



Impatiens-vlekkenvirus in Phalaenopsis

Ineke Stijger¹, Roel Hamelink¹, Khanh Pham², Maarten de Kock² ¹ Wageningen UR Glastuinbouw, Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk ² PPO Bloembollen, Bomen & Fruit, Prof. van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse



Referaat

In de teelt van Phalaenopsis worden telers de laatste jaren geconfronteerd met een bladsymptoom bestaande uit concentrische kringen, vooral op de jongste bladeren. De aantasting varieert van mild (een enkele chlorotische kring) tot ernstig (afstervende bladdelen). In mei 2009 signaleerde men een sterke toename aan symptomen, waarbij in verschillende partijen tot 25% van de planten was aangetast.

Middels een ELISA-toets is de aanwezigheid van Impatiens-vlekkenvirus (Impatiens necrotic spot virus, INSV) vastgesteld. De symptomen van INSV kunnen verschillend zijn en zijn afhankelijk van de waardplant, de omstandigheden waarin de plant wordt geteeld en het gedrag van een individuele trips die een plant koloniseert. Necrotische vlekken, strepen, kringvlekken, groeiachterstand en verwelking zijn een aantal van de vele symptomen die door dit virus kunnen worden veroorzaakt. Ook is het mogelijk dat het virus symptomeloos in de plant voorkomt.

INSV wordt overgedragen via trips en de Californische trips (*Frankliniella occidentalis*) is de voornaamste vector.

Alleen de larven van de trips kunnen het virus opnemen uit besmette planten. Nadat de larven volgroeid zijn, verspreiden de volwassen exemplaren het virus naar andere planten. Rondvliegende volwassen mannetjes zijn de belangrijkste verspreiders. "Schone" volwassen tripsen kunnen het virus niet meer opnemen. De overdracht van het virus is persistent. Uit de overdrachtsexperimenten is gebleken dat tripsen niet de voorkeur geven aan Phalaenopsis-planten. Het zou kunnen zijn dat geïnfecteerde tripsen de planten testen als geschikte voedselbron bij gebrek aan beter. Zodra ze een betere waardplant vinden zullen ze niet meer op de Phalaenopsis-planten blijven.

In de overdrachtsproeven is een verschil te zien tussen een gedwongen verblijf van de tripsen en een vrije keus. Bij een gedwongen verblijf van geïnfecteerde tripsen op gezonde bladeren zijn de symptomen al na ongeveer een week zichtbaar dit in tegenstelling tot de vrije keus waarbij symptomen rond de vier weken zichtbaar waren.

Abstract

In the cultivation of Phalaenopsis some plants show necrotic/chlorotic spots symptoms, especially on the youngest leaves. Damage ranges from mild (a single chlorotic spot) to serious (dying leaf parts). Samples from different nurseries have tested positive for Impatiens necrotic spot virus, INSV.

INSV has a large host range (but smaller than TSWV) and is mostly a virus found infecting ornamental crops.

INSV is transmitted from plant to plant by several species of thrips, the most common species that spread this virus is the western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*).

Experiments showed that thrips do not prefer Phalaenopsis plants. Once they find a better host plant, they will not remain on Phalaenopsis plants. In various experiments a difference between a forced stay of the thrips and a free choice was determined. In a forced stay of infected thrips on healthy leaves the symptoms were already visible after one week instead of the free choice of the thrips where symptoms are visible around four weeks.

© 2012 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Wageningen UR Glastuinbouw.

Wageningen UR Glastuinbouw

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

Inhoudsopgave

	Samenvatting	5
1	Inleiding	7
	1.1 Aanleiding van het onderzoek	8
	1.2 Doel van het onderzoek	8
2	Materiaal en Methoden	9
	2.1 Aantonen virus in geïnfecteerd plantmateriaal	9
	2.2 Overdrachtsexperimenten	9
	2.3 Detectie van virus in de vector	10
3	Resultaten	13
	3.1 Aantonen virus in geïnfecteerd materiaal	13
	3.2 Overdrachtsexperimenten	15
	3.3 Detectie van virus in de vector	20
4	Discussie en conclusie	23
5	Literatuur	25
Bijlage I	Publicaties over of na aanleiding van het onderzoek naar INSV	27
Bijlage II	Phalaenopsis planten	31

Samenvatting

Inleiding

In de teelt van Phalaenopsis worden telers de laatste jaren geconfronteerd met een bladsymptoom bestaande uit concentrische kringen, vooral op de jongste bladeren. De aantasting varieert van mild (een enkele chlorotische kring) tot ernstig (afstervende bladdelen). In mei 2009 signaleerde men een sterke toename aan symptomen, waarbij in verschillende partijen tot 25% van de planten was aangetast.

Eind mei 2009 verzamelde Wageningen UR Glastuinbouw enkele aangetaste planten voor een oriënterend onderzoek. Middels een ELISA-toets is de aanwezigheid van *Impatiens*-vlekkenvirus (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) vastgesteld. De symptomen van INSV kunnen verschillend zijn en zijn afhankelijk van de waardplant, de omstandigheden waarin de plant wordt geteeld en het gedrag van een individuele trips die een plant koloniseert. Necrotische vlekken, strepen, kringvlekken, groeiachterstand en verwelking zijn een aantal van de vele symptomen die door dit virus kunnen worden veroorzaakt. Ook is het mogelijk dat het virus symptoomloos in de plant voorkomt,

INSV wordt overgedragen via trips en de Californische trips (*Frankliniella occidentalis*) is de voornaamste vector.

Alleen de larven van de trips kunnen het virus opnemen uit besmette planten. Nadat de larven volgroeid zijn, verspreiden de volwassen exemplaren het virus naar andere planten. Rondvliegende volwassen mannetjes zijn de belangrijkste verspreiders. "Schone" volwassen tripsen kunnen het virus niet meer opnemen. De overdracht van het virus is persistent.

Telers van Phalaenopsis geven aan dat zij weinig of geen trips in het gewas waarnemen. Voor hen is het daarom de vraag waar het virus vandaan komt, en welke maatregelen ze moeten nemen als het virus op het bedrijf aanwezig is.

Om meer te weten te komen over INSV in Phalaenopsis-planten is dit project uitgevoerd en onderverdeeld in een drietal onderwerpen te weten:

1. Aantonen virus in geïnfecteerd plantmateriaal.
2. Overdrachtsexperimenten.
3. Detectie van virus in de vector.

Resultaten

1. Aantonen virus in geïnfecteerd plantmateriaal

In het onderzoek is aangetoond dat *Impatiens*-vlekkenvirus in Phalaenopsis alleen kan worden aangetoond in het weefsel dat symptomen vertoont. Deze symptomen bestaan meestal uit concentrische kringen. Het toetsen van het plantmateriaal kan worden uitgevoerd met zowel een ELISA test als een PCR test. In tegenstelling tot een ELISA test toont de PCR test soms nog net iets buiten de kringen het virus aan. Een ELISA test voor het aantonen van *Impatiens*-vlekkenvirus in weefsel dat symptomen vertoont voldoet prima en is ook nog eens stuk goedkoper dan een PCR test.

2. Overdracht van INSV

INSV kan worden overgebracht door de trips *Frankliniella occidentalis* van geïnfecteerde Phalaenopsis-planten naar gezonde Phalaenopsis-planten. Dit is echter alleen vastgesteld bij een gedwongen verblijf van de trips (in bladkooitjes) op Phalaenopsis planten.

Wanneer er virusresistente waardplanten (in het onderzoek komkommer) met een gevestigde tripspopulatie bij besmette en gezonde Phalaenopsis-planten worden gezet, dan geeft de trips de voorkeur aan deze waardplanten. Op de Phalaenopsis-planten worden dan niet of nauwelijks tripsen waargenomen en is een virusoverdracht niet aan de orde.

Ook in de situatie waarbij een gezonde waardplant voor het virus (in het onderzoek paprika) bij gezonde en besmette Phalaenopsis-planten wordt geplaatst en de tripsen kunnen kiezen, dan blijkt de keuze te vallen op de andere waardplant en niet op de Phalaenopsis-planten. Ook hierbij is er geen virusoverdracht.

Anders wordt het in geval van een gedwongen verblijf van de trips op eerst een geïnfecteerde Phalaenopsis-plant en vervolgens op paprikaplanten dan blijkt een virusoverdracht via de trips naar de paprikaplanten mogelijk. Deze planten reageerden met zeer heftige symptomen. Door vervolgens gezonde Phalaenopsis-planten bij deze zwaar geïnfecteerde paprikaplanten te plaatsen, waarbij de tripsen een vrije keus hebben, blijkt wel een virusoverdracht mogelijk naar deze Phalaenopsis-planten. Zelfs nadat was vastgesteld dat er niet of nauwelijks tripsen op de Phalaenopsis-planten waren waargenomen. Op de geïnfecteerde paprikaplanten die bij de Phalaenopsis-planten zijn blijven staan, zijn wel steeds tripsen waargenomen. Blijkbaar dienden deze paprikaplanten als virusbron en thuisbasis van de tripsen. Het feit dat de

Phalaenopsis-planten wel geïnfecteerd raakte geeft aan dat de tripsen een 'uitstapje' maakte van de paprikaplanten naar deze planten.

In het onderzoek is ook vastgesteld dat besmette tripsen (getoetst met PCR) van een geïnfecteerde waardplant (in dit geval chrysant) in staat zijn om het virus over te brengen naar gezonde Phalaenopsis-planten. Dit was wel in een situatie waarbij de trips geen keus had maar waarbij de symptomen al na één week op het blad zichtbaar waren.

3. Detectie van virus in de vector

Met de ontwikkelde PCR toets is het mogelijk gebleken om INSV aan te tonen in tripsen. Dit is zeer waardevol want met deze toets kun je tripsen toetsen die op planten worden waargenomen maar waar nog geen virussymptomen te zien zijn. Zo weet je of je met geïnfecteerde tripsen te maken hebt en dan kun je je maatregelen daar op aanpassen.

Op basis van de resultaten van dit onderzoek blijft het lastig te verklaren waarom de telers soms een grote aantasting kunnen hebben in hun planten. Mogelijk komt het virus met plantmateriaal (symptoomloos) mee en onder bepaalde omstandigheden worden de symptomen zichtbaar. Een andere mogelijkheid is dat geïnfecteerde tripsen van een virusbron van buiten de kas komen. Maar zoals uit de overdrachtsexperimenten is gebleken geven tripsen niet de voorkeur aan Phalaenopsis-planten. Het zou kunnen zijn dat geïnfecteerde tripsen de planten testen als geschikte voedselbron bij gebrek aan beter. Zodra ze een betere waardplant vinden zullen ze niet meer op de Phalaenopsis-planten blijven.

In de overdrachtsproeven is een verschil te zien tussen een gedwongen verblijf van de tripsen en een vrije keus. Bij een gedwongen verblijf van geïnfecteerde tripsen op gezonde bladeren zijn de symptomen al na ongeveer een week zichtbaar dit in tegenstelling tot de vrije keus waarbij symptomen rond de vier weken zichtbaar waren.

Voorkomen en beheersen van een virus aantasting

- De beste controle van een plantenvirus is altijd het voorkomen van een infectie.
- Zorg dat de Phalaenopsis planten afkomstig zijn van een betrouwbare, schone herkomst.
- Inspecteer de binnenkomende planten op virussymptomen en trips.
- Indien mogelijk isoleer de nieuwe partij planten totdat zeker is dat er geen virus in zit.
- Teel de planten apart van alle andere planten die waardplant kunnen zijn voor zowel tomatenbronsvlekken virus als *Impatiens*-vlekkenvirus of waardplant zijn voor trips.
- Kijk welke gewassen er in de omgeving worden geteeld zoals bijvoorbeeld chrysant en of deze besmet zijn met TSWV en/of INSV. Chrysant is een bekende waardplant voor zowel TSWV als INSV.
- Verwijder en vernietig alle planten die symptomen vertonen.
- Verwijder al het onkruid in en rond de kas, zij kunnen namelijk een reservoir zijn voor zowel virus als trips.
- Geen planten vegetatief vermeerderen waarvan bekend is dat er virus in zit.
- Voorkom dat jonge, schone planten naast oudere, mogelijk geïnfecteerde planten komen te staan.
- Hang blauwe en gele vangplaten op om een eventuele populatie van trips waar te nemen.
- Controleer, tel en verwissel de vangplaten iedere week en neem maatregelen wanneer er (te) veel trips wordt waargenomen.
- Het risico op problemen door INSV valt in te perken met maatregelen rondom wisseling van planten (schoonmaak), de inzet van biologische bestrijders en het verwijderen van virusplanten en onkruiden.

1 Inleiding

Impatiens-vlekkenvirus was tot 1999 een aparte stam van het tomatenbronsvlekkenvirus (tomato spotted wilt virus, TSWV) [1,2].

Impatiens-vlekkenvirus heeft net als tomatenbronsvlekkenvirus een enorm brede waardplantenreeks: in totaal > 600 plantsoorten [3]. Over het algemeen zijn waardplanten voor INSV ook waardplant voor TSWV. Maar het aantal waardplanten voor INSV is kleiner dan voor TSWV. Daarnaast wordt INSV vaker waargenomen in siergewassen dan in groentengewassen. Voorbeelden van waardplanten voor INSV zijn: *Impatiens* New Guinea Hybrids, *Alstroemeria*, *Gloxinia*, *Cyclamen*, *Gerbera*, *Chrysanten*, *Fresia*, *Begonia*, *Petunia* en Paprika.

Omdat INSV een grote waardplantenreeks heeft, zijn er veel verschillende soorten infectiebronnen mogelijk.

De symptomen van INSV kunnen verschillend zijn en zijn afhankelijk van de waardplant, de omstandigheden waarin de plant wordt geteeld en het gedrag van een individuele trips die een plant koloniseert. Necrotische vlekken, strepen, kringvlekken, groeiachterstand en verwelking zijn een aantal van de vele symptomen (Figuur 1.) die door dit virus kunnen worden veroorzaakt. Ook is het mogelijk dat het virus symptomeloos in de plant voorkomt,



Alstroemeria



Impatiens



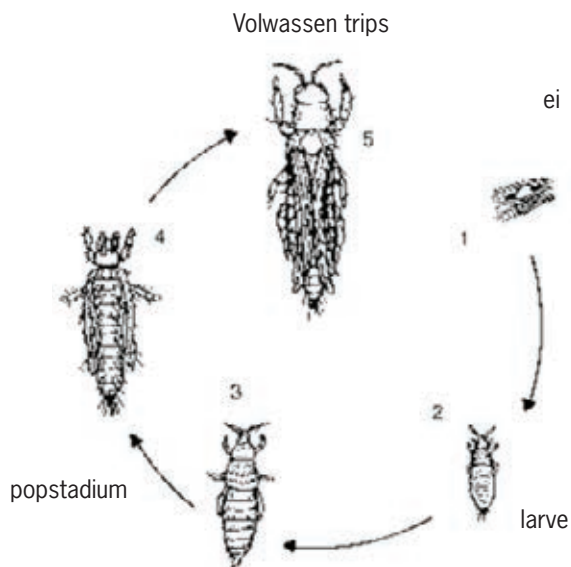
Begonia

Figuur 1. Symptomen veroorzaakt door INSV op een paar siergewassen.

Het huidige verspreidingsgebied van *Impatiens*-vlekkenvirus omvat een groot deel van Europa, waaronder Nederland en alle omliggende landen [4]. Recente literatuur [5,6] maken melding van het voorkomen van INSV in *Phalaenopsis* in China en Florida.

INSV wordt net als TSWV overgedragen via trips. Voor INSV is de Californische trips de voornaamste vector (*Frankliniella occidentalis*) [7]. Ook *Frankliniella intonsa* kan optreden als vector. TSWV heeft meerdere vectoren, maar ook hier is de Californische trips de voornaamste.

Alleen de larven van de trips kunnen het virus opnemen uit besmette planten. Nadat de larve volgroeid zijn, verspreiden de volwassen exemplaren het virus naar andere planten. Rondvliegende volwassen mannetjes zijn de belangrijkste verspreiders. "Schone" volwassen tripsen kunnen het virus niet meer opnemen. De overdracht van het virus is persistent. Zie Figuur 2. voor de levenscyclus van een trips.



Figuur 2. Levenscyclus van de Californische trips (*Frankliniella occidentalis*) 1 = ei, 2 = larve (kan het virus opnemen), 3 = pop, 4 = pop, 5 = volwassen (kan virus afgeven en verspreiden). (Bron: Factsheet, Colorado State University).

1.1 Aanleiding van het onderzoek

In de teelt van Phalaenopsis worden telers de laatste jaren geconfronteerd met een bladsymptoom bestaande uit concentrische kringen, vooral op de jongste bladeren. De aantasting varieert van mild (een enkele chlorotische kring) tot ernstig (afstervende bladdelen). In mei 2009 signaleerde men een sterke toename aan symptomen, waarbij in verschillende partijen tot 25% van de planten was aangetast.

Eind mei 2009 verzamelde Wageningen UR Glastuinbouw enkele aangetaste planten voor een oriënterend onderzoek. Middels een ELISA-toets is de aanwezigheid van *Impatiens*-vlekkenvirus (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) vastgesteld.

Telers van Phalaenopsis geven aan dat zij weinig of geen trips in het gewas waarnemen. Voor hen is het daarom de vraag waar het virus vandaan komt, en welke maatregelen ze moeten nemen als het virus op het bedrijf aanwezig is.

1.2 Doel van het onderzoek

De epidemiologie van deze virusziekte is bij Phalaenopsis-teelt nog grotendeels onbegrepen. Doel van het onderzoek is om informatie te verzamelen die het de telers mogelijk maakt een besmetting te voorkomen en interne verspreiding tegen te gaan.

Het project bestaat uit een drietal onderdelen te weten:

1. Aantonen virus in geïnfecteerd plantmateriaal.
2. Overdrachtsexperimenten.
3. Detectie van virus in de vector.

Het aantonen van het virus is het eerste uitgevoerd. De twee andere onderdelen zijn daarna gelijktijdig uitgevoerd.

2 Materiaal en Methoden

2.1 Aantonen virus in geïnfecteerd plantmateriaal

Uit het oriënterende onderzoek dat in 2009 is uitgevoerd, was vastgesteld dat met een ELISA test van PrimeDiagnostics *Impatiens*-vlekken virus alleen kon worden aangetoond in de bladkringen maar niet daarbuiten. Dit zou kunnen betekenen dat het virus zich niet systemisch in de plant verspreidt. Of dit zo is, of dat de ELISA test niet gevoelig genoeg is om dit virus aan te tonen zou onderzocht moeten worden.

Vraag voor dit onderzoek was dan ook of het met gevoeliger detectietechnieken mogelijk zou kunnen zijn om zowel in als buiten de bladkringen het virus te kunnen aantonen. Voor dit virus was al een PCR toets aanwezig maar met positief (besmet) materiaal is deze eerst op betrouwbaarheid gecontroleerd en waar nodig aangepast.

Om de bruikbaarheid van de testen te kunnen vaststellen was het noodzakelijk om virusgeïnfecteerde Phalaenopsis planten uit de praktijk te verzamelen. Via een teler uit de BCO is een oproep gedaan aan collega telers om materiaal ter beschikking te stellen.

In dit onderzoek zijn de verschillende plantendelen getoetst op de aanwezigheid van INSV:

- Bladeren
 - o In de kringen
 - o symptoomloze delen van het blad dat op een andere plek kringsymptomen vertoonde
- Bloemen
- Wortels

Voor het toetsen zijn twee technieken gebruikt:

- ELISA (serologische toetsmethode, relatief goedkoop)
- PCR (moleculaire toetsmethode, gevoelig)

Na de eerste oproep van een teler om ziek plantmateriaal ter beschikking te stellen, is dit later in het project nogmaals gedaan. Via LTO Groeiservice is in maart 2011 een A4-tje met symptomen van INSV in Phalaenopsis planten via de digitale nieuwsbrief onder telers verspreid (Bijlage I). Hierbij stond een korte uitleg over het virus. Indien telers deze symptomen ook in hun planten zagen of ze dan zo vriendelijk zouden willen zijn dit bij ons te melden en eventueel planten af te willen staan voor onderzoek.

2.2 Overdrachtsexperimenten

Impatiens-vlekkenvirus is een virus met een brede waardplantenreeks met name in de sierteelt. Volgens de literatuur wordt het uitsluitend verspreid door trips, zij het wat op een “moeizame” manier. Dit is aangetoond voor slechts enkele tripssoorten; zoals *Frankliniella intonsa* en de Californische trips, *Frankliniella occidentalis*. Deze laatste geldt als een relatief efficiënte overdrager (vector). Telers geven aan dat zij weinig of geen trips in het gewas waarnemen. Voor hen is het daarom de vraag waar het virus vandaan komt en hoe het zich verspreidt. Om mogelijk een antwoord op die vraag te kunnen geven zijn in dit project overdrachtsexperimenten uitgevoerd. Deze proeven zijn allemaal uitgevoerd in tripsdichte kooien met *Frankliniella occidentalis* als vector. In het begin zelfs met kleine bladkooitjes op bladeren van planten die in een tripsdichte kooi zijn geplaatst.

De volgende varianten zijn toegepast:

1. Besmette Phalaenopsis-planten, gezonde Phalaenopsis-planten, volwassen tripsen.
2. Besmette Phalaenopsis-planten, gezonde Phalaenopsis-planten, gevestigde tripspopulatie op een virusresistente goede waardplant voor trips
3. Besmette Phalaenopsis-planten, gezonde Phalaenopsis-planten, gezonde waardplant voor het virus, volwassen tripsen
4. Gezonde Phalaenopsis-planten, besmette waardplant voor het virus met een gevestigde tripspopulatie

2.3 Detectie van virus in de vector

Voor het aantonen van de aanwezigheid van INSV in plantmateriaal is een specifieke PCR-toets aanwezig (PPO, 2005). Kenmerkend voor een PCR-toets is dat deze veel gevoeliger is dan een ELISA-toets. Veel kleinere hoeveelheden virus kunnen met een PCR-toets worden aangetoond. Deze toets is, naast een ELISA test, ingezet voor het vaststellen van het virus in verschillende delen van de plant zoals aangegeven bij onderdeel A van dit project.

In dit onderdeel van het project is nu onderzocht of het haalbaar is om met moleculaire technieken (PCR) ook de aanwezigheid van het virus in de trips te bepalen.

Hiervoor zijn zowel gezonde tripsen als besmette tripsen gekweekt in afzonderlijke, tripsdichte kooien. Met deze tripsen zijn de toetsen gevalideerd.

Voor de detectie van INSV in plantmateriaal en in tripsen zijn PCR-toetsen gebruikt. Voor de detectie van INSV in de vector (trips) zijn Taqman PCR toetsen voor INSV en voor de vector *Frankliniella occidentalis* verder ontwikkeld.

RNA extractie van Phlebotomus en trips vond plaats met behulp van QIAgen RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Duitsland). Ter voorbereiding op de RT-PCR vond cDNA synthese plaats met behulp van M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA) volgens aanwijzingen van de fabrikant. PCR amplificatie werd uitgevoerd met TaqMan PCR Brilliant II QPCR Mastermix (Stratagene Europe) volgens de aanwijzingen van de fabrikant. Voor INSV vond cDNA synthese plaats m.b.v. primer INSVrev (reguliere PCR) of INSVTaqdetRev, voor Actine vond cDNA synthese plaats m.b.v. WFT-RNA-93R-C. Details voor primers en probes voor PCR-amplificatie zijn beschreven in Tabel XYZ.

Tabel 1. Primers en probes gegevens voor diverse PCR-toetsen.

Primer/probe	Sequentie (5'-3')	Targetgen	Amplicon	Ref.
Reguliere PCR				
INSV589F (189)	ccaagacacaggattca	Manteleiwit van INSV	401 bp	Uga (2004)
INSVRev (191)	gcagatcaagatgaacaaagca			Pham (2005) unpublished
TaqMan PCR				
INSVTaqdetFor	tccaagacttgatgcaatg	Manteleiwit van INSV	135 bp	Dit verslag
INSVTaqdetRev	aatctgtggtgcaagaccat			
INSV-CP-Probe	Cctccaagtcaccctctga (*)			
WFT-RNA-25F	ggatcgtcctggactctggg	Actine van trips	148 bp	Boonham et.al, 2002
WFT-RNA-93R-C	gggaaggcgtaacctca			
WFT-RNA-48TProbe	cgggtgtctcccactgtcccca (**)			

(*) 5'FAM, TAMRA Probe

(**) 5'VIC (HEX), TAMRA Probe

Pipeteerschema (Reverse Transcription), 30 minuten 42 C

RNA	5 µl
Buffer 5X	4 µl
dNTP	1 µl
RT	1 µl
RNasin	0.1 µl
MQ	6.9 µl
Primer Rev	2 µl
Totaal	20 µl

Pipeteerschema (Real-time PCR)

DNA	1.00 µl
Primer F (10uM)	0.75 µl
Primer R (10uM)	0.75 µl
Probe P (5uM)	0.50 µl
Master Mix (2X)	12.50 µl 9.50
Nuclease-vrij water	µl
Totaal	25.00µl

De uiteindelijke concentratie van primers in de PCR-mix is 300 nM en de concentratie van probe is 100 nM. Het PCR-programma begint eerst met 2 min bij 50 °C gevolgd door 10 min bij 95 °C. Aansluitend worden 40 cycli uitgevoerd die elk bestaan uit 15 sec bij 95 °C en 1 min op 60 °C.

3 Resultaten

3.1 Aantonen virus in geïnfecteerd materiaal

Door de oproep via LTO Groeiservice en telers uit de BCO zijn in de periode oktober 2010 en augustus 2011 van een aantal bedrijven Phalaenopsis planten met symptomen ontvangen.

Na binnenkomst bij Wageningen UR Glastuinbouw zijn de planten van een code voorzien en is een korte beschrijving van de diverse symptomen gemaakt (Bijlage II). Ook zijn er van verschillende symptomen foto's gemaakt. Zie Figuur 3. voor een selectie hiervan.



Figuur 3. Diverse symptomen van Impatiens-vekkenvirus op Phalaenopsis-planten.

Van de planten met symptomen die bij ons zijn binnengebracht in 2010 zijn de verschillende plantendelen getoetst op aanwezigheid van het virus.

Tabel 2. Monstercodes, beschrijving symptomen en resultaten van een ELISA test en de reguliere PCR toets.

	Inschrijfcode	monsternr	beschrijving symptomen	ELISA resultaten	PCR reultaten
1	INP 1	1	4e blad van ondere geen symptomen	neg.	neg.
2		2	3e blad van onderen vage symptomen	neg.	neg.
3		3	1 na jongste blad vage symptomen langs de rand	neg.	neg.
4		4	jongste blad met gele vlek	pos	pos
5		5	jongste blad vage plek	pos	pos
6		6	jongste blad met necrose	pos	pos
7		7	volgroeide bloem	neg.	neg.
8		8	bloemknop	neg.	neg.
9	INP 2	1	wortels	neg.	neg.
10		2	1 na jongste blad zonder symptomen	neg.	neg.
11		3	1 na jongste blad geel stuk	pos	pos
12		4	1 na jongste blad centrum deels verzonken	pos	pos
13		5	jongste blad met vage symptomen	neg.	pos
14	INP 3	1	jongste blad met vage vlekken	pos	pos
15		2	jongste blad verzonken chlorotische vlekken	pos	pos
16		3	afwijkende bloem	neg.	neg.
17	INP 4	1	3e blad van boven chlorose en verzonken	neg.	neg.
18		2	jongste blad zonder symptomen	neg.	neg.
19		3	4e blad van boven symptomen onderzijde	neg.	neg.
20	INP 5	1	oudste blad met vage symptomen	neg.	neg.
21		2	3e blad van boven chlorotische vlek en verzonken	neg.	neg.
22	INP 6	1	3e blad van onderen zonder symptomen	neg.	neg.
23		2	jongste blad met kringen	pos	pos
24	INP 7	1	grote ronde plek op één blad	pos	pos
25		2	bloemknop	neg.	neg.
24	INP 7a	1	oudste blad met vage symptomen	neg.	neg.
25		2	3e blad van onderen met vele kringen	neg.	neg.
26	INP 8	1	wortels	neg.	neg.
27		2	jongste blad zonder symptomen	neg.	neg.
28	INP 9	1	oudste blad met kringen met ingezonken necrotische kern, vergeeld blad	neg.	neg.
29	INP 10	1	2e blad van onderen, kleine kringen bij elkaar	neg.	pos.
30	INP 11	1	uitloper	neg.	neg.
31	INP 12	1	jongste blad zonder symptomen	neg.	neg.
32		2	oudste blad met kleine gele vlekken en verzonken kern (necrotisch)	neg.	neg.
33	INP 13	1	kringen	neg.	neg.
34		2	naast kringen	neg.	neg.
35	INP 14	1	ringen	neg.	neg.
36		2	naast ringen	neg.	neg.
37	INP 15	1	necrotische kringen	neg.	pos.
38		2	naast kringen	neg.	neg.
39	INP 16	1	kringen	neg.	neg.
40		2	naast kringen	neg.	neg.
41	INP 17	1	gele vlekjes	neg.	neg.
42		2	wortels	neg.	neg.
43	INP 18	1	kringen	neg.	neg.
		2	naast kringetjes	neg.	neg.

In Tabel 2. staat beschreven van welk deel van de plant de monsters zijn genomen. Dit waren stukjes met en zonder symptomen. Het materiaal is met een ELISA test getoetst maar ook met de gevoeliger moleculaire PCR-test. Zoals in de tabel te zien is, is maar in een beperkt aantal gevallen het virus aan te tonen met een ELISA test en dan alleen nog maar in bladweefsel dat symptomen laat zien. De resultaten van de PCR test komen overeen met de resultaten van de ELISA met een enkele uitzondering waarbij wel virus is aangetoond met PCR maar niet met de ELISA test.

Na een oproep voor planten met symptomen via LTO Groeiservice in begin 2011 zijn alle binnengekomen planten getoetst. Hierbij is steeds materiaal genomen met symptomen maar ook net buiten de symptomen. De resultaten zijn vergelijkbaar met de bovenstaande resultaten in de Tabel 2. Als er virus wordt aangetoond, dan is het het bladweefsel dat ook de symptomen vertoont. Virus is zowel met PCR als ELISA niet detecteerbaar (en dus afwezig) in het bladgedeeltes of ander type weefsel dat geen symptomen laat zien.

Voor de overdrachtsexperimenten zijn met INSV geïnfecteerde Phalaenopsis-planten in leven gehouden en met een regelmaat getoetst. Uit deze planttoetsingen is duidelijk naar voren gekomen dat de virustiter in de plant afneemt naarmate de plant (en de symptomen) ouder wordt. Op een gegeven moment kun je het virus helemaal niet meer aantonen. Dit is vooral het geval bij de symptomen die necrotisch (bruin tot zwart) zijn geworden. Deze toetsingen zijn uitsluitend met een ELISA test uitgevoerd.

3.2 Overdrachtsexperimenten

1. Besmette Phalaenopsis-planten, gezonde Phalaenopsisplanten en volwassen tripsen

Bladkooitjes

De overdrachtsexperimenten zijn gestart met het kweken van trips op Phalaenopsis-planten. Hiervoor zijn gezonde Phalaenopsis-planten in een kooi geplaatst en op het blad zijn bladkooitjes (Figuur 4.) geplaatst. In deze bladkooitjes zijn 10 tot 15 volwassen (adulten) tripsen gedaan. De tripsen hadden zo geen keus voor een plant en konden ook niet ontsnappen. Na ongeveer 14 dagen werden er larven waargenomen. Dit geeft aan dat er ook eieren op de Phalaenopsis-planten gelegd kunnen worden.

Met de bladkooitjes methode zijn gezonde tripsen op besmette Phalaenopsis planten gezet en de ontwikkelde adulten op deze planten zijn over gezet op gezonde planten. Daarbij is het gelukt om de planten te infecteren.



Figuur 4. Bladkooitje op een blad van een Phalaenopsis-plant (Foto links), viruskringen op een Phalaenopsis-blad waarop een bladkooitje bevestigd is geweest (Foto rechts).

Experiment 1

De experimenten zijn voortgezet zonder de bladkooitjes. In tripsdichte kooien zijn vijf besmette Phalaenopsis-planten geplaatst. Hierop zijn 100 gezonde volwassen tripsen uitgezet. In dit experiment is nagegaan of trips in staat is vanuit de symptomen op het blad het virus over te brengen naar bijvoorbeeld de bloemstengels of de bloemen.

Door de grote aantallen tripsen is wel schade aan de bloemen en bloemstengels ontstaan (Figuur 5.) maar geen virussymptomen. Op zowel de bladeren als de bloemen zijn larven waargenomen.



Figuur 5 Tripsschade op de bloemstengel en op de bloem.

Experiment 2

Een tweede experiment is uitgevoerd met vijf besmette en vijf gezonde Phalaenopsis-planten. Deze zijn bij elkaar in een kooi geplaatst en 20 gezonde volwassen tripsen. In dit experiment is geen schade aan de bloemen of bloemstengels waargenomen. Een virusoverdracht is ook niet vastgesteld.

2. Besmette Phalaenopsis-planten, gezonde Phalaenopsis-planten, gevestigde trijspopulatie op een virusresistente goede waardplant voor trips

Komkommerplanten

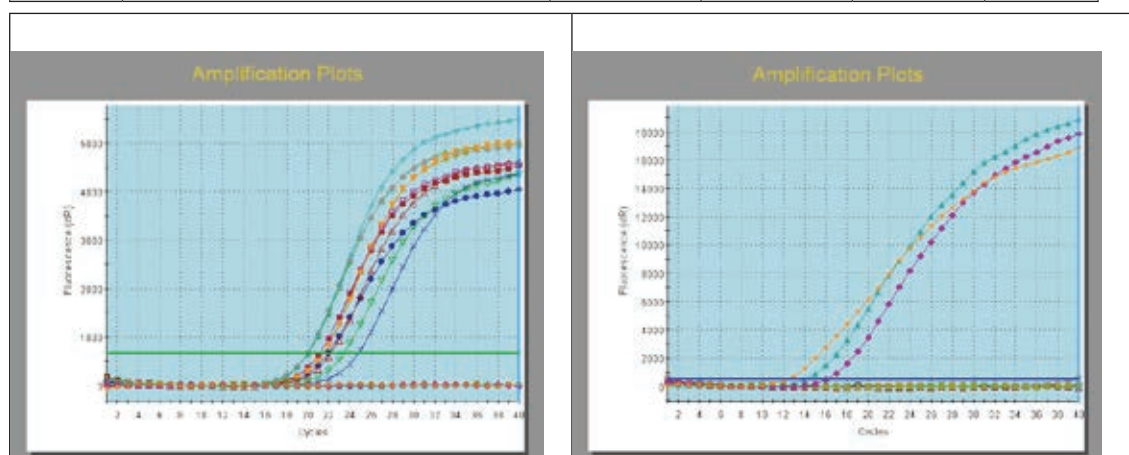
Voor dit experiment zijn eerst tripsen opgekweekt op komkommerplanten in een tripsdichte kooi. Komkommer is wel een waardplant voor de trips maar geen waardplant voor INSV. Nadat er voldoende tripsen op deze planten waren waargenomen zijn er vijf besmette en vijf gezonde Phalaenopsis-planten bij de komkommerplanten geplaatst. Hierna is de ontwikkeling van de tripsen gevolgd. Ook is een eventuele symptoomontwikkeling op de Phalaenopsis-planten gedurende twee en halve maand gevolgd. Er is gezorgd dat de komkommerplanten steeds werden teruggesnoeid zodat ze in de kooi bleven passen.

In de komkommerplanten zijn gedurende de looptijd van het experiment alle tripsstadia's waargenomen. Er trad ook veel tripsschade op. In de gezonde Phalaenopsis-planten zijn geen tripsen waargenomen en ook geen virussymptomen. Bij de besmette Phalaenopsis-planten zijn in de bloemen een paar adulten en een paar larven aangetroffen. Een virusoverdracht kon in dit experiment niet worden vastgesteld.

In de kasafdeling met Phalaenopsis-planten waren een paar planten met vreemde gelige vlekjes welke afwijkend waren met wat tot dan toe was gezien. In dezelfde kas stonden ook komkommerplanten waarvan een aantal virusvrij waren en een aantal met een infectie met komkommerbontvirus. Dit is een virus waarvoor Phalaenopsis geen waardplant is. Op zowel de Phalaenopsis planten als de komkommerplanten kwamen tripsen voor. Van een aantal komkommerplanten zijn vijf tripsen (adulten)/per plant in een epje verzameld. Deze tripsen zijn met de moleculaire test getoetst op aanwezigheid van INSV. Zoals te zien in Tabel 3 is er geen INSV in de tripsen vastgesteld. De tripsen zijn niet getoetst op de aanwezigheid van komkommerbontvirus want dat was niet van belang voor dit project.

Tabel 3. Detectie van INSV in tripsen met behulp van PCR-diagnostiek. RNA extracten van tripsen zijn gebruikt voor de PCR-detectie van INSV en trips zelf (interne PCR-controle). De Ct-waarde geeft relatieve informatie over de hoeveelheid trips, resp. INSV dat in het monster aanwezig was. Ct-waarden lager dan 35 zijn positief (Trips of INSV is aanwezig) ; Ct-waarden hoger dan 35 geven een negatief resultaat aan.

Nr.	Monster	Trips-PCR		INSV-PCR	
		Ct (dR) (*)	PCR resultaat	Ct (dR) (**)	INSV
		Fig . 6		Figuur 7	
1	5 tripsen, van gezonde komkommerplaten	21.95	Pos	No Ct	neg
2	5 tripsen, van gezonde komkommerplaten	21.17	Pos	No Ct	neg
3	5 tripsen, van gezonde komkommerplaten	20.05	Pos	No Ct	neg
4	5 tripsen, van gezonde komkommerplaten	19.94	Pos	No Ct	neg
5	5 tripsen, van zieke komkommerplanten	21.49	Pos	No Ct	neg
6	5 tripsen, van zieke komkommerplanten	19.99	Pos	No Ct	neg
7	5 tripsen, van zieke komkommerplanten	21.15	Pos	No Ct	neg
8	5 tripsen, van zieke komkommerplanten	21.57	Pos	No Ct	neg
9	2 tripsen, van Phalaenopsis	24.79	Pos	No Ct	neg
10	2 tripsen (RNA van Feb 2011)	22.24	Pos	No Ct	neg
11	4 tripsen (RNA van Feb 2011)	23.44	Pos	No Ct	neg
12	NTC (neg controle)	No Ct	Neg	No Ct	neg
13	NTC (neg controle)	No Ct	Neg	No Ct	neg
14	INSV 1 (pos controle)	No Ct	Neg	14.53	pos
15	INSV 2 (pos controle)	No Ct	Neg	16.46	pos
16	INSV 3 (pos controle)	No Ct	Neg	12.78	pos



Figuur 6. Amplificatie-curves voor de Trips-PCR. Het aantal cycli waarbij de stijgende S-curve de groene drempelwaardelijijn doorkruist, bepaald de Ct-waarde.

Figuur 7. Amplificatie-curves voor de INSV-PCR. Het aantal cycli waarbij de stijgende S-curve de blauwe drempelwaardelijijn doorkruist, bepaald de Ct-waarde.

INSV is niet aangetoond in de geanalyseerde tripsmonsters. De kwaliteit/kwantiteit van RNA is goed (Ct-waarden van trips-PCR liggen tussen 20 en 25, afhankelijk van hoeveelheid geanalyseerde tripsen).

De concentraties van INSV geïnfecteerde plantmaterialen (hippeatrium/iris) zijn hoog (Ct-waarden tussen 13 en 17).

3. Besmette Phalaenopsis-planten, gezonde Phalaenopsis-planten, gezonde waardplant voor het virus, volwassen tripsen

Experiment 1

In een kooi zijn gezonde paprikaplanten en gezonde Phalaenopsis-planten geplaatst. Vervolgens zijn 20 tripsen (adulten) op de planten uitgezet. Paprika is een waardplant voor INSV maar ook een goede waardplant voor tripsen. De tripsen ontwikkelde zich uitstekend op de paprikaplanten waarbij alle stadia's werden waargenomen. Op de Phalaenopsis-planten werd een enkele larve op het blad waargenomen. Dit experiment is uitgevoerd om na te gaan of tripsen die in grote getalen op paprikaplanten kunnen zitten, gemakkelijk over gaan op Phalaenopsis-planten.

Experiment 2

In dit experiment zijn vijf gezonde en vijf besmette Phalaenopsis-planten in een kooi gezet. Daarbij zijn vijf paprikaplanten geplaatst en 20 tripsen (adulten) losgelaten. Gedurende ruim twee maanden is de ontwikkeling van de tripsen gevolgd en een eventuele symptomontwikkeling op de plant. De tripsen zijn alleen op de paprikaplanten waargenomen en ze zorgden ook voor schade op de bladeren. Het virus is niet verspreid naar de gezonde Phalaenopsisplanten en ook niet naar de paprikaplanten.

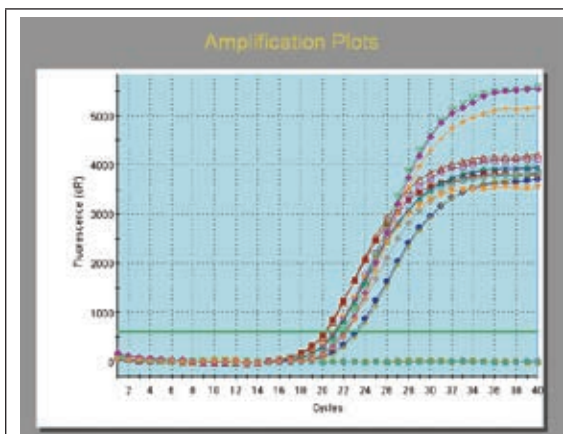
In deze proef zijn van een aantal paprikaplanten tripsen verzameld. Deze zijn met de moleculaire test getoetst op aanwezigheid van INSV. Zoals uit Tabel 4 is er geen virus vastgesteld.

Tabel 4. Detectie van INSV in tripsen met behulp van PCR-diagnostiek. RNA extracten van tripsen zijn gebruikt voor de PCR-detectie van INSV en trips zelf (interne PCR-controle). De Ct-waarde geeft relatieve informatie over de hoeveelheid trips, resp. INSV dat in het monster aanwezig was. Ct-waarden lager dan 35 zijn positief (Trips of INSV is aanwezig) ; Ct-waarden hoger dan 35 geven een negatief resultaat aan.

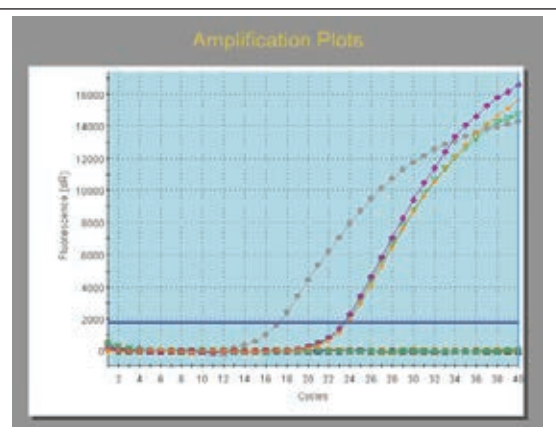
Nr.	Monster (code)	Trips PCR		INSV PCR	
		Ct (dR) (*)		Ct (dR)	PCR resultaat
		Figuur 8		Figuur 9	
1	G1	23.15	pos	No Ct	neg
2	G2	20.26	pos	No Ct	neg
3	G3	21.41	pos	No Ct	neg
4	G4	22.02	pos	No Ct	neg
5	G5	23.41	pos	No Ct	neg
6	K1	21.09	pos	No Ct	neg
7	K2	21.17	pos	No Ct	neg
8	K3	21.11	pos	No Ct	neg
9	K4	21.24	pos	No Ct	neg
10	K5	20.41	pos	No Ct	neg
11	Pos C, Trips met INSV (K1 (31-10-11))	21.93	pos	23.62	pos
12	Pos C, INSV in Hippeastrum	No Ct	Neg	17.17	pos
13	Neg C, non-template controle	No Ct	Neg	No Ct	neg
14	Neg C, non-template controle	No Ct	Neg	No Ct	Neg
15	Pos C, Trips met INSV (K1 (31-10-11))	22.23	Pos	23.41	pos
16	Pos C, Trips met INSV (K1 (31-10-11))	22.31	pos	23.8	pos

(*) Threshold: 1730.426

(**) Threshold: 597.822



Figuur 8. Amplificatie-curves voor de Trips-PCR. Het aantal cycli waarbij de stijgende S-curve de groene drempelwaardelijijn doorkruist, bepaald de Ct-waarde.



Figuur 9. Amplificatie-curves voor de INSV-PCR. Het aantal cycli waarbij de stijgende S-curve de blauwe drempelwaardelijijn doorkruist, bepaald de Ct-waarde.

INSV is niet aangetoond in alle 10 tripsmonsters (nr. 1 tot en met 10).

De kwaliteit/kwantiteit van RNA is goed (Ct-waarden van trips-PCR liggen tussen 20 en 24, afhankelijk van hoeveelheid geanalyseerde tripsen).

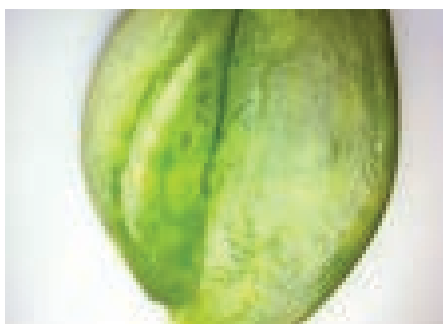
Experiment 3

In dit experiment zijn tripsen (adulten) direct op virusgeïnfecteerde Phalaenopsis-planten gezet. Nadat was vastgesteld dat er larven op deze planten voorkwamen, zijn zowel larve als adulten overgezet op gezonde paprikaplanten. Deze planten vertoonden na enige tijd wat typische virussyptomen die uiteindelijk zo heftig werden dat de planten het maar nauwelijks overleefden. In een ELISA test is het *Impatiens*-vlekkenvirus vastgesteld. Vervolgens zijn bij deze geïnfecteerde paprikaplanten gezonde Phalaenopsis-planten gezet. Tripsen hadden de keus naar welke planten ze gingen. De symptoomontwikkeling is gevolgd en na 4 weken werden de eerste symptomen bij Phalaenopsis-planten zichtbaar. Toetsing met een ELISA test bevestigde dat het hier ging om symptomen van *Impatiens*-vlekkenvirus. Opvallend was wel dat er niet of nauwelijks trips voorkwamen op de Phalaenopsis-planten.

4. Gezonde Phalaenopsis-planten, besmette waardplant voor het virus met een gevestigde tripspopulatie

Chrysant

Bij een partij chrysanten van een praktijkbedrijf is INSV vastgesteld en in deze chrysanten zaten erg veel tripsen. Een aantal adulten zijn verzameld en met behulp van de ontwikkelde PCR test, getoetst op de aanwezigheid van INSV. Dit kon worden bevestigd (Tabel 5.). Met een aantal tripsen uit deze besmette chrysanten zijn overdrachtsproeven gedaan. De tripsen zijn op bladeren van gezonde Phalaenopsis-planten uitgezet in een glazen pot. Zo werden de tripsen gedwongen op de bladeren te blijven en ze konden niet ontsnappen. Na ongeveer een week verschenen op de bladeren de eerste symptomen (Figuur 10.). In dit experiment was op de bladeren duidelijk de zuigschade van de tripsen te zien en de ontwikkeling van virusringen. De virusoverdracht is met behulp van een ELISA test vastgesteld.



Figuur 10. Virussyptomen op een oorspronkelijk gezonde Phalaenopsis veroorzaakt door tripsen afkomstig van INSV-besmette chrysanten.

Tabel 5. Detectie van INSV in tripsen met behulp van PCR-diagnostiek. RNA extracten van tripsen zijn gebruikt voor de PCR-detectie van INSV en trips zelf (interne PCR-controle). De Ct-waarde geeft relatieve informatie over de hoeveelheid trips, resp. INSV dat in het monster aanwezig was. Ct-waarden lager dan 35 zijn positief (Trips of INSV is aanwezig) ; Ct-waarden hoger dan 35 geven een negatief resultaat aan.

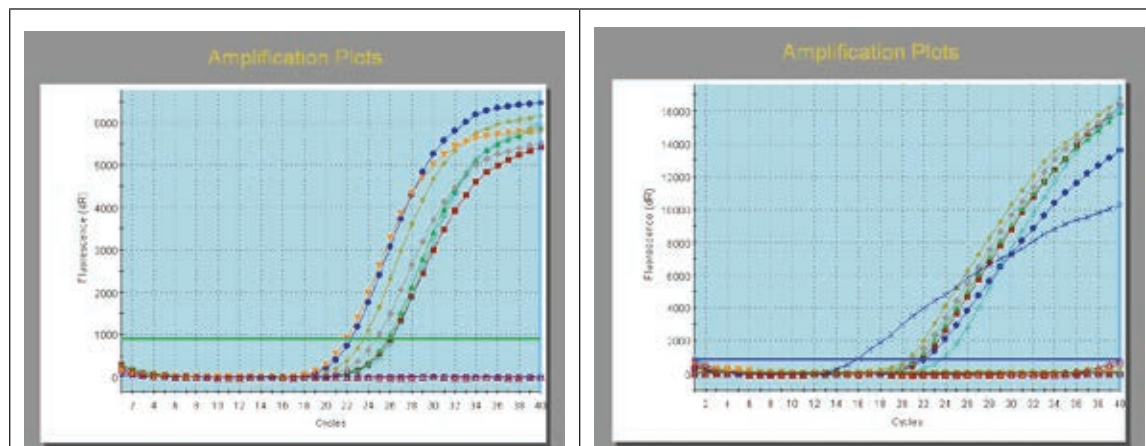
Nr.	Monster	Ct (dR) (*) Trips	Trips	Ct (dR) (**) INSV	INSV
			Figuur 11		Fig.12
1	5X Trips K1	22.41	pos	22.01	pos
2	5X Trips K2	26.02	pos	21.77	pos
3	5X Trips K3	25.77	pos	21.41	pos
4	5X Trips T1	24.73	pos	20.92	pos
5	5X Trips T2	23.57	pos	20.47	pos
6	5X Trips T3	26.24	pos	23.67	pos
7	Neg C, Non template controle	No Ct	neg	No Ct	neg
8	Trips 1 (11-10-2011) (***)	21.98	pos	No Ct	neg
9	INSV1 (11-10-2011) (****)	No Ct	neg	15.85	pos
10	Neg C, Non template controle	No Ct	neg	No Ct	neg

(*) HEX, Threshold (dR): 889.769, Trips-PCR (*Frankliniella occidentalis*)

(**) FAM, Threshold (dR): 856.261, INSV-PCR

(***) Trips controle

(****) INSV controle, geïnfecteerd Hippeastrum



Figuur 11. Amplificatie-curves voor de Trips-PCR. Het aantal cycli waarbij de stijgende S-curve de groene drempelwaarde lijn doorkruist, bepaald de Ct-waarde.

Figuur 12. Amplificatie-curves voor de INSV-PCR. Het aantal cycli waarbij de stijgende S-curve de blauwe drempelwaarde lijn doorkruist, bepaald de Ct-waarde.

INSV is aangetoond in alle zes (nr. 1 tot en met 6) tripsmonsters.

3.3 Detectie van virus in de vector

Met de speciaal voor de toetsontwikkeling gekweekte tripsen (gezond en geïnfecteerd met INSV) zijn de toetsen gevalideerd. In Tabel 6 zijn de resultaten vermeld waarbij de gevoeligheid van de toets is nagegaan bij gebruik van één of meerdere tripsen per monsters welke al dan niet geïnfecteerd waren met INSV.

Tabel 6. Overzicht van Q-PCR resultaten uitgevoerd op diverse RNA monsters voor gevoeligheid toetsing van PCR op trips en PCR op INSV.

Nr.	Code	Beschrijving van monster	Op.	Ct -waarde bij PCR Thrips (*)	Ct-waarde bij PCR op INSV (**)
1	T1	RNA van 1 trips	(1)	25.31	
2	T2	RNA van 2 trips		24.04	
3	T4	RNA van 4 trips		22.67	
4	T8	RNA van 8 trips		23.69	
5	T1+l	RNA van 1 trips + RNA van INSV	(2)	25.86	26.27
6	T2+l	RNA van 2 trips + RNA van INSV		25.41	26.66
7	T4+l	RNA van 4 trips + RNA van INSV		23.34	26.56
8	T8+l	RNA van 8 trips + RNA van INSV		24.6	27.00
9	I	RNA van INSV	(3)		25.61
10	lv	RNA van INSV 1/10	(4)		28.85
11	lvv	RNA van INSV 1/100			31.71
12	lvvv	RNA van INSV 1/1000			33.9
13	T1+l	RNA van 1 trips + RNA van INSV	(5)	25.8	26.62
14	T2+lv	RNA van 2 trips + RNA van INSV 1/10		25.32	29.44
15	T4+lvv	RNA van 4 trips + RNA van INSV 1/100		23.39	32.94
16	T8+lvvv	RNA van 8 trips + RNA van INSV 1/1000		24.64	34.95
17	NTC	Non template control		No Ct	No Ct
18	NTC	Non template control		No Ct	No Ct
19	T1+l	RNA van 1 trips + RNA van INSV	(6)	27.82	28.57
20	T1+l	RNA van 1 trips + RNA van INSV		27.99	28.73

(*) Threshold (dR) 710.71

(**) Threshold (dR): 2029.86

(1) RNA van trips

(2) RNA van toenemende aantal trips + RNA van INSV geïnfecteerd phalaenopsis (monster 11 van dec 2010), de mengverhouding is 1:1.

(3) RNA van INSV geïnfecteerd phalaenopsis (monster 11 van dec 2010).

(4) RNA van INSV geïnfecteerd phalaenopsis (monster 11 van dec 2010) + RNA van gezond phalaenopsis (monster 10) de mengverhouding is 1/10, 1/100, 1/1000.

(5) RNA van toenemende aantal trips + verdunningen van RNA van INSV geïnfecteerd phalaenopsis op RNA van gezond phalaenopsis.

(6) Duplex PCR (HEX+FAM)

In Tabel 7. is de verhouding van Ct-trips/Ct-INSV aangegeven.

Tabel 7. Verhouding van Ct-trips/Ct-INSV.

Code	Sample	Assay	Ct- thrips (*)	Assay	Ct-INSV (**)	Ct- thrips/ Ct-INSV
T1+l	1 thrips +INSV	HEX	25.80	FAM	26.62	0,96
T2+lv	2 thrips +INSV 1/10	HEX	25.32	FAM	29.44	0.86
T4+lvv	4 thrips +INSV 1/100	HEX	23.39	FAM	32.94	0.71
T8+lvvv	8 thrips +INSV 1/1000	HEX	24.64	FAM	34.95	0.70

(*) Ct neemt af bij toenemende aantal trips

(**) Ct neemt toe bij afnemende concentratie van INSV

De resultaten van de toetsen zijn als volgt:

1. Beide Taqman PCR toetsen voor detectie van thrips en detectie van INSV leveren goede resultaten. Toepassing van duplex PCR (2 toetsen in 1 reactie) is ook mogelijk, hierbij is een kleine remming van duplex PCR t.o.v simplex PCR waar te nemen. De Ct- waarde voor Trips PCR neemt toe van 25.31 naar 27.82 (of 27.99), voor INSV PCR neemt de Ct-waarde toe van 25.61 naar 28.57 (of 28.73)
2. Taqman PCR toets voor trips werkt op 1 exemplaar (Ct tussen 25 en 26)
3. Taqman PCR toets voor INSV geeft bij verdunning 1/1000 (ziek/gezond phalaenopsis) een waarde ca. 34 (33.9). Zelf een waarde van 35 (34.95) bij menging (1:1) met RNA van 8 thripsen.
4. NSV concentratie is hoog bij hoge waarde van Ct-trips/Ct-INSV verhouding.

4 Discussie en conclusie

Aantonen virus in geïnfecteerd plantmateriaal

- *Impatiens*-vlekkenvirus kan in *Phalaenopsis* alleen worden aangetoond in het weefsel dat symptomen vertoont. Deze symptomen bestaan meestal uit concentrische kringen.
- Het toetsen van het plantmateriaal kan worden uitgevoerd met zowel een ELISA test als een PCR test. In tegenstelling tot een ELISA test toont de PCR test soms nog net iets buiten de kringen het virus aan.
- Een ELISA test voor het aantonen van *Impatiens*-vlekkenvirus in weefsel dat symptomen vertoont voldoet prima en is een stuk goedkoper dan een PCR test.

Overdracht van INSV

- Het INSV kan worden overgebracht door de trips *Frankliniella occidentalis* van geïnfecteerde planten naar gezonde planten. Dit is alleen vastgesteld bij een gedwongen verblijf van de trips (in bladkooitjes) op *Phalaenopsis* planten.
- Wanneer er virusresistente waardplanten (in het onderzoek komkommer) met een gevestigde tripspopulatie bij besmette en gezonde *Phalaenopsis*-planten worden gezet, dan geeft de trips de voorkeur aan deze waardplanten. Op de *Phalaenopsis*-planten worden dan niet of nauwelijks tripsen waargenomen. Een virusoverdracht is dan ook niet aan de orde.
- In de situatie waarbij een gezonde waardplant voor het virus (in het onderzoek paprika) bij gezonde en besmette *Phalaenopsis*-planten wordt geplaatst en de tripsen kunnen kiezen, dan blijkt de keuze te vallen op de paprikaplanten. Een virusoverdracht wordt dan niet vastgesteld.

In geval van een gedwongen verblijf van de trips op eerst een geïnfecteerde *Phalaenopsis*-plant en vervolgens op paprikaplanten dan blijkt een virusoverdracht via de trips naar de paprikaplanten mogelijk. Dit met zeer heftige symptomen in de paprikaplant. Door vervolgens gezonde *Phalaenopsis*-planten bij deze paprikaplanten te plaatsen, waarbij de tripsen een vrije keus hebben, wordt wel een virusoverdracht mogelijk naar deze *Phalaenopsis*-planten. Zelfs nadat was vastgesteld dat er niet of nauwelijks tripsen op de *Phalaenopsis*-planten waren waargenomen. Op de geïnfecteerde paprikaplanten die bij de *Phalaenopsis*-planten zijn blijven staan zijn wel steeds tripsen waargenomen. Blijkbaar dienden deze paprikaplanten als virusbron en thuisbasis van de tripsen. Het feit dat de *Phalaenopsis*-planten wel geïnfecteerd raakte geeft aan dat de tripsen een 'uitstapje' maakte van de paprikaplanten naar deze planten.

- Besmette tripsen van een geïnfecteerde waardplant (in dit geval chrysanth) zijn in staat om het virus over te brengen naar gezonde *Phalaenopsis*-planten.

Detectie van virus in de vector

- Met de ontwikkelde PCR toets is het mogelijk gebleken om INSV aan te tonen in tripsen. Dit is zeer waardevol want met deze toets kun je tripsen toetsen die op planten worden waargenomen maar waar nog geen virussymptomen te zien zijn. Zo weet je of je met geïnfecteerde tripsen te maken hebt en dan kun je je maatregelen daar op aanpassen.

Op basis van de resultaten van dit onderzoek blijft het lastig te verklaren waarom de telers soms een grote aantasting kunnen hebben in hun planten. Mogelijk komt het virus met plantmateriaal (symptoomloos) mee en onder bepaalde omstandigheden worden de symptomen zichtbaar. Een andere mogelijkheid is dat geïnfecteerde tripsen van een virusbron van buiten de kas komen. Maar zoals uit de overdrachtsexperimenten is gebleken geven tripsen niet de voorkeur aan *Phalaenopsis*-planten. Het zou kunnen zijn dat geïnfecteerde tripsen de planten testen als geschikte voedselbron bij gebrek aan beter. Zodra ze een betere waardplant vinden zullen ze niet meer op de *Phalaenopsis*-planten blijven.

In de overdrachtsprouven is een verschil te zien tussen een gedwongen verblijf van de tripsen en een vrije keus. Bij een gedwongen verblijf van geïnfecteerde tripsen op gezonde bladeren zijn de symptomen al na ongeveer een week zichtbaar dit in tegenstelling tot de vrije keus waarbij symptomen rond de 4 weken zichtbaar waren.

Voorkomen en beheersen van een virus aantasting

- De beste controle van een plantenvirus is altijd het voorkomen van een infectie
- Zorg dat de Phalaenopsis planten afkomstig zijn van een betrouwbare, schone herkomst
- Inspecteer de binnenkomende planten op virussyptomen en trips
- Indien mogelijk isoleer de nieuwe partij planten totdat zeker is dat er geen virus in zit.
- Teel de planten apart van alle andere planten die waardplant kunnen zijn voor zowel tomatenbronsvlekken virus als *Impatiens*- vlekkenvirus of waardplant zijn voor trips.
- Kijk welke gewassen er in de omgeving worden geteeld zoals bijvoorbeeld chrysant en of deze besmet zijn met TSWV en/of INSV. Chrysant is een bekende waardplant voor zowel TSWV als INSV.
- Verwijder en vernietig alle planten die symptomen vertonen.
- Verwijder al het onkruid in en rond de kas, zij kunnen namelijk een reservoir zijn voor zowel virus als trips
- Geen planten vegetatief vermeerderen waarvan bekend is dat er virus in zit
- Voorkom dat jonge, schone planten naast oudere, mogelijk geïnfecteerde planten komen te staan
- Hang blauwe en gele vangplaten op om een eventuele populatie van trips waar te nemen.
- Controleer, tel en verwissel de vangplaten iedere week en neem maatregelen wanneer er (te) veel trips wordt waargenomen.
- Het risico op problemen door INSV valt in te perken met maatregelen rondom wisseling van planten (schoonmaak), de inzet van biologische bestrijders en het verwijderen van virusplanten en onkruiden.

5 Literatuur

- de Avila A.C., de Haan P., Kitajima E.W., Kormelink R., Resende R.O., Goldbach R.W., Peters D., 1992.
Characterization of a distinct isolate of tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Impatiens* sp. In the Netherlands.
Journal of Phytopathology 134: 133 - 151
- Vaira A.M., Roggero P., Luisoni E., Masenga V., Milne R.G., Lisa V., 1993.
Characterization of two tospoviruses in Italy: tomato spotted wilt virus and *impatiens* necrotic spot. *Plant Pathology* 42: 530 -542
- EPPO: *Impatiens* necrotic spot tospovirus, 2008.
In: *EPPO Data Sheets on quarantine pests*
- CABI/EPPO, 1998
Impatiens necrotic spot tospovirus. *Distribution Maps of Plant diseases*, No. 755. CAB International, Wallingford (GB)
- Baker C., Davison D., Scoates C., 2007.
White *Phalaenopsis* Ringspots - Mystery Solved. *Plant Pathology Circular* No. 406
- Zhang Q., Ding Y.-M., Li M., 2010.
First Report of *Impatiens necrotic spot virus* Infecting *Phalaenopsis* and *Dendrobium* Orchids in Yunnan Province, China. *Plant disease*, 94: 915
- de Angelis J.D., Sether D.M., Rossignol P.A., 1994.
Transmission of *impatiens* necrotic spot virus in peppermint by western flower thrips. *Journal of Economic Entomology*, 87:197-201 .
- Hu J.S., Ferrerira S., Wang M., Xu M.Q., 1992.
Detection of Cymbidium Mosaic Virus, Odontoglossum Ringspot Virus, Tomato Spotted Wilt Virus, and Potyviruses Infecting Orchids in Hawaii. *Plant Disease* 77: 464-468
- Koike S.T., Mayhew D.E., 2001.
Impatiens Necrotic Spot Virus found in *Oncidium* Orchids. *The Magazine of the American Orchid Society*. 70: 746-747
- Uga H., Tsuda S., 2005.
A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple tospovirus infections. *Phytopathology*. 95: 166-171
- Boonham N., Smith P., Walsh K., Tame J., Morris J., Spence N., Bennison J., Barker I., 2002
The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods*. 101 (1-2):37-48

Bijlage I Publicaties over of na aanleiding van het onderzoek naar INSV

Plantmateriaal met *Impatiens-vlekkenvirus* (INSV)

Voor het onderzoek aan INSV in Phalaenopsis is geïnfecteerd plantmateriaal nodig. De symptomen van INSV bestaan meestal uit concentrische kringen op vooral de jongste bladeren. Hieronder staan foto's met een aantal voorbeelden van virussymptomen in Phalaenopsis.



Heeft u planten met vergelijkbare symptomen neemt u dan aub contact op met Ineke Stijger. Voorkeur per e-mail: ineke.stijger@wur.nl of telefonisch: 0317 485628.

Nieuwe ziekte geeft concentrische gele ringen op het blad

Impatiensvlekkenvirus in phalaenopsis te lijf met hygiënemaatregelen

POTPLANTEN
ZIEKTEN & PLAGEN

Teilers van phalaenopsis vinden de laatste jaren een bladaantasting, die bestaat uit concentrische gele ringen. De vraag is: wat is dit en wat kun je doen om dit probleem te voorkomen, want de aangetaste planten zijn niet verkoopbaar. Onderzoekers van Wageningen UR Glastuinbouw stelden vast dat het om het impatiensvlekkenvirus gaat en geven advies hoe ermee om te gaan.

TEXTE EN BEELD: NARRAEN ARPESTELIJ

De eerste meldingen van het Impatiensvlekkenvirus (Impatiens necrotic spot virus, INSV) in phalaenopsis stammen uit 2009. Rond 2009 had 30% van de teilers last van het probleem. Veelal zijn het maar enkele planten met virus symptomen, waarbij de schade varieert van een enkele chlorotische kring tot afstervende bladdelen.

De heftigheid van de symptomen hangt volgens Ineke Stijger, virologe bij Wageningen UR Glastuinbouw, af van de combinatie van infectiedruk van de trips, de omstandigheden en de vatbaarheid van het gewas (onder andere het ras).

Brede waardplantenreeks

Volgens Stijger komt de ziekte behalve in Nederland volgens de literatuur ook voor in verschillende andere landen verspreid over de wereld. INSV komt bovendien niet alleen in phalaenopsis voor, maar in circa 250 verschillende waardplanten, waaronder veel bloemistergewassen (www.onderglas.nl, januari 2009, pagina 15-17) en in vruchtgroenten. "Het nadeel van zo'n brede waardplantenreeks is dat het risico op verspreiding groter is", geeft ze aan.

De onderzoekers gebruikten een ELISA-



De kenmerkende concentrische gele ringen.

toets en een moleculaire techniek, de nog gevoeliger PCR-toets, om het virus in de plant aan te tonen. "We hebben het virus alleen aan kunnen tonen in de bladsymptomen en niet in de wortels, bloemen, bladeren en zaden. Het virus verspreidt zich niet systemisch in de plant. De virusconcentratie neemt af in de tijd."

Door trips

INSV is een zogenaamd tospovirus, net zoals het tomatenbronsvlekkenvirus (TSWV) dat er veel op lijkt. Dat wil zeggen dat het virus door trips wordt overgedragen. In Nederlandse kassen is Californische trips (*Frankliniella occidentalis*) de voornaamste vector.

De manier van overbrengen is 'moelzaam'. Alleen tripslarven kunnen het virus opnemen en vermeerderen. Schone volwassen tripsen kunnen dat niet meer. Alleen 'besmette' volwassen tripsen kunnen het virus verspreiden.

Tripsdichte koolen

Het virus wordt dus niet mechanisch overgedragen door gewashandelingen en ook niet via zaad. Het kan wel meekomen met besmet uitgangsmateriaal, waarbij nog geen symptomen zichtbaar zijn. Tijdens een vegetatieve vermeerdering komt het virus in vele nakomelingen terecht.

Nu hoort Stijger regelmatig van teilers dat ze nooit trips op hun gewas zien. "In overdrachtsexperimenten hebben we aan kunnen tonen dat Californische trips wel degelijk kan overleven en zich voortplanten op phalaenopsis, maar dat het geen geweldige waardplant is. We hebben deze proef uitgevoerd in tripsdichte koolen of bladkooitjes met daarin de trips *Frankliniella occidentalis*. In de proeven vonden we tripsschade op het blad, de stengel en de bloem."



Ineke Stijger: "De schade door INSV varieert van een enkele chlorotische kring tot afstervende bladdelen."

Detectiemethode

Om 100% zeker te zijn dat de tripsen inderdaad het virus over kunnen brengen, heeft Stijger dit in het laboratorium nog eens getest. Daarvoor heeft ze eerst in samenwerking met onderzoeker Khanh Pham van WVO Bloembollen een methode ontwikkeld om het virus in de trips zelf aan te tonen.

"We kunnen zo snel nagaan of trips op met virus besmette planten ook daadwerkelijk geïnfecteerd is. Geïnfecteerde tripsen kunnen we gebruiken voor overdrachtsexperimenten. Zo hebben we bijvoorbeeld aangetoond dat virus symptomen op een oorspronkelijk gezonde phalaenopsis zijn veroorzaakt door tripsen afkomstig van met INSV besmette chrysanthen."

De proeven, gefinancierd door het Productieschap Tuinbouw, zijn gedaan in tripsdichte koolen om er zeker van te zijn dat er geen besmette tripsen van buitenaf bij kunnen.

Praktijkadvies

Op basis van de gezonde resultaten heeft Stijger een lijstje van adviezen opgesteld om INSV bij phalaenopsis onder controle te houden. Het gaat daarbij vooral om hygiënemaatregelen: Zorg voor planten van een betrouwbare herkomst; voorkom trips; verwijder planten met symptomen (ziektebron); verwijder onkruid (mogelijke ziektebron) en kijk welke gewassen er in de omgeving worden geteeld. Bijvoorbeeld chrysanthen kan problemen hebben met TSWV en INSV en wees in dat geval extra alert.



Impatiens-vlekkenvirus in Phalaenopsis

Ineke Stijger, Pierre Ramakers, Roel Hamelink

Achtergrond

In de teelt van Phalaenopsis worden telers de laatste jaren geconfronteerd met een bladsymptoom, bestaande uit concentrische kringen op vooral de jongste bladeren.

De aantasting varieert van mild (een enkele chlorotische kring) tot ernstig (afstervende bladdelen). In een oriënterend onderzoek uitgevoerd door Wageningen UR Glastuinbouw is de aanwezigheid van *Impatiens-vlekkenvirus* (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) vastgesteld.



Virus en vector

INSV is een virus met een brede waardplanten reeks, dat in veel siergewassen voorkomt. Volgens de literatuur wordt dit virus uitsluitend overgedragen door trips, zij het op een "moeizame" manier. In kassen is californische trips (*Frankliniella occidentalis*) de voornaamste vector. Het virus wordt door de tripslarven opgenomen en vermeerderd, en later door de

volwassen exemplaren verspreid. "Schone" volwassen tripsen kunnen het virus niet meer opnemen.



Verspreiding van virus

Telers geven aan dat zij weinig of geen trips in het gewas waarnemen. Voor hen is het daarom de vraag waar het virus vandaan komt, en welke maatregelen ze moeten nemen als het virus op het bedrijf aanwezig is.

Doel van het onderzoek

De epidemiologie van deze virusziekte is nog grotendeels onbegrepen. Doel van het onderzoek is om informatie te verzamelen die het telers mogelijk maakt besmetting te voorkomen en interne verspreiding tegen te gaan.

Inrichting van het onderzoek

Het onderzoek bestaat uit een aantal onderdelen:

- A. Aantonen van het virus in geïnfecteerd plantmateriaal.
 - verschillende plantedelen worden getoetst op de aanwezigheid van INSV
 - hierbij worden twee toetsmethode gebruikt (ELISA en PCR)
- B. Overdrachtsexperimenten
 - deze worden uitgevoerd in tripsdichte kooien met *Frankliniella occidentalis* als vector
- C. Detectie van virus in de vector

Wageningen UR Glastuinbouw
Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk
Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk
Tel.: 0317 485606
F: 0317 485602

Dit project is november 2010 gestart en loopt tot en met 31 december 2011

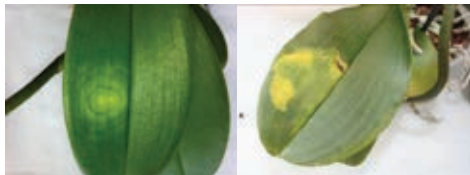
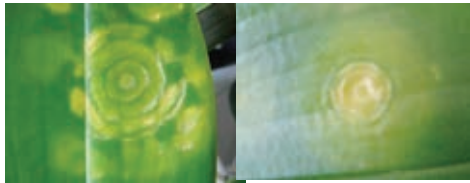


Impatiens-vlekkenvirus in Phalaenopsis

Ineke Stijger, Roel Hamelink, Wageningen UR Glastuinbouw
Khanh Pham. PPO BBF

Achtergrond

In de teelt van Phalaenopsis worden telers de laatste jaren geconfronteerd met een bladsymptoom, bestaande uit concentrische kringen. De aantasting varieert van mild (een enkele chlorotische kring) tot ernstig (afstervende bladdelen). In een onderzoek uitgevoerd door Wageningen UR Glastuinbouw is de aanwezigheid van *Impatiens*-vlekkenvirus (Impatiens necrotic spot virus, INSV) vastgesteld.



Virus en vector

INSV is een virus met een brede waardplanten reeks, dat in veel siergewassen voorkomt. Volgens de literatuur wordt dit virus uitsluitend overgedragen door trips, zij het op een "moeizame" manier. In kassen is californische trips (*Frankliniella occidentalis*) de voornaamste vector. Het virus wordt door de tripslarven opgenomen en vermeerderd, en later door de volwassen exemplaren verspreid. "Schone" volwassenen

tripsen kunnen het virus niet meer opnemen.

Aantonen van virus

- Het virus kan alleen worden aangetoond in de bladsymptomen.
- Hierbij kunnen twee toets methoden worden gebruikt (ELISA en PCR).
- Het virus verspreidt zich niet systemisch in de plant.
- De virustiter is over het algemeen laag en neemt af in de tijd.

Overdrachtsexperimenten

Deze worden uitgevoerd in tripsdichte kooien of bladkooitjes met *Frankliniella occidentalis* als vector



Schade op de bloemstengel veroorzaakt door trips.

Detectie van virus in de vector

Voor het detecteren van het virus in de vector is succesvol een toetsmethode ontwikkeld. Zo kan in het onderzoek snel worden nagaan of trips op virusbesmette planten ook daadwerkelijk geïnfecteerd zijn. Deze tripsen kunnen dan gebruikt worden voor overdrachtproeven.



Virussymptomen op een oorspronkelijk gezonde Phalaenopsis veroorzaakt door tripsen afkomstig van

De bloemen- en plantensector investeert in dit project via het



Bijlage II Phalaenopsis planten

Phalaenopsis planten		datum ontvangst	bladsymptomen	bloemsymptomen	bijzonderheden
INP 1		2-11-2010	op jongste blad grote kringen plus necrose	wel bloemen maar geen symptomen	
INP 2		2-11-2010	op jongste blad vage tekening vooral langs de rand, op 1 na jongste blad 1 grote kring + vergeling, op blad daaronder ook een vage tekening	geen bloemen	
INP 3		2-11-2010	jongste blad 1 grote kring	wel bloemen en één daarvan is afwijkend, een beetje gelig	
INP 4		2-11-2010	1 na jongste blad meerdere kringen bij elkaar, deels verzonken, ook symptomen op de onderkant van het blad	geen bloemen	
INP 5		5-11-2010	3e blad van boven, chlorotisch, deels verzonken. Langs rand vage kringen, oudst blad vage kringen	geen bloemen	
INP 6		5-11-2010	jongste blad grote gele vlek (bestaat uit vele (k)ringen)	wel bloemen geen symptomen	
INP 7		5-11-2010	3e blad van boven, één grote ronde kringen met verzonken rand	bloemknoppen	
INP 7a		5-11-2010	3e blad van boven en 5e blad en oudste blad, meerder kringen, buitenrand verzonken	geen bloemen	
INP 8		8-11-2010	Op jongste bladeren geen symptomen. Op oudste blad kringen met al dan niet ingezonken kern die soms necrotisch is geworden, blad is over het geheel wat gelier. Op het één na oudst blad zijn wat kringen te zien en deze verschillen in grootte.	Geen bloemen aan deze plant	
INP 9		8-11-2010	Op de twee jongste bladeren geen symptomen. Op het oudste blad vele kringen met al dan niet ingezonken kernen die over het algemeen necrotisch zijn. Gehele blad is gelig met hier en daar necrotisch plekken. Op de bladeren daarboven verschillende grote en kleine kringen met een al dan niet ingezonken kern en soms necrotisch. Deze bladeren zijn nog wel groen.	Geen bloemen aan deze plant	
INP 10		8-11-2010	De twee jongste bladeren laten geen symptomen zien. Op het oudste blad (vooral aan het uiteinde) veel kringen met over het algemeen ingezonken kernen die meestal necrotisch zijn. Blad wordt al wat gelier. Op één na oudste blad een aantal kringen (zitten bij elkaar).	Geen bloemen aan deze plant	
INP 11		8-11-2010	Op de drie jongste bladeren geen symptomen. Op het oudste blad een aantal kringen. Blad wordt in zijn geheel wat gelier. Op het één na oudste blad een aantal kringen die bij elkaar liggen.	Geen bloemen aan deze plant	
INP 12		8-11-2010	Op het jongste blad geen symptomen. Op de andere drie bladeren een aantal kringen, verschillend in grootte, met op het oudste blad ook wat ingezonken kernen die necrotisch zijn of worden.	Geen bloemen aan deze plant	
INP 13		26-11-2010	Op 1 na jongste blad 1 grote plek gevormd door ringen. Op 2 na jongste blad en paar onregelmatige vlekken		
INP 14		26-11-2010	Op 1 na oudste blad grote plek gevormd door ingezonken necrotische ringen		
INP 15		26-11-2010	Op 1 na oudste blad 1 grote plek gevormd door necrotische ringen in het midden 1 grote ronde necrose		
INP 16		14-12-2010	vele kleine gele plekjes op een blad	geen bloemen	
INP 17		14-12-2010	gelige plekjes met hier en daar necrose	geen bloemen	
INP 18		14-12-2010	kringschtige plekjes, meerder op een blad	geen bloemen	

Phalaenopsis planten			bladsymptomen	bloemsymptomen	bijzonderheden
INP	datum ontvangst				
INP 19	10-6-2011	twee kringen op 1 blad, zitten tegen elkaar.		stengel met knoppen	
INP 20	10-6-2011	grote kringen op oudste blad, mooi zichtbaar aan de onderkant van het blad. In het midden van de kring zit een necrose. Aan de rand dat blad zitten nog een aantal necroses. Aanprik plaatsen van de trips?		stengel met knoppen	
INP 21	10-6-2011	vage kringen aan de buitenrand van een blad		stengel met knoppen	
INP 22	10-6-2011	meerdere kringen op oudste blad, tipsschade op punt van het blad en ook lijkt er tripsschade te zitten langs de nrf van het blas		stengel met knoppen	
INP 23	10-6-2011	kringen in het midden en daaromheen een brede lichtgele rand		stengel met knoppen	
INP 24	13-7-2011	aan uiteinde van jongste blad gelige kringen			
INP 25	13-7-2011	vage vlek lijkt uit een middenpunt op het blad te beginnen		stengel met knoppen	
INP 26	13-7-2011	licht ingezonken plek op een blad, (nog) geen kringen er omheen		stengel met knoppen	
INP 27	13-7-2011	plant met afwijkende symptomen, lijkt meer op kouschade			
INP 28	13-7-2011	plant met afwijkende symptomen, lijkt meer op kouschade		stengel met knoppen	
INP 29	31-8-2011	licht gelige vlek aan de buitenrand van het blad (jongste blad)		stengel met knoppen	
INP 30	31-8-2011	een grote lichtgele vlek (geen kringen) op het midden van het blad (jongste) en vele licht gele vlekjes aan de buitenrand van het blad)		stengel met knoppen	
INP 31	31-8-2011	grote heelgele vlek met ingezonken kringen er omheen, in het midden van de vlek is het groen. Aan de rand van het blad (jongste) een aantal heelgele vlekken, geen kringen er omheen		stengel met knoppen	
INP 32	31-8-2011	kringen om een necrose liggen als een halve cirkel aan de rand van een blad. Meer in het midden van het blad ook kringen rond een necrotische plek in het midden. Kringen ook licht ingezonken.		stengel met knoppen	
INP 33	31-8-2011	aan het uiteinde van een blad twee grote necrotische, gelige vlekken		stengel met knoppen	
INP 34	31-8-2011	vage gelige kringen aan het begin van het jongste blad		stengel met knoppen	
INP 35	31-8-2011	lichtgele ronde kringen met in het midden twee puntjes		stengel met knoppen	
INP 36	31-8-2011	op een paar plaatsen necrose aan de rand van het blad en gele plekken daar omheen. Opvallend is dat dit voorkomt op één bladheft		stengel met knoppen	
INP 37	31-8-2011	vage gelige vlekjes aan het begin van het blad		stengel met knoppen	
INP 38	31-8-2011	felgele ronde plekjes met daaromheen gele kringen, hier en daar begint een plekje necrotisch te worden		stengel met knoppen	

