

Beschermende maatregelen tegen PepMV in de tomatenteelt

Vertrouwelijk

Verslag van de onderdelen selectie en karakterisering zwakke stam en kasproef (cross-protectie)

Ineke Stijger, Roel Hamelink, René van der Vlugt, Ruud Kaarsemaker & Adriaan Vermunt





Beschermende maatregelen tegen PepMV in de tomatenteelt

Vertrouwelijk

Verslag van de onderdelen selectie en karakterisering zwakke stam en kasproef (cross-protectie)

Ineke Stijger¹, Roel Hamelink¹, René van der Vlugt², Ruud Kaarsemaker³ & Adriaan Vermunt³

¹ Wageningen UR Glastuinbouw

² Plant Research International

³ Groen Agro Control

© 2008 Wageningen, Wageningen UR Glastuinbouw

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Wageningen UR Glastuinbouw.

Wageningen UR Glastuinbouw is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



Projectnummer: 32 41110400

PT nummer: 12384

Wageningen UR Glastuinbouw

Adres : Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk
: Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk
Tel. : 0317 - 48 56 06
Fax : 010 - 522 51 93
E-mail : glastuinbouw@wur.nl
Internet : www.glastuinbouw.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
1 Inleiding	3
1.1 Doel	3
2 Deelproject Selectie en karakterisering van zwakke stammen (onderdeel A)	5
2.1 Inleiding	5
2.2 Doel	5
2.3 Uitvoering	6
2.4 Resultaten	6
3 Deelproject Cross-protectie proef (onderdeel B)	9
3.1 Inleiding	9
3.2 Doel	9
3.3 Uitvoering	9
3.4 Resultaten	10
4 Conclusies en discussie	27
Bijlage I Formulier waarneming symptomen praktijkbedrijf	31
Bijlage II Plattegronden kasproef 2006 Naaldwijk	33
Bijlage III Korte vertrouwelijke verslagen PepMV project (kasproef)	39
Bijlage IV Waarneming symptomen	51
Bijlage V Totale opbrengst per ras	59

Samenvatting

Vanaf 2004 is er een duidelijke toename van de schade die pepinomozaïekvirus (PepMV) veroorzaakt in de tomatenteelt. Het virus uit zich veel duidelijker in heftigere bladsymptomen in het begin van de teelt maar ook bijkomende vruchtsymptomen in de tweede helft van de teelt (vanaf juli-augustus). Het virus uit zich in de vorm van grauwe kronen tot vlekkerige en zachte vruchten en verminderde houdbaarheid, kortom een kwaliteitsprobleem. De economische schade hiervan is zeer aanzienlijk.

Vanuit de sector is de vraag gesteld of een mogelijke zwakke stam van het PepMV een oplossing zou kunnen bieden voor de huidige problemen. Dit naar analogie met de zwakke stam van tomatenmozaïekvirus (MII-16) die in het verleden werd ingezet om schade veroorzaakt door sterke stammen van dit virus te beperken.

Het oorspronkelijke PepMV isolaat dat in 1999 voor het eerst in Nederland werd waargenomen, gaf in de beginperiode slechts beperkte bladsymptomen en de economische schade was gering. PepMV heeft zich sinds de eerste vondst sterk verspreid. Het niet goed schoonmaken aan het eind van de teelt of zelfs bewuste verspreiding heeft hieraan bijgedragen. Voor die bewuste verspreiding wordt gebruik gemaakt van isolaten die van verschillende plaatsen afkomstig zijn (uit binnen- en buitenland) en die gekozen worden op grond van hun zwakke symptomen.

Het in dit verslag beschreven project 'Beschermende maatregelen tegen PepMV in de tomatenteelt' bestaat uit een aantal deelprojecten die onderling samenhangen en zijn afgestemd. Deze deelprojecten zijn:

Onderdeel A: Selectie en karakterisering (symptomen en verspreiding) van verschillende zwakke isolaten.

Onderdeel B: Kasproef (Cross-protectie).

Onderdeel C: Monitoring bedrijven PepMV besmetting (al dan niet opzettelijk geïnfecteerd) (niet in dit verslag, separaat gerapporteerd door GAC).

Onderdeel D: Ontwikkelen bio-assay voor het vaststellen agressiviteit PepMV (niet in dit verslag, separaat gerapporteerd door GAC).

Selectie en karakterisering van stammen

Door Wageningen UR Glastuinbouw en PRI zijn de afgelopen jaren uit de Nederlandse praktijk en via bedrijven en buitenlandse collega's veel isolaten van PepMV verzameld. Vrijwel allemaal zijn deze biologisch (symptomen) en moleculair (RNA-sequentie) gekarakteriseerd. Na een grondige analyse van alle data werd geconcludeerd dat het originele tomatenisolaat 1066, voor het eerst in 1999 in Nederland aangetroffen werd, als een betrouwbaar echt zwak isolaat beschouwd kan worden. De RNA sequentie is helemaal bekend en alle testen die in de loop van de jaren met dit zuiver isolaat uitgevoerd zijn, hebben nooit enige schade of sterk symptoom laten zien.

Daarom is besloten om in de uit te voeren kasproef vanuit Wageningen UR glastuinbouw 1066 als standaard zwakke stam in te brengen.

Als necrotisch isolaat is DB1 ingebracht. DB1 is al enige jaren geleden in Nederland gevonden en in vele proeven op tomaat onder verschillende omstandigheden steeds duidelijk necrotisch gebleken. Binnen dit onderzoek is de volledige sequentie van dit isolaat bepaald. Uit vergelijkingen tussen het genetische materiaal van DB1, 1066 en verschillende andere PepMV praktijkisolaten en -stammen, waarvan verschillende door PRI bepaald, bleek dat DB1 duidelijk tot de tomatengroep behoort. Toch bevat de sequentie van DB1 in totaal 19 unieke nucleotiden die in geen enkel ander isolaat voorkomen. Het blijft vooralsnog onbekend of en welke van deze verschillen een rol spelen in de heftige symptomen die DB1 veroorzaakt. Dit isolaat kan wel meer inzicht geven in waarom een isolaat heftige symptomen kan veroorzaken en die te helpen (tijdig) te herkennen.

Cross-protectie (kasproef)

Virusconcentratie

Alle virusinfecties zijn gevolgd in de tijd m.b.v. DAS-ELISA. Daarmee kon nauwkeurig de virusconcentratie in elke plant gemeten worden. De resultaten van de toetsingen laten duidelijk zien dat beide sterke isolaten een veel hogere concentratie in de plant bereiken dan de zwakke isolaten. Ook is de totale virus concentratie in de menginfecties lager. De virusconcentratie blijft duidelijk het laagst bij de infecties met alleen 1066 of alleen V1.

Uit alle proeven blijkt steeds dat de sterke isolaten een hogere concentratie bereiken. In menginfecties blijkt ook dat de totale virusconcentratie in die planten steeds tussen de concentraties van de zwakke en sterke isolaten in te liggen. Wellicht zorgen de eerste infecties met de zwakke stammen ervoor dat de totale virus concentraties lager uitvallen dan in het geval van een sterk virus alleen (tussen de 2 en 4 x afhankelijk van de periode in de teelt).

Opbrengst

In het onderzoek is vastgesteld dat de cross-protectie heeft voldaan in die zin dat de opbrengsten niet sterk zijn gedaald. De totale opbrengst ligt zoals verwacht bij de geënte planten hoger dan bij de ongeënte planten. De opbrengst van de planten geïnfecteerd met alleen het necrotisch isolaat (DB1) blijven sterk achter bij alle andere behandelingen en dit geldt ook voor de planten die alleen met het chlorotisch isolaat (V3) zijn geïnoculeerd. De resultaten moeten als een indicatie worden gezien omdat vanwege de besmettelijkheid van PepMV voor een bepaalde opzet van het onderzoek is gekozen. Dit betekent dat de statische betrouwbaarheid van de resultaten niet kon worden getoetst.

Samenvattend algemene conclusies:

- Selectie en karakterisering van stammen
 - i. Op het praktijkbedrijf waar opzettelijk 1066 was ingebracht is de teelt goed verlopen en zijn geen grote problemen opgetreden.
 - ii. Naast 1066 werd in een aantal gevallen ook de (op dat moment) nieuwe US2 stam vastgesteld.
 - iii. In een infectie proef met zwakke en sterke stammen is vastgesteld dat ze apart en in menginfecties in de planten kunnen voorkomen.
- Cross-protectie
 - i. De absolute hoeveelheid van het virus is met de kwalitatieve toetsmethode (ELISA) bepaald en met de kwantitatieve toetsmethode (Q-PCR) is wel de aanwezigheid van verschillende isolaten vastgesteld maar kon niet de concentratie van het virus altijd voldoende betrouwbaar worden bepaald.
 - ii. De sterkere isolaten hebben een hogere concentratie virus dan de zwakke of de combinatie.
 - iii. De zwakke stammen 1066 en V1 hebben gedurende het gehele teeltseizoen geen of nauwelijks symptomen op de planten laten zien. Ook reageren de sterkere (heftige symptomen) isolaten met minder symptomen op planten die eerst zijn geïnfecteerd met een zwakke stam in vergelijking met inoculatie op planten zonder zwakke stam.
 - iv. In dit onderzoek is vastgesteld dat de cross-protectie heeft voldaan in die zin dat de opbrengsten niet sterk gedaald zijn.

1 Inleiding

Vanaf 2004 is er een duidelijke toename van de schade die pepinomozaïekvirus (PepMV) veroorzaakt in de tomatenteelt. Het virus uit zich veel duidelijker in heftigere bladsymptomen in het begin van de teelt maar ook bijkomende vruchtsymptomen in de tweede helft van de teelt (vanaf juli-augustus). Het virus uit zich in de vorm van grauwe kronen tot vlekkerige en zachte vruchten en verminderde houdbaarheid, kortom een kwaliteitsprobleem. De economische schade hiervan is zeer aanzienlijk.

Vanuit de sector is de vraag gesteld of een mogelijke zwakke stam van het PepMV een oplossing zou kunnen bieden voor de huidige problemen. Dit naar analogie met de zwakke stam van tomatenmozaïekvirus (MII-16) die in het verleden werd ingezet om schade veroorzaakt door sterke stammen van dit virus te beperken.

Het oorspronkelijke PepMV isolaat dat in 1999 voor het eerst in Nederland werd waargenomen, gaf in de beginperiode slechts beperkte bladsymptomen en de economische schade was gering. PepMV heeft zich sinds de eerste vondst sterk verspreid. Het niet goed schoonmaken aan het eind van de teelt of zelfs bewuste verspreiding heeft hieraan bijgedragen. Voor die bewuste verspreiding wordt gebruik gemaakt van isolaten die van verschillende plaatsen afkomstig zijn (uit binnen- en buitenland) en die gekozen worden op grond van hun zwakke symptomen.

Uit eerder door Wageningen UR Glastuinbouw (voorheen Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, PPO) en Plant Research International uitgevoerd onderzoek blijkt dat het genetische materiaal van het virus bij willekeurige doorvermeerdering verandert. In 2004 zijn bij diverse telersgroepen verschillende vormen van het virus aangetroffen. Ook zijn in binnen- en buitenland inmiddels een aantal isolaten en nieuwe stammen van PepMV beschreven, met duidelijke verschillen in hun genetisch materiaal, die heftige symptomen op blad, vrucht en stengel veroorzaken. Echter, het is nog niet bekend welk verschil (of welke verschillen) daar voor verantwoordelijk is (of zijn). Grondige kennis hiervan is een absolute voorwaarde om sterke en zwakke isolaten (snel) te kunnen onderscheiden en uiteindelijk de kwaliteit van de te ontwikkelen zwakke stam te controleren en garanderen. De nieuwe stammen van PepMV hebben zich sinds 2005 snel verspreid en komen nu al op veel plaatsen in Europa voor. Ook in Nederland zijn al in 2005 de eerste besmettingen vastgesteld. De tomatenstam geeft geen bescherming tegen een besmetting met de nieuwe stammen en in de praktijk komen beide stammen vaak samen in een plant voor. Er zijn aanwijzingen dat dit tot meer uitgesproken symptomen kan leiden.

In de praktijk wordt opzettelijk besmet met onbekend materiaal. Vaststaat dat dit onbekend materiaal al deels uit mengsels van isolaten en stammen van PepMV bestaat. Ook is men minder alert op wat er gedurende de teelt nog aan virus bij kan komen. Hierdoor is de situatie ontstaan dat er in Nederland op dit moment meerdere isolaten van PepMV voorkomen. In hoeverre dat die verantwoordelijk zijn voor de heftige symptomen en schade is niet bekend.

1.1 Doel

Het project 'Beschermende maatregelen tegen PepMV in de tomatenteelt' beschrijft het raamwerk betreffende het onderzoek naar pepinomozaïekvirus in de komende jaren. Het oorspronkelijke projectplan bestaat uit een aantal deelprojecten die onderling samenhangen en afgestemd worden. Deze deelprojecten zijn:

- Onderdeel A: Selectie en karakterisering (symptomen en verspreiding) van verschillende zwakke isolaten.
- Onderdeel B: Kasproef (Cross-protectie).
- Onderdeel C: Monitoring bedrijven PepMV besmetting (al dan niet opzettelijk geïnfecteerd) (niet in dit verslag, separaat gerapporteerd door GAC).
- Onderdeel D: Ontwikkelen bio-assay voor het vaststellen agressiviteit PepMV (niet in dit verslag, separaat gerapporteerd door GAC).

De ontwikkeling van een zwakke stam van PepMV die de schadelijke effecten van PepMV beperkt.

Eén van de voorwaarden voor het op langere termijn slagen van een 'zwakke stam strategie' is dat 'sterke stammen' uitgebannen worden. Dit zal alleen mogelijk zijn als iedereen zich houdt aan een aantal strikte uitgangspunten. Door toepassing van dezelfde zwakke stam door alle telers die besluiten opzettelijk te besmetten, wordt per teelt in ieder geval gestart met een en hetzelfde virus. Willekeurige en mogelijk schadelijke genetische mutaties worden hiermee zo veel mogelijk beperkt.

Cruciaal in deze strategie is echter wel dat:

1. Elk jaar iedere teler die besluit vroeg te besmetten dit alleen doet met getest en goedgekeurd zwakke isolaat.
2. Niemand nog onbekend en niet gekarakteriseerd materiaal hiervoor gebruikt.
3. Strikte hygiëne tijdens de teelt geldt en infecties met onbekende isolaten of andere virussen voorkomen worden.
4. Alle gewassen en alle mogelijke bronnen van PepMV aan het eind van de teelt totaal vernietigd worden.

2 Deelproject Selectie en karakterisering van zwakke stammen (onderdeel A)

2.1 Inleiding

In het projectvoorstel dat in augustus 2005 is geschreven is voor onderdeel A het plan van aanpak als volgt opgesteld:

- Fase 1, Selectie en karakterisering (symptomen en verspreiding) van verschillende zwakke isolaten. Vaststellen en beschrijven van typische biologische en genetische kenmerken van een 'zwakke stam' en van een 'sterke stam' en het ontwikkelen van toetsen hiervoor. Onderzoek zal worden uitgevoerd in kortlopende proeven. In dit onderzoek kan gebruik gemaakt worden van kennis die al eerder door PRI en Wageningen UR Glastuinbouw verzameld is en de testen die GAC ontwikkelt. Kansrijke virusisolaten verzameld door Wageningen UR Glastuinbouw en GAC zullen in dit onderzoek worden meegenomen.
- Fase 2, december 2006 t/m november 2007:
In kasproeven vaststellen van bescherming door zwakke stam op diverse rassen en onder verschillende omstandigheden (tijdstip van infectie, belichte vs. onbelichte teelt etc.).
Borgen van voldoende zwakte van de 'zwakke stam' door biologische toetsingen.
- Fase 3, december 2007 t/m november 2008:
Toetsen van bescherming onder (semi) praktijkcondities.
Overleg met alle betrokken partijen over toelatingen en registratie van zwakke PepMV stam.
- Fase 4, december 2008 t/m november 2009:
Uitwerken van productie op grotere schaal. (Wageningen UR Glastuinbouw en PRI)

Praktijkbedrijf

Nog voordat hier mee begonnen zou worden begonnen veranderde de opzet enigszins. Dit is in overleg met de BCO tomaat tot stand gekomen.

Bij een deelnemende teler aan het onderzoek in 2005 is vastgesteld dat daar de (op dat moment) nieuwe US2 stam voorkwam en niet bekend was welke problemen dat zou kunnen geven in de volgende teelt (US2 is nu, 2008, bekend als Chili2). Aan de teler is het voorstel gedaan om zijn planten in een jong stadium te inoculeren met het zwakke isolaat 1066 en dit gedurende het gehele jaar te volgen. Voor het onderzoek betekende dit dat er op vrij grote schaal gevolgd kon worden wat cross-protectie op een praktijkbedrijf zou kunnen betekenen.

Voor de start van dit onderzoek is de PD op de hoogte gebracht middels een uitgebreide schriftelijke uitleg wat er bij de teler allemaal gedaan zou worden en waarom. Hierop hebben Wageningen UR Glastuinbouw en PRI een schriftelijke reactie gekregen dat de PD kennis genomen hebben van ons onderzoek en daar mee akkoord ging onder de voorwaarde van diverse maatregelen. Zoals dat aan het eind van teelt al het plantaardig materiaal moet worden vernietigd en het verbod op het verhandelen van de zaden afkomstig van de geïnfecteerde planten.

De naam van de teler is op verzoek van de teler alleen bij de onderzoekers bekend.

2.2 Doel

Doel van dit onderdeel is nagaan of er een 'zwakke' stam van PepMV is die voldoende bescherming biedt, onder verschillende omstandigheden, tegen 'sterkere' stammen van PepMV.

2.3 Uitvoering

Praktijkbedrijf

Bij de teler zijn de tomatenplanten opzettelijk geïnfecteerd met het zwakke PepMV isolaat 1066. Voordat de planten zijn geïnoculeerd zijn deze eerst getest om na te gaan of ze nog virusvrij waren. De planten bleken allen, vijf weken na poten, nog vrij van virus te zijn. Op dit bedrijf met 6 ha tomatenplanten is de inoculatie uitgevoerd door gezonde tomatenbladeren te dopen in een suspensie van gemalen, geïnfecteerde bladeren en door alle paden te lopen. Hierbij zijn de onderste bladeren van de planten geraakt.

Twee weken na inoculatie zijn er bladmonsters verzameld en getoetst met ELISA.

De teler heeft per week een logboek bijgehouden (zie Bijlage I voor voorbeeldformulier waarneming symptomen) en per maand zijn er bladmonsters op dit bedrijf genomen.

Analyse van PepMV stammen

Van een necrotisch isolaat van PepMV (DB1) is door PRI de volledige sequentie bepaald. Deze sequentie is vergeleken met de sequentie van het standaard tomatenisolaat (1066) en sequenties van andere gepubliceerde PepMV isolaten. Diverse monsters van het praktijkbedrijf en van diverse praktijkbedrijven zijn m.b.v. RT-PCR en stam-specifieke primers geanalyseerd op de aanwezigheid van verschillende PepMV stammen. Hiervoor zijn door PRI primersets ontwikkeld die goed onderscheid mogelijk maken tussen de tomatenstam en de US2 stam (op basis van uitgebreide toetsingen en zelf bepaalde en gepubliceerde sequentiegegevens).

2.4 Resultaten

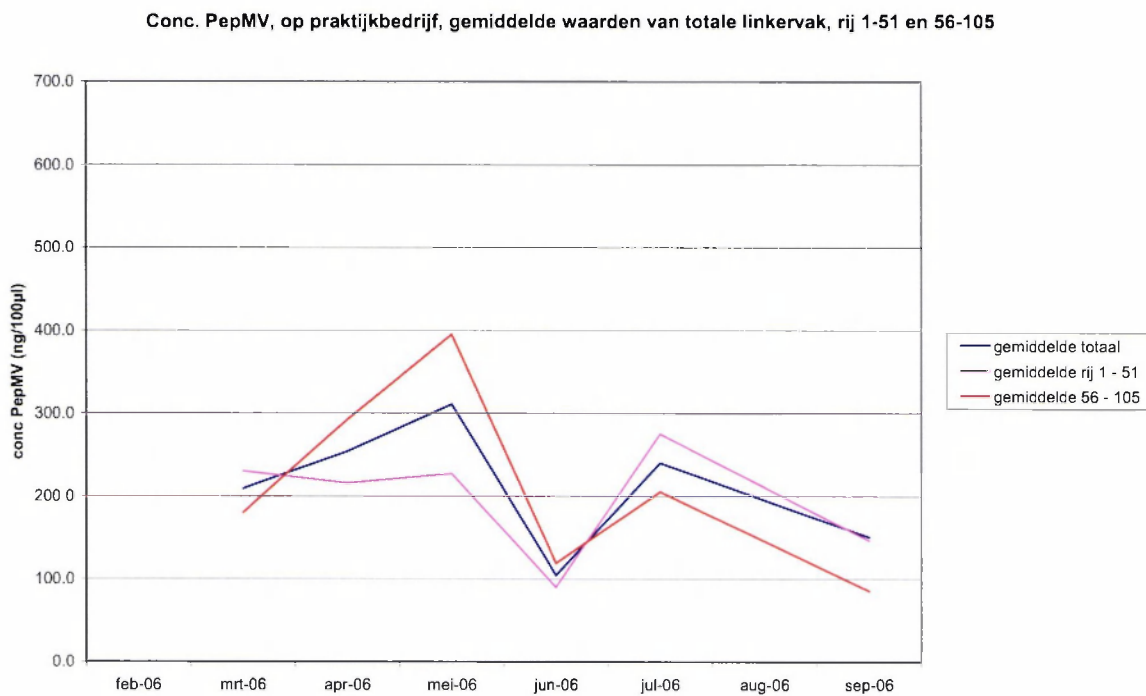
Praktijkbedrijf

De eerste bladsymptomen zijn door de teler één week na langslopen met besmet blad waargenomen. Bij de eerste toetsing bleek uit de ELISA uitslagen dat in een aantal planten het virus (nog) niet kon worden aangetoond. Bij de volgende toetsing bleek het virus (1066) wel in de planten aanwezig te zijn.

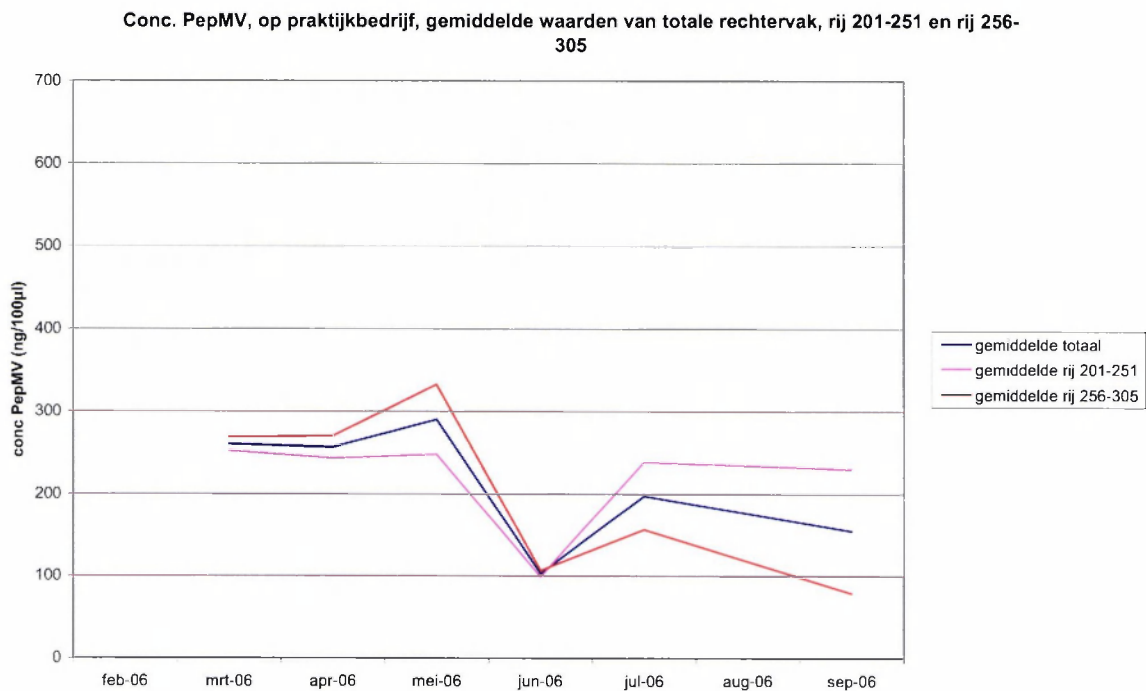
Het gehele seizoen zijn betrekkelijk weinig symptomen waargenomen met uitzondering van een pad waarin begin maart op een aantal planten vreemde vooral necrotische symptomen zijn waargenomen. Na genetische analyse van dit materiaal bleek geen ander PepMV isolaat dan de zwakke tomatenstam 1066 aanwezig te zijn. Dit wil niet zeggen dat de zwakke stam 1066 ook verantwoordelijk is voor de ontwikkeling van de ontstane symptomen. De symptomen zijn na verloop van tijd weer weggetrokken maar eind augustus zijn ze weer op de planten verschenen en niet meer weggetrokken. Deze planten zijn op andere virussen getest en ook op verschillende schimmels maar er kon alleen PepMV worden aangetoond.

Gedurende de gehele teelt zijn de bladmonsters met ELISA getest met als resultaat dat in het begin van het jaar wat hogere virusconcentraties zijn gevonden dan later in het jaar. Vanaf de zomer tot aan de laatste monsternamedag lijkt deze concentratie ook niet veel verder meer terug te lopen. Er zijn geen grote verschillen gevonden tussen de monsters van dezelfde monsterdag. Zie Figuur 1 en 2 voor het concentratieverloop waarbij de gemiddelde zijn vermeld van een aantal rijen aan de linkerkant van het bedrijf en van een aantal rijen aan de rechterkant van het bedrijf. De planten met afwijkende symptomen vertoonden geen grote afwijking met betrekking tot de concentratie van het virus.

Uit diverse analyses van het genetische materiaal van monsters die gedurende het jaar genomen zijn bleek dat alle planten besmet waren met het geïnoculeerde isolaat 1066. Een deel echter bleek daarnaast ook besmet met de nieuwe US2 stam.



Figuur 1. Gemiddelde virusconcentratie in de planten van een aantal rijen aan de linkerkant van het bedrijf.



Figuur 2. Gemiddelde virusconcentratie in de planten van een aantal rijen aan de rechterkant van het bedrijf.

Volledige sequentie van DB1

De volledige sequentie van het necrotische isolaat DB1 is door PRI bepaald om na te gaan of en in hoeverre dit isolaat verschilt van het zwakke isolaat 1066. Het genoom van DB1 bestaat uit 6414 nucleotiden, exclusief de poly-A staart. Het is daarmee 6 nucleotiden korter dan de standaard zwakke tomatenstam 1066. Rechtstreekse vergelijking van de RNA-sequenties van DB1, 1066 en alle andere beschikbare sequentie van PepMV laat een paar opvallende zaken zien. Op de eerste plaats heeft DB1 in totaal 19 nucleotiden die uniek zijn voor dit isolaat. Dat wil zeggen dat op 19 plaatsen in het genoom nucleotiden zitten die afwijken van alle andere PepMV sequenties.

De (biologische) betekenis hiervan is nog een vraagteken. Enkel onderzoek m.b.v. een infectieuze kloon van dit virus kan daarin helderheid brengen.

Wat verder opvalt, is dat een directe vergelijking tussen DB1 en 1066, in totaal 47 nucleotiden verschil laat zien en dat in een totale vergelijking DB1 diverse overeenkomsten vertoont met een recentelijk gepubliceerde sequentie van een isolaat uit Chili.

De algemene vergelijkingen van alle sequenties geeft wel een duidelijke indeling in groepen te zien. De grootste groep bevat de tomaten en pepino isolaten. DB1 behoort duidelijk tot deze groep. Deze groep van isolaten is de zgn. tomaten groep. Dit is het virus dat in 1998 Europa en in 1999 Nederland is binnengekomen. De tweede groep bestaat uit de US isolaten. Hierin zitten US1 en US2. Inmiddels staat wel vast dat er meerdere isolaten in Europa voorkomen die tot deze groep behoren. Helaas zijn alle gegevens erg fragmentarisch zodat er nog geen goed totaalbeeld is. Een conclusie is wel duidelijk te trekken. Isolaten uit de US groep komen zeker in Nederland en Spanje voor en zijn zeer waarschijnlijk ook verder over Europa verspreid. Deze US isolaten zijn tot nu toe altijd in menginfecties met de tomatenstam of de pepinostam aangetroffen. Deze menginfecties lijken voor PepMV eerder regel dan uitzondering te zijn en zouden wel eens de belangrijkste oorzaak voor de toenemende problemen met het virus kunnen zijn, ook omdat daarmee de kans op recombinante vormen van PepMV zeer reëel wordt.

De derde groep bestaat uit de zgn Chili-isolaten. Deze vertonen overeenkomsten met de US isolaten. Op dit moment (eind 2007) is duidelijk geworden dat het Chili-2 isolaat inmiddels wijd verspreid is geraakt binnen Nederland. Er is een grote overeenkomst met het US2 isolaat. Goed en vooral betrouwbaar onderscheid tussen de verschillende PepMV groepen (tomaat, US en Chili) is nog niet mogelijk. Diverse genetisch testen die door ervaren internationale onderzoeksgroepen zijn ontworpen bleken vrijwel nooit 100% betrouwbare resultaten te geven. PepMV blijkt erg snel te veranderen en daarmee als het ware de testen steeds een stap voor te blijven. Binnen het nieuwe EU project PEPEIRA, wat in februari 2007 van start is gegaan, is een belangrijke plaats ingeruimd om de verschillen en maar vooral ook overeenkomsten tussen alle in Europa aanwezige isolaten te bepalen en onderscheidende testen te maken.

De sequentiegegevens van DB1 zijn gebruikt om te bevestigen dat in de infectieproef met zwakke en sterke stammen, uitgevoerd bij Wageningen UR Glastuinbouw in Naaldwijk, inderdaad DB1 en de tomatenstam apart en in menginfecties voorkwamen. Dit is gedaan door op verschillende tijdstippen gedurende het seizoen uit planten RNA te isoleren en de sequenties van verkregen RT-PCR fragmenten te bepalen en te vergelijken.

Toetsing op voorkomen van dubbelinfecties

Op basis van eigen en literatuurgegevens zijn door PRI RT-PCR primersets ontwikkeld waarmee onderscheid gemaakt kan worden tussen de tomatenstam en de US2 stam. Toepassing van deze sets in de praktijkproef bevestigde de bevinding van 2005 dat US2 al in Nederland voorkomt en in een menginfectie met de tomatenstam aangetroffen wordt. In begin februari zijn 40 monsters uit de praktijkproef bij de teler getoetst. De specificiteit van een deel van de verkregen RT-PCR fragmenten is gecontroleerd d.m.v. sequentieanalyses. Alle monsters waren geïnfecteerd met de tomatenstam en 11 monsters bleken ook besmet met de US2 stam. Dit wijst erop dat de bron van de US2 niet in het inoculum lag.

3 Deelproject Cross-protectie proef (onderdeel B)

3.1 Inleiding

In het tweede onderdeel van het parapluplan PepMV is in kasproeven (vier afdelingen) onderzoek gedaan naar de mate van bescherming van twee zwakke isolaten te weten V1 en 1066 tegen twee isolaten, V3 en DB1 met heftige symptomen. Waarbij V3 vooral chlorotische symptomen geeft en DB1 necrotische symptomen.

Bij deze kasproeven zijn zeer uitgebreide hygiënemaatregelen genomen om verspreiding tussen de isolaten te voorkomen. Zoals één vaste medewerker die alle werkzaamheden heeft verricht die in een protocol zijn opgenomen met aparte kleding en schoeisel voor de diverse plantgroepen. Van groot belang van slagen van deze proeven was de werkvolgorde waarin beslist geen fouten gemaakt mochten worden. Zo is het gelukt om de onbehandelde planten gedurende de gehele teelt vrij van virus te houden (geen symptomen en vastgesteld na herhaalde malen toetsen) door het nemen van uitgebreide hygiëne maatregelen.

3.2 Doel

Doel van dit onderdeel van het onderzoek is de mate van bescherming na te gaan van twee bekende 'zwakke isolaten' tegen twee isolaten met heftige symptomen onder semi-praktijkomstandigheden.

3.3 Uitvoering

In vier kasafdelingen bij Wageningen UR Glastuinbouw te Naaldwijk zijn op 2 januari 2006 de planten in de kas gezet. De diverse groepen planten zijn gescheiden door rijen paprikaplanten (zie Bijlage II voor de kasplattegronden). In overleg met de BCO zijn in deze proef drie, veel in de praktijk geteelde, cultivars geplant te weten Cedrico, Ever en Ingar. Hierbij is de helft van de planten geënt en de helft ongeënt.

Van alle planten is de symptoomontwikkeling nagegaan en zijn bladmonsters genomen.

Met behulp van DAS-ELISA is de aanwezigheid van het virus gecontroleerd en de concentratie van het virus bepaald. Met deze methode is het mogelijk om de absolute hoeveelheid virus in het monster aan te tonen. Door GAC zijn ook monsters genomen en getoetst met behulp van Q-PCR. Met behulp van deze testen zouden de verschillende isolaten te volgen zijn en de verhouding ten opzichte van elkaar bepaald kunnen worden.

Alle planten zijn op 6 januari getoetst met ELISA op de afwezigheid van virus. Na toetsing bleken alle planten nog vrij van virus te zijn.

Op 12 januari is bij de uitgezette vakken de behandeling met het zwakke isolaat 1066 uitgevoerd. Per plant is het eerste gestrekte blad net onder de kop geïnoculeerd. Eén dag later is de behandeling met het zwakke isolaat V1 uitgevoerd. Dit is op dezelfde wijze uitgevoerd als met 1066. De rest van de planten zijn niet geïnoculeerd.

Om vast te stellen of de planten na inoculatie ook daadwerkelijk besmet waren, zijn één week na inoculatie (19 januari voor 1066 en 20 januari voor V1) de planten bemonsterd en getoetst met DAS-ELISA. Weer een week later (27 januari) zijn alle planten nogmaals getoetst en vervolgens op 3 februari en de laatste maal op 10 februari.

Op 23 februari zijn de twee isolaten DB1 (necrotisch) en V3 (chlorotisch) geïnoculeerd op controle planten en op een deel van de planten die of met 1066 of met V1 al waren geïnoculeerd. Daarnaast zijn groep planten in de proef niet geïnoculeerd die als gezonde controle dienen.

Oogst

De vruchten zijn per week geoogst en beoordeeld.

3.4 Resultaten

Symptomen

Gedurende de gehele teelt zijn symptomen gevolgd en samengevat in verslagen die naar de BCO leden per e-mail zijn verstuurd. Deze verslagen beschrijven meestal een periode van een aantal weken waarin de voortgang (waaronder ook de stand van het gewas) en de bijzonderheden van de kasproef zijn genoteerd. Soms ook met foto's van de symptomen die in die periode zijn waargenomen (zie Bijlage III). In Bijlage IV staan in Tabel 1 tot en met 14 uitgebreide informatie over het aantal maal dat er symptomen zijn waargenomen in een veld met desbetreffende virusbehandeling en gemiddelde waarde van alle dagen dat er symptomen in het veld zijn waargenomen. Hieronder staat kort samengevat de symptoomontwikkeling gedurende de gehele teelt.

De planten geïnoculeerd met 1066 of V1 hebben gedurende de gehele teelt geen of nauwelijks bladsymptomen laten zien. Ook was opvallend dat er over het algemeen weinig vruchtsymptomen zijn geconstateerd. Met uitzondering van enkele planten die wel vruchtsymptomen gaven. Als er al op de vruchten iets te zien was dan was het wankleurigheid. Op alle rassen kwamen in februari de eerste bladsymptomen (van heel licht tot heftig bij het necrotische isolaat) te voorschijn om vervolgens weer nagenoeg te verdwijnen. Vanaf juli kwamen ze langzaam weer terug. Uitzondering waren de planten geïnfecteerd met DB1 die gedurende de gehele teelt necrotische symptomen hebben gegeven. Eind mei/begin juni zijn necrotische symptomen gevonden bij planten die eerst met V1 of 1066 waren geïnfecteerd en vervolgens met het necrotische isolaat DB1. Deze necrotische symptomen zijn afgenomen maar zijn nooit helemaal verdwenen. Dit geeft dus aan dat DB1 inderdaad op zichzelf maar ook in combinatie met andere isolaten necrotische symptomen kan veroorzaken. Volgens alle op dit moment beschikbare genetische testen behoort DB1 duidelijk tot de tomatengroep.

Cedrico: in beide combinaties (V1 en DB1, 1066 en DB1) op zowel geënte als ongeënte planten is geen necrose waargenomen.

Ever: in dit ras zijn de heftigste symptomen van DB1 vastgesteld.

Ingar: bij dit ras waren de necrose veroorzaakt door DB1 minder heftig dan bij Ever.

Toetsingen (op aanwezigheid van virus uitgevoerd m.b.v. ELISA)

Uit de toetsing van 19 en 20 januari bleek dat alle planten geïnoculeerd met 1066 voor 100% ziek waren en van de planten geïnoculeerd met V1 was pas 23% ziek. Op 27 januari was dit percentage voor V1 opgelopen naar 33% en een week later was dit 85%. Uiteindelijk bleken de planten voor 100% ziek bij de toetsing op 13 februari.

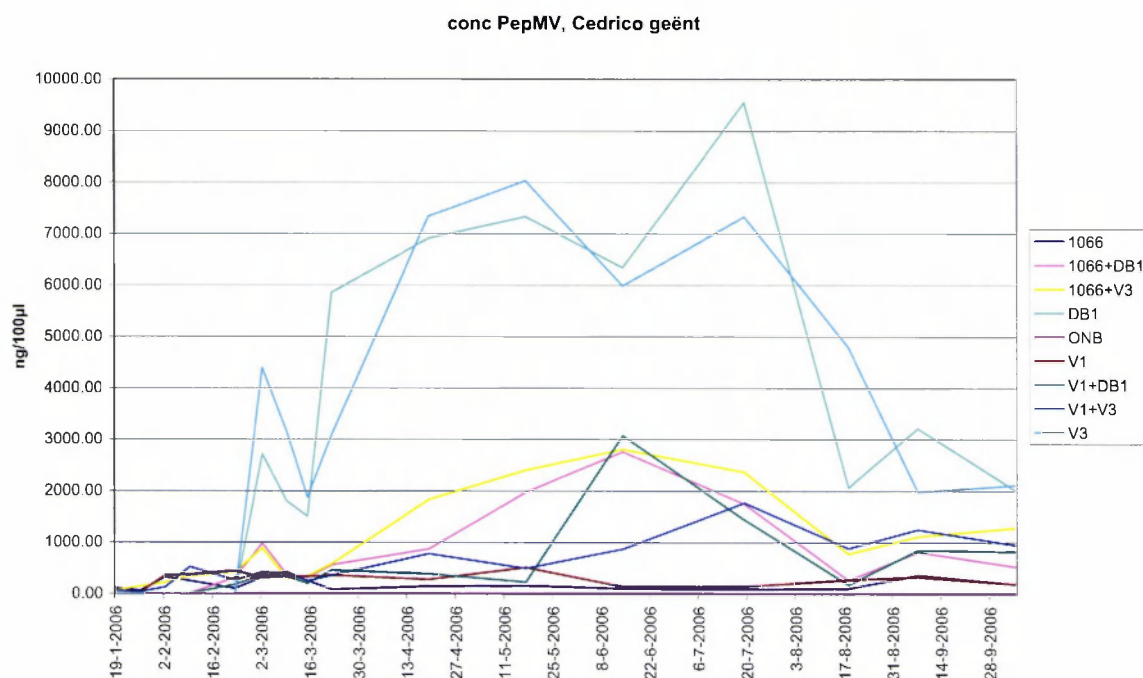
Concentratie (uitgevoerd m.b.v. ELISA)

Over het concentratieverloop zijn per ras de volgende bijzonderheden (kort) te vermelden:

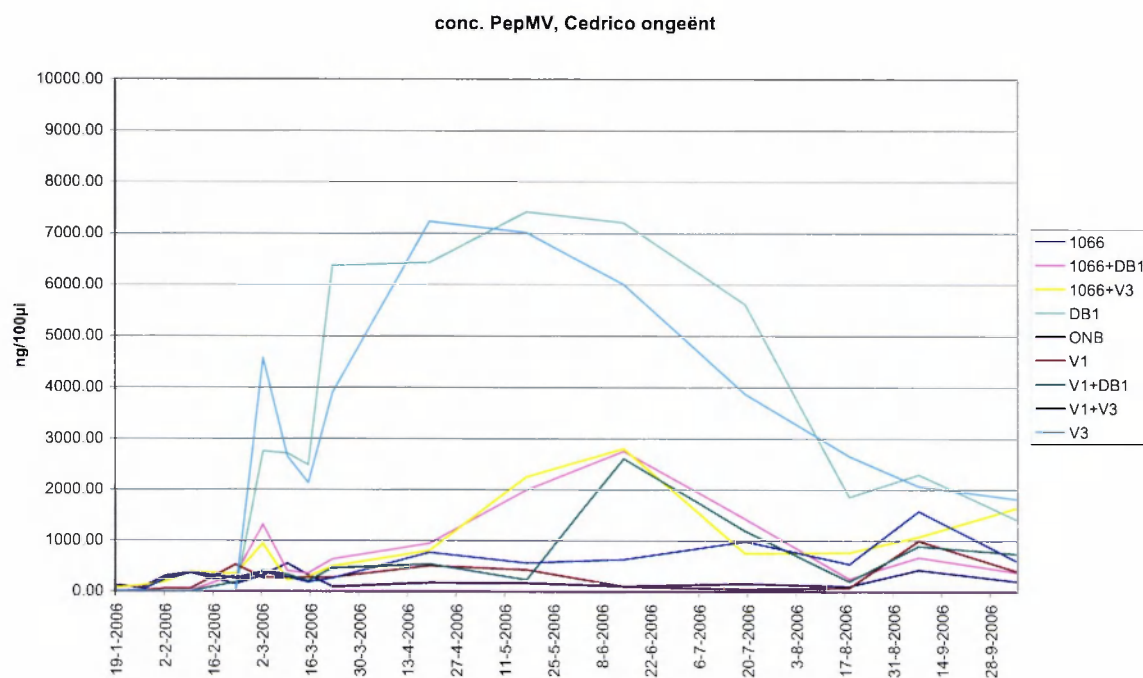
Cedrico (Figuur 3 en 4): tussen geënte en ongeënte zijn geen grote verschillen waargenomen. De concentratie van de isolaten DB1 en V3 zijn verreweg het hoogste in vergelijking met alleen 1066 of V1 en de combinaties. Gedurende de teelt zijn er verschillende pieken te zien. Half juni is er wel een lichte piek waar te nemen bij de combinaties (V1 + DB1 of V3, 1066 + DB1 of V3) in vergelijking met alleen 1066 of V1.

Ever (Figuur 5 en 6): hier een vergelijkbaar beeld als bij Cedrico met het verschil dat bij de geënte planten de concentratie van alleen DB1 en V3 wat lager ligt dan bij de ongeënte planten.

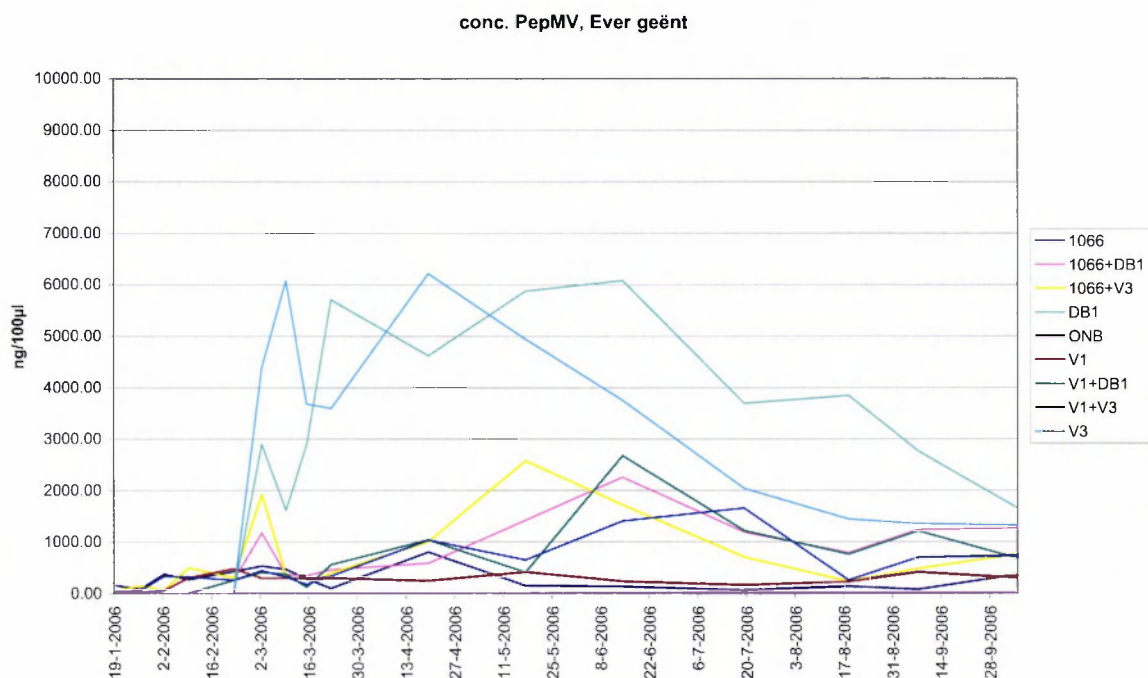
Ingar (Figuur 7 en 8): ook hier een vergelijkbaar beeld als bij Cedrico.



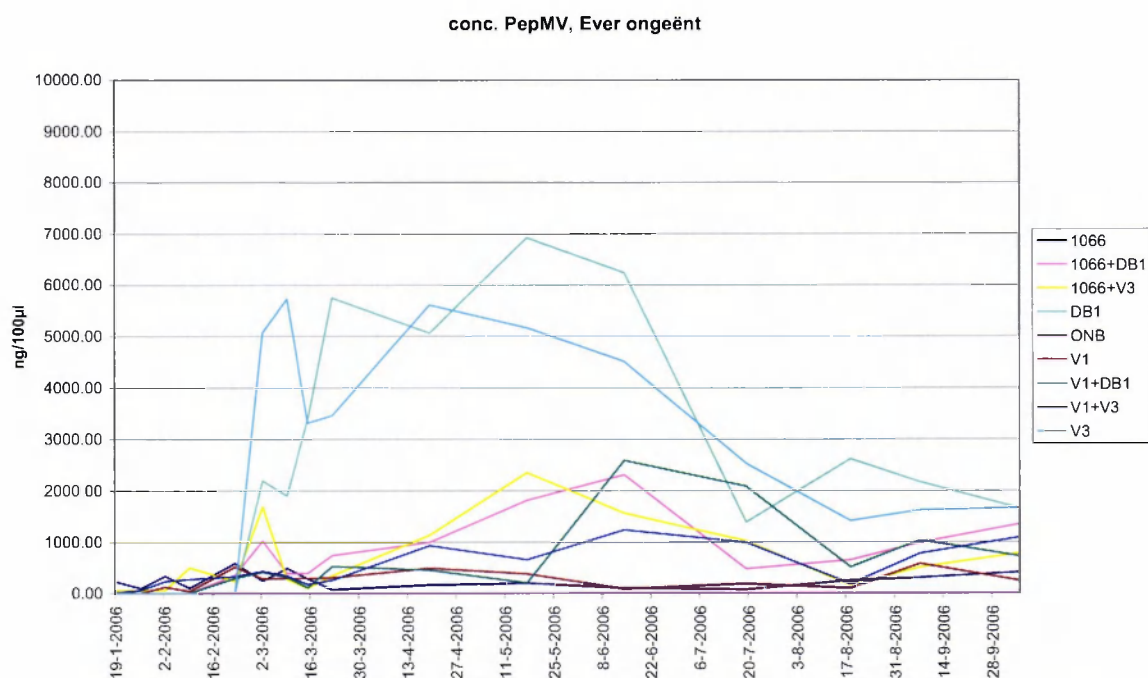
Figuur 3. Virusconcentratie in de planten van het ras Cedrico (geënte planten) gemeten op verschillende tijdstippen gedurende de teelt.



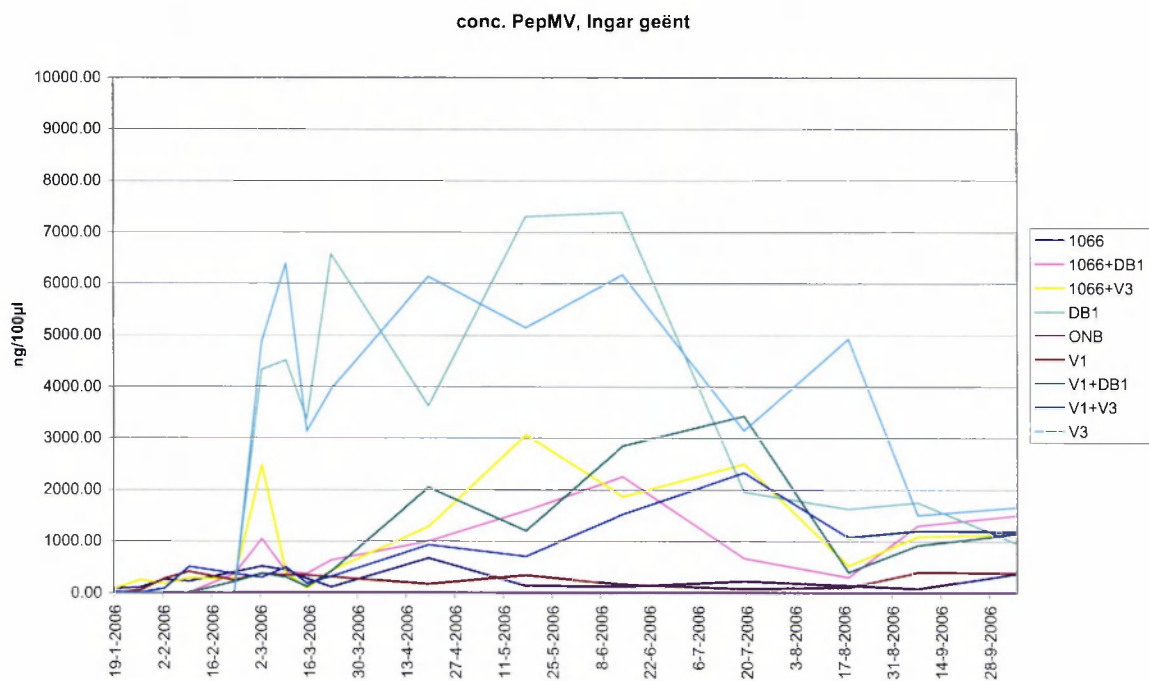
Figuur 4. Virusconcentratie in de planten van het ras Cedrico (ongeënte planten) gemeten op verschillende tijdstippen gedurende de teelt.



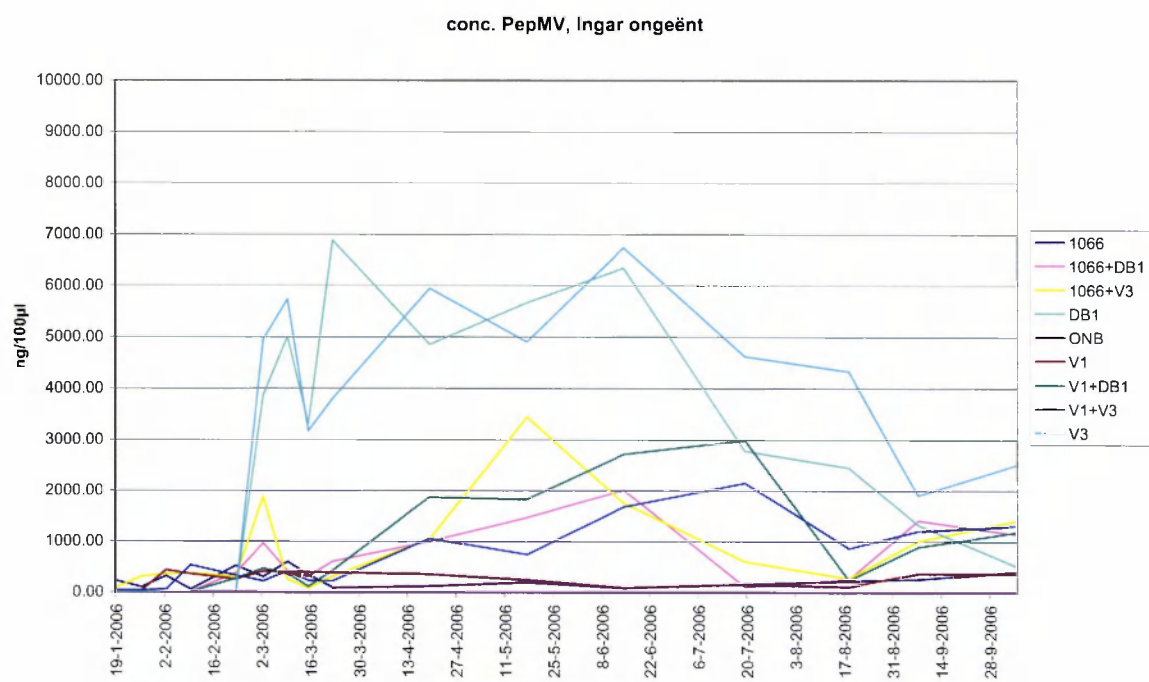
Figuur 5. Virusconcentratie in de planten van het ras Ever (geënte planten) gemeten op verschillende tijdstippen gedurende de teelt.



Figuur 6. Virusconcentratie in de planten van het ras Ever (ongeënte planten) gemeten op verschillende tijdstippen gedurende de teelt.



Figuur 7. Virusconcentratie in de planten van het ras Ingar (geënte planten) gemeten op verschillende tijdstippen gedurende de teelt.



Figuur 8. Virusconcentratie in de planten van het ras Ingar (ongeeënte planten) gemeten op verschillende tijdstippen gedurende de teelt.

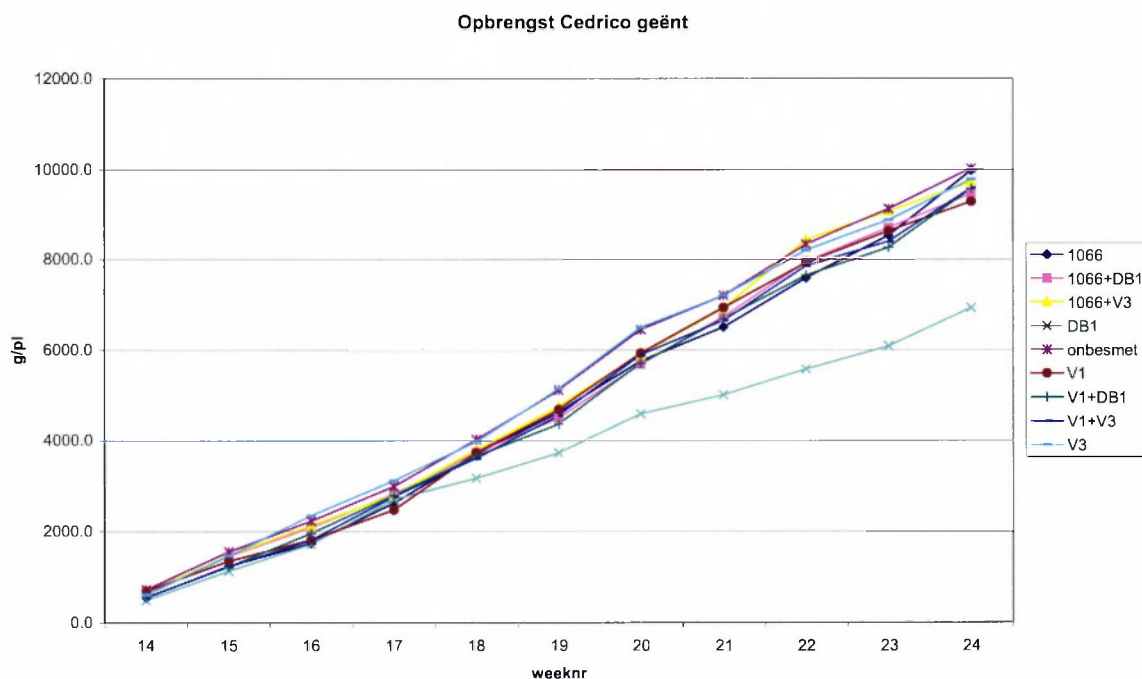
Opbrengst

Cedrico: de totale opbrengst ligt bij geënte planten wat hoger (tussen 12,5 en 18,7 kilo per plant) ten opzichte van ongeënte planten (11 en 16,8) waarbij de opbrengst van de planten geïnfecteerd met DB1 de laagste opbrengst hebben. De hoogste opbrengst hebben hier de planten geïnfecteerd met 1066 of V1. De combinaties en onbehandeld liggen dicht bij elkaar (Figuur 9 en 10).

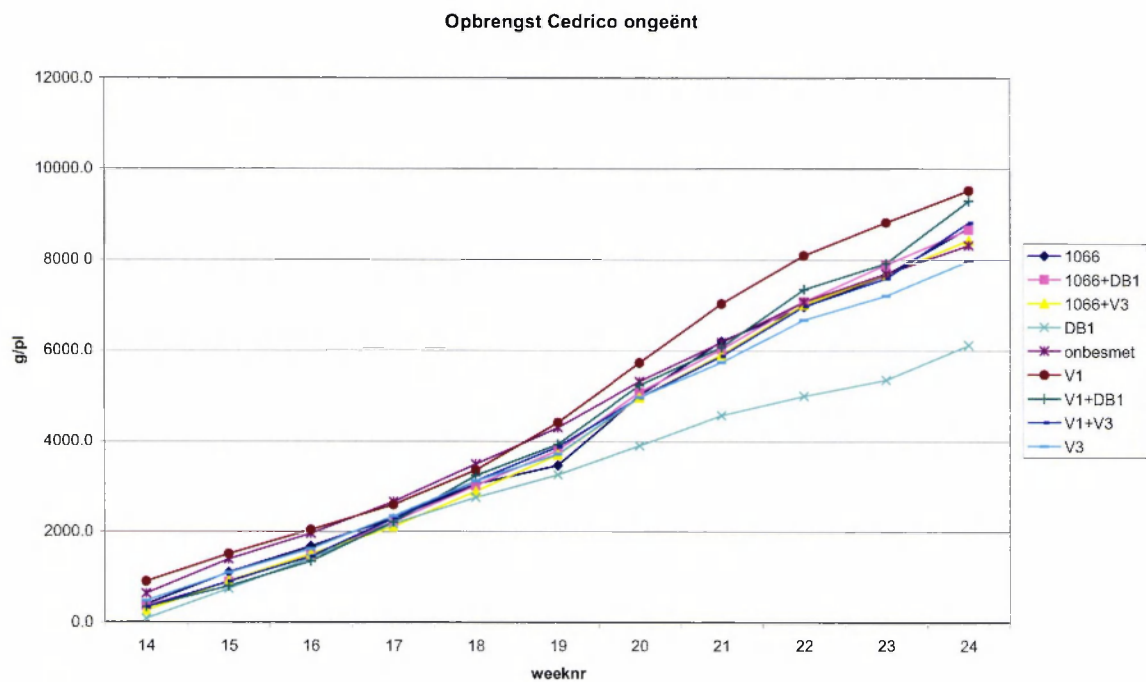
Ever: de totale opbrengst ligt bij de geënte planten tussen de 12,7 en 17,4 kilo en bij de ongeënte planten tussen de 11,4 en 17,1 kilo. Ook hier weer de laagste opbrengst van planten geïnfecteerd met DB1 en de hoogste opbrengst van planten geïnfecteerd met V1. De opbrengst van de combinaties en onbehandeld ligt bij de ongeënte planten wat verder uit elkaar dan bij de geënte planten (Figuur 11 en 12).

Ingar: bij dit ras ligt de totale opbrengst van de geënte planten tussen de 12,9 en 17,5 kilo en bij de ongeënte planten tussen de 12,5 en 16,1 kilo. De laagste opbrengst bij de met DB1 geïnfecteerde planten en de hoogste bij V1 en bij 1066 + V3. De opbrengst van onbehandeld en de zwakke isolaten en de combinaties zitten redelijk dicht bij elkaar (Figuur 13 en 14).

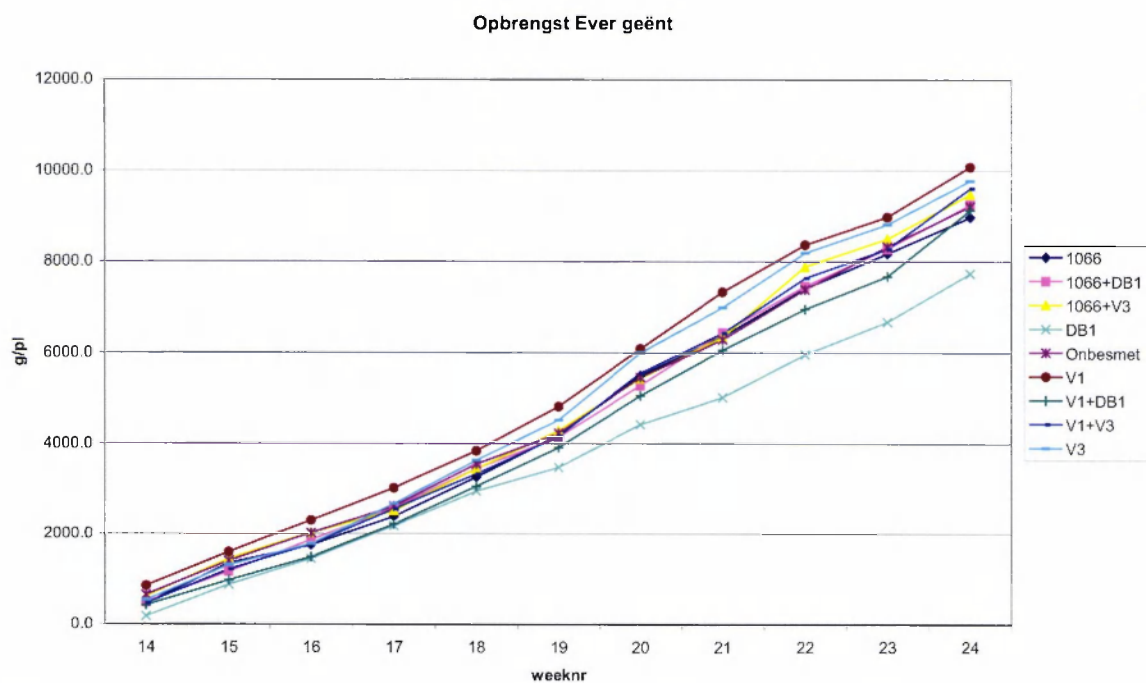
Om de cijfers van de opbrengst te kunnen vergelijken is het van belang te weten dat voor alle behandelingen de gewasbehandelingen gelijk zijn geweest met uitzondering van de planten die waren geïnfecteerd met DB1. Door de stand van het gewas is op een bepaald tijdstip besloten om het bladplukken een keer uit te stellen.



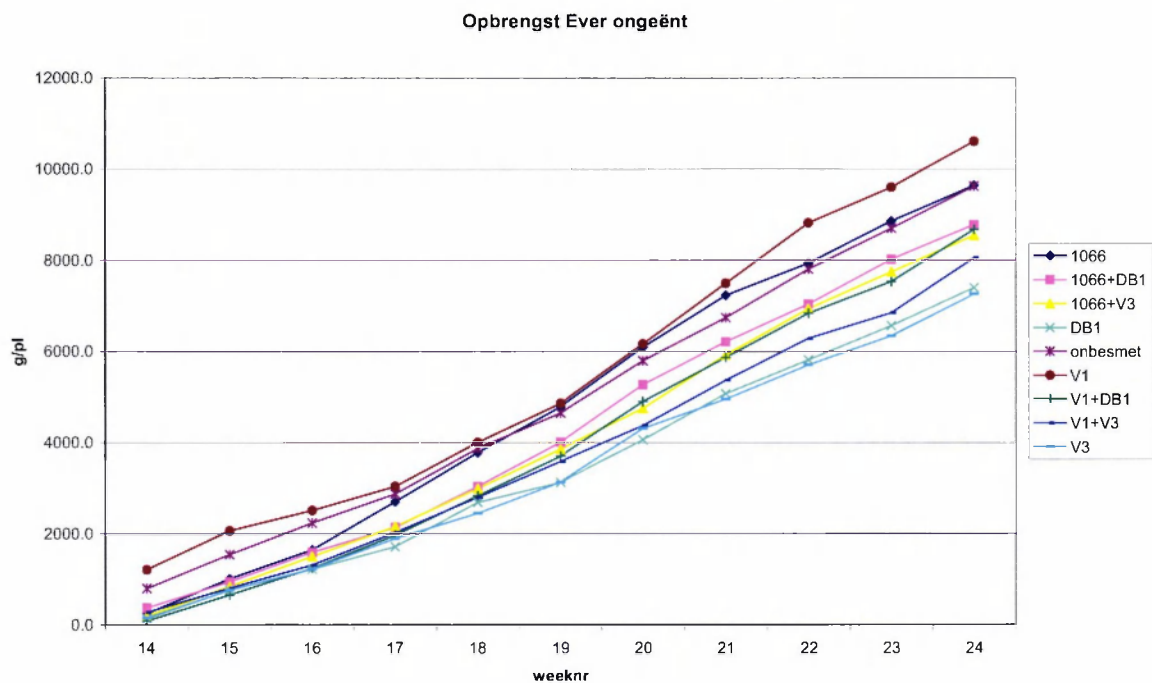
Figuur 9. Totale opbrengst (in gram per plant) van de verschillende behandelingen van het ras Cedrico (geënt).



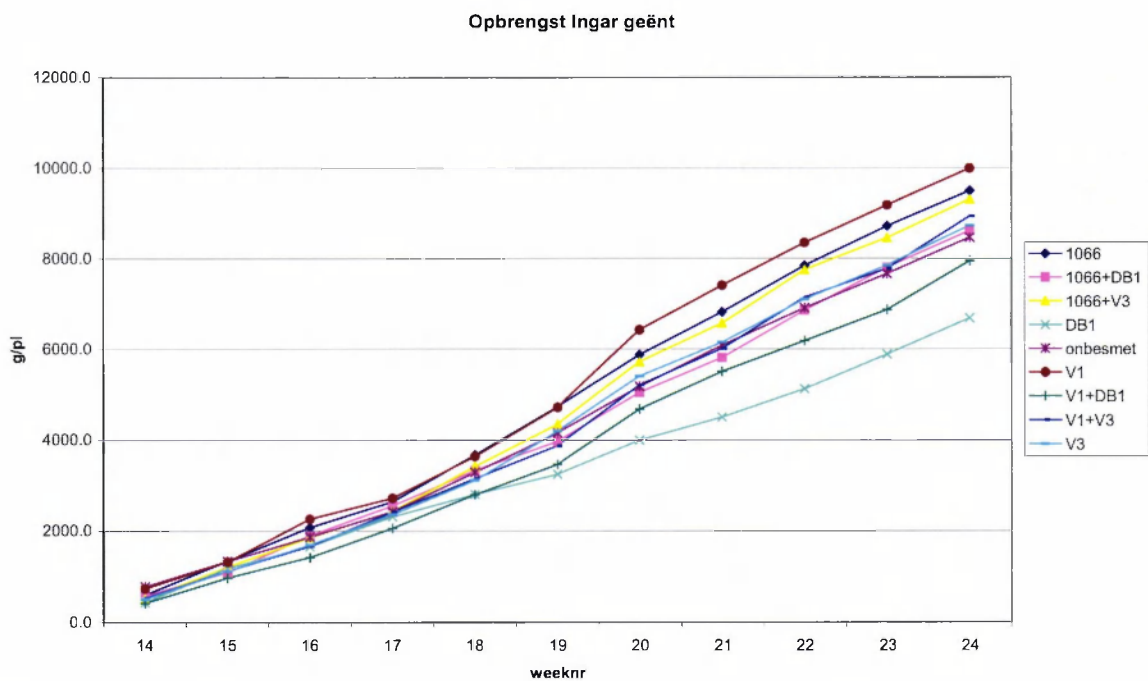
Figuur 10. Totale opbrengst (in gram per plant) van de verschillende behandelingen van het ras Cedrico (ongeënt).



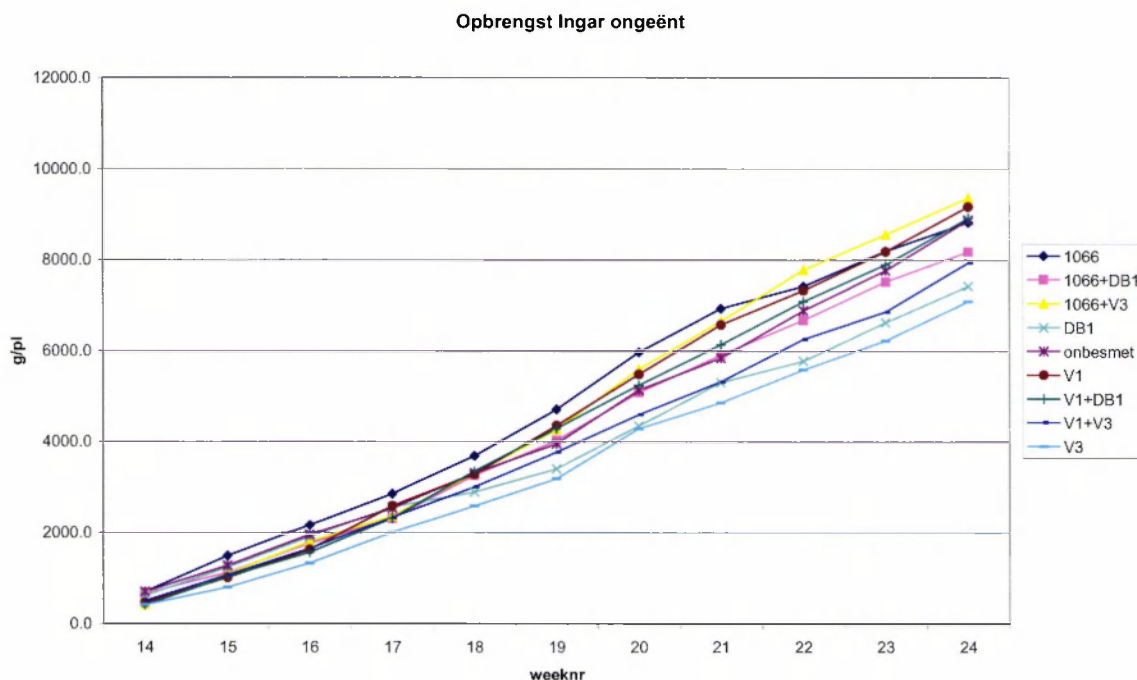
Figuur 11. Totale opbrengst (in gram per plant) van de verschillende behandelingen van het ras Ever (geënt).



Figuur 12. Totale opbrengst (in gram per plant) van de verschillende behandelingen van het ras Ever (ongeënt).



Figuur 13. Totale opbrengst (in gram per plant) van de verschillende behandelingen van het ras Ingar (geënt).



Figuur 14. Totale opbrengst (in gram per plant) van de verschillende behandelingen van het ras Ingar (ongeënt).

Totale productie en stand van het gewas

Omdat de behandelingen allemaal in enkelvoud zijn uitgevoerd is het moeilijk om harde conclusies te trekken per combinatie. In Tabel 1 staan de totale opbrengst per behandeling en per ras. Er zijn wel enkele zaken die opvallen. Zo is enten vooral belangrijk voor de behandelingen die met de sterke virussen (DB1 en V3) zijn besmet. Ook als de met een zwakke stam beschermde planten met een sterk virus worden besmet is er een duidelijk positief productie effect te zien van de onderstam.

De PepMV-vrije planten van de rassen Ingar en Ever produceerden zonder onderstam meer dan met onderstam. Deze gewassen groeiden heel weelderig en hadden een groot bladoppervlak. Hierdoor zijn relatief veel assimilaten in de bladeren terecht gekomen waardoor er minder assimilaten voor de vruchten zijn overgebleven. De zwakke virusstammen 1066 en V1 hadden een generatief effect op deze rassen. Het bladoppervlak was zichtbaar kleiner en de gewassen stonden een stuk generatiever wat gunstig was voor de productie van de geënte tomaten.

De gemiddelde productie van de ongeënte PepMV-vrije behandelingen wordt sterk beïnvloed door de lage productie van de ongeënte Cedrico.

Tabel 1. Totale opbrengst per behandeling en per ras (geënt en ongeënt).

	1066	1066 + DB1	1066 + V3	DB1	Onbesmet	V1	V1 + DB1	V1 + V3	V3
Cedrico geënt	9970.2	9454.3	9711.2	6922.7	10015.0	9278.5	9565.7	9578.6	9781.0
Cedrico ongeënt	8689.4	8659.3	8424.5	6115.5	8313.6	9521.2	9295.4	8813.4	7972.8
Ever geënt	8961.0	9232.5	9462.5	7727.1	9201.8	10069.5	9116.5	9595.8	9766.7
Ever ongeënt	9639.7	8774.3	8542.2	7401.0	9677.8	10611.5	8678.5	8053.2	7264.8
Ingar geënt	9488.0	8602.4	9292.0	6674.7	8454.7	9983.4	7940.4	8929.5	8726.2
Ingar ongeënt	8822.0	8172.0	9360.1	7419.7	8872.5	9167.7	8915.6	7933.0	7068.9

De resultaten van de totale opbrengst, zoals aangegeven in Tabel 1, zijn ook terug te vinden in de figuren in Bijlage V.

Statistiek

De besmettelijkheid van de virusziekte PepMV stelt bijzondere eisen aan de proefopzet. Onbehandelde planten kunnen ivm met de hoge besmettelijkheid van het virus niet geward door de kas worden gelegd.

De consequentie van de enkelvoudige uitvoering en niet gewarde ligging van de objecten is dat de statistische betrouwbaarheid van de resultaten niet kan worden getoetst.

Toetsingen mbv kwantitatieve PCR (qPCR)

Meetmethode PepMV

PepMV kan gemeten worden met ELISA of real-time PCR. Met beide methoden kan PepMV kwantitatief en kwalitatief bepaald worden. ELISA is robuuster omdat het onafhankelijk is van mogelijke genetische veranderingen in het virus. Real-time PCR is gevoeliger om PepMV bij lage concentraties te bepalen. Met real-time PCR kunnen in principe zowel specifieke stammen als ook hele groepen van stammen gemeten worden. Hierdoor is het ook mogelijk om met real-time PCR verhoudingen tussen twee stammen in één plant te bepalen. Als er genetische veranderingen optreden bij het virus kan het zijn dat de PCR methode niet meer werkt en het veranderde virus niet meer wordt herkend. Bij aanvang van het onderzoek is besloten om alle monsters te meten met Elisa en een gedeelte van de monsters te meten met real-time PCR.

In het onderzoek van 2005 bleek dat real-time PCR geschikt was om V1, V3, V4 en 1066 volledig kwalitatief en kwantitatief te meten. Een jaar later bleek de samenstelling van stam V3 veranderd te zijn en het gebruikte isolaat van 1066 veranderd te zijn ten opzichte van het jaar daarvoor. Hierdoor miste de V3-primers een gedeelte van het V3-materiaal en waren de primers voor 1066 ongeschikt om 1066 in de proef van 2006 te meten. Ook voor DB1 geldt dat maar een gedeelte van DB1 daadwerkelijk gemeten werd. De primers voor V1 en PepMV pikten wel al het V1-materiaal en PepMV-materiaal op. De resultaten van de PCR-toetsen met DB1 en V1, V2 en V3 hebben duidelijk gemaakt dat er geen onbedoelde kruisbesmetting is opgetreden.

Kwantitatieve PCR (qPCR)

Met de DNA-techniek kwantitatieve PCR (qPCR) kan de hoeveelheid PepMV bepaald worden. Tevens kan er met deze techniek onderscheid gemaakt worden tussen de verschillende PepMV-varianten. Hiervoor worden PCR-primers gebruikt die specifiek één bepaalde variant herkennen. Voor deze methode wordt eerst het RNA van het virus geïsoleerd, daarna wordt het RNA enzymatisch omgezet in cDNA. Op dit cDNA kan in de Polymerase Chain Reaction (PCR) met specifieke primers een stukje DNA geamplificeerd en gedetecteerd worden. Door verschillende monsters met elkaar te vergelijken kunnen de verhoudingen van PepMV-varianten in en tussen monsters bepaald worden.

Voor de hier omschreven experimenten is een algemene PepMV PCR-primerset gebruikt die alle PepMV-varianten aantoonst. Tevens zijn specifieke PepMV PCR-primersets gebruikt die elk specifiek één bepaalde variant aantoonen (V1, V3, 1066 of DB1).

Voor elke serie metingen werd een standaard meegenomen die geïndexeerd was op 100. De te meten monsters krijgen een waarde t.o.v. deze standaard.

Monsternamen qPCR

Van behandelingen waarin 2 virussen voorkomen zijn alle 17 monsterdata doorgemeten voor PepMV-algemeen en PepMV-variant specifiek. Van behandelingen met 1 virus is er van 4 monsterdata de specifieke variant en PepMV-algemeen gemeten.

Resultaten qPCR

Om de virusconcentratie in planten te bepalen is ELISA zeer geschikt. Hiermee kunnen ook verschillende behandelingen met elkaar vergeleken worden. ELISA is echter niet geschikt om onderscheid te maken tussen verschillende varianten van een virus. Dit is echter wel nodig als de verhouding van verschillende varianten in één monster bepaald dienen te worden. Deze bepaling kan in principe wel uitgevoerd worden met de DNA-techniek real-time PCR, oftewel kwantitatieve PCR (qPCR).

Onbehandelde planten vrij gebleven van PepMV

In de kasproef zijn negatieve controles meegenomen. Als er virussen gemeten worden in de negatieve controles zou dit betekenen dat er onbedoelde besmettingen zijn opgetreden. Maar dit is in geen van de cultivars, geënt en ongeënt het geval geweest. Alle monsters van de onbehandelde planten gedurende de gehele periode van de proef waren allemaal negatief met PepMV-algemeen primers in qPCR (Figuur 15, 16, 17, 18, 20).

Enkelvoudige besmettingen

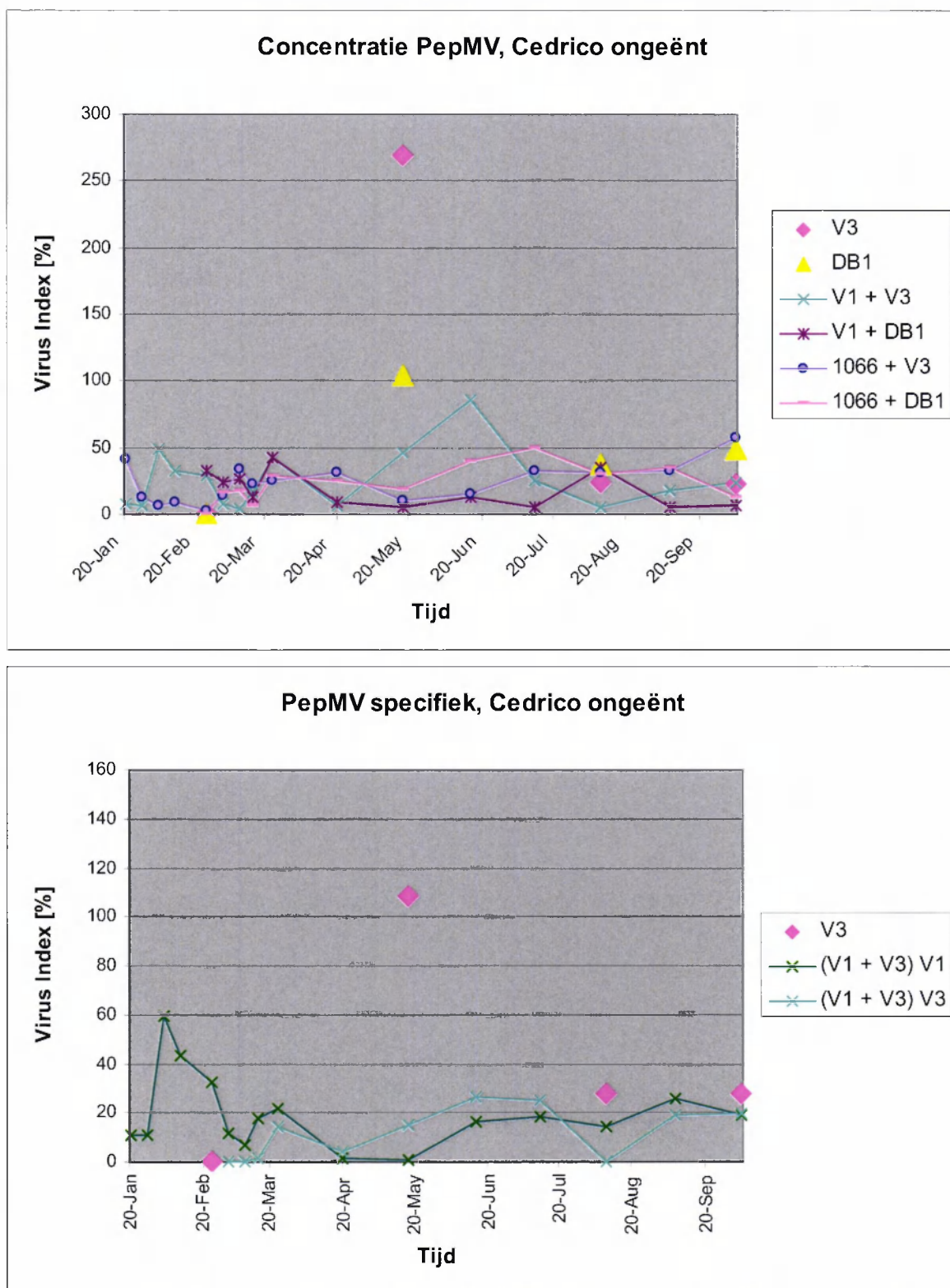
Van alle enkelvoudige besmettingen is in alle cultivars, geënt en ongeënt, PepMV aangetoond (Figuur 15-20). Van het concentratieverloop in de enkele besmettingen kan weinig gezegd worden omdat bij de enkelvoudige besmettingen voor de qPCR maar vier monsterdata zijn genomen, hetgeen te weinig is om pieken en dalen vast te leggen.

Vergelijking PepMV-metingen qPCR en ELISA in dubbelvoudige besmettingen

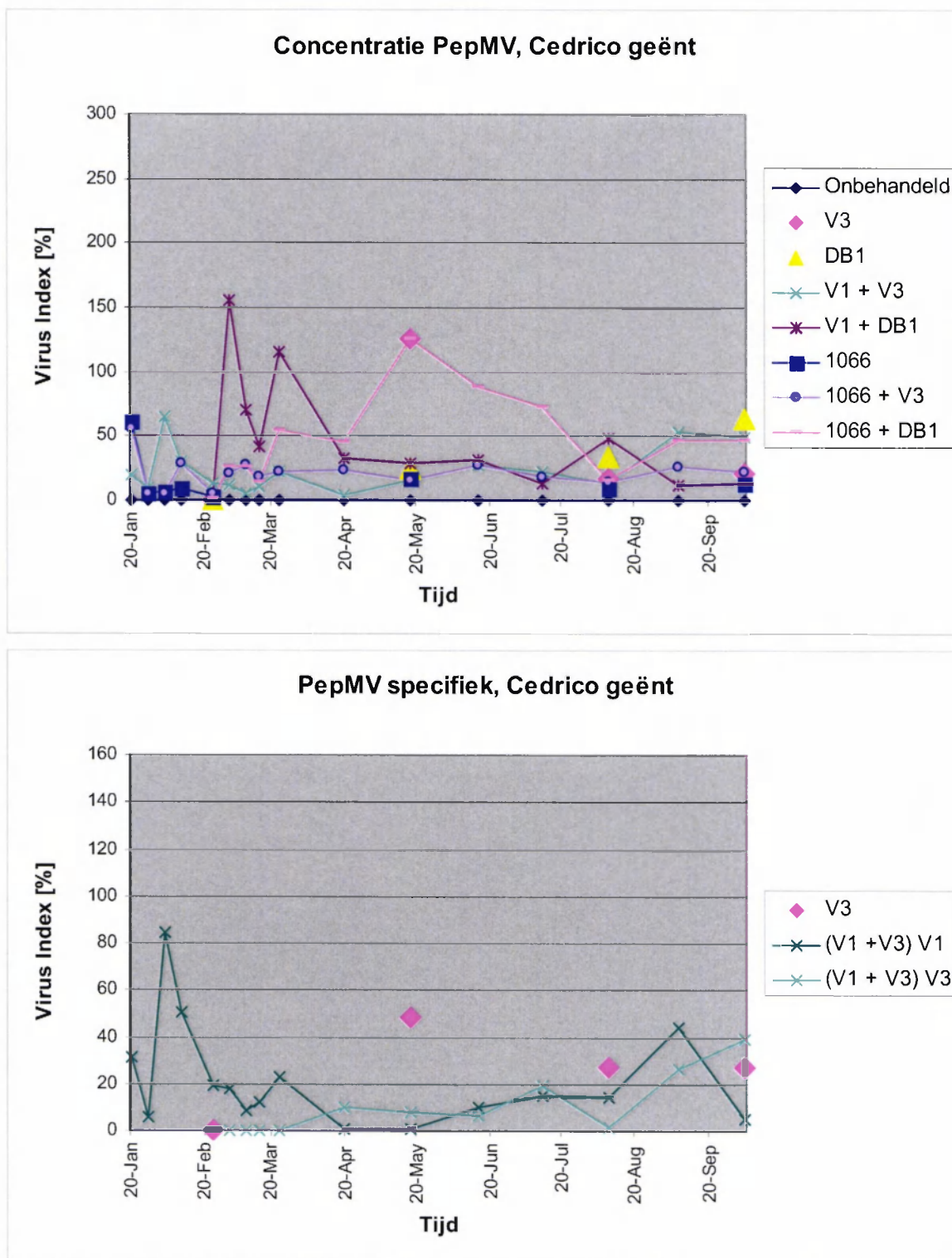
Voor de dubbelvoudige besmettingen komt het concentratieverloop van PepMV-algemeen redelijk overeen met de ELISA data (respectievelijk Figuur 15-20 en Figuur 3-8).

Variant-specifieke metingen

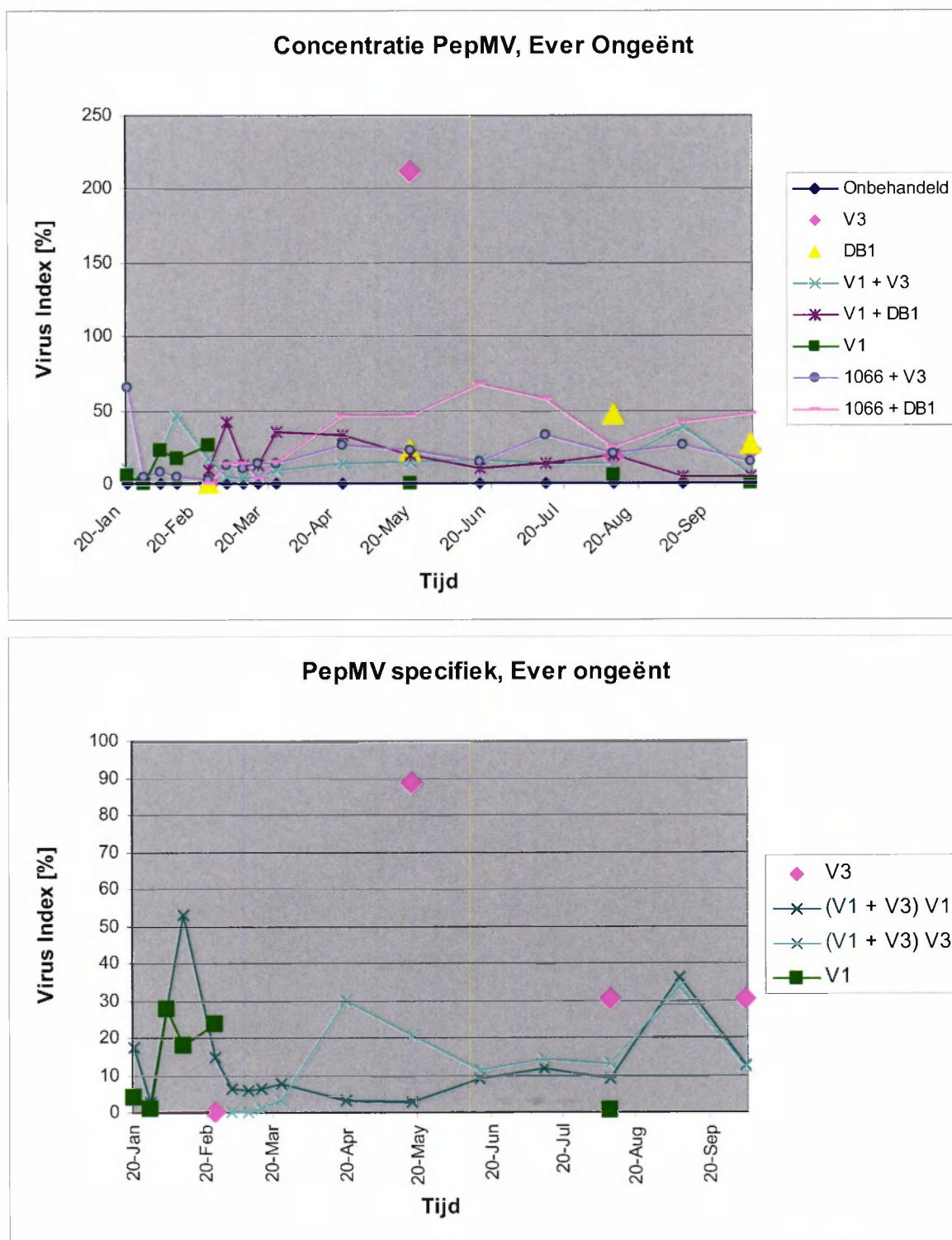
In de monsters met alleen V1 kwam het concentratieverloop van qPCR met PepMV-algemeen primers overeen met V1-specifieke primers (Figuur 15-20). Daarom kan geconcludeerd worden dat al het PepMV dat in deze monsters aanwezig was, inderdaad alleen V1 was. Bij V3 bleek, vermoedelijk door veranderingen in het genetische materiaal (RNA) van dit isolaat, de qPCR primers niet goed meer te werken. Ook voor de monsters met alleen 1066 en alleen DB1 kwamen de curves met de PepMV-primers en de curves voor de PepMV-variant specifieke primers niet overeen (data niet weergegeven hier). Dit kan veroorzaakt zijn doordat het virus in deze isolaten gemuteerd is op de plekken waar de primers zich hechten of dat de variant waarop de primers zijn ontwikkeld ondervertegenwoordigd was in de pool van varianten in de isolaten die gebruikt zijn voor de kasproef. Hierdoor zijn de metingen die uitgevoerd zijn met 1066- en DB1-specifieke primers niet bruikbaar hier en zijn daarom niet opgenomen in dit verslag. De resultaten met V1- en V3-specifieke primers zijn hier wel gepresenteerd.



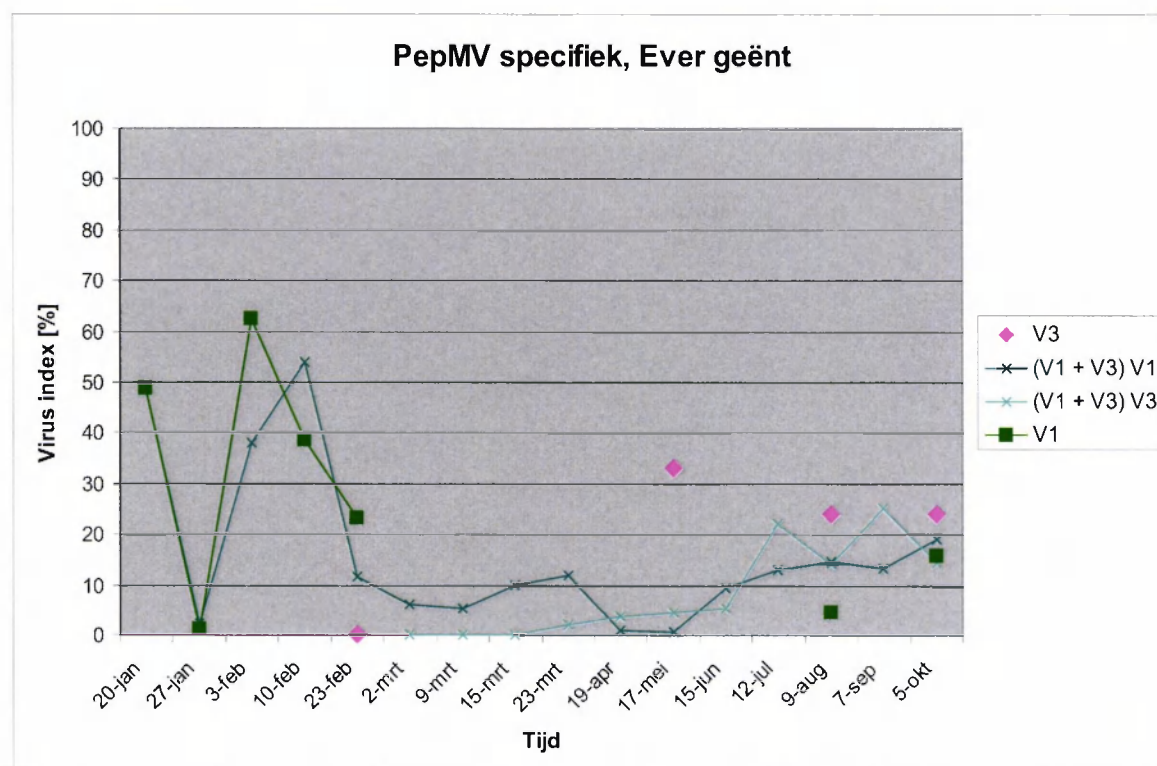
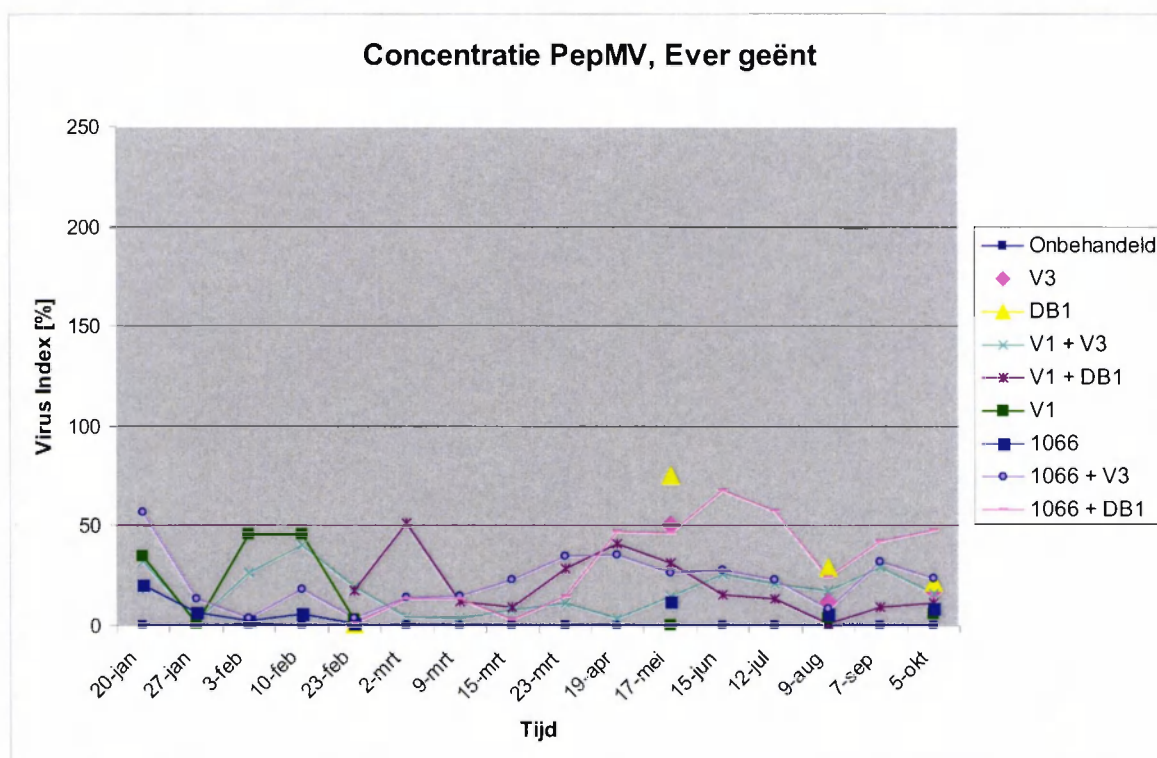
Figuur 15. PepMV-concentratieverloop in het cultivar Cedrico, ongeënt.
Boven: PepMV-algemeen. Onder: PepMV-variant specifiek.



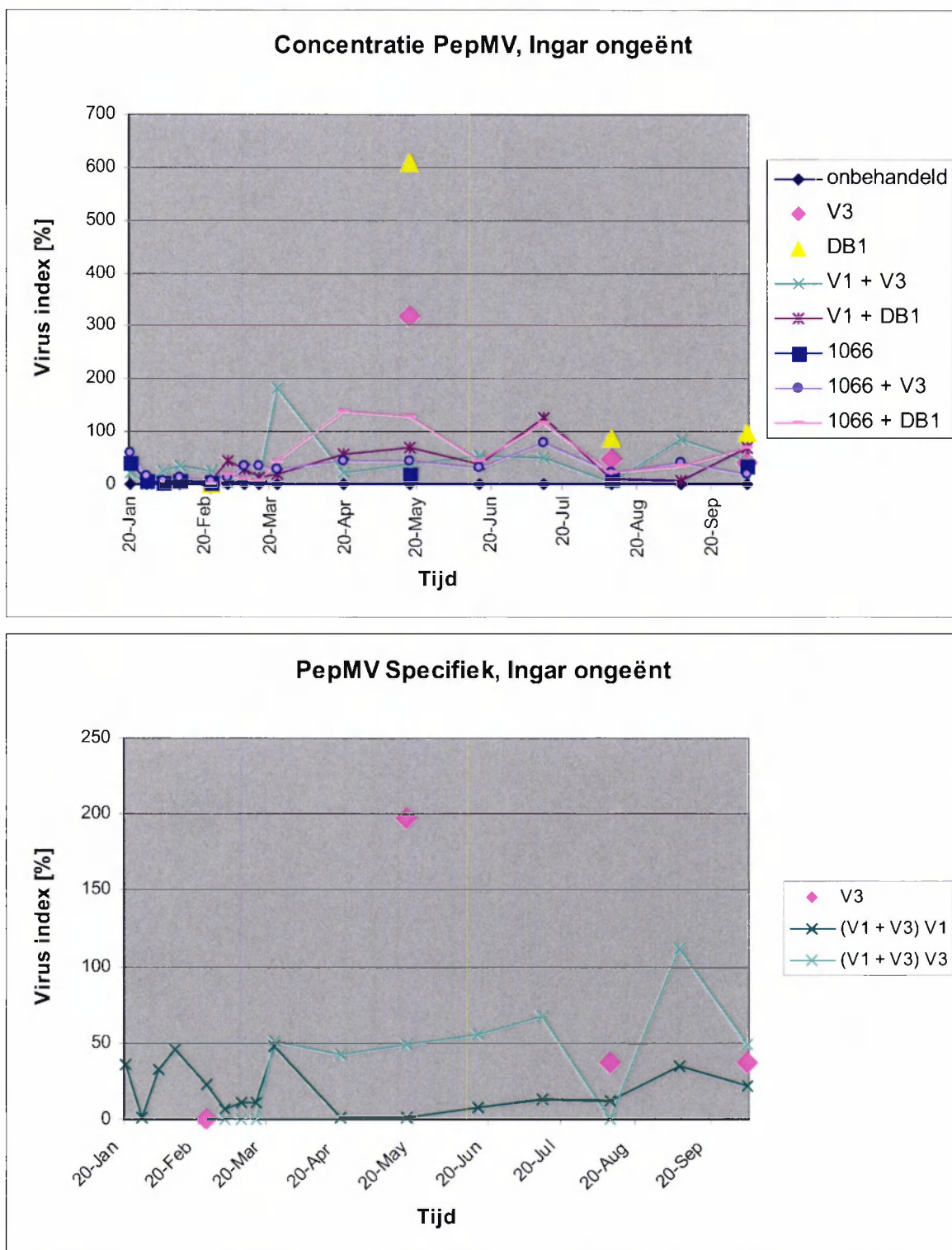
Figuur 16. PepMV-concentratieverloop in het cultivar Cedrico, ongeënt.
 Boven: PepMV-algemeen. Onder: PepMV-variant specifiek.



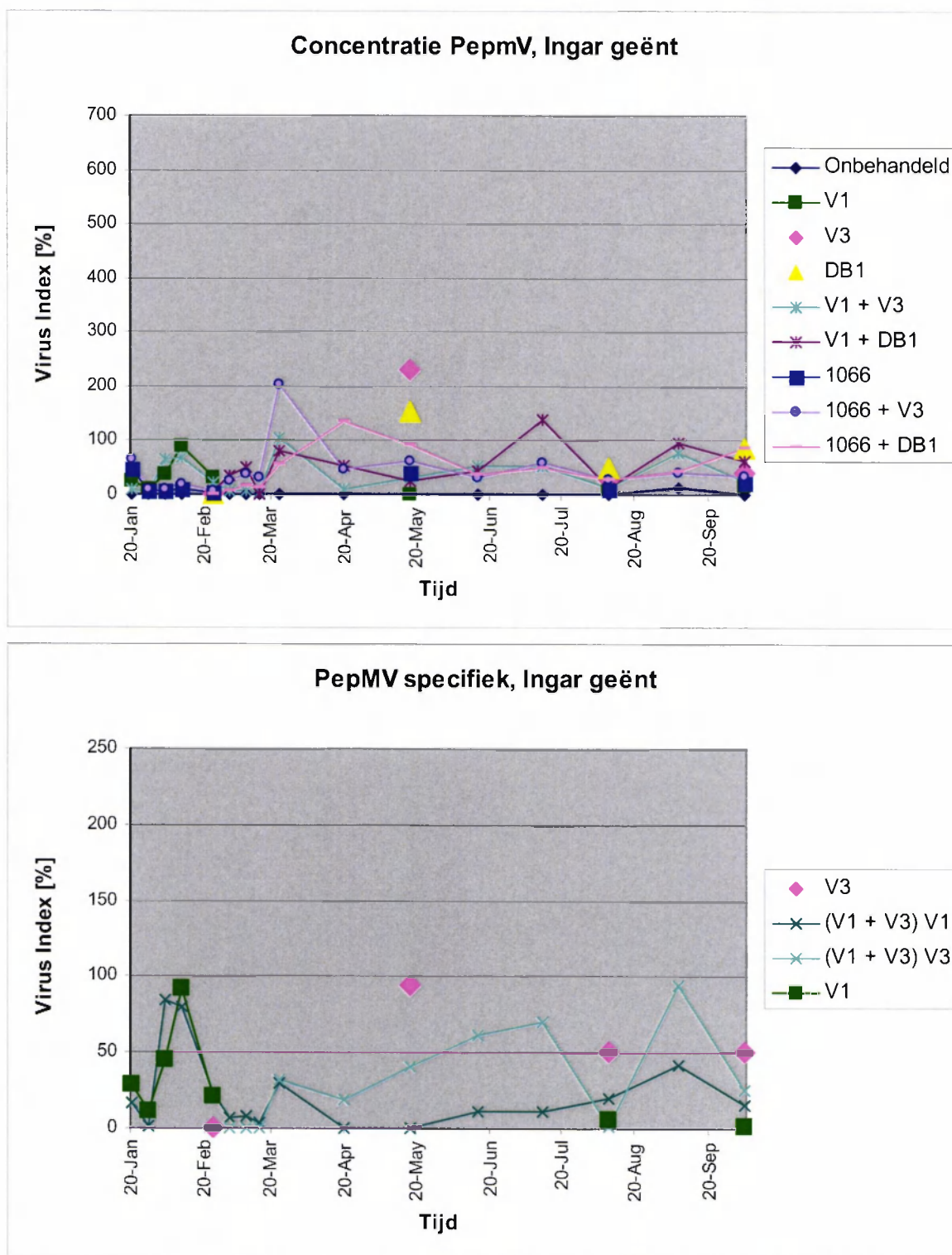
Figuur 17. PepMV-concentratieverloop in het cultivar Ever, ongeënt.
 Boven: PepMV-algemeen. Onder: PepMV-variant specifiek.



Figuur 18. PepMV-concentratieverloop in het cultivar Ever, geënt.
Boven: PepMV-algemeen. Onder: PepMV-variant specifiek.



Figuur 19. PepMV-concentratieverloop in het cultivar Ingar, ongeënt.
Boven: PepMV-algemeen. Onder: PepMV-variant specifiek.



Figuur 20. *PepMV*-concentratieverloop in het cultivar Ingar, geënt.
 Boven: *PepMV*-algemeen. Onder: *PepMV*-variant specifiek.

Globaal beeld PepMV-concentratieverloop gedurende de proef

De virusconcentratie piekte in de meeste gevallen twee of drie weken na inoculatie (Figuur 15-20). De enkelvoudige besmettingen met een sterk isolaat (V3 of DB1) gaven in mei een relatieve hoge concentratie. Wat verder opviel was dat de virusconcentratie in veel gevallen scherp daalde begin augustus, hetgeen bevestigd wordt door de ELISA-data.

Vergelijking enkele en dubbele besmettingen

Opvallend is dat op de monsterdata waarbij een enkele besmetting met een sterk isolaat een hoge PepMV concentratie laat zien, op hetzelfde tijdstip bij een dubbele besmetting de PepMV concentratie van het sterke isolaat veel lager is, voor zover meetbaar met deze test (Figuur 15-20). Dit is wederom een bevestiging van de ELISA-data. Dit geldt voor alle cultivars, geënt en ongeënt. Met name half mei zijn de verschillen heel duidelijk. Overal is hier V3 hoger als het alleen ingebracht is dan wanneer eerst V1 of 1066 ingebracht is en daarna V3. Dit is zowel te zien in de metingen met V3-specifieke primers als met PepMV-algemeen primers.

Als V1 (zwak isolaat) eerst ingebracht wordt, piekt de concentratie van V1 in februari. Daarna daalt de concentratie van V1. Als vervolgens V3 (sterk isolaat) ingebracht wordt bereikt V3 niet de hoge concentraties als V3 alleen ingebracht was, dus zonder V1.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat de zwakke isolaten (V1 en 1066) mogelijk de hoge PepMV-concentraties van de sterke isolaten (V3 en DB1) kunnen onderdrukken. Helaas werken de testen door de genetische veranderingen in het virus niet allemaal optimaal.

Geen verschillen tussen ongeënt en geënt

Tussen ongeënte en geënte planten van alle cultivars, waren voor het virusconcentratieverloop bij alle behandelingen geen significante verschillen waar te nemen (Figuur 15-20). Dit geldt zowel voor de PepMV-algemeen en variant-specifieke metingen.

Geen verschillen tussen cultivars

Tevens zijn er tussen de verschillende cultivars geen noemenswaardige verschillen in concentratieverloop van PepMV-algemeen en de verschillende PepMV-varianten waar te nemen (Figuur 15-20).

4 Conclusies en discussie

Deelproject Selectie en karakterisering van zwakke stammen (onderdeel A)

Door Wageningen UR Glastuinbouw en PRI zijn de afgelopen jaren uit de Nederlandse praktijk en via bedrijven en buitenlandse collega's veel isolaten van PepMV verzameld. Vrijwel allemaal zijn deze biologisch (symptomen) en moleculair (RNA-sequentie) gekarakteriseerd. Na een grondige analyse van alle data werd geconcludeerd dat het originele tomaatenisolaat 1066, voor het eerst in 1999 in Nederland aangetroffen, als een betrouwbaar echt zwak isolaat beschouwd kan worden. De RNA sequentie is helemaal bekend en alle testen die in de loop van de jaren met dit zuiver isolaat uitgevoerd zijn, hebben weinig schade of sterk symptoom laten zien.

Daarom is besloten om in de uit te voeren kasproef vanuit WUR glastuinbouw 1066 als standaard zwakke stam in te brengen.

Als necrotisch isolaat is DB1 ingebracht. DB1 is al enige jaren geleden in Nederland gevonden en in vele proeven op tomaat onder verschillende omstandigheden steeds duidelijk necrotisch gebleken. Binnen dit onderzoek is de volledige sequentie van dit isolaat bepaald. Uit vergelijkingen tussen het genetische materiaal van DB1, 1066 en verschillende andere PepMV praktijkisolaten en -stammen, waarvan verschillende door PRI bepaald, bleek dat DB1 duidelijk tot de tomatengroep behoort. Toch bevat de sequentie van DB1 in totaal 19 unieke nucleotiden die in geen enkel ander isolaat voorkomen. Het blijft vooralsnog onbekend of en welke van deze verschillen een rol spelen in de heftige symptomen die DB1 veroorzaakt. Dit isolaat kan wel meer inzicht geven in waarom een isolaat heftige symptomen kan veroorzaken en die te helpen (tijdig) te herkennen.

In eerder onderzoek had PRI al een methode ontwikkeld om de groep van tomatenisolaten van de groep van US isolaten te onderscheiden. Met behulp van deze test is het in ieder geval mogelijk gebleken om praktijkmonsters betrouwbaar op de aanwezigheid van isolaten uit deze twee groepen te testen. Verschillende isolaten binnen een en dezelfde groep verschilden te weinig van elkaar om ze te kunnen onderscheiden met alleen de PCR test. Bepaling van het genetische materiaal van vele PepMV isolaten liet zien dat het steeds veranderd bleek te zijn. Het ging weliswaar om kleine mutaties maar die bleken steeds voldoende om de primer sets waarmee de isolaten uit elkaar gehouden zouden moeten worden, niet meer te laten werken. Dat vermogen van PepMV om snel kleine veranderingen in zijn genetisch materiaal aan te brengen is al eerder door PRI in PT onderzoek gevonden en gerapporteerd. Het is (nog niet bekend) waarom het virus zo variabel is, hoe snel veranderingen kunnen optreden en hoever het virus daarmee kan gaan. De veranderingen zullen ongetwijfeld een rol spelen in de 'wapenwedloop' tussen virus en plant waarin beiden steeds proberen elkaar te slim af te zijn.

Uiteindelijk is door PRI, Wageningen UR Glastuinbouw en GAC geconcludeerd dat de meest betrouwbare manier om PepMV concentratieverloop in een plant te volgen, een standaard DAS-ELISA is. Deze test is zeer gevoelig, uiterst betrouwbaar en goedkoop. Met behulp van een DAS-ELISA i.c.m. een ijkreeks van gezuiverd virus, kan zeer nauwkeurig de concentratie van PepMV in de tijd in de plant bepaald en gevolgd worden. Dit blijkt ook uit de uitslagen van de kasproef (deelproject cross-protectie proeven). Als er toch onderscheid tussen verschillende stammen of isolaten in een en dezelfde plant noodzakelijk is, is de meest betrouwbare manier om een RT-PCR uit te voeren m.b.v. de eerder getest groep-specifieke primers en dan van elk verkregen RT-PCR product de sequentie te bepalen. Alleen dan kan met enige zekerheid gezegd worden welke sequentie(s), en dus welke stammen of isolaten in de plant aanwezig zijn. Door de eerder genoemde variabiliteit van het virus en de daarmee samenhangende onbetrouwbaarheid van RT-PCR primer-sets, kan anders niet worden uitgesloten dat een RT-PCR reactie vals-negatief of vals-positief is.

Door GAC zijn de isolaten V1 en V3 ingebracht. V1 is door GAC benoemd als een zwak isolaat, V3 als een sterk, chlorotisch isolaat. Er zijn helaas geen verdere biologische (symptomen op tomaat en toetsplanten) of moleculaire (sequenties) gegevens over deze isolaten bekend.

Halverwege 2006 is V1 op grotere schaal vermeerderd en op aanvraag van telers in een zgn. 'praktijkproef' toegepast. Dit gebeuren heeft ook zijn invloed op het oorspronkelijke voorstel van onderdeel A van het parapluplan. In plaats dat dit via de voorgestelde fases naar de praktijk zou kunnen gaan wordt het nu al op grote schaal met een bepaald isolaat toegepast, zonder dat is vastgesteld dat dit de beste 'zwakke stam' is en de 'zwakke stam' strategie ook werkt.

Deelproject Cross-protectie proef (onderdeel B)

Testen

DAS-ELISA blijkt zoals verwacht een betrouwbare en robuuste manier om de virusisolaten in de planten te volgen. Concentratieverschillen in de tijd en tussen de verschillende isolaten zijn goed te volgen. Als mogelijk nadeel van ELISA zou aangevoerd kunnen worden dat geen onderscheid mogelijk is tussen de verschillende isolaten van de tomatenstam zoals die in deze kasproef zijn gebruikt. Zoals hierboven al vermeld is een test om dat onderscheid te maken tussen isolaten van een en dezelfde stam niet betrouwbaar. In deze proef is een RT-PCR toets ingezet (Q-PCR) met de intentie dat onderscheid wel mogelijk zou maken maar waarmee ook de concentratie van elk isolaat in de plant bepaald kan worden.

Hiertoe worden op elk monster twee Q-RT-PCR reacties uitgevoerd. De eerst met primers die alle PepMV deeltjes moeten detecteren en hun concentratie moet vaststellen. De tweede met isolaat specifieke primers (V1, 1066, V3 of DB1). In planten die met één enkel isolaat geïnfecteerd zijn moeten de uitslagen van deze twee testen dus identiek zijn. Helaas blijkt dat niet het geval. Voor het 1066 isolaat (de zwakke tomatenstam) blijken de specifiek primers vrijwel geen virus aan te kunnen tonen (10% van het totaal) terwijl in deze planten met de algemene PepMV wel virus aangetoond kan worden. De '1066' primers werken dus niet, vermoedelijk door de veranderlijkheid van het virus. Eenzelfde uitslag was er voor de V3-specifiek primers. Ook deze reageerden slecht met het V3 isolaat (max. ongeveer 50% van het aanwezige virus).

Door alle partijen is gezamenlijk geconcludeerd dat de resultaten van de toetsingen met Q-PCR geen betrouwbaar beeld geeft van de aanwezigheid of virusconcentraties in de plant. Daarom worden de DAS-ELISA testen als betrouwbaar en leidend gezien bij de vergelijking van de virusconcentraties in verschillende inoculaties.

Concentratie

Alle virusinfecties zijn gevolgd in de tijd m.b.v. DAS-ELISA. Daarmee kon nauwkeurig de virusconcentratie in elke plant gemeten worden (zie Figuur 3-8). Uit al deze grafieken blijkt duidelijk dat beide sterke isolaten een veel hogere concentratie in de plant bereiken dan de zwakke isolaten. Ook is de totale virus concentratie in de menginfecties lager. De virusconcentratie blijft duidelijk het laagst bij de infecties met alleen 1066 of alleen V1.

Uit alle proeven blijkt steeds dat de sterke isolaten een hogere concentratie bereiken. In menginfecties blijkt ook dat de totale virusconcentratie in die planten steeds tussen de concentraties van de zwakke en sterke isolaten in te liggen. Wellicht zorgen de eerste infecties met de zwakke stammen ervoor dat de totale virus concentraties lager uitvallen dan in het geval van een sterk virus alleen (tussen de 2 en 4 x afhankelijk van de periode in de teelt).

Opbrengst

De totale opbrengst ligt zoals verwacht bij de geënte planten hoger (zie Figuur 9-14) dan bij de ongeënte planten. De opbrengst van de planten geïnfecteerd met alleen DB1 blijven sterk achter bij alle andere behandelingen en dit geldt ook voor de planten die alleen met V3 zijn geïnoculeerd. Opvallend daarbij is dan dat bij een menginfectie met eerst een zwak isolaat en vervolgens een sterker isolaat de opbrengsten nagenoeg vergelijkbaar zijn met of alleen een zwak isolaat of de onbehandelde planten. Hierbij is dus weinig opbrengstreductie. Dit is iets wat veel telers in Nederland steeds hebben aangegeven dat zeker planten geïnfecteerd met een zwak isolaat weinig tot geen opbrengstreductie geven.

Samenvattend algemene conclusies:

- Selectie en karakterisering van stammen
 - i. Op het praktijkbedrijf waar opzettelijk 1066 was ingebracht is de teelt goed verlopen en zijn geen grote problemen opgetreden.
 - ii. Naast 1066 werd in een aantal gevallen ook de (op dat moment) nieuwe US2 stam vastgesteld.
 - iii. In een infectie proef met zwakke en sterke stammen is vastgesteld dat ze apart en in menginfecties in de planten kunnen voorkomen.
- Cross-protectie
 - i. De absolute hoeveelheid van het virus is met de kwalitatieve toetsmethode (ELISA) bepaald en met de kwantitatieve toetsmethode (Q-PCR) is wel de aanwezigheid van verschillende isolaten vastgesteld maar kon niet de concentratie van het virus altijd voldoende betrouwbaar worden bepaald.
 - ii. De sterkere isolaten hebben een hogere concentratie virus dan de zwakke of de combinatie.
 - iii. De zwakke stammen 1066 en V1 hebben gedurende het gehele teeltseizoen geen of nauwelijks symptomen op de planten laten zien. Ook reageren de sterkere (heftige symptomen) isolaten met minder symptomen op planten die eerst zijn geïnfecteerd met een zwakke stam in vergelijking met inoculatie op planten zonder zwakke stam.
 - iv. In dit onderzoek is vastgesteld dat de cross-protectie heeft voldaan in die zin dat de opbrengsten niet sterk gedaald zijn.

Bijlage I

Formulier waarneming symptomen praktijkbedrijf

Waarneming symptomen PepMV

Datum
Weeknr

score

0	niets
1	weinig
2	veel
3	zeer hevig

Bladsymptomen

Kop

bobbeling	
brandnetelblad	
necrose	
grauw	
verkleuring	
slap	
<i>anders</i>	

Gehele plant

gele vlekken	
bladmisvorming	
stengel necrose	
blad necrose	
slap	
andere	

Vruchtsymptomen

Vruchten

marmer	
meer glans dan normaal	
% wankleur	
anders	

Kronen

grauw		
verdroogd		
verkleuring		
<i>stand</i>		
necrose		
<i>anders</i>		

Stand van gewas

Generatief

1

2

3

4

Vegetatief

5

Groeikracht

Zwak

1

2

3

4

Sterk

5

Opmerkingen

Bijlage II

Plattegronden kasproef 2006 Naaldwijk

Plattegrond 103-18

ONB.

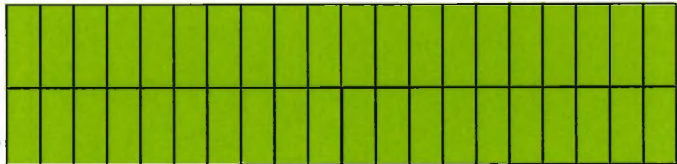
paprika

1066 (geïnoculeerd 12-01-06)

V1 (geïnoculeerd 13-01-06)

Cedrico

0



A

Ever

0

B

Ingar

0

C

G

0

D

Ever

G

E

Cedrico

G

1

Vaknr.

G = geënt

0 = ongeënt

Cedrico

0



F

Ingar

G

G

Ever

G

H

Cedrico

G

I

Ingar

0

Ever

0



J

Ingar

G

K

Ever

G

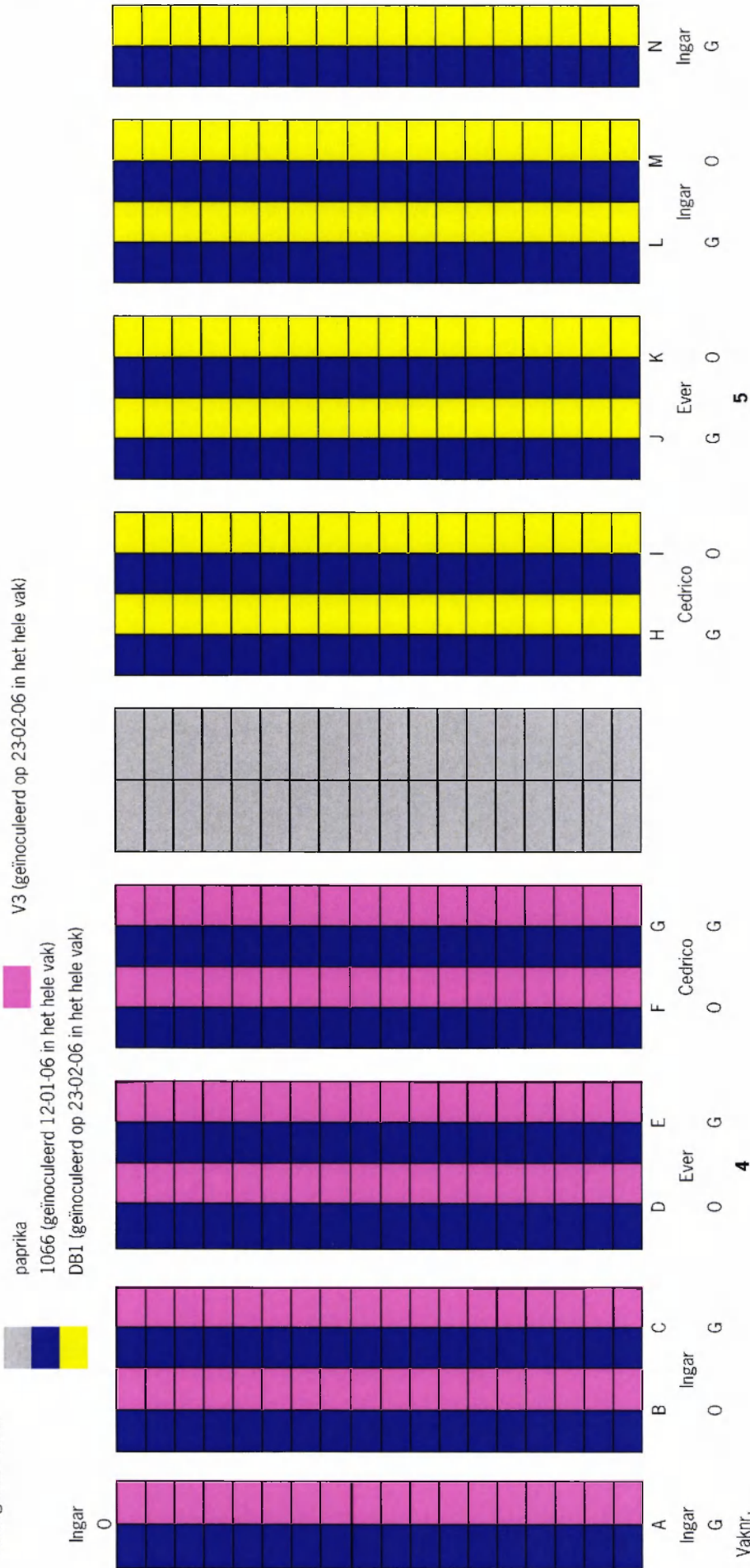
L

Ever

0

2

3



Vaknr.
G = geënt
O = ongeënt



paprika

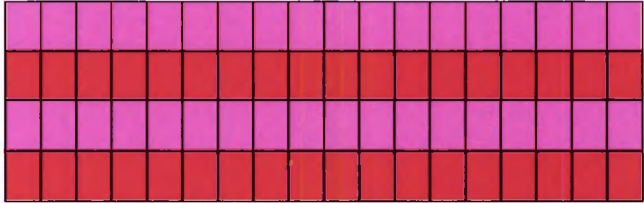
V3 (geïnoculeerd 23-02-06 in het hele vak)

V1 (geïnoculeerd 13-01-06 in het hele vak)

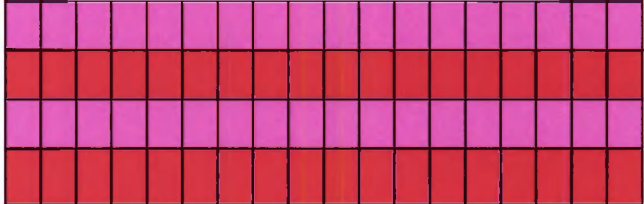
DB1 (geïnoculeerd 23-02-06 in het hele vak)



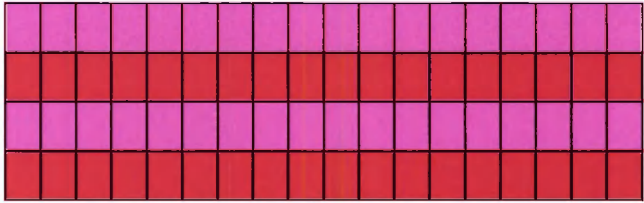
A
Cedrico
G



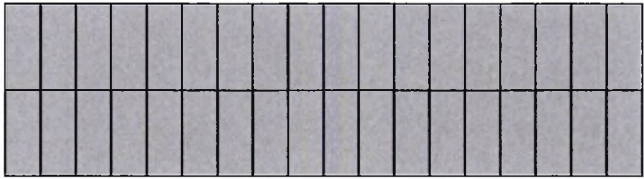
B
Ingar
O



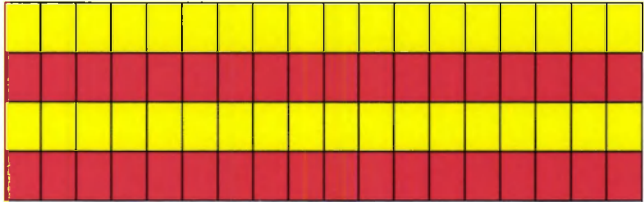
C
Ingar
G



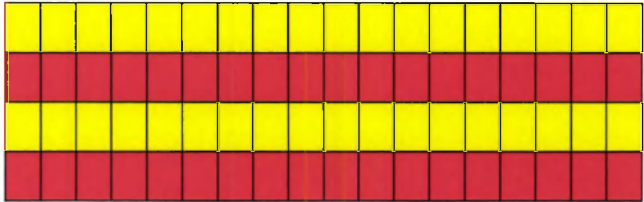
D
Ever
O



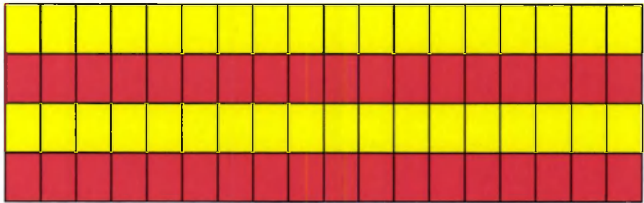
E
Ever
G



F
Cedrico
O



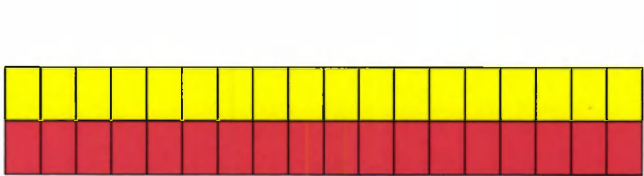
G
Cedrico
O



H
Cedrico
G



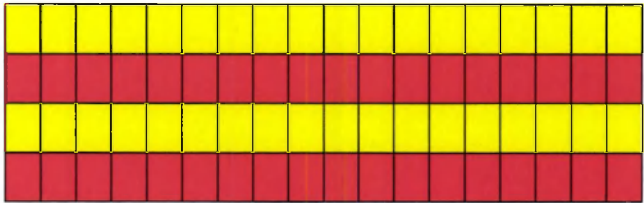
I
Cedrico
G



J
Cedrico
G



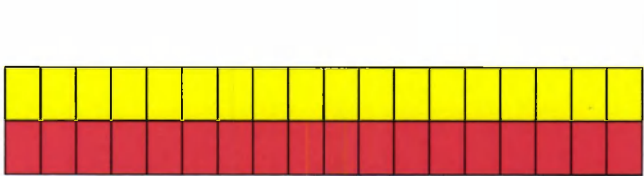
K
Ever
O



L
Ingar
G



M
Ingar
O



N
Cedrico
G

Vaknr.

G = geënt

O = ongeënt



paprika

DB1 (geïnculeerd 23-02-06 in het hele vak)

V3 (geïnoculeerd 23-02-06 in het hele vak)

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Ever	Ingar	Ing	Ever	Ing	Cedric	Ing	Cedric	Cedric	Ever	Ing	Ing	Ing
G	O	G	O	G	O	G	G	O	G	O	G	O

Vaknr. 8

Vaknr.

G = geënt

0 = ongeënt

Opmerking: het vaknummer geeft de aangehouden werkvolgorde aan, bij bijvoorbeeld gewaswerkzaamheden is altijd eerst vak 1 gedaan.

Bijlage III

Korte vertrouwelijke verslagen PepMV project (kasproef)

Algemeen

Het verslagje is vertrouwelijk en uitsluitend bedoeld voor informatie van de leden van de BCO tomaat. Ik ga er van uit dat niemand deze informatie verspreidt zonder toestemming van de auteurs.

Eerste verslag

Periode: start proef tot en met week 7

Op 2 januari jl. zijn de planten in de kas gezet. Dit zijn drie cultivars te weten Cedrico, Ever en Ingar. De helft van de planten is geënt en de helft ongeënt.

Alle planten zijn op 6 januari getoetst met ELISA op de afwezigheid van virus. Na toetsing bleken alle planten nog vrij van virus te zijn.

Op 12 januari is de behandeling met het zwakke isolaat 1066 uitgevoerd. Per plant is het eerste gestrekte blad net onder de kop geïnoculeerd. Vervolgens is de behandeling met het zwakke isolaat V1 op 13 januari uitgevoerd. Dit is op dezelfde wijze gedaan als met 1066.

Eén week na inoculatie (19 januari voor 1066 en 20 januari voor V1) zijn de planten opnieuw bemonsterd en getoetst met ELISA. Uit deze toetsing bleek dat alle planten geïnoculeerd met 1066 ziek waren en van de planten met V1 was pas 23% ziek. Weer een week later (27 januari) zijn alle planten nogmaals getoetst en daaruit bleek dat 33% van de planten geïnoculeerd met V1 ziek was.

Op 3 februari is de volgende monsternamen uitgevoerd en na toetsing bleek dat nu 85% van planten geïnoculeerd met V1 ziek waren. Bij de monsternamen op 10 februari en na toetsing (13 februari) kon worden vastgesteld dat 100% van de planten ziek zijn.

De symptomen zijn op 19 januari voor de eerste maal afgelezen (één week na inoculatie) en daarbij werd niets gevonden.

De tweede maal is één week (27 januari) later uitgevoerd.

- *1066*
Werd een hele lichte verkleuring in de kop waargenomen. Bijzonder was dat er op drie planten gelige vlekken verschenen. Alle drie bij het ras Ingar.
- *V1*
In het algemeen gelige koppen.

Aflezings 3 februari

- *1066*
Op veel planten begon in de kop wat lichte bobbeling te verschijnen. Op Ingar was dat iets heftiger dan bij de andere cultivars.
- *V1*
Wat meer verkleuring in de kop en lichte bobbeling (alle cultivars).

Aflezings 10 februari

- *1066*
Op een aantal planten wordt nu wat chlorose waargenomen (1 plant Cedrico en 1 plant Ingar).
- *V1*
In het ras Ingar wordt meer bobbeling in de kop waargenomen (meer dan bij andere cultivars), meer brandnetelachtig blad en gelige vlekken.

Algemeen is opvallend dat de planten geïnoculeerd met 1066 vooral symptomen geven in de cultivar Cedrico. Voor de planten geïnoculeerd met V1 geldt dit vooral voor de cultivar Ingar.

Naaldwijk, 13 februari 2006
Ineke Stijger en Roel Hamelink

Tweede verslag

Periode: week 7

Week 7

- *1066*
De cultivar Ingar reageert in vergelijking met de andere cultivars het meest met bobbeling van het blad in de kop en met licht brandnetelig blad in de kop. Tevens is een lichte misvorming van het blad direct onder de kop waargenomen. Tussen de geënte en ongeënte planten van Ingar is geen verschil waargenomen in de hevigheid van de symptomen. De cultivar Ever geeft op de ongeënte planten naast een lichte bobbeling van het blad in de kop, ook een lichte vorming van brandnetelig blad in de kop. In de cultivar Cedrico is bij zowel de geënte als de ongeënte planten alleen een lichte vorm van bobbeling aangetroffen in de kop. Bij alle planten van de drie cultivars is een lichte mozaïek in de kop waargenomen.
- *V1*
Bij alle planten van de drie cultivars is een lichte mozaïek in de kop waargenomen. De cultivar Ingar reageert in vergelijking tot de andere cultivars met hevigere bobbeling in kop van de planten. Tevens is alleen bij Ingar brandnetelig blad aangetroffen. Bij de cultivar Ingar wordt het blad over het gehele gewas aan de basis geel. Dit geel breidt vanuit deze basis verder uit naar de rest van het blad. Bij de cultivar Ever is een in vergelijking met de andere cultivars lichtere kleur van de kop van het gewas waargenomen. Dit gold voor zowel de geënte als de ongeënte planten. Bij Cedrico is alleen een lichte bobbeling in de kop waargenomen.

Naaldwijk, 21 februari 2006
Ineke Stijger en Roel Hamelink

Derde verslag

Periode: week 8, 9 en 10

Week 8

De inoculatie met de isolaten DB1 (van Wageningen UR Glastuinbouw) en V3 (van GAC) is uitgevoerd. Het betreft hier isolaten die in eerdere proeven hevige symptomen lieten zien. Beide isolaten zijn in 3 vakken geïnoculeerd, namelijk 1 vak waar eerder al 1066 in was geïnoculeerd, 1 vak waar al eerder V1 in was geïnoculeerd, en 1 vak waar de planten nog virusvrij waren. Alvorens het laatstgenoemde vak is geïnoculeerd, is eerder in de week met ELISA een controle uitgevoerd op de aanwezigheid van PepMV. Uit deze toets bleek dat de betreffende vakken inderdaad nog virusvrij waren.

Week 9

Symptomen

- *1066*
Bij alle cultivars (geënte en ongeënte) zijn planten waargenomen met gele stippen op het blad. Bij de cultivar Ingar is een lichte bobbeling van het blad in de kop waargenomen. Tevens gaf Ingar een duidelijker mozaïek in het blad in de kop, in vergelijking tot de andere cultivars. Bij de cultivar Cedrico is bij de geënte en ongeënte planten een lichte misvorming van het blad onder de kop waargenomen.

- *VI*
Bij cultivar Ingar is bij zowel de geënte als de ongeënte planten een lichte bobbeling van het blad in de kop waargenomen. Tevens is bij Ingar een in vergelijking tot de andere twee cultivars een zwaardere mozaïekvorming in de kop waargenomen. Ook is alleen bij Ingar een lichte misvorming van het blad onder de kop waargenomen. Bij de cultivars Cedrico en Ever is eigenlijk alleen een licht mozaïek in de kop waargenomen.
- *VI + V3*
Bij alle planten in de kop een licht mozaïek waargenomen. Bij de cultivar Ingar is bij zowel de geënte als de ongeënte planten een lichte misvorming van het blad onder de kop waargenomen.
- *VI + DB1*
Bij alle planten in de kop een licht mozaïek waargenomen. Bij de cultivar Cedrico is bij de geënte en ongeënte planten een lichte bobbeling van het blad in de kop waargenomen. Tevens zijn enkele planten waargenomen met gele stippen op het blad. Bij de cultivar Ingar is bij zowel de geënte als de ongeënte planten een lichte bobbeling van het blad in de kop en een lichte vorm van brandneteligblad waargenomen. Tevens is bij Ingar een lichte misvorming van het blad onder de kop waargenomen.
- *1066 + V3*
Bij alle cultivars zijn planten waargenomen met gele stippen op het blad. Verder is bij alle planten in de kop een licht mozaïek waargenomen. Bij de cultivar Cedrico is bij de geënte en ongeënte planten een lichte bobbeling van het blad in de kop waargenomen. Bij de cultivar Ingar is bij zowel de geënte als de ongeënte planten een lichte bobbeling van het blad in de kop en een lichte vorm van brandneteligblad waargenomen. Tevens is bij Ingar een lichte misvorming van het blad onder de kop waargenomen.
- *1066 + DB1*
Hier zijn dezelfde symptomen waargenomen als bij het vak '1066 + V3'. In dit vak zijn twee planten met erge symptomen, beide hebben hevige bobbeling en brandneteligblad in de kop. Tevens vertonen beide planten zeer hevig mozaïek in de kop. De gehele planten vertonen chlorosevorming op het blad. Deze symptomen waren al aanwezig voor de inoculatie met DB1.
- *V3*
Bij alle planten in dit vak is een lichtgroene kop waargenomen. Het is nog niet duidelijk of het hier gaat om PepMV-symptomen. Verder geen bijzonderheden
- *DB1*
Bij vrijwel alle planten is necrosevorming op het geïnoculeerde blad waargenomen. Bij diverse planten verspreid over de drie cultivars lijkt het dat vanaf de derde tros ook de vruchtkroontjes beginnen te verdorren. Bij een plant (Ingar ongeënt) is al necrose op de stengel in de kop waargenomen.

Week 10

Symptomen

- *1066*
Bij alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij de cultivar Ingar (ongeënt) is een lichte bobbeling van het blad in de kop en een lichte vorm van brandnetelig blad (ook in de kop) waargenomen. Bij Ingar geënt was sprake van een lichte misvorming van het blad net onder de kop.
- *VI*
Bij alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij de cultivar Ingar (ongeënt) is een lichte misvorming van het blad net onder de kop waargenomen.
- *VI + V3*
Bij alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen. Verder geen bijzonderheden.
- *VI + DB1*
Bij alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij alle planten van de cultivar Cedrico is een lichte bobbeling van het blad in de kop waargenomen. Bij alle planten van de cultivar Ingar is een lichte misvorming van het blad direct onder de kop waargenomen. Bij een plant (Cedrico geënt) was een lichte necrose op het blad in de kop zichtbaar. Tevens waren de vruchtkroontjes vanaf tros 3 en hoger bruin verkleurd en opgekruld.

- *1066 + V3*
Bij alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij de cultivar Ingar (geënt en ongeënt) was sprake van een lichte misvorming van het blad net onder de kop. Verder waren er diverse planten verspreid over de drie cultivars met gele stippen op het blad.
- *1066 + DB1*
In dit vak zijn dezelfde symptomen waargenomen als in het vak '1066 + V3'. Tevens is bij alle planten van de cultivar Cedrico een lichte bobbeling van het blad in de kop waargenomen.
- *V3*
Alle planten in dit vak waren lichtgroen van kleur. Verder is bij alle planten van de cultivar Ingar een duidelijker mozaïek (in vergelijking met de andere twee cultivars) in de kop waargenomen. Bij alle planten in het vak is een lichte bobbeling van het blad in de kop waargenomen. Tevens is bij Ingar (geënt en ongeënt) en bij Cedrico (ongeënt) een in vergelijking met Ingar duidelijker vorming van brandnetelig blad in de kop. Alle planten gaven een lichte misvorming van het blad direct onder de kop. Bij alle planten van de cultivars Ingar en Cedrico waren de vruchtkroontjes vanaf tros 3 en hoger omgekruld of stonden omhoog. Bij Ever stonden deze normaal.
- *DB1*
Bij alle planten is in de kop een hevige necrosevorming in het blad en een hevige brandnetelvorm waargenomen. Tevens is bij alle planten een zeer duidelijk mozaïek in de kop waargenomen. Vanaf het geïnoculeerde blad naar boven is al het blad hevig misvormd en sterft het in sommige gevallen zelfs af. Ook is op de bovenste 30-50 cm van de stengel necrose waargenomen. Bij alle planten kleuren vanaf tros 3 en hoger de vruchtkroontjes bruin en staan ze omhoog of zijn ze omgekruld. De stengels van alle planten zijn erg hard, en breken bij gewaswerkzaamheden erg makkelijk af. Van een aantal symptomen in dit vak zijn op maandag 13 maart foto's genomen. Toen bleek dat het gewas in de kop weer een licht herstel liet zien.

Naaldwijk, 13 maart 2006

Ineke Stijger, Roel Hamelink en Ruud Kaarsemaker

Vierde verslag

Periode: week 11

Symptomen

- *1066*
Bij alle cultivars (geënt en ongeënt) zijn planten waargenomen met gele stippen op het blad. Bij de cultivar Ingar (ongeënt) is een lichte bobbeling van het blad in de kop waargenomen. Bij alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen.
- *VI*
Bij cultivar Ingar is bij de geënte planten een lichte bobbeling van het blad in de kop waargenomen. Ook is alleen bij Ingar een lichte misvorming van het blad onder de kop waargenomen. Bij alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen. De cultivar Cedrico vertoonde bij zowel de geënte als de ongeënte planten een lichte vorm van brandnetelig blad in de kop.
- *VI + V3*
Bij alle planten in de kop een licht mozaïek waargenomen. Bij de cultivar Ingar is bij zowel de geënte als de ongeënte planten een lichte misvorming van het blad onder de kop waargenomen.
- *VI + DB1*
Bij alle planten is in de kop een licht mozaïek waargenomen. Tevens zijn enkele planten waargenomen met gele stippen op het blad. Bij Ingar (geënt en ongeënt) is een lichte misvorming van het blad onder de kop waargenomen. De plant waar in week 10 al necrose was gevonden (zie verslag 13-03-06) vertoonde ook nu weer duidelijk necrose op al het blad en op de stengel boven het geïnoculeerde blad. Tevens is in de kop van deze plant een lichte vorm van bobbeling en brandnetelig blad waargenomen. Het blad bovenin is ook erg misvormd. Bij cultivar Ever (ongeënt) is een plant aangetroffen met lichte necrose op het geïnoculeerde blad.

- *1066 + V3*
Bij alle cultivars zijn planten waargenomen met gele stippen op het blad. Verder is bij alle planten in de kop een licht mozaïek waargenomen. Bij de cultivar Ingar is bij zowel de geënte als de ongeënte planten een lichte misvorming van het blad onder de kop waargenomen. Bij een plant (Ever geënt) is een lichte chlorose in het blad waargenomen. Tevens vertoonde deze plant naast een zwaar mozaïek, ook licht bobbelig en brandnetelvormig blad in de kop. Deze symptomen waren al aanwezig voor de inoculatie met V3.
- *1066 + DB1*
Hier zijn dezelfde symptomen waargenomen als bij het vak '1066 + V3'. In dit vak zijn twee planten met erge symptomen, beide hebben lichte bobbeling en brandnetelblad in de kop. Tevens vertonen beide planten zeer hevig mozaïek in de kop. De gehele planten vertonen chlorosevorming op het blad. Deze symptomen waren al aanwezig voor de inoculatie met DB1.
- *V3*
Alle planten in dit vak zijn licht van kleur. Bij alle planten kleuren de randen van de bladeren bovenin het gewas gelig. Alle planten van de cultivar Ingar hebben in vergelijking met de andere cultivars heviger bobbelig en brandnetelig blad in de kop. Tevens is bij Ingar het blad onder de kop misvormd. Bij alle planten is een duidelijk mozaïek in de kop waargenomen. Bij Ingar en Cedrico stonden de vruchtkronen van tros 3 en 4 omhoog. Bij Ever was dit ook het geval, maar in mindere mate.
- *DB1*
Bij alle planten is in de kop necrose in het blad en een lichte brandnetelvorm waargenomen. Het blad in de kop is wel misvormd (kort, gekruld, enz.) Tevens is bij alle planten een licht mozaïek in de kop waargenomen. Vanaf het geïnoculeerde blad tot 5 a 8 bladeren hoger is al het blad verdord en hevig misvormd. Ook is necrose op de stengel waargenomen. Dit loopt door tot ongeveer 30cm onder de kop. Bij alle planten zijn vanaf tros 3 tot tros 7/8 de vruchtkroontjes verdord en staan ze omhoog of zijn ze omgekruld. De stengels van alle planten zijn erg hard, en breken bij gewaswerkzaamheden erg makkelijk af.

Naaldwijk, 21 maart 2006

Ineke Stijger, Roel Hamelink en Ruud Kaarsemaker

Vierde verslag

Periode: week 12 - 15

Symptomen (voor vruchtsymptomen zie het kopje 'oogst')

- *1066*
Bij enkele planten zijn gele stippen waargenomen. Verder is bij alle planten een licht mozaïek in de kop waargenomen. Dit is niet toe- of afgenomen gedurende de hier besproken periode.
- *V1*
Gedurende de hier besproken periode is bij alle planten alleen een licht mozaïek in de kop waargenomen. Wel gaf de cultivar Cedrico (geënt) in week 12 - 14 een iets duidelijker mozaïek dan de andere cultivars. Dit was echter in week 15 al weer weggetrokken.
- *V1 + V3*
Op enkele planten is in de kop een lichte vorm van brandnetelig en bobbelig blad waargenomen. Tevens is bij alle planten een licht mozaïek in de kop aangetroffen. Dit was in week 12 en 13 bij alle planten ongeveer gelijk, terwijl in week 14 en 15 bij de cultivar Ever (zowel geënt als ongeënt) het mozaïek iets duidelijker te zien was. Op enkele planten zijn ook gele stippen waargenomen.
- *V1 + DB1*
Bij alle planten is in de kop een vrij duidelijk mozaïek aangetroffen. Bij de cultivar Ever was deze in de laatste 2 weken iets duidelijker te zien in vergelijking met de andere cultivars. Op enkele planten zijn ook gele stippen waargenomen. In week 15 is bij alle planten van de cultivars Cedrico en Ever spitsig blad in de kop waargenomen. Bij de plant waar al eerder necrose was aangetroffen, is een zware misvorming van het blad waargenomen. Dit gaat door tot ongeveer 30 cm onder de kop.

- *1066 + V3*
Bij alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij enkele planten van de cultivar Ever was dit mozaïek iets duidelijker te zien. Bij diverse planten in alle cultivars zijn gele stippen te zien.
- *1066 + DB1*
Bij alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij enkele planten van de cultivar Ever was dit mozaïek iets duidelijker te zien. Bij diverse planten in alle cultivars zijn gele stippen te zien.
- *V3*
In week 12 waren er nog vrij hevige symptomen waar te nemen, zo lieten alle planten een licht mozaïek in de kop zien. Tevens hadden alle planten bobbelig en brandnetelig blad in de kop. Bij de cultivar Ingar (zowel geënt als ongeënt) was dit iets heviger. Veel planten in alle cultivars hadden gele stippen op het blad. Bij alle planten is onder de kop een lichte misvorming van het blad waargenomen. Bij de cultivar Ingar (geënt en ongeënt) was dit iets erger dan bij de andere cultivars. Bij de cultivars Ingar en Cedrico stonden de vruchtkroontjes van tros 3 en 4 omhoog. De symptomen zijn in de hier beschreven periode in hevigheid afgenomen, in week 15 werd naast de misvorming in het blad en de gele stippen bij alle planten een licht mozaïek in de kop aangetroffen. In de koppen van cultivar Cedrico (geënt en ongeënt) was nog een licht brandnetelig blad te zien.
- *DB1*
Net als bij het vak 'V3' namen in dit vak de waargenomen symptomen in hevigheid af. In week 12 zijn bij alle planten in de kop de volgende symptomen waargenomen: een licht mozaïek, lichte necrose en bobbeling, met duidelijk brandnetelig blad. In week 15 is alleen nog een licht mozaïek in de kop waargenomen (bij Ever ongeënt iets duidelijker dan bij de rest).

In alle cultivars zijn planten waargenomen met gele stippen op het blad. Alle planten vertoonden hevige misvormingen vanaf het geïnoculeerde blad tot ongeveer 50 cm onder de kop. Tevens was bij alle planten een hevige necrosevorming op het blad en de stengel waargenomen. Ook dit liep in week 15 tot ongeveer 50 cm onder de kop. Bij alle planten zijn de vruchtkroontjes vanaf tros 1 tot ongeveer tros 7 verdord. De symptomen zijn bij de cultivar Ever (geënt en ongeënt) iets minder erg dan bij de andere cultivars. Van het herstel van de planten is een overzichtsfoto gemaakt. Zie Foto 1.



Foto 1. Overzicht herstel planten vak 'DB1'.

Oogst

In week 14 is voor het eerst in de proef geoogst. In de vakken 'V3' en 'DB1' zijn erg veel wankleurige vruchten aangetroffen. In het vak 'DB1' waren ook de kroontjes van de geoogste trossen verdord. In de overige vakken waren geen bijzonderheden. Van de wankleurige vruchten met de verdorde vruchtkroontjes is een foto gemaakt, zie Foto 2.



Foto 2. Wankleurige vruchten met verdorde vruchtkroontjes.

Naaldwijk, 18 april 2006

Ineke Stijger, Roel Hamelink en Ruud Kaarsemaker

Vijfde verslag

Periode: week 16-19

Symptomen (voor vruchtsymptomen zie het kopje 'oogst')

- *1066*
Bij alle planten is in week 16 een licht mozaïek in de kop waargenomen. In de periode van week 17-19 werd bij sommige planten (in alle cultivars) dit mozaïek niet meer aangetroffen. Enkele planten vertoonden in week 16 licht brandnetelig en bobbelig blad in de kop. Verderop in de hier besproken periode werden de symptomen op wat meer planten gevonden.
- *V1*
In week 16 is bij alle planten een licht mozaïek in de kop waargenomen. Alle planten van de cultivar Cedrico (ongeënt) hadden ook een licht bobbelig en brandnetelig blad in de kop. Dit was later in de hier besproken periode echter weer weggetrokken. In week 17-19 werd bij sommige planten verspreid over de cultivars geen mozaïek meer in de kop aangetroffen.
- *V1 + V3*
In week 16 is op enkele planten in de kop een lichte vorm van brandnetelig en bobbelig blad waargenomen. Tevens is bij alle planten een licht mozaïek in de kop aangetroffen. Bij de cultivar Ever (ongeënt) was het mozaïek iets duidelijker te zien. Op enkele planten zijn ook gele stippen waargenomen. Later in de hier besproken periode was het mozaïek in de kop bij alle planten ongeveer even duidelijk. In week 19 waren er vrij veel planten, verspreid over de cultivars, met brandnetelig blad in de kop.

- *V1 + DB1*

Bij alle planten is gedurende de hier besproken periode in de kop een vrij duidelijk mozaïek aangetroffen, in week 19 was deze bij de cultivar Ingar (zowel geënt als ongeënt) iets duidelijker dan bij de andere planten. Op enkele planten zijn ook gele stippen waargenomen. In week 18 werden voor het eerst in de cultivar Ever (ongeënt) kleine bruine vlekjes op het blad waargenomen. Het is nog niet duidelijk of het hier om necrose gaat. Op enkele planten is een lichte vorm van brandnetelig blad aangetroffen. In week 19 is dit bij veel planten, verspreid over de cultivars, aangetroffen.

- *1066 + V3*

In week 16 is bij alle planten een licht mozaïek in de kop waargenomen. In de rest van de hier besproken periode is bij een aantal planten verspreid over de cultivars dit mozaïek niet meer waargenomen. Bij diverse planten zijn gele stippen op het blad waargenomen. In week 16 waren er een paar planten met een lichte vorm van brandnetelig blad in de kop. In week 19 waren er vrij veel planten, verspreid over de cultivars, met deze symptomen.

- *1066 + DB1*

In week 16 is bij alle planten een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij Ever geënt was dit iets duidelijker te zien dan bij de rest van de planten. In week 19 was de mozaïek in de kop bij alle planten ongeveer even duidelijk. In week 18 en 19 waren er diverse planten met een lichte vorm van brandnetelig blad in de kop. De meeste van deze planten waren te vinden bij Ingar geënt en ongeënt. In week 18 werden voor het eerst in de cultivar Ever (ongeënt) kleine bruine vlekjes op het blad waargenomen. Het is nog niet duidelijk of het hier om necrose gaat.

- *V3*

Bij alle planten is gedurende de hier besproken periode een licht mozaïek in de kop waargenomen. In het begin van de periode waren er veel planten met gele stippen op het blad. In week 19 waren dit er al veel minder. In week 16 en 17 is bij alle planten van de cultivar Cedrico in de kop een lichte vorm van brandnetelig blad waargenomen. In week 18 en 19 waren er ook planten in de andere cultivars met deze symptomen. Bij de cultivar Ingar (geënt en ongeënt) is tot week 18 onderin het gewas wat misvormd blad waargenomen.

- *DB1*

In week 16 is veel van het verdorde blad van de planten gehaald. Bij alle planten is gedurende de hier besproken periode een licht mozaïek in de kop waargenomen. Een aantal planten had gele stippen op het blad. Alle planten vertonen zeer hevige bladmisvormingen, dit loopt tot ongeveer 50 cm onder de kop. Bij het ras Ever (geënt en ongeënt) loopt de misvorming nog iets minder ver door, in vergelijking met de andere cultivars. Bij de cultivar Cedrico (ongeënt) zijn een aantal planten met veel chlorose in de bladeren.

In week 19 waren er vrij veel planten (binnen de diverse cultivars) met licht brandnetelig blad in de kop. De verdorring van de vruchtkroontjes loopt bij alle planten tot ongeveer tros 6. Tot tros 9 zijn alle kroontjes misvormd en omgekruld.

Oogst

In alle vakken (ook in het onbehandelde vak) worden wankleurige vruchten aangetroffen. In ieder vak worden bij vooral de ongeënte planten ook vruchten met neusrot geoogst. In het vak 'DB1' zijn de vruchtkroontjes verdord. In veel vakken zijn de geoogste vruchten minder rijp (oranje ipv rood) als in de onbehandeld.

Naaldwijk, 15 mei 2006

Ineke Stijger, Roel Hamelink en Ruud Kaarsemaker

Vijfde verslag

Periode: week 20 - 23

Stand van het gewas

De bladvulling in de PepMV-vrije vakken is duidelijk beter dan in de vakken met PepMV. In die vakken zijn de geënte planten vrij zwaar en de niet geënte planten staan mooi generatief te groeien met voldoende bladvolume al is de kop wel wat dunner dan de geënte planten.

In alle PepMV vakken is de bladvulling duidelijk minder en heeft de onderstam een positieve bijdrage aan de kopdikte en de bladvulling. Het gevolg is dat het bladoppervlak aan de lage kant dreigt te worden. Er kunnen niet meer bladeren per stengel blijven staan omdat de trossen dan tussen het blad geoogst moeten worden en dat komt niet overeen met de praktijk.

Het vak met enkelvoudig DB1-besmetting (necrotische isolaat) herstelde zich langzaam maar is iets terug gevallen. De bladgrootte herstelde zich aanvankelijk goed maar 3-6 bladeren onder de kop zijn de bladeren weer duidelijk kleiner als gevolg van misvormingen en necrotische plekjes. Hier worden wat meer bladeren per stengel aangehouden dan de overige behandelingen zodat het gewas zich kan herstellen.

Symptomen (voor vruchtsymptomen zie het kopje 'oogst')

- *1066*
Bij vrijwel alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen. In week 20 en 21 is bij een aantal planten ook wat brandnetelig blad in de kop aangetroffen. Het betrof hier vooral planten van de cultivar Ingar (zowel geënt als ongeënt). In week 22 is het brandnetelig blad niet meer waargenomen. In week 22 begonnen enkele planten van de cultivar Ever (ongeënt) licht chlorotisch blad te vertonen. In week 23 was dit erger geworden. Voor een foto van de chlorotische bladeren, zie Foto 1.
- *V1*
In week 20 is bij alle planten een licht mozaïek in de kop waargenomen. In week 21-23 werd bij sommige planten verspreid over de cultivars (behalve Ingar) geen mozaïek meer in de kop aangetroffen. Enkele planten van de cultivar Cedrico (ongeënt) vertoonden lichte chlorose.
- *V1 + V3*
Op een enkele plant na, is bij alle planten een licht mozaïek in de kop aangetroffen. Op enkele planten zijn ook gele stippen waargenomen.
- *V1 + DB1*
Bij alle planten is gedurende de hier besproken periode in de kop een licht mozaïek aangetroffen, in week 23 is dit mozaïek bij enkele planten van de cultivar Cedrico (zowel geënt als ongeënt) niet meer waargenomen. Op enkele planten is een lichte vorm van brandnetelig blad aangetroffen. In week 23 is dit niet meer waargenomen. In week 22 zijn bij diverse planten van de cultivars Ingar en Ever (geënt en ongeënt) in de kop necrotische vlekjes waargenomen. In week 23 zat deze necrose op de bladeren net onder de kop (niet meer in de kop) en in lichte vorm op bladeren lager in de plant. Bij een aantal planten is ook necrose op de kroonlipjes rond tros 16 waargenomen. Bij een plant is ook necrose op de stengel waargenomen.
Voor de necrose op het blad, zie Foto 2.
- *1066 + V3*
Op een enkele plant na, is bij alle planten een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij diverse planten zijn gele stippen op het blad waargenomen.

Er waren een paar planten met een lichte vorm van brandnetelig blad in de kop.

- *1066 + DB1*
In week 20 is bij alle planten een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij sommige planten, verspreid over de cultivars was dit iets duidelijker te zien dan bij de rest van de planten. Gedurende de hier besproken periode waren er diverse planten met een lichte vorm van brandnetelig blad in de kop. In week 22 zijn bij diverse planten van de cultivars Ingar en Ever (geënt en ongeënt) in de kop necrotische vlekjes waargenomen. In week 23 zat deze necrose op de bladeren net onder de kop (niet meer in de kop) en in lichte vorm op bladeren lager in de plant. Bij een plant is ook necrose op de stengel waargenomen.

- *V3*

Bij alle planten is gedurende de hier besproken periode een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij enkele planten was dit mozaïek iets duidelijker te zien. In week 20 waren er een aantal planten (vooral Cedrico) met licht brandnetelig blad in de kop. In week 23 was dit echter weer weggetrokken.

- *DB1*

Bij alle planten is gedurende de hier besproken periode een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij de cultivars Ever en Ingar was deze iets duidelijker te zien, in vergelijking tot de cultivar Cedrico. Een aantal planten had gele stippen op het blad. Bij de cultivar Cedrico (ongeënt) zijn een aantal planten met veel chlorose in de bladeren. In week 22 was bij alle planten duidelijk necrose in de kop te zien. Bij de cultivar Ever was dit nog iets duidelijker, dan bij de rest. Tevens waren er veel planten (vooral Ever) met stengel necrose in de kop.

Rond tros 14 tot 17 was ook necrose te zien op de kroonlipjes en op de trossteeltjes zelf.

De necrose was bij alle planten ook lager in de plant op het blad te zien (in een lichte vorm). Bij diverse planten was ook het blad onder de kop misvormd. In week 23 is bij geen van de planten nog necrose in de kop waargenomen. De necrose bevond zich nu vooral op de bladeren onder de kop en op de stengel onder de kop. Bij alle planten was het blad onder de kop ook misvormd.

Voor een foto van de necrose op het blad en de bladmisvorming, zie Foto 3.

Oogst

In alle vakken (ook in het onbehandelde vak) worden veel wankleurige vruchten aangetroffen. Dit geldt echter niet voor de cultivar Ingar (ongeënt en geënt). Hier worden in alle vakken nauwelijks tot geen wankleurige vruchten aangetroffen. In week 21 en 23 was de oogst voor alle vakken minder rijp.

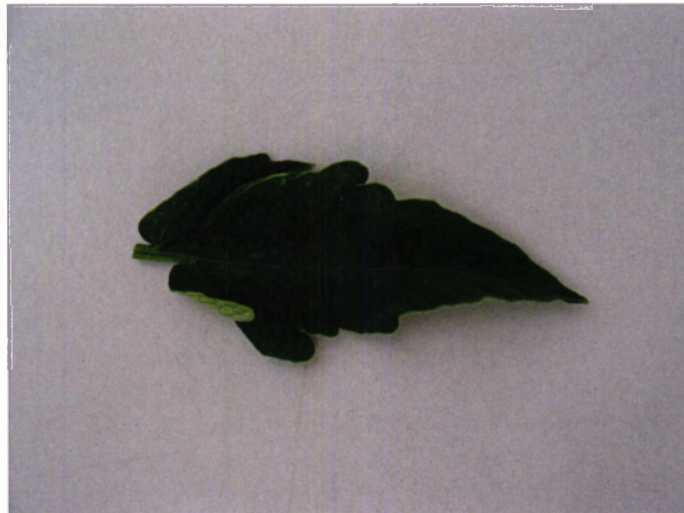


Foto 1. Chlorosevorming op blad in vak met isolaat 1066.



Foto 2. Necrosevorming op blad in vak met isolaten V1 en DB1.



Foto 3. Necrosevorming en bladmisvorming op blad in vak met isolaat DB1.

Naaldwijk, 09 juni 2006

Ineke Stijger, Roel Hamelink en Ruud Kaarsemaker

Vijfde verslag

Periode: week 24 - 26

Symptomen (voor vruchtsymptomen zie het kopje 'oogst')

- *1066*
Bij vrijwel alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij een aantal planten (Ever en Cedrico ongeënt) is chlorose in het blad waargenomen.
- *V1*
Bij vrijwel alle planten is een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij een aantal planten is licht brandnetelig blad in de kop waargenomen. Bij enkele planten van Cedrico ongeënt is lichte chlorose in het blad waargenomen.
- *V1 + V3*
Bij alle planten is een licht mozaïek in de kop aangetroffen. Bij enkele planten (Ingar en Cedrico) is ook licht brandnetelig blad in de kop waargenomen. Bij alle cultivars zijn enkele planten met chlorose in het blad aangetroffen.
- *V1 + DB1*
Bij alle planten is gedurende de hier besproken periode in de kop een licht mozaïek aangetroffen. Bij de cultivar Ingar (geënt en ongeënt) was dit mozaïek iets duidelijker. Bij een aantal planten van de cultivars Ingar en Ever (geënt en ongeënt) is in de gehele plant necrose op het blad waargenomen. Tevens is hier een lichte misvorming van het blad waargenomen (blad omgekruld).
- *1066 + V3*
Op een enkele plant na, is bij alle planten een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij diverse planten zijn gele stippen op het blad waargenomen. Er waren een paar planten met een lichte vorm van brandnetelig blad in de kop. Een enkele plant binnen de cultivars Ingar en Ever vertoonde lichte chlorose in het blad.
- *1066 + DB1*
In week 20 is bij alle planten een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij sommige planten, verspreid over de cultivars was dit iets duidelijker te zien dan bij de rest van de planten. In week 24 waren binnen de cultivars Ingar en Ever (geënt en ongeënt) diverse planten met lichte necrose in het blad onder de kop. In week 25 waren er meer planten met necrose. Nu zat de necrose echter ook in de kop. In week 25 waren er ook diverse planten (vooral Ever ongeënt) met een lichte misvorming van het blad.
- *V3*
Bij alle planten is gedurende de hier besproken periode een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij enkele planten was dit mozaïek iets duidelijker te zien. Enkele planten verspreid over de cultivars vertoonden lichte chlorose in het blad.
- *DB1*
Bij alle planten is gedurende de hier besproken periode een licht mozaïek in de kop waargenomen. Bij de cultivar Ingar was dit iets beter te zien. Alle planten hadden necrose op het blad. Bij de meeste planten (bij cultivar Cedrico slechts enkele) zat ook necrose in de kop. Bij de cultivars Ingar en Ever is rond tros 16 necrose op de vruchtkroontjes en -steeltjes te zien. Bij de cultivar Cedrico is dit rond tros 20 te zien. Bij alle planten was het blad misvormd. Bij de cultivar Ever (geënt en ongeënt) was dit iets duidelijker te zien, in vergelijking tot de andere cultivars.

Oogst

In alle vakken (ook in het onbehandelde vak) worden veel wankleurige vruchten aangetroffen. In het vak met isolaat 'DB1' waren veel misvormde vruchten geoogst. In alle vakken hangen erg veel vruchten met neusrot aan de planten.

Naaldwijk, 03 juli 2006

Ineke Stijger, Roel Hamelink en Ruud Kaarsemaker

Bijlage IV

Waarneming symptomen

Tabel 1. Aantal maal dat er symptomen in een veld met de betreffende virusbehandeling zijn waargenomen in geënte en ongeënte tomaten (totaal van alle rassen).

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop						Symptomen waargenomen in hele plant						Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Grauw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming blad/plant	Slap	Stengel necrose	
Onbehandeld													
1066	1	27	2		207	6		11	30	13			
V1		32	58	2	211	210		19	3	11	1		
1066 + V3		32	93		210	210		7	65	34			
1066 + DB1	14	43	88		216	216	45	1	63	36		3	
V1 + V3		38	89		208	204		8	26	20		1	
V1 + DB1	10	46	90		216	210	43		30	38		2	
V3		25	104		186	180		6	59	45	1		1
DB1	69	17	86	19	186	180	147	9	55	149		45	50

Tabel 2. Gemiddelde waarde van alle dagen dat er symptomen in een veld met de betreffende virusbehandeling zijn waargenomen in geënte en ongeënte tomaten (gemiddeld van alle rassen).

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop					Symptomen waargenomen in hele plant						Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Grauw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming blad/plant	Slap	
Onbehandeld												
1066	1,0	3,7	4,0		4,4	5,0		3,1	1,6	2,7		
V1		4,6	3,0	1,5	4,9	4,9		2,4	1,0	2,7	1,0	
1066 + V3		3,2	2,6		5,2	5,0		1,3	1,6	2,7		
1066 + DB1	2,1	3,9	2,6		5,6	5,0	1,7	1,0	1,2	2,9		1,0
V1 + V3		4,1	2,8		5,5	5,0		1,4	1,2	3,0		3,0
V1 + DB1	1,5	4,6	3,0		5,6	4,9	1,3	1,1	1,2	2,8	4,0	1,0
V3		5,7	3,1	5,1	5,2	4,9		4,8	1,6	4,3		12,0
DB1	6,0	3,9	4,5		6,0	5,0	7,2		1,6	9,4		15,4

Tabel 3. Aantal maal dat er symptomen in een veld met de betreffende virusbehandeling zijn waargenomen in ongeënte tomaten (totaal van alle rassen).

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop					Symptomen waargenomen in hele plant					Necrose tros	
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Grauw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming blad/plant		Slap
Onbehandeld												
1066	1	14	2		103	3		11	14	7		
V1		15	30		104	105		18	1	8	1	
1066 + V3		13	27	1	105	102		3	35	18		
1066 + DB1	6	20	38		108	108	28	1	31	19		3
V1 + V3		21	44		103	102		6	15	15		1
V1 + DB1	3	21	45		108	105	22		12	20		1
V3		12	42		93	90		6	29	28		
DB1	37	8	43	9	93	90	75	9	25	76		23
												25

Tabel 4. Gemiddelde waarde van alle dagen dat er symptomen in een veld met de betreffende virusbehandeling zijn waargenomen in ongeënte tomaten (gemiddeld van alle rassen).

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop						Symptomen waargenomen in hele plant					Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Grauw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming blad/plant	Slap	
Onbehandeld												
1066	1,0	3,7	4,0		4,6	5,0		3,1	1,6	2,4		
V1		5,0	3,4	2,0	4,8	5,0		2,5	1,0	2,9	1,0	
1066 + V3		3,5	2,3		4,7	5,0		1,0	1,5	3,2		
1066 + DB1	2,3	3,9	2,3		5,6	5,0	1,7	1,0	1,2	3,0		1,0
V1 + V3		3,9	2,6		5,5	5,0		1,4	1,2	3,1		3,0
V1 + DB1	1,7	5,0	2,9		5,5	4,9	1,4		1,3	2,6		1,0
V3		5,8	3,4		5,2	5,0		1,1	1,7	4,1		
DB1	5,6	4,0	4,3	5,4	5,8	5,0	7,3	4,8	1,5	9,5		7,0
												14,6

Tabel 5. Aantal maal dat er symptomen in een veld met de betreffende virusbehandeling zijn waargenomen in geënte tomaten (totaal van alle rassen).

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop					Symptomen waargenomen in hele plant						Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Grauw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming blad/plant	Slap	
Onbehandeld						3						
1066		13	26		104	105			16	6		
V1		17	31	1	107	102		1	2	3		
1066 + V3		19	55		105	105		4	30	16		
1066 + DB1		23	40		108	108	17		32	17		
V1 + V3	8	17	45		105	102		2	11	5		
V1 + DB1	7	25	45		108	105	21		18	18	1	1
V3		13	62		93	90			30	17	1	
DB1	32	9	43	10	93	90	72		30	73	22	25

Tabel 6. Gemiddelde waarde van alle dagen dat er symptomen in een veld met de betreffende virusbehandeling zijn waargenomen in geënte tomaten (gemiddeld van alle rassen).

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop					Symptomen waargenomen in hele plant							Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Grauw	Bladnecrose	Chlorose	Gale stippen	Misvorming blad/plant	Slap	Stengel necrose	
Onbehandeld						5,0							
1066		3,6	2,4		4,2	4,9			1,5	3,0			
V1		4,2	2,6	1,0	5,0	5,0		1,0	1,0	2,3			
1066 + V3		3,0	2,8		5,7	5,0		1,5	1,6	2,1			
1066 + DB1		3,9	2,9		5,6	5,0	1,7		1,3	2,9			
V1 + V3	2,0	4,5	3,0		5,5	5,0		1,5	1,2	2,6			
V1 + DB1	1,4	4,3	3,1		5,7	4,9	1,3		1,1	2,9	4,0	1,0	12,0
V3		5,5	2,9		5,3	4,9			1,5	4,5			
DB1	6,4	3,8	4,6	4,7	6,2	5,0	7,1		1,7	9,3		7,3	16,2

Tabel 7. Aantal maal dat er symptomen in een veld met het betreffende ras zijn waargenomen in geënte en ongeënte tomaten.

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop					Symptomen waargenomen in hele plant							Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Grauw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming blad/plant	Slap	Stengel necrose	
Cedrico	21	96	232	4	545	540	45	20	110	56	1	14	16
Ever	35	58	147	9	547	540	102	34	110	169		21	18
Ingar	38	106	287	8	548	540	88	7	111	121	1	16	17

Tabel 8. Gemiddelde waarde van alle dagen dat er symptomen in een veld met het betreffende ras zijn waargenomen in geënte en ongeënte tomaten.

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop						Symptomen waargenomen in hele plant						Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Grauw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming blad/plant	Slap	Stengel necrose	
Cedrico	5,8	3,7	2,9	6,0	4,9	5,0	7,3	3,2	1,5	7,7	4,0	7,7	27,0
Ever	4,8	4,2	3,0	4,0	5,4	4,9	4,8	2,2	1,5	5,2		5,8	3,6
Ingar	4,4	4,6	3,2	4,9	5,6	5,0	4,3	1,8	1,3	5,9	1,0	6,3	16,7

Tabel 9. Aantal maal dat er symptomen in een veld met het betreffende ras zijn waargenomen in ongeënte tomaten.

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop						Symptomen waargenomen in hele plant						Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Gruuw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming blad/plant	Slap	Stengel necrose	
Cedrico	13	49	117	2	271	270	24	20	46	33		7	7
Ever	15	28	61	4	272	270	53	27	51	103		12	9
Ingar	19	47	141	4	274	270	48	7	65	55	1	9	9

Tabel 10. Gemiddelde waarde van alle dagen dat er symptomen in een veld met het betreffende ras zijn waargenomen in ongeënte tomaten.

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop						Symptomen waargenomen in hele plant						Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Grauw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming blad/plant	Slap	Stengel necrose	
Cedrico	5,0	3,7	2,8	6,0	4,8	5,0	7,2	3,2	1,6	7,3		7,9	13,7
Ever	5,7	4,3	3,1	4,5	5,2	4,9	4,8	2,4	1,4	4,9		5,1	3,3
Ingar	4,2	5,0	3,1	5,3	5,5	5,0	4,1	1,8	1,4	6,4	1,0	5,8	26,4

Tabel 11. Aantal maal dat er symptomen in een veld met het betreffende ras zijn waargenomen in geënte tomaten.

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop						Symptomen waargenomen in hele plant						Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Grauw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming blad/plant	Slap	Stengel necrose	
Cedrico	8	47	115	2	274	270	21		64	23	1	7	9
Ever	20	30	86	5	275	270	49	7	59	66		9	9
Ingar	19	59	146	4	274	270	40		46	66		7	8

Tabel 12. Gemiddelde waarde van alle dagen dat er symptomen in een veld met het betreffende ras zijn waargenomen in geënte tomaten.

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop						Symptomen waargenomen in hele plant						Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel	Verkleuring/ mozaïek	Gruuw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming	Slap	Stengel	
				necrose						blad/plant		necrose	
Cedrico	7,1	3,7	2,9	6,0	4,9	5,0	7,5		1,4	8,4	4,0	7,6	37,3
Ever	4,2	4,2	3,0	3,6	5,6	4,9	4,7	1,4	1,6	5,8		6,7	3,8
Ingar	4,7	4,3	3,2	4,5	5,6	5,0	4,4		1,3	5,4		7,1	5,8

Tabel 13. Aantal maal dat er symptomen in een veld zijn waargenomen in geënte en ongeënte tomaten.

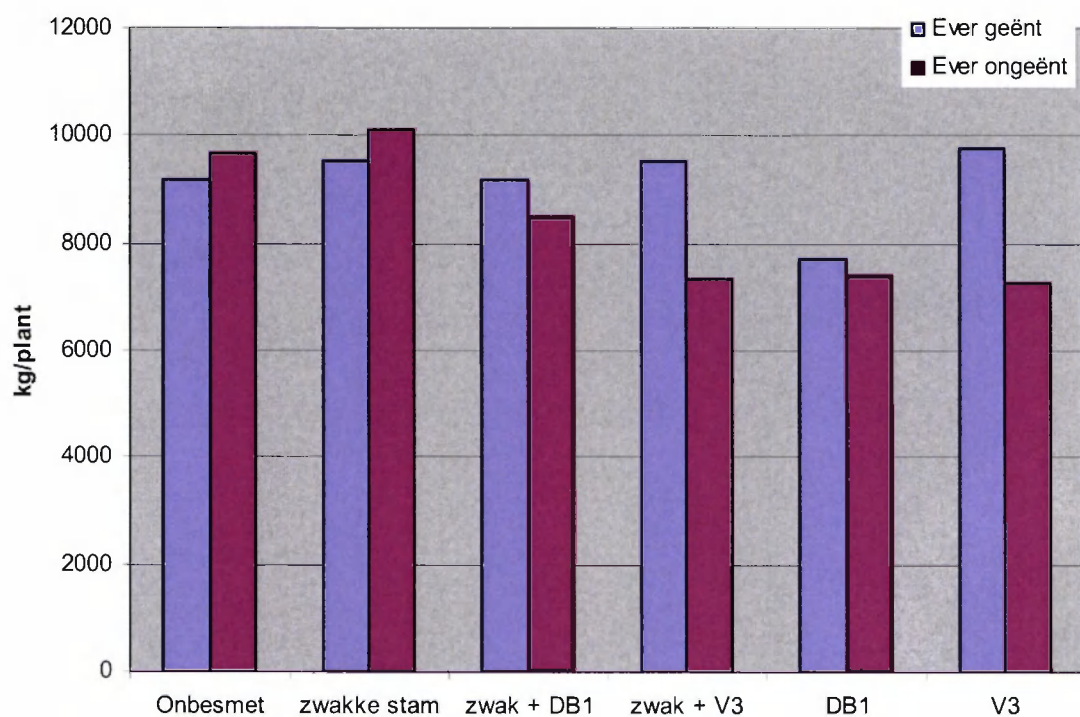
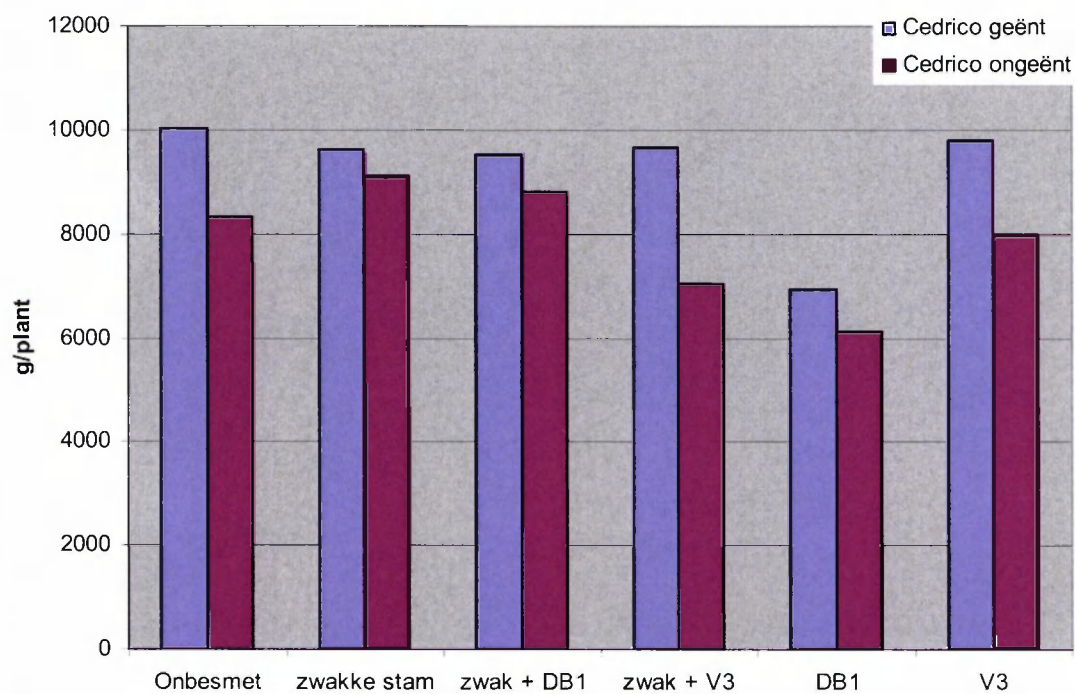
Behandeling	Symptomen waargenomen in kop						Symptomen waargenomen in hele plant						Necrose tros
	Bobbeling			Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Gruauw	Misvorming						
	Bladnecrose	blad	Brandnetel				Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	blad/plant	Slap	Stengel necrose	
Geënt	47	136	347	11	823	810	110	7	169	155	1	23	26
Ongeënt	47	124	319	10	817	810	125	54	162	191	1	28	25

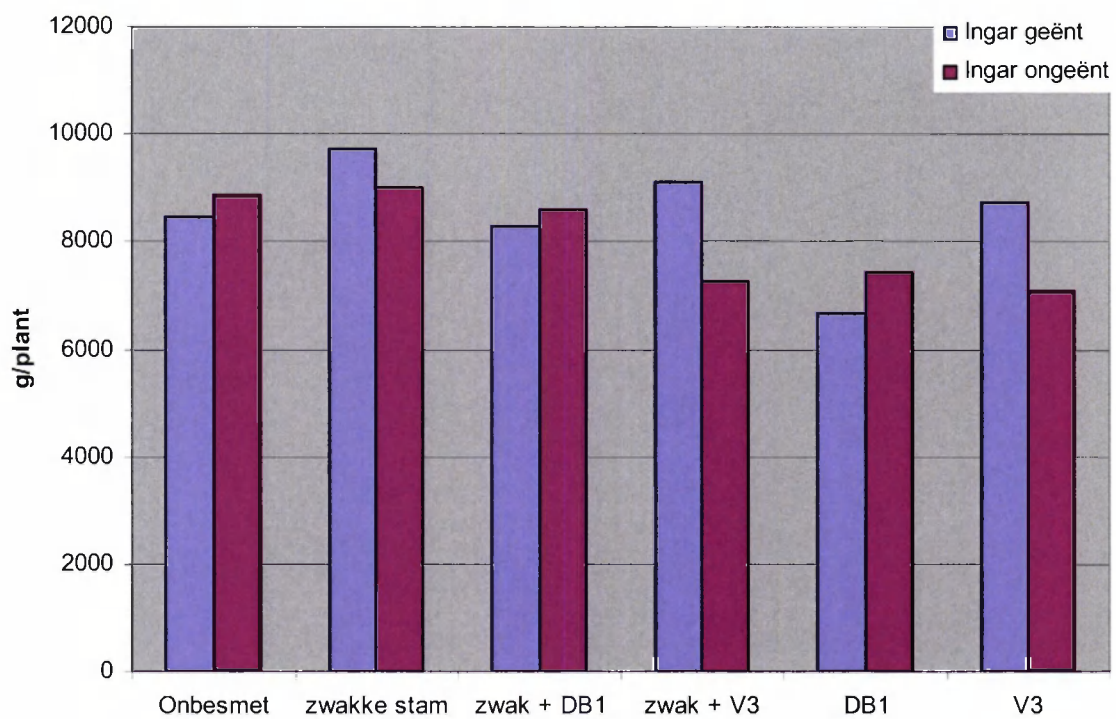
Tabel 14. Gemiddelde waarde van alle dagen dat er symptomen in een veld met het betreffende ras zijn waargenomen in geënte en ongeënte tomaten.

Behandeling	Symptomen waargenomen in kop						Symptomen waargenomen in hele plant						Necrose tros
	Bladnecrose	Bobbeling blad	Brandnetel	Stengel necrose	Verkleuring/ mozaïek	Grauw	Bladnecrose	Chlorose	Gele stippen	Misvorming blad/plant	Slap	Stengel necrose	
Geënt	4,9	4,1	3,1	4,4	5,4	5,0	5,1	1,4	1,4	6,0	4,0	7,1	16,0
Ongeënt	4,9	4,3	3,0	5,1	5,2	5,0	5,0	2,6	1,4	5,7	1,0	6,0	14,6

Bijlage V

Totale opbrengst per ras





Totale opbrengst gemiddeld over alle rassen en behandelingen

