

Stammenstrijd binnen aardappelvirus Y

René van der Vlugt en Chris Cuperus

Plant Research International BV, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB, Wageningen. E-mail: Rene.vanderVlugt@wur.nl

Aardappelvirus Y is niet alleen een belangrijk probleem in de aardappelteelt, maar ook wereldwijd in tal van andere gewassen. Voor aardappel zijn van oudsher drie stammen belangrijk. De laatste jaren is er in aardappel een aantal nieuwe stammen beschreven die beduidend meer schade veroorzaken. Met name de PVY-NTN stam, waaraan ernstige knolsymptomen worden toegeschreven, baart wereldwijd zorgen. Onderzoek aan verschillende oude en nieuwe stammen van aardappelvirus Y bracht recombinatie van genetisch materiaal van het virus aan het licht. Deze recombinatie lijkt meer algemeen dan eerder werd aangenomen en is een nieuw bewijs voor het grote aanpassingsvermogen dat virussen tot zulke bijzondere ziekteverwekkers maakt.

Inleiding

In tegenstelling tot wat de naam wellicht suggereert is het aardappelvirus Y (Potato virus Y of PVY) niet alleen een virus van aardappel. Het veroorzaakt ook problemen in belangrijke gewassen zoals tomaat, paprika en tabak en is daarmee wereldwijd een economisch zeer belangrijk en daardoor ook een veel bestudeerd virus. Op grond van diverse biologische kenmerken worden er verschillende stammen van het virus onderscheiden. Zo worden, afhankelijk van symptomen, stammen als necrotisch of als mozaïek veroorzakend geclassificeerd. Het al dan niet doorbreken van bepaalde resistentiegenen in bijvoorbeeld paprika geldt als basis voor een indeling in stammen.

In Nederland is het virus vooral een probleem in de aardappelteelt. Jaarlijks zorgt het voor opbrengstderving in de consumptie- en zetmeelaardappelteelt, maar met name in de teelt van aardappelpootgoed veroorzaakt het de grootste schade. De kwaliteit, en daarmee de waarde van dit belangrijke exportproduct, wordt

mede bepaald door de maximale hoeveelheid virus die in een partij knollen voor mag komen. Keurmeesters van de Nederlandse Algemene Keuringsdienst (NAK) beoordelen het gewas in het veld op symptomen voor aardappelvirus Y en ook voor een aantal andere virussen zoals het aardappelbladrolvirus (Potato leafroll virus of PLRV). Naast veldkeuringen worden blad en/of knollen ook in het laboratorium met behulp van ELISA ('Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay') onderzocht op het voorkomen van verschillende virussen. Steekproefsgewijs worden dan het daaropvolgend jaar de keuringsresultaten geverifieerd door knollen van bepaalde partijen op het "controleveld" na te telen en te beoordelen op virus-symptomen zoals bont en bladrol. Ondanks alle controlemaatregelen blijft PVY een terugkerend probleem. Niet alleen omdat het met de aardappelknollen overgaat, maar met name omdat het steeds opnieuw in het gewas gebracht wordt. Bladluizen zijn in dit geval de voornaamste boosdoeners. Bladluizen verwerven het virus omdat het aan hun snuit blijft

plakken als ze hun stekende monddelen (de zgn. styletten) in een virusziek blad steken om bij het suikerrijke floeemsap te komen. Bladluizen proeven altijd even of ze een plant wel lekker vinden. Zo'n proefboring, die niet meer dan enkele seconden duurt, is al voldoende om het virus op te nemen. Vliegt een bladluis vervolgens naar een gezonde plant dan wordt het virus ook al binnen enkele seconden weer afgegeven. Bespuitingen met insecticiden helpen om totale bladluispopulaties onder controle te houden maar verhinderen de overdracht van PVY niet. Hiervoor kan alleen nog met minerale olie worden gespoten. Een dun laagje olie over het blad spoelt als het ware het virus van de styletten van de bladluis als die wil proeven van de plant. Er moet alleen wel vrijwel wekelijks worden gespoten omdat nieuw gegroeide plantdelen natuurlijk niet beschermd zijn. Jaarlijks komen er zo honderden tonnen olie in het milieu terecht als bestrijdingsmiddel tegen virusoverdracht.

De stammen van aardappelvirus Y.

Aardappelvirus Y is al sinds de jaren 20 van de vorige eeuw bekend in Nederland. Tot begin jaren 80 waren er in aardappel drie stammen belangrijk. Van oudsher wordt het onderscheid tussen die drie verschillende aardappelstammen van het virus gemaakt op basis van typische symptomen op bepaalde aardappelcultivars en/of

ARTIKEL



Figuur 1. Typisch bont op aardappelras Bintje veroorzaakt door PVY-N.

toetsplanten (De Bokx en Cuperus, 1978). Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen symptomen die ontstaan na infectie van een gezonde aardappelplant met PVY tijdens het groeiseizoen (de primaire symptomen) en symptomen van planten die groeien uit met PVY geïnfecteerde knollen (de secundaire symptomen) (Cuperus en van de Haar, 2002). De uiteindelijke symptomen worden bepaald door de combinatie van aardappelcultivar en virusstam.

PVY-O ('old') is de oudst bekende stam van het aardappelvirus Y. Bij een primaire infectie kan het geïnfecteerde blad reageren met necrose, verdorren en vervolgens afvallen of aan de stengel blijven hangen, waardoor de z.g. palm-type ontstaat. Bij secundaire symptomen komt krinkel, gepaard gaande met bladnecrose en, afhankelijk van het ras, stippelstreep voor. In sommige aardappelrassen kan ook necrose van de knollen optreden. PVY-C ('common') kwam in de jaren dertig op. Primaire symptomen kunnen variëren van stippelstreep tot bont. Secundair geïnfecteerde planten vertonen symptomen variërend van stippelstreep en bont of krinkelbont. Aardappelrassen die primair met bontsymptomen reageren zullen ook secundair met bont of krinkelsymptomen reageren. In aardappelcultivars die primair met ne-

crose (stippelstreep) reageren kan ook necrose in de knol optreden. Eind jaren vijftig kwam PVY-N ('new') in Nederland terecht. Deze stam werd snel de belangrijkste stam in het veld omdat de meeste aardappelcultivars met slechts een zwak mozaïek van de bladeren ('bont') reageerden op een infectie. Secundaire infecties zijn meestal iets duidelijker. Ook wordt soms een oppervlakkige necrose van knollen waargenomen. Naast deze drie PVY-stammen zijn in de loop van de tijd nog andere afwijkende isolaten gerapporteerd. Een van de eerste was 'Gladblaadje', een in eerste instantie voor een PVY-C versleten isolaat. Later bleek dit isolaat zoveel af te wijken dat het als een apart virus (aardappel-

virus V of PVV) is benoemd. In het buitenland zijn ook diverse afwijkende isolaten gevonden. De bekendste zijn de PVY-N 'Wilga' isolaten, PVY-Z en PVY-NTN. Dit laatste isolaat, nog het meest verwant met PVY-N, wordt verantwoordelijk gehouden voor Potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). Dit ziektebeeld, dat zich voor het eerst in 1978 in Hongarije openbaarde, kenmerkt zich door ringvormige necrotische plekken op de aardappelknollen die zich vaak bij of kort na de oogst opbaren. PVY-NTN doorbreekt de veldresistentie tegen PVY-N in veel cultivars en zorgt nog steeds voor de nodige problemen in de aardappelteelt.

Toetsing op PVY

De symptomen van PVY-N bleken in het veld moeilijk te herkennen, zeker als er primaire infecties later in het voorgaande seizoen optraden. PVY, en met name de N-stam, verspreidde zich snel en in de praktijk bleek PVY steeds moeilijker onder controle te houden. Dit leidde uiteindelijk bij de certificering, naast de visuele veld- en partijkering, tot de invoering van laboratoriumtoetsen. Specifieke polyklonale antisera, zoals geproduceerd door Plant Research International, herkennen alle



Figuur 2. Stippelstreep, een primaire reactie veroorzaakt door PVY-O.

stammen van PVY, waarbij geen onderscheid gemaakt wordt tussen PVY-N, PVY-O of PVY-C. Dat onderscheid kan alleen met behulp van zgn. monoklonale antilichamen gemaakt worden, maar is voor de praktijk minder van belang. ELISA maakt het tegenwoordig mogelijk om snel en relatief goedkoop vele miljoenen bladmonsters per jaar te onderzoeken op de aanwezigheid van virus. Het uiteindelijk percentage virus dat in partijen pootaardappelen vastgesteld wordt, bepaalt mede de indeling in een bepaalde klasse.

De zgn. kiemrust van de knollen bemoeilijkt het vroege laboratoriumonderzoek. Enige weken na de oogst vermindert de fysiologische activiteit van aardappelknollen en als gevolg daarvan daalt de virusconcentratie in de knol. De knol blijft natuurlijk wel ziek en er zal ook in het volgende seizoen een viruszieke plant uitgroeien maar het maakt de detectie van virus in knollen met behulp van ELISA wel lastig en vooral bewerkelijker.

Een gevoeliger toets dan ELISA is gebaseerd op het aantonen van het genetisch materiaal van het virus. Bepaling en vergelijking van het genetisch materiaal (het genoom) van isolaten van met name de PVY-N en O stammen bracht verschillen tussen beide stamgroepen aan het licht. Naast een indeling van PVY isolaten en stammen op basis van biologische kenmerken bleek ook een indeling op basis van genetische kenmerken mogelijk (Van der Vlugt, 1993). Al snel bleek echter dat beide systemen niet naadloos op elkaar aansloten. Er werden virusisolaten gevonden waarbij de biologische indeling en genetische indeling niet met elkaar strookten. Nauwkeuriger analyses maakten echter snel duidelijk dat de indeling in stammen op basis van genetische kenmerken afhankelijk was van het deel van het genoom dat bekeken werd. Van bepaalde isolaten bleek zelfs één gebied typisch van PVY-N te zijn, het daarop volgende gebied typisch voor PVY-O en het



Figuur 3. Duidelijke knolnecrose veroorzaakt door PVY-C.

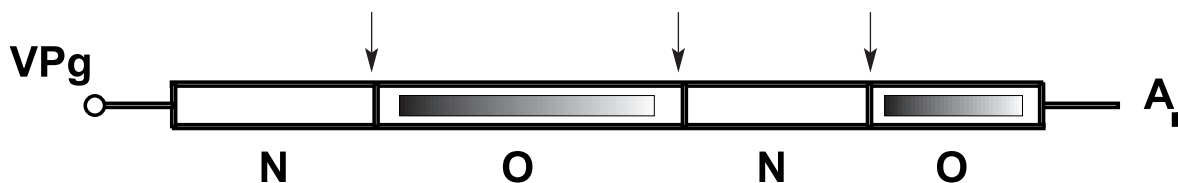
daaropvolgend volgend weer typisch voor PVY-N. Dit vormde wel een heel duidelijke aanwijzing voor zgn. recombinatie. Recombinatie is een proces waarbij tijdens de vermeerdering van het genetisch materiaal van het virus, delen van dit materiaal uitgewisseld worden. Voor veel virussen een normale strategie die hun flexibiliteit en daarmee kans op overleving vergroot. De recombinaties die bij PVY gevonden werden duiden op dubbel-infecties, een plant wordt door minimaal twee verschillende stammen geïnfecteerd. In het veld is dit heel goed mogelijk: een secundair met PVY-N geïnfecteerde plant wordt bezocht door een bladluis die PVY-O bij zich draagt. Of een plant wordt bezocht door een bladluis die PVY-O bij zich heeft en even later een tweede bladluis die PVY-N overbrengt.

Recombinaties in PVY

Wat betreft de recombinaties tussen PVY-stammen is er veel duidelijk geworden door het onderzoek aan het eerder genoemde PVY-NTN. Planten die geïnfecteerd zouden zijn met deze stam vertoonden alle uiterlijke kenmerken van een infectie met PVY-O of PVY-C. Ook vertoonden de necroses die op de knollen gesignaleerd werden duidelijke overeenkom-

sten met die van de vroeger in Nederland beschreven PVY-O of PVY-C isolaten. Vertonen de symptomen van PVY-NTN de meeste overeenkomst met PVY-O, de reacties met monoklonale antilichamen classificeren PVY-NTN duidelijk als een PVY-N stam. Onderzoek aan het genetisch materiaal van PVY-NTN moest duidelijkheid brengen.

Er zijn inmiddels diverse studies naar de samenstelling van het genetisch materiaal van PVY-NTN uitgevoerd. Vergelijking van gedeeltelijke en complete genomen van vele PVY-NTN isolaten bracht in vrijwel al deze isolaten duidelijke recombinaties aan het licht. Een van de meest opvallende was een recombinatie in het gen voor het manteleiwit van het virus. Het voorste deel (het 5'-deel) bleek typisch voor PVY-N terwijl het achterste deel (het 3'-deel) typisch voor PVY-O bleek. Een duidelijk geval van recombinatie dat steeds op hetzelfde punt in het manteleiwitgen teruggevonden kon worden. Op basis van deze recombinatie in het manteleiwitgen is een aantal moleculaire detectiemethoden ontwikkeld die een eenduidig onderscheid van PVY-NTN ten opzichte van PVY-N en PVY-O mogelijk zouden moeten maken (Szemes *et al.*, 2002, Moravec *et al.* 2003). Helaas echter na analyse van een groot aantal isolaten, die



Figuur 4. Schematische weergave van recombinaties in het aardappelvirus Y genoom met afwisselend PVY-N en PVY-O specifieke gebieden. Pijlen geven de recombinaatieplaatsen aan.

allemaal eerder als PVY-NTN geclassificeerd waren, bleek er niet in alle gevallen een eenduidig verband te bestaan tussen het voorkomen van de recombinaatie en het voorkomen van knolnecrose. In de meeste gevallen bleek dit terug te voeren op het ontbreken van voldoende betrouwbare biologische data met betrekking tot aardappelras en knolsymptomen van de onderzochte isolaten. Knolnecrose is namelijk geen unieke eigenschap van PVY-NTN. Uit andere studies bleek dat er naast de recombinaatie in het manteleiwitgen ook op nog zeker twee andere plaatsen in het genoom van PVY recombinaties op kunnen treden. Wat de rol van deze recombinaties in bijvoorbeeld het optreden van PTNRD of knolsymptomen is, is nog niet duidelijk. Moleculaire studies, hoe waardevol en verhelderend ook, hebben toch de neiging om de rol en invloed van het genoom sterk te benadrukken. De invloed van bijvoorbeeld aardappelras, vatbaarheid en gevoeligheid en andere omgevingsfactoren verschuiven daarbij ten onrechte al snel meer naar de achtergrond.

Conclusies

Uit het onderzoek aan PVY-NTN is duidelijk geworden dat recombinaties tussen verschillende isolaten en stammen van PVY geen toevalligheden zijn. Het voorkomen van duidelijke 'recombinational hot spots' staat vast maar wat de rol van deze recombinaties precies is, zal uit verder onderzoek moeten blijken. Dergelijke recombinaatieplaatsen

zijn niet alleen bij PVY gevonden. Ook bij Yam mozaïek virus (YMV), een potyvirus dat tot dezelfde groep als PVY behoort, is recombinaatie tussen verschillende stammen van het virus aangetoond (Bousalem *et al.*, 2000). Ook is Yam een gewas wat sterk leunt op een vegetatieve vermeerdering en wordt ook YMV door bladluizen verspreid. Een aantal factoren zal zeker bijdragen aan het optreden van recombinaties tussen stammen van PVY. Ten eerste is aardappel een vegetatief vermeerderd gewas dus virusinfecties worden gemakkelijk via de besmette knollen doorgegeven. Hoewel partijen gecertificeerd pootgoed maar beperkte percentages virus-geïnfecteerde knollen mogen bevatten (virusvrij kan niemand garanderen), treden er tijdens de teelt van deze partijen overal ter wereld voortdurende nieuwe besmettingen met lokale PVY-isolaten op. Bladluisvluchten zijn niet te controleren en voor infectie van een plant heeft een bladluis maar enkele seconden nodig. Bij nateelt vermeerderd ook het virus mee. In opeenvolgende seizoenen komen dubbelinfecties met verschillende PVY stammen regelmatig voor. Introducties van nieuwe rassen met verschillende niveaus van virusresistentie tegen de verschillende stammen hebben ook invloed op populatieopbouw van deze stammen. Toen er na de introductie van PVY-N met name gericht veredeld werd op resistentie tegen deze stam was er een hele tijd minder aandacht voor PVY-O en PVY-C. Hoewel sommigen meenden dat deze stammen zo goed als verdwenen waren, bleken later deze stammen toch vaker voor te komen dan gedacht.

De verschillende stammen van aardappelvirus Y hebben waarschijnlijk elk hun eigen plaats. Het bestaan van specifieke recombinaatieplaatsen in het genetisch materiaal van het virus, geeft echter aan dat onder bepaalde omstandigheden het bundelen van krachten door de verschillende stammen blijkbaar een voordeel oplevert. Toch leidt recombinaatie blijkbaar niet tot chaos en houdt elke stam vast aan zijn eigen identiteit. Dit wijst maar weer eens op het opportunistische karakter van virussen als pathogenen die zeer goed in staat blijken om zich als geen ander aan te passen. Hierbij kan een virus in heel korte tijd veranderen van een sluipend gevaar in een acuut probleem.

Literatuur

- Bokx, J.A. de, Cuperus, C. (1978). Alle bont is geen nieuw Y-virus bont. De pootaardappelwereld, mei 1978: 2-8.
- Bousalem, M., Douzery, E.J.P. and Fargette, D. (2000). High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecific recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus*: a contribution to understanding potyvirus evolution. *Journal of General Virology* 81: 243-255.
- Cuperus, C. en van de Haar H. (2002). Bont, stippelstreep en krinkel (aardappelvirus Y / PVY). In: *Aardappelziektenboek. Ziekten, plagen en beschadigingen*. Ed.: A. Mulder en L.J. Turkensteen. Aardappelwereld BV
- Moravec, T., Cerovská, N en Boonham, N. (2003). The detection of recombinant, tuber necrotizing isolates of *Potato virus Y* (PVY^{NTN}) using a three-primer PCR based in the coat protein. *Journal of Virological Methods* 109: 63-68.
- Szemes, M., Klerks, M.M., van den Heuvel, J.E.J.M. en Schoen, C.D. (2002). Development of a multiplex Ampliflet RNA assay for simultaneous detection and typing of *Potato virus Y* isolates. *Journal of Virological Methods* 100: 83-96.