

Thema C (voordrachten)

Identificatie, signalering en epidemiologie

V-C1

Pepino mozaïek virus, een nieuw virus in de tomatenteelt

R.A.A. van der Vlugt¹, C.C.M.M. Stijger²,
J.Th.J. Verhoeven³, and J.W. Roenhorst³

¹Plant Research International, Postbus 16,
6700 AA Wageningen

²Proefstation voor Plant en Omgeving Naaldwijk, Postbus 8,
2670 AA Naaldwijk

³Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102,
6700 HC Wageningen

In het begin van 1999 werd de Nederlandse tomatenteelt plots geconfronteerd met een nieuw en zeer besmettelijk virus. In korte tijd greep het virus om zich heen en in een gezamenlijke inspanning van het Proefstation voor Plant en Omgeving te Naaldwijk (PPO-Naaldwijk), de Plantenziektenkundige Dienst (PD) en Plant Research International, werd het geïdentificeerd als Pepino mosaic virus (PepMV). Dit virus behoort tot de groep van de potexvirussen, virussen die zich kenmerken door een hoge mate van besmettelijkheid en persistentie. Voor Europa bleek het een nieuw virus en de enige beschikbare beschrijving van het virus dateerde van 1980 en betrof een infectie van pepino planten (*Solanum muricatum*) in 1974 in Peru.

Inmiddels is PepMV uit meerdere landen binnen en buiten Europa gemeld. Het staat op de Alert list van EP-PO en een Europese beschikking verplicht landen een actief beleid te voeren om het virus uit te roeien.

Binnen Nederland is er inmiddels al veel onderzoek naar de eigenschappen van het virus gedaan, de mate en gevaar van verspreiding en de gevaren voor de teelt van tomaten. Er zal een overzicht worden gegeven van alle onderzoek binnen PPO, PD en PRI en de inspanningen tot op heden om het virus te beteugelen.

V-C2

Sla-bobbelblad, een complex van twee virussen?

M. Verbeek, A.M. Dullemans en F. van der Wilk

Plant Research International BV, Postbus 16,
6700 AA Wageningen

Al sinds de eerste melding van de sla-bobbelbladziekte in de Verenigde Staten van Amerika is er door veel onderzoekers naarstig gezocht naar de veroorzaker ervan. De ziekte wordt overgebracht door de wortels-infecterende bodemschimmel *Olpidium brassicae*. Er is geen resistentie gevonden in slarassen en wilde *Lactuca*-soorten en de veroorzaker van sla-bobbelblad kan wel meer dan twintig jaar in de rustsporen van de schimmel infectieus blijven. Het is dan ook niet verwonderlijk dat sla-bobbelblad een wereldwijd probleem vormt in de slateelt.

In de jaren tachtig werden staafvormige virusdeeltjes gevonden in geïnfecteerde sla. Dit virus werd geassocieerd met de ziekte en *Sla-bobbelbladvirus* genoemd. Echter, door de extreme labiliteit van dit virus mislukten alle pogingen om het virus te isoleren en terug te inoculeren naar sla.

Recent werd een tweede virus gevonden in sla met sla-bobbelbladsymptomen. Dit virus behoort tot het genus *Ophiovirus* en is evenals het *Sla-bobbelbladvirus* zeer instabiel.

Op dit moment zijn beide virussen uit het complex geïsoleerd en worden nu verder gekarakteriseerd om te bepalen welke van de twee, of misschien het complex van beiden, de sla-bobbelbladziekte veroorzaakt. Adequate zuiveringsmethoden zijn ontwikkeld waardoor antisera kunnen worden geproduceerd.

VOORDRACHTEN

V-C3

Variatie in *Fusarium*-isolaten afkomstig van diverse bloembolgewassen

S.J. Breeuwsma en M. de Boer

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, sector bloembollen,
Vennestraat 22, Postbus 85, 2160 AB Lisse

De bodemschimmel *Fusarium* veroorzaakt in diverse bloembolgewassen economische schade. Er worden verschillende maatregelen getroffen, zoals chemische bestrijding, om de ziekte te beheersen maar deze werken niet afdoende of zijn niet meer toegelaten. Een alternatief is het kweken van resistente bolgewassen. Om dit te bereiken is inzicht nodig in de verschillende *Fusarium* soorten die in de bolgewassen ziekten veroorzaken zodat er in de toekomst adviezen kunnen worden gegeven over vruchtwisseling en resistentieveredeling.

Op het PPO in Lisse worden *Fusarium* soorten afkomstig van Amaryllidaceae en Liliaceae gekarakteriseerd aan de hand van morfologische kenmerken en met behulp van ITS-PCR. Om te onderzoeken of tussen isolaten onderling verschillen aanwezig zijn is er een VCG indeling en RAPD-PCR uitgevoerd.

Gebleken is dat er veel variatie bestaat tussen *Fusarium* isolaten afkomstig van bolgewassen. Elk onderzochte bolgewas bevat een eigen *Fusarium* soort of soorten. Tussen de isolaten onderling, afkomstig van één bolgewas, is bij de gewassen tulp en hyacint geen variatie aangetoond. Bij de gewassen amaryllis, narcis en nerine bestaat wel variatie tussen de isolaten onderling. Bij de gebruikte technieken is er een verband aanwezig tussen de indeling in groepen bepaald met behulp van VCG indeling en bepaald met behulp van RAPD-PCR.

V-C4

Multiplex detectie van plant (quarantaine) pathogenen met behulp van micro-arrays: een innovatief gereedschap voor plant gezondheidsmanagement

C.D. Schoen, M. de Weerd, A.G.C.L.
Speksnijder, C. Zijlstra en P.J.M. Bonants

Plant Research International B.V., Postbus 16,
6700 AA Wageningen

Het detecteren van schadelijke (quarantaine (Q)) organismen in plantaardig vermeerderings materiaal is

noodzakelijk om een veilige en duurzame landbouw in Europa te garanderen. Vele verschillende technieken zijn beschreven voor de detectie van gewasbelagers, elk met zijn eigen protocol, als ook apparatuur, reagentia en vooral expertise. Als verschillende pathogenen tegelijk gedetecteerd moeten worden, is deze benadering kostbaar. De hoeveelheid verschillende toegepaste methoden voor detectie van een bepaald pathogeen leidt tot een gebrek aan consistentie tussen de diverse test laboratoria in Europa en staat standaardisatie in de weg.

Micro-array technologie, waarbij duizenden verschillende oligo's of eiwitten gespot kunnen worden op een vierkante cm, maakt het mogelijk dat in hetzelfde monster vele verschillende target moleculen tegelijkertijd gedetecteerd kunnen worden, waarbij de specificiteit zelfs groter is. Daardoor kunnen micro-arrays voldoen aan de eis van een snelle, specifieke, efficiënte, kosteneffectieve, gebruikersvriendelijke en betrouwbare multiplex detectie-methode voor verschillende gewasbelagers (of plantpathogenen). Om de micro-array technologie geschikt te maken voor diagnostische toepassingen, moeten allereerst generieke extractie methodes voor DNA en RNA ontwikkeld worden. Ten tweede, moet de gevoeligheid verbeterd worden, bijvoorbeeld via generieke pre-amplificatie methodes, om ook lage concentraties van de geëxtraheerde nucleïne-zuren te kunnen detecteren.

Momenteel zijn verschillende extractiemethodes beschreven voor complexe matrices om pathogenen in lage concentraties te detecteren. Vooruitgang is geboekt in de ontwikkeling voor generieke amplificatie voor (groepen van) pathogenen.

Recent is een revolutionaire poreuze capillaire micro-array ontwikkeld door PamGene B.V. De capaciteit van deze drie-dimensionale array om oligonucleotides te binden is groter dan de conventionele twee-dimensionale glas array, resulterend in een grotere gevoeligheid. Bovendien laat het poreuze materiaal actief 'fluxen' van het materiaal toe wat resulteert in snelle hybridisatie-tijden van slechts vijftien minuten in plaats van de gebruikelijke achttien uur op glas.

Recente data om plant-pathogenen te detecteren in deze multiplex setting worden bediscussieerd.

V-C5

Phytophthora ramorum, een plotselinge bedreiging van onze eik

R.P. Baayen¹, P.J.M. Bonants², W.A. Man in 't Veld¹, A.W.A.M. de Cock³ en S. Werres⁴

¹ Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen

² Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen

³ Centraalbureau voor Schimmelcultures, Postbus 85167, 3508 AD Utrecht

⁴ Institute for Plant Protection in Horticulture, Messeweg 11/12, Braunschweig, Germany

Sinds 1995 brengt Sudden Oak Death in Californië grote schade toe aan eiken. Honderden jaren oude bomen sterven in enkele maanden af. In 2000 werd ontdekt dat de ziekte veroorzaakt wordt door een nieuwe *Phytophthora*. Eind 2000 rees het vermoeden dat die soort identiek is aan een nieuwe *Phytophthora* (*P. ramorum*) die sinds 1993 in Nederland en Duitsland incidenteel voorkomt op *Rhododendron* en *Viburnum*, en daarop bladvlekken, twijgsterfte en stamkanker veroorzaakt. Spoedonderzoek van PD, PRI, CBS, BBA Braunschweig en Californische onderzoeksgroepen heeft aangetoond dat het om dezelfde soort gaat. Moleculair (ITS, AFLP, isozymen) en morfologisch is er hooguit op populatieniveau verschil, maar het is onzeker of dat betekent dat de Europese en Californische populaties verschillen in pathogeniteit. Beide populaties lijken geïmporteerd (Azië?). Tot nog toe zijn er geen zieke eiken in Nederland gerapporteerd. Komt dat door klimaatverschillen? of zijn Europese eiken resistent? of verschillen de schimmelpopulaties toch in pathogeniteit? Het potentiële risico van *P. ramorum* voor Europa is enorm. De onzekerheid echter ook. Welke maatregelen moet de PD nemen? Deze casus laat zien dat snel, top-of-the-art onderzoek cruciaal is bij nieuwe bedreigingen in de natuur. Onderzoek is meer dan geld of hobby: het is een harde noodzaak voor onze samenleving.

V-C6

Ontwikkeling en validatie van een snelle PCR detectiemethode voor pathogene isolaten van Guignardia citricarpa op sinaasappel

P.J.M. Bonants¹, G.C. Carroll², M. de Weerd¹, I.R. van Brouwershaven³ en R.P. Baayen³

¹ Plant Research International B.V. Business Unit Biointeracties en Plantgezondheid, Postbus 16, 6700 AA Wageningen

² Department of Biology, 1210 University of Oregon, Eugene, OR, USA

³ Plantenziektenkundige Dienst, Sectie Mycologie, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen

Citrus black spot, veroorzaakt door de quarantaineschimmel *Guignardia citricarpa* Kiely (EU A1 lijst), is een vruchtziekte die veel schade veroorzaakt op plaatsen waar citrus wordt gekweekt (Azië, Australië, Zuid-Amerika en Zuid-Afrika). De schimmel is pathogeen op diverse citrussoorten. De symptomen van de ziekte zijn allerlei spots (lesies) op de vruchten, waarin wel of geen pycniden aanwezig kunnen zijn. De lesies zijn niet altijd eenduidig en kunnen gemakkelijk worden verward met lesies die door andere schimmels worden veroorzaakt.

Tijdens intercepties in de Rotterdamse haven worden vaak symptomen gezien waarvan onzeker is of ze te wijten zijn aan *G. citricarpa* of niet. Om twijfelgevallen op te lossen zijn momenteel een incubatie- en een kweekmethode beschikbaar; beide zijn gebaseerd op klassieke identificatie van de schimmel. Deze diagnosemethoden vergen veel tijd. Daar de handelswaarde tijdens een onderzoek van veertien dagen kan afnemen tot minder dan de helft, is er dringend behoefte aan een snelle diagnostische methode, die onverminderd betrouwbaar is en die ook onderscheid maakt tussen pathogene en niet-pathogene stammen.

In ons onderzoek zijn hiervoor isolaten verzameld uit lesies met en zonder pycniden van diverse citrussoorten. Op DNA ervan zijn allerlei moleculaire technieken toegepast: AFLP DNA fingerprint analyse en sequentieanalyse van het rDNA. Op basis van de resultaten is een op PCR gebaseerde detectiemethode ontwikkeld met een interne controle, die toegepast kan worden op lesies met en zonder pycniden en die specifiek is voor de pathogene vormen van *Guignardia citricarpa*.

Tenslotte is deze methode gevalideerd te samen met de incubatie- en de kweekmethode.

De PCR methode bleek veel betrouwbaarder dan de twee klassieke diagnose methoden.

De ontwikkelde methode vormt de basis voor het gestandaardiseerde EPPO-diagnose-protocol.

VOORDRACHTEN