

Onderzoek naar mechanische verspreiding van Tulpenvirus X onder praktijkomstandigheden

Maarten de Kock, Martin van Dam en Miriam Lemmers

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
Juli 2009
PPO nr. 32 340554 00 / PT nr. 13062

© 2009 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

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 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



PPO-BBF projectnummer: 32 340554 00
PT projectnummer: 13062

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

Adres : Prof. van Slogterenweg 2, Lisse
: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 – 46 21 21
Fax : 0252 – 46 21 00
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
1.1 Tulpenvirus X - achtergrond	7
1.2 Tulpenvirus X - verspreiding	7
1.3 Doelstelling van onderzoekproject.....	8
2 MATERIAAL EN METHODEN	9
3 RESULTATEN & DISCUSSIE	11
3.1 Virusanalyse handmatig koppen	11
3.2 Machinaal koppen.....	11
3.3 Virusanalyse machinaal gekopte tulpen.....	12
3.4 Nieuwe aanwijzingen omtrent verspreiding van TVX	15
3.4.1 Mechanische verspreiding TVX.....	15
3.4.2 Verspreiding via water?.....	15
3.4.3 Verspreiding via grondgebonden vectoren?	15
3.4.4 Voorkomen van mechanische verspreiding en ontsmetting	16
4 AANBEVELINGEN VOOR DE PRAKTIJK.....	17
5 CONCLUSIES	19
6 GERAADPLEEGDE LITERATUUR.....	21

Samenvatting

Uit eerder onderzoek bij PPO-BBF kwam de tulpengalmijt als vector van Tulpenvirus X (TVX) naar voren. In 2008 is ontdekt dat TVX tijdens de bewaring waarschijnlijk ook via de stromijt kan worden verspreid. Daarnaast is gedurende de periode 2006-2008 bekend geworden dat mechanische verspreiding van TVX via koppen een belangrijke besmettingsroute voor dit virus kan zijn. Deze kennis is gebaseerd op relatief kleine veldproeven en handmatig koppen. Tegenwoordig is handmatig koppen niet meer gangbaar en worden de tulpenvelden machinaal gekopt. Vanwege de sterke toename van het TVX-probleem in de praktijk is het van groot belang het risico op mechanische TVX-verspreiding bij machinaal koppen verder in kaart te brengen. Aansluitend kunnen passende maatregelen genomen worden om virusverspreiding tijdens machinaal koppen te beperken.

Een proefveld is aangelegd waarin tulpen onder praktijkomstandigheden zijn gekopt. Er is zowel 'normaal' gekopt waarbij uitsluitend de bloemsteel machinaal werd afgesneden als ook 'diep' gekopt waarbij de bloemsteel als ook de bovenste delen van het blad machinaal werden afgesneden. Na een strook viruszieke planten is een strook virusvrij planten gekopt waarna het uitsmeereffect van het virus is bestudeerd.

Tijdens het machinaal koppen van (viruszieke) tulpen vindt er inderdaad verspreiding van TVX via de kopmachine plaats. Echter, de omvang van de virusverspreiding is relatief laag en de uitsmering is gering. In de praktijk zal het risico op virusverspreiding bij 'diep koppen' niet groter of kleiner zijn dan bij 'normaal koppen'. Hierbij moet gemeld worden dat de weersomstandigheden tijdens het koppen zeer gunstig waren om virusverspreiding te beperken. Wanneer er bij minder gunstige omstandigheden wordt gekopt (bijv. op koele dagen met een hoge luchtvochtigheid), dan wordt verwacht dat het risico op virusverspreiding zal toenemen.

De relatief geringe mate waarin in dit project de virusverspreiding is waargenomen, kan de sterke toename van TVX in de praktijk niet verklaren. Virusverspreiding door mijten tijdens de bewaring, en mogelijk andere manieren van virusverspreiding spelen zeker in de praktijk een belangrijke rol. Beheersing van de TVX-problematiek moet daarom gedurende alle fasen van de teelt en broeierij punt van aandacht zijn. Een uitgebreide lijst van aanbevelingen voor de praktijk is geformuleerd waarmee verspreiding van TVX tijdens koppen, maar ook gedurende andere fasen van de teelt beperkt moet kunnen worden.

1 Inleiding

1.1 Tulpenvirus X - achtergrond

Het tulpenvirus X (TVX) behoort tot de familie van potexvirussen en bestaat uit staafvormige virusdeeltjes met een afmeting van ca. 495 nm x 13 nm. Bij infectie van tulpen ontstaan geelgroen- en wit- of bruin-necrotische streperigheid, en langgerekte ovale vlekken, plaatselijk optredend of over het gehele bladoppervlak. In de bloemen komen kleine, ovale of streperige vlekken voor, waarvan de zichtbaarheid afhankelijk is van de bloemkleur. De aard van de symptomen is afhankelijk van de aangetaste cultivars. De symptoomontwikkeling komt afhankelijk van het cultivar ruim voor de bloei tot omstreeks de bloei en later op gang. In een aanzienlijk deel van een partij kunnen symptomen afwezig zijn, terwijl het virus aanwezig is

Inventariserend onderzoek van de BKD en afkeuring van partijen voor export naar Japan vanwege TVX wijzen erop dat de problemen met TVX de laatste jaren in omvang toeneemt (Tabel 1):

Tabel 1. Schade (in oppervlakte) als gevolg van TVX

Jaar	Afkeuring vanwege >1% TVX
2000	3 ha
2004	23 ha
2007	43 ha
2008	46 ha

Tulp is tot zover bekend de enige natuurlijke waardplant van TVX. Handmatige inoculatie op virustoetsplanten zoals *Chenopodium amaranticolor* en *Q. quinoa* resulteert in locale en systemische chlorotische vlekjes op de bladeren.

1.2 Tulpenvirus X - verspreiding

Uit eerder onderzoek bij PPO-BBF kwam de tulpengalmijt als vector van TVX naar voren. Naast het feit dat de tulpengalmijt (*Aceria tulipae*) visuele schade veroorzaakt, kan deze mijt TVX tijdens de bewaring verspreiden. Door de toename van het TVX in de praktijk, zelfs op bedrijven waar geen tulpengalmijt is waargenomen, wordt er steeds meer betwijfeld of TVX alleen wordt verspreid door de tulpengalmijt tijdens de bewaring. In 2008 is een onderzoek afgerond (PT-project 12271) waarin ook voor stromijt is aangetoond dat deze mijt TVX tijdens de bewaring van bollen kan verspreiden. Omdat dit een éénjarig experiment betrof, zal dit in een nieuw project moeten worden bevestigd. Omdat de stromijt tijdens de bewaring in grote aantallen kan voorkomen en niet door Actellic bestreden wordt, wordt verwacht dat de stromijt een belangrijke bijdrage kan leveren aan de verspreiding van TVX.

Tevens is in PT-project 12271 duidelijk aangetoond dat TVX tijdens het kappen verspreid kan worden. Het blijkt dat sommige cultivars gevoeliger zijn voor mechanische verspreiding tijdens het kappen dan andere cultivars. Bij laat kappen (aan het einde van de bloeiperiode) is er een groter risico op virusverspreiding dan bij vroeg kappen (voor de bloei). Ook zijn er aanwijzingen dat de mate van TVX-verspreiding tijdens het kappen wordt beïnvloed door fysiologische omstandigheden en omgevingsfactoren zoals temperatuur, zon en wind. Op een warme zonnige dag met een matige wind de droogt een verwonding aan een plant veer sneller in dan op een koele bewolkte dag met een relatief hoge luchtvochtigheid. Wanneer een verwonding aan de plant snel indroogt, is de kans veel kleiner dat virusdeeltjes via het wondweefsel de plant kunnen binnendringen dan wanneer een wondweefsel lange tijd vochtig blijft. De overdrachtproeven zijn destijds op kleine schaal door middel van 'handmatig' kappen uitgevoerd en komen niet overeen met de praktijksituatie.

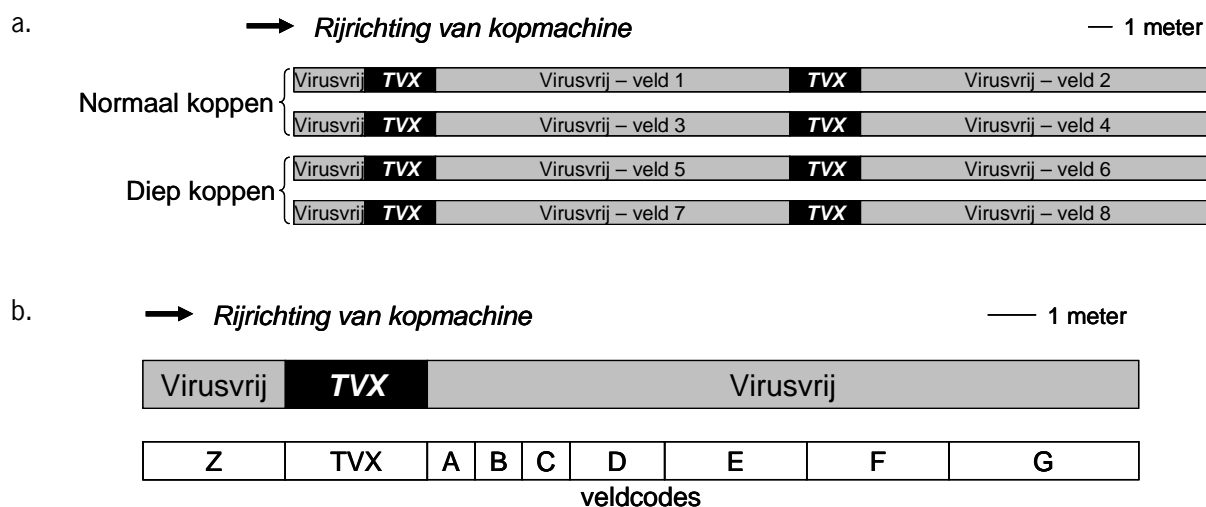
1.3 Doelstelling van onderzoekproject

PT-project 12271 heeft met behulp van handmatig kappen in kleine veldproeven mogelijk een belangrijke besmettingsroute voor TVX opgespoord. Handmatig kappen is tegenwoordig echter niet meer gangbaar. Daarentegen worden de tulpenvelden tegenwoordig machinaal gekopt. Vanwege de sterke toename van het TVX-probleem in de praktijk is het van belang het risico op mechanische TVX-verspreiding bij machinaal kappen verder in kaart te brengen. Aansluitend kunnen passende maatregelen genomen worden om virusverspreiding tijdens machinaal kappen te beperken.

2 Materiaal en Methoden

Een proefveld is aangelegd waarin de planten onder praktijkomstandigheden zijn gekopt. Het proefveld bestond uit vier bedden van 39 meter lang met per bed de volgende indeling (zie ook Figuur 1a):

- 3 m virusvrije tulpen (cv. Barcelona, virusvrij - klasse Japan)
- 3 m tulpen met TVX (cv. Blue Herron, 79% TVX)
- 15 m virusvrije tulpen (cv. Barcelona, virusvrij - klasse Japan)
- 3 m tulpen met TVX (cv. Blue Herron, 79% TVX)
- 15 m virusvrije tulpen (cv. Barcelona, virusvrij - klasse Japan)



Figuur 1. Schematische indeling van proefveld ten behoeve van onderzoek naar mechanische verspreiding van TVX tijdens mechanisch koppen van tulpen. (a) Proefveld met vier bedden van 39 meter met afwisselend virusvrije en TVX-geïnfecteerde tulpenbollen. (b) Schematische weergave van veldcodes voor het oogsten van bollen.

Wanneer de kopmachine door deze bedden rijdt, dan worden de messen van de kopmachine gedurende de eerste 3 meter tijdens het koppen voldoende bevochtigd met plantenmateriaal. Wanneer de kopmachine vervolgens 3 meter virusgeïnfecteerde tulpen kopt, dan wordt verwacht dat de messen van de kopmachine voldoende besmet raken met virus. Wanneer de kopmachine vervolgens 15 meter virusvrije tulpen kopt, zal er al dan niet mechanische virusverspreiding plaatsvinden.

In totaal wordt acht maal door virusgeïnfecteerde tulpen gekopt waarna de uitsmering van virus gedurende 15 meter kan plaatsvinden. Bij de eerste 4 passages is er 'normaal' gekopt waarbij uitsluitend de bloemsteel machinaal werd afgesneden (veld 1 t/m 4). Bij de laatste 4 passages is er 'diep' gekopt waarbij zowel de bloemsteel als ook de bovenste delen van het blad machinaal werden afgesneden (veld 5 t/m 8).

Ter controle en ter vergelijking met resultaten uit PT-project 12271 zijn een 200-tal tulpen handmatig gekopt met een virusbesmet mes. Bij het handmatig koppen is er zowel 'normaal' als 'diep' gekopt. Het virussap dat is gebruikt als virusinfectiebron is gemaakt van virusgeïnfecteerde planten. Met ELISA is de concentratie virus bepaald.

Aansluitend op het teeltseizoen zijn de bollen als veldjes van 1 tot 4 strekkende meter geroid (zie ook Figuur 1b). Wanneer er verspreiding van TVX via de kopmachine plaats heeft gevonden, dan zal deze verspreiding kort na de drie meter TVX-tulpen het grootst zijn geweest. Om deze reden zijn de tulpen de eerste 3 meter per meter geroid (veldjes 1, 2, 3). Na verloop van tijd zal als gevolg van verdunning van het virussap op de kopmachine de virusverspreiding tijdens het machinaal koppen afgenomen zijn. Om die reden zijn vanaf 3 meter na de infectiebron de tulpen als grotere veldjes geroid.

Na het rooien zijn de bollen volgens gangbare wijze opgeschoond en bewaard. Omdat een boltoets voor TVX nog niet mogelijk is (zie ook PT-project 13632), zijn de bollen van de verschillende veldjes in het seizoen na het machinaal rooien opnieuw opgeplant.

Tijdens de groeifase van de tulpen is in 2009 het percentage TVX besmetting visueel beoordeeld. Aansluitend op de bloeiperiode is het percentage TVX serologisch bepaald door middel van een ELISA-toets op blad.

3 Resultaten & Discussie

3.1 Virusanalyse handmatig koppen

Ter controle op de mate van mechanische verspreiding door middel van machinaal koppen, zijn twee partijen tulp handmatig gekopt. Het virussap dat gebruikt werd om het mesje te besmetten met virus, had een ELISA-waarde van >1.2. De virusconcentratie van het sap waarmee het mes tijdens dit project besmet werd, was daarmee vergelijkbaar met de concentratie virus uit PT-project 12271. Er is zowel 'normaal', als 'diep' gekopt. Het handmatig koppen is uitgevoerd op 13 mei 2008 (week 19). Deze week was het zomers en zonnig weer met een maximum van 24°C en weinig wind. Op de dag van het koppen, noch de paar dagen daarvoor of daarna is er geen neerslag gevallen.

Na het rooien van de gekopte planten en de bewaarperiode, zijn de tulpenbollen in het najaar van 2008 opgeplant. Na opkomst van het gewas in maart 2009 is op regelmatige basis visueel het percentage virus beoordeeld. Globaal was er weinig TVX zichtbaar. Na de bloeiperiode zijn de tulpen serologisch getoetst op TVX (ELISA bladtoets):

- 'Normaal koppen' – De planten die op 13 mei 2008 handmatig zijn gekopt met een virusbesmet mes, vertoonden in de nateelt in 2009 een viruspercentage van 2%.
- 'Diep koppen': - De planten die op 13 mei 2008 handmatig zijn gekopt met een virusbesmet met, vertoonde in de nateelt in 2009 een viruspercentage van 3%.

De gevonden percentages virusoverdracht zijn niet hoog. Deze komen overeen met de percentages die in 2007 gevonden zijn voor cv. Renown (bijna geen virusoverdracht). Echter, in 2007 was deze cv. Renown veel gevoeliger voor mechanische verspreiding van TVX. Er werden destijds voor deze cultivar percentages van 20-30% virus gevonden na handmatig koppen met een virusbesmet mes. Een cultivar als Pink Diamond bleek in de periode 2006-2007 nog gevoeliger te zijn voor mechanische TVX-overdracht. Tijdens dit onderzoek werd echter al gesuggereerd dat de vatbaarheid voor mechanische virusoverdracht afhankelijk is van diverse, maar helaas nog niet-onderzochte factoren zoals zon, vochtigheid enz.

3.2 Machinaal koppen

Aan het eind van de bloeiperiode is het risico op virusverspreiding tijdens koppen groter dan aan het begin van het bloeiseizoen. In dit project is er daarom voor gekozen om het machinaal koppen uit te voeren wanneer de tulpen een aantal dagen vol in bloei staan en de eerste bloemen van de plant afvallen. Dit moment van koppen komt overeen met het moment waarop in de praktijk ook wordt gekopt.

Het mechanisch koppen is uitgevoerd op 13 mei 2008 (week 19). Deze week was het zomers en zonnig weer met een maximum van 24°C en weinig wind. Op de dag van het mechanisch koppen, noch de paar dagen daarvoor of daarna is er geen neerslag gevallen.

Er is gekopt met een handgestuurde kopmachine met ronddraaiende messen (vergelijkbaar met een grote grasmaaier) (zie Figuur 2). Bij het 'normaal koppen' is alleen de bloemsteel afgesneden; bij het 'diep koppen' is ook een gedeelte van de bladeren afgesneden. Tussen het wisselen van de bedden is de kopmachine niet gereinigd. Vanwege de relatief hoge temperatuur, droogde de snijwond binnen 10 minuten in. Dit kan effect hebben op de mate van virusoverdracht. Aansluitend op het koppen van de vier bedden is de kopmachine grondig gereinigd met water.

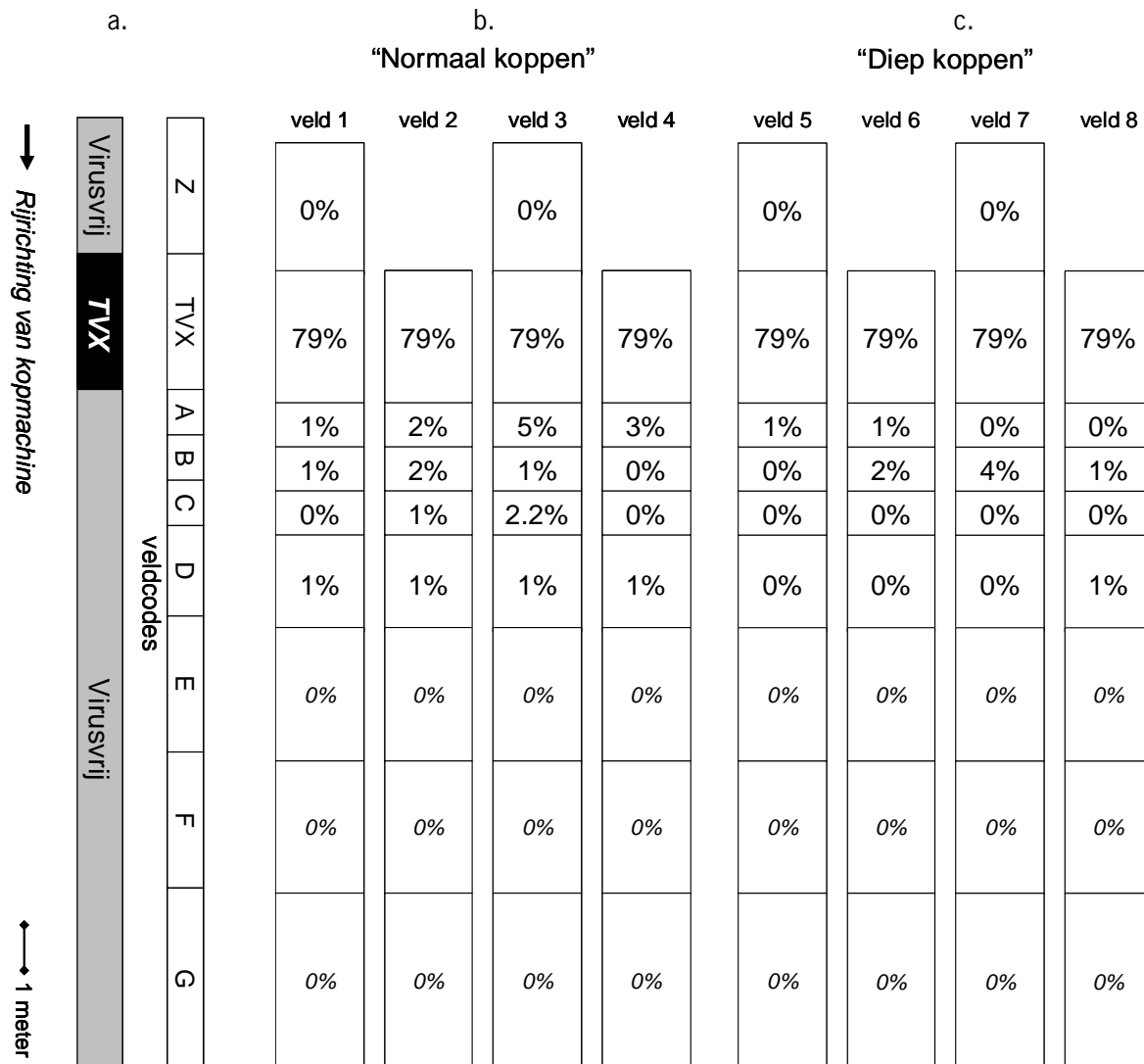
Gedurende teeltjaar 2008 hebben zich verder geen bijzonderheden voorgedaan die invloed kunnen hebben op de uitkomst van de proef. Na het rooien van de bollen in week 27, zijn de bollen volgens gangbare wijze gedroogd en vrij van mijten bewaard.



Figuur 2. Impressies van mechanisch kappen van tulp. (a) Proefveld voor onderzoek naar mechanische verspreiding TVX via de kopmachine (zie ook Figuur 1). (b) Proefveld op 13 mei 2008, de dag waarop het gewas machinaal is gekopt. Op de voorgrond de TVX-geïnfecteerde tulpen (cv. Blue Herron), op de achtergrond de virusvrije tulpen (cv. Barcelona). (c) Machinaal kappen met een handgestuurde kopmachine. (d) Een afgesneden bloemsteel met wondweefsel waarop de virusinfectie plaats kan vinden.

3.3 Virusanalyse machinaal gekopte tulpen

De tulpenbollen uit de diverse veldjes zijn in het najaar van 2008 opgeplant. Na opkomst van het gewas in maart 2009 is op regelmatige basis visueel het percentage virus beoordeeld. Globaal was er weinig TVX zichtbaar in de veldjes, ook niet in de veldjes die net na de TVX-besmettingsbron hadden gelegen. Na de bloeiperiode zijn de tulpen afkomstig uit de eerste 5 meter na de besmettingsbron serologisch getoetst op TVX (ELISA bladtoets). Tevens zijn diverse controlebehandelingen en controleveldjes serologisch getoetst op aanwezigheid van TVX. De percentages virus in de diverse veldjes zijn weergegeven in Figuur 3.



Figuur 3. Verspreiding van TVX tijdens machinaal koppen. (a) Schematische weergave het perceel met de positie van aanvankelijke virusvrije tulpen (cv. Barcelona) en de TVX-geïnfecteerde tulpen (cv. Blue Herron). (b en c) Percentage TVX op basis van ELISA-analyse in partijtjes tulp na normaal koppen met een kopmachine (b) en diep koppen met een kopmachine (c). Percentages TVX cursief is op basis van visuele beoordeling.

In veldje 1-Z hebben bollen gestaan waar de kopmachine als eerste door heen is gereden. In veldjes 3-Z, 5-Z en 7-Z had de kopmachine daarvoor 15 meter virusvrije-tulpen gekopt. In geen van deze veldjes is TVX, noch een ander virus aangetroffen. Dit betekent dat:

- de partij cv. Barcelona daadwerkelijk TVX-vrij was bij planten in 2008,
- er na het koppen van viruszieke planten en vervolgens 15 meter koppen van gezonde planten er zeker geen risico is op virusverspreiding.

'Normaal koppen'

In de eerste meter na 3 meter TVX tulpen is tussen de 1% en 5% virus gevonden (veldjes 1A-4A). In de tweede meter is tussen de 0% en 2% virus gevonden (veldjes 1B-4B). In de derde meter (veldjes 1C-4C) varieerde het viruspercentage tussen de 0 en 2.2%. In het veld dat 4 en 5 meter na de virusbesmettingsbron aanwezig was, werd gemiddeld 1% TVX waargenomen (veldjes D). Vanaf zes meter na

de TVX-besmettingsbron werd er (visueel) geen TVX meer waargenomen (veldjes 1-4E, -F, -G).

'Diep koppen' In de eerste meter na 3 meter TVX tulpen werd tussen de 0% en 1% TVX waargenomen (veldjes 5A-8A). In de tweede meter werd tussen de 0% en 4% virus gevonden (veldjes 5B-8B). In de derde meter (veldjes 5C-8C) werd geen virus meer waargenomen terwijl in veldjes 4D-8D (4 tot 5 meter na de besmettingsbron) in één van de vier herhalingen 1% TVX werd waargenomen. Vanaf 5 meter na de besmettingsbron werd visueel geen TVX infectie meer waargenomen.

De viruspercentages die in de eerste twee meter na de TVX infectiebron zijn gevonden, komen globaal overeen met de percentages die met handmatig koppen met een virusbesmet mes zijn gevonden (§3.1). Deze percentages zijn niet hoog, maar geven aan dat er wel degelijk virusverspreiding via de kopmachine heeft plaatsgevonden. Er zijn een aantal opmerkingen te plaatsen bij deze resultaten:

- Statistische analyse: omdat de percentages TVX voor de veldjes A-D in het algemeen erg laag zijn, is statistische analyse van de resultaten niet informatief. Door de lage percentage zullen er geen significante verschillen worden gevonden.
- 'normaal' versus 'diep koppen': in de veldjes A-D zijn de gevonden percentages TVX hoger na 'normaal koppen' dan na 'diep koppen'. Ondanks dat dit geen significant verschil is, is dit een opmerkelijk resultaat. Mogelijk dat door het 'diep koppen' het plantensap op de kopmachine eerder verdund is met 'vers plantensap' waardoor het uitsmeereffect van virus minder groot is. In 2006-2008 werd bij handmatig koppen juist gevonden dat bij 'diep koppen' het risico op virusverspreiding het grootst was. Bij 'diep koppen' ontstaat er meer wondweefsel van waaruit plantensap vrij komt. Daarnaast is de kans op virusbesmetting groter bij relatief veel wondweefsel dan bij relatief weinig wondweefsel. In dit project lijken deze argumenten niet belangrijk te zijn. Echter, in tegenstelling tot het machinaal koppen, werd bij handmatig koppen het mes voor elke kopbeweging opnieuw besmet met TVX. In de praktijk staat de virusbron ook tussen de gezonde planten en is er een continue besmetting met virus. In dit project was de virusbron apart opgeplant. De proefopzet komt daarmee niet volledig overeen met de praktijksituatie.
- Relatief weinig TVX-verspreiding, ook in de controle: De gevonden percentages virusoverdracht zijn niet hoog. Zoals ook al in §3.1 is besproken, komen deze percentage overeen met de percentages die in 2007 gevonden zijn voor cv. Renown. Echter, in 2007 was cv. Renown veel gevoeliger voor mechanische verspreiding van TVX en werden percentages van 20-30% gevonden als gevolg van handmatig koppen met een virusbesmet mes. Een cultivar als Pink Diamond bleek tijdens dit onderzoekproject nog veel gevoeliger te zijn voor mechanische TVX-overdracht. Tijdens het onderzoek uit 2006-2008 werd echter al gesuggereerd dat de vatbaarheid voor mechanische virusoverdracht afhankelijk is van diverse, maar helaas nog steeds onbekende factoren. De omstandigheden voor koppen waren tijdens dit project ideaal om virusverspreiding te beperken (warm en helder weer, geen neerslag of hoge luchtvochtigheid). Het is dus niet onlogisch te veronderstellen dat wanneer er tijdens dit project bij koeler weer met eventueel een hoge luchtvochtigheid gekopt werd, er (veel) meer virusverspreiding had plaatsgevonden.
- TVX-infectiebron: tijdens dit project is als TVX-infectiebron een strook van 3 meter met gemiddeld 79% virus gebruikt om het uitsmeereffect van virus tijdens mechanisch koppen te bestuderen. In de praktijk komt een lokale virusbron met een vergelijkbaar hoog percentage echter niet voor en staan de virusplanten tussen virusvrije planten. Ook is het percentage TVX in de praktijk gelukkig lager. Wanneer in de praktijk de omstandigheden voor koppen vergelijkbaar zijn met de omstandigheden tijdens het koppen uit dit project, wordt er verwacht dat er relatief weinig kans op (grootschalige) mechanische verspreiding is. Wanneer de omstandigheden gunstiger zijn voor mechanische verspreiding en er is minstens een paar procent virus in een partij aanwezig, dan wordt op basis van de resultaten uit dit project verwacht dat er wel degelijk enige virusverspreiding via de kopmachine plaats zal vinden. Zonder een efficiënte verwijdering van TVX-geïnfecteerde planten zal het TVX percentage daarom gedurende een teeltseizoen stijgen.
- Kopmachine: In de praktijk zijn verschillende typen kopmachines in gebruik. Deze machines maken gebruik van ronddraaiende of snijdende messen. Er wordt niet verwacht dat er tussen verschillende typen kopmachines veel verschil in virusverspreiding aanwezig is. Als stelregel kan worden gehanteerd dat hoe scherper de messen zijn, en hoe minder plantensap er tijdens het koppen vrijkomt, hoe lager het risico is op mechanische virusverspreiding.

Op basis van de resultaten uit dit project en bovenstaande opmerkingen kan de vraag worden gesteld in hoeverre de mechanische verspreiding van TVX bijdraagt aan de problemen die de sector op dit moment met dit virus heeft. Mechanische verspreiding vindt (tijdens mechanisch koppen) zeker plaats, maar de enigszins geringe mate waarin de virusverspreiding in dit project is waargenomen, kan niet de sterke toename van TVX in de praktijk verklaren.

3.4 Nieuwe aanwijzingen omtrent verspreiding van TVX

3.4.1 Mechanische verspreiding TVX

In PT-project 12271 is in de periode 2006-2008 waargenomen dat TVX mechanisch kan worden verspreid door middel van (handmatig) koppen met een virusbesmet mes. Deze mechanische verspreiding is op praktijkschaal bevestigd in dit onderzoeksproject. Het mes van de ontbolmachine kan tevens een route zijn voor verspreiding van virus in de afbroei van tulpen. Dit blijkt uit kleinschalig onderzoek dat in 2008 is uitgevoerd door Proeftuin Zwaagdijk en Agrifirm (Bloembollennisie 18 december 2008, p. 36). Ondanks dat numerieke resultaten ontbreken, is aangetoond dat tulpenmozaïekvirus (TBV, een potyvirus) zich via het mes van de ontbolmachine kan verspreiden. Het is een algemeen feit dat mechanische verspreiding van potexvirussen efficiënter plaats vindt dan voor potyvirussen. Omdat TVX behoort tot de potexvirussen, is het zeer aannemelijk dat er ook verspreiding van TVX plaats vindt via het mes van de ontbolmachine.

Momenteel wordt er door Agrifirm gewerkt aan een druppelaar met ontsmettingsmiddel om virusverspreiding tijdens het ontbollen zo veel mogelijk te beperken.

Vanuit Japan is via de Bloembollenkeuringsdienst informatie beschikbaar gekomen over mogelijke verspreiding van TVX via bolcontact. Dhr. Kaori Horri van het Toyama Agricultural Research Center heeft in kleinschalige proeven aangetoond dat wanneer gepelde bollen in een net langs elkaar schuren, er virusoverdracht plaats kan vinden. Bij ongepelde bollen vindt deze virusoverdracht niet of nauwelijks plaats. Ook bij een behandeling met in water opgelost Trifumizole zou een lichte mate van virusverspreiding optreden. Deze manier van virusverspreiding is niet eerder onderzocht. Verspreiding van TVX via bolcontact wordt in een nieuw PT-project onderzocht (PT-project 13630).

3.4.2 Verspreiding via water?

Hosta virus X (HVX) is een potexvirus dat de laatste jaren voor problemen zorgt tijdens de teelt van Hosta. Het risico op verspreiding van HVX is het grootst tijdens het spoelen van Hosta wortelstokken. Tijdens het spoelproces vindt er als gevolg van een relatief hoge waterdruk in combinatie met zand lichte verwonding van plantmateriaal plaats van waaruit virusverspreiding plaatsvindt. Deze virusverspreiding lijkt relatief efficiënt plaats te kunnen vinden. Op basis van dit onderzoek (PT-project 12501.4) is het vermoeden ontstaan dat TVX zich mogelijk kan verspreiden tijdens het spoelen van tulpenbollen en tijdens waterbroei. Vooral bij waterbroei ontstaan aanzienlijke beschadigingen in de bol als gevolg van de prikbakken. Vervolgens kan het virus via het water verspreiden. Verspreiding van TVX via het spoelen van bollen en tijdens waterbroei wordt in een nieuw PT-project onderzocht (PT-project 13630).

3.4.3 Verspreiding via grondgebonden vectoren?

In 2007 is vanuit onderzoeksinstituut Bioforsk (Noorwegen) het bericht ontvangen dat zij onverwacht TVX in vangplanten hadden geïdentificeerd. Deze vangplanten (*Nicotiana tabacum*) werden gebruikt voor onderzoek naar virusoverdracht via grondgebonden vectoren (nematoden of schimmels). Er is helaas weinig achtergrondinformatie bekend van het grondmonster dat is onderzocht, maar het is zo goed als zeker dat er in het verleden op dat perceel geen tulpenteelt heeft plaatsgevonden. Het TVX isolaat uit Noorwegen is door PPO-BBF verder gekarakteriseerd en blijkt bijna identiek te zijn met het TVX isolaat dat in Nederland voor komt. Deze resultaten geven aan dat (1) TVX zeer waarschijnlijk (latent) in een ander(e) gewas(sen)

voor kan komen en (2) dat TVX zeer waarschijnlijk via een nematode of schimmel als grondgebonden vector zich kan verspreiden. Beide suggesties sluiten niet aan bij de huidige kennis over TVX en potexvirussen. Mowat heeft in 1985 een lijst met waardplanten voor TVX gepubliceerd (Ann. Appl. Biol. 101, 51-63), maar dit betrof een waardplantenlijst op basis van handmatige virusinoculaties. Daarnaast zijn er geen voorbeelden bekend van verspreiding van potexvirussen door nematoden of bodemgebonden schimmels.

De laatste decennia is enkele keren, met name in West-Friesland, sprake geweest van een pleksgewijze aantasting waarvan de ziektebeelden overeenkwamen met Augustaziek. Echter, na serologische analyse kon het bijbehorende tabaksnecrosevirus (TNV) niet worden waargenomen. Dit verschijnsel werd destijds daarom pseudo-Augusta genoemd. Nu er vanuit de praktijk steeds meer voorbeelden zijn van TVX-infecties, wordt ook duidelijk dat in een aantal gevallen de symptomen van een TVX-infectie moeilijk te onderscheiden zijn van Augusta ziektebeelden. Daarmee kan het verschijnsel pseudo-Augusta mogelijk in verband worden gebracht met een infectie met TVX en de mogelijk verspreiding van dit virus via een bodemgebonden vector. TNV wordt door de schimmel *Olpidium brassicae* verspreid.

Verspreiding van TVX via een mogelijke grondgebonden vector wordt in een nieuw PT-project onderzocht (PT-project 13630).

3.4.4 Voorkomen van mechanische verspreiding en ontsmetting

De belangrijkste manier om virusverspreiding te voorkomen is het werken met virusvrije partijen en het naleven van strikte hygiënische maatregelen. De glastuinbouw heeft ook problemen met mechanisch overdraagbare virussen zoals komkommermozaïekvirus (CMV) en Pepinomozaïekvirus (PepMV, ook een potexvirus). Ter voorkoming van mechanische verspreiding van deze virussen tijdens teelthandelingen wordt in de glastuinbouw geadviseerd om strikte hygiëneprotocolen na te leven. Een onderdeel van zo'n werkwijze is vanaf de start van de teelt bij elke gewashandeling preventief met magere melk te werken. Van (onverdunde) magere melk (min 3.5% eiwit) of een oplossing van 100 gram magere melkpoeder (35% melkeiwit) per liter is bekend dat dit de mechanische verspreiding via het mes van bijvoorbeeld PepMV kan beperken. Belangrijk is om de melkoplossing regelmatig te verversen en het gebruik zo lang mogelijk vol te houden.

In de glastuinbouwsector worden machines, kasruimten en andere oppervlakten na gebruik of teeltseizoen schoongespoten met (zo warm mogelijk) water totdat alle gewasresten verdwenen zijn. Aansluitend kan er een ontsmettingsmiddel als EasyClean of VirkonS worden toegepast. Middelen als formaline zijn niet werkzaam tegen virussen.

4 Aanbevelingen voor de praktijk

Op basis van de resultaten uit dit onderzoek en kennis uit voorgaande onderzoeksprojecten aan TVX is een lijst van aanbevelingen voor teelt en bewaring opgesteld. De aanbevelingen voor met name de verwerking van bollen en de broeierij zijn gebaseerd op recente kennis van andere potexvirussen uit de Hostateelt en glastuinbouw. In hoeverre deze aanbevelingen daadwerkelijk van toepassing zijn op het beperken van verspreiding van TVX, wordt in de periode 2009-2011 in PT-project 13630 onderzocht. Strikte opvolging van deze maatregelen moet niet alleen de verspreiding van TVX beperken, maar ook verspreiding van andere virussen als bijvoorbeeld TBV beperken.

Teelt

- Ken de virusstatus van alle partijen.
- Zorg ervoor dat viruszieke partijen duidelijk gescheiden geteeld worden ten opzichte van virusvrije partijen zodat virusvrije partijen daadwerkelijk virusvrij blijven.
- Verwijder planten met visuele virussymptomen voordat er gekopt wordt. Op deze manier wordt de verspreiding van het virus tijdens het kappen zoveel mogelijk voorkomen.
- Laat bij twijfel over virus altijd een virusanalyse uitvoeren door BKD of PPO.
- TVX symptomen kunnen soms pas laat in het seizoen zichtbaar worden. Blijf daarom ook na het kappen tot en met het rooien viruszieke planten verwijderen. Zo wordt virusverspreiding tijdens de bewaring zo veel mogelijk voorkomen.
- Kop niet te laat, het gewas lijkt dan extra vatbaar voor mechanische verspreiding van het virus.
- Indien mogelijk, kop (viruszieke partijen) bij warm weer, blauwe hemel en enige wind. Onder deze omstandigheden is het risico op verspreiding gering.
- Reinig de kopmachine regelmatig, maar in ieder geval bij een wisseling tussen partijen.
- Kop viruszieke partijen als laatste, daardoor lopen virusvrije partijen geen risico.
- Probeer vroegtijdig klepelen van het gewas voor de oogst te beperken waardoor er geen extra verspreiding van TVX kan optreden.

Bewaring

- Zorg ervoor dat viruszieke partijen gescheiden verwerkt en bewaard worden ten opzichte van virusvrije partijen.
- Zorg voor een doelmatige bestrijding van tulpengalmijt en stromijt. Dit begint bij een goede bedrijfshygiëne en wordt aangevuld met chemische bestrijding (in het geval van de tulpengalmijt). Zorg ervoor dat elke bron van tulpengalmijt en stromijt uit de droog- en bewaarruimtes is verwijderd voordat de gerooide bollen binnenkomen.
- Controleer bij chemische bestrijding van mijten dat het toegepaste middel voldoende aanwezig is in alle hoeken van bewaarruimtes en kuubskisten.
- Houd tijdens de bewaring de populatie van tulpengalmijt en stromijt in de gaten met mijtenvalletjes en lijmplaten en verwijder stof en plantenresten waarin mijten kunnen voorkomen

Broeierij Ondanks dat virusverspreiding tijdens broeierij nog niet is aangetoond, kunnen preventieve maatregelen worden genomen.

- Wanneer tijdens waterbroei watercirculatie wordt gebruikt, zorg ervoor dat viruszieke partijen op een gescheiden watercircuit worden geteeld.
- Voorkom virusverspreiding via de ontbolmachine door te druppelen met magere melk (of 3.5%

melkeiwit)

- Ontbol eerst virusvrije partijen, daarna verdachte partijen en als laatste viruszieke partijen.
- Reinig de ontbolmachine regelmatig, maar in ieder geval tussen partijen
- Reinigen van de ontbolmachine kan efficiënt met warm water en zeep; zorg dat er geen plant- en bolresten aanwezig zijn na het reinigen. Eventueel kan aansluitend een reinigingsmiddel als Easy Clean of Virkon S worden gebruikt.
- Meng afbroei niet met normaal plantgoed, maar houdt afbroei minstens één jaar apart. Is er in afbroei na één gescheiden teeltjaar geen virustoenname te zien is, dan kan de afbroei eventueel gemengd worden met normaal plantgoed (met een vergelijkbaar percentage van hetzelfde virus).

5 Conclusies

In dit project is op praktijkschaal de mechanische verspreiding van TVX door de kopmachine bestudeerd. Tijdens het machinaal koppen van (viruszieke) tulpen vindt er verspreiding van TVX plaats. Echter, de omvang van de virusverspreiding is relatief laag en de uitsmering is gering. In de praktijk zal de virusverspreiding niet meer of minder zijn bij 'diep koppen'. Hierbij moet gemeld worden dat de weersomstandigheden tijdens het koppen zeer gunstig waren om virusverspreiding te beperken. Wanneer er bij minder gunstige omstandigheden wordt gekopt (bijv. op koele dagen met een hoge luchtvochtigheid), dan wordt verwacht dat het risico op virusverspreiding zal toenemen.

De relatief geringe mate waarin in dit project de virusverspreiding is waargenomen, kan de sterke toename van TVX in de praktijk niet verklaren. Virusverspreiding door mijten tijdens de bewaring en mogelijk andere manieren van virusverspreiding spelen zeker in de praktijk een belangrijke rol. Beheersing van de TVX-problematiek moet daarom gedurende alle fasen van de teelt en broeierij punt van aandacht zijn. Een uitgebreide lijst van aanbevelingen voor de praktijk is geformuleerd waarmee verspreiding van TVX tijdens koppen, maar ook gedurende andere fasen van de teelt beperkt moet kunnen worden.

6 Geraadpleegde literatuur

- Horri K. (2008) Occurrence and transmission method of Tulip virus X (TVX) (unofficial translation). Toyama Agricultural Research Center, Japan.
- Mowat, W.P. (1982) Pathology and properties of Tulip virus X, a new potex virus. *Ann. Appl. Biol.* 101, 51-63.
- PT-project 12271: Beperken van verspreiding van Tulpenvirus X in tulpen - Een zoektocht naar de verschillende manieren van TVX verspreiding. De Kock, M., Van Dam, M., Geerlings, M. Lemmers, M., Stijger, C. en Conijn, C.. Wageningen UR – Praktijkonderzoek Plant en Omgeving, 2008.
- PT-project 12501.1: HVX-verspreiding via spoelen. Dijkema, M. Van Dalfsen, P. De Kock, M.. Wageningen UR – Praktijkonderzoek Plant en Omgeving, 2009.