

Virustoetsing en virusdiagnostiek door de Bloembollenkeuringsdienst

Ton van Schadewijk

Bloembollenkeuringsdienst; Ton.van.schadewijk@bloembollenkeuringsdienst.nl

Virussen vormen een lastig probleem in de bloembollenteelt. Ze veroorzaken schade zoals verminderde opbrengst in kilogrammen en ze verlagen de sierwaarde van het product. Anders dan bij plantenziekten veroorzaakt door schimmels en bacteriën, kun je aan virus besmette bollen niet zien of ze ziek zijn. Ook helpt ontsmetten niet. Doordat bloembollen vegetatief worden vermeerderd en het virus veelal over gaat van moederbol op dochterbol, blijft de virusbesmetting door de jaren in een partij aanwezig. Het percentage viruszieke bollen in een partij neemt toe doordat vectoren virus verspreiden vanuit besmette planten naar gezonde planten. Door tijdig viruszieke planten uit een partij te verwijderen kunnen, bij bepaalde teelten, telers verdere verspreiding in een partij voorkomen en zelfs het percentage terugdringen. Viruszuivering is arbeidsintensief en daarmee kostbaar. Bij hoge aantastingspercentages is viruszuivering niet meer rendabel en zal een teler tot vervanging van de partij moeten overgaan. Dit betekent aankoop van uitgangsmateriaal van hoge kwaliteit.

voldoende herkenbaar zoals tulpenmozaïekvirus in witte en gele cultivars van Tulp. Daarom worden keuringen ondersteund door laboratoriumtoetsen. Voor elke kwaliteitsklasse gelden bepaalde toleranties wat betreft de aanwezigheid van virussen. Meestal mag dit niet meer dan enkele procenten bedragen. De normen zijn gebaseerd op de schadelijkheid van de betreffende virussen dus dient ook vastgelegd te worden welk type virus wordt aangetroffen.

ELISA virustoetsen

Voor grootschalige virustoetsing in het laboratorium wordt

Viruskeuringen

De aanwezigheid van virus is een van de aspecten waarop gelet wordt bij de kwaliteitskeuring van bolgewassen zoals de Bloembollenkeuringsdienst (BKD) deze uitvoert. De keuring is er op gericht om duidelijkheid te verschaffen over de kwaliteit van vermeerderingsmateriaal en dit vast te leggen door het certificeren van partijen. Alleen kwalitatief goed uitgangsmateriaal mag gebruikt en verhandeld worden. De viruskeuring is in ieder geval visueel, bestaande uit een veldkeuring of een keuring van opgeplante monsters op proeftuinen (Gladiool en Krokus) of monstercassen (Iris, Tulp, Muscari, figuur 2) van de BKD. Sommige virussen geven nau-

welijks symptomen zoals het symptoomloos lelievirus in Lelie of de symptomen zijn on-



Figuur 1. Virus in Rose Queen.

ARTIKEL



Figuur 2. Monsterkas bij de Bloembollenkeuringsdienst.

de ELISA-methode gebruikt. Deze serologische toets wordt uitgevoerd in microtiterplaten met 96 posities. Hierdoor is de uitvoering grotendeels te automatiseren en blijven de kosten laag. De benodigde antisera zijn veelal in Nederland ontwikkeld door het PPO te Lisse en PRI en de vakgroep Virologie te Wageningen. In het laboratorium van de Bloembollenkeuringsdienst in Lisse worden jaarlijks meer dan twee miljoen ELISA-bepalingen uitgevoerd. Het merendeel, 5800 monsters, betreft lelies terwijl ook nog 4200 tulpenmonsters en vierhonderd dahliamonsters worden getoetst. Ongeveer vijftien procent van de toetsen heeft betrekking op commerciële opdrachten. Dit betreft monsters die door bedrijven zelf worden ingestuurd. Het gaat daarbij om percentagebepalingen, selectie van gezond materiaal en identificatie van virussen.

Kwaliteitsverbetering

Een aantal bolgewassen is volledig besmet met één of meerdere virussen zonder dat de

consument dit als een nadeel ervaart. Voorbeelden zijn: Gladiool (bonenscherpmozaïekvirus), Iris (irismozaïekvirus) en Narcis (virussen uit de potyvirusgroep). In het verleden zijn pogingen ondernomen om de gewassen Iris en Gladiool virusvrij te maken door middel van meristeemcultuur. Dit is ook gelukt, met een kwalitatief goed en groeikrachtig gewas als resultaat, maar de ontwikkeling is niet doorgezet omdat er praktische bezwaren waren in de praktijk. Zo waren de symptomen bij opnieuw geïnfecteerde gladiolen extreem heftig en de bloemproductie bij virusvrije irissen bleek niet economisch. Bij andere gewassen zijn in de afgelopen jaren echter successen geboekt op kwaliteitsgebied. Na invoering van de kwaliteitskeuring voor Iris is het irisgrijsvirus en narcislatentvirus in dit gewas vrijwel verdwenen. Twintig jaar geleden was het gewas Lelie voor 100% geïnfecteerd met symptoomloos lelievirus. Door toepassing van ELISA kon een certificeringssysteem gestart worden waarna virusvrije partijen de markt veroverden. Een dreigende introductie van lelievirus X kon via serologische

toetsing effectief gekeerd worden. Inmiddels maakt ook een toets op aanwezigheid van leliemozaïekvirus deel uit van de toetsing. Door het introduceren van virusvrij uitgangsmateriaal neemt de infectiedruk in de teelt van lelies af met als gevolg dat het gewas inmiddels vrijwel virusvrij geteeld wordt.

Hoewel het gemiddelde percentage tulpenmozaïekvirus bij Tulp varieert tussen de 1 à 2%, is dit toch regelmatig een bron van zorg. Door variatie in het klimaat en door schaalvergroting in de bollenteelt kan een situatie ontstaan waarin de virusverspreiding niet meer voldoende door handmatige selectie kan worden tegengegaan.

ELISA en selectie

ELISA-virustoetsing resulteert meestal slechts in een cijfer dat het geschatte percentage virus in een partij aangeeft. Bij de keuring van Dahlia bestaat echter ook de mogelijkheid om de uitslag van de toets tevens te benutten voor selectie. Dit vergt een samenwerking tussen teler en keurmeester van de BKD: van elk van de bemonsterde knollen worden drie 'vingers' in een genummerd zakje verzameld terwijl de teler het restant van de knol van een label voorziet. De uitslag van de toets bestaat in dit geval uit een percentage virus (tomatenbronsvlekkenvirus, TSWV) en een lijst met besmet gevonden nummers. Valt het viruspercentage te hoog uit om de partij te mogen vermeerderen, dan kan een vermeerdering van de virusvrij getoetste knollen uitkomst. Met een vermeerderingsfactor van veertig kan snel een virusvrije selectie worden opgebouwd met de gezonde stekken. Geholpen door de tra-

ARTIKEL

ge verspreiding van TSWV te velde is op deze wijze de dahliateelt inmiddels nagenoeg vrij van dit virus geworden.

Ook bij lelies is een selectie van genummerde bollen effectief gebleken en in combinatie met vermeerdering via “schubben” vaak een sneller en goedkoper alternatief voor weefselkweek.

Diagnostiek

Virussen veroorzaken vaak, maar niet altijd, kenmerkende symptomen in planten en keurmeesters van de BKD zijn getraind op het herkennen van deze beelden. Ter ondersteuning van hun werk zijn beschrijvingen van beelden in de afzonderlijke cultivars beschikbaar en een databank met fotomateriaal. Vaak is echter een toets gewenst ter ondersteuning van keuringsbeslissingen. Virussympptomen kunnen variëren per cultivar en per seizoen en combinaties van virussen komen voor. Keurmeesters zijn ook alert op het aantreffen van nieuwe virussen.

In het kader van internationale handel zijn afspraken gemaakt met diverse landen. Voor sommige landen gelden nultoleranties voor bepaalde virussen zoals tabaksratelvirus (figuur 3) of tabaksnecrosevirus. In sommige gevallen bepaalt het aantreffen van één enkele besmette plant een beperking van de exportmogelijkheid van een partij. Een serologische toets verschaft in zo'n geval duidelijk naar zowel teler als keurmeester.

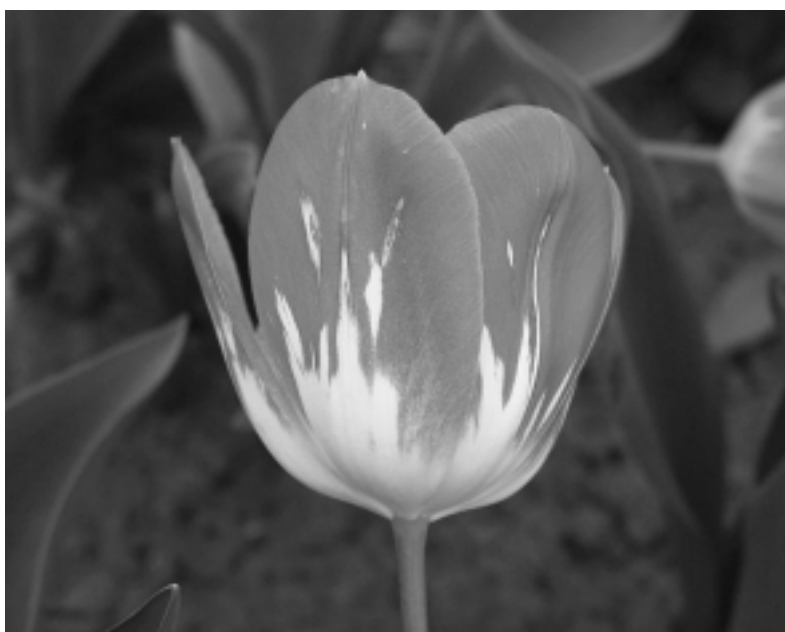
Protocol

Per gewas zijn gemiddeld zo'n drie virussen van belang in de Nederlandse teelt. Het lab van de Bloembollenkeuringsdienst heeft echter per gewas een veelvoud daarvan aan toetsen beschikbaar om alle uit de praktijk en literatuur bekende virussen te kunnen aantonen. De eerste serie toetsingen gebeurt meestal met ELISA's en daarbij wordt uitgegaan van de indicatie van de keurmeester alsmede de vakkennis van de laboratoriummedewerker. Indien geen

positieve reacties worden verkregen of de reacties die geen afdoende verklaring zijn voor de symptomen wordt een tweede serie toetsen opgestart waaronder dikwijls PCR-toetsen (zie onder). De aantoonbaarheid van virussen via ELISA is vaak afhankelijk van het groeistadium waarin de plant verkeert. Dit geldt in mindere mate voor PCR-toetsen. Tenslotte resteert de mogelijkheid van diagnostisch onderzoek door het Praktijkonderzoek Bollen en Bomen (PPO) in Lisse of de Plantenziektenkundige dienst in Wageningen en het aanhouden van materiaal voor eigen onderzoek door de BKD.

PCR-toetsen versus ELISA

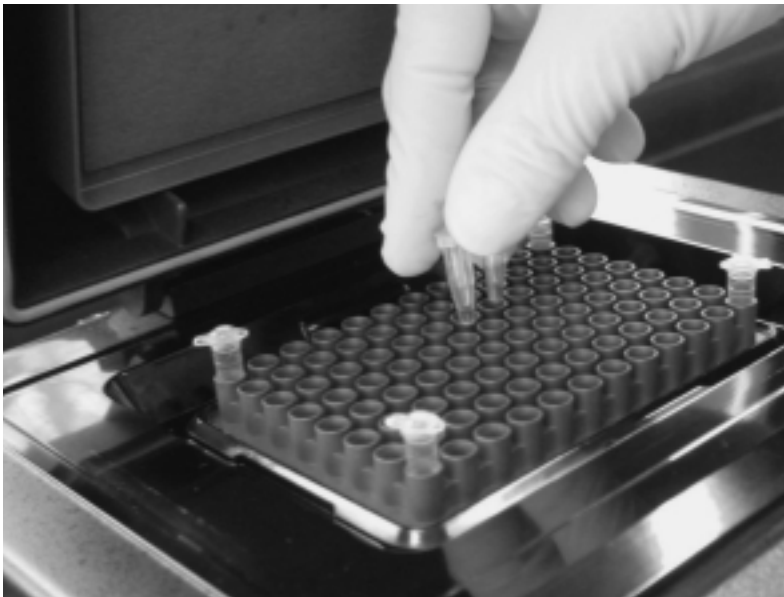
Toetsen op basis van de Polymerase Kettingreactie (PCR) maken gebruik van herkenning van viraal DNA of RNA terwijl ELISA-toetsen (figuur 4) viruseiwitten herkennen met behulp van antisera. Waar ELISA het moet doen met het aantal virusdeeltjes dat in het plantensap aanwezig is, kan via de PCR-reactie een stuk virus-DNA of RNA duizenden malen kunstmatig vermeerderd worden in een reactiemengsel. Dit levert een gevoeligheidswinst op ten opzichte van ELISA. Andere voordelen van PCR zijn de mogelijkheden om meerdere virussen behorende tot een groep met een toets te kunnen aantonen. Het lab van de BKD legt zich toe op het ontwikkelen van zogenaamde generieke primers voor dergelijke PCR-toetsen. Deze breedwerkende toetsen bewijzen hun nut bij diagnostiek doordat ze de kans verkleinen dat een plantenvirus aan de aandacht ontsnapt. Verder blijken PCR-



Figuur 3. TRV in Blenda.



Figuur 4. ELISA-toets materialen.



Figuur 5. PCR-toets materialen.

toetsen, beter dan via ELISA, in staat om virusdeeltjes in planten ook buiten de plekken met symptomen te kunnen detecteren. Een nadeel vormt de hogere kostprijs van deze toetsen.

PCR en onderzoek

PCR-toetsen (figuur 5) geven verder vaak indicaties over het bestaan van meerdere stappen of complexen van virussen. Zo bleek het verschijnsel Augustaziek in tulpen niet alleen sa-

men te hangen met het tabaksnecrosevirus maar ook met een ander necrovirus: het olijfla-tentvirus. De informatie over nieuw ontdekte virussen komt uit sequentiebepalingen van de PCR-producten. PCR helpt ook om twijfelgevallen bij ELISA-toetsen te verduidelijken. Dit type toetsen is zeer geschikt om na het proces van meristeen-cultuur viruszieke weefselkweekplantjes te onderscheiden van gezonde.

Plantenvirussen internationaal

De tijd is voorbij dat de normen voor viruskeuring uitsluitend werden bepaald door invloed die plantenvirussen hebben op de kwaliteit van bloembolgewassen binnen het Nederlandse productieproces. Ook internationaal is men bezig met het opzetten van normen en stelt men eisen betreffende de afwezigheid van virussen. Vaak gaat het daarbij om virussen die nog niet in Nederland voorkomen of virussen die bij ons als latent, zonder aantoonbare schade, in gewassen voorkomen, maar in het buitenland een potentieel gevaar vormen in andere gewassen. Het is zaak om kennis te nemen van de virusproblematiek wereldwijd en over de middelen te beschikken om de aan- of afwezigheid van nieuwe virussen te kunnen bepalen. Dit enerzijds om discussie omtrent vermeende risico's aan te kunnen gaan maar anderzijds om onze internationale klanten de kwaliteit te kunnen bieden waarom ze vragen.

ARTIKEL