

Voorkomen in plaats van genezen

J.F.J.M. van den Heuvel

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

'Gewasbescherming' publiceert een serie artikelen over de verschillende DLO-PO onderzoekprogramma's. In dit artikel wordt ingegaan op het programma 'Virussen en Viroïden' (1998-2001) dat wordt uitgevoerd door Plant Research International B.V., het Praktijkonderzoek Bloembollen en Bolbloemen (PBB) en het Proefstation voor de Bloemisterij en Glasgroenten (PBG). De speerpunten in dit programma zijn vastgesteld in nauw overleg met de betrokken sectoren en de Directies Landbouw en Wetenschap & Kennisoverdracht van het Ministerie van LNV. Dit ministerie financiert het onderzoek met een jaarlijkse bijdrage van ongeveer 1,7 miljoen gulden. De effectieve omvang is groter doordat projecten medegefinancierd worden door de Europese Commissie, het Productschap voor de Tuinbouw en het NWO/LNV-prioriteitsprogramma 'Gewasbescherming'.

Achtergrond

Virussen en viroïden laten zich niet makkelijk grijpen: ze zijn niet zelden slecht visueel herkenbaar, gaan over op het vegetatieve (knollen, bollen, stekken) en generatieve (zaad) 'nageslacht' van een geïnfecteerde plant, en worden efficiënt verspreid door insecten, nematoden, bodemschimmels en via contact. In tegenstelling tot de meeste plantenpathogenen kunnen infecties van virussen en viroïden niet rechtstreeks bestreden worden; genezen kan (nog) niet. In alle voor onze export belangrijke sectoren (onder andere aardappel, bollen, glasgroenten, vermeerderingsmateriaal, sierteelt) vormen (quarantaine) virussen en viroïden een continue bedreiging. Door telkens uit te gaan van schoon uitgangsmateriaal kunnen veel problemen voorkomen worden. Ondanks een schone start is het toch vrijwel onvermijdbaar dat er gedurende de teelt virussen geïntroduceerd worden. De natuurlijke vegetatie en aanpalende teelten huisvesten talloze infectiebronnen van waaruit het virus overgedragen kan worden door insecten, nematoden en bodemschimmels. Er moet dan ingegrepen

worden tegen deze virusoverbrengers om verdere verspreiding te voorkomen. Aangezien virusresistentie in cultuurgewassen eerder uitzondering dan regel is, speelt de chemie een prominente rol in de beheersing van virusverspreiding in de huidige praktijk. In een aantal voor de export belangrijke teelten wordt naar schatting de helft van de hoeveelheid toegepaste pesticiden ingezet alleen voor dit doel.

Doel

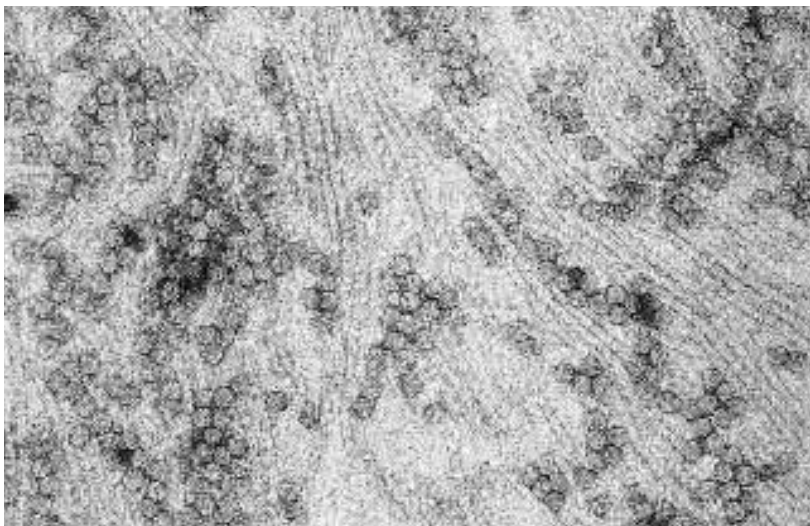
Het doel van het programma is om te komen tot een economisch en maatschappelijk verantwoorde methode om schade door virussen en viroïden te voorkomen en om het gebruik en de afhankelijkheid van pesticiden die ingezet worden tegen de overbrengers van virussen terug te dringen. Dit kan worden bereikt door de selectie en productie van gezond uitgangsmateriaal mogelijk te maken. Bij deze kwaliteitsborging spelen de in het programma ontwikkelde detectiemethoden een cruciale rol. Daarnaast worden er beheersmaatregelen ontwikkeld om op een omgevingsvriendelijke manier virusverspreiding te beteuge-

len. De nadruk ligt daarbij op het inzetten van biologische agentia tegen de vectoren van plantenvirussen en het ontwikkelen van (nieuwe vormen van) virusresistentie.

Centrale rol voor karakterisering

Virussen bestaan uit RNA of DNA omhuld door een eiwit (figuur 1) en soms nog een membraan. Viroïden zijn eenvoudiger van structuur omdat hun erfelijk materiaal (RNA) geen omhulsel kent. Daarom speelt de moleculair-biologische en biochemische karakterisering van het erfelijk materiaal en de manteleiwitten een centrale rol in het programma. Voorafgaand hieraan vindt een biologische karakterisering van virussen plaats op basis van toetsplanten en wijze van overdracht, en worden er methodes voor zuivering van het virus of viroïde ontwikkeld. Deze kennis is niet alleen van groot belang bij het bepalen van de identiteit en de productie van antistoffen voor serologische toetsen (ELISA), maar is ook essentieel voor i) het kunnen toepassen van nieuwe moleculaire detectiemethoden, ii) de productie van antistoffen via heterologe expressie van manteleiwitten van moeilijk te isoleren virussen, iii) biotechnologische toepassingen waarbij gebruik gemaakt wordt van virale genen om resistentie te induceren, en iv) het ontwikkelen van methodes voor risicoanalyse om potentiële ongewenste interacties tussen virussen, viroïden en virale transgenen in kaart te brengen.

ARTIKEL



Figuur 1: Een elektronenmicroscopische opname van een mengsel van virussen geïsoleerd uit aardappel. De diameter van het bolvormige virus is 25 nm.

Diagnostica

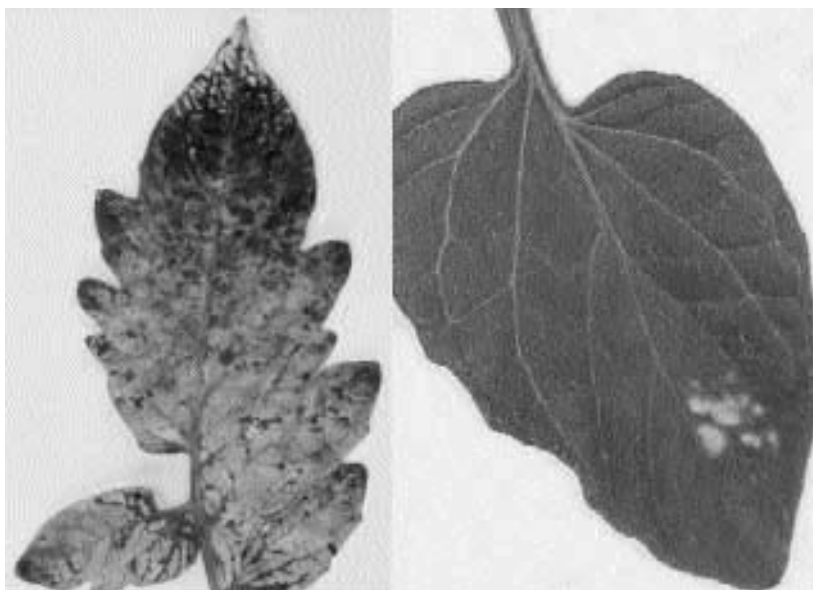
Door continue problemen met nieuwe virussen in de diverse gewasgroepen richt een belangrijk deel van het huidige programma zich op de karakterisering en de ontwikkeling van diagnostica. De beschikbaarheid van deze -vaak gewasgebonden- expertises en de daaruit voortvloeiende producten (onder meer diagnostische methoden, goed gekarakteriseerde inocula) is eminent in het adagium 'voorkomen is beter dan genezen'. Grootschalig in te zetten detectietechnieken dragen bij aan de kwaliteitscontrole in de productiekolom, de implementatie van (inter)nationale keuringseisen en vroegtijdige identificatie van quarantaine-organismen. Alleen al in aardappel werden in 1999 bijna 2,5 miljoen virustoetsen uitgevoerd; het totaal aantal virustoetsen in bedrijfslaboratoria, keuringsdiensten en instituten overschrijdt de 7,5 miljoen. Een schoon productiesysteem met gezond uitgangsmateriaal leidt direct tot verminderde inzet van pesticiden tegen de overbrengers (vectoren). Immers in veel teeltsystemen kan een veel hogere druk van virusvectoren getolereerd worden indien virussen er niet in voorkomen.

Serologische detectie van plantenvirussen, veelal met behulp van ELISA, is op dit moment de meest gangbare vorm. Tegen ruim zestig

virussen is momenteel een antiserum voorhanden en gedurende de looptijd van dit programma zal het aantal verder worden uitgebreid. De keuze van het virus laat zich voornamelijk bepalen door acute problemen die door 'nieuwe' virussen worden veroorzaakt. Een actueel voorbeeld hiervan is het *Pepino mosaic virus* (figuur 2). Het optreden in 1999 van dit zeer besmettelijke en schadelijke virus in de tomatenteelt in Europa leidde snel tot een beschikking van het Permanent Fyto-sanitair Comité gericht op de uitroeijing ervan. Belangrijk uitgangspunt hierbij is het kunnen aantonen van dit virus, echter diagnostica ontbraken. Door een geza-

menlijke inspanning van het PBG, Plant Research International B.V. en de Plantenziektenkundige Dienst is hierin voorzien: er is inmiddels een antiserum beschikbaar dat breed kan worden ingezet. Moleculaire karakterisering van dit virus is noodzakelijk om de varianten van dit virus te kunnen onderscheiden en om nog gevoeliger detectiemethoden te kunnen ontwikkelen.

Vaak blijkt serologische detectie niet toereikend of onmogelijk. Dit kan te maken hebben met de lage concentratie waarin virussen voor kunnen komen in een plant of in het teeltsubstraat en (recirculatie)water. Maar ook kunnen er in het te toetsen materiaal stoffen voorkomen die een zeer sterk negatief effect hebben op de detectie via antilichamen (onder andere bij aardbei en fruitbomen) of ontbreekt een eiwitmantel (zoals bij viroïden) waardoor detectie op deze manier onmogelijk is. Daarnaast levert de serologie niet altijd het gewenste onderscheidend vermogen op zoals bij de verschillende stammen van het *Potato virus Y* (stammen N, O, C en NTN). Voor deze gevallen worden moleculaire methoden (onder andere PCR en NASBA) toegepast die gebaseerd zijn op een sterke vermeerdering van de hoeveelheid erfelijk materiaal van een virus of viroïde. Een goede moleculaire karakterisering van het virus of viroïde en het in

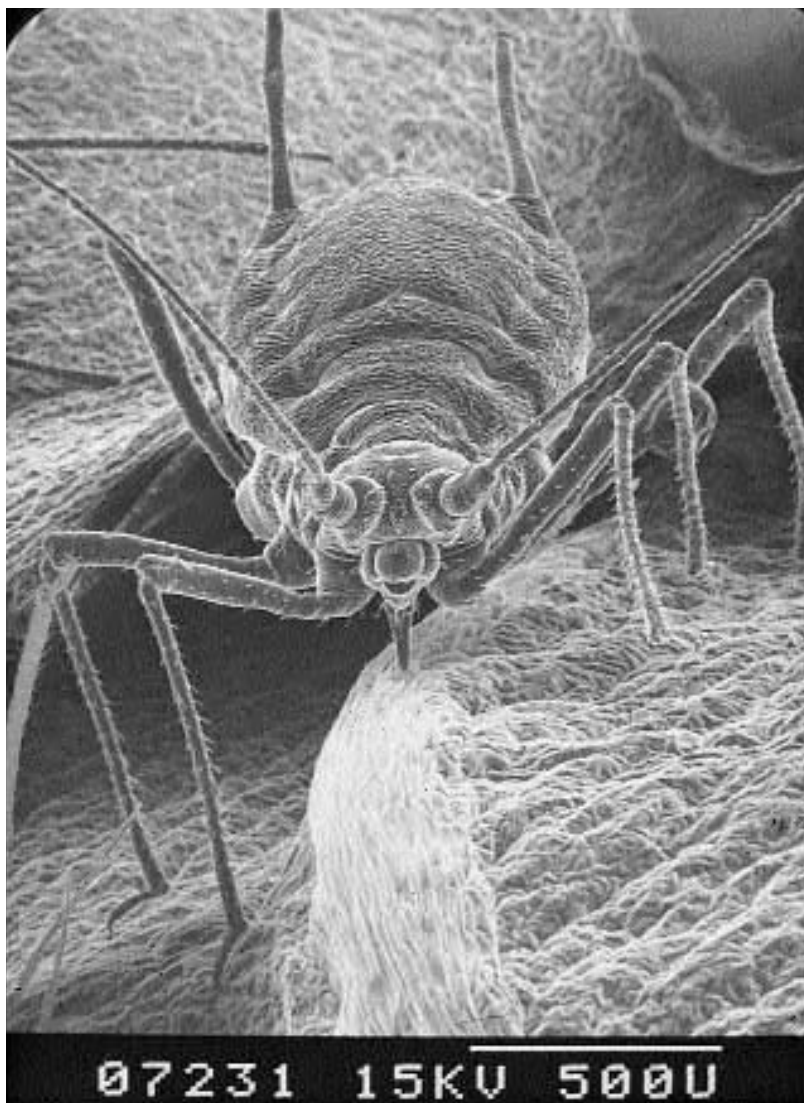


Figuur 2: Een infectie met het *Pepino mosaic virus* in tomaat

kaart brengen van de genetische variabiliteit is hiervoor vereist. Het huidige programma vervult een sterke katalysatorrol in de toepassing van de (veelal voor humane virussen) ontwikkelde diagnostica in de gewasbeschermingswereld. Zo wordt NASBA ook al ingezet voor de detectie van levende cellen van de veroorzaker van de quarantaineziekte bruinrot en van toxineproducerende schimmels.

Beheersmaatregelen

Om tot een vermindering van de inzet van fungiciden en (grond)ontsmettingsmiddelen te komen wordt vanuit het huidige programma een aantal projecten gecoördineerd om virusverspreiding door bodemschimmels (*Oplidium* spp.) in open en gesloten teeltsystemen beheersbaar te maken. Hierbij speelt niet alleen detectie een rol maar ook de ontwikkeling van resistentie of tolerantie en het formuleren van teeltadviezen. Voor het ombuigen van de huidige milieubelastende bestrijding van bladluizen (als overbrengers van virussen) worden de interacties tussen virus, bladluis en plant onderzocht. Deze gedetailleerde kennis zal leiden tot nieuwe leads in de gewasbescherming. Een vergelijkbare insteek is wenselijk voor het management van virusziekten die door overige insecten (onder andere wittevliegen, thrips) en nematoden worden overgedragen. De opgave waarvoor dit onderzoek wordt gesteld is een lastige: het vinden van duurzame methodes voor de beheersing van virusziekten die passen in een economisch verantwoord teeltsysteem. Dit vergt een investering die over de grens van het huidige programma heen zal gaan. Immers, essentiële elementen zoals resistente rassen en gedegen kennis van de interacties tussen waardplanten, virussen en hun vectoren ontbreken veelal. Ook is van een belangrijk aantal virusziekten -zoals de door *Oplidium* overgedragen ziekten slabobbelblad, sla-kringnecrose en freesia-bladnecrose- het veroorzakende agens nog niet geïdentificeerd of geïsoleerd.



Figuur 3: Bladluizen, de belangrijkste vectoren van plantenvirussen

Virusresistentie

In het huidige programma wordt een belangrijke bijdrage geleverd aan de conventionele veredeling van gewassen door de ontwikkeling van toetsmethodes, het beschikbaar stellen van goed gekarakteriseerde virusinocula en bijbehorende diagnostica. Daarnaast wordt er ingezet op de ontwikkeling van nieuwe vormen van resistentie die gebaseerd zijn op het interfereren in de infectiecyclus van het virus via in de plant tot expressie gebrachte genen. Aan de hand van onder andere het systeem aardappel-Potato leafroll virus (PLRV)-bladluis wordt de moleculaire basis van de interacties tussen genoemde componenten bestudeerd om de zwakke schakel in de cyclus bloot te leggen. Deze kan dan worden aangegrepen voor een efficiënte vorm van resistentie.

Alle rassen in het huidige pakket zijn immers vatbaar voor PLRV. Vergelijkbaar onderzoek wordt door het PBB uitgevoerd aan potyvirusen van bolgewassen die eveneens door bladluizen worden overgedragen. Dit onderzoek richt zich op het ontrafelen van de interactie tussen virus en waardplant met onder meer de bedoeling om specifieke virussequenties te vinden die na inbouw in een plant resistentie bewerkstelligen. In de gekozen modellen zal dit direct leiden tot een aanzienlijke reductie van het gebruik van insecticiden tegen de bladluis in de aardappel- en bollen-teelt. De kennis die dit oplevert is breed inzetbaar tegen andere (door insecten overgedragen) virussen.

In samenwerking met het PBG werkt Plant Research International B.V. aan tobamovirussen in tomaat.

ARTIKEL

Voornamelijk om methodes te ontwikkelen om de diverse stammen en pathotypen van het Tomato mosaic virus te kunnen onderscheiden. Daarnaast wordt er ingezet op het in kaart brengen van de virulentiefactoren die zijn betrokken bij de resistentie tegen dit virus.

Om de risico's van het gebruik van transgene planten die virale genen bevatten beter te kunnen inschatten, is in 1998 een project gestart waarin methoden en procedures ontwikkeld worden voor het bepalen of en in welke mate er interacties kunnen optreden tussen transgene eiwitten en mRNA en infecterende virussen en viroïden. Einddoel van dit project is om tot een protocol te komen ten behoeve van beleidsbepalende en vergunningverlenende instanties in de EU.

Virussen als vriend

Een vermindering van de afhankelijkheid van insecticiden tegen virusvectoren kan ook gerealiseerd worden door de inzet van pathogenen van insecten. In het huidige programma vindt een groeiende inzet plaats om insectenvirussen te isoleren die pathogeen zijn voor de belangrijkste overbrenger van plantenvirussen: de bladluis. Dit heeft reeds geresulteerd in de isolatie van

een viertal nieuwe bladluisvirussen. In het laatste jaar van dit programma wordt hun potentie als biologisch pesticide bestudeerd.

Wat levert het op?

Op het gebied van de identificatie, karakterisering en detectie levert het programma de volgende (kennis)producten die -vanwege de sterke vraagsturing door de betrokken sectoren- vrijwel direct in de praktijk worden geïmplementeerd:

- gedetailleerde beschrijvingen van plantenvirussen en -viroïden en de daardoor veroorzaakte ziekten in belangrijke landbouw-, groente-, fruit- en siergewassen,
- gevoelige en specifieke detectiemethoden en bijbehorende diagnostica die worden gebruikt door de keuringsdiensten, Plantenziektenkundige Dienst en bedrijfsleven voor certificeringsdoeleinden om de fytosanitaire status van het uitgangs- en vermeerderingsmateriaal vast te stellen en om de kwaliteit van het teeltsubstraat te toetsen, en
- een uitgebreide referentiecollectie (thans 120 virussoorten) van goed gekarakteriseerde virusisolaten die nodig is om tot een juiste identificatie te kunnen komen van 'nieuwe' virussen en viroïden.

Op het gebied van de beheersing en wering van plantenvirussen en -viroïden levert het programma:

- ondersteuning van het quarantainebeleid van de overheid door de beschikbaarheid van methodes voor identificatie,
- insectenvirussen die ingezet kunnen worden voor de biologische bestrijding van bladluizen,
- aanbevelingen voor teelt- en hygiënische maatregelen om virusverspreiding tegen te gaan,
- een gedetailleerd begrip van de interacties tussen plantenvirussen, waardplanten en virusoverbrengers dat noodzakelijk is voor het creëren van nieuwe vormen van virusresistentie, en
- procedures voor risicoanalyse van het gebruik van transgene gewassen die virale genen tot expressie brengen,

De kennisproducten die het programma voortbrengt dragen zowel direct als indirect bij aan het LNV-beleid: het terugdringen van het gebruik en de afhankelijkheid van bestrijdingsmiddelen, quarantainebeleid, een verbeterde voedselveiligheid (onder andere door vermindering residuproblematiek), maatschappelijk verantwoordelijke methoden om schade door virussen en viroïden terug te dringen, en een borging van de sterke Nederlandse exportpositie.

ARTIKEL

NIEUW:
internetsite adres **KNPV**
www.knpv.org