

Bescherming en beheersing van pepinomozaïekvirus in de tomatenteelt: kasproef cross-protectie

Martijn Schenk, Roel Hamelink, René van der Vlugt, Adriaan Vermunt & Rob Meijer





Bescherming en beheersing van pepinomozaïekvirus in de tomatenteelt: kasproef cross-protectie

Martijn Schenk¹, Roel Hamelink¹, René van der Vlugt², Adriaan Vermunt³ & Rob Meijer¹

- ¹ Wageningen UR Glastuinbouw, Bleiswijk
- ² Plant Research International, Wageningen
- ³ Groen Agro Control, Delfgauw

© 2010 Wageningen, Wageningen UR Glastuinbouw

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Wageningen UR Glastuinbouw



PT projectnummer: 13471

Wageningen UR projectnummer: 3242065800

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

	pagina
Samenvatting	1
1 Inleiding	3
1.1 Maatregelen tegen pepinomozaïekvirus	3
1.2 Pepinomozaïekvirus in de praktijk	3
1.3 Doelstelling	4
2 Uitvoering	5
2.1 Zwakke isolaten	5
2.2 Agressieve isolaten	6
2.3 Proefopzet	6
2.4 Proefverloop	8
2.5 Toetsingen DAS-ELISA	9
2.6 Waarnemingen bladsymptomen	9
2.7 Waarnemingen productie en vruchtsymptomen	10
3 Resultaten	11
3.1 Symptoomverloop bij enkele besmetting	11
3.2 Symptoomverloop bij Cross-protectie	12
3.3 Opbrengst	16
3.4 Vruchtkwaliteit	17
4 Discussie en conclusie	19
4.1 Agressieve isolaten	19
4.2 Cross-protectie met <i>Vx1</i>	19
4.3 Cross-protectie met nieuwe zwakke Chili-2 stammen	20
4.4 Stabiliteit symptomen Chili-2 isolaten	20
4.5 Conclusie	20
5 Literatuur	21
Bijlage I. Gestandaardiseerd scoreformulier voor symptomen pepinomozaïekvirus	1 p.

Samenvatting

Achtergrond

Pepinomozaïekvirus is een mechanisch overdraagbaar virus. Het tegengaan van besmettingen met dit virus blijkt in de praktijk bijzonder lastig. Naast het aanhouden van strikte hygiëne vormt de toepassing van cross-protectie een alternatieve strategie. Daarbij veronderstelt men dat besmetting met zwakke virusisolaten (zwakke stammen) de gevolgen van een besmetting met agressieve isolaten onderdrukt. In 2005 en 2006 is in kasproeven aangetoond dat cross-protectie met de isolaten *VI* of *1066* werkt tegen isolaten van de Europese (EU) stam van pepinomozaïekvirus. Kleinschalige proeven uit 2008 suggereerden echter dat de zwakke isolaten *VI* en *1066* niet in staat zijn om bescherming te bieden tegen alle nieuwe agressieve isolaten van het pepinomozaïekvirus. Vooral bij besmettingen met nieuwe varianten die tot de Chili-2 stam (Ch-2) behoorden, waren doorbraakverschijnselen zichtbaar. Een zwak isolaat dat behoorde tot deze Ch-2 stam bood wel bescherming onder deze omstandigheden, maar was minder zwak in zijn symptomen dan *VI* en *1066*. In de proeven uit 2008 is vanwege de looptijd van de proef alleen gekeken naar het optreden van bladsymptomen.

Doelstelling

De doelstelling van dit onderzoek was om te bepalen of bestaande en nieuwe zwakke stammen in staat zijn om te beschermen tegen de nieuwe agressieve isolaten van pepinomozaïekvirus onder (semi-)praktijkomstandigheden.

Methode

Het onderzoek vond plaats in kasproeven onder uniforme teeltcondities en op uniform plantmateriaal. De cross-protectie proeven zijn uitgevoerd met één bestaand zwak isolaat (*Vx1*) en twee nieuwe potentieel zwakke isolaten (*Pep1* en *Pep28*) die beide tot de Ch-2 stam van het virus behoren. De werking van het cross-protectie mechanisme is getest door de beschermde planten te besmetten met twee agressieve virusisolaten waarvan de ene ernstige bladsymptomen en de andere ernstige vruchtsymptomen zou geven. Omdat men verwachtte dat de blad- en vruchtsymptomen in de loop van de zomer beperkt zouden blijven en omdat het optreden van vruchtsymptomen door de agressieve varianten minder heftig was dan verwacht, is de proef verkort uitgevoerd.

Resultaten

Uit de aanwezigheid van bladsymptomen in de enkele infecties met de zwakke isolaten, bleek dat alleen *Vx1* als een echt zwak isolaat kan worden beschouwd. Zowel *Pep1* als *Pep28* veroorzaakten meer bladsymptomen dan uit eerdere proeven was gebleken. Bij een besmetting met de agressieve virusisolaten bleek *Vx1* niet in staat om de toename in bladsymptomen tegen te houden en bood het isolaat op dit punt geen verbetering ten opzichte van de onbeschermden planten. Wat betreft *Pep1* en *Pep28* kunnen hieromtrent geen sluitende uitspraken worden gedaan, omdat deze isolaten van zichzelf al vrij heftige bladsymptomen gaven. De gewasstand in de met *Vx1* en *Pep28* besmette plant was beter dan in de planten die met de agressieve isolaten besmet waren, maar dit vertaalde zich niet in een hogere opbrengst. Hoe dit zich in de loop van het seizoen ontwikkeld zou hebben, blijft door de verkorte looptijd een openstaande vraag. Wat betreft het ontstaan van vruchtsymptomen geldt dat *Pep1* meer symptomen veroorzaakte dan in eerdere proeven het geval was. Bovendien lagen de *Pep1* besmette planten qua opbrengst één tros achter op de rest. *Vx1* en *Pep28* hadden van zichzelf geen negatieve effecten op vruchtsymptomen of opbrengst, maar boden op deze punten geen bescherming tegen de agressievere isolaten. De vruchtsymptomen namen daarbij in beschermde planten even sterk toe als in onbeschermden planten.

Conclusie

Doordat de proef tussentijds is beëindigd, is het lastig om harde conclusies te trekken. Wel zijn er duidelijke trends waarneembaar:

- *Vx1* is niet in staat om een infectie met agressievere isolaten van de Chili-2 stam tegen te houden, wat overeenkomt met de uitkomst van de kleinschalige proeven in 2008.
- In 'beschermd' planten was na besmetting met de Chili-2 isolaten een duidelijke toename zichtbaar in bladsymptomen en een lichte toename in vruchtsymptomen. Deze toename was gelijk aan die in onbeschermd planten.

In het verleden zijn *Vx1* en *1066* wel in staat gebleken om in proeven de schade van isolaten van de EU-stam in te perken, maar gezien het feit dat momenteel de Chili-2 stam in de Nederlandse praktijk domineert, zou het gebruik van *Vx1* slechts een beperkte bijdrage leveren aan inperking van de aan pepinomozaïekvirus gerelateerde schade in de praktijk. Of de geteste zwakke isolaten van de Chili-2 stam de infectie met de agressievere isolaten van de Chili-2 stam tegenhouden is onduidelijk. Op basis van de waargenomen vruchtsymptomen is *Pep1* sowieso niet zwak genoeg voor een praktijktoepassing, terwijl zowel *Pep1* als *Pep28* niet stabiel bleken te zijn wat betreft hun symptomenexpressie. Als dit voor meer Chili-2 isolaten geldt, zal dit de zoektocht naar een geschikt zwak Chili-2 isolaat bemoeilijken.

1 Inleiding

Pepinomozaïekvirus is een mechanisch overdraagbaar virus dat binnen de tomatenteelt voor de nodige problemen zorgt. Sinds de introductie en ontdekking van het virus in 1999 heeft het zich snel verspreid binnen de Europese tomatenteelt en is het in diverse landen, waaronder Nederland, aanwezig [1-4]. Het virus weet zich gemakkelijk te verspreiden via bijvoorbeeld besmette handen, kleding of gereedschappen [5]. Direct contact tussen gezonde en geïnfecteerde planten gedurende het reguliere gewaswerk volstaat al voor verspreiding van het virus.

Pepinomozaïekvirus blijft geruime tijd infectieus, ook op oppervlakten en kleding.

1.1 Maatregelen tegen pepinomozaïekvirus

De belangrijkste maatregel die momenteel in de praktijk kan worden toegepast, is het voeren van een zeer strikt hygiënebeleid. Het blijkt echter bijzonder lastig om met hygiënemaatregelen daadwerkelijk vrij te blijven van het virus [6].

Een alternatief dat uitkomst zou kunnen bieden, is om vroeg in de teelt bewust een zwak isolaat van het virus in het gewas te brengen. Bij deze strategie is de veronderstelling dat besmetting met milde virusvarianten (zwakke stammen) de gevolgen van een besmetting met agressieve isolaten onderdrukt. De keuze van de te gebruiken zwakke isolaten is daarbij essentieel. Het is belangrijk om een goed gekarakteriseerd en stabiel zwak isolaat te hebben. Dit isolaat moet weinig of geen blad- en vruchtsymptomen geven en tevens afdoende bescherming bieden tegen agressieve isolaten. In het verleden is deze strategie succesvol gebleken bij de bestrijding van tomatenmozaïekvirus. Hiervoor is jarenlang het door het Proefstation Naaldwijk ontwikkelde MII-16 isolaat gebruikt.

De strategie waarbij men het gewas bewust infecteert met een zwakke virusstam wordt aangeduid met de term cross-protectie of pre-munitie. In kasproeven die in 2005 en 2006 door Wageningen UR Glastuinbouw en Groen Agro Control (GAC) zijn uitgevoerd, is vastgesteld dat het mechanisme van cross-protectie onder bepaalde omstandigheden werkt [7, 8]. Deze omstandigheden corresponderen echter niet meer met de huidige praktijk sinds er vanaf 2005 nieuwe agressieve virusvarianten zijn opgedoken. In de kasproeven van 2006 werden de gevolgen van een besmetting met twee agressieve isolaten drastisch verminderd door een eerdere infectie met een zwak virusisolaat van de Peruviaanse stam of de Europese tomatenstam. Deze agressieve isolaten veroorzaakten in enkele infecties een opbrengstverlies van respectievelijk 8 en 25%, wat gereduceerd werd tot 0-3% opbrengstverlies aan de hand van cross-protectie. Beide zwakke isolaten (*I066 en VI*) werkten daarbij even goed.

1.2 Pepinomozaïekvirus in de praktijk

In voorafgaand onderzoek, wat door het Productschap Tuinbouw gefinancierd is, hebben Wageningen UR Glastuinbouw en PRI aangetoond dat er verschillende varianten van pepinomozaïekvirus binnen Nederland voorkomen [9]. Deze varianten van het pepinomozaïekvirus zijn op basis van de gelijkenis in het genetische materiaal van het virus in groepen te delen. In totaal worden vier groepen (stammen) onderscheiden, namelijk:

- De Peruviaanse stam die oorspronkelijk afkomstig is van pepino (*Solanum muricatum*) en wilde tomaat (*Lycopersicon peruvianum*) (afkorting: PE)
- De Europese tomatenstam (afkorting: EU)
- De Chili-2 stam (afkorting: CH2)
- De US-1 stam (afkorting: US1)

Isolaten van de Peruviaanse stam vertonen een sterke genetische gelijkenis met isolaten van de EU-stam. Deze EU-isolaten werden in 1999 voor het eerst in Nederland waargenomen [3]. Destijds gaven ze slechts beperkte bladsymptomen en veroorzaakten een geringe economische schade aan het gewas. Pepinomozaïekvirus heeft zich sinds deze eerste vondst sterk verspreid binnen de tomatenteelt. Vanaf 2005 komen in Europa - en ook in Nederland

- besmettingen voor met nieuwe isolaten, welke blijken te behoren tot de CH2 stam [9]. Deze isolaten zijn in eerste instantie in Chili en de Verenigde Staten gevonden, maar doken in 2005 op diverse plekken binnen Europa op [1, 10, 11]. Isolaten van de vierde stam (de US1 stam) waren tot voorkort alleen in Amerika aanwezig, maar zijn recentelijk ook op de Canarische eilanden aangetroffen [12]. In Nederland is deze stam nog nooit gevonden.

De situatie rondom pepinomozaïekvirus is sinds 2005 in complexiteit toegenomen door de introductie van nieuwe CH2 isolaten. Sinds de intrede van deze nieuwe isolaten treden er ook menginfecties van verschillende stammen in één plant op. Een praktijkinventarisatie die in 2008 is uitgevoerd, laat goed zien hoe complex de huidige situatie rondom pepinomozaïekvirus daadwerkelijk is [13]. Pepinomozaïekvirus is een zeer veranderlijk en onvoorspelbaar virus wat in staat is gebleken om in één kas binnen enkele maanden te veranderen in diverse varianten die onderling aanzienlijke genetische verschillen vertoonden [9]. Binnen mengsels van varianten of stammen kan vermenging van het erfelijk materiaal optreden door het mechanisme van recombinatie [1]. Daardoor kunnen nieuwe varianten van het virus ontstaan, die weer nieuwe eigenschappen hebben, zoals een verhoogde agressiviteit van de symptomen.

Onder praktijkomstandigheden laat pepinomozaïekvirus diverse virusbeelden zien. Dit is deels afhankelijk van teeltomstandigheden en verschillen tussen de geteelde rassen. Het virusbeeld hangt ook sterk af van het aanwezige virusisolaat. In een door GAC uitgevoerd onderzoek uit 2005 bleek dat er in Nederland verschillende varianten voorkomen van pepinomozaïekvirus [14]. Deze varianten geven verschillende virusbeelden. Sommige isolaten zijn zeer mild, terwijl andere zeer heftige symptomen geven. Het is echter niet bekend welke genetische verschillen hiervoor verantwoordelijk zijn. In onderzoek uit 2008 zijn een twintigtal isolaten van diverse genetische herkomst biologisch gekarakteriseerd [13]. Hierin bleek dat zowel infecties met isolaten van de EU als van de CH2 stam kunnen leiden tot de ontwikkeling van heftige symptomen. Zowel isolaten van de EU als van de CH2 stam kunnen ook necrotische symptomen veroorzaken, waarbij delen van het blad of de stengels afsterven.

In 2005 en 2006 is in kasproeven aangetoond dat cross-protectie met *VI* of *1066* tegen de EU-stam van pepinomozaïekvirus werkt. Echter, binnen deze proeven zijn alleen isolaten getoetst van de stam die op dat moment het meest in Nederland aanwezig was, namelijk de EU stam. Of cross-protectie ook werkt tegen nieuwe, agressieve (EU en CH2) isolaten, die sindsdien zijn opgedoken is zeer de vraag. Kleinschalige proeven uit 2008 suggereerden dat de zwakke stammen *VI* en *1066* niet in staat zijn om bescherming te bieden tegen alle nieuwe agressieve isolaten van het pepinomozaïekvirus [7, 15]. Vooral bij een besmetting met nieuwe varianten die tot de Chili-2 stam (CH2) behoren, waren doorbraakverschijnselen zichtbaar. Een zwak isolaat dat behoorde tot deze CH2-stam bood tegelijkertijd wel bescherming, maar was minder zwak in zijn symptomen dan *VI* en *1066*.

1.3 Doelstelling

De doelstelling van dit onderzoek was om te bepalen of bestaande en nieuwe zwakke stammen in staat zijn om te beschermen tegen nieuwe agressieve isolaten van pepinomozaïekvirus onder (semi)-praktijkomstandigheden. Omdat men verwachtte dat de blad- en vruchtsymptomen in de loop van de zomer beperkt zouden blijven en omdat het optreden van vruchtsymptomen door de agressieve varianten minder heftig was dan verwacht, is de proef uiteindelijk verkort uitgevoerd.

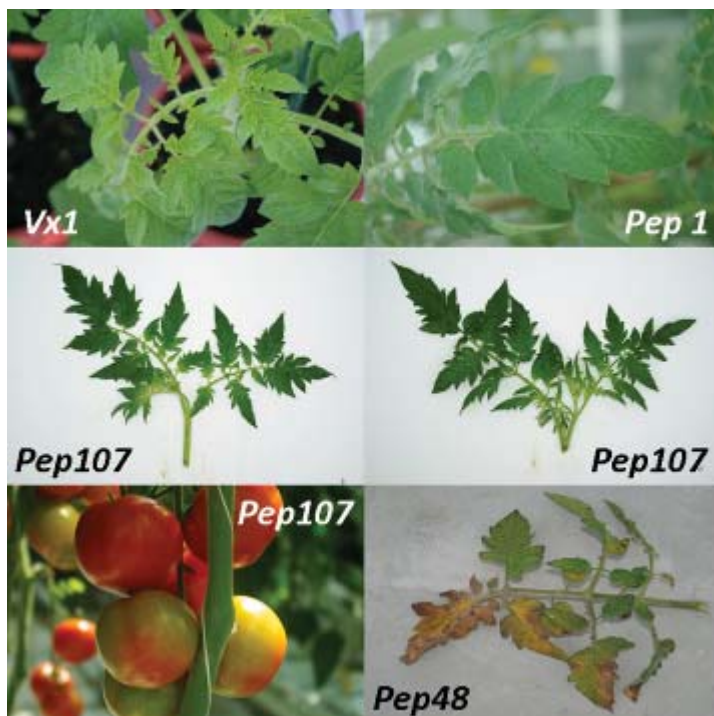
2 Uitvoering

2.1 Zwakke isolaten

De cross-protectie proeven zijn uitgevoerd met één bestaande zwakke stam (*Vx1*) en twee nieuwe potentieel zwakke isolaten (*Pep1* en *Pep28*). *Vx1* is tevens gebruikt in een eerdere cross-protectie kasproeven in 2005 en 2006 [7, 8]. Destijds bood dit isolaat een goede bescherming tegen twee agressieve isolaten van de Europese (EU)-stam van pepinomozaïekvirus. Daarbij presteerde het vergelijkbaar met een ander zwak isolaat, aangeduid met *1066*. *Vx1* behoort tot de Peruviaanse (PE)-stam van het virus. De isolaten van deze stam lijken sterk op die van de EU-stam. De andere twee isolaten zijn afkomstig uit onderzoek uit 2008. Met het oog op de hypothese dat cross-protectie tegen agressieve Chili-2 isolaten het best kan worden uitgevoerd met zwakke isolaten van dezelfde virusstam, zijn diverse isolaten van deze Chili-2 stam getest [13, 15]. Daarbij kwamen de isolaten *Pep1* en *Pep28* uiteindelijk het beste uit te toetsingen op blad- en vruchtsymptomen (Tabel 1; Fig. 1).

Tabel 1. De mate waarin de zwakke en agressieve stammen symptomen veroorzaken op tomaat.

Isolaat	Omschrijving symptomen	Type isolaat	Ernst symptomen	Necrose	Vruchtsymptomen
<i>Pep1</i>	Licht brandnetelvormig blad en mozaïek	CH2	Matig	Nee	Minimaal
<i>Pep28</i>	Licht brandnetelvormig blad en mozaïek	CH2	Licht/Matig	Nee	Geen
<i>V(x)1</i>	Nauwelijks symptomen	PE	Licht	Nee	Geen
<i>Pep48</i>	Mozaïek en beginnende necrose	CH2	Eerst matig, daarna heftig	Ja	Onbekend
<i>Pep107</i>	Brandnetelvormig blad en mozaïek	CH2	Behoorlijk	Nee	Ja



Figuur 1. Symptoombeelden van de zwakke isolaten Pep1 en Vx1 en van de agressieve isolaten Pep48 en Pep107 op jonge tomatenplanten, vruchten en oudere planten.

2.2 Agressieve isolaten

De werking van de zwakke stammen is getoetst met twee agressieve isolaten (*Pep48* en *Pep107*). *Pep48* is afkomstig uit de set van isolaten die in 2008 onderzocht zijn [13, 15], terwijl *Pep107* nadien verzameld is vanwege het symptoombeeld op de vruchten. Beide isolaten zijn afkomstig uit de praktijk en behoren tot de Chili-2 stam. Daarmee zijn ze representatief voor de 'nieuwe' agressieve isolaten zoals die in de praktijk gevonden worden. *Pep48* is geselecteerd vanwege de heftige necrose die het isolaat destijds veroorzaakte, terwijl *Pep107* verzameld is vanwege de heftige vruchtsymptomen (Tabel 1; Fig. 1).

2.3 Proefopzet

In totaal zijn er twaalf afzonderlijke behandelingen getoetst in de kasproeven, namelijk:

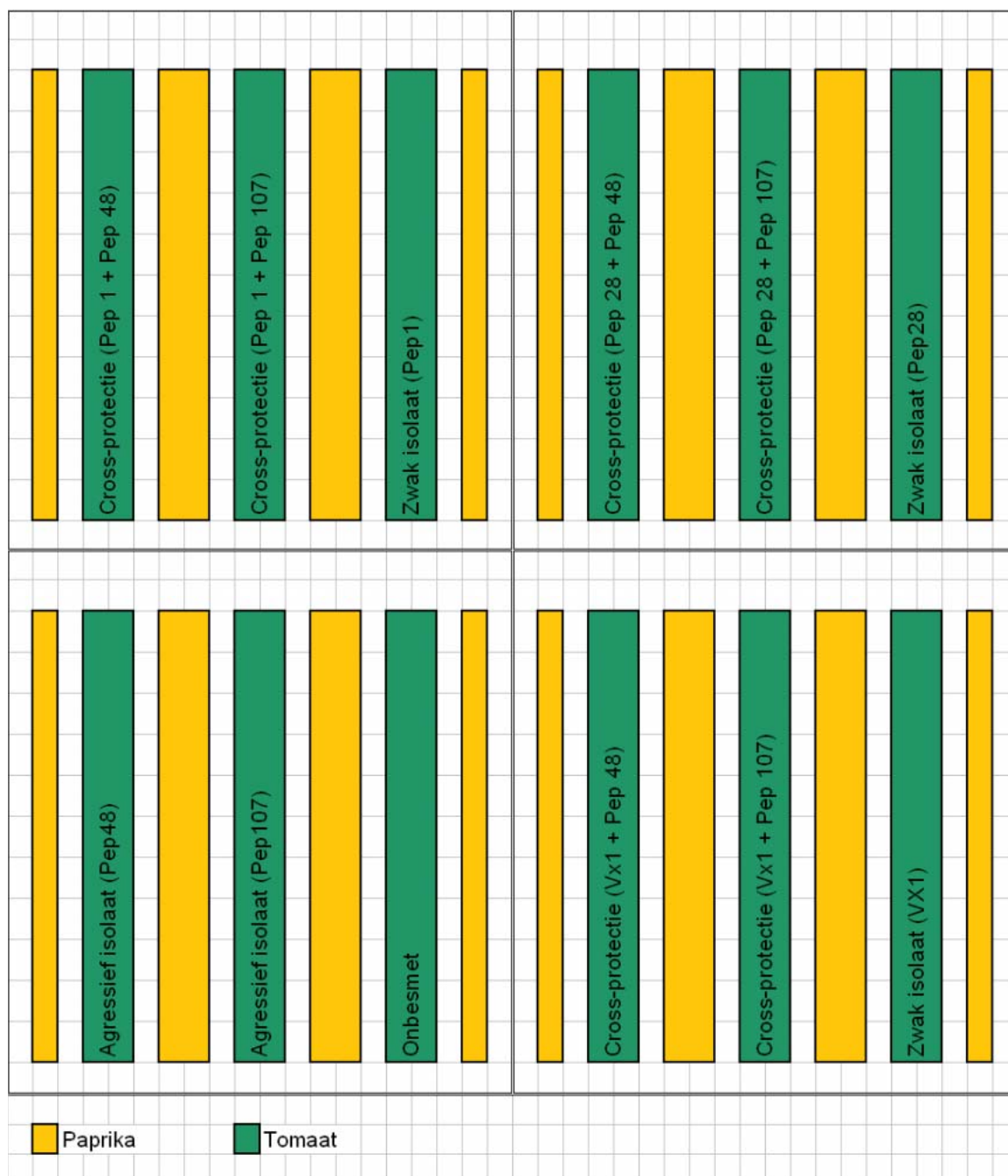
- Negatieve Controle, ofwel gezonde tomatenplanten
Deze behandeling geeft aan welke productie bereikt wordt in afwezigheid van het virus.
- Enkele besmetting *Vx1*
- Enkele besmetting *Pep1*
- Enkele besmetting *Pep28*
Deze behandelingen geven aan of de zwakke isolaten daadwerkelijk zwak zijn en geen productie of kwaliteitsverliezen geven.
- Enkele besmetting *Pep48*
- Enkele besmetting *Pep107*
Deze behandelingen geven aan welke schade de agressieve isolaten geven in afwezigheid van cross-protectie.

- Cross-protectie behandeling: bescherming *Vx1* tegen *Pep48*
- Cross-protectie behandeling: bescherming *Vx1* tegen *Pep107*
- Cross-protectie behandeling: bescherming *Pep1* tegen *Pep48*
- Cross-protectie behandeling: bescherming *Pep1* tegen *Pep107*
- Cross-protectie behandeling: bescherming *Pep28* tegen *Pep48*
- Cross-protectie behandeling: bescherming *Pep28* tegen *Pep107*

Deze behandelingen geven aan of de zwakke isolaten daadwerkelijk bescherming bieden tegen de agressieve isolaten.

De behandelingen zijn verdeeld over vier kascompartimenten bij Wageningen UR Glastuinbouw in Bleiswijk (Fig. 2). In elk van deze kascompartimenten bevonden zich twaalf teeltgoten. De twee buitenste teeltgoten van het compartiment vormden de randrijen waarop paprikaplanten groeiden. De tien teeltgoten daartussen besloegen vijf carrousel. Op drie hiervan stonden tomaten geplant, waarbij elk carrousel één behandeling vormde. Tussen de afzonderlijke behandelingen lag telkens één carrousel waarop paprika's stonden. Paprika is voor zover bekend geen systemische gastheer van pepinomozaïekvirus en vormt dus een effectieve barrière tegen ongewenste verspreiding van dit virus tussen de behandelingen. De plattegrond in Figuur 2 geeft de exacte locatie van de twaalf behandelingen binnen het complex weer.

Omwille van de statistiek is elke carrousel in vier gelijke blokken verdeeld, zodat elk blok kon fungeren als pseudoherhaling. Het hanteren van echte herhalingen is vanwege de besmettelijkheid van het virus niet mogelijk.



Figuur 2. Plattegrond van de proef. De totale proef besloeg vier compartimenten. Elke carousel met tomaat omvatte één behandeling. Tussen de afzonderlijke behandelingen lag telkens een carousel met paprikaplanten.

2.4 Proefverloop

Het onderzoek vond plaats onder uniforme teeltcondities en op uniform plantmateriaal. Daarbij is gekozen voor de cultivar *Elanto*. Deze cultivar is geënt op *Emperador*. In de randrijen stonden paprika's van het ras *Spirit*. De planten zijn gezaaid op 27 november en zouden 8 januari worden afgeleverd.

In de behandelingen waarin *Vx1*, *Pep1* of *Pep28* moest komen, zijn deze planten op 20 januari geïnoculeerd met virus. Sinds die tijd gold in de kassen een specifieke werkvolgorde om de gevolgen van een eventuele ongewenste

overdracht van het virus zoveel mogelijk te beperken. Daarnaast golden vanaf dat moment in de kas strikte hygiënemaatregelen en had elk van de behandelingen zijn eigen gereedschap. Tussen het betreden van de afzonderlijke behandeling werden telkens nieuwe pakken en handschoenen aangetrokken. Op 6 maart zijn de inoculaties met de agressieve virusvarianten uitgevoerd.

Vanaf 21 april werd er in de kassen geoogst. De waarnemingen zijn op 13 mei beëindigd, waarna de kassen tussen 20 en 27 mei geruimd zijn en nadien grondig schoongemaakt om besmetting naar andere proeven uit te sluiten.

De teeltcondities (temperatuur, lichtintensiteit, relatieve luchtvochtigheid en CO₂ concentraties) zijn vastgelegd met data loggers. Buiten het reguliere gewaswerk waren er weinig ingrepen nodig. Halverwege en eind april is gespoten tegen witte vlieg met Admiral, terwijl begin mei is gespoten met Methonex. Alle bespuitingen zijn in alle vier de compartimenten uitgevoerd, ongeacht het besmettingsniveau met witte vlieg om uit te sluiten dat er door de bespuiting verschillen zijn ontstaan. Daarnaast hingen er in de kas zwavelpotten tegen de meeldauw. Gedurende de looptijd van de kasproef is er geen uitval door *Botrytis* opgetreden.

2.5 Toetsingen DAS-ELISA

Voordat de inoculatie met de zwakke stammen is uitgevoerd, zijn bladmonsters genomen van alle planten. Deze bladmonsters zijn met een DAS-ELISA getoetst op de aanwezigheid van pepinomozaïekvirus om uit te sluiten dat er voor de inoculatie al een ongewenste besmetting had plaatsgevonden.

Voordat de inoculatie met de agressieve stammen is uitgevoerd, zijn bladmonsters genomen van alle planten in de twee behandelingen waarin de enkele infecties van deze stammen zouden worden ingebracht. Ook deze bladmonsters zijn met een DAS-ELISA getoetst op de aanwezigheid van pepinomozaïekvirus om uit te sluiten dat er voordien al een ongewenste besmetting had plaatsgevonden.

Gedurende de proef ook diverse bladmonsters genomen uit de koppen van besmette planten. Per behandeling zijn daarbij telkens vier monsters genomen (één per pseudoherhaling). In totaal zijn dat dus 48 monsters per bemonstering. Er zijn wekelijks bladmonsters genomen in de eerste vier weken na de inoculatie met de zwakke stammen en vervolgens opnieuw in de eerste vier weken na de inoculatie met de agressieve stammen. Vanaf dat moment was het de bedoeling om vierwekelijks een monster te nemen, maar door de ingekorte looptijd is nadien nog slechts één monster genomen. Van deze monsters is de virusconcentratie bepaald, die aanwijzingen kan geven over het verloop van de besmetting.

2.6 Waarnemingen bladsymptomen

De waarnemingen van de symptomen op de tomatenplanten zijn gemaakt met een gestandaardiseerd scoreformulier (Bijlage I) dat ook in diverse andere onderzoeken naar pepinomozaïekvirus gebruikt is [8, 16]. De symptomen in de kop van de plant waarnaar gekeken wordt, zijn bobbeling van het blad, brandnetelblad, bladnecrose (bladverbruining), stengelnecrose en mozaïek. De symptomen op de bladeren onder de kop waarna gekeken wordt, zijn gele vlekken, bladnecrose, stengelnecrose, bladmisvorming en chlorose. De ernst van elk symptoom is aangegeven op een schaal van 0 (geen symptomen) tot 4 (zeer ernstige symptomen). De scores van de afzonderlijke symptomen zijn in de analyse gesommeerd tot een totaalscore. Deze totaalscore geeft een globaal beeld van de totale schade die het virus toebrengt aan de tomatenplanten.

2.7 Waarnemingen productie en vruchtsymptomen

De tomaten zijn vanaf 21 april wekelijks geoogst. De oogst is per blok beoordeeld. Hierbij zijn de tomaten gesorteerd in grootteklasse, beoordeeld op kwaliteit, geteld en gewogen op de dag waarop ze geoogst zijn. De criteria voor vruchtkwaliteit zijn gebaseerd op EU-Directive 790/2000 EC 'Marketing standard for tomatoes'. De vruchten zijn verdeeld over de grootte klassen <35 mm, 37-47 mm, 47-57 mm, 57-67 mm en >67 mm. Alle vruchten zijn verder ingedeeld in klasse 1, klasse 2 of afval, afhankelijk van de aanwezigheid van marmering, wankleurigheid en andere afwijkingen zoals te zachte vruchten, scheurtjes, beschadigingen en neusrot.

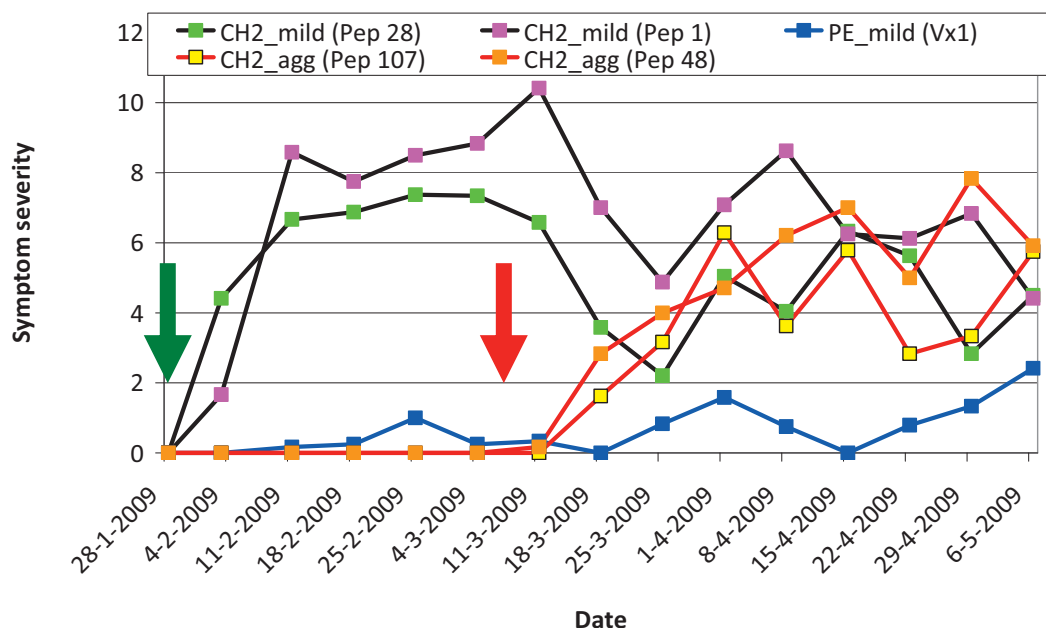
3 Resultaten

Voorafgaand aan de kasproef zijn alle planten gecontroleerd op de afwezigheid van pepinomozaïekvirus. Met een DAS-ELISA is daarna bepaald of de inoculaties met de zwakke isolaten geslaagd zijn, wat bij alle behandelingen het geval bleek. Binnen twee weken na inoculatie waren alle planten besmet met het virus. Ook aan het einde van de proef is gecontroleerd of er virus in de planten aanwezig was en is in alle planten met een ELISA virus aangetoond.

Tijdens de proeven zijn waarnemingen gedaan in de behandelingen met de enkele infecties van zwakke isolaten, in de behandelingen met enkele infecties van agressieve isolaten en in de cross-protectie behandelingen. De waarnemingen op planten die alleen besmet zijn met het zwakke isolaat geven aan hoe mild deze isolaten zelf zijn. De waarnemingen op planten die alleen besmet zijn met de agressieve isolaten geven aan hoe ernstig de schade zou zijn als er geen cross-protectie wordt toegepast. Tenslotte geven de cross-protectie behandelingen aan in hoeverre de zwakke isolaten in staat zijn om tomatenplanten te beschermen tegen de agressieve isolaten van het virus.

3.1 Symptoomverloop bij enkele besmetting

Het verloop van de bladsymptomen is gevolgd door wekelijks waarnemingen te doen. De resultaten voor de enkele besmettingen staan in Figuur 3 weergegeven. Uit deze grafiek komt direct naar voren dat de enkele besmetting van de zwakke CH2 isolaten (*Pep 1* en *Pep 28*) veel symptomen laat zien. Kort na inoculatie nemen de symptomen in deze beide behandelingen sterk toe. Later nemen de symptomen iets af, maar op het moment van beëindiging van de proeven waren deze symptomen nog altijd (te) agressief. In eerdere proeven waarbij deze isolaten zijn gebruikt, gaven ze nooit hogere symptoomscores dan 4 tot 5, dus dat *Pep28* nu een score van 7 en *Pep1* nu een score van 10 bereikt is zeer uitzonderlijk te noemen. De oorzaak hiervan is niet eenduidig te achterhalen. Mogelijk heeft de slechte kwaliteit van de planten een rol gespeeld. De plantenkweker had namelijk de planten per ongeluk getopt en om weer op de juiste plantdichtheid te komen is één van de toppen uit het toch al zwakke gewas verwijderd. Dit heeft de nodige stress veroorzaakt, wat de planten gevoeliger kan maken voor het virus. Daarnaast kunnen ook de weersomstandigheden op het moment van inoculatie de plantstress hebben vergroot. Ook *Vx1* gaf meer symptomen dan het isolaat in eerdere proeven had gedaan, wat een duidelijke indicatie is dat de planten in de huidige kasproef gevoeliger waren voor de ontwikkeling van symptomen. Bij *Vx1* was de ernst van de symptomen echter nog altijd op een zeer acceptabel niveau.

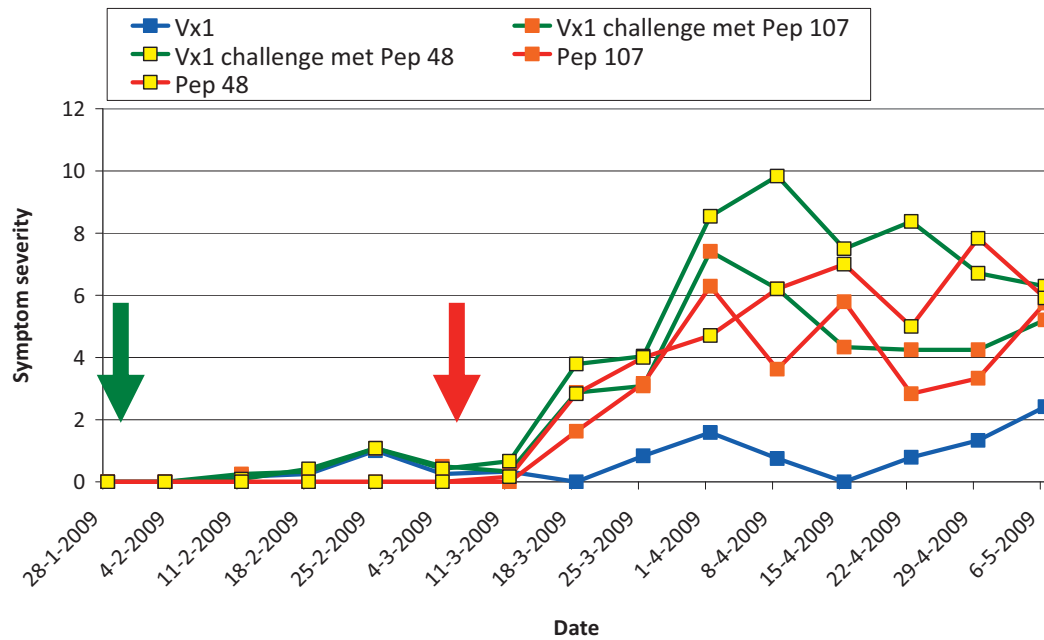


Figuur 3. Ontwikkeling van de bladsymptomen in de enkele infecties met de drie zwakke en twee agressieve isolaten. De afzonderlijke symptomen zijn bij elkaar opgeteld tot een enkele 'symptoomscore' die een globaal beeld geeft van de ernst van de infectie. Hoe hoger deze score, des te agressiever de symptomen. De twee zwakke Chili-2 isolaten (Pep1 en Pep28, zwarte lijnen) en Vx1 (blauwe lijn) zijn 28 januari geïnoculeerd (groene pijl), terwijl de agressieve Chili-2 isolaten (Pep48 en Pep107, rode lijnen) 6 maart zijn ingebracht (rode pijl). In Tabel 2 zijn gegevens terug te vinden van de afzonderlijke symptomen zoals die optraden gedurende de proef.

Uit Figuur 3 komt tevens naar voren dat de symptomen van de agressieve isolaten meevallen. Vooral *Pep48* reageerde in eerdere testen zeer agressief doordat dit isolaat heftige necrose op de bladeren veroorzaakte. Voor *Pep107* gold deze verwachting met betrekking tot bladsymptomen niet, omdat dit isolaat gekozen is op basis van de vruchtsymptomen. De symptomen van beide isolaten waren kort na inoculatie duidelijk zichtbaar, maar de agressiviteit van de symptomen was milder dan verwacht. Op het moment dat de proef begin mei beëindigd werd, waren de bladsymptomen van de agressieve Chili-2 isolaten slechts iets heftiger dan de bladsymptomen van de zwakke Chili-2 isolaten. De oorzaak hiervan is onduidelijk. Mogelijk heeft de plantleeftijd of het moment van inoculatie een rol gespeeld. In eerdere testen met beide isolaten zijn deze geïnoculeerd op jonger plantmateriaal (2 tot 6 weken oud) dan nu het geval was (18 weken oud). Daarnaast wordt de vergelijking enigszins vertekend doordat de zwakke Chili-2 isolaten juist agressiever waren dan verwacht. Ook het in gelijktijdig lopende PEPEIRA project werd een agressief Chili-2 isolaat gebruikt. Hiervan waren de bladsymptomen ook niet bijzonder agressief, maar veroorzaakte het isolaat uiteindelijk wel 8% kwaliteitsverlies.

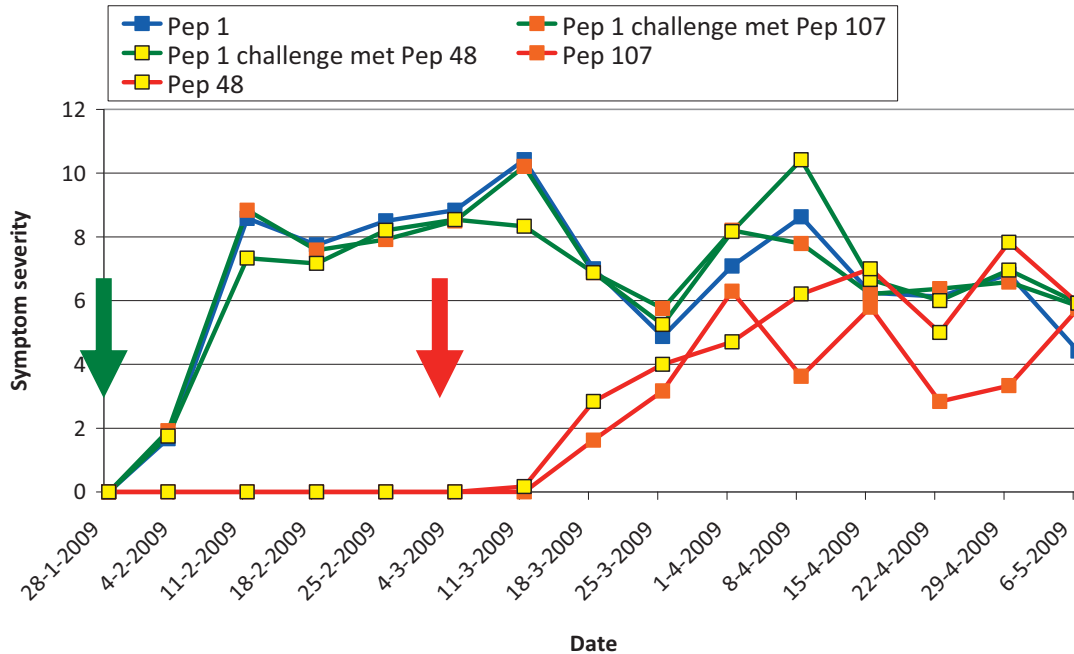
3.2 Symptoomverloop bij Cross-protectie

Het verloop van de bladsymptomen is ook binnen de cross-protectie behandelingen gevolgd, waarbij er dus een tweede besmetting met een agressief virus plaatsvond. De beperkte looptijd van de proef maakt het onmogelijk om hieruit harde conclusies te trekken, maar er zijn wel enkele trends zichtbaar in de onderstaande figuren.

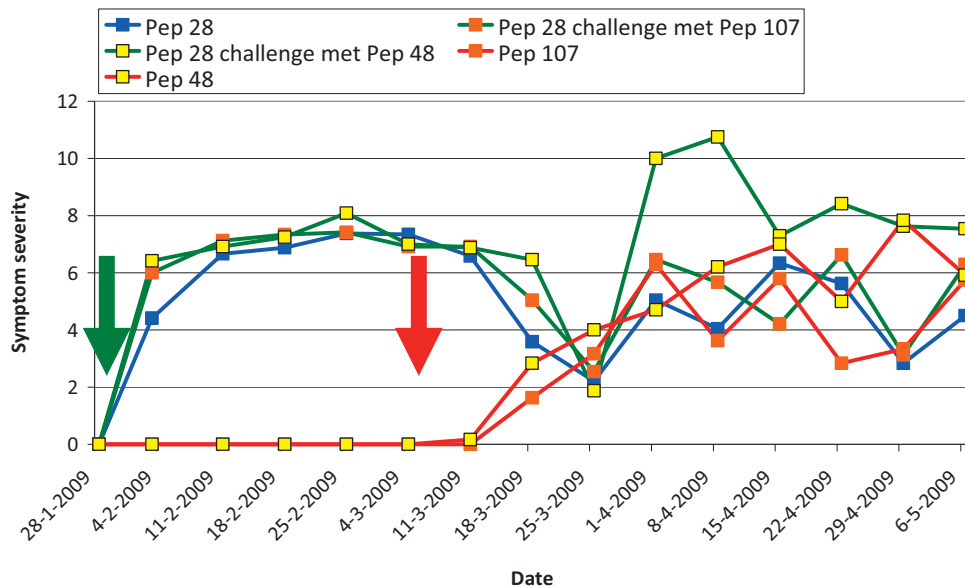


Figuur 4. Ontwikkeling van de bladsymptomen in de enkele infecties met twee agressieve isolaten en in de cross-protectie behandelingen met Vx1. De afzonderlijke symptomen zijn bij elkaar opgeteld tot een enkele 'symptoomscore'. Hoe hoger deze score, des te agressiever de symptomen. De planten met Vx1 (blauwe lijn) zijn op 28 januari geïnoculeerd (groene pijl), terwijl de agressieve Chili-2 isolaten (rode lijnen) op 6 maart zijn ingebracht (rode pijl). De planten in de cross-protectie behandelingen (groene lijnen) zijn op 28 januari geïnoculeerd met Vx1 en 6 maart gechallengeerd met Pep48 en Pep107.

Uit Figuur 4 wordt duidelijk dat er geen sprake is van bescherming van *Vx1* tegen de bladsymptomen van de twee agressieve Chili-2 isolaten. De symptomen van *Pep107* nemen net zo snel toe los ongeacht het feit of de planten eerst zijn geïnoculeerd met *Vx1* of niet. De symptomen in de combinatie van *Vx1* met *Pep48* lijken zelfs iets heftiger te zijn in vergelijking met de enkele infectie met *Pep48*. Dit alles duidt erop dat het cross-protectie mechanisme niet werkt als met *Vx1* getracht wordt om de gevolgen van een agressieve infectie met Chili-2 isolaten tegen te gaan.



Figuur 5. Ontwikkeling van de bladsymptomen in de enkele infecties met twee agressieve isolaten en in de cross-protectie behandelingen met Pep1. De afzonderlijke symptomen zijn bij elkaar opgeteld tot een enkele 'symptoomscore'. Hoe hoger deze score, des te agressievere de symptomen. De planten met Pep1 (blauwe lijn) zijn op 28 januari geïncubeerd (groene pijl), terwijl de agressieve Chili-2 isolaten (rode lijnen) op 6 maart zijn ingebracht (rode pijl). De planten in de cross-protectie behandelingen (groene lijnen) zijn op 28 januari geïncubeerd met Pep1 en op 6 maart gechallenged met Pep48 en Pep107.



Figuur 6. Ontwikkeling van de bladsymptomen in de enkele infecties met twee agressieve isolaten en in de cross-protectie behandelingen met Pep28. De afzonderlijke symptomen zijn bij elkaar opgeteld tot een enkele 'symptoomscore'. Hoe hoger deze score, des te agressievere de symptomen. De planten met Pep28 (blauwe lijn) zijn op 28 januari geïncubeerd (groene pijl), terwijl de agressieve Chili-2 isolaten (rode lijnen) op 6 maart zijn ingebracht (rode pijl). De planten in de cross-protectie behandelingen (groene lijnen) zijn op 28 januari geïncubeerd met Pep28 en op 6 maart gechallenged met Pep48 en Pep107.

Uit Figuur 5 wordt duidelijk dat de symptomen van *Pep1* al zodanig heftig zijn dat er geen uitspraken meer gedaan kunnen worden over de werking van cross-protectie tegen de twee agressieve Chili-2 isolaten. Wel is duidelijk dat er geen verandering optreedt na de inoculatie met de agressieve Chili-2 isolaten. Om uitsluitsel te geven over de vraag of het cross-protectie mechanisme werkt als men met een zwak Chili-2 isolaat tracht om de gevolgen van een infectie met agressieve Chili-2 isolaten tegen te gaan, zal eerst een zwakker Chili-2 isolaat gevonden en getest moeten worden. Voor de behandelingen met *Pep28* geldt min-of-meer hetzelfde als voor *Pep1* (Fig. 6), met als enige uitzondering dat er een kortstondige piek is in de symptomen in de combinatie van *Pep28* met *Pep48*, die op een doorbraak van het cross-protectie mechanisme zou kunnen duiden.

Tabel 2 vat de bovengenoemde resultaten nog eens samen voor de afzonderlijke symptomen. Hieruit blijkt dat alle behandelingen die met *Pep48* en *Pep107* besmet zijn er nagenoeg hetzelfde type symptomen op na houden en dat die symptomen vergelijkbaar zijn qua ernst. In deze planten zijn dus de symptomen zichtbaar van de 'zwakke isolaten' die dus niet zwak genoeg zijn. Er is één concrete aanwijzing dat het cross-protectie mechanisme wel werkt in deze gevallen, namelijk het uitblijven van necrose in de met *Pep1* en *Pep28* beschermde planten na inoculatie met *Pep48*. Duidelijk is ook dat bescherming met *Vx1* niet kan voorkomen dat de symptomen van *Pep48* en *Pep107* zichtbaar worden in het gewas. In alle gevallen verschijnen dezelfde symptomen als in de enkele besmetting met *Pep48* en *Pep107*. Het meest duidelijke voorbeeld van het falen van het cross-protectie mechanisme is het optreden van necrose in de combinatie tussen *Vx1* en *Pep48*.

Tabel 2. Het optreden van de afzonderlijke symptomen in de twaalf behandelingen. De symptoomscore geeft een indicatie van de heftigheid van de symptomen. Hoe hoger de score hoe heftiger de symptomen.

Behandeling	Bobbeling	Brandtelblad	Stengel necrose (kop)	Blad necrose (kop)	Mozaïek/verkleuring	Gele stippen	Bladmisvorming	Stengel necrose (gewas)	Blad necrose (gewas)	Chlorose
Onbesmet	0,1	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
<i>Vx1</i>	0,3	0,0	0,0	0,0	0,9	0,1	0,5	0,0	0,0	0,0
<i>Pep1</i>	1,4	0,9	0,0	0,0	1,8	0,7	2,4	0,0	0,0	0,1
<i>Pep28</i>	0,8	0,5	0,0	0,0	1,5	0,9	1,3	0,0	0,0	0,1
<i>Pep107</i>	0,9	0,8	0,0	0,0	1,6	0,8	0,9	0,0	0,0	0,0
<i>Pep107</i> (beschermd <i>Pep1</i>)	1,3	1,2	0,0	0,0	1,7	0,8	2,3	0,0	0,0	0,0
<i>Pep107</i> (beschermd <i>Pep28</i>)	0,9	0,7	0,0	0,0	1,7	0,9	1,6	0,0	0,0	0,0
<i>Pep107</i> (beschermd <i>Vx1</i>)	1,0	0,8	0,0	0,0	2,0	0,7	1,1	0,0	0,0	0,1
<i>Pep48</i>	1,1	1,4	0,0	0,0	1,6	0,6	1,4	0,0	1,0	0,0
<i>Pep48</i> (beschermd <i>Pep1</i>)	1,6	1,4	0,0	0,0	1,8	0,7	2,4	0,0	0,0	0,1
<i>Pep48</i> (beschermd <i>Pep28</i>)	1,7	1,6	0,0	0,0	2,2	0,9	2,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pep48</i> (beschermd <i>Vx1</i>)	1,6	1,7	0,0	0,0	1,9	0,8	1,5	0,0	1,0	0,1

Één van de opvallendste zaken in de symptoomontwikkeling is dat isolaten die op voorhand als zwak werden aangemerkt in een later stadium agressief bleken te zijn en *vice versa*. Figuur 7 illustreert dit nog eens duidelijk. De oorzaak hiervan was niet duidelijk, maar deze informatie is wel zeer relevant met betrekking tot de ontwikkeling van een stabiele zwakke Chili-2 stam. Uit voorafgaand onderzoeken is gebleken dat de zwakke stammen *1066* en *V(x)1*

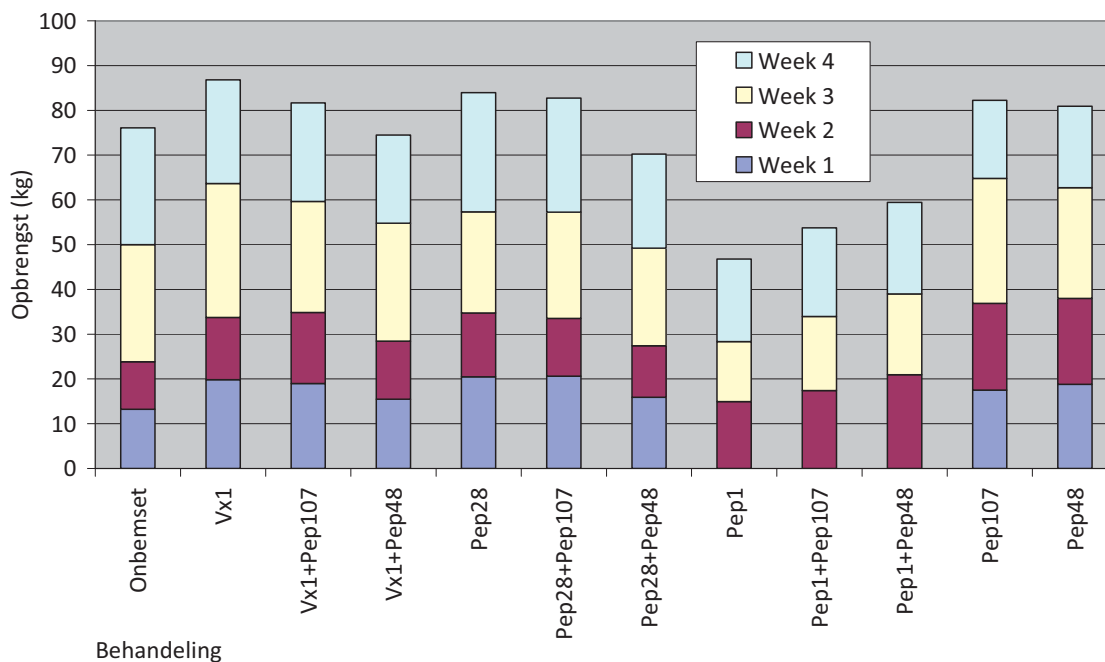
stabiel zwak zijn in hun symptomen, terwijl het agressieve *DB1* isolaat (een isolaat van EU-stam) dat in 2006 in de kasproef gebruikt is, consequent agressieve symptomen geeft. Daarom zijn in een klein vervolgproufje vijf isolaten van de Chili-2 onderzocht op de symptoomontwikkeling over de tijd. Hierbij zijn de isolaten tot vijf keer toe overgezet van zieke op gezonde planten van dezelfde cultivar. Dat gebeurde telkens na drie weken, waarbij door de hele proef heen dezelfde klimaatinstellingen gehandhaafd werden. In dit proefje bleek dat de symptomen van elk van de isolaten bijzonder variabel waren. Twee van de isolaten die in eerste instantie mild waren, bleken na de vierde overzetting ineens bijzonder agressief te zijn. Andersom bleek dat een isolaat wat in eerste instantie zeer agressief was, na de derde overzetting mild te zijn geworden om na de vijfde overzetting opeens weer agressief te worden.



Figuur 7. De Chili-2 isolaten gebruikt in dit onderzoek, bleken instabiel te zijn wat betreft hun symptoomontwikkeling. Pep48 was in 2008 vele malen agressiever dan in 2009, terwijl voor Pep1 het omgekeerde gold

3.3 Opbrengst

Tot het voortijdig stopzetten van de proeven zijn van vier weken de oogstdata bekend. De totale opbrengst in elk van de behandeling staat per week weergegeven in Figuur 8. Doordat de behandelingen zijn opgedeeld in vier blokken, kan statistiek toegepast worden. Hieruit blijkt dat de opbrengst van de behandelingen *Pep1*, *Pep1* met *Pep107* en *Pep1* met *Pep48* significant lager liggen dan in de onbesmette controle. Bij de andere behandelingen wijkt de opbrengst niet significant af van de onbesmette controle. Deze lagere opbrengst is geheel terug te voeren op een verminderde productie in de eerste oogstweek. Feitelijk lag het compartiment met *Pep1* één tros achter op de andere compartimenten. Het zwakke *Pep1* isolaat heeft dus een negatief effect op de totale opbrengst, terwijl dat voor alle andere isolaten niet geldt. De andere zwakke isolaten (*Vx1* en *Pep28*) hadden geen negatief opbrengst-effect. Hierbij moet echter aangetekend worden dat onduidelijk is hoe dit zich over het hele seizoen heen ontwikkeld zou hebben. De agressieve isolaten hebben na vier weken (nog) geen negatief effect op de totale opbrengst. Over de werking van cross-protectie kunnen aangaande de totale opbrengst dus geen uitspraken worden gedaan.



Figuur 8. Effect van de verschillende behandelingen op de totale opbrengst in de eerste vier weken van de proef (totaal aantal kg per behandeling).

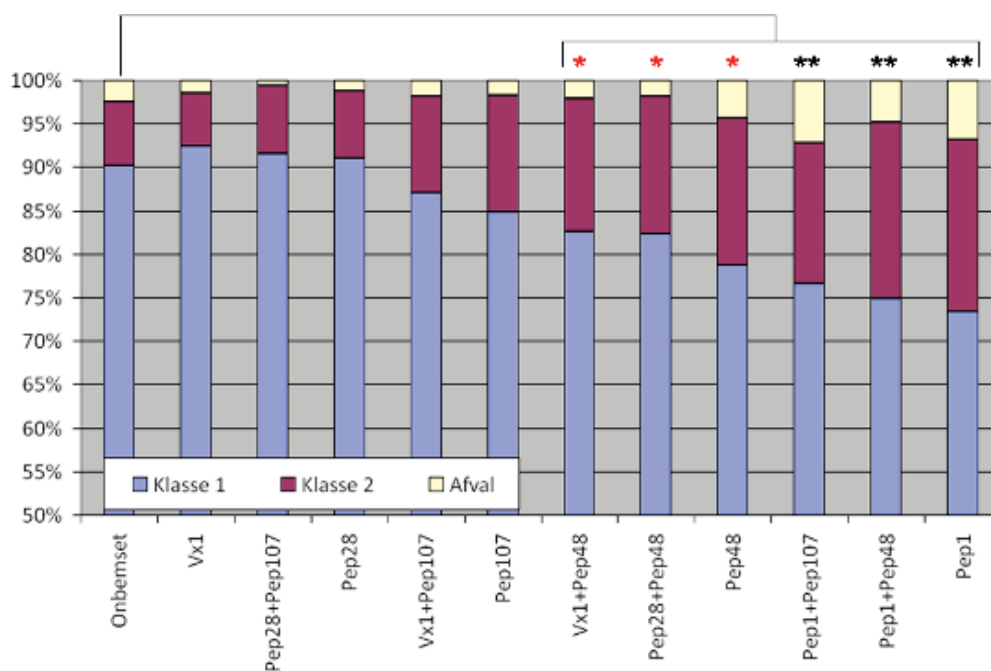
De gewasstand in de met *Vx1* en *Pep28* besmette plant was beter dan in de planten die met de agressieve isolaten besmet waren, maar dit vertaalde zich niet in een hogere opbrengst. Dit gold zowel voor de enkele infecties van deze isolaten als voor de cross-protectie behandelingen met deze isolaten. Vooral het verschil met de met *Pep1* besmette planten was treffend. Hoe dit zich in de loop van het seizoen ontwikkeld zou hebben, blijft door de verkorte looptijd een openstaande vraag.

3.4 Vruchtkwaliteit

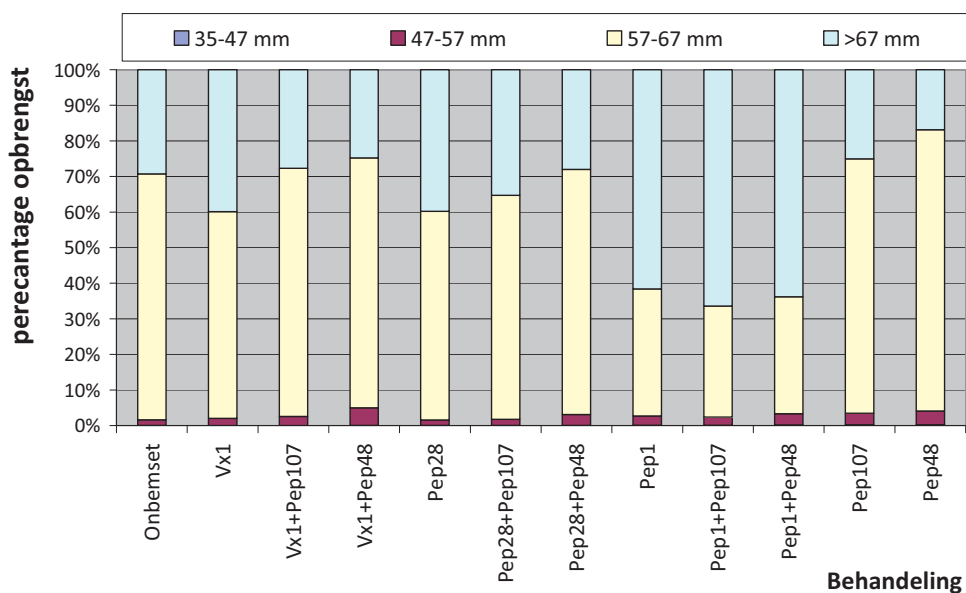
De geoogste vruchten zijn ook beoordeeld op vruchtgrootte en vruchtkwaliteit. Wat betreft de invloed van de zwakke isolaten op de vruchtkwaliteit geldt opnieuw dat *Pep1* niet als zwak kan worden aangemerkt. Dit isolaat gaf significant veel meer vruchtsymptomen dan de onbehandelde controle (Fig. 9). De isolaten *Pep28* en *Vx1* weken niet significant af van de onbehandelde controle. Wel gaf *Pep28* op de eerste twee trossen een aantal glazige vruchten. Deze weken niet zodanig af dat het klasse 2 vruchten waren, maar hadden wel een zichtbare afwijking. Het isolaat *Pep107* had weliswaar een mindere vruchtkwaliteit tot gevolg dan de onbehandelde controle, maar dit verschil was niet significant. Het effect van *Pep107* op het ontstaan van vruchtsymptomen was na vier weken dus zodanig klein dat dit isolaat ook zonder toepassing cross-protectie al geen aantoonbare problemen gaf aangaande de vruchtkwaliteit.

Uit Figuur 9 blijkt duidelijk dat het agressieve isolaat *Pep48* wel een significant negatief effect heeft op de vruchtkwaliteit. Het percentage vruchten wat wordt afgekeurd voor klasse 1, neemt met meer dan 10% toe onder invloed van een infectie met dit isolaat. Zowel *Vx1*, *Pep1* als *Pep28* konden geen significante verbetering bewerkstelligen ten opzichte van de enkele infectie met *Pep48*, terwijl de vruchtkwaliteit wel significant slechter was dan in de onbehandelde controle. Hier levert cross-protectie dus geen verbetering op. In alle behandelingen met *Pep48* was er een duidelijke toename in de hoeveelheid wankleurige vruchten. Opnieuw geldt de opmerking dat hier alleen de eerste 3 tot 4 trossen onderzocht zijn en dat de onderzoeksperiode bovendien samenviel met een periode waarin ook in andere gelijktijdig lopende proeven, flinke symptomen zichtbaar waren, die later in het jaar verminderden.

De vruchtgrootte verschilt ook duidelijk tussen de behandelingen (Fig. 10). Alle behandelingen met *Pep1* gaven namelijk duidelijk grotere vruchten dan de andere behandelingen. Mogelijk was de vruchtzetting in deze behandeling minder, waardoor er meer assimilaten overblijven voor de vruchten die wel gezet zijn.



Figuur 9. Het percentage vruchten in de drie kwaliteitsklassen in de 12 behandelingen. De verticale as begint bij 50% en het onderliggende deel betreft allemaal klasse 1 vruchten. De behandeling waar één of meerdere sterren bijstaan scoorden significant slechter ($p < 0.05$; $p < 0.0005$) dan de onbesmette controle.



Figuur 10. Het percentage vruchten in de vier grootteklassen in elk van de 12 behandelingen.

4 Discussie en conclusie

De doelstelling van de hier beschreven kasproef was om te bepalen of zwakke stammen in staat zijn om de tomatenteelt te beschermen tegen nieuwe (agressievere) isolaten van het pepinomozaïekvirus. Daarbij zijn zowel het bestaande zwakke isolaat *Vx1* onderzocht als twee nieuwe zwakke Chili 2-isolaten (*Pep1* en *Pep28*).

4.1 Agressieve isolaten

Binnen dit onderzoek hebben we twee agressieve PepMV-isolaten geselecteerd om de werking van de zwakke stammen in cross-protectie te toetsen. We hebben getracht om deze selectie zo representatief mogelijk te maken voor de Nederlandse praktijksituatie waarin de CH2 stam een steeds belangrijkere rol speelt. Beide agressieve isolaten waren derhalve van deze CH2 stam. Daarbij is gekozen voor één isolaat dat necrotische symptomen gaf en één isolaat wat in eerder onderzoek heftige vruchtsymptomen had gegeven. De geselecteerde isolaten gaven echter in deze kasproef vele minder symptomen dan in eerdere onderzoek. Dit bemoeilijkt de proeven zeer, vooral als gaat om het aantonen van de werking van cross-protectie met een zwakke CH2 stam. Om te bepalen of *Vx1* bescherming biedt, waren de isolaten wel afdoende agressief. Doordat er slechts van vier oogstweken data verzameld zijn, is *Pep107* niet goed tot zijn recht gekomen. In deze vier weken gaf *Pep48* wel duidelijk meer virusgerelateerde vruchtsymptomen dan in de onbesmette controle, maar het relatieve aantal aangetaste vruchten lag nog altijd laag.

4.2 Cross-protectie met *Vx1*

De beperkte aanwezigheid van bladsymptomen in de enkele infecties met *Vx1* bevestigde dat dit een echt zwak isolaat is. Echter, bij een besmetting met de agressieve virusisolaten bleek *Vx1* niet in staat om de toename in bladsymptomen tegen te houden en bood het isolaat geen enkele verbetering ten opzichte van de onbeschermd plant. Terwijl *Vx1* wel bescherming biedt tegen isolaten van de EU-stam geldt dit dus niet voor isolaten van de Chili-2 stam. Dit bevestigt de cross-protectie proeven uit 2008, waarin evenmin een beschermend effect werd gevonden tegen agressieve isolaten van de Chili-2 stam. In deze proeven van 2008 is alleen gekeken naar de bladsymptomen en konden dus geen uitspraken gedaan worden over de vruchtsymptomen. Daarom is destijds ook besloten tot de uitvoering van deze kasproef. Wat betreft het ontstaan van vruchtsymptomen en de opbrengst geldt ook dat *Vx1* van zichzelf geen negatieve effecten heeft op vruchtsymptomen of opbrengst. Echter, het isolaat bood in de eerste vier oogstweken geen bescherming tegen de vruchtsymptomen van één van de agressievere isolaten, aangezien de vruchtsymptomen in beschermde planten even sterk toenamen als in onbeschermd plant. Dit bevestigt het beeld dat de Chili-2 isolaten de bescherming van *Vx1* doorbreken. In andere door GAC uitgevoerde proeven waren de bladsymptomen in de met *Vx1* beschermde planten wel minder heftig zijn dan in onbeschermd plant.

Wat betekent dit nu voor de huidige praktijk? Het feit dat bij het merendeel van de infecties die in Nederland plaatsvinden er een virusvariant van de Chili-2 stam aanwezig is, zou het gebruik van *Vx1* slechts een beperkte bijdrage leveren aan inperking van de aan pepinomozaïekvirus gerelateerde schade in de huidige praktijksituatie. Omdat duidelijk is aangetoond dat *Vx1* wel bescherming biedt tegen isolaten van de EU-stam, zou in die praktijkgevallen waar alleen een isolaat van de EU-stam aanwezig is, *Vx1* uitkomst bieden tegen de schade van pepinomozaïekvirus. In de situatie zoals die in 2006 bestond en waarbij alleen isolaten van de EU-stam aanwezig waren, zou protectie met *Vx1* dus zinvol zijn geweest. Echter, in de huidige praktijksituatie krijgen isolaten van de Chili-2 stam steeds meer de overhand. Uit de praktijkinventarisatie van 2008 bleek dat er in meer dan 80% van de monsters een Chili-2 isolaat aanwezig was, terwijl deze variant voor 2005 niet eens voorkwam in Nederland. Zeker als de trend zich doorzet dat de Chili-2 varianten een steeds groter aandeel krijgen, zal de keuze voor een bepaalde zwakke stam mee moeten veranderen. Toepassing van zwakke Chili-2 isolaten is dan de meest logische route, maar zoals hieronder staat beschreven is het zeer de vraag of deze strategie succesvol zou zijn. Dat de Chili-2 varianten

in de praktijk niet altijd voor problemen zorgen, komt doordat er binnen deze groep isolaten ook een grote variatie aan symptomen bestaat. De biologische karakterisering van een grote serie praktijkisolaten in 2008, heeft al laten zien dat er binnen de Chili-2 groep zowel isolaten met milde als met heftige bladsymptomen bestaan. Dit geldt ook voor de vruchtsymptomen.

4.3 Cross-protectie met nieuwe zwakke Chili-2 stammen

Uit kleinschalige kasproeven kwam in 2008 naar voren dat een zwak Chili-2 isolaat (*Pep1*) bescherming bood tegen het optreden van bladsymptomen bij een infectie met agressieve Chili-2 isolaten. Of de in deze kasproeven onderzochte isolaten *Pep1* als *Pep28* ook bescherming bieden onder semi-praktijkomstandigheden is onduidelijk, doordat deze isolaten meer bladsymptomen veroorzaakten dan in eerdere proeven was gebleken. De oogstresultaten van de eerste vier weken gaven bovendien aan dat *Pep28*, net als *Vx1*, niet in staat is om in de eerste periode na de infectie de vruchtsymptomen van *Pep48* tegen te houden. Door de korte looptijd van de proef kunnen geen conclusies worden getrokken over hoe de situatie zich over het hele seizoen heen ontwikkeld zou hebben. In andere door GAC in 2009 uitgevoerde proeven gaf *Pep1* betere resultaten, waarbij *Pep1* wel echt zwak was.

4.4 Stabiliteit symptomen Chili-2 isolaten

Stel dat er inderdaad met een zwak Chili-2 gewerkt moet worden voor succesvolle cross-protectie in de toekomst, dan is het van belang om een stam te selecteren die weinig of geen symptomen geeft en daarnaast stabiel is in zijn symptoomexpressie. Het is zeer de vraag of het lukt om een zwak Chili-2 isolaat te vinden, maar zorgwekkend is bovendien dat de tot nu toe onderzochte isolaten niet stabiel bleken te zijn in hun symptoomexpressie. Isolaten die in eerste instantie zwak bleken, laten bij hergebruik alsnog heftige bladsymptomen zien. Van zowel *Pep28* als *Pep1* was al bekend dat deze isolaten lichte vruchtsymptomen konden geven, maar bij *Pep1* waren deze symptomen in de huidige proef duidelijk heftiger dan in de eerdere onderzoeken, terwijl er wel vanuit dezelfde batch is geïnoculeerd als in de kleine cross-protectie proeven van 2008. In het geval van *1066* en *Vx1* is de symptoomexpressie wel bewezen stabiel. Zowel na kortdurende opslag in de vriezer als na het doorenten zijn deze isolaten stabiel in hun milde symptomen. Dit geeft enerzijds aan dat de nu geteste Chili-2 isolaten te veel symptomen geven om als echte zwakke stam door te gaan, maar impliceert bovendien dat er een risico kleeft aan het gebruik van Chili-2 isolaten. Pas als er een bewezen stabiel zwak isolaat wordt gevonden, is een praktijktoepassing het overwegen waard. Ook zal dan onderzocht moeten worden wat er gebeurt als het zwakke isolaat zich vermengt met praktijkisolaten, om uit te sluiten dat er door recombinatie nieuwe virusvarianten kunnen ontstaan met een afwijkend symptoombeeld.

4.5 Conclusie

Doordat de proef tussentijds is beëindigd, is het niet mogelijk om op alle onderzoeksvragen sluitende antwoorden te geven. Wel zijn er duidelijke trends waarneembaar. *Vx1* is niet in staat om een infectie met agressievere isolaten van de Chili-2 stam tegen te houden. Dit komt overeen met de uitkomst van de kleinschalige proeven in 2008. Ook in 'beschermd' planten was na besmetting met de Ch2-isolaten isolaten een duidelijke toename zichtbaar in bladsymptomen en een lichte toename in vruchtsymptomen. Deze toename was gelijk aan die in onbeschermd planten. De gewasstand in de met *Vx1* en *Pep28* besmette plant was beter dan in de planten die met de agressieve isolaten besmet waren, maar dit vertaalde zich niet in een hogere opbrengst. Hoe dit zich in de loop van het seizoen ontwikkeld zou hebben, blijft door de verkorte looptijd een openstaande vraag. In eerdere kasproeven zijn *Vx1* en *1066* wel in staat gebleken de schade van isolaten van de EU-stam in te perken, maar gezien het feit dat momenteel de Chili-2 stam in de Nederlandse praktijk domineert, zou het gebruik van *Vx1* slechts een beperkte bijdrage leveren aan inperking van de aan pepinomozaïekvirus gerelateerde schade in de praktijk. Of de geteste zwakke isolaten van de Chili-2 stam de infectie met de agressievere isolaten van de Chili-2 stam tegenhouden is onduidelijk, maar deze nu geteste 'zwakke' isolaten zijn sowieso niet zwak genoeg voor een praktijktoepassing. Uit het onderzoek blijkt verder dat de nu geteste isolaten van de Chili-2 stam niet stabiel zijn wat betreft hun symptoomexpressie, iets wat de zoektocht naar een geschikt zwak Chili-2 isolaat bemoeilijkt.

5 Literatuur

1. Hanssen, I.M., et al., *Genetic characterization of Pepino mosaic virus isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination*. European Journal of Plant Pathology, 2007: p. 1-16.
2. Jorda, C., et al., *First Report of Pepino mosaic virus on Tomato in Spain*. Plant Disease, 2001. **85**: p. 1292.
3. Van der Vlugt, R.A.A., et al., *First report of Pepino mosaic virus on tomato*. Plant Disease, 2000. **84**: p. 103.
4. Verhoeven, J.T.J., R.A.A. Van der Vlugt, and J.W. Roenhorst, *High similarity between tomato isolates of Pepino mosaic virus suggests a common origin*. European Journal of Plant Pathology, 2003. **109**: p. 419-425.
5. Van der Vlugt, R.A.A. and C.C.M.M. Stijger, *Pepino mosaic virus*, in *Encyclopedia of Virology. Third Edition*, B. Mahy and M.H.V. Van Regenmortel, Editors. 2008, Elsevier Publishers. p. 103-108.
6. Vermunt, A., et al., *Haalbaarheid hygienstrategie bij tomatenbedrijven om vrij te blijven van pepinomozaïekvirus*. 2009.
7. Vermunt, A., *Relatie tussen symptomen, PepMV-varianten en tomatenrassen*, in *PT-project 12265*. 2006.
8. Stijger, I., et al., *Beschermende maatregelen tegen PepMV in de tomatenteelt*, in *Nota 548*. 2008, Wageningen UR Glastuinbouw: Bleiswijk.
9. Stijger, I., et al., *Op zoek naar de variabiliteit van pepinomozaïekvirus*, in *PT nummer (11598)*. 2006, Praktijkonderzoek Plant en Omgeving - Glastuinbouw: Naaldwijk.
10. Pagan, I., et al., *Genetic structure of the population of Pepino mosaic virus infecting tomato crops in Spain*. Phytopathology, 2006. **96**: p. 274-279.
11. Pospieszny, H., B. Hasiow, and N. Borodynko, *Characterization of two distinct Polish isolates of Pepino mosaic virus*. European Journal of Plant Pathology, 2008. **122**: p. 443-445.
12. Alfaro-Fernandez, A., et al., *First report of the US1 strain of Pepino mosaic virus in tomato in the Canary islands, Spain*. Plant Disease, 2008. **92**: p. 1590.
13. Vermunt, A., et al., *Bescherming en beheersing van PepMV in de tomatenteelt, onderdeel PepMV in de praktijk*. 2009.
14. Vermunt, A., *Relatie tussen symptomen, PepMV-varianten en tomatenrassen*. 2006, PT-project 12265.
15. Schenk, M., et al., *Bescherming en beheersing van PepMV in de tomatenteelt. Onderdeel Cross-protectie*, in *PT nummer (12384)*. 2009.
16. Stijger, I. and R. Hamelink, *First year project report PEPEIRA (Pepino mosaic virus: epidemiology, economic impact and pest risk analysis)*. 2008.

