



Non-persistente virusoverdracht door bladluizen, *Aardappelvirus Y* in aardappel

Projectverslag Beleidsondersteunend onderzoek, Fytosanitair
BO 06-005-001.06

Martin Verbeek, Paul Piron, Chris Cuperus, Annette Dullemans, Gerrie Wieggers, Antje de Bruin, Henry van Raaij en René van der Vlugt

Gé van den Bovenkamp, Eisse de Haan, Gerlof Miedema en Ton Stolte





Non-persistente virusoverdracht door bladluizen, *Aardappelvirus Y* in aardappel

Projectverslag Beleidsondersteunend onderzoek, Fytosanitair
BO 06-005-001.06

¹ Martin Verbeek, Paul Piron, Chris Cuperus, Annette Dullemans, Gerrie Wiegers, Antje de Bruin, Henry van Raaij en René van der Vlugt

² Gé van den Bovenkamp, Eisse de Haan, Gerlof Miedema en Ton Stolte

¹ Plant Research International, Wageningen

² Nederlandse Algemene Keuringdienst (NAK), Emmeloord

© 2009 Wageningen, Plant Research International 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 Plant Research International B.V.

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 – 48 60 01
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
1. Samenvatting	1
2. Inleiding	2
2.1. Doelstelling van het project	2
2.2. Tijdspad	3
3. Bladluissituatie in Nederland	4
3.1. Probleemstelling	4
3.2. Proefopzet	4
3.3. Resultaten en discussie	5
3.4. Conclusie	5
4. Veldsituatie <i>Aardappelvirus Y</i> in Nederland	6
4.1. Probleemstelling	6
4.2. Proefopzet	6
4.3. Resultaten en discussie	7
4.4. Conclusie	8
5. Bepaling van REF-waarden voor bladluisoorten bij overdracht van de nieuwe PVY stammen	9
5.1. Probleemstelling	9
5.2. Proefopzet	9
5.3. Resultaten en discussie	11
5.4. Conclusie	12
6. Eindconclusie	13
7. Communicatie van resultaten	14
8. Dankwoord	15
9. Literatuur	16
Bijlage I: Overzicht waarnemingen opslag	I-1
Bijlage II: Overzicht resultaten REF-bepaling	II-1
Bijlage III: Voorgestelde nieuwe REF-waarden	III-1

1. Samenvatting

De laatste jaren nemen de problemen met *Aardappelvirus Y* (PVY) toe. Dit is terug te vinden in de toenemende percentages declassering van partijen pootaardappelen. Deze tendens is niet te verklaren met behulp van de vangstcijfers van bladluizen, de overbrengers van het virus. De bladluisvangsten nemen de laatste jaren juist af.

Om de oorzaak van de toenemende problemen met PVY te achterhalen startte in 2006 het project 'Non-persistente overdracht door bladluizen, aardappel', gezamenlijk gefinancierd door het ministerie van LNV (BO fyto sanitair), Nederlandse Algemene Keuringsdienst (NAK) en het Productschap Akkerbouw (PA).

Het onderzoek richtte zich op een drietal vragen:

- Is de bladluissituatie in het veld veranderd? M.a.w. zijn er nieuwe bladluisoorten die PVY kunnen overdragen aanwezig?
- Zijn er andere of nieuwe stammen van het virus in het veld aanwezig?
- Is de overdrachtsefficiëntie van bladluizen voor nieuwe PVY-stammen anders?

Er is aangetoond dat in de afgelopen jaren de veldsituatie voor wat betreft aanwezige PVY-stammen is veranderd. Enkele jaren geleden werd nog algemeen aangenomen dat voornamelijk PVY^N in de Nederlandse aardappelteelt voorkwam. Nu komt deze stam nauwelijks meer voor en zijn PVY⁰ en de recombinante stammen PVY^{NTN} en PVY^{N-Wi} volop aanwezig.

Gedurende drie jaar zijn de bladluisvangsten door de NAK uitgebreid geanalyseerd op het eventueel voorkomen van nieuwe soorten. De cijfers zijn vergeleken met de vangstcijfers uit de tachtiger jaren van de vorige eeuw. Nieuwe soorten bladluizen die PVY kunnen overbrengen zijn niet waargenomen. Er is één nieuwe soort gevonden (*Utamphorophora humboldti*), maar van deze soort is nog niet bekend of het PVY kan overbrengen en, zo ja, met welke efficiëntie. Dit kon helaas niet in het huidige project worden uitgezocht.

Er is een nieuwe methode ontwikkeld om de relatieve transmissie efficiëntie (REF waarde) van bladluisoorten te meten. Deze methode heeft als voordeel dat hij het gehele jaar door kan worden uitgevoerd. Daarnaast is de methode minder arbeidsintensief in vergelijking met de in de tachtiger jaren gebruikte methode.

Van de belangrijkste bladluisoorten is de REF-waarde bepaald voor de overdracht van PVY^N, PVY^{NTN}, en PVY^{N-Wi}. De waarden van overdracht van PVY^N komen goed overeen met de in de tachtiger jaren in Nederland bepaalde REF-waarden, die toen ook met PVY^N zijn bepaald. Bij sommige bladluisoorten worden andere REF-waarden gevonden wanneer PVY^{NTN} en PVY^{N-Wi} worden overgedragen. Voor deze soorten zal voorgesteld worden nieuwe REF-waarden in gebruik te nemen voor bepaling van de advies-loofdoingsdatum.

2. Inleiding

De laatste jaren nemen de problemen met *Aardappelvirus Y* (PVY) toe. Dit is terug te vinden in de toenemende percentages declassering van partijen pootaardappelen. Deze tendens is niet te verklaren met behulp van de vangstcijfers van bladluizen, de overbrengers van het virus. De bladluivangsten nemen de laatste jaren juist af.

In Nederland kennen we een beheerssysteem om de problemen met PVY het hoofd te bieden. Dit beheerssysteem is gebaseerd op intensieve veldkeuringen, virustoetsingen op geogste knollen (na uitgroei in hetzelfde jaar en nacontrole in het daaropvolgende jaar) en het bepalen van een zogenaamde loofdodingsdatum. Deze loofdodingsdatum is de datum waarop de pootaardappelteler het loof van het aardappelgewas moet vernietigen om zoveel mogelijk translocatie van het virus naar de knollen te voorkomen.

De loofdodingsdatum wordt berekend aan de hand van een aantal factoren. Zo zijn de regio waar geteeld wordt en de waargenomen virusdruk (infecties in het veld) belangrijke input. Daarnaast is een hele belangrijke factor in de bepaling van de loofdodingsdatum de vectordruk. Deze vectordruk wordt afgeleid van de vangstcijfers van bladluizen, de vectoren van het virus. De bladluizen worden gevangen in drie hoge zuigvallen (gesitueerd in Colijnsplaat, Tollebeek en Kollumerwaard) en ongeveer 40 gele vangbakken die verspreid staan in de belangrijke pootaardappelgebieden. Nu is bekend dat niet alle bladluizen PVY over kunnen brengen. Daarom worden ongeveer 14 bladluisoorten die vector voor PVY zijn geteld. Ook is bekend dat niet alle bladluisoorten PVY even efficiënt overbrengen. De groene perzikbladluis, *Myzus persicae*, is de belangrijkste vector voor dit virus. Andere bladluisoorten dragen het virus minder efficiënt over. De efficiëntie van deze bladluisoorten wordt gerelateerd aan die van *M. persicae* d.m.v. de zogenaamde Relatieve Efficiëntie Factor (REF).

Om de oorzaak van de toenemende problemen met PVY te achterhalen startte in 2006 het project 'Non-persistente overdracht door bladluizen, aardappel', gezamenlijk gefinancierd door het ministerie van LNV (BO fyto-sanitair), Nederlandse Algemene Keuringsdienst (NAK) en het Productschap Akkerbouw (PA).

Het onderzoek richtte zich op een drietal vragen:

- Is de bladluissituatie in het veld veranderd? M.a.w. zijn er nieuwe bladluisoorten die PVY kunnen overdragen aanwezig?
- Zijn er andere of nieuwe stammen van het virus in het veld aanwezig?
- Is de overdrachtsefficiëntie van bladluizen voor nieuwe PVY-stammen anders?

2.1. Doelstelling van het project

- Het vaststellen van de belangrijkste bladluisoorten verantwoordelijk voor de overdracht van PVY gedurende een periode van drie jaar door analyses van bladluivangsten van de NAK en aanvullend monitoren in het veld.
- Een inventarisatie op het voorkomen van stammen en recombinanten van PVY in Nederlands veldmateriaal gedurende meerdere jaren. Dit zal gebeuren door karakterisering van de gevonden PVY-stammen aan de hand van symptomen op aardappel en toetsplanten, serologie, alsmede analyse van bepaalde genetische kenmerken.
- Bepaling van de REF's van diverse veldpopulaties van deze bladluisoorten, voor de belangrijkste PVY stammen.

2.2. Tijdsplan

Het project is in 2006 gestart, in eerste instantie als deelproject in een groter project over non-persistente overdracht door bladluizen. In dit project werd het andere deelproject uitgevoerd door PPO met als onderwerp non-persistente bladluisoverdracht in tulp en lelie. Later bleken de onderwerpen te ver van elkaar te liggen zodat besloten is om beide onderwerpen als aparte projecten door te zetten. Na drie jaar onderzoek is het project eind 2008 afgesloten. De resultaten zijn regelmatig besproken met de NAK en in de klankbordgroep. Daarnaast zijn in de hele projectperiode regelmatig lezingen verzorgd tijdens congressen, telersbijeenkomsten en gewasbeschermingsdagen (zie hoofdstuk 7).

De verschillende onderdelen van het onderzoek zijn in de volgende perioden uitgevoerd:

2006

- Ontwikkeling van een nieuwe methode om REF-waarden te bepalen.
- REF-waarden voor klonen van *Myzus persicae* en PVY-stammen bepalen door overdrachtsexperimenten met *M. persicae*-klonen PRI (gevangen in 2004) en PVY-referentiestammen (N, O, C, NTN en Wilga).
- Analyse van NAK bladluisvangsten 2006 (hoge zuigval en gele vangbakken) waarbij alle gevangen bladluissoorten gedetermineerd zullen worden.
- Bemonstering van symptomatische aardappelplanten in de na-controle velden van de NAK
- Plaatsen en bemonsteren van vangplanten om zicht te krijgen op virusdruk
- Stambevestiging van de verzamelde PVY-monsters door middel van serologie, toetsplantenonderzoek en sequentieanalyse.
- Verzamelen van veldisolaten van *M. persicae* of andere belangrijke bladluissoorten (input vanuit analyses bladluisvangsten)

2007

- Analyse van NAK bladluisvangsten 2007 (hoge zuigvallen en gele vangbakken) waarbij van de op 1 dag per week gevangen bladluizen de soort is bepaald.
- Bemonstering van symptomatische aardappelplanten uit de nacontrole velden NAK.
- Stambevestiging van de verkregen PVY-isolaten.
- Verzamelen van veldisolaten van bladluizen, waarvan bekend is dat ze vector zijn van PVY en nieuwe bladluissoorten
- Bepaling van de overdrachtsefficiëntie (REF) van de belangrijkste bladluissoorten voor PVY^N, PVY^{NTN} en PVY^N-Wilga (referentie-isolaten).
- Bronnenonderzoek (bemonsteren onkruiden en toetsing op aanwezigheid van PVY)
- Nader onderzoek naar PVY^C. Komt PVY^C, of aan deze stam gerelateerde sequenties, nog voor?

2008

- Analyse van NAK bladluisvangsten 2008 (hoge zuigvallen en gele vangbakken) waarbij van de op 1 dag per week gevangen bladluizen de soort is bepaald.
- Verzamelen van veldisolaten van bladluizen, waarvan bekend is dat ze vector zijn van PVY en nieuwe bladluissoorten
- Bepaling van de overdrachtsefficiëntie (REF) van de belangrijkste bladluissoorten voor PVY^N, PVY^{NTN} en PVY^N-Wilga (referentie-isolaten).
- Karakterisering van twee NTN en twee Wilga isolaten uit Nederland.
- Bronnenonderzoek (bemonsteren onkruiden en toetsing op aanwezigheid van PVY), inventarisatie van opkomst opslag
- Sequentiebepaling van referentie-isolaat van PVY^C.

3. Bladluissituatie in Nederland

3.1. Probleemstelling

Eén van de hoofdvragen binnen dit project is of de bladluissituatie in Nederland zodanig is veranderd dat hiermee de toenemende problemen met PVY zijn te verklaren. Die toename leek in tegenstelling met de waarneming dat steeds minder bladluizen werden gevangen tijdens het poottaardappelseizoen (ten opzicht van de vangsten in de tachtiger jaren van de vorige eeuw). De vraag rees of er zich wellicht andere soorten bladluizen in Nederland hadden gevestigd en, zo ja, of deze nieuwe soorten goede vectoren van het virus zouden zijn. Omdat bij de bepaling van de vectordruk slechts 14 bladluisoorten worden geteld en de rest niet, was de kans aanwezig dat een nieuwe PVY-vector over het hoofd werd gezien.

3.2. Proefopzet

Gedurende de drie jaar van dit project is door de NAK de actuele bladluissituatie geanalyseerd. Hiervoor was het nodig om de kennis op het gebied van bladluisdeterminatie op een zodanig peil te brengen dat alle gevangen bladluizen tot op soortsniveau konden worden gedetermineerd. In een aantal workshops zijn medewerkers van de NAK door PRI (P. Piron) geïnstrueerd in het determineren van bladluizen. Tijdens het project fungeerde P. Piron als “achtervang” voor moeilijk op naam te brengen bladluizen.

Omdat het ondoenlijk was om alle gevangen bladluizen te determineren is ervoor gekozen om tijdens de vangstperiode (in 2006 en 2007: 1 mei tot 1 augustus en in 2008: 1 april – 1 augustus) de vangsten van 1 dag per week te analyseren. Daarnaast werden ook de afklopvangsten die vroeg in het seizoen worden uitgevoerd geanalyseerd.



Figuur 1: A) Gele vangbak



B) Hoge Zuigval

3.3. Resultaten en discussie

Dit onderzoek is uitgevoerd door de NAK en de resultaten zijn weergegeven in het rapport "Bladluisdeterminaties 2006-2008" (NAK, Gé van den Bovenkamp en Gerlof Miedema, maart 2009). Hieronder volgt een korte samenvatting van dit verslag.

In vergelijking met onderzoek uit de tachtiger jaren van de vorige eeuw werden, op één na, geen nieuwe soorten ontdekt. Deze nieuwe soort betrof *Utamphorophora humboldti*, een oorspronkelijk uit Noord-Amerika en Oost-Azië bekende soort, die vanuit Schotland en Ierland, in West-Europa aan een opmars bezig lijkt.

Tijdens de onderzoeksperiode werd bij het afkloppen van jonge aardappelplanten geconstateerd dat bepaalde soorten bladluizen, die vector zijn voor PVY, soms heel vroeg in het jaar in relatief grote aantallen in het gewas aanwezig zijn. Later in het seizoen worden ze in veel mindere mate gevangen. Mogelijk slaan bladluizen ten gevolge van warmere winters hun seksuele cyclus over en overwinteren als nymf op onkruiden. Wanneer er ook veel virusbronnen in het veld staan (denk met name aan aardappelopslag dat doorgaans voor een hoog percentage is geïnfecteerd) dan kan dit een oorzaak zijn van vroegtijdige infecties van de, nog gevoelige, aardappelplant.

3.4. Conclusie

Geconcludeerd kan worden dat er niet aantoonbaar melding gemaakt kan worden van nieuwe soorten bladluizen die PVY kunnen overbrengen. Er is één nieuwe soort gevonden (*U. humboldti*), maar van deze soort is nog niet bekend of het PVY kan overbrengen en, zo ja, met welke efficiëntie. Dit kon helaas niet in het huidige project worden uitgezocht.

4. Veldsituatie *Aardappelvirus Y* in Nederland

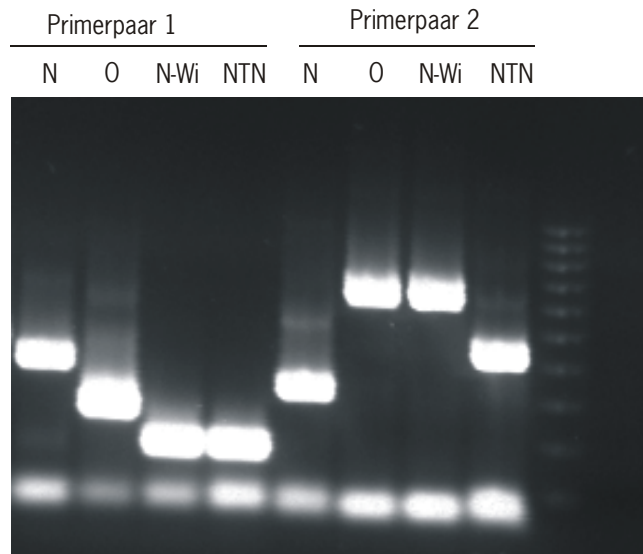
4.1. Probleemstelling

Het onderzoek aan *Aardappelvirus Y* werd in Nederland vooral in de zeventiger en tachtiger jaren van de vorige eeuw uitgevoerd. In die tijd kwamen drie stammen van het Aardappelvirus Y voor, te weten PVY⁰ (de oude stam), PVY^C (de 'common' of gewone stam) en PVY^N (de nieuwe stam). Inventarisaties uit die tijd lieten zien dat PVY^N in Nederland het meeste voorkwam en als belangrijkste werd geacht. Belangrijk onderzoek, zoals naar de REF-waarden en veredelingsonderzoek (resistentietoetsingen), werd met name met PVY^N uitgevoerd. Inmiddels zijn er nieuwe stammen gerapporteerd, zoals PVY^{NTM} (N-stam die knolnecrose (tuber necrosis) kan veroorzaken) en PVY^{N^{Wi}} (de uit Polen afkomstige Wilga stam). Deze nieuwe stammen bleken recombinanten te zijn; virussen met erfelijk materiaal dat is ontstaan uit een fusie van het genetisch materiaal van PVY^N en PVY⁰. Bij het begin van het project was niet bekend of deze nieuwe – recombinante – stammen ook in Nederland voorkwamen. Daarom is binnen dit project een inventarisatie gedaan in Nederlands pootgoedmateriaal. Deze inventarisatie kon gebeuren omdat inmiddels goede (moleculaire) methoden voorhanden zijn om deze stammen te kunnen onderscheiden. Met deze methoden kan echter de C-stam van het virus niet aangetoond of onderscheiden worden. De genetische code (sequentie) van deze stam is nog nauwelijks bestudeerd. Binnen dit project is dan ook de sequentie bepaald van een type-isolaat van PVY^C, waardoor de ontwikkeling van moleculaire detectie mogelijk wordt.

Een ander belangrijk punt in de veldsituatie in Nederland en in het begrijpen van de epidemiologie van het *Aardappelvirus Y* is kennis van de virusbronnen in het veld. Met andere woorden: *Waar komt het virus in het voorjaar vandaan?* Om deze vraag te kunnen beantwoorden is een inventarisatie gedaan in onkruiden, wintertarwe en aardappelopslag (kleine aardappeltjes die bij de oogst in de grond achterblijven en het volgende jaar weer uitgroeien).

4.2. Proefopzet

In 2006 zijn enkele honderden symptomatische aardappelplanten uit de na-controlevelden van de NAK (Emmeloord) bemonsterd en d.m.v. ELISA getoetst op infectie met PVY (polyclonaal antiserum PRI, detecteert alle stammen). In deze na-controlevelden staan monsters uit heel Nederland en kunnen als een representatieve weergave worden gezien van de Nederlandse veldsituatie. Van 98 positieve monsters is de identiteit (stam) van het evt. aanwezige PVY-isolaat bepaald door middel van serologie (met monoclonalen die kunnen discrimineren tussen N- en O-serotype, Adgen), toetsplanten-onderzoek en PCR-analyses. De PCR-analyses werden met verschillende primers (Glais et al, 2002 en Lorenzen et al, 2006) uitgevoerd. Dit experiment is in 2007 herhaald met 100 planten uit het na-controleveld in Emmeloord.



Figuur 2: Resultaten van PCR met Lorenzen primers. Door het gebruik van twee verschillende primerparen kan onderscheid worden gemaakt tussen N, O, N-Wi en NTN stammen van het *Aardappelvirus Y*.

Voor het bepalen van de sequentie van een referentie isolaat van PVY^C (PRI siolaat nr. 509, Zeeuwse Blauwe) werd gebruik gemaakt van primers gebaseerd op al bekende gedeeltelijke sequenties voor PVY^C. De rest van het genoom werd bepaald met behulp van een zogenaamde 'primer-walking' strategie.

In 2006 en 2007 zijn diverse onkruiden d.m.v. ELISA getest op de aanwezigheid van PVY. De onkruiden werden verzameld rond een perceel in Wageningen, waar het jaar ervoor consumptieaardappelen waren geteeld.

Daarnaast zijn inoculatie-experimenten met enkele belangrijke onkruiden uitgevoerd. Hierbij werden isolaten van de verschillende PVY stammen mechanisch geïnoculeerd op o.a. zwarte nachtschade (*Solanum nigrum*), muur (*Stellaria* spp), grote weegbree (*Plantago major*) en klaver (*Trifolium* spp). Als controle werd de toetsplant *Nicotiana occidentalis* '37B' meegenomen. In 2008 is ook gekeken naar het voorkomen van PVY in graanvelden. Ruim 500 wintertarweplanten zijn in het voorjaar met ELISA getoetst op infectie met PVY (polyclonaal antiserum PRI). Daarnaast is gekeken naar de hoeveelheid opslag in velden waar het vorige jaar aardappels werden geteeld en naar het moment waarop deze opslag boven de grond kwam. Enkele mensen uit de aardappelsector hebben hierbij als waarnemer gefungeerd.

4.3. Resultaten en discussie

Bij de vergelijking van PCR methoden om de verschillende stammen van PVY te onderscheiden bleken de Lorenzen primers meer betrouwbare resultaten te geven dan die door Glais waren ontwikkeld (met name voor de detectie van PVY^{N-Wi} isolaten). De resultaten van de verschillende toetsmethoden (serologie, toetsplantenonderzoek en PCR kwamen zeer goed overeen.

Uit de uitgebreide inventarisatie werd duidelijk dat er een aanzienlijke verschuiving in de aanwezige PVY-stammen is opgetreden. Algemeen werd nog steeds aangenomen dat PVY^N overheersend is. Echter in het onderzochte materiaal bleek PVY^N vrijwel niet voor te komen. Daarentegen bleek de NTN –stam massaal vertegenwoordigd en ook de nieuwe Wilga-stam (PVY^{N-Wi}) bleek veel aanwezig.

	aantal	PVY ^C %	PVY ^N %		PVY ^O %		PVY %
	Zieke planten		PVY ^N	PVY ^{NTN}	PVY ^{N-Wi}	PVY ^O	total
1994	113	39	24			50	113
1999	55	0	15	29		58	102
2000	59	2	2	7		71	102
2003	87	0	0	67		33	100
2006	98	0	0	73	14	13	100
2007	100	0	6	56	23	15	100

Tabel 1: Overzicht van veldinventarisaties van PVY stammen. In 1994 is de inventarisatie uitgevoerd door het voormalige IPO met toetsplantenonderzoek. In de jaren 1999 en 2000 werd de inventarisatie uitgevoerd door de NAK, waarbij een eerste set primers voor de detectie van NTN werd gebruikt. Later bleek deze set primers een overwaardering van NTN te geven ten opzichte van PVY^N. In 2003 is een primerset gebruikt van L. Glais (uitgevoerd door NAK volgens Glais, 2002) voor de detectie van NTN-stammen. In 2006 en 2007 is de inventarisatie uitgevoerd als beschreven in de vorige paragraaf.

De sequentie van PVY^C is in zijn geheel bepaald en zal beschikbaar komen in GenBank onder nummer EU563512. De opheldering van de sequentie maakt moleculaire detectie en onderscheiding van andere stammen mogelijk.

In de bemonsterde onkruiden die werden geplukt rond een perceel waar in het vorige jaar consumptieaardappelen waren geteeld kon geen PVY worden aangetoond. Ook in de planten van wintertarwe kon geen PVY worden aangetoond. Toch vinden onderzoekers soms tarweplanten die geïnfecteerd zijn met PVY (J. Schubert, JKI, Duitsland, persoonlijke mededeling).

Uit de inoculatieproeven bleek dat de weegbree, klaver en muur niet waren geïnfecteerd. De zwarte nachtschade echter bleek zeer hoge concentraties PVY te bevatten, terwijl de planten niet of nauwelijks symptomen lieten zien. Dit is dus een potentiële virusbron in het veld. Het grootse gevaar schuilt echter in de aardappelopslag van vorig jaar. Uit onderzoek van de NAK en PRI is gebleken dat een zeer hoog percentage van deze opslag geïnfecteerd is.

Waarschijnlijk is opslag al vroeg in het voorjaar een geduchte virusbron. In het afgelopen jaar is een inventarisatie gedaan naar het tijdstip en dichtheid van aardappelopslag. Het bleek dat in Zeeland de eerste opslag al half maart werd waargenomen. In de noordelijke provincies was dat ongeveer een maand later (zie bijlage I).

4.4. Conclusie

In dit project is duidelijk geworden dat de verdeling van PVY stammen in het Nederlandse veld is verschoven. De gedachte was dat voornamelijk PVY^N en PVY^O aanwezig zouden zijn, maar uit de inventarisaties blijkt dat PVY^N bijna is verdwenen en dat de nieuwe – recombinante – stammen PVY^{NTN} en PVY^{N-Wi} (Wilga) frequent in Nederland voorkomen. In het veld zijn voornamelijk opslagplanten geduchte virusbronnen, die al heel vroeg in het pootaardappelseizoen aanwezig zijn. Vroeg in het voorjaar zijn er ook al voldoende bladluizen en zijn de jonge aardappelplanten nog zeer gevoelig. Hierdoor vindt er waarschijnlijk dan al veel verspreiding van PVY plaats.

5. Bepaling van REF-waarden voor bladluisoorten bij overdracht van de nieuwe PVY stammen

5.1. Probleemstelling

In de jaren 80 van de vorige eeuw zijn door het voormalige IPO de relatieve overdrachtsefficiënties van een groot aantal bladluizen voor transmissie van PVY^N bepaald (Van Harten, 1983, Piron, 1986, De Bokx en Piron, 1990). Deze relatieve overdrachtsefficiëntie, oftewel de Relatieve Efficiëntie Factor (REF), drukt de mate van overdracht van het aardappelvirus Y door een bepaalde bladluisoort uit ten opzichte van die van *Myzus persicae*, de bladluis waarvan algemeen wordt aangenomen de hoogste efficiëntie te hebben. Deze cijfers worden gebruikt in het Nederlandse beheerssysteem voor PVY om de vectordruk in het veld te bepalen. Van een aantal bladluisoorten (aanvankelijk 11, heden 14) worden het aantal gevangen exemplaren geteld en per soort wordt dit aantal vermenigvuldigd met de REF van die soort. In tabel 2 worden de REF-waarden weergegeven zoals die in de 80er jaren zijn bepaald en tot op heden gebruikt in het beheerssysteem.

Soort	REF	Soort	REF
<i>Myzus persicae</i>	1.00	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	0.10
<i>Myzus certus</i>	0.44	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0.05
<i>Aphis nasturtii</i>	0.42	<i>Rhopalosiphum</i> spp.	0.03
<i>Aphis frangulae</i>	0.42	<i>Brachycaudus helichrysi</i>	0.01
<i>Phorodon humuli</i>	0.15	<i>Metopolophium dirhodum</i>	0.01
<i>Aphis fabae</i>	0.10		

Tabel 2: REF-waarden voor 11 bladluisoorten zoals bepaald door het IPO in de jaren 1980-1990.

Naar aanleiding van de toenemende problemen met PVY werd de vraag gesteld of de huidige REF-waarden nog wel voldeden en of deze REF-waarden anders waren wanneer er andere stammen van het virus worden overgedragen. Binnen het onderzoek is gekozen om de REF-waarden te bepalen van bladluizen voor één isolaat van PVY^N (als referentie) en een aantal isolaten van PVY^{N^{TN}} en PVY^{N^{Wi}}.

In de tachtiger jaren werden de REF-waarden bepaald aan de hand van in aardappelvelden levend gevangen gevleugelde bladluizen. Omdat dit een zeer tijdrovend karwei is, is binnen dit project gezocht naar een nieuwe methode van REF bepaling.

5.2. Proefopzet

Er werd een nieuwe methode ontwikkeld om REF-waarden te bepalen van bladluisoorten. In deze methode wordt gebruikt gemaakt van gekweekte bladluisklonen, dit in tegenstelling tot de bepalingen in de jaren 80 waarbij bladluizen levend werden gevangen en later in het lab getest op hun vermogen PVY over te dragen. Voordeel van de nieuwe methode is dat deze jaarrond kan worden uitgevoerd.

Van elke bladluiskloon werden 50 adulte individuen getest op overdracht van een bepaald PVY-isolaat. In alle experimenten werden 6 PVY-isolaten getest (PVY^N '603', PVY^{N^{TN}} '752', 'Nicola' en 'Orleans', en PVY^{N^{Wi}} '261-4' en 'Pologne').

Op basis van eerdere experimenten bleek het noodzakelijk om in elk experiment voor elk isolaat tevens 50 adulten te testen van de standaardbladluiz *M. persicae*, kloon Mp2. De overdracht van elke bladluiskloon kon op die manier worden gerelateerd aan de overdracht door Mp2 onder dezelfde omstandigheden. Omdat in deze experimenten werd uitgegaan van twee deelblaadjes van hetzelfde blad van de bron-aardappelplant, was ook de virusconcentratie binnen het experiment vergelijkbaar.

Opgemerkt moet worden dat de experimenten in de tachtiger jaren met bladluizen uit het veld werden uitgevoerd, waarbij de genetische achtergrond van die bladluizen divers was. In onze experimenten werken we met klonen van bladluizen, kweken die werden gestart met slechts één individu. Deze klonen zijn dus genetisch homogeen. Het is bekend geworden in het eerste jaar van dit project dat de overdrachtsefficiëntie per kloon kan verschillen. Om deze reden testen we waar mogelijk drie verschillende klonen (biotypen) van elke bladluisoort.

Werkwijze:

- Verzamel ruim 300 adulten van de te testen bladluiskloon en ruim 300 adulten van de referentiekloon Mp2 (*M. persicae*) in plastic bakjes.
- Laat de bladluizen 2,5 uur hongeren.
- Zet batchgewijs bladluizen op een bronblaadje van een geïnfecteerde aardappelplant en laat die bladluizen 2,5 minuut proefboringen doen (acquisitieperiode).
- Per PVY-isolaat wordt 1 samengesteld blad gebruikt, waarvan twee deelblaadjes worden afgebroken. 1 deelblaadje wordt gebruikt om de te testen bladluiz virus te laten opnemen en het tweede deelblaadje wordt gebruikt voor de referentiebladluiz Mp2.
- De bladluizen worden na de acquisitieperiode individueel op jonge *Physalis floridana* plantjes gezet en meteen afgedekt met een PVC kooitje (wordt over het plantje heen gezet). In totaal zijn per experiment 600 *P. floridana* plantjes en 600 kooitjes nodig.
- De volgende dag worden de bladluizen gedood m.b.v. een insecticide.
- Na drie weken kunnen de geïnfecteerde *P. floridana* plantjes op basis van symptomen worden geteld.



Figuur 3: Overdrachtsexperimenten met bladluizen. Links: individuele bladluizen worden op de *Physalis floridana* zaailingen gezet en de planten worden afgedekt met een kooitje. Rechts: na drie weken zijn de symptomen duidelijk zichtbaar en kan de overdrachtsefficiëntie worden bepaald.

De uiteindelijke REF-waarde werd bepaald door het aantal plantjes dat werd geïnfecteerd door de te testen bladluiskloon met een bepaald PVY-isolaat te delen door het aantal plantjes dat werd geïnfecteerd door *M. persicae* kloon Mp2 in hetzelfde experiment

$$(REF [biotype]) = \frac{\text{number of infected plants [biotype]}}{\text{number of infected plants [Mp2]}}$$

Per bladluisoort werden (wanneer mogelijk) de uitkomsten van de drie geteste klonen gemiddeld. Op deze manier werden de REF-waarden per PVY-isolaat berekend. Een algehele REF waarde voor de bladluisoort werd berekend door de waarden voor de 6 PVY-isolaten te middelen.

5.3. Resultaten en discussie

Met het nieuwe systeem kunnen REF-waarden van bladluizen vrij efficiënt worden bepaald in kasexperimenten welke het gehele jaar door kunnen worden uitgevoerd. Dit is een voordeel ten opzicht van de in de jaren 80 gebruikte methode. De resultaten van de experimenten kunnen met elkaar vergeleken worden mits er elke keer een interne controle (*Myzus persicae* biotype Mp2 op een deelblaadje van hetzelfde bronblad) wordt meegenomen.

Van een groot aantal bladluizen konden klonen worden verzameld en in kweek genomen. Toch bleek het soms erg lastig om bepaalde bladluizen te vinden in het veld, en vooral om ze dan in kweek te nemen. Vaak waren in het veld gevangen bladluizen al geïnfecteerd door sluipwespen en was het opzetten van een kweek een onmogelijke taak. Helaas is het binnen de gegeven tijd van drie jaar niet gelukt om van alle belangrijke soorten de REF te bepalen. De NAK heeft daarnaast nog een aantal bladluisoorten gedefinieerd waarvan het wenselijk zou zijn om te bepalen of deze soorten vector zijn van PVY. Ook deze experimenten konden niet meer worden uitgevoerd binnen dit project.

De REF-waarden die werden bepaald voor de verschillende bladluizen en PVY stammen zijn weergegeven in Bijlage 2. De voorgestelde nieuwe REF-waarden voor gebruik in het Nederlandse PVY-beheerssysteem zijn weergegeven in Bijlage 3. De NAK zal uiteindelijk een beslissing nemen over het al dan niet overnemen of bijstellen van deze waarden.

De experimenten zijn uitgevoerd met referentiemateriaal van de PVY stammen N, NTN en Wilga. Geen van deze stammen was van Nederlandse oorsprong (N afkomstig uit Zwitserland, NTN afkomstig uit Hongarije, Frankrijk en Duitsland, en Wilga afkomstig uit Polen en Duitsland). Er zijn uit het in 2006 in Nederland verzamelde materiaal (na-controlelevelden NAK, Emmeloord) 5 isolaten van het NTN-type en 5 van het Wilga-type gekozen en verder geanalyseerd op toetsplanten, m.b.v. serologie en sequentieanalyse.

In Tabel 3 zijn de resultaten weergegeven van die inventarisatie. Van elk type zijn 2 isolaten gekozen en gebruikt in een bladluisoverdracht-experiment. Het blijkt dat wanneer de overdracht van *A. nasturtii* wordt gerelateerd aan *M. persicae* de efficiënties in de buurt liggen van de nieuwe voorgestelde REF van 0.6, behalve voor Wilga isolaat 2, waarbij de overdracht verrassend achterblijft (zie Tabel 4).

Isolaat (2006, controleveld NAK)	Ras	Toetsplant reactie	ELISA (Mab)	PCR Lorenzen	Conclusie
4	Alcmaria	type N	serotype N	NTN	NTN
5	Armada	type N	serotype N	NTN	NTN
22	Sirtema	type N	serotype N	NTN	NTN
57	Spunta	type N	serotype N	NTN	NTN
69	Bintje	type N	serotype N	NTN	NTN
2	Agata	type N + O	serotype O	Wilga	Wilga
54	Saturna	type N + O	serotype O	Wilga	Wilga
89	Irene	type N	serotype O	Wilga	afwijkend
97	Allure	type N + O	serotype O	Wilga	sequentie afwijkend?
51	Russet Burbank	type O	serotype O	Wilga	afwijkend

Tabel 3: Inventarisatie Nederlandse isolaten van PVY^{NTN} en PVY^{N^{Wi}}.

PVY-isolaat	N-603	NTN-752	NL-NTN 22	NL-NTN 57	NL-Wilga 2	NL-Wilga 54	Gemiddeld
<i>A. nasturtii</i> 1108-1 t.o.v. MP2	0.52	0.60	0.50	0.71	0.19	0.44	0.50

Tabel 4: Overdrachtsefficiënties van Nederlandse isolaten van PVY^{NTN} en PVY^{N^{Wi}} voor de bladluis *Aphis nasturtii*, kloon 1108-1

5.4. Conclusie

Voor de meeste getoetste bladluisoorten blijken de huidige REF-waarden te kloppen, wanneer het gemiddelde cijfer over de experimenten met 6 PVY-isolaten wordt vergeleken met de 'oude' REF-waarden zoals die in de jaren 80 is bepaald (van Harten, 1983; De Bokx & Piron, 1990). Er zijn echter een paar bladluisoorten die voor de nieuwe stammen PVY^{NTN} en PVT^{N^{Wi}} veel efficiëntere vectoren zijn dan wanneer PVY^N wordt overgedragen; *Aphis nasturtii*, *Phorodon humuli* en *Acyrtosiphon pisum*. Deze bladluizen hebben in het huidige systeem een te lage REF-waarde wanneer de nieuwe stammen in het veld aanwezig zijn. Ook zijn er enkele bladluisoorten gevonden die in het oude systeem geen REF-waarde hadden, maar in onze experimenten wel PVY overdroegen. Deze bladluisoorten zijn *Aulacorthum solani*, *Myzus ascalonicus*, *Schizaphis graminum* en bladluizen uit de moeilijk te determineren groep van *Aphis* spp.

De bladluisoort *Macrosiphum euphorbiae* (de aardappeltopluis) leverde in onze experimenten juist een lagere REF waarde op (van 0.10 naar 0.01).

6. Eindconclusie

Aan het begin van het project werden drie vragen gesteld naar aanleiding van de waarneming dat infecties met het *Aardappelvirus Y* (PVY) in de pootaardappelteelt toenamen en tegelijkertijd de bladluipopulaties leken af te nemen. In de afgelopen drie jaar van onderzoek zijn er antwoorden gevonden voor deze drie vragen:

1. Is de bladluissituatie in het veld veranderd? M.a.w. zijn er nieuwe bladluisoorten die PVY kunnen overdragen aanwezig?

Op deze vraag kan in principe met nee worden geantwoord. Hoewel er één nieuwe soort is gevonden zijn over het algemeen dezelfde soorten in het veld aanwezig als ongeveer 30 jaar terug. Het is wel interessant om van deze ene nieuwe soort (*Utamphorophora humboldti*) te onderzoeken of deze soort vector is van PVY.

2. Zijn er andere of nieuwe stammen van het virus in het veld aanwezig?

Op deze vraag kan een duidelijk ja worden gegeven. Het is gebleken dat de nieuwe stammen PVY^{NTN} en PVY^{N^{Wi}} al volop in Nederland aanwezig zijn. Het is zelfs zo dat in de inventarisaties van 2006 en 2007 in ongeveer 80% van de PVY infecties deze nieuwe stammen werden gevonden.

3. Is de overdrachtsefficiëntie van bladluizen voor nieuwe PVY-stammen anders?

Ook op deze vraag kan met ja worden geantwoord. Hoewel voor de meeste bladluizen het niet uitmaakt welke stam wordt overgedragen zijn er toch enkele waarvoor heel duidelijk is aangetoond dat zij de nieuwe stammen PVY^{NTN} en PVY^{N^{Wi}} beter overbrengen (met een hogere efficiëntie) dan PVY^N. Met de huidige REF-waarden werd de bijdrage in de verspreiding van PVY dus onderschat wanneer de nieuwe stammen in het veld aanwezig zijn.

De toename van infecties met PVY zou dus verklaard kunnen worden uit het feit dat er de laatste jaren nieuwe stammen van het virus in Nederland zijn opgedoken. Deze stammen worden door enkele bladluisoorten efficiënter overgedragen dan de N-stam van het virus. Gebruik makend van de REF-waarden die golden voor PVY^N kon leiden tot een onderschatting van de virusdruk, waardoor de loofdodingsdatum te laat werd gekozen. Er wordt op dit moment met behulp van de vangstcijfers van de afgelopen jaren nagegaan welk effect het gebruik van de nieuwe REF-waarden zou hebben gehad op de keuze van de loofdodingsdatum.

Natuurlijk is met het beantwoorden van deze drie vragen nog niet alles opgelost. Er zijn tijdens ons onderzoek en vooral ook door het contact met andere onderzoekers op congressen zaken naar voren gekomen die ook aandacht verdienen. Zo is er het veranderende klimaat. Wanneer winters warmer worden zullen bepaalde bladluisoorten hun overwinteringstrategie gaan veranderen. In plaats van het leggen van een winterei dat overwintert op een houtig gewas, zullen bladluizen tijdens de winter gewoon doorgaan met hun non-sexuele cyclus en overwinteren op onkruiden. Hierdoor zullen bladluizen al zeer vroeg in het voorjaar aanwezig zijn en eerder naar andere kruidige gewassen vliegen. Wanneer er dan ook al vroeg in het voorjaar virusbronnen in het veld staan (onkruiden, granen, aardappelopslag) dan zal virusverspreiding al heel vroeg plaatsvinden, juist op het moment dat de aardappels het gevoeligst zijn voor infectie.

7. Communicatie van resultaten

De resultaten van dit onderzoek zijn regelmatig in verschillende gremia gecommuniceerd. Naast wetenschappelijke lezingen en posters op congressen zijn de resultaten ook besproken op bijvoorbeeld telersbijeenkomsten van LTO.

Tijdens het project is een goede relatie opgebouwd met de groep Kerlan (Frankrijk) en dit zal worden gecontinueerd in het PVY-wide project.

Aan wetenschappelijke publicaties wordt op moment van schrijven nog gewerkt. Een eerste manuscript over de bepaling van REF-waarden is aangeboden aan het tijdschrift *Annals of Applied Biology* en is onder review.

Hieronder volgt een overzicht van lezingen/publicaties over het in dit project uitgevoerde onderzoek:

2006, 2007 en 2008: informeel overleg tussen groep C. Kerlan en FNPPPT (Frankrijk) en NAK en PRI over PVY onderzoek en mogelijkheden samenwerking.

2007:

Presentaties telersavond (R vd Vlugt) 6 februari Hoogland BV Ferwert, 15 maart Haijtema Agrotheek BV, Opmeer

LTO-Noord Thema-avonden "Bacterieziek, virus en luizen": 7 februari Eenrum, 15 februari Sint Annaparochie, 26 februari Emmeloord.

Mei/juni: Verwijzing naar onderzoeksproject in Nieuwsbrief Certis

Presentatie KNPV voorjaarsverg (R. vd Vlugt).

Juni: twee presentaties (M. Verbeek en R. vd Vlugt) op EAPR virology symposium te Aviemore (Schotland)

Oktober: presentatie op NJF seminar, Kristianstad, Zweden (M. Verbeek)

Oktober: presentatie en poster (R. v.d. Vlugt en M. Verbeek) op IPVE symposium, Hyderabad, India

2008:

April: Artikel Agrarisch Dagblad

Mei: Presentatie Gewasbeschermingsmanifestatie Ede (M. Verbeek)

Juni: Presentatie tijdens eerste bijeenkomst PVY-wide (R. v.d. Vlugt)

Augustus: Presentatie Congres IWGLVV, Ljubljana, Slovenia (R. v.d. Vlugt)

2009:

Februari: Invited speaker op Bioforsk congres, Noorwegen (M. Verbeek) plus artikel in Bioforsk Fokus (Verbeek, M (2009) Aphid transmission of *Potato virus Y*. *Bioforsk FOKUS-4(2): 180-181*)

April: Presentatie AAB advances in virology, Harrogate, UK (M. Verbeek)

April: Posterpresentatie op de gezamenlijke vergadering van de Nederlandse Kring voor Plantenvirologie en de Duitse Arbeitskreis für Pflanzenvirologie, Hamburg, Duitsland

April: artikel Agrarisch Dagblad

8. Dankwoord

Dit onderzoek werd mogelijk door de financiering door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, de Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor zaaizaad en pootgoed van landbouwgewassen (NAK) en het Hoofdproductschap Akkerbouw (PA). Naast financier had de NAK ook een uitvoerende taak in dit onderzoek. Wij danken Gé, Ton, Gerlof en Eisse voor de plezierige manier van samenwerken en hun opbouwende kritiek. Ook de leden van de klankbordcommissie, onder voorzitterschap van Annelien Roenhorst en Paul van den Boogert (Plantenziektenkundige dienst) danken wij voor de zeer plezierige vergaderingen en hun meedenken in de problematiek van non-persistente virusoverdracht.

9. Literatuur

- Bovenkamp, GW van den en Miedema, G (2009) Bladluisdeterminaties 2006-2008. Verslag Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor zaaizaad en pootgoed van landbouwgewassen (NAK), maart 2009
- De Bokx J A and Piron P G M. (1990) Relative efficiency of a number of aphid species in the transmission of potato virus YN in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **96**:237-246
- Glais L, Tribodet M and Kerlan C. (2002) Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): Evidence that PVYNW and PVYNTN variants are single to multiple recombinants between PVYO and PVYN isolates. *Archives of Virology*, **147**:363-378.
- Lorenzen J H, Piche L M, Gudmestad N C, Meacham T and Shiel P. (2006) A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. *Plant Disease*, **90**:935-940.
- Piron P G M. (1986) New aphid vectors of potato virus YN. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **92**:223-229.
- Van Harten A. (1983) The relation between aphid flights and the spread of potato virus YN (PVYN) in the Netherlands. *Potato Research*, **26**:1-15.

Bijlage I. Overzicht waarnemingen opslag

Bijlage 1: Overzicht waarnemingen opslag

Op 5-3-2008 zijn afspraken gemaakt met potentiële waarnemers in het land. Drie van het reageerden positief en gaven de volgende waarnemingen door

Joris van Waes, Zeeland, ZLTO:

- belde 13-3 eerste sporadische eerste opslag;
- 28-4 gebeld, opslag komt volop voor (bieten, cichorei)
- 22-5 gebeld, veel opslag, plaag, in wintertarwe, bieten, uien, cichorei(veel is 3 tot 5 planten/vierkante meter)

Alex de Bruyckere (Piet Groen), HaijtemaAgrotheek, Middenmeer

- 27-3 gebeld, nat en koud, geen opslag
- 28-4 gebeld eerste opslag in wintertarwe gezien op 24-4
- 22-5 gebeld, veel opslag, in wintertarwe, bieten, uien, graszaad (veel is tot wel 10 planten/vierkante meter)

Andries Jensma, Hoogland Ferwert

- 27-3 gebeld, nat en koud, geen opslag
 - 28-4 gebeld, geen opslag
 - 26-5 gebeld, veel opslag, vooral in uien, bieten (veel is 3 planten/vierkante meter)
- Geen opslag op geploegde percelen

Chris Cuperus, Wageningen

Percelen: Wel, Kievit, Wel en Braam, wintertarwe, geen opslag tot 22-5

Born 1 (braak) tot 16-4 geen opslag, 17-4 bewerkt en ingezaaid, tot 22-5 geen opslag

Bijlage II. Overzicht resultaten REF-bepaling

Bladluis	Kloon	Klassieke Ref	NAK schaduw	Nieuwe REF						Gemiddeld	Hoogste	Voorgestelde REF
				603	752	NTN-F	NTN-D	Wilga-F	Wilga-D			
<i>Myzus persicae</i>	Mp2(controle)	1.00	1.00	1(36%)	1(38%)	1(38%)	1(34%)	1(34%)	1(46%)			1.00
<i>Myzus persicae</i>	307-1			1.12	1.29	1.63	1.29	1.00	0.93	1.21	1.63	
<i>Myzus persicae</i>	307-2			1.09	0.91	1.00	1.13	0.89	0.78	0.97	1.13	
<i>Myzus persicae</i>	307-3			0.88	0.86	1.00	1.04	2.00	0.85	1.11	2.00	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	groen			0.08	0.00	0.05	0.12	0.12	0.26	0.11	0.26	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	rood-oud			0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.05	0.02	0.05	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	rood-nieuw			0.17	0.33	0.11	0.00	0.00	0.19	0.13	0.33	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Gemiddeld	0.05	0.15	0.08	0.13	0.05	0.04	0.04	0.17	0.09	0.21	0.10
<i>Aphis fabae</i>	oud			0.10	0.04	0.00	0.21	0.06	0.51	0.15	0.51	
<i>Aphis fabae</i>	nieuw 405-1			0.00	0.08	0.00	0.04	0.00	0.05	0.03	0.08	
<i>Aphis fabae</i>	nieuw-405-2			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.01	0.08	
<i>Aphis fabae</i>	Gemiddeld	0.10	0.10	0.03	0.04	0.00	0.08	0.02	0.21	0.07	0.22	0.10
<i>Aphis frangulae/gossipii</i>	DDR			0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.07	0.03	0.08	
<i>Aphis frangulae</i>	3108			0.54	0.25	0.13	0.18	0.14	0.20	0.24	0.54	
<i>Aphis frangulae</i>	Gemiddeld	0.42	0.40	0.27	0.13	0.11	0.09	0.07	0.14	0.13	0.31	0.40 *
<i>Aphis nasturtii</i>	oud			0.75	0.25	0.25	0.61	1.59	0.69	0.69	1.59	
<i>Aphis nasturtii</i>	nieuw 2305-1			0.50	0.58	0.00	1.15	0.59	0.67	0.58	1.15	
<i>Aphis nasturtii</i>	nieuw 1108-1			0.15	1.00	0.08	1.00	0.10	0.67	0.50	1.00	
<i>Aphis nasturtii</i>	Gemiddeld	0.42	0.40	0.47	0.61	0.11	0.92	0.76	0.68	0.59	1.25	0.60
<i>Aulacorthum solani</i>	oud			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Aulacorthum solani</i>	108			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Aulacorthum solani</i>	14508			0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.07	
<i>Aulacorthum solani</i>	Gemiddeld	x		0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01
<i>Brachycaudus helichrysi</i>												
<i>Brachycaudus helichrysi</i>												
<i>Brachycaudus helichrysi</i>												
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	Gemiddeld	0.01	0.25									0.01
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	2305-1			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	208-1			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	2305-3			0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.01	0.06	
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Gemiddeld	0.10	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.02	0.01
<i>Metopolophium dirhodum</i>	oud			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Metopolophium dirhodum</i>	nieuw 3-12			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Metopolophium dirhodum</i>	8508			0.06	0.00	0.00	0.00	0.90	0.07	0.02	0.07	
<i>Metopolophium dirhodum</i>	Gemiddeld	0.01	0.10	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.02	0.01
<i>Myzus ascalonicus</i>	7408			0.03	0.00	0.04	0.00	0.00	0.07	0.02	0.07	
<i>Myzus ascalonicus</i>	10408			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Myzus ascalonicus</i>	8308			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Myzus ascalonicus</i>	Gemiddeld	x		0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.02	0.01	0.02	0.01
<i>Myzus certus</i>												
<i>Myzus certus</i>												
<i>Myzus certus</i>												
<i>Myzus certus</i>	Gemiddeld	0.44	0.50									0.44
<i>Phorodon humuli</i>	1708			0.15	0.43	0.14	0.12	0.08	0.15	0.18	0.43	
<i>Phorodon humuli</i>	9608			0.27	0.14	0.07	0.07	0.12	0.15	0.14	0.27	
<i>Phorodon humuli</i>	2708			0.23	0.50	0.22	0.53	0.94	0.48	0.48	0.94	
<i>Phorodon humuli</i>	Gemiddeld	0.15	0.25	0.22	0.36	0.14	0.24	0.38	0.26	0.27	0.55	0.45
<i>Rhopalosiphum padi</i>	oud			0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.05	
<i>Rhopalosiphum padi</i>	nieuw			0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.08	0.03	0.08	
<i>Rhopalosiphum padi</i>	DDR			0.00	0.00	0.05	0.00	0.05	0.04	0.02	0.05	
<i>Rhopalosiphum padi</i>	Gemiddeld	0.03	0.20	0.00	0.02	0.02	0.00	0.04	0.04	0.02	0.06	0.03
<i>Rhopalosiphum insertum</i>												
<i>Rhopalosiphum insertum</i>												
<i>Rhopalosiphum insertum</i>												
<i>Rhopalosiphum insertum</i>	Gemiddeld	0.03	0.20									0.03
<i>Sitobion avenae</i>	oud			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Sitobion avenae</i>	nieuw			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Sitobion avenae</i>	nieuw 605-2			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Sitobion avenae</i>	Gemiddeld	x		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Andere soorten												
<i>Schizaphis graminum</i>	oud	x		0.00	0.05	0.00	0.10	0.00	0.00	0.03	0.10	0.05
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	30608			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	140708			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	60708			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	Gemiddeld	x		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Aphis spp</i>	Wikke	x		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Aphis spp</i>	A. craccivora	x		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Aphis spp</i>	Paardebloem	x		0.04	0.09	0.00	0.21	0.22	0.30	0.14	0.30	
<i>Aphis spp</i>	Gemiddeld	x		0.01	0.03	0.00	0.07	0.07	0.10	0.05	0.10	0.05
<i>Brevicoryne brassicae</i>	DDR	x		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Brevicoryne brassicae</i>	Warmenhuizen	x		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Brevicoryne brassicae</i>	Valthermond	x		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Brevicoryne brassicae</i>	Gemiddeld	x		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Cavariella aegopodii</i>	Annette	x		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

* toelichting op *Aphis frangulae*: de eerste kloon (afkomstig uit Duitsland) waarschijnlijk meer *Aphis gossipii*, de tweede kloon echt *A. frangulae*

Bijlage III. Voorgestelde nieuwe REF-waarden

Bladluis	Klassieke Ref	NAK schaduw	Voorgestelde REF
<i>Myzus persicae</i>	1.00	1.00	1.00
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0.05	0.15	0.10
<i>Aphis fabae</i>	0.10	0.10	0.10
<i>Aphis frangulae</i>	0.42	0.40	0.40
<i>Aphis nasturtii</i>	0.42	0.40	0.60
<i>Aulacorthum solani</i>	x		0.01
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	0.01	0.25	0.01
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	0.10	0.20	0.01
<i>Metopolophium dirhodum</i>	0.01	0.10	0.01
<i>Myzus ascalonicus</i>	x		0.01
<i>Myzus certus</i>	0.44	0.50	0.44
<i>Phorodon humuli</i>	0.15	0.25	0.45
<i>Rhopalosiphum padi</i>	0.03	0.20	0.03
<i>Rhopalosiphum insertum</i>	0.03	0.20	0.03
<i>Sitobion avenae</i>	x		0.00
<i>Schizaphis graminum</i>	x		0.05
<i>Hyperomyzus lactucae</i>	x		0.00
<i>Aphis spp</i>	x		0.05
<i>Brevicoryne brassicae</i>	x		0.00
<i>Cavariella aegopodii</i>	x		0.00

	REF waarde verandert niet
	REF waarde verhoogd
	REF waarde verlaagd
	REF waarde nog niet (geheel) experimenteel bepaald