

Wering van quarantaine- virussen¹ bij aardappel

A.W. (Arjen) Werkman, J.Th.J (Ko) Verhoeven en J.W. (Annelien) Roenhorst

Plantenziektenkundige Dienst, afdeling Diagnostiek, Virologie, e-mail: a.w.werkman@minlnv.nl

De PD voert een actief beleid om quarantaineorganismen te weren in de teelt en handel van aardappel. In deze publicatie geeft de sectie Virologie een overzicht van de toetsingen die zij in dit kader verricht en de vondsten die dit heeft opgeleverd. Tevens wordt de effectiviteit ervan geëvalueerd in relatie tot de 'Bewaking gewaskolom aardappel'.

Inleiding

'Het beleid van de Plantenziektenkundige Dienst (PD) is er op gericht de introductie en verspreiding van voor Nederland nieuwe plantenziekten zoveel mogelijk te voorkomen. Dit is niet alleen noodzakelijk om in ons land de teelt van belangrijke gewassen te beschermen, maar ook om de export van plantenmateriaal, nu en op de langere termijn, zeker te stellen.' Dit schreef A. Treur in Gewasbescherming in 1982. Nu, ruim twintig jaar later, is dit nog steeds één van de belangrijkste taken van de PD. Dit willen we illustreren door een overzicht te geven van de activiteiten die de PD verricht om de teelt en handel van aardappel te beschermen tegen de nadelige invloeden van quarantaineorganismen. Het gewas aardappel is voor Nederland van groot belang, zowel vanwege de veredelingsactiviteiten als de productie en export van hoogwaardig pootgoed.

Regelgeving import aardappel

Om er voor te zorgen dat de teelt van aardappel in de Europese Unie (EU) gevrijwaard blijft van quarantaineorganismen, is de import van dit gewas aan strikte regels gebonden. Op basis van de fytorichtlijn

van de EU (2000/29/EC) is de import van o.a. alle knol- en stolonendragende *Solanum*-soorten verboden. Voor specifieke onderzoeks- en verdelingsdoelinden kan echter een ontheffing van dit importverbod worden verkregen, mits hierbij aan de voorwaarden wordt voldaan die risico's voor introductie, ontsnapping en verspreiding van quarantaineorganismen uitsluiten. Deze voorwaarden zijn vastgelegd in richtlijn 95/44/EC. In Nederland is de PD verantwoordelijk voor het uitvoeren van deze richtlijn.

Ingeval van aardappel maakt deze richtlijn het dus mogelijk om genemateriaal van buiten de EU in gebruik te nemen. In de praktijk betekent dit, dat een vergunning nodig is voor al het aardappel-materiaal dat op deze basis wordt geïmporteerd. Op het moment van binnenkomst moet het materiaal direct naar een door de PD goedgekeurde quarantainelocatie worden gebracht, waar het na controle van de fytosanitaire documenten in quarantaine wordt genomen. Vervolgens wordt aan de hand van het programma 'post-entry quarantine testing' vastgesteld welke toetsingen het materiaal moet ondergaan. Ook ongetoetst materiaal dat reeds aanwezig is in genencollecties in Nederland of andere

EU-landen, valt onder deze richtlijn. Alleen wanneer bij de toetsingen geen schadelijke organismen worden aangetroffen, mag het materiaal worden vrijgegeven voor veredeling. Tevens mag het materiaal dan binnen de EU in het verkeer worden gebracht. Wordt er wel een schadelijk organisme aangetroffen, dan dient het materiaal te worden vernietigd.

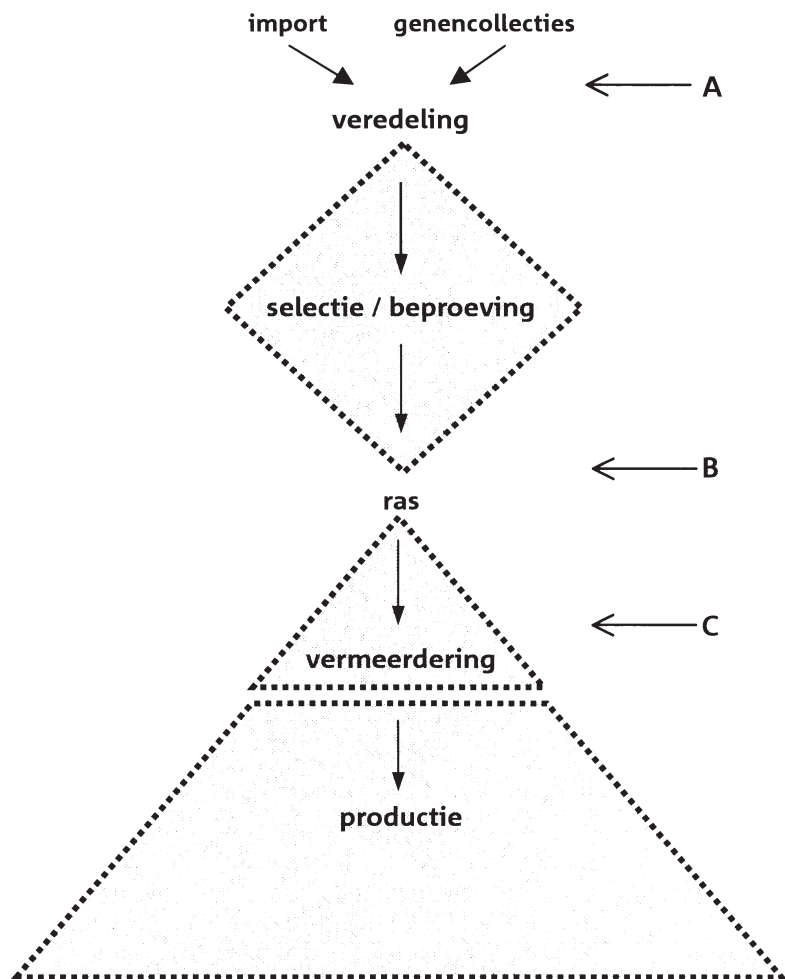
Deze publicatie gaat verder in op de toetsingen die verschillende typen materiaal moeten ondergaan tijdens de 'post-entry quarantine testing', waarbij de nadruk ligt op de toetsing op virussen, viroïden en fytoplasma's. Deze ziekteverwekkers worden verder aangeduid met de term 'virussen'. Er wordt een overzicht gegeven van de vondsten sinds 1989, het jaar waarin deze toetsingen werden ondergebracht bij de net opgerichte sectie Virologie. Tevens wordt aangegeven hoe deze toetsingen vallen binnen het volledige PD-programma 'Bewaking gewaskolom aardappel', en welke overige toetsingen in dit kader plaatsvinden. De resultaten hiervan worden geëvalueerd in het licht van de werking van quarantainevirussen in aardappel.

'Post-entry quarantine testing'

'Post-entry quarantine testing' bij aardappel onderscheidt drie typen materiaal: zaad, in-vitro planten en knollen. Zaad wordt alleen ge-

¹ Het begrip virussen betreft hier zowel virussen, viroïden als fytoplasma's

GEWASKOLOM AARDAPPEL



Figuur 1. Fasen in de gewaskolom aardappel. Pijlen rechterzijde verwijzen naar de momenten waarop toetsing plaatsvindt: A 'post-entry quarantine testing', B Registratie en Kwekersrecht Onderzoek, C NAK twee- en driejarige stammen.

toetst op de zaadoverdraagbare virussen en het aardappelspindelknolviroïde (*Potato spindle tuber viroid*; PSTVd). Bij in-vitro planten en knollen komen daarbij de virussen die niet zaadoverdraagbaar zijn, het stolbur-fytoplasma en de bruin- en ringrot veroorzakende bacteriën *Ralstonia solanacearum* en *Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus*. Knollen worden bovendien getoetst op de aanwezigheid van het vals wortelknobbelaaltje (*Nacobbus aberrans*).

Alle typen materiaal worden bij binnenkomst direct overgebracht naar een quarantainelocatie, zoals

de quarantainekassen van de PD. Van een partij zaad worden uiteindelijk zo'n 20 tot 25 zaailingen opgekweekt voor toetsing, het minimale aantal dat nodig is om de genetische variëteit binnen de 'accessie' te behouden (Hawkes, 1990). Bij in-vitro planten en knollen worden slechts twee planten opgekweekt, waarvan er uiteindelijk maar één in toetsing wordt genomen. Wanneer de planten bijna volgroeid zijn, wordt met de toetsing gestart.

De toetsing op virussen, viroïden en fytoplasma's wordt uitgevoerd aan bladmateriaal. Dit materiaal wordt zowel serologisch (ELISA,

Clark & Adams, 1977; latex agglutinatie toets tot 1999, Koenig & Bode, 1978, Fribourg & Nakashima, 1984) als met behulp van toetsplanten onderzocht op de aanwezigheid van virussen (Tabel 1; Verhoeven & Roenhorst, 2000 and 2003). Daarnaast wordt het met 'return-polyacrylamide gel electrophoresis' (R-PAGE; Huttiniga *et al.*, 1987; Roenhorst *et al.*, 2000) en 'polymerase chain reaction' (PCR; Daire *et al.*, 1997; Heinrich *et al.*, 2001) getoetst op de aanwezigheid van viroïden respectievelijk fytoplasma's. Bij positieve toetsresultaten worden in alle gevallen extra toetsen ingezet voor nadere identificatie van de ziekteverwekker en/of bevestiging van de vondst.

Vondsten

Tabel 1 geeft een overzicht van de resultaten van 'post-entry quarantine testing' sinds 1989. De linkerkolom vermeldt alle ziekteverwekkers waarop gericht getoetst is, waarbij opgemerkt moet worden dat niet gedurende de volledige periode vanaf 1989 op alle ziekteverwekkers is getoetst. Tot 1996 werd een toetsplantenonderzoek niet standaard uitgevoerd. Het feit dat voor een aantal quarantainevirussen echter geen serologische of moleculair biologische toets beschikbaar was, was mede aanleiding om het toetsplantenonderzoek in te voeren voor alle typen materiaal. Daarnaast biedt dit onderzoek extra garanties voor de virussen waarop alleen serologisch wordt getoetst, omdat ook serologisch afwijkende isolaten kunnen worden aangetoond. Tenslotte, kunnen met het toetsplantenonderzoek ook virussen worden aangetoond waarop niet specifiek wordt getoetst, inclusief eventuele 'onbekende' of zelfs 'nieuwe' virussen. Overigens geldt wel de beperking dat alleen virussen worden aangetoond die mechanisch kunnen worden overgedragen. Op

deze wijze werden in 1997 een onbekend virus (Verhoeven & Roenhorst, 2000) en in 2003 het luzernemozaïekvirus (*Alfalfa mosaic virus*) gedetecteerd. De toetsing op fytoplasma's, met name stolbur-fytoplasma, bestond tot 2003 uit een visuele beoordeling. Sinds 2003 wordt echter ook standaard met PCR op fytoplasma's getoetst.

In de achtereenvolgende kolommen zijn de vondsten per periode van drie jaar weergegeven. Het valt op dat het aantal vondsten in de loop der jaren sterk is afgenomen. Hoewel ook het aantal voor toetsing in aanmerking komende monsters is gedaald, duiden de resultaten op een aanzienlijke verbetering van de fyto-sanitaire kwaliteit van het materiaal dat wordt uitgewisseld. Dit is mede te danken aan de internationale regelgeving, het opstellen van aanbevelingen voor veilige uitwisseling (Jeffries, 1998) en de toegenomen toetsingsmogelijkheden.

PSTVd, dat begin negentiger jaren nog regelmatig werd aangetroffen, wordt de laatste jaren nog slechts sporadisch gevonden. Dit geldt in

feite ook voor de algemeen in de EU voorkomende aardappelvirussen, zoals aardappelvirus Y (*Potato virus Y*), die alleen een quarantainestatus hebben wanneer ze van buiten de EU komen. Van de 'echte' niet-Europese virussen is alleen het latent Andesvirus van aardappel (*Andean potato latent virus*; APLV) enkele malen aangetroffen in zaad afkomstig uit een genencollectie. De virussen die het laatst aan de quarantainelijst zijn toegevoegd, aardappelgeelbladvirus (*Potato yellowing virus*; PYV) en aardappelvirus T (*Potato virus T*) zijn tot op heden nog niet aangetroffen.

Evaluatie 'Bewaking gewaskolom aardappel'

De toetsing van het aardappelveredelingsmateriaal staat niet op zich, maar maakt deel uit van het programma 'Bewaking gewaskolom aardappel', dat tot doel heeft de gehele gewaskolom te vrijwaren van quarantaineorganismen (Fi-

guur 1). Voor de virussen ligt het zwaartepunt van de werking in het veredelingsmateriaal. Dit heeft verschillende redenen. In de eerste plaats is dit materiaal vaak in de natuur verzameld, ongetoetst en wordt het meestal wereldwijd via genenbanken uitgewisseld. Het betreft dus materiaal met een hoog fyto-sanitair risico. De tweede reden is dat de veredelingsfase de 'startfase' in de gewaskolom is. Evenals voor andere gewassen geldt ook voor aardappel dat het beheersen van virusproblemen begint met het voorkomen van infecties in het uitgangsmateriaal. De aanwezigheid van één geïnfecteerde lijn in het beginstadium, kan leiden tot zeer omvangrijke infecties in de productiefase. Toetsing in de veredelingsfase is dus zeer effectief. Bovendien is de hoeveelheid te toetsen materiaal in deze fase relatief gering, hetgeen de benodigde capaciteit en kosten van toetsing beperkt.

Al sinds 1980 worden jaarlijks circa 3000 monsters uit verschillende fasen van de gewaskolom aardappel getoetst op de aanwezigheid van PSTVd en drie Zuid-Amerikaanse virussen, APLV, het aardappel-Andesbontvirus (*Andean potato mottle virus*) en het aardappelzwartkringvirus (*Potato black ringspot virus*). Het betreft hier de toetsing van alle ongeveer 80 klonen die worden aangemeld voor het Registratie- en Kwekersrecht Onderzoek (RKO) ten behoeve van opname in de Nederlandse rassenlijst. Daarnaast wordt jaarlijks een steekproef uit alle twee- en driejarige stammen van de NAK getoetst. In beide gevallen betreft het dus toetsingen van aardappelmateriaal dat zich lager in de gewaskolom bevindt dan het veredelingsmateriaal. Deze toetsingen geven daarom inzicht in de effectiviteit van de 'post-entry quarantaine testing' in het weren van quarantainevirussen. Tot op heden is slechts éénmaal PSTVd aangetroffen in deze zogenoemde 'bewakingsmonsters'.

Tabel 1. Vondsten 'post-entry quarantine testing' van 1989 tot en met 2003
APLV: Andean potato latent virus; APMoV: Andean potato mottle virus; PBRV: Potato black ringspot virus; PLRV: Potato leafroll virus; PSTVd: Potato spindle tuber viroid; PVA, PVM, PVS, PVT, PVV, PVX, PVY: Potato virus A, M,

Virus	1989-1991	1992-1994	1995-1997 ¹	1998-2000	2001-2003
APLV	1	1	1	0	0
APMoV	0	0	0	0	0
PBRV	0	0	0	0	0
PLRV	16	12	4	2	5
PSTVd	12	8	0	1	0
PVA	14	9	0	0	0
PVM	24	11	4	0	2
PVS	57	52	21	12	3
PVT ²	–	–	0	0	0
PVV ²	–	–	0	0	0
PVX	10	21	1	2	2
PVY	25	26	32	1	2
PVY	–	–	0	0	0
Stolbur- phytoplasma ³	0	0	0	0	0

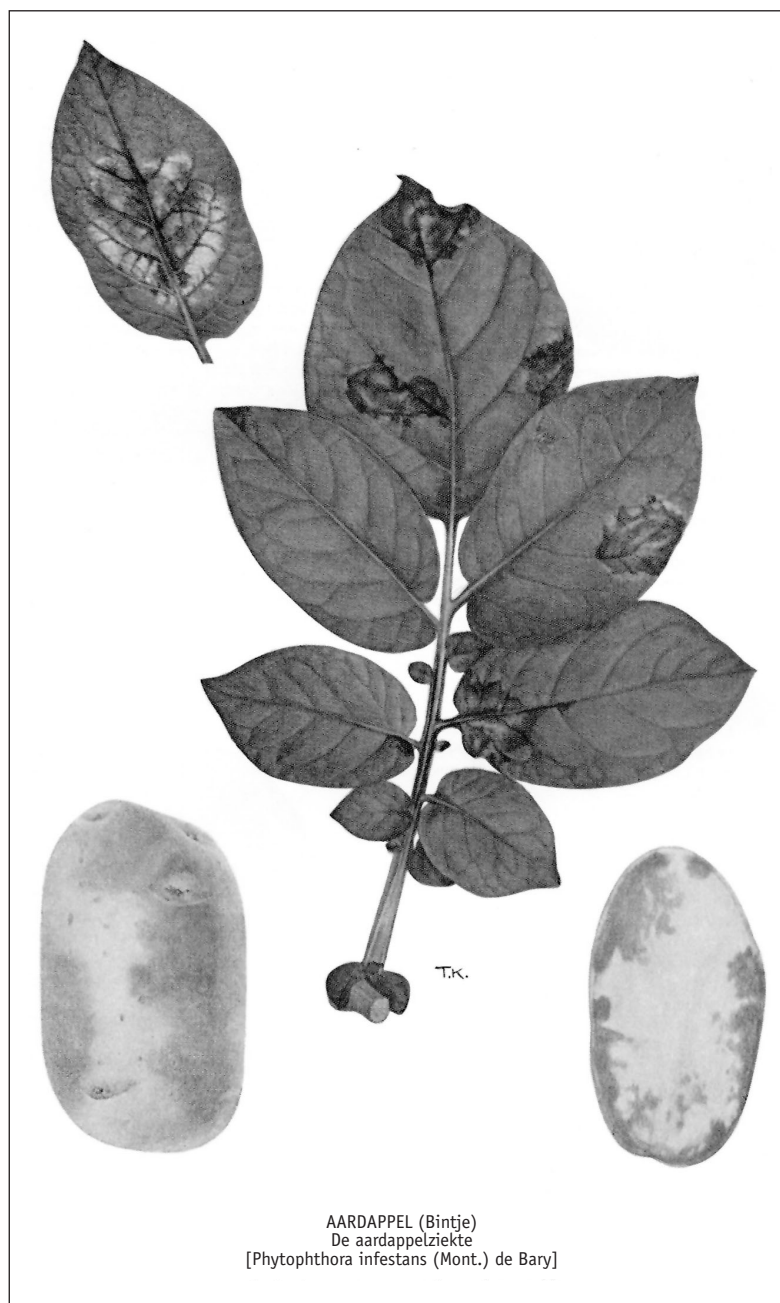
S, T, V, X, Y; PVY: *Potato yellowing virus*. ¹ Toetsplantenonderzoek vanaf 1996; ² Serologische toetsing: ELISA, tot 1999 latex agglutinatie toets; PVT en PVV vanaf 2000; ³ PCR voor stolbur-fytoplasma, tot 2003 alleen visuele beoordeling.

Dit betrof een monster van een kloon afkomstig uit een andere EU-lidstaat die was opgenomen in het RKO. Zowel in RKO- als NAK-monsters afkomstig uit Nederland zijn PSTVd en de drie Zuid-Amerikaanse virussen niet aangetroffen.

Bovenstaande resultaten rechtvaardigen de conclusie dat 'post-entry quarantine testing' een effectief instrument is om de introductie van quarantainevirussen in Nederland te voorkomen. Of zoals A. Treur in 1982 schreef: 'Slagvaardig quarantainebeleid, dat mede steunt op inventarisatie-onderzoek, fundamenteel en toegepast onderzoek, kan een belangrijke bijdrage leveren tot het weren van nieuwe ziekten.'

Literatuur

- Clark, M.F. & Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475-483
- Daire, X., Clair, D., Reinert, W. & Boudon-Padieu, E. (1997). Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the alm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 507-514
- EU (1997). Directive 97/46/EC of 25 July 1997 amending Directive 95/44/EC establishing the conditions under which certain harmful organisms, plants, plant products and other objects listed in Annexes I to V to Council Directive 77/93/EEC may be introduced into or moved within the Community or certain protected zones thereof, for trial or scientific purposes and for work on varietal selections. *Official Journal of the European Communities* **L 204**, 43-46
- EU (2000). Directive 2000/29/EC of 8 May 2000 on protective measures against the introduction into the Community of organisms harmful to plants or plant products and against their spread within the Community. *Official Journal of the European Communities* **L 169**, 1-112
- Fribourg, C.E. & Nakashima, J. (1984). An improved latex agglutination test for routine detection of potato viruses. *Potato Research* **27**, 237-249
- Hawkes, J.G. (1990). *The Potato. Evolution, Biodiversity & Genetic Resources*. Bellhaven Press, London.
- Heinrich, M., Botti, S., Caprara, L., Arthofer, W., Strommer, S., Hanzer, V., Katinger, H., Bertaccini, A. & Laimer da Camara Machado, M. (2001). Improved detec-



- tion methods for fruit tree phytoplasmas. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**, 169-179
- Huttinga, H., Mosch, W.H.M. & Treur A. (1987). Comparison of bi-directional electrophoresis and molecular hybridization methods to detect potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **17**, 37-43
- Jeffries, C. (1998). *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No 19. Potato*. FAO/IPGRI, Rome.
- Koenig R. & Bode, O. (1978). Sensitive detection of Andean potato latent and Andean potato mottle viruses in potato tubers with the serological latex test. *Phytopathologische Zeitschrift* **92**, 275-280
- Roenhorst, J.W., Butôt, R.P.T., van der He-

- ijden, K.A., Hooftman, M. & van Zaayen, A. (2000). Detection of *Chrysanthemum stunt viroid* and *Potato spindle tuber viroid* by return-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 453-456
- Treur, A. (1982). Beperking van de fytosanitaire risico's, verbonden aan de import van uitheems plantmateriaal. *Gewasbescherming* **13**, 71-77
- Verhoeven, J.Th.J. & Roenhorst, J.W. (2000). Herbaceous test plants for the detection of quarantine viruses of potato. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **30**, 463-467
- Verhoeven, J.Th.J. & Roenhorst, J.W. (2003). Detection of a broad range of potato viruses in a single assay by mechanical inoculation of herbaceous test plants. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **33**, 305-311