

De ontwikkeling van een detectiemethode en een inoculatiemethode voor de veroorzaker van freesiabladnecrose en de toepassingen ervan in de praktijk



Fase 1 en 2

Martin Verbeek
Johan Lindner
René van der Vlugt

Eindrapport 12 juli 2006

Fase 3

E.T.M. Meekes
J.J.P. Kerkvliet
R. Butôt

Eindrapport 14 december 2006

Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	1
Fase 1 en 2 Plant Research International	2
1. Inleiding	2
2. Freesiabladnecrose isolaten en instandhouding	3
3. Mechanische overdracht naar alternatieve waardplanten	3
4. Instandhouding van het geïsoleerde virus buiten freesia	4
5. Zuivering van een ophiovirus	5
6. Productie van een antiserum tegen het gezuiverde ophiovirus	6
7. Toetsing van het antiserum onder praktijkomstandigheden	7
8. Mechanische inoculatie van het geïsoleerde ophiovirus naar freesia	7
9. Inoculatie met behulp van Olpidium brassicae	8
10. Discussie en aanbevelingen	10
Fase 3 Naktuinbouw	12
11. Inleiding	12
12. Toetsmethode	13
12.1 Validatie	13
12.1.1 Specificiteit	13
12.1.2 Gevoeligheid	14
12.2 Aantoonbaarheid in verschillende delen van de plant	15
12.3 Conclusie	15
13. Survey's	16
14. Japan opplant	16
14.1 Selectie interessante partijen	16
14.2 Volgen van partijen door de tijd	18
14.2.1 Toetsing vooraf	18
14.2.2 Preparatie, knollen- en kralentoets	19
14.2.3 Opplanten en toetsing	20
14.3 Conclusies Japan Opplant	21
15. Bemonstering in praktijkmateriaal met symptomen	22
16. Toetsen materiaal met en zonder symptomen	25
17. FOV in symptoomloos materiaal	27
18. Volgen licht besmette partijen	30
19. Toetsing van Select Plant® freesia materiaal	30
20. Discussie	33
21. Suggesties voor vervolgonderzoek	35
22. Literatuur	36

Fase 1 en 2 Plant Research International

1. Inleiding

In opdracht van Naktuinbouw heeft Plant Research International BV (PRI) onderzoek uitgevoerd aan bladnecrose in freesia in de periode 2003-2006.

De doelstelling van dit onderzoek, zoals omschreven in de offerte/projectbeschrijving van 25 februari 2003, was het ontwikkelen van een detectiemethode voor freesiabladnecrose. Daarnaast zou geprobeerd worden een inoculatiemethode te ontwikkelen die geschikt is om freesia te infecteren met het agens dat freesiabladnecrose veroorzaakt.

Het vermoeden bestaat dat freesiabladnecrose (FBN) wordt veroorzaakt door een virus behorende tot het virusgenus *Ophiovirus*. Ophiovirussen worden door de schimmel *Olpidium brassicae* overgedragen.

Recent is aangetoond dat in freesia met bladnecrosesymptomen een positief signaal kon worden verkregen m.b.v. PCR door gebruik te maken van gedegenereerde primers, gebaseerd op de nucleotide sequentie van het *Ranunculus white mottle virus*, een ophiovirus (Vaira *et al.*, 2003). Echter isolatie van het FBN veroorzakende virus en teruginoculatie ervan naar freesia is tot op heden niet beschreven.

Bij Plant Research International BV is inmiddels een grote expertise op het gebied van ophiovirussen aanwezig, met name met *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV), de veroorzaker van slabobbelblad (van der Wilk *et al.*, 2002). Anticiperend op het vermoeden dat FBN door een ophiovirus zou kunnen worden veroorzaakt, werden er mogelijkheden gezien om deze ziekte nader te bestuderen en detectiemethoden ervoor te ontwikkelen.

In het tussentijds rapport (september 2003) zijn de onderzoeksresultaten weergegeven die behaald zijn in de periode november 2002 – september 2003. In de daarop volgende periode (november 2003 tot april 2006) is door verhuizingen van kassen het onderzoeksmateriaal besmet geraakt met andere virussen en geheel verloren gegaan. Hoewel de middelen al geheel waren uitgeput, zijn in het afgelopen jaar toch experimenten opgezet om het tweede deel van het onderzoek, de ontwikkeling van een inoculatiemethode voor het gevonden freesia ophiovirus, uit te voeren.

2. Freesiabladnecrose isolaten en instandhouding

Via Naktuinbouw werden isolaten van FBN verkregen in de rassen Blue Moon, White Wings, Lydia en Elegance. Bij het freesiabedrijf van dhr. S. v.d. Kammen te Rossum werden een aantal planten verkregen van het ras Elysee, welke waren geïnfecteerd met FBN en freesiamozaïekvirus. Knollen werden batchgewijs bij Naktuinbouw geprepareerd, zodat elke drie maanden een nieuwe partij bij PRI kon worden gepoot.

3. Mechanische overdracht naar alternatieve waardplanten

Voor de mechanische overdracht van FBN naar alternatieve waardplanten werd uitgegaan van de inoculatiemethode voor *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV), welke door PRI werd ontwikkeld. Hierbij wordt geïnfecteerd bladmateriaal vermalen in ijskoude inoculatiebuffer (0.1M HEPES, pH 7.8 met 20mM Na₂SO₃, 10mM Na-DIECA en 5 mM Na-EDTA).

Wanneer freesia als bronplant werd gebruikt was het noodzakelijk om 2% Norit aan de inoculatiebuffer toe te voegen teneinde ernstige bladbeschadiging bij de toetsplanten te voorkomen.

In de inoculatie-experimenten werd gekozen voor de volgende alternatieve waardplanten (bekende 'lokale lesie'-planten zijn buiten beschouwing gelaten):

Nicotiana benthamiana ;

N. occidentalis 'P1';

N. occidentalis '37B';

N. hesperis '67A';

N. tabacum 'White Burley';

N. rustica ;

N. clevelandii ;

N. glutinosa.

Deze toetsplanten werden geïnoculeerd met de aanwezige isolaten van FBN, met bladmateriaal van verschillende ouderdom, met en zonder bladnecrosesymptomen.

Alleen *N. occidentalis* 'P1' en *N. hesperis* '67A' vertoonden duidelijke symptomen na inoculatie en alleen bij de isolaten uit 'Blue Moon' en 'Lydia'. Het bleek belangrijk dat het bronmateriaal van freesia duidelijke

bladnecrosesyndromen heeft om als inoculum te voldoen. Deze inoculatiresultaten komen overeen met een eerder beschreven waardplantenreeks voor FBN (Bouwen, 1994). De symptomen op 'P1' en '67A' bestonden uit lokale lesies (chlorotische vlekken, later vernecrotiserend tot bruine kringen of vlekken) en vertoonden gelijkenis met de symptomen van MLBVV op deze toetsplanten. Echter een groot verschil met MLBVV was dat de symptomen van FBN lokaal bleven en niet systemisch werden. Hierdoor bleef de virusconcentratie in de alternatieve waardplanten erg laag en konden de verkregen bladnecrose-isolaten aanvankelijk niet in deze waardplanten in stand worden gehouden.

4. Instandhouding van het geïsoleerde virus buiten freesia

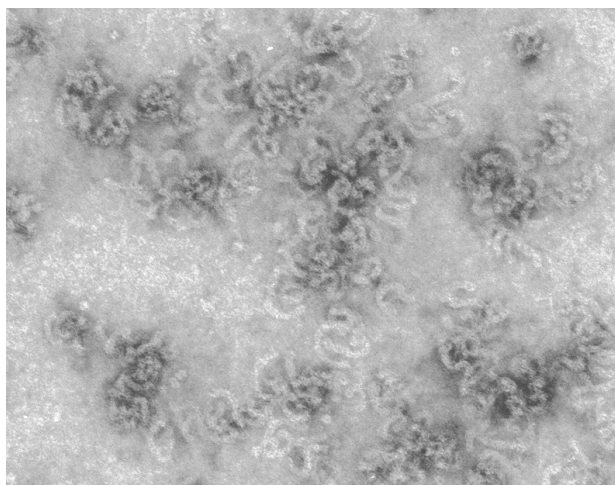
Door herhaaldelijk lokale lesies uit te ponsen en te inoculeren op dezelfde alternatieve waardplant als de bronplanten werd een poging ondernomen om het virus aan de betreffende plant te laten 'wennen'. Aanvankelijk ging dat erg moeizaam en bleef het aantal lokale lesies die in de geïnoculeerde plant ontstonden beperkt. Echter na verloop van tijd nam het aantal lokale lesies toe, een indicatie dat de virusconcentratie hoger werd in de betreffende toetsplanten. Na 5 tot 6 overzettingen (telkens 2-3 weken na inoculatie) werden de eerste systemische symptomen waargenomen; chlorotische vlekken die later vernecrotiseren (figuur 1). Inoculatie vanuit systemisch geïnfecteerde bladeren resulteerde in veel meer lokale lesies in de toetsplanten, hetgeen een indicatie is voor een hogere virusconcentratie in het systemisch geïnfecteerde blad. Het percentage systemisch geïnfecteerde planten nam geleidelijk aan toe tot nagenoeg 100%. Op deze manier werden twee isolaten buiten freesia in stand gehouden: 'Blue Moon' en 'Lydia'.



Figuur 1 - Systemische symptomen van isolaat 'Blue Moon' in *N. occidentalis* 'P1'.

5. Zuivering van een ophiovirus

Na aannahme dat bij FBN een ophiovirus in het spel is, werd geprobeerd een aan FBN gerelateerd agens te zuiveren m.b.v. een zuiveringsprotocol dat door PRI werd ontwikkeld voor de zuivering van MLBVV. Omdat er eerst alleen lokale lesies verschenen in de toetsplanten zijn de eerste pogingen ondernomen met lokaal geïnfekteerde bladeren. Uit dit materiaal kon echter geen virus worden gezuiverd. Toen later voldoende systemisch geïnfekteerde bladeren voorhanden waren, bleek de zuiveringsmethode succesvol. Er werd een viruspreparaat gezuiverd uit planten geïnfecteerd met isolaat 'Blue Moon'. Na bestudering van het gezuiverde virus in de elektronenmicroscopie kon worden vastgesteld dat het gezuiverde virus behoorde tot het genus *Ophiovirus*. Dit virus heeft heel karakteristieke virusdeeltjes: dunne draadjes van ongeveer 3 nm dik, die ineengedraaid zijn tot draadjes van ongeveer 10 nm dikte. Deze draadjes zijn onregelmatig ineengestremeld en zijn van verschillende lengte (figuur 2). Door hun slangachtige uiterlijk heeft dit genus de naam Ophiovirus gekregen (*ophius* = slang). Voorlopig hebben we dit virus *Freesia ophiovirus* (FOV) genoemd.

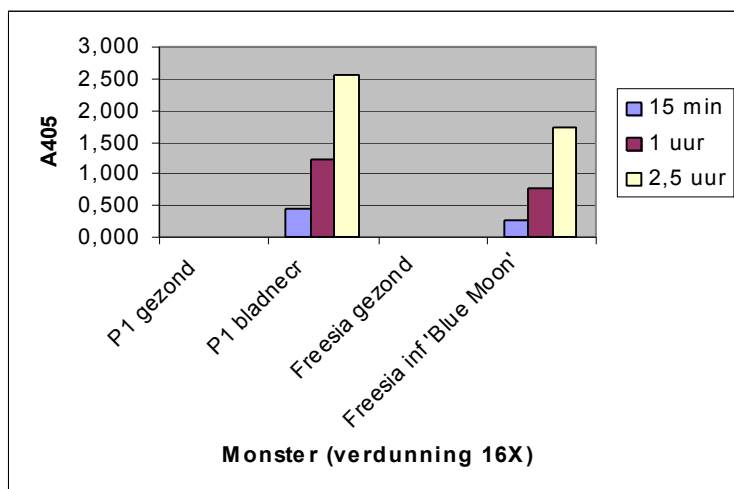


Figuur 2 - Elektronenmicroscopische opname van ophiovirusdeeltjes gezuiverd uit 'P1' met isolaat 'Blue

6. Productie van een antiserum tegen het gezuiverde ophiovirus

Voor de productie van een antiserum zijn de gezuiverde fracties van vier zuiveringen gepooled (uitgangsmateriaal totaal 400 gram *N. occidentalis* 'P1' en *N. hesperis* '67A'). M.b.v. een coomassieplus eiwitbepaling is de totale hoeveelheid eiwit vastgesteld: 105 µg. Deze hoeveelheid virus is verdeeld over drie injecties, die met een interval van twee weken in een konijn subcutaan werden ingespoten. Bij het inspuiten van de derde injectie is tevens een kleine hoeveelheid bloed afgenomen (vier weken na de eerste injectie). Deze testbloeding is opgewerkt tot een coating en conjugaat en getest in ELISA op gezond en ziek materiaal van *N. occidentalis* 'P1' en freesia (gezonde freesia zaailingen en zieke 'Blue Moon').

Hieruit bleek dat het antiserum goed reageert op ziek materiaal en dat er nagenoeg geen achtergrondreactie is (ook bij lage verdunningen van het plantensap). Absorptiewaarden na 1 uur substraatincubatie waren voor 'P1' ziek 1.230 en gezond 0.007 (ratio ziek: gezond = 175 : 1) en voor freesia ziek 0.774 en gezond 0.005 (ratio ziek : gezond = 154 : 1) (Zie figuur 3).



Figuur 3 - Staafdiagram ELISA op FBN geïnfecteerd materiaal met het antiserum tegen het geïsoleerde ophiovirus. Sapverdunningen van 2x tot 64x werden getest, weergegeven is de sapverdunning van 16x bij drie perioden van substraatincubatie.

Om de verdeling van het virus te bestuderen zijn in ELISA verschillende delen van freesiaplant 'Blue Moon' getoetst: blad, bloemstengel, bloemblaadjes, knollen en kralen. In al dit uitgangsmateriaal kon FOV met ELISA worden aangetoond.

7. Toetsing van het antiserum onder praktijkomstandigheden

Het verkregen antiserum is volgens de condities van Prime Diagnostics, Wageningen, opgewerkt tot een standaard coating en conjugaat voor DAS-ELISA. Dit antiserum is bij Naktuinbouw getest onder praktijkomstandigheden. Hierbij zijn een groot aantal praktijkmonsters getoetst. Over het algemeen kon in partijen met bladnecrose m.b.v. de nieuw ontwikkelde ELISA het Freesia ophiovirus (FOV) worden aangetoond. Voor de resultaten van het onderzoek op Naktuinbouw wordt verwezen naar de verslagen van E. Meekes, Naktuinbouw.

8. Mechanische inoculatie van het geïsoleerde ophiovirus naar freesia

Om vast te stellen of het geïsoleerde ophiovirus werkelijk de veroorzaker is van FBN zullen volgens de 'postulaten van Koch' teruginoculaties naar freesia moeten worden uitgevoerd. De voorkeur gaat dan uit naar mechanische inoculatie van het geïsoleerde virus, omdat zo invloeden van de vector en eventueel andere betrokken virussen kunnen worden uitgesloten.

In de inoculatie-experimenten is uitgegaan van de methode zoals beschreven op blz. 3. Infectieus sap werd verkregen door systemisch geïnfecteerde bladeren van *N. occidentalis* 'P1' of *N. hesperis* '67A' te vermalen in koude buffer. Tevens werden enkele experimenten uitgevoerd met gedeeltelijk gezuiverd virus.

Het virus werd geïnoculeerd op freesiazaailingen, ter beschikking gesteld door Wülfinghoff Freesia BV (Rijswijk ZH). Een groot deel van deze zaailingen werd getoetst m.b.v. ELISA op FOV. De zaailingen waren altijd negatief. Van de andere zaailingen werd daarom aangenomen dat ze virusvrij waren.

Ongeveer 1 maand na zaaien waren de planten groot genoeg om te inoculeren.

Voor inoculatie werden de freesiaplantjes 2 dagen in het donker gezet. Deze methode wordt bij moeilijk inoculeerbare gewassen toegepast om deze vatbaarder te maken. Na inoculatie werden de planten nogmaals 2 dagen in het donker gezet en daarna nogmaals geïnoculeerd.

In totaal werden ongeveer 400 freesiazaailingen geïnoculeerd. Geen van de geïnoculeerde planten vertoonde typische necrose symptomen of gaven een reactie in ELISA met het antiserum tegen FOV. Helaas kon op deze manier niet worden vastgesteld of het gevonden virus de veroorzaker is van freesiabladnecrose. Geconcludeerd kan worden dat mechanische inoculatie geen mogelijkheden biedt voor een resistentietoets.

9. Inoculatie met behulp van *Olpidium brassicae*

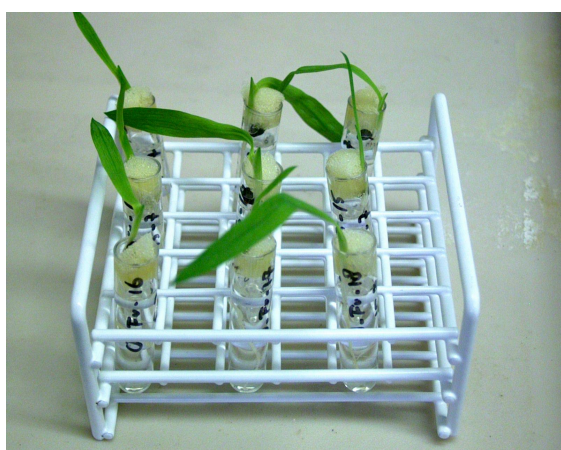
Omdat mechanische inoculatie geen oplossing leek te bieden is geprobeerd om een zuiver isolaat te verkrijgen van de vector van de ziekte: *Olpidium brassicae*.

Via Naktuinbouw (L. van Leeuwen) zijn een drietal gronden verkregen van freesiabedrijven waar freesiabladv necrose voorkomt. De gronden zijn afkomstig uit Helenaveen, Blitterswijk en Horst. Op deze gronden zijn zowel freesia's als enkele tabaksoorten gezaaid.

De planten zijn d.m.v. ELISA gevolgd op infectie met FOV. Alleen in de grond afkomstig uit Horst vond infectie plaats en kon het ophiovirus in de freesia's, vier maanden na zaaien, worden aangetoond. In de wortels van de freesia's konden door microscopische analyse rustsporen van *Olpidium* worden gevonden. In de tabaksplanten, die op dezelfde grond waren gezaaid, kon echter geen *Olpidium* worden gevonden. Dit is een aanwijzing voor de waardplantspecificiteit van deze schimmel.

In het onderzoek met slabobbelblad zijn goede resultaten geboekt met het inoculeren van planten in watercultuur. Besloten werd eenzelfde systeem uit te proberen voor freesia.

Vanuit een wortel van een freesiazaailing, met FOV geïnfecteerd op de grond uit Horst, werden kleine stukjes gesneden die slechts één of enkele rustsporen bevatten. In totaal werden zo 18 stukjes geïsoleerd en afzonderlijk in een buisje met substraatoplossing gedaan. Per buisje werd gedurende twee dagen een freesiazaailing gezet (zie figuur 4) en daarna werden deze planten opgepot. Deze planten werden visueel en m.b.v. ELISA gevolgd op infectie met FOV.



Figuur 4 - Inoculatie van freesiazaailingen m.b.v. *Olpidium* rustsporen

Vier maanden na oppotten kon met ELISA in één plant het ophiovirus worden aangetoond. Deze plant vertoonde ook symptomen, al waren deze anders dan de typische bladnecrose-symptomen. De symptomen bestaan uit onregelmatige, witte papierachtige vlekjes (figuur 5). Op het eerste gezicht doen de symptomen denken aan een aantasting met trips, maar de kenmerkende zwarte stipjes van de uitwerpselen van trips ontbreken in dit geval.



*Figuur 5 - symptomen op freesia van een met *Olpidium brassicae* overgebracht isolaat van *freesia ophiovirus**

Enkele wortels van deze geïnfekteerde plant zijn microscopisch onderzocht op het voorkomen van rustsporen, maar deze werden niet gevonden. Andere wortels van deze plant zijn gebruikt voor een verdere inoculatieproef in watercultuur, maar dit bleek niet succesvol.

10. Discussie en aanbevelingen

Uit freesia met freesiabladnecrose is succesvol een ophiovirus geïsoleerd, voorlopig genoemd Freesia ophiovirus (FOV). Voor dit virus is een zuiveringsmethode ontwikkeld en een antiserum geproduceerd. Het antiserum reageert zeer goed met het geïsoleerde virus en met plantmateriaal waaruit het virus was geïsoleerd. Ook praktijkmateriaal met freesiabladnecrose reageert over het algemeen zeer goed met het antiserum in ELISA (resultaten Naktuinbouw). Gezond freesiamateriaal geeft in ELISA geen achtergrondreactie. De ontwikkelde ELISA bleek niet alleen goed te voldoen voor bladmateriaal, maar was ook bruikbaar voor knollen, kralen, bloemstengels en bloemen.

Het gevonden freesia ophiovirus kon niet mechanisch worden overgebracht vanuit toetsplanten naar freesiazaailingen. Het virus had zich wellicht al te veel aangepast aan de tabaksplanten waarin het virus was vermeerderd. Het virus rechtstreeks uit zieke freesia inoculeren is geen oplossing, omdat niet vaststaat dat in zieke freesia een zuiver isolaat van het ophiovirus aanwezig is.

Een poging om via *Olpidium* sporen gezonde freesiazaailingen te infecteren was in één plant succesvol. Deze plant kon met een klein stukje wortel van een zieke plant, dat slechts enkele rustsporen bevatte, worden geïnfecteerd met FOV, dat later met ELISA kon worden aangetoond. Opvallend waren de symptomen die deze plant had: droge witte vlekjes, lijkend op een tripsaantasting. Ook in de praktijk worden deze symptomen wel waargenomen en kan FOV in dit soort planten worden aangetoond (persoonlijke communicatie E. Meekes). Of dit afwijkende symptoom te wijten is aan het genotype van de geïnfecteerde freesiazaailing is nu nog niet te zeggen. Hiervoor zullen meerdere planten met FOV geïnoculeerd moeten worden. Helaas kon het *Olpidium*-isolaat niet meer in de zieke plant worden teruggevonden en doorgezet.

Een andere mogelijkheid is dat FOV wanneer het alleen in een plant voorkomt dit soort symptomen veroorzaakt. Er zou dan een ander virus in het spel kunnen zijn wanneer het om freesiabladnecrose gaat. Bij andere ziekten die door Ophiovirussen worden veroorzaakt is vaak een ander, ook door *Olpidium* overgebracht virus betrokken. Deze andere virussen behoren tot het genus *Varicosavirus*, een staafvormig virus. Deze varicosavirussen spelen een nog onbekend rol in de ontwikkeling van de ziekte (Lot *et al.*, 2002). Ook in freesia zijn een enkele keer deeltjes van varicosavirussen waargenomen. Het is zeer waarschijnlijk dat ook in FBN een varicosavirus een rol speelt.

Aan het eind van dit project ligt er een goede detectiemethode voor het gevonden ophiovirus. In de praktijk lijkt er een goede correlatie te zijn tussen de ziekte bladnecrose en de aanwezigheid van FOV in de aangetaste planten. Toch is er nog verder onderzoek nodig om de 'postulaten van Koch' voor dit virus bewezen te krijgen. De precieze rol van FOV in de ziekte is nog niet bekend. Er zijn aanwijzingen dat er nog een ander virus (wellicht varicosvirus) bij de ziekte is betrokken.

Ook de ontwikkeling van een inoculatiemethode vraagt meer onderzoek. Het is gebleken dat een mechanische inoculatie van freesia zeer moeilijk, wellicht onmogelijk, is. Een volgend onderzoek zou zich kunnen richten op het maken van zogenaamde 'single spore isolates' van freesia infecterende Olpidium. Deze 'single spore isolates' zullen waarschijnlijk slechts één virus overbrengen, waardoor een betrouwbare toets ontstaat en hopelijk ook de rol van de eventueel betrokken virussen bestudeerd kan worden. Daarnaast zou het vervolgonderzoek zich moeten richten op het ontwikkelen van de condities voor een betrouwbare grootschalige toets.

Fase 3 Naktuinbouw

11. Inleiding

Bladnecrose van freesia is een ernstige ziekte waarvoor ondanks veel onderzoeks-inspanningen nog geen afdoende oplossing is gevonden. Uit de toename van het percentage afkeuringen van freesiateeltmateriaal blijkt dat de laatste jaren het probleem relatief gezien steeds groter wordt. Door een betere hygiëne, beter uitgangsmateriaal en een effectieve luisbestrijding is freesiemozaïekvirus beter beheersbaar geworden, maar wordt het probleem met freesiabladnecrose relatief groter.

Er is dringend behoefte aan een goede detectiemethode voor het agens dat freesiabladnecrose veroorzaakt. Met een goede detectiemethode kunnen gezonde gewassen worden herkend, kan er worden gewerkt aan resistentieveredeling en aan de ontwikkeling van schone vermeerderingssystemen. Daarnaast geeft een detectiemethode inzicht in de freesiabladnecrosestatus van een partij Freesia.

Onderzoek van Bouwen (pers. mededeling) en Milne (2002) leverden sterke aanwijzingen dat freesiabladnecrose niet, zoals eerder werd verondersteld door o.a. Bouwen (1994), wordt veroorzaakt door een varicosavirus maar door een 'ophiovirus-like particle'. Dit virus wordt voorlopig aangeduid met freesia ophiovirus (FOV).

Het onderzoek dat in dit project is uitgevoerd valt uiteen in drie delen;

1. de productie van een detectiemethode voor de veroorzaker van freesiabladnecrose,
2. de ontwikkeling van een inoculatiemethode
3. het toetsen van de mogelijkheden van de detectiemethode in de praktijk en de inzet ervan in surveys en in programma's om te komen tot freesiabladnecrose-vrij uitgangsmateriaal voor de freesiateelt.

Delen 1. en 2., uitgevoerd door Plant Research International, zijn ondertussen afgerond evenals de verslaglegging hierover (Verbeek *et al.*, 2006). Onderstaand rapport geeft weer hoe de detectiemethode die bij Plant Research International is ontwikkeld kan worden ingezet in de praktijk en resultaten van verschillende survey's die met behulp van deze detectiemethode zijn uitgevoerd.

12. Toetsmethode

In deel 1 van het onderzoek is door Plant Research International een antiserum ontwikkeld tegen de vermoedelijke veroorzaker van freesiabladnecrose namelijk het freesia ophiovirus.

Dit antiserum is aan Naktuinbouw geleverd voor het derde deel van het onderzoek: het implementeren van de detectiemethode en de toepassing ervan in surveys, keuringen en beheersingsstrategieën.

Voordat surveys met deze toets worden uitgevoerd, moet worden nagegaan of het antiserum ook in een routinesetting toepasbaar is.

12.1 Validatie

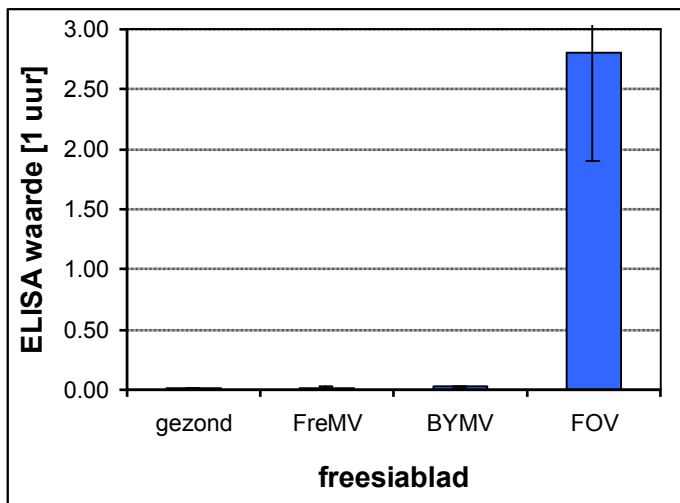
Het principe van ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) is dat het antiserum zich specifiek bindt aan het virus waartegen het ontwikkeld is. Als het virus aanwezig is zal er een kleuring plaatsvinden.

Deze kleuring is met het oog waar te nemen, maar kan ook gemeten worden m.b.v. een fotospectrometer. Afhankelijk van materialen, apparatuur en periode tussen toevoegen kleurstof en tijdstip van meting zal deze waarde variëren. Om een idee te geven van de gemeten waarden: in de toets zoals deze wordt uitgevoerd bij Naktuinbouw varieerden de waarde tussen 0,015 (geen kleuring) tot 3,999 (zeer intense kleuring). Metingen vinden plaats 1 uur na toevoeging van de kleurstof (substraat).

Voor grootschalige toepassing van het antiserum is van belang dat de toets in een routinematige setting goed kan draaien. Criteria als specificiteit en gevoeligheid spelen hierbij een rol.

12.1.1 Specificiteit

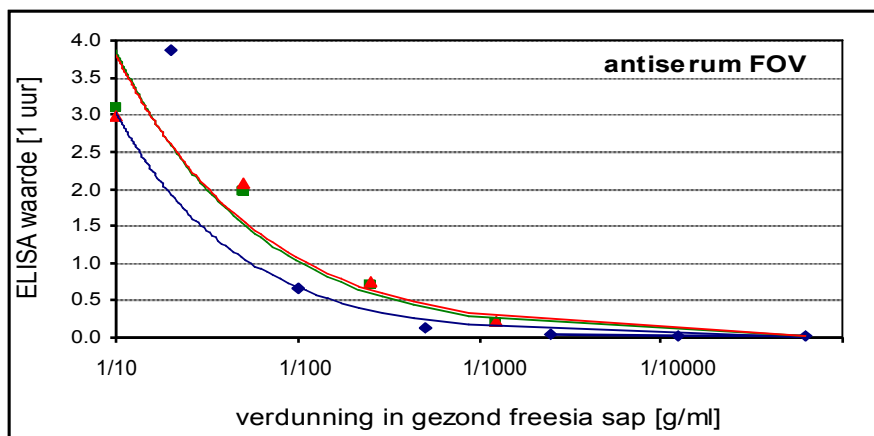
Het is belangrijk dat de toets alleen reageert op het virus waarvoor de toets bedoeld is en geen "vals positief" mag geven. Dit betekent dat de toets niet mag reageren met gezond freesiamateriaal, maar ook niet mag reageren op andere in freesia voorkomende virussen, zoals freesiamozaïekvirus (FreMV) en bonenscherpmozaïekvirus (BYMV). Dit blijkt niet het geval (figuur 7).



Figuur 6 - ELISA waarden van gezond freesiablاد, freesiablاد besmet met freesiamozaïekvirus (FreMV), bonenscherpmozaïekvirus (BYMV) of freesia ophiovirus (FOV); waarden gemeten na 1 uur.

12.1.2 Gevoeligheid

Daarnaast is het belangrijk dat de toets gevoelig genoeg is. Dit wil zeggen dat het virus kan worden aangetoond in de concentraties waarin het van nature voorkomt. Dit is uitgevoerd met materiaal dat FOV bevat en gezond materiaal (aangeleverd door Plant Research International) dat in verschillende verhoudingen met elkaar gemengd is. Deze toets is enkele keren herhaald, de resultaten zijn te vinden in figuur 7. Hieruit blijkt dat het virus bij grote verdunningen (1:1000 g/ml) nog steeds aantoonbaar is.



Figuur 7 - ELISA waarden bij toetsing van freesiablاد besmet met FOV verdund in sap gezonde freesia; herhaling in tijd, waarden gemeten na 1 uur; verschillende kleuren betreffen verschillende herhalingen.

12.2 Aantoonbaarheid in verschillende delen van de plant

Uit bovenstaande gegevens komt naar voren dat FOV in blad goed aantoonbaar is. Ook voor steelmateriaal en bijvoorbeeld de hoofdkam geldt dat het virus in deze delen van de plant goed aantoonbaar is. Het materiaal van de stengel en de kop zijn echter minder makkelijk te verwerken met een plantenpers dan bladmateriaal, vanwege hun grotere de dikte. In de loop van dit project zijn daarom altijd bladmonsters genomen, dit maakt het vergelijkbaar met de routinematige toetsingen die gedaan worden voor FreMV en BYMV en omdat blad ook altijd aanwezig is in tegenstelling tot steel en bloemmateriaal.

Bij toetsing op verschillend tijdstippen bleek dat een besmetting met FOV in heel jong materiaal – net een enkel blad boven de grond – kan worden gemist. Dit is een algemeen fenomeen: het virus heeft tijd nodig om zich uit de knol/kraal naar het blad te verspreiden. Monsters van dergelijk jong materiaal worden in de praktijk niet getoetst.

De toetsingen aan knolmateriaal worden behandeld bij het hoofdstuk Japan Opplant “volgen van partijen door de tijd”.

12.3 Conclusie

De toets geeft een duidelijk resultaat: materiaal met FOV wordt goed gedetecteerd met behulp van ELISA. Ook bij sterke verdunningen is het virus aantoonbaar.

Bij het valideren van een toets is het ook belangrijk dat de toets het hele spectrum van het virus afdekt en of de toets het symptoom “freesiablادنecrose” voldoende dekt. Dit zijn twee afzonderlijke vragen, omdat de vraag of FOV de veroorzaker is van freesiablادنecrose nog niet volledig beantwoordt kan worden – directe besmetting van Freesia met FOV is niet gelukt (Verbeek *et al.*, 2006). Op deze vragen wordt in de discussie / conclusie teruggekomen.

13. Survey's

De waarde van de toets zal moeten blijken uit grootschalige toetsingen van praktijkmateriaal. Aan de hand hiervan kan beter worden ingeschat of de toets het volledige spectrum van freesiabladnecrosesymptomen dekt.

Vragen die bij deze toetsing van belang waren zijn:

- Identificeren ziek en gezond materiaal
- Komt in al het materiaal dat freesiabladnecrosesymptomen lijkt te vertonen ook FOV voor?
- Identificeren van interessante partijen, hoe is de verdeling van FOV over deze partijen?
- Komt FOV latent (symptoomloos) voor?

De toetsingen vallen uiteen in:

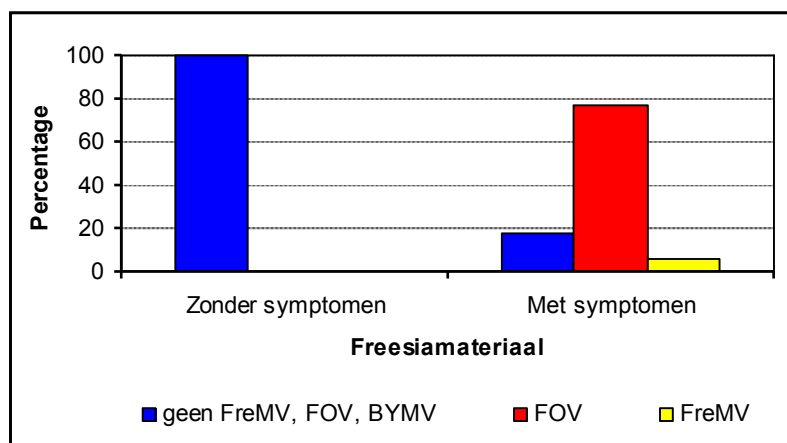
- Japan opplant – eerste verkenning van de toets
- Toetsing van materiaal met symptomen uit de praktijk
- Toetsing van symptoomloos materiaal uit de praktijk
- Toetsing van Naktuinbouw Select Plant® Freesia materiaal

14. Japan opplant

14.1 Selectie interessante partijen

Voor een eerste screening van praktijkmonsters is gebruikt gemaakt van de Japan-opplant. Wanneer materiaal bestemd is voor de Japanse markt worden er steekproefsgewijs 24 knollen/kralen opgeplant bij Naktuinbouw voor nacontrole. Dit materiaal is in het veld driemaal visueel beoordeeld op onder andere het voorkomen van FreMV (virus), BYMV (bloemvirus) en freesiabladnecrosesymptomen (necrose). Verder is het materiaal ook getoetst op FreMV en BYMV. Over dit materiaal is dus veel bekend over de historie, bovendien kon dit materiaal in tijd worden gevolgd.

Bij de eerste toetsingen is gebruik gemaakt van materiaal uit partijen zonder enig symptoom en partijen die bestaan uit zowel planten met symptomen als planten zonder symptomen. Resultaten zijn weergegeven in figuur 6.



Figuur 8 - Percentage monsters met en zonder Freesia Ophiovirus (FOV) en freesiemozaïekvirus (FreMV); totaal 46 toetsingen, materiaal afkomstig uit 27 partijen.

Uit bovenstaande gegevens blijkt dat in dit symptoomloze bladmateriaal géén virus aangetoond kon worden. Dit betreft een beperkte steekproef van 29 monsters uit 26 partijen. In het materiaal dat wel freesiabladnecrosesympptomen vertoont (17 monsters uit 11 partijen) is 75% van het materiaal besmet met FOV (inclusief materiaal met dubbele besmetting FOV - FreMV). In 6% is alleen FreMV aangetoond en in een aantal monsters (18%) is geen virus aangetoond (figuur 8). FOV lijkt niet in alle planten van een partij voor te komen, omdat in planten zonder symptomen uit eenzelfde partij geen FOV kon worden aangetoond, in planten met symptomen wel.

In vervolgoetsingen is alleen gekeken naar partijen met freesiabladnecrosesympptomen. Veertien partijen zijn getoetst op het voorkomen van FOV, FreMV en BYMV, waarbij alleen het materiaal met symptomen is getoetst. Binnen partijen bestaande uit vierentwintig planten varieert het aantal planten met symptomen van één plant tot drieëntwintig planten.

Uit deze toetsing bleek dat in vijf van de veertien partijen FOV werd aangetoond – waarvan enkele dubbelinfecties met FreMV –, in zes partijen alleen FreMV werd gevonden en in drie partijen géén virus werd gevonden. Preparatie van freesiaknollen en –kralen heeft plaatsgevonden bij een relatieve luchtvochtigheid van >75% bij 30°C voor een periode van 3 maanden.

14.2 Volgen van partijen door de tijd

14.2.1 Toetsing vooraf

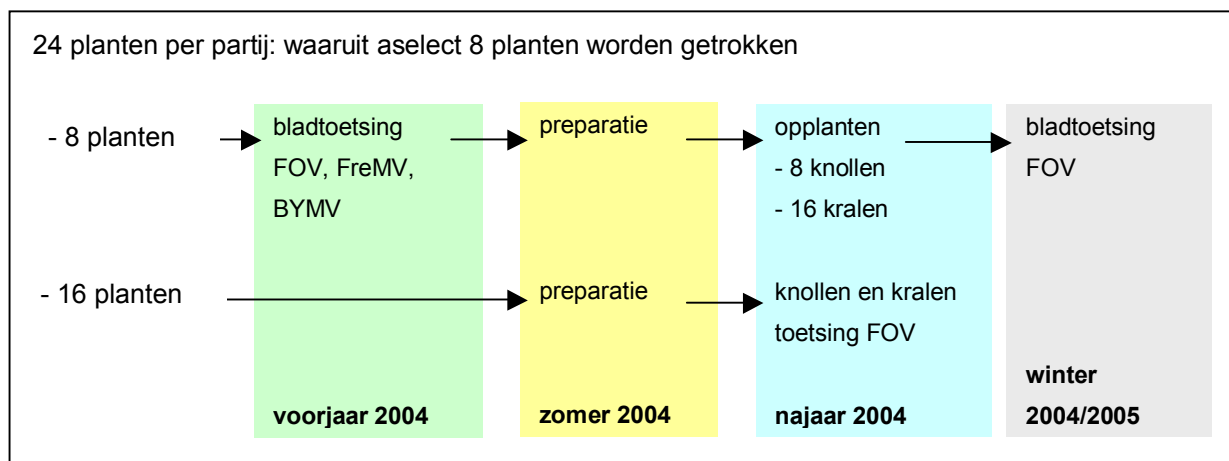
In 2004 zijn acht partijen van de Japan-opplant geselecteerd voor verdere toetsing. De partijen zijn geselecteerd om de volgende redenen (Tabel 1):

- Alle partijen hebben minimaal één plant met freesiabladnecrose-symptomen
- De partijen verschillen in besmettingspercentages
- In sommige partijen is in materiaal met symptomen geen FOV aangetoond.

Partijen worden behandeld volgens het schema in figuur 9.

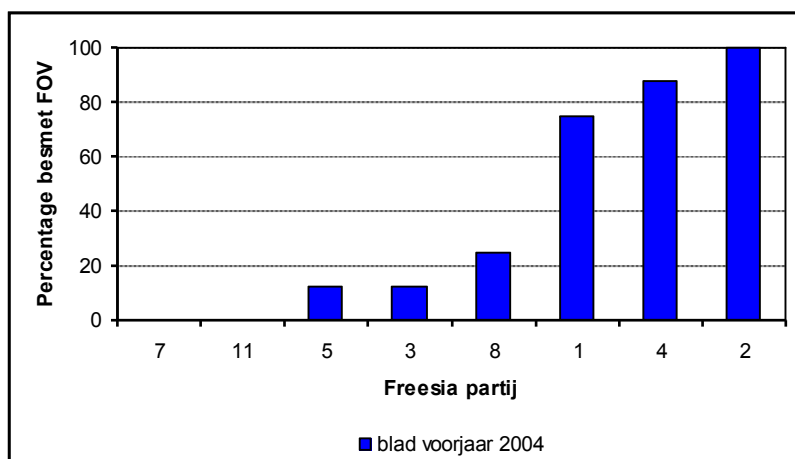
Tabel 1: Gegevens over symptomen en toetsresultaten van acht geselecteerde partijen uit de Japan opplant.

Code	Ras	Voorgeschiedenis: toetsing 1 & 2		Toetsing 8 aselechte planten: toetsing 3		
		Symptomen	FOV	FOV	FreMV	BYMV
1	Alderney	Enkele planten	Ja	6	1	0
2	Côte d' Azur	Veel planten	Ja	8	0	0
3	Pink Sun	Enkele planten	Ja	1	1	0
4	Champagne Richam	Veel planten	Ja, ook FreMV	7	0	0
5	Elegance	Enkele planten	Ja	1	0	0
7	Popeye Vapopey	Alle planten	Nee	0	0	0
8	Versailles Ricaille	meerder planten	Nee	2	0	0
11	Kristie	Enkele planten	ja	0	0	1



Figuur 9 - Overzicht toetsingschema

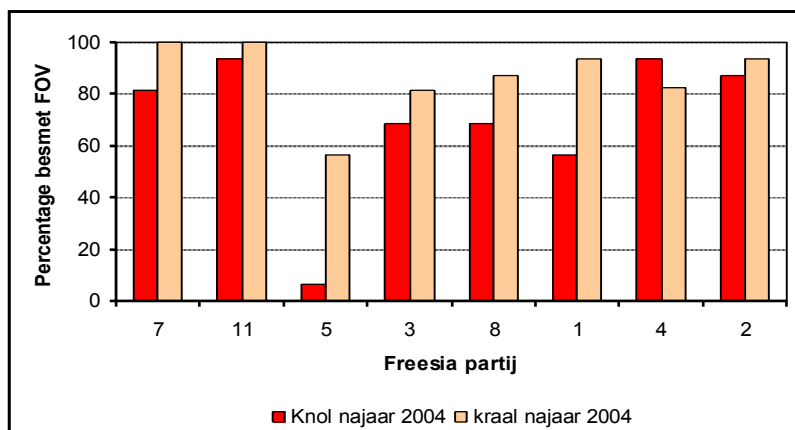
Uit de geselecteerde partijen zijn aselect 8 planten getrokken en het bladmateriaal is getoetst op FOV, FreMV en BYMV. Partij 7 vertoont wel symptomen, maar er is geen FOV aangetoond; van partij 11 zijn slechts enkele planten besmet, de planten kunnen bij selectie gemist zijn. Besmettingspercentages binnen partijen varieerden van 0 tot 100% (Tabel 1, figuur 10).



Figuur 10 - Percentage planten besmet met *Freesia ophiovirus* van acht partijen (% gebaseerd op 8 planten per partij).

14.2.2 Preparatie, knollen- en kralentoets

De knollen en kralen van deze partijen zijn geprepareerd, waarbij de knollen en kralen van de acht getoetste planten apart zijn gehouden (figuur 9). De knollen en kralen van de overige 16 planten zijn na preparatie getoetst met ELISA op FOV. Een knollen- en kralentoets is destructief: het materiaal kan daarna niet meer worden opgeplant.



Figuur 11 - Percentage knollen en kralen besmet met *Freesia ophiovirus* voor acht partijen (% gebaseerd op 16 knollen en 16 kralen per partij)

De besmettingspercentages van de knollen en kralen liggen aanzienlijk hoger in vergelijking met de toetsing van bladmateriaal voor preparatie, met name voor partijen 7, 11, 5, 3 en 8 (zie figuur 11).

Bij partij 5 lijken meer kralen dan knollen besmet met FOV, er zijn echter lukraak 16 kralen getoetst, waardoor er geen verband hoeft te bestaan tussen knol en kraal uit dezelfde partij.

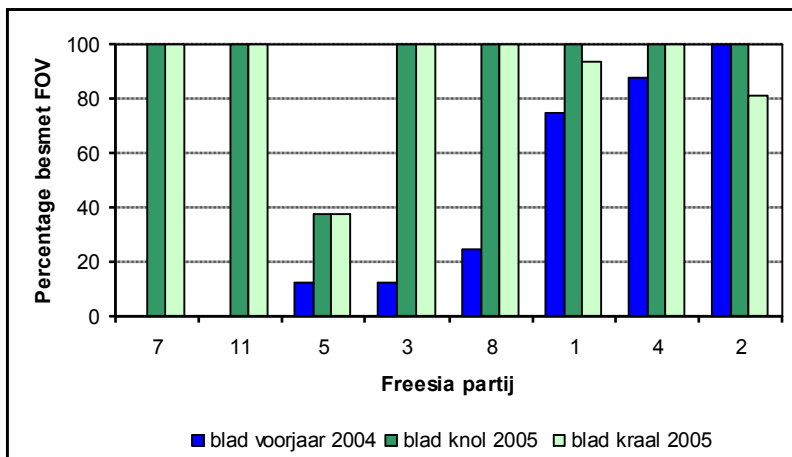
Opmerkelijk is dat partijen 7 en 11, die in het voorjaar volledig negatief waren voor FOV, maar wel freesiabladnecrose symptomen hadden, nu een hoge besmettingsgraad vertonen (80-100%). Na preparatie blijkt FOV wel aantoonbaar. Hiervoor zijn verschillende theoretische verklaringen te geven:

- De knollen en kralen toets is uitgevoerd op andere planten dan de toetsing vooraf (figuur 9), deze gegevens zullen dus niet één op één overeen komen.
- Het plantmateriaal is tijdens opplanting besmet geraakt. Voor alle toetsen wordt schone potgrond gebruikt, de besmetting kan niet uit de grond afkomstig zijn. De schimmel *Olpidium brassicae* – die verantwoordelijk is voor overdracht van FOV – kan overlevingsstructuren (rustsporen) vormen. Deze rustsporen kunnen een preparatie van 30°C overleven. Een mogelijke infectie van buurplanten zal dan afhangen van de aantallen aanwezige rustsporen en het percentage rustsporen dat besmet is met FOV.
- Het virus was bij de bladtoetsingen in een te lage concentratie aanwezig en daardoor niet aantoonbaar. Gedurende de preparatie heeft vermeerdering van het virus plaatsgevonden, waardoor het virus wel aantoonbaar is geworden.
- Het virus was in een niet detecteerbaar stadium aanwezig: voor detectie met behulp van ELISA is een eiwitmantel noodzakelijk. Als het virus een stadium heeft waarin deze eiwitmantel ontbreekt, dan is het virus niet aantoonbaar met ELISA. Of dit voor Ophiovirussen (het geslacht waartoe FOV behoort) opgaat is onbekend. Over de virusgroep is nog niet zoveel bekend.
- Het is mogelijk dat er nog een onbekend virus bij freesiabladnecrose betrokken is.

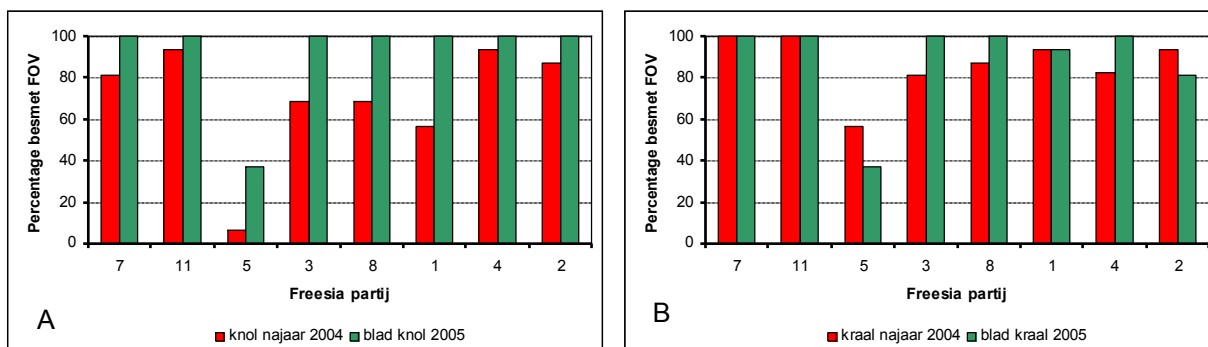
14.2.3 Opplanten en toetsing

Van de acht planten die afzonderlijk zijn getoetst zijn de knollen en 2 kralen opgeplant. Na opkomst is het blad op verschillende tijdstippen op FOV getoetst, FreMV en BYMV zijn buiten beschouwing gelaten.

Ook hier is een sterke toename in besmettingspercentages waar te nemen. Dit geldt met name voor partijen 7, 11, 3 en 8: in alle 8 planten is FOV aangetoond (figuur 12). Deze sterke toename komt overeen met de resultaten van de knollen en kralen toetsing (figuur 11 en 13).



Figuur 12 - Percentage besmetting met *Freesia ophiovirus* voor acht partijen (% gebaseerd op blad van 8 knollen en blad van 16 kralen)



Figuur 13 - A Percentage besmette knollen (najaar 2004) en besmet blad van opgeplante knollen (2005) uit dezelfde partij; B idem voor kralen uit dezelfde partij.

14.3 Conclusies Japan Opplant

Uit de selectiegegevens blijkt dat de toets niet het hele spectrum van de freesiebladnecrose symptomen dekt. Naast FOV wordt ook regelmatig FreMV aangetoond. In enkele partijen wordt geen FOV, FreMV of BYMV aangetoond. Verdere survey's in praktijkmateriaal moet dit beeld scherper krijgen.

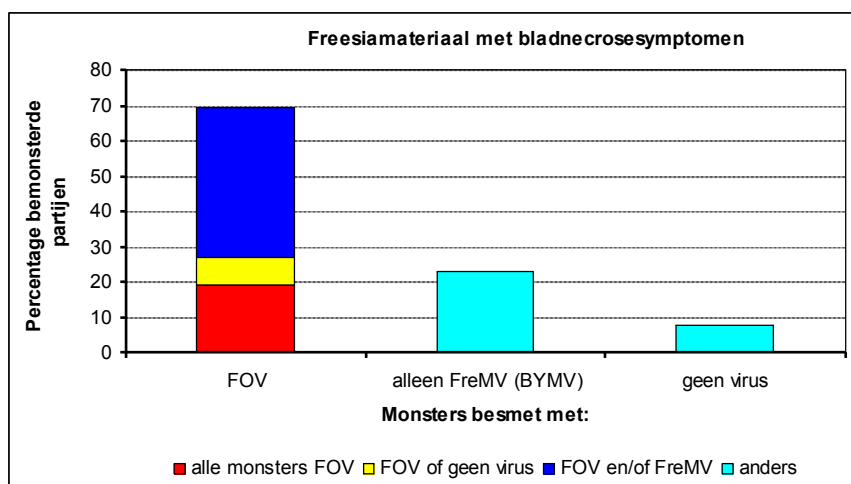
De knollen- en kralentoets werkt goed als deze zijn geprepareerd.

Er is een sterke toename van besmettingpercentages: hoewel alle partijen enkele planten met symptomen zijn waargenomen, was niet in alle partijen FOV aan te tonen. Na preparatie was dat wel het geval.

15. Bemonstering in praktijkmateriaal met symptomen

Om na te gaan of de toets het volledige spectrum van freesiabladnecrose dekt is er ook veel praktijkmateriaal getoetst. In 2004 zijn door keurmeesters van Naktuinbouw monsters in de praktijk genomen van materiaal dat freesiabladnecrosesympptomen vertoonde. Deze monsters (1 blad per monster en 8 of meer monsters per partij) zijn getoetst op FOV, FreMV en BYMV. Er is specifiek bemonsterd op materiaal met freesiabladnecrosesympptomen en het overgrote deel van het materiaal is gefotografeerd bij binnenkomst.

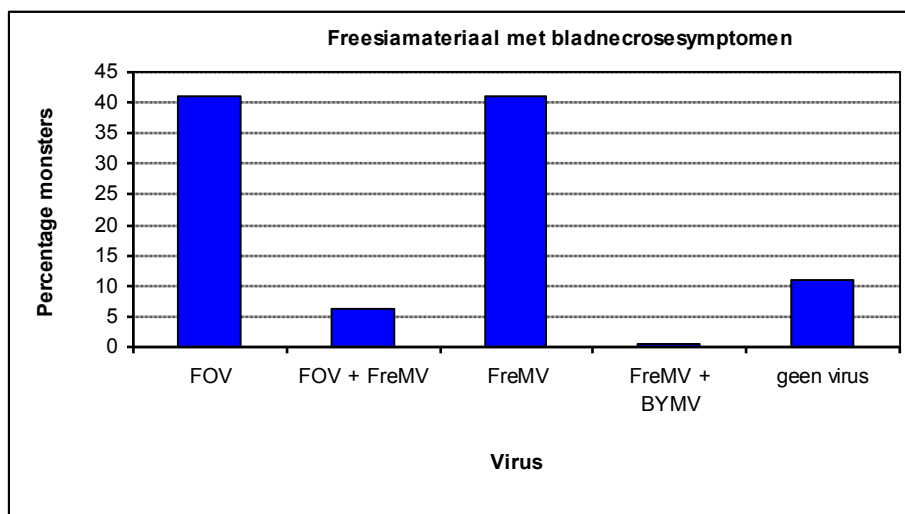
In circa 70% van de bemonsterde partijen (18 van de 26 partijen) is FOV aangetoond. In 5 partijen waren alle monsters besmet met FOV, de rest was ondanks specifieke necrose symptomen besmet met FreMV, dubbelinfectie met FOV en FreMV of had geen aantoonbare virusinfectie. In 5 partijen werd alleen FreMV aangetoond, in 2 partijen werd geen enkel virus aangetoond, zie figuur 14 waarin de gegevens zij weergegeven per partij.



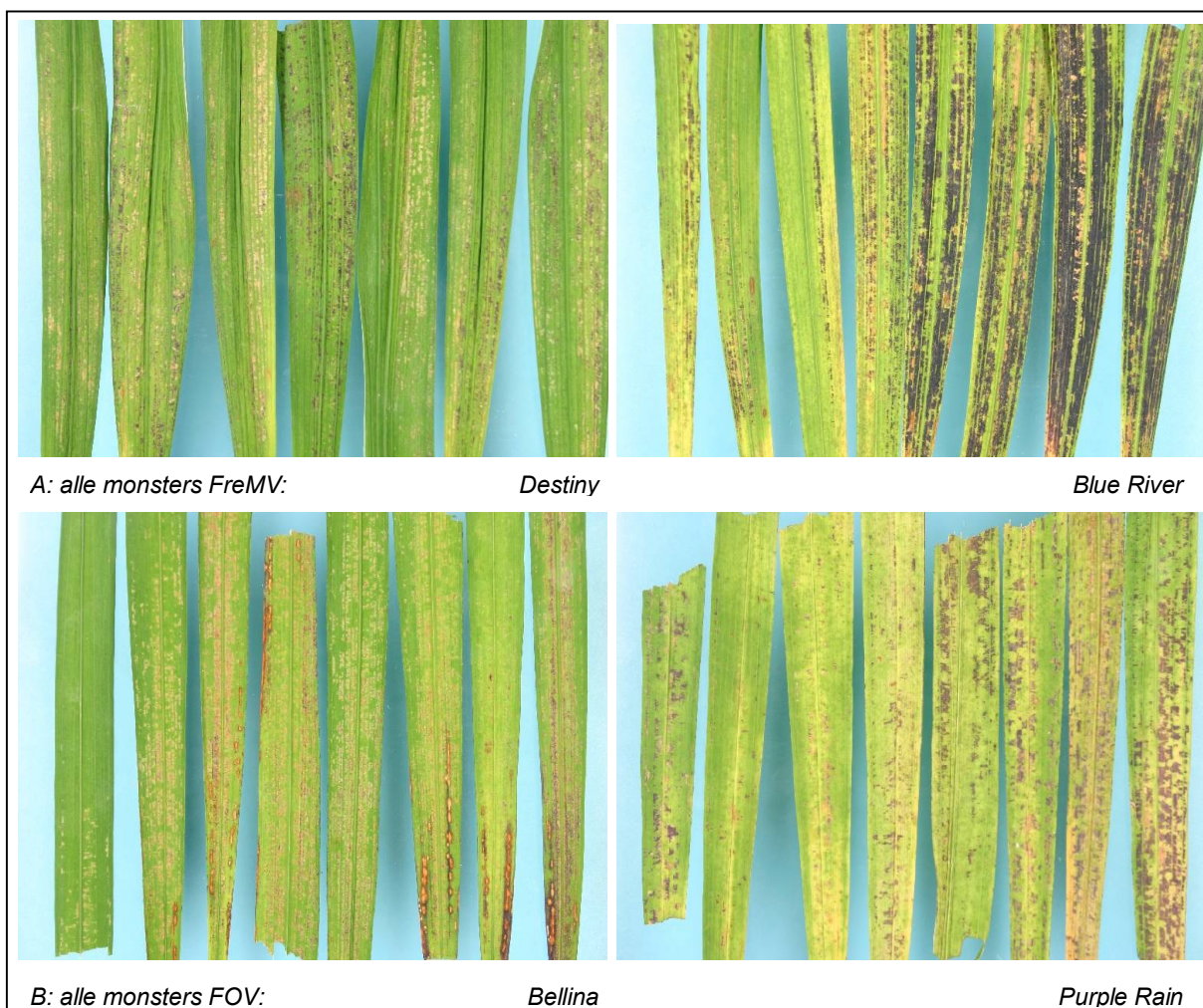
Figuur 14 - Resultaten praktijkbemonstering van materiaal met freesiabladnecrosesympptomen: verdeling van gevonden virusinfecties per partij (26 partijen).

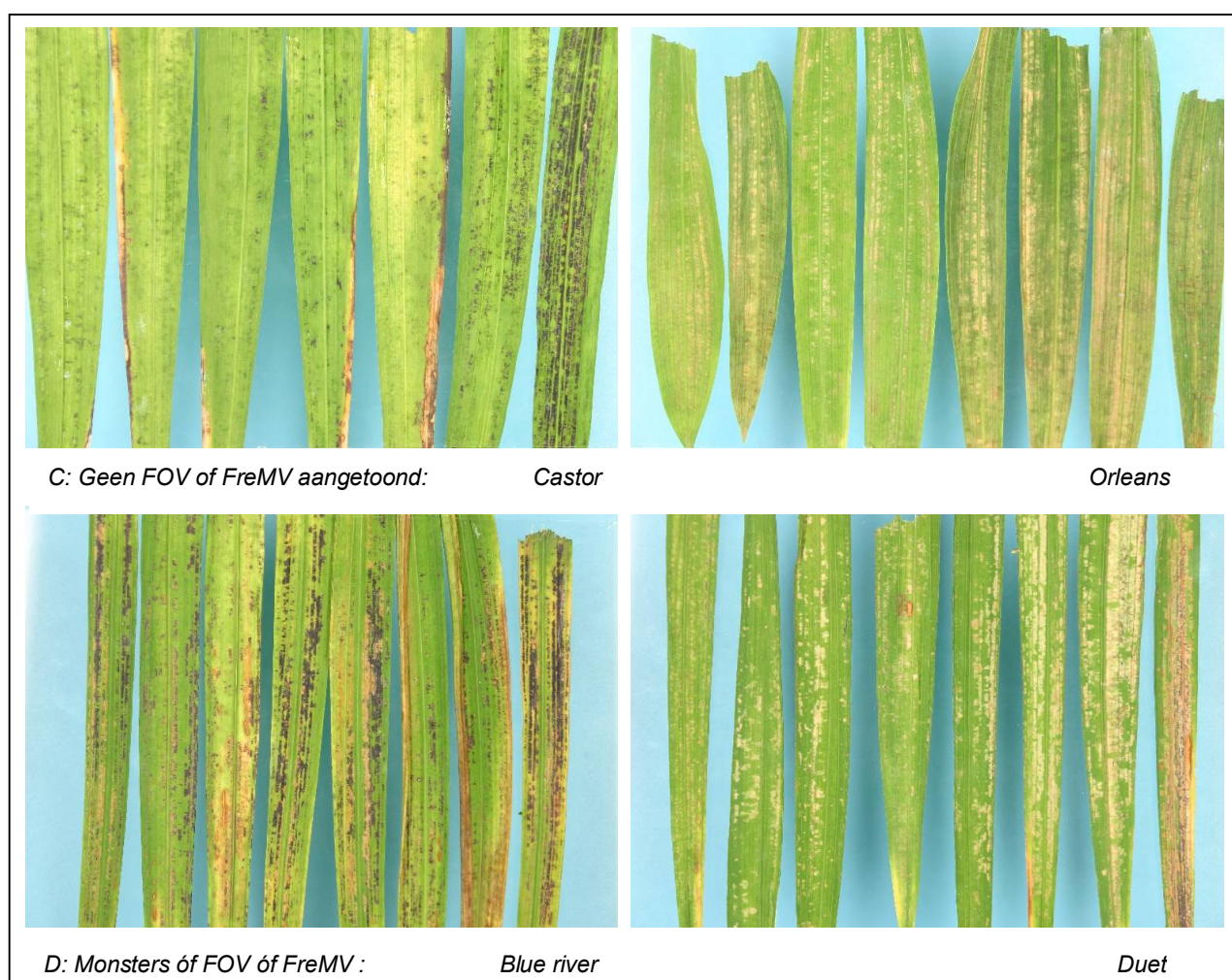
Foto's van de verschillende monsters per partij en de gevonden resultaten zijn weergegeven in figuur 16.

Als de gegevens worden weergegeven per monster, ongeacht uit welke partij deze afkomstig is, blijkt dat er zeer weinig dubbele infecties zijn: een monster is óf besmet met FOV (40% van de monsters) óf besmet met FreMV (40% van de monsters; figuur 15).



Figuur 15 - Resultaten praktijkbemonstering van materiaal met freesiabladnecrosesymptomen: verdeling van gevonden virusinfecties per monster (221 monsters uit 26 partijen).





Figuur 16 - voorbeelden van symptomen en de virussen die in deze monsters zijn aangetoond: A: alle monsters FreMV, B: Alle monsters FOV, C: Geen FOV of FreMV aangetoond, D: monsters óf FOV óf FreMV.

Deze resultaten komen overeen met de eerdere resultaten uit de Japan opplant, te weten:

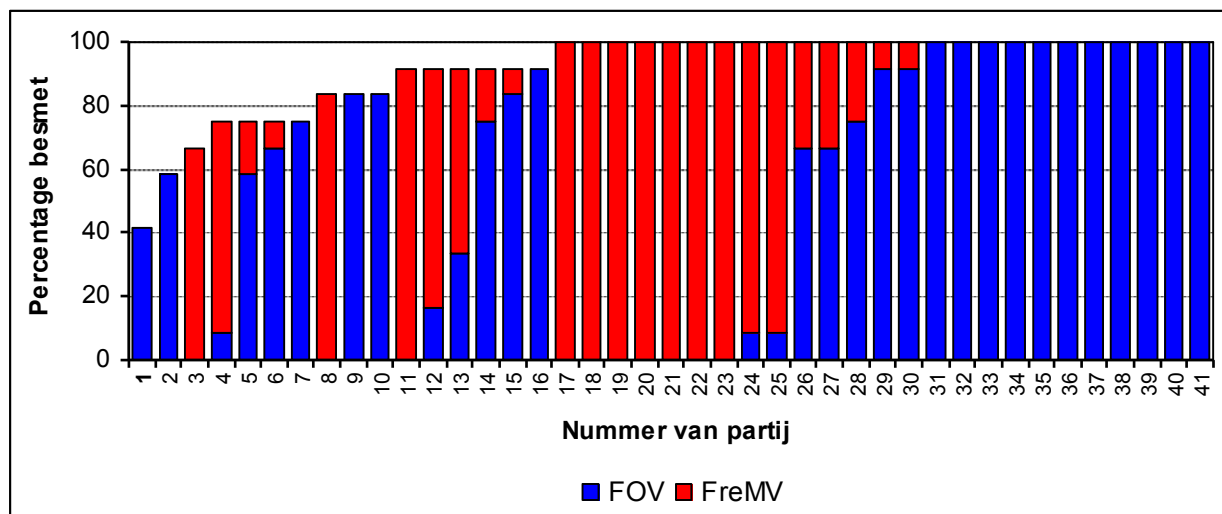
- In een groot deel van de monsters FOV is aangetoond,
- FOV is echter niet het enige aanwezige virus, een groot deel van de monsters is alleen besmet met FreMV. Dit kan erop duiden dat de symptomen veroorzaakt door FOV en FreMV niet goed te onderscheiden zijn.
- In een gedeelte van de partijen / monsters is geen virus aangetoond.

In verdere toetsing van bladmateriaal van Orleans is een laag percentage besmet gevonden met FOV. Knollen en kralen zijn geprepareerd, na preparatie zijn de beste knollen en kralen gebruikt voor opplanten, de rest van de knollen en kralen zijn direct getoetst.

Uit de directe knollen- en kralen-toetsingen bleek dat ca. 50% besmet was met FOV. Uit toetsingen aan bladmateriaal na opplanten bleek slechts 4% besmet, deze planten vertoonden symptomen.

16. Toetsen materiaal met en zonder symptomen

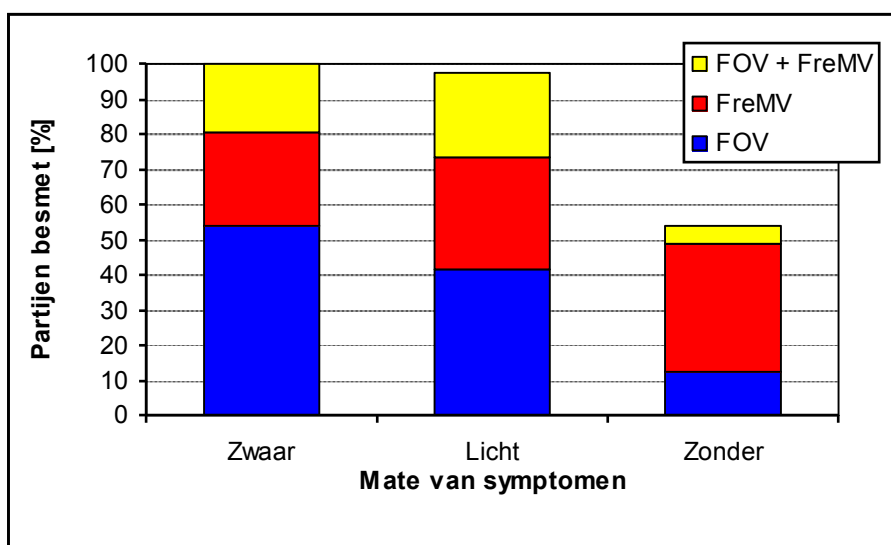
Een tweede bemonstering op materiaal met symptomen is uitgevoerd. Hierbij is uit één partij materiaal met verschillende gradaties van freesiabladnecrose (licht en zwaar) en materiaal zonder symptomen bemonsterd. Dit is gebeurd voor totaal 42 partijen. De monsters zijn getoetst op FOV en FreMV; BYMV is buiten beschouwing gelaten. In de monsters met lichte en zware symptomen wordt FOV óf FreMV aangetoond, zelden wordt in 1 monsters beide virussen aangetoond (0.4%). Ook binnen partijen waarin beide virussen voorkomen zijn de monsters besmet met één virus: FOV of FreMV (figuur 17).



Figuur 17 - Percentages van de monsters met symptomen (licht + zwaar) besmet met FOV (blauw) of FreMV (rood) onderverdeeld naar partij. Nummers in grafiek corresponderen met onderstaande nummers:

1 Paloma Beach Zafrepalom	11 Long Beach Varalong	21 Opala	31 Gold River	41 Bellina
2 Monaco	12 Brevet	22 Argenta	32 Côte d'Azur	
3 Yvonne	13 Versailles Ricaille	23 Yvonne	33 Blue Moon	
4 Versailles Ricaille	14 Gold River	24 Marianne Osred	34 Sarnia	
5 Aladin	15 Elysee Ricasee	25 Champagne	35 Blue Moon	
6 Santana	16 Ambassador	26 Santana	36 Red River	
7 Davos	17 Honeymoon	27 Volante	37 Blossom Beach Zafreblos	
8 Grandeur Ricagran	18 Yvonne	28 Volante	38 Marianne Osred	
9 Summer Beach Varasum	19 Marianne Osred	29 Purple Rain	39 Orangina Ricagina	
10 Ambassador	20 Blue Bayou	30 Blue Bayou	40 Kelly	

In figuur 18 worden de gegevens weergegeven per categorie van aantasting (zware, lichte symptomen of zonder symptomen). Bij de categorie “zwaar” blijkt dat in 50% van de partijen alleen FOV is aangetoond, in 30% van de partijen wordt alleen FreMV aangetoond en 20% van de partijen bevatten monsters met FOV of FreMV (figuur 17). Bij de categorie “licht” is het beeld nagenoeg gelijk. Ook in de categorie zonder symptomen wordt in de monsters virus aangetoond, in ca. 15% van de partijen wordt FOV aangetoond, in 30% van de partijen FreMV.



Figuur 18 - Percentage van de partijen besmet met alleen FOV (blauw), alleen FreMV (rood), en partijen die monsters bevatten die of met FOV of FreMV besmet zijn (geel), weergegeven in de mate waarin symptomen binnen de partij voorkomen: zwaar, licht of zonder symptomen.

In de monsters met symptomen varieert het percentage waarin virus wordt aangetoond tussen 40 tot 100%. Dit is afhankelijk van partij (figuur 17).

In 40 monsters (8%) werd geen virus aangetoond met behulp van ELISA. Hiervoor zijn verschillende verklaringen te geven:

- 37 monsters vallen in de categorie met “lichte” symptomen. Het is mogelijk dat beginnende freesiabladnecrosesympptomen veel moeilijker te onderscheiden zijn van andere beschadigingen in een plant.
- Zoals eerder genoemd is er een mogelijkheid dat het virus in een niet detecteerbaar stadium aanwezig is: voor detectie met behulp van ELISA is een eiwitmantel noodzakelijk. Als het virus een stadium heeft waarin deze eiwitmantel ontbreekt, dan is het virus niet aantoonbaar met ELISA. Dit kan nagegaan worden met een moleculaire toets (zie hieronder).
- Er is mogelijk nog een ander virus bij symptoomontwikkeling betrokken.

De 40 monsters waarin geen FOV of FreMV werd aangetoond zijn nader onderzocht met behulp van een moleculaire toets (Vaira *et al*, 2003). Met deze toets kan wordt het RNA van het virusgeslacht Ophiovirus aangetoond. Mocht het virus zonder eiwitmantel voorkomen, dan wordt met behulp van de moleculaire toets alsnog Ophiovirus aangetoond (de PCR toont ook andere soorten Ophiovirus aan). Echter alle 40 monsters waren negatief voor Ophiovirus, wat betekent dat er geen FOV in wat voor vorm ook in de monsters aanwezig is.

In het algemeen worden eerdere resultaten bevestigd:

- In materiaal met necrosesymptomen wordt FOV of FreMV aangetoond.
- In symptoomloosmateriaal is FOV aangetoond
- In de monsters met symptomen maar zonder aantoonbaar virus wordt ook met behulp van PCR geen FOV aangetoond.

17. FOV in symptoomloos materiaal

Om een inschatting te kunnen maken van het voorkomen van FOV in symptoomloos materiaal zijn twee surveys uitgevoerd. Partijen die in aanmerking kunnen komen voor Select Plant® freesia “Keuring met Partijrapport” uit vier freesia-gebieden, te weten Westland, Bollenstreek/Veenstreek, Noord Holland en Limburg-Bommelerwaard-Huissen zijn bemonsterd en getoetst m.b.v. ELISA op FOV. De eerste survey richtte zich op de top vijf van freesiacultivars waarbij 2 partijen per streek werden bemonsterd (40 partijen). De tweede survey richtte zich op de top twintig van freesiacultivars. Hierbij werden het Westland, vanwege het areaal en het aantal bedrijven, en Limburg, Bommelerwaard en Huissen, vanwege het variabele gebied, dubbel meegenomen (totaal 120 partijen). Doordat er een beperkt aantal partijen aan bovenstaande voorwaarden voldeed is de survey uitgevoerd op 98 partijen, waarbij 20 monsters per partij zijn getoetst.

In deze 98 partijen is met behulp van ELISA in 14 partijen FOV aangetoond (14%).

Besmettingspercentages binnen een partij varieerden tussen 5 en 15%. Dit is in vergelijking met bijvoorbeeld FreMV niet hoog.

De monsters zijn, indien mogelijk, nader geïnspecteerd op symptomen. Monsters die wel symptomen vertoonden zijn nageïtoetst met behulp van ELISA op FOV en FreMV. Bij het ontbreken van symptomen zijn alle 20 monsters nageïtoetst. Hierbij kan de volgende indeling worden gemaakt:

- FOV besmet:
 - In een aantal partijen waren al zeer lichte symptomen van freesiabladnecrose aanwezig (4x), deze symptomen worden in het veld gemist.
 - In een aantal partijen waren géén symptomen op het aangeleverde blad aanwezig (5x)
- Wel (beginnende) symptomen, maar is geen FOV aangetoond:
 - bij natoetsing wel FreMV aangetoond (1x)
 - bij natoeting geen virus aangetoond (2x)

In tabel 2 en 3 zijn de resultaten per streek en per cultivar voor beide surveys gezamenlijk weergegeven.

Tabel 2: Aantal getoetste freesiapartijen per regio, aantal partijen met *Freesia ophiovirus* besmette monsters (ELISA) en percentage besmette partijen per regio.

Regio	aantal partijen	aantal partijen met FOV besmette monsters	% besmette partijen
Bollenstreek / Veenstreek	22	1	4.5
Limburg, Bommelerwaard, Huissen	17	2	11.8
Noord Holland	13	4	30.8
Westland	46	7	15.2
Totaal	98	14	

Tabel 3: Aantal getoetste freesiapartijen per cultivar en aantal partijen met FOV besmette monsters (ELISA).

Cultivar	Aantal partijen	aantal partijen met FOV positieve monsters
Aladin	2	0
Alderney	4	2
Ambassador	12	2
Argenta	11	1
Avila	3	0
Blue Bayou	4	2
Blue Moon	11	4
Blue River	3	1
Côte d'Azur	3	0
Dukaat	12	0
Elegance	1	0
Gold River	5	1
Grace	2	0
Purple Rain	3	1
Saffier	2	0
Santorini	3	0
Versailles Ricaille	4	0
Volante	2	0
Yvonne	11	0
Totaal	98	14

18. Volgen licht besmette partijen

Om te onderzoeken of sterke toename in lichtbesmette partijen te verwachten is, zijn uit een viertal partijen waarin visueel een klein percentage necrose is vastgesteld 100 planten getrokken. Deze monsters zijn getoetst en de knollen zijn geprepareerd. Na preparatie is een gedeelte van de partij opgeplant (25 knollen), een ander gedeelte van de partij gelijk getoetst (ca. 25 knollen gebruikt voor knollentoets).

Tabel 4: Resultaten volgen partijen met lichte besmetting

Partij	Toetsing vooraf % (aantal)	Na preparatie	
		Knollentoets % (aantal)	Bladtoets na opplanting % (aantal)
1	1% (100)	0%(24)	0% (25)
2	2% (100)	4.2% (24)	3.2% (31)
3	0% (96)	11.5% (26)	0% (32)
4	1% (96)	7.7% (26)	7.1% (28)

Uit bovenstaande resultaten komt naar voren dat in enkele partijen het besmettingspercentage met FOV is toegenomen. Opmerkelijk is het hoge besmettingspercentage bij de knollen in partij 3. De waarden in ELISA waren erg laag, het kan zijn dat de knollen slecht waren en daardoor storing geven in de toets.

Bovenstaande gegevens betreffen een zeer beperkte steekproef, het geeft echter wel aan dat partijen niet na preparatie naar 100% besmetting schieten, zoals bij de Japan opplant gebleken is.

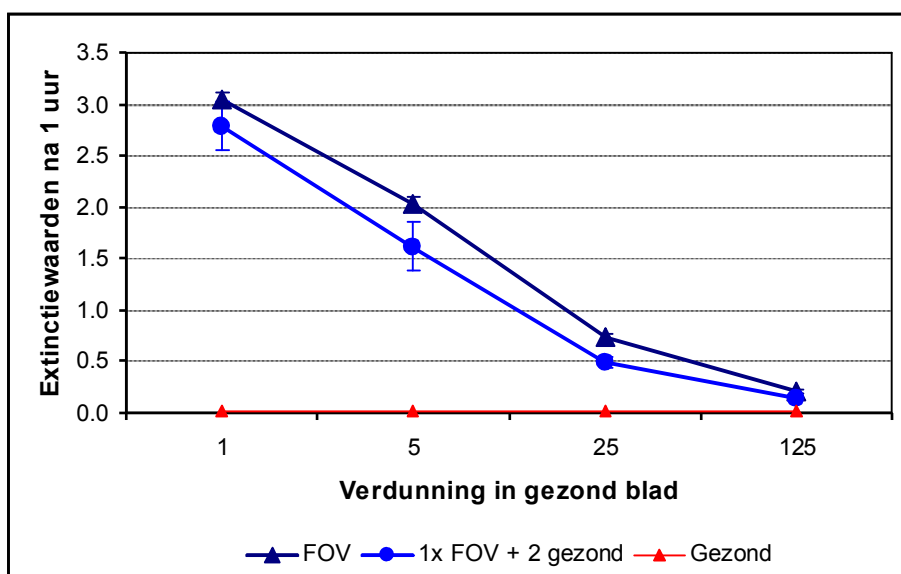
19. Toetsing van Select Plant® freesia materiaal

Een aselechte toetsing van praktijkmateriaal levert extra inzicht op over de verspreiding van FOV in de freesiateelt. De aselechte toetsing is uitgevoerd op 45 partijen die sowieso getoetst worden in het kader van Select Plant® freesia op de twee voorgeschreven virussen, te weten FreMV en BYMV. Toetsing op FOV zal dan volledig parallel moeten lopen met de andere toetsingen.

Voordat op FOV getoetst kan worden, zal moeten worden uitgezocht of de monsterverwerking op dezelfde manier kan worden uitgevoerd. Bij toetsing op FreMV en BYMV voor de Select Plant® worden namelijk drie blaadjes samengevoegd. Voor FreMV en BYMV is uitgezocht dat samenvoegen mogelijk is.

Mocht namelijk slechts één van de drie bladeren besmet zijn, dan mag de kans van detectie niet beïnvloed worden.

Voor dit experiment is toetsing van 1 blad besmet met FOV vergeleken met toetsing van 3 bladeren, waarvan slechts 1 blad besmet is met FOV. Deze extracten zijn daarna doorverdund in gezond freesiabladsap. Uit de resultaten blijkt dat de uitslag nauwelijks beïnvloed wordt (zie figuur 19).



Figuur 19 - Resultaten van het al dan niet samenvoegen van freesiabladeren voor toetsing op FOV

Uit de resultaten van de paralleltoetsingen blijkt dat in 13 van de 45 partijen FOV is aangetroffen, dit komt overeen met 29%. Binnen een partij varieert de FOV besmetting van 1 tot 5 van de 16 combitoetsingen. Deze variatie is kleiner in vergelijking met FreMV toetsing: 1 tot 16 van de 16 combitoetsing positief (Tabel 5). Uit tabel 5 komt ook naar voren dat FreMV vaak samengaat met FOV besmetting: in 11 van de 13 partijen waarin FOV is aangetoond komt ook FreMV voor. Gezien FreMV en FOV niet altijd goed te onderscheiden zijn is het moeilijk om het visueel constateren van freesiabladnecrose (“necrose opmerking” Tabel 5) te correleren aan het voorkomen FOV.

Als gegevens worden weergegeven per regio valt het op dat in regio 2 en 3 worden het grootst aantal partijen gevonden waarvan enkele monsters besmet zijn met FOV (Tabel 6). De steekproef is te klein om hier harde conclusies uit te trekken. Daarnaast is de achtergrond van deze partijen niet meer te achterhalen. Als het materiaal al lang in de handel is, is de kans namelijk groter dat er een virusbesmetting aanwezig is.

Tabel 5: Resultaten Select Plant® toetsing: aantal combimonsters waarin FreMV, BYMV en FOV is aangetroffen van de 16 combitoetsingen die zijn uitgevoerd.

Rasnaam	aantal FreMV ziek	aantal BYMV ziek	aantal FOV ziek	Necrose opmerking	Zowel FreMV en FOV in partij gevonden
Aleide	14	0	1	nee	Ja
Aleide	0	0	0	nee	
Ambassador	6	0	0	nee	
Ambassador	0	0	0	nee	
Avila	0	0	0	nee	
Avila	0	0	0	nee	
Bergamo	9	0	1	nee	Ja
Blossom Beach Zafreblos	0	0	0	ja	
Blue Bayou	9	0	1	ja	Ja
Blue Bayou	2	1	5	ja	Ja
Blue Moon	0	0	0	nee	
Blue River	0	0	0	nee	
Blue Sky	2	0	3	ja	Ja
Castor	16	0	1	nee	Ja
Corsica	0	0	0	nee	
Dukaat	12	0	0	nee	
Elegance	0	0	0	nee	
Gold River	9	0	1	nee	Ja
Gold River	0	0	0	nee	
Honeymoon	0	0	0	nee	
Long Beach Varalong	0	0	0	nee	
Long Beach Varalong	0	0	1	nee	
Medeo	0	0	0	nee	
Medeo	4	0	0	nee	
Medeo	16	0	0	nee	
Monaco Ricamon	0	0	0	ja	
Opala	9	0	1	nee	Ja
Popeye Vapopey	0	0	0	ja	
Purple Rain	16	0	0	ja	
Purple Rain	5	0	0	nee	
Red River	0	0	0	nee	
Riverdance	3	0	0	nee	
Samba	0	0	5	nee	
Smarty	1	0	0	ja	
Summer Beach Varasum	1	0	0	nee	
Summer Beach Varasum	1	0	2	nee	Ja
Summer River	0	0	0	nee	
Troubadour	4	0	3	nee	Ja
Versailles Ricaille	2	0	0	nee	
Volante	6	0	0	nee	
Yvonne	1	0	0	nee	
Yvonne	8	0	3	ja	Ja
Yvonne	11	0	0	nee	
Yvonne	3	0	0	nee	
Yvonne	1	0	0	nee	

Tabel 6: Resultaten Select Plant® freesia toetsing: aantal partijen per regio waarin FOV is aangetoond.

Regio	Aantal partijen getoetst	Aantal partijen FOV	% partijen met FOV
1 Bollenstreek / Veenstreek	5	0	0%
2 Bommelerwaard / Limburg / Huissen	11	5	45%
3 Noord-Holland	8	4	50%
4 Westland	21	4	19%
totaal	45	13	

20. Discussie

Hieronder zal een samenvatting gegeven worden van de belangrijkste conclusies uit dit rapport en al naar gelang zullen sommige punten nader besproken worden.

Allereerst werkt de toets goed voor het aantonen van FOV. De ELISA die door Plant Research International ontwikkeld is toont alleen FOV aan en reageert niet op FreMV, BYMV of gezond materiaal. Verder is de toets dusdanig gevoelig dat zonder probleem 3 bladeren kunnen worden samengevoegd voor toetsing.

Verder is het virus met behulp van de ELISA aantoonbaar in alle delen van de plant, te weten blad (mits niet te jong), stengel, kam/haak, knollen en kralen. De voorkeur gaat uit naar het toetsen van bladmateriaal, omdat dit materiaal het makkelijkst te verwerken is en van begin tot eind van het teeltseizoen aanwezig is. Mocht er geen blad aanwezig zijn dan kunnen knollen en kralen – ná preparatie – getoetst worden. De toets liet in de Japan opplant een goede overeenkomst zien tussen infectiepercentage van blad (na preparatie) en infectiepercentages van knollen en kralen. Bij toetsing van knollen en kralen uit de partij Orleans bleek dit niet het geval, wat waarschijnlijk te maken heeft met de selectie van knollen voor opplanten.

Bij het toetsen van bladmateriaal met symptomen komt uit alle experimenten naar voren dat naast FOV ook FreMV aanwezig is. In het algemeen wordt in 90% van bladeren met symptomen FOV óf FreMV aangetoond. Dit kan erop duiden dat het lastig is om in het veld, maar ook in het laboratorium getuige

figuur 11, onderscheidt te maken tussen “freesiablادنecrose”-symptomen en “bladvirus”-symptomen. Allerlei factoren kunnen hier doorheen spelen: seizoen, cultivar, omstandigheden waaronder de partij geteeld wordt, etc.

Dubbele infecties waarbij beide virussen tegelijkertijd in 1 blad worden aangetoond, kwamen zelden voor. Dit kan echter te maken hebben met de monsternamen. Het samen voorkomen van beide virussen in 1 plant kan leiden tot ernstige symptomen en de instructie bij monsternamen was om alleen blad te plukken met freesiablادنecrose symptomen. Daarnaast zullen telers doorgaans dergelijke zeer zieke planten uit de partij verwijderen.

In de 10% van de monsters met symptomen werd geen FOV of FreMV aangetoond. Deze monsters zijn niet besmet met een andere vorm van FOV, getuige de PCR resultaten.

Plant Research International heeft aangetoond dat FOV wordt overgebracht door *Olpidium brassicae* (Verbeek et al., 2006). Bij zaaien van freesia's op “necrose”gronden – grond van percelen waar in het verleden grote problemen zijn geweest met freesiablادنecrose – werden 1) wel echte bladnecrosesymptomen in freesia waargenomen, 2) *Olpidium*-rustsporen in de wortels gevonden en 3) FOV in de plant aangetoond. De geïsoleerde *Olpidium*-rustsporen konden zich weer hechten aan freesia wortels, maar induceerden afwijkende symptomen in freesia, gelijkend op aantasting veroorzaakt door trips. Dit kan erop wijzen dat er NOG een virus betrokken is bij het freesiablادنecrose complex. Dit virus zal ook met *Olpidium brassicae* overgebracht worden. In de inleiding wordt verwezen naar waarnemingen van een Varicosavirus in freesia met freesiablادنecrosesymptomen. Varicosavirussen kunnen, zover bekend, ook overgebracht worden door *Olpidium brassicae*. Toentertijd werd dit virus niet als de veroorzaker gezien, maar mogelijk speelt het toch een rol in de symptoomontwikkeling. *Olpidium brassicae* kan ook nog andere virussen zoals bijvoorbeeld tabaksnecrosevirus (TNV) overbrengen.

FOV komt ook symptoomloos voor in freesia. In 14% van de partijen bleek dit het geval te zijn. Infectiepercentages binnen een partij zijn in het algemeen laag. Het was niet mogelijk om uit te zoeken of dergelijk materiaal in het vervolgtraject – prepareren en opnieuw opplanten – symptomen gaat vertonen. Het volgen van partijen gaf tegenstrijdige resultaten t.a.v. toename symptoomontwikkeling / aantoonbaarheid FOV. In de Japan-opplant was er namelijk een snelle toename van FOV te zien, deze partijen vertoonden echter al wel symptomen. Bij andere experimenten bleven infectiepercentages en symptoomontwikkeling gelijk, of namen licht toe.

Uit alle toetsingen die uitgevoerd zijn in het kader van dit project is niet naar voren gekomen dat bepaalde rassen minder gevoelig zouden zijn. Echter gezien de enorme hoeveelheid rassen die binnen freesia

bestaan (> 200), kunnen zaken als minder tonen dan wel minder gevoelig zijn van rassen over het hoofd zijn gezien zijn.

Er lijkt een effect van regio waarneembaar. Helaas zijn de onderliggende factoren die hiermee te maken zouden kunnen hebben moeilijk te ontrafelen. Het kan zijn dat de grondsoort het tonen van virusbesmetting beïnvloed. Het kan zijn dat *Oplidium brassicae* in deze gronden in een hogere concentratie aanwezig is. Echter deze gegevens kunnen niet worden losgezien van de historie van een partij freesia. Doordat dezelfde freesiapartijen niet van jaar tot jaar in kaart worden gebracht – partijen worden gesplitst, doorverkocht, etc – is het onmogelijk deze historie te achterhalen.

Uit alle bovenstaande gegevens en de gegevens van Plant Research International is veel duidelijk geworden in het freesiablادنecrosecomplex. Hoewel de FOV toets de symptomen van freesiablادنecrose niet geheel dekt, kan de toets een handvat bieden voor het aanpakken van problemen. Zelfs als er nog een onbekend virus naast FOV een rol speelt in de symptomontwikkeling van freesiablادنecrose, zal toetsing op FOV aangeven dat de partij recent of in het verleden geïnfecteerd is geweest met de schimmel *Oplidium brassicae*, de overbrenger van FOV en een aantal andere virussen.

Er wordt overwogen om de FOV toetsing op te nemen in het Select Plant® freesia toetsingsschema. Door de combinatie van visuele waarnemingen en toetsresultaten zal meer kennis en ervaring worden opgebouwd over de ontwikkeling van freesiablادنecrose.

21. Suggesties voor vervolgonderzoek

Ondanks de vele kennis die binnen dit project is opgebouwd blijven een aantal vragen onbeantwoord.

Allereerst, de vraag óf er een ander virus naast FOV een rol speelt bij de symptomontwikkeling van freesiablادنecrose. In de inleiding werd al gerefereerd aan een Varicosavirus dat in freesia's met freesiablادنecrosesymptomen is waargenomen. Daarnaast is *Oplidium brassicae* in staat andere virussen over te brengen. Nader onderzoek is noodzakelijk om de symptomontwikkeling te begrijpen. Dit kan leiden tot effectiever opschonen van freesiamateriaal.

Daarnaast bestaat er een mogelijkheid dat sommige freesiarassen minder gevoelig zijn voor freesiablادنecrose. Ontwikkeling van een toetsmethode zou screening op resistentie dan wel tolerantie mogelijk maken en op de (zeer) lange termijn tot minder problemen kunnen leiden in de praktijk.

Daarnaast kan overwogen worden om *Olpidium brassicae* besmettingen in het veld beter in kaart te krijgen. Om dit goed te doen is meer informatie nodig t.a.v deze schimmel. *Olpidium brassicae* is een veel voorkomende schimmel in allerlei gronden. Er zijn echter duidelijke aanwijzingen dat de gehele populatie niet over één kam geschoren kan worden. Zo zijn er aanwijzingen dat de schimmel zich mogelijk gespecialiseerd heeft op freesia. Uit het onderzoek van Plant Research International kwam naar voren dat de *Olpidium brassicae*, aanwezig in de necrosegronden, zich niet hechtte aan tabak of melde, maar wel aan freesiawortels (Verbeek et al., 2006). Het aanwezig zijn van *Olpidium brassicae* hoeft dus niet automatisch te betekenen dat er een risico is voor freesia. Inzicht in de ontwikkeling van deze schimmel kan wel een waardevolle bijdrage leveren aan het verder voorkomen van freesia bladnecrose problemen.

22. Literatuur

Bouwen, I. (1994) Freesia leaf necrosis: some of its mysteries revealed. Acta Horticulturae 377: 311-318.

Lot, H., Campbell, R. N., Souche, S., Milne, R. G. & Roggero, P. (2002). Transmission by *Olpidium brassicae* of Mirafiori lettuce virus and Lettuce big-vein virus, and their roles in lettuce big-vein etiology. Phytopathology 92, 288-293.

Vaira, A.M., Accotto, G.P., Costantini, A., and Milne, R.G. (2003) The partial sequence of RNA 1 of the ophiovirus Ranunculus white mottle virus indicates its relationship to rhabdoviruses and provides candidate primers for an ophiovirus-specific RT-PCR test. Archives of Virology 148: 1037-1050.

van der Wilk, F., Dullemans, A.M., Verbeek, M. & van den Heuvel, J.F.J.M. (2002). Nucleotide sequence and genomic organization of an ophiovirus associated with lettuce big-vein disease. Journal of General Virology 83, 2869-2877.

Milne, R.G., 2002. The history of O - Some interesting revelations. Proceedings 5th Congress EFPP, Sicily, September 2000, pp. 21-24.

Verbeek, M., Van der Wilk, F., Vetten, H.J. & J.F.J.M. van den Heuvel, 2001. Viruses associated with the lettuce big-vein syndrome. Tagung Arbeitskreis Viruskrankheiten der Pflanzen, Köln, March 2001.