

Verspreiding aardappelvirus-Y^{ntn} door trichodoriden

een onderzoek naar de vraag of het mogelijk is dat het
aardappelvirus-Y^{ntn} (PVY) in een aardappelperceel
wordt verspreid door trichodoride nematoden, in opdracht van
Productschap Akkerbouw



PRODUCTSCHAP AKKERBOUW

Auteurs	ir. T.C. Everaarts & ing. R. Ellens
Projectcode	12068
Rapportnummer	15-011
Datum	19 februari 2015



HLB

research and consultancy in agriculture





Titel	Verspreiding aardappelvirus-Yntn door trichodorida
Financiering	Productschap Akkerbouw Louis Braillelaan 80 2719 EK Zoetermeer
Auteurs	ir. T.C. Everaarts & ing. R. Ellens t.everaarts@hlbbv.nl r.ellens@hlbbv.nl 0593 282828 HLB BV Kampsweg 27 9418 PD Wijster
HLB-project	12068
HLB-rapport	15-011
Afgedrukt op	20 februari 2015

Op al onze dienstverlening zijn de algemene voorwaarden van HLB van toepassing. U vindt deze voorwaarden op onze website.



Disclaimer

Dit rapport is met de grootst mogelijke zorgvuldigheid samengesteld. Toch bestaat de mogelijkheid dat dit rapport informatie bevat die incorrect en/of incompleet is. Aan de inhoud kunnen geen rechten worden ontleend. HLB aanvaardt geen aansprakelijkheid voor directe of indirecte schade die het gevolg is van het gebruik van informatie die door of via dit rapport verkregen is.

De inhoud van dit rapport mag alleen worden gebruikt met bronvermelding.

Op al onze dienstverlening zijn de algemene voorwaarden van HLB van toepassing. Deze zijn gedeponeerd bij de Kamer van Koophandel te Meppel onder nummer 52707768. Een exemplaar wordt u op verzoek (info@hlbbv.nl) kosteloos toegezonden.

Copyright

ir. T.C. Everaarts & ing. R. Ellens
Verspreiding aardappelvirus-Yntn door trichodoriden

© 2015, ir. T.C. Everaarts & ing. R. Ellens
Uitgegeven in eigen beheer
info@hlbbv.nl

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand en/of openbaar gemaakt in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of op enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.



Samenvatting

Het aardappelvirus-Y^{ntn}, in dit verslag verder PVY genoemd, is een besmettelijk virus, dat via contact door bijvoorbeeld apparatuur of via contact tussen buurplanten gemakkelijk over kan gaan van zieke planten op onbesmette planten. Bladluizen kunnen het virus na zuigen op aangetaste planten via besmette monddelen overbrengen naar gezonde planten. In het groeiseizoen van 2009 is veel pootgoed afgekeurd vanwege besmetting met PVY. Sommige aardappelpercelen in het zandgebied van Nederland bleken na een bladtoets in hoge mate besmet met PVY terwijl de partij in het voorjaar schoon de grond in was gegaan en de percelen zo ver van andere aardappelpercelen verwijderd waren dat de luizendruk minimaal was. De ernstige besmettingen van aardappelpercelen met PVY zonder een duidelijke oorzaak was voor pootgoedtelers uit het zandgebied een reden om, ondersteund door DLV Plant in Assen, bij Productschap Akkerbouw de onderzoeksvraag in te dienen of het mogelijk is dat, naast bladluizen, ook zich vrij in de bodem bewegende trichodoride-aaltjes een rol spelen bij uitbreiding van een PVY-besmetting in een perceel.

HLB in Wijster heeft in opdracht van het Productschap Akkerbouw een onderzoek uitgevoerd met de volgende doelstelling: aantonen dat PVY overgedragen kan worden door trichodoride-aaltjes.

Trichodoriden voeden zich door wortels van planten aan te prikken om zo voedingsmiddelen vanuit de plant op te nemen. Om PVY over te kunnen brengen via de monddelen van het aaltje moet het virus niet alleen in de bovengrondse delen van de planten aanwezig zijn maar ook in de wortels. Besmette aardappelknollen zijn daarom uitgeplant. Een aantal weken later zijn verschillende delen van de jonge planten met behulp van RT-SYBR green PCR getoetst op PVY. Uit de toets bleek dat het virus zich inderdaad in de wortels van de aardappelplanten bevond.

Hierna is een pottenproef met vijf objecten opgezet waarin jonge planten van een voor PVY gevoelig aardappelras zijn geïnoculeerd met trichodoriden. In twee objecten werden trichodoriden gebruikt afkomstig van een akkerbouwperceel met in het recente verleden problemen met PVY, die zich daarna in het laboratorium hadden gevoed met PVY-besmette aardappelplanten. Ter vergelijking werden in twee andere objecten trichodoriden gebruikt afkomstig van een grasveld, waarvan zeer onwaarschijnlijk was dat deze populatie ooit met PVY in aanraking was geweest. Het vijfde object was een extra controle van aardappelplanten die niet werden geïnoculeerd, om achteraf aan te kunnen tonen dat het startmateriaal niet al was besmet met PVY.

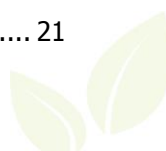
Zowel de trichodoriden die zich met de PVY-besmette planten hadden gevoed als de trichodoriden afkomstig van het grasveld zijn met PCR getoetst op PVY. In geen van de trichodoriden is het virus aangetoond. Een maand na inoculatie met de trichodoriden is het bladmateriaal van alle vijf objecten met PCR getoetst op PVY. In geen van de planten kon het virus worden aangetoond. Ook later is er geen PVY aangetoond in de inmiddels gevormde dochterknollen. Het is daarom niet aannemelijk dat trichodoriden PVY van plant naar plant kunnen overbrengen en daarmee een bijdrage leveren aan de verspreiding van PVY over een perceel.





Inhoudsopgave

Samenvatting.....	5
Inhoudsopgave	7
1. Inleiding en doelstelling	9
2. Het aantonen van PVY in de wortels van PVY-zieke aardappelplanten	10
2.1 Inleiding en doelstelling.....	10
2.2 Opzet en uitvoering.....	10
2.3 Resultaten.....	11
2.4 Discussie.....	11
2.5 Conclusie	12
3. Experiment om te onderzoeken of PVY verspreid kan worden door trichodoride-aaltjes.....	13
3.1 Inleiding en doelstelling.....	13
3.2 Opzet en uitvoering.....	13
De objecten.....	13
Besmette planten als PVY-bron voor trichodoriden	13
Grond voor verzamelen trichodoriden niet besmet met PVY	14
Kweek aardappelplanten niet besmet met PVY	14
Controle (A)	15
Trichodoriden van PVY besmette grond en planten toevoegen aan schone planten (B, C)	15
Trichodoriden van PVY-vrije grond toevoegen aan schone planten (D, E).....	16
Eindbemonstering en analyse op PVY	16
3.3 Resultaten.....	16
Controle besmette planten als PVY-bron voor trichodoriden	16
Controle trichodoriden op PVY.....	17
Resultaten PVY na inoculatie met trichodoriden	17
3.4 Discussie.....	18
3.5 Conclusie	18
Literatuur	19
Bijlage 1 Ruwe data PCR.....	21





1. Inleiding en doelstelling

Het aardappelvirus-Y^{ntn}, in dit verslag verder PVY genoemd, is een besmettelijk virus, dat via contact door bijvoorbeeld apparatuur of via contact tussen buurplanten gemakkelijk over kan gaan van zieke planten op onbesmette planten ([Bantarri et al, 1993; De Bokx, 1987] in Kerlan 2015). Bladluizen kunnen het virus na zuigen op aangetaste planten via besmette monddelen overbrengen naar gezonde, waarvoor zuigtijden van slechts seconden nodig zijn ([Powell, 1991; Lopez-Abella et al, 1988] in Kerlan 2015). PVY blijft in bladluizen slechts vier tot zeventien uur levensvatbaar ([Hoof, van, 1980; Kostiw, 1975] in Kerlan 2015).

In het groeiseizoen van 2009 is veel pootgoed afgekeurd vanwege besmetting met PVY. Sommige aardappelpercelen in het zandgebied van Nederland bleken na een bladtoets in hoge mate besmet met PVY terwijl de partij in het voorjaar schoon de grond in was gegaan en de percelen zo ver van andere aardappelpercelen verwijderd waren dat de luizendruk minimaal was. In het seizoen was weinig selectiewerk nodig en er was sprake van een goede luizenbestrijding met insecticide en olie. De ernstige besmettingen van aardappelpercelen met aardappelvirus-Y, en in het bijzonder Y^{ntn}, zonder een duidelijke oorzaak, was voor pootgoedtelers uit het zandgebied een reden om ondersteund door DLV Plant in Assen bij Productschap Akkerbouw de onderzoeksvraag in te dienen of het mogelijk is dat naast bladluizen ook de zich vrij in de bodem bewegende trichodoride-aaltjes een rol spelen bij uitbreiding van een PVY-besmetting in een perceel.

Trichodoriden leven vrij in de grond en nemen voedsel op uit waardplanten door wortels aan te prikken. Bekend is dat trichodoriden virussen kunnen overbrengen van de ene waardplant naar de andere. Deze virussen behoren alle tot de tobnavirussen (Evans et al., 1993). Het tabaksratelvirus (TRV) is daarvan de bekendste. Deze overdracht vindt plaats via besmette monddelen, net zoals overdracht van PVY door bladluizen plaatsvindt via besmette monddelen. TRV-virusdeeltjes kunnen bij volwassen aaltjes van trichodoride-aaltjes tot een jaar in de stilet en oesofagus aanwezig blijven (Cooper en Harrison, 1973).

Verspreiding van PVY door trichodoride-aaltjes is slechts mogelijk als de wortels van PVY-zieke waardplanten inderdaad PVY bevatten. In de literatuur is niet gevonden dat dit inderdaad zo kan zijn. Daarom is eerst getoetst of het virus kon worden aangetoond in de wortels van PVY-besmette aardappelplanten. De resultaten van deze toets worden beschreven in hoofdstuk 2.

Om te kunnen aantonen dat PVY overgedragen kan worden door trichodoride-aaltjes, de doelstelling van dit onderzoek, is een pottenproef met vijf objecten opgezet waarin jonge planten van een voor PVY gevoelig aardappelras zijn geïnoculeerd met trichodoriden. In twee objecten werden trichodoriden gebruikt afkomstig van een akkerbouwperceel met in het recente verleden problemen met PVY, die zich vervolgens in het laboratorium hadden gevoed met PVY-besmette aardappelplanten. Ter vergelijking werden in twee andere objecten trichodoriden gebruikt afkomstig van een grasveld, waarvan zeer onwaarschijnlijk was dat deze populatie ooit met PVY in aanraking was geweest. Het vijfde object was een extra controle van aardappelplanten die niet werden geïnoculeerd, om achteraf aan te kunnen tonen dat het startmateriaal niet al was besmet met PVY. De resultaten van de potproef worden beschreven in hoofdstuk 3.



2. Het aantonen van PVY in de wortels van PVY-zieke aardappelplanten

2.1 Inleiding en doelstelling

Verspreiding van PVY door trichodoride-aaltjes is slechts mogelijk als niet alleen het bovengrondse deel en de knollen, maar ook de wortels van PVY-zieke waardplanten PVY bevatten. De doelstelling van dit onderdeel van het onderzoek is aantonen dat dit inderdaad het geval is.

2.2 Opzet en uitvoering

Met PVY besmette aardappelknollen, afkomstig van een kweekbedrijf, zijn na binnenkomst met behulp van RT-SYBR green PCR getest en positief bevonden. In mei 2012 zijn de knollen uitgepoot in twee potten gevuld met potgrond, zie foto's 1a en b.



Foto 1a. Aardappelplanten opgekweekt uit met PVY besmette knollen.



Foto 1b. Er is sprake van goede doorworteling van de pot

Op 30 mei 2012 zijn van één pot duplo-monsters genomen van de volgende onderdelen van de plant: blad, stengel, moederknol en wortels. Tussen het nemen van alle monsters door zijn steeds schone handschoenen aangetrokken om besmetting met PVY van het ene monster naar het andere te voorkomen. Tevens zijn monsters genomen van gespoelde wortels (waar de grond zo goed mogelijk vanaf is geschud) en van de grond waarin zich zo min mogelijk wortelweefsel bevond, zie foto's 2a en b.



Foto 2a. Wortelmonster.



Foto 2b. Grondmonster



Na voorbereiding van de twaalf monsters zijn de verkregen filtraten in twee verschillende verdunningen met behulp van RT-SYBR green PCR getest op de aanwezigheid van PVY.

2.3 Resultaten

Bij het uitvoeren van een PCR wordt een Cq-waarde (cycle quantification) bepaald. Tijdens een PCR-procedure wordt DNA van het doelorganisme, in dit geval PVY, steeds verdubbeld in een cyclus. Omdat PVY een RNA virus is, moet het RNA eerst worden omgezet naar DNA. Dit gebeurt met behulp van reverse transcriptase. De Cq-waarde staat voor het aantal cycli dat nodig was om het RNA van het doelorganisme meetbaar te maken. Hoe minder cycli daarvoor nodig waren, hoe meer RNA van het doelorganisme zich in het monster bevond, in dit geval dus meer virusdeeltjes. Bij deze PCR-toets betekent een Cq-waarde kleiner dan 24 dat PVY in het monster aanwezig was. De resultaten van de PCR zijn te vinden in tabel 1. De ruwe data staan in bijlage 1.

Tabel 1. Resultaten van de bemonsteringsproef. PVY is bepaald met behulp van PCR.

Monster	Uitslag PCR
Bladmonster 1	Positief, besmet met PVY
Bladmonster 2	Positief, besmet met PVY
Knolmonster 1	Positief, besmet met PVY
Knolmonster 2	Positief, besmet met PVY
Wortelmonster 1	Positief, besmet met PVY
Wortelmonster 2	Positief, besmet met PVY
Gespoelde wortels 1	Positief, besmet met PVY
Gespoelde wortels 2	Positief, besmet met PVY
Gespoelde grond 1	Zwak positief, zeer lichte besmetting met PVY
Gespoelde grond 2	Zwak positief, zeer lichte besmetting met PVY

De bladmonsters gaven de laagste Cq-waarde. Dat betekent dat het blad de grootste hoeveelheid PVY virusdeeltjes bevatte. Ook in de stengel zien we Cq-waarden die ruim beneden de 24 liggen, dus ook in die delen was PVY aanwezig. Bij de ondergrondse delen, de moederknol en de wortels zijn eveneens Cq-waarden lager dan 24 gevonden en dus is ook in die monsters PVY aangetoond, ook al was het wat minder dan in de bovengrondse delen van de aardappelplant. In de gespoelde grond is tevens een zeer lage concentratie PVY aangetoond.

2.4 Discussie

Het doel van dit onderzoek was aantonen dat PVY niet alleen in de bovengrondse plantdelen aantoonbaar is, maar ook in de ondergrondse delen zoals de wortels. Om eventuele remming uit te sluiten zijn de RNA extracties zowel onverdund als in een 10 keer verdunning geanalyseerd met behulp van PCR. Hieruit is gebleken dat het blad en de stengel zoals verwacht geen remming laten zien. In het blad werd de laagste Cq-waarde verkregen wat inhoudt dat in het blad de hoogste concentratie PVY RNA aanwezig was. In de stengel en in het blad is geen sprake geweest van remming in de PCR. In de moederknol en in de wortels is het virus ook aangetroffen met behulp van de PCR. In deze monsters was wel sprake van remming. Deze remming kan zijn veroorzaakt door de test-matrix, zoals een hoge zetmeelconcentratie of aanhangende-gronddoeltjes. Om na te gaan wat



de beste bemonsteringsmethode is voor de wortels en of ook monsters van direct grond genomen kunnen worden zijn de wortels en grond gespoeld in een fosfaatbuffer. Vervolgens is uit de gefilterde fosfaatbuffer het RNA geëxtraheerd. Het is inderdaad mogelijk met deze werkwijze PVY aan te tonen in de wortels. Het resultaat is dat deze monsters een iets lagere Cq-waarde laten zien, maar daarnaast ook veel minder remming. Daarnaast is in de grond PVY aangetoond, dit kan komen doordat er inderdaad PVY aanwezig was of doordat er wortelmateriaal mee is gekomen die besmet was met PVY.

2.5 Conclusie

Op basis van het uitgevoerde experiment kan de volgende conclusie worden getrokken.

- Er is aangetoond dat niet alleen de bovengrondse delen maar ook de wortels van een met PVY besmette plant virusdeeltjes kunnen bevatten.

3. Experiment om te onderzoeken of PVY verspreid kan worden door trichodoride-aaltjes

3.1 Inleiding en doelstelling

Nadat is aangetoond dat de wortels van aardappelplanten inderdaad PVY kunnen bevatten en aangetoond kunnen worden met een PCR volgens een op het HLB geldende procedure, is een tweede experiment uitgevoerd met als doelstelling aantonen dat PVY overgedragen kan worden door trichodoride-aaltjes.

3.2 Opzet en uitvoering

De objecten

De proef bestond uit vijf objecten in 5 of 10 herhalingen, in totaal 30 potten. Object A was een controle object, objecten B en C werden geïnoculeerd met trichodoriden die zich hadden gevoed met PVY-besmette aardappelplanten en objecten D en E werden geïnoculeerd met trichodoriden die geen PVY bij zich droegen. Object C had meer herhalingen dan de andere objecten om daarmee de kans op aantonen van een besmetting te vergroten wanneer PVY inderdaad door trichodoriden overdraagbaar is. In objecten A, C en D werd geen besmetting met PVY verwacht en bij een besmetting in object B zou een eventuele besmetting kunnen zijn overgebracht via het debris. Tabel 2 toont een overzicht van de 5 objecten. In de volgende paragrafen volgt een meer uitgebreide beschrijving van gevolgde werkwijze en de objecten.

Tabel 2. Objectenlijst, met herh = aantal herhalingen. Codes onder label: C = controle, B = besmet, L = Leek (onbesmet), S = slib (debris) en T = Trichodoride-suspensie.

Object	Label	Herh	Inoculatie met	Tijdstip inoculatie	Herkomst trichodoriden
A	C	5	-	-	-
B	BS	5	Debris	T0	Aardappelperceel Vlagtwedde (perceel besmet met PVY)
C	BT	10	Tricho suspensie	T6	Aardappelperceel Vlagtwedde (perceel besmet met PVY)
D	LS	5	Debris	T0	Grasperceel Leek (vrij van PVY)
E	LT	5	Tricho suspensie	T6	Grasperceel Leek (vrij van PVY)

Besmette planten als PVY-bron voor trichodoriden

In december 2012 is grond verzameld van een aardappelperceel in Vlagtwedde waarvan bekend was dat er zich trichodoriden bevonden. Tevens zijn in deze periode aardappelen ontvangen die besmet waren met PVY, verschillende rassen door elkaar, zie foto 3a. Op 20 december 2012 is de grond verdeeld over 9 potten van 5 liter. Uit iedere pot is een grondmonster genomen voor analyse op plantparasitaire aaltjes. Deze monsters werden samengevoegd tot één verzamelmonster. Na analyse bleek dit monster 30 trichodoriden (soort: *Trichodorus pachydermus*) per 100 ml grond te bevatten, naast 300 tylenchorinichidae en 65 *Meloidogyne chitwoodi*.



In iedere pot werden vervolgens drie of vier met PVY besmette knollen van verschillend formaat en ras gepoot. De potten zijn een aantal weken bij kamertemperatuur geplaatst (foto 3b) en hierna overgeplaatst naar een kasruimte met een minimale (nacht)temperatuur van 15°C.



Foto 3a. Met PVY-virus besmette knollen gebruikt in deze proef.



Foto 3b. Negen potten met grond met trichodoriden, waarin de met PVY besmette knollen zijn gepoot.

Grond voor verzamelen trichodoriden niet besmet met PVY

In januari 2013 is er tevens grond verzameld van een stuk gras binnen de bebouwde kom van Leek (Groningen) waarvan niet te verwachten was dat de aaltjes in deze grond ooit met PVY in aanraking waren geweest.

Kweek aardappelplanten niet besmet met PVY

In februari 2013 zijn voor Y-virus gevoelige aardappels van het ras Nicola ontvangen. Deze knollen zijn eind februari uitgepoot in 30 potten van 2 liter in een mengsel van zilverzand, kleipoeder, kunstmest en een voedingsoplossing, later in dit verslag schone grond genoemd. De potten met knollen zijn vervolgens in de kasruimte weggezet in een tent, om daarmee de kans zo klein mogelijk te maken dat de planten besmet zouden kunnen raken met PVY, anders dan later in het experiment door trichodoriden, zie foto 4.



Foto 4. 30 potten met schone knollen, gepoot in een schone grond en vervolgens geplaatst in een tent om het risico op ongewenste besmetting met PVY te verkleinen.

Controle (A)

5 Potten met schone knollen zijn apart gehouden ter controle (object A). Dit om later eventueel uit te kunnen sluiten dat er bij een besmetting in de andere objecten niet al een besmetting aanwezig was in het gebruikte plantmateriaal. Dit object werd in een eigen tent van gaas apart gehouden van de andere objecten om het risico op ongewenste besmetting met PVY te verkleinen.



Foto 5. Vijf potten van de onbehandelde controle met schone knollen, gepoot in schone grond en vervolgens geplaatst in een tent om het risico op ongewenste besmetting met PVY te verkleinen.

Trichodoriden van PVY besmette grond en planten toevoegen aan schone planten (B, C)

Op 10 april 2013, toen de 30 potten met schone knollen voldoende waren doorworteld, is de grond in de 9 potten met daarin trichodoriden en met PVY besmette knollen opnieuw bemonsterd door uit iedere pot een aantal submonsters te nemen. De submonsters zijn samengevoegd en vervolgens zijn drie verzamelmonsters van 500 ml en 1 verzamelmonster van 100 ml grond gespoeld met behulp van een Oostenbrinkkan.

Na het spoelen van het 100 ml monster zijn vijf trichodoride-aaltjes direct na spoelen van de grond uit het debris-monster gevestigd en met behulp van PCR getest op de aanwezigheid van PVY in de aaltjes, om te onderzoeken of PVY aangetoond kan worden in trichodoride-aaltjes waarvan bekend is dat zij zich hebben gevoed via de wortels van met PVY besmette planten.

Omdat bekend is dat PVY in bladluizen slechts vier tot zeventien uur levensvatbaar is, is er ervoor gekozen om het debris van 1 x 500 ml, met daarin de trichodoriden zo snel mogelijk te verdelen over 5 potten met schone PVY-gevoelige knollen (object B). Dit is gebeurd binnen een half uur na het spoelen.

De andere 2 x 500 ml grondmonsters zijn verwerkt volgens de standaardmethode waarbij via filters waar de aaltjes doorheen kunnen kruipen een schone alensuspensie wordt verkregen. Zes dagen na het spoelen (T6), op 16 april 2013, zijn alle doorgekropen aaltjes samengevoegd in 120 ml suspensie. Ter controle zijn 15 trichodoriden uit de suspensie gevestigd en met PCR getoetst op de aanwezigheid van PVY. De overige 120 ml is verdeeld over 10 potten met schone knollen (object C).

De vijftien potten geïnoculeerd met trichodoriden afkomstig van PVY besmette grond met PVY besmette aardappelplanten (objecten B en C) werden bij elkaar in een aparte tent van gaas gezet om het risico op ongewenste besmetting met PVY te verkleinen.

Om aan te tonen dat de planten opgekweekt uit de met PVY besmette knollen in de 9 potten inderdaad en nog steeds PVY bevatten zijn hiervan 2 bladmonsters, 2 knolmonsters en 2 wortelmonsters genomen. Dit betrof steeds verzamelmonsters van verschillende planten uit verschillende potten.

Trichodoriden van PVY-vrije grond toevoegen aan schone planten (D, E)

Eveneens op 10 april 2013 zijn 3 monsters van 500 ml genomen van de grond afkomstig van het grasperceel in Leek en gespoeld met behulp van een Oostenbrinkkan. Ook van deze grond is het debris van 1 x 500 ml, met daarin de trichodoriden, binnen een half uur na het spoelen verdeeld over 5 potten met schone knollen (object D). Zes dagen na het spoelen op 16 april 2013 (T6) zijn de doorgrokpen alen van de 2 andere monsters van 500 ml samengevoegd in 100 ml suspensie. Ter controle zijn 15 trichodoriden uit de suspensie gevist en met PCR getoetst op de aanwezigheid van PVY. 50 ml van de suspensie is verdeeld over 5 potten met schone knollen (object E).

De tien potten geïnoculeerd met trichodoriden afkomstig van PVY-vrije grond (objecten D en E) werden bij elkaar in een aparte tent van gaas gezet om het risico op ongewenste besmetting met PVY te verkleinen.

Eindbemonstering en analyse op PVY

Na een maand zijn op 8 mei 2013 bladmonsters genomen van alle objecten. Ieder bladmonster was een verzamelmonster per object met bladeren van alle herhalingen. Deze bladmonsters zijn met behulp van PCR geanalyseerd op aanwezigheid van PVY.

Op 18 juni 2013 is een verzamelmonster genomen van de dochterknollen die zich inmiddels hadden gevormd van de objecten D en E. Dit verzamelmonster bevatte knolmateriaal van alle herhalingen. Het knolmonster is met behulp van PCR geanalyseerd op aanwezigheid van PVY.

3.3 Resultaten

Controle besmette planten als PVY-bron voor trichodoriden

Na afloop van de periode waarin de knollen hebben kunnen wortelen en de aanwezige trichodoriden het PVY-virus hebben kunnen opnemen zijn met een PCR-toets 2 bladmonsters, 2 knolmonsters en 2 wortelmonsters gecontroleerd op de aanwezigheid van PVY. De resultaten worden weergegeven in tabel 3. De planten bleken besmet met PVY, zodat het inderdaad mogelijk was te testen of het virus door trichodoriden kan worden overgebracht. De bladmonsters gaven de laagste C_q-waarden in de analyse met PCR, dit betekent dat hierin de hoogste concentratie PVY virus aanwezig was. Deze observatie was gelijk als in de eerdere proef. De ruwe data van de PCR analyse staan in bijlage 1.

Tabel 3. Controle van gebruikt plantmateriaal op PVY met behulp van PCR-toets.

Monster	Uitslag PCR
Bladmonster 1	Positief, besmet met PVY
Bladmonster 2	Positief, besmet met PVY
Knolmonster 1	Positief, besmet met PVY
Knolmonster 2	Positief, besmet met PVY
Wortelmonster 1	Positief, besmet met PVY
Wortelmonster 2	Positief, besmet met PVY

Controle trichodoriden op PVY

Vijf trichodoride-aaltjes zijn direct na spoelen van de besmette grond met besmette planten uit het debris-monster gevestigd en met behulp van PCR getest op PVY. Zes dagen later zijn uit de trichodoride-suspensies van de besmette grond en van PVY-vrije grond ieder 15 trichodoriden gevestigd en eveneens getoetst op PVY. De resultaten worden weergegeven in tabel 4, de ruwe data staan in tabel 1. In geen van de getoetste trichodoriden kon PVY worden aangetoond.

Tabel 4. Controle van de aaltjes die van besmette grond met besmette planten (objecten B en C) en van de schone grond (objecten D en E) zijn overgebracht op de PVY-vrije aardappelen.

Object	Label	Herkomst trichodoriden	Dagen na spoelen	Uitslag PCR
B, C	B	besmette grond + besm planten	0	Negatief, niet besmet met PVY
B, C	B	besmette grond + besm planten	6	Negatief, niet besmet met PVY
D, E	L	PVY-vrije grond	6	Negatief, niet besmet met PVY

Resultaten PVY na inoculatie met trichodoriden

Ruim een maand na inoculatie van de potten met jonge aardappelplanten zijn per object verzamelmonsters genomen van de bladeren. De uitslag van de PCR-toets op PVY wordt weergegeven in tabel 5. Weer een maand later is van de objecten waar eventueel een besmetting verwacht mocht worden, namelijk die objecten geïnoculeerd met trichodoriden afkomstig van besmette grond met besmette planten, nog een verzamelmonster van dochterknollen getoetst op PVY. Deze uitslag wordt eveneens vermeld in tabel 5, de ruwe data staan in bijlage 1. In geen van de planten is PVY aangetoond.

Tabel 5. Uitslag PCR-toets op PVY van bladmateriaal van de verschillende objecten en dochterknollen van de objecten D en E.

Object	Label	Monstertype	Uitslag PCR
A	C	Blad	Negatief, niet besmet met PVY
B	BS	Blad	Negatief, niet besmet met PVY
C	BT	Blad	Negatief, niet besmet met PVY
D	LS	Blad	Negatief, niet besmet met PVY
E	LT	Blad	Negatief, niet besmet met PVY
D, E	B	Dochterknol	Negatief, niet besmet met PVY



3.4 Discussie

In de potproef zijn diverse controles uitgevoerd. De planten waarmee de trichodoriden zich hebben gevoed om te kunnen testen of trichodoriden PVY kunnen overbrengen, bleken na de voedingsperiode nog aantoonbaar besmet met PVY, een voorwaarde voor het kunnen uitvoeren van de proef.

In de aardappelplanten die niet zijn geïnoculeerd met trichodoriden die zich hebben gevoed met PVY-besmette aardappelplanten is geen PVY aangetoond. Er heeft dus geen ongewenste besmetting plaatsgevonden in het experiment.

Omdat na de potproef geen van de objecten besmet bleek met PVY zijn de resultaten niet statistisch verwerkt.

3.5 Conclusie

Op basis van het uitgevoerde experiment kunnen de volgende conclusie worden getrokken.

- In de trichodoriden die zich hebben gevoed met PVY-besmette aardappelplanten is geen PVY aangetoond.
- In de aardappelplanten die zijn geïnoculeerd met trichodoriden die zich hebben gevoed met PVY-besmette aardappelplanten is eveneens geen PVY aangetoond.
- Het is niet waarschijnlijk dat trichodoriden PVY van plant naar plant kunnen overbrengen en daarmee een bijdrage leveren aan de verspreiding van PVY over een perceel.

Literatuur

- Banttari, E.E., P.J. Ellis and S.M.P. Khurana, (1993) Management of Diseases Caused by Viruses and Virus Like Pathogens. Potato Health Management, Rowe, R.C. (Ed.). APS Press, St. Paul, pp: 127-133.
- De Bokx, J.A. (1987) Biological properties. Virus of Potatoes and Seed Potato Production (de Bokx J.A., van der Want J.P.H., eds.), Pudoc, Wageningen, 1987, pp. 58-82.
- Cooper, J.I. & Harrison, B.D. (1973) The role of weed hosts and the distribution and activity of vector nematodes in the ecology of tobacco rattle virus. *Annals of Applied Biology* 73, 53-66.
- Evans, K., Trugill, D.L. en Webster, J.M. (1993) Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. CAB International Wallingford UK, 648 blz.
- Hoof, H.A. van (1980) Aphid vectors of potato virus YN. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 86, 159–162.
- Kerlan, C (2015) website www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414, February 2015
- Kostiw, M. (1975). Investigation on the retention of potato viruses M and Y in two species of aphids (*Myzus persicae* Sulz. and *Aphis nasturtii* Kalt.). *Pot. Res.*, 18: 637–640.
- Lopez-Abella D, Bradley RHE, Harris KF (1988) Correlation between stylet paths made during superficial probing and the ability of aphids to transmit nonpersistent viruses. Harris KF (ed.), *Advances in Disease Vector Research (Volume 5)*, Springer-Verlag, New York, pp. 251-287.
- Powell, G. (1991) Cell membrane punctures during epidermal penetrations by aphids: consequences for the transmission of two potyviruses. *Annals of Applied Biology* 119, 313–321



Bijlage 1 Ruwe data PCR

Ruwe data van de verschillende PCR's. Cq waarden zijn gemiddelden van een duplo meting.

monster	origineel ID	uitgangsmateriaal	datum isolatie	datum PCR	Cq waarde	PVY
Blad 1	virusreservoir	blad	7-mei-13	7-mei-13	6,76	+
Blad 2	virusreservoir	blad	7-mei-13	7-mei-13	8,8	+
Knol 1	virusreservoir	knol	7-mei-13	7-mei-13	17,44	+
knol 2	virusreservoir	knol	7-mei-13	7-mei-13	12,36	+
wortel 1	virusreservoir	wortel	7-mei-13	7-mei-13	14,86	+
wortel 2	virusreservoir	wortel	7-mei-13	7-mei-13	11,36	+
85740	B4	geviste trichodoriden	12-apr-13	12-apr-13	N/A	-
85735	L2	geviste trichodoriden	7-mei-13	7-mei-13	32,17	-
85738	B2	geviste trichodoriden	7-mei-13	7-mei-13	27,93	-
86863	C	blad	8-mei-13	17-mei-13	29,58	-
86864	LT	blad	8-mei-13	17-mei-13	28,73	-
86865	LS	blad	8-mei-13	17-mei-13	27,82	-
86866	BT	blad	8-mei-13	17-mei-13	27,37	-
86867	BS	blad	8-mei-13	17-mei-13	29,22	-
dochterknollen	object B	knol	18-jun-13	18-jun-13	30,54	-

