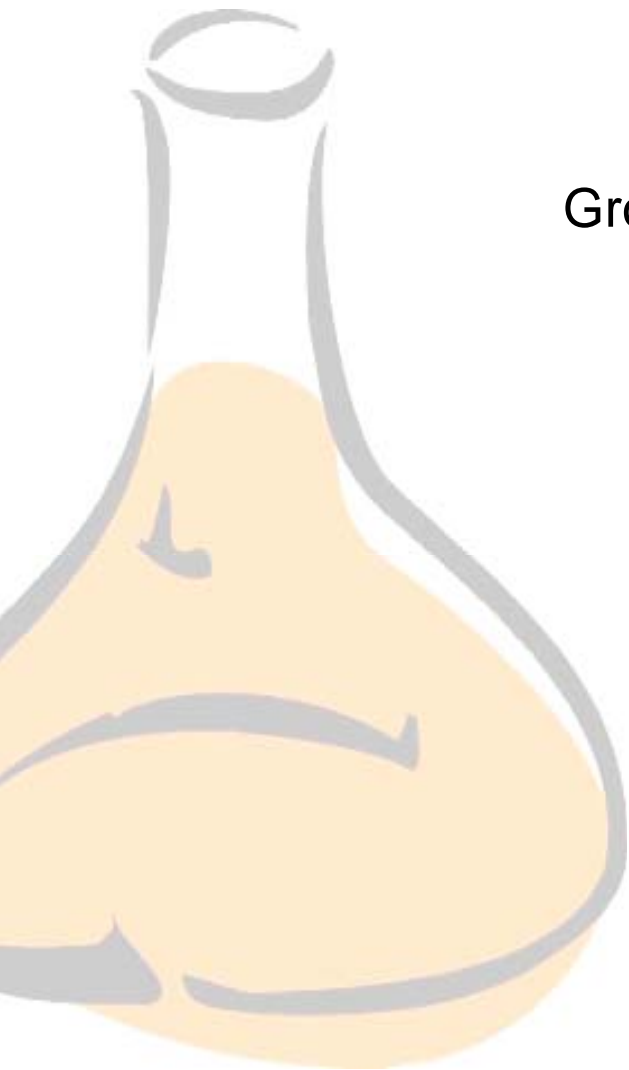


Ontwikkeling van een PCR-toets voor twee virussen in de cymbidiumteelt, CyMV en ORSV

Groen Agro Control

A.M.W. Vermunt



Eindrapport

Ontwikkeling van een PCR-toets voor twee virussen in de cymbidiumteelt, CyMV en ORSV

Groen Agro Control

Adriaan Vermunt

Financier en opdrachtgever:
Productschap Tuinbouw



Begeleidingscommissie: LTO Groeiservice
Gewas Orchidee



Looptijd project: januari 2006 - november 2006

COLOFON:

Auteur: Adriaan Vermunt
Groen Agro Control
Distributieweg 1
2645 EG Delfgauw
Telefoon: 015-2572511
Telefax: 015-2572522
E-mail: info@agrocontrol.nl

Datum:	Maart 2007
Titel Rapport:	Ontwikkeling van een PCR-toets voor twee virussen in de cymbidiumteelt, CyMV en ORSV.
Opdrachtgever en financier:	Productschap Tuinbouw
Kernwoorden:	Orchidee, cymbidium, virus, CyMV, ORSV, hygiëne.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm, elektronisch of op geluidsband of op welke andere wijze ook en evenmin in een retrieval systeem worden opgeslagen zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgevers.

	Samenvatting	4
1	Inleiding.....	5
1.1	Te beantwoorden vragen.....	5
1.2	CyMV.....	6
1.3	ORSV	7
1.4	Ernst van virusproblematiek	8
1.5	Aanpak virusprobleem: hygiëne	8
1.6	Ontwikkeling van een gevoelige toets	9
2	Materiaal en methode.....	11
2.1	Virusisolaten.....	11
2.2	Real-time PCR	11
2.3	Primers voor real-time PCR.....	11
2.4	Monstername bij telers	12
2.5	Verspreiding door insecten.....	13
2.6	Ontsmettingsproef	13
3	Resultaten	14
3.1	Huidige hygiëne bij telers	14
3.2	Het volgen van het Hygiëneprotocol Orchidee	15
3.3	Ontwikkeling en validatie van een real-time PCR-toets voor CyMV en ORSV	16
3.4	Verspreiding van virus bij telers.....	17
3.5	Verspreiding door insecten.....	19
3.6	Ontsmettingsproef	19
4	Conclusies	21
5	Aanbevelingen	21
5.1	Schoon beginnen	21
5.2	Schoon blijven	22
6	Literatuur.....	23
	Bijlage 1	24

Samenvatting

Met de door Groen Agro Control ontwikkelde PCR-toets voor CyMV en ORSV kunnen vroege besmettingen van deze virussen opgespoord worden. Voorheen werden de twee veel voorkomende virussen in de orchideeteelt, Cymbidiummozaïekvirus (CyMV) en Odontoglossum kringvlekkenvirus (ORSV), aangetoond met ELISA-toetsen. Op dit moment is de ontwikkelde PCR-toets voor deze twee virussen 1000x gevoeliger dan de bestaande ELISA-toetsen. Door deze hoge gevoeligheid kunnen latente infecties en mogelijke besmettingsbronnen sneller opgespoord worden.

Om latere virusproblemen te voorkomen is het relevant om met schoon uitgangsmateriaal te starten. Om dit te testen is de PCR-toets zeer geschikt. Gedurende de teelt is het belangrijk te realiseren dat de twee virussen mechanisch overdraagbaar zijn. Actieve infecties door insecten zijn tot nu toe niet aangetoond. Dat betekent dat met name door gewashandelingen het virus zich kan verspreiden. Besmette handen, kleding en mesjes zijn belangrijke voor de hand liggende aandachtspunten. Uit praktijkmetingen kwam naar voren dat ook de volgende zaken besmet kunnen zijn: wortels, drain, guttatievocht, oude bladeren, stekers, katrolletjes en schortjes.

De enige manier om het virusprobleem onder de duim te krijgen is te starten met virusvrij uitgangsmateriaal en een zorgvuldige bedrijfshygiëne. De bedrijfshygiëne is belangrijk om virus buiten de deur te houden en bij een eventuele besmetting verdere verspreiding tegen te gaan. Voor het ontsmetten van handen en materiaal geldt dat de aanwijzingen van de fabrikant zorgvuldig opgevolgd dienen te worden.

1 Inleiding

In de teelt van Cymbidium komen twee virussen veel voor die schadelijk zijn:

- Cymbidium mozaïek virus, Cymbidium Mosaic Virus (CyMV)
- Odontoglossum kringvlekkenvirus, Odontoglossum Ring Spot Virus (ORSV)

1.1 Te beantwoorden vragen

Cymbidiumtelers wilden voor aanvang van het project graag antwoord op de volgende vragen:

- Is er virus aanwezig in uitgangsmateriaal? Om deze vraag te beantwoorden is het belangrijk een zeer gevoelige toets ter beschikking te hebben om zo vroeg mogelijk besmet materiaal te traceren.
- Hoe verspreidt het virus zich in de cymbidiumteelt? Het is bekend dat CyMV en ORSV mechanisch overdraagbaar zijn. Maar de telers hebben nog steeds praktische vragen, zoals kunnen insecten het virus overdragen en zijn huidige ontsmettingen effectief. Hiertoe zullen praktijkmetingen bij drie bedrijven uitgevoerd worden.
- Is het huidige hygiëneprotocol afdoende? Hiervoor zullen de hygiënemaatregelen van de drie bedrijven doorgelicht worden en met hetgeen uit de praktijkmetingen komt, zullen er aanbevelingen gedaan worden.

1.2 CyMV

CyMV behoort tot de potexvirusgroep. Andere bekende leden van deze groep zijn pepinomozaïekvirus dat veel voorkomt in tomaat en hosta virus X dat hosta's infecteert en aardappel virus X dat tomaat en aardappel infecteert. Bekende natuurlijke gastheren voor CyMV zijn Cymbidium, Cattleya, Phalaenopsis, Vanda, Epidendrum, Laelia, Laeliocattleya, Oncidium, Zygopetalum en Vanilla (1, 2). Symptomen zijn sterk afhankelijk van teeltcondities. In Fig. 1 zijn typische CyMV-symptomen te zien in Cymbidium. Het belangrijkste symptoom is vergeling van de bladeren dat zich openbaart in de vorm van een mozaïek. De vergeling kan gevolgd worden door het zwart worden en uiteindelijk het afsterven van bepaalde gebieden op het blad (necrose). Ook kan er virustekening op de bloemen te zien zijn.



Fig. 1. Cymbidium-bladeren met symptomen van cymbidium-mozaïek-virus (CyMV).

Volgens de literatuur zijn er geen bekende vectoren (insecten) die CyMV overdragen van plant naar plant. Het virus kan alleen door middel van mechanische inoculatie planten infecteren. Dit betekent in de praktijk dat het virus met het plantensap door handelingen in het gewas verspreid wordt (1, 2). Het virus blijft in plantensap 4 weken infectieus. Het wordt inactief als het minimaal 10 minuten op minimaal 70°C wordt geïncubeerd (1, 2).

1.3 ORSV

ORSV behoort tot de tobamovirusgroep. Andere bekende leden van deze groep zijn tabaksmozaïekvirus, tomatenmozaïekvirus en komkommerbontvirus. Dit virus kan planten ziek maken van de soorten *Odontoglossum grande*, *Cymbidium* en andere orchideesoorten. ORSV-symptomen karakteriseren zich door diamantvormige vergeling en gele strepen (Fig. 2). Deze vergelingen kunnen overgaan in bruin- en zwartkleuring (necrose). Tevens kunnen in de bloemen misvormingen en onregelmatigheden in de bloemkleur voorkomen.



Fig. 2. Cymbidium bladeren met symptomen van *Odontoglossum* kringvlekkenvirus (ORSV)..

Ook van dit virus is geen vector bekend die het virus actief over kan dragen van plant naar plant. ORSV wordt alleen door mechanische inoculatie verspreid. In de praktijk vindt verspreiding voornamelijk plaats door handelingen in de teelt via plantsap (1, 2). Het virus kan verspreid worden door besmet snijgereedschap, werkoppervlakken, gebruikte potten en handen. ORSV is niet infectieus meer na een verhitte van minimaal 10 minuten op 90°C.

1.4 Ernst van virusproblematiek

Beide virussen komen wereldwijd voor en kunnen schade veroorzaken in de meeste commerciële orchideesoorten. Cymbidiumplanten die geïnfecteerd zijn met CyMV en ORSV groeien slechter en produceren minder bloemen. Als bloemen aangetast zijn, zijn ze onverkoopbaar en dit heeft dus belangrijke financiële consequenties. Bloemen van geïnfecteerde planten die visueel niet aangetast zijn, kunnen later als ze éénmaal verkocht zijn alsnog symptomen gaan vertonen. Naast snijcymbidium kunnen ook geïnfecteerde potcymbidiums onverkoopbaar zijn als die een tekening op het blad vertonen.

1.5 Aanpak virusprobleem: hygiëne

Als planten eenmaal geïnfecteerd zijn, is er geen bestrijding voor handen die het virus uitschakelt. Het is dan zaak om verdere virusverspreiding tegen te gaan. Dit is alleen mogelijk door strikte hygiëne. Voor meristeamvermeerdering dient uitgegaan te worden van virusvrij materiaal. Hiervoor is het relevant een zo gevoelig mogelijke toets tot de beschikking te hebben die CyMV en ORSV al in lage concentraties kan detecteren, zodat geïnfecteerde planten uitgesloten worden voor meristeamvermeerdering. Ook na het meristemen is het belangrijk om een virusinfectie in een vroeg stadium te constateren, zodat geïnfecteerde planten zo snel mogelijk uitgeselecteerd kunnen worden. Met name door de lange incubatietijd, 1 tot 2 jaar, zijn vroeg geïnfecteerde planten visueel niet te herkennen en vormen ze onbewust mogelijke besmettingsbronnen. Daarom is het belangrijk een toets te ontwikkelen die latente infecties opspoot.

Om besmettingen van virussen en andere pathogenen zoveel mogelijk te voorkomen, is hygiënisch werken een vereiste. Cymbidiumtelers kunnen hiervoor een Hygiëneprotocol Orchidee volgen dat PPO Naaldwijk in 2002 heeft opgesteld (3). Belangrijke punten hierin zijn:

- Uitgaan van schoon plantmateriaal
- Gebruik schone kleding en schoenen voor het werk
- Altijd handen wassen voor het werk
- Ontsmetten van handen, gereedschap en schoeisel
- Vaste werkrichting
- Bij teeltwisseling:
 - oude gewasresten verwijderen
 - materialen verwijderen of ontsmetten
 - schoonmaken van teeltruimte
- Controleer op symptomen
- Verdachte planten laten testen

De mate waarin dit protocol uitgevoerd wordt varieert van teler tot teler. Een aantal punten in het protocol is namelijk praktisch moeilijk uitvoerbaar. Eén van die punten is dat er bij de meeste cymbidiumtelers nooit een groot gedeelte van de teeltruime helemaal schoon gemaakt kan worden. Het is een meerjarige teelt en verschillende rassen staan naast elkaar die niet gelijk opgepot zijn en opgeruimd worden. Dus er is niet, zoals in de groententeelt, één teeltwisseling per jaar waarbij alles ontruimd en grondig schoongemaakt kan worden. In de cymbidiumteelt is altijd meer dan 75% van het oppervlak bezet met gewas. Naast praktische bezwaren, weten telers die nu besmettingen hebben, niet zeker of de besmettingen veroorzaakt worden door het niet goed opvolgen van het bestaande hygiëneprotocol of door andere, onbekende, oorzaken. Zo speelt de vraag bij telers of het virus wel dan niet door insecten overgedragen kan worden. En is het uitgangsmateriaal dat getest is met ELISA echt schoon bij een negatieve uitslag? Een gevoeliger test kan dit ophelderen.

Als er éénmaal schoon uitgangsmateriaal binnen gebracht wordt, is het zaak om virusvrij te blijven. Ook hierbij is een gevoelige toets essentieel. De huidige veelgebruikte toets, ELISA, is alleen bruikbaar bij planten met symptomen. Vanuit de cymbidiumteelt bestaat de wens dat er een toets moet komen die de virussen al aan kan tonen voordat symptomen waar te nemen zijn. Het is bekend dat virussen symptomeloos voor kunnen komen in orchideeën. Die periode waarin de planten wel besmet zijn met virus, maar nog geen virusbeelden te zien zijn, heet de incubatieperiode, die kan bij orchideeën twee jaar in beslag nemen. Met een gevoelige toets, kunnen de virussen tijdig opgespoord worden en kunnen er op tijd maatregelen getroffen worden, zodat het virus zich niet verder verspreidt.

1.6 Ontwikkeling van een gevoelige toets

Bestaande toetsen voor CyMV en ORSV zijn immunologische toetsen. Deze maken gebruik van antisera die de buitenkant van virussen herkennen. Na herkenning volgt er een kleurreactie die aangeeft of een monster al dan niet besmet is met virus. In de wetenschappelijke literatuur is het algemeen bekend dat PCR-toetsen vaak gevoeliger zijn dan ELISA-toetsen. Dat is ook de reden waarom in dit project een PCR-toets ontwikkeld is.

PCR is een DNA-techniek waarmee micro-organismen specifiek gedetecteerd en gekwantificeerd kunnen worden (Fig. 3). Voor plantvirussen moet dan eerst het RNA van het virus geïsoleerd worden, daarna wordt het RNA omgezet in complementair DNA (cDNA). Op dit cDNA kan in de Polymerase Chain Reaction (PCR) met specifieke primers een stukje DNA geamplificeerd en gedetecteerd worden.

real-time PCR-toets

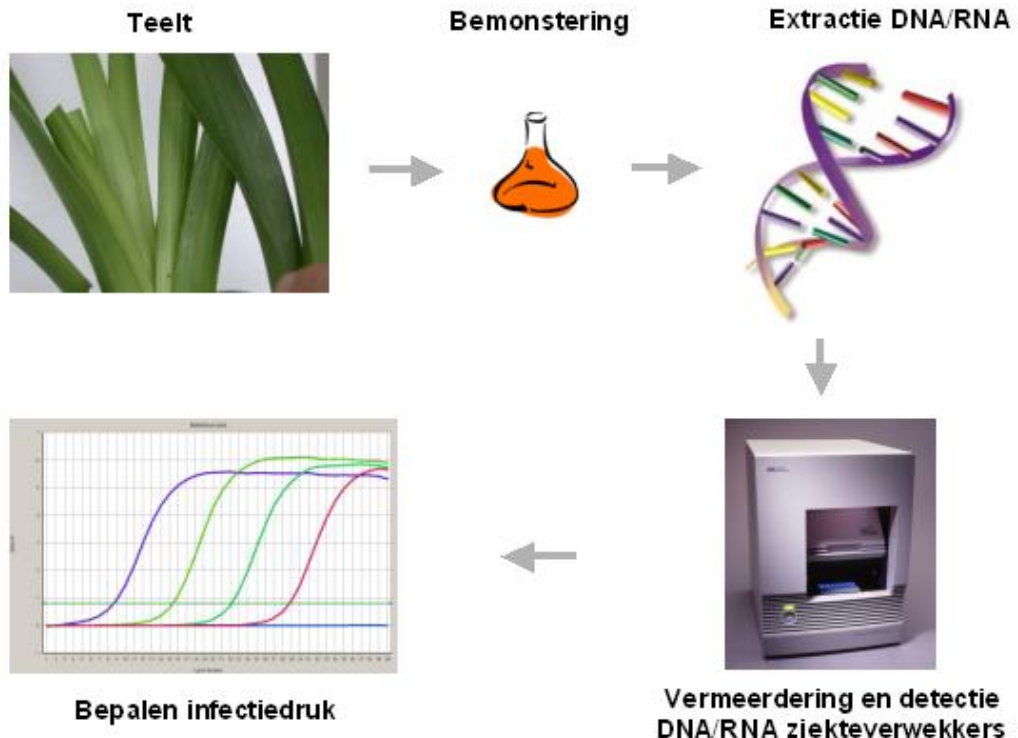


Fig. 3. Schematische weergave van de real-time PCR toets voor de detectie van CyMV en ORSV. Eerst worden planten bemonsterd om vervolgens uit het monster het erfelijke materiaal van virussen, RNA, te extraheren. Daarna wordt het virale RNA in een reactieplaat met chemicaliën gebracht. In een apparaat, de real-time PCR machine, wordt een stukje van het virale RNA vermenigvuldigd. Gedurende deze vermenigvuldiging, in 40 stappen, neemt de fluorescentie toe, die gemeten wordt in het apparaat. De fluorescentie kan uitgezet worden in curves. Als de curve snel door de drempel heen gaat (linkse curve) zat er veel viraal RNA in het monster en dus veel virus in de plant. Als de curve laat op komt zetten (rechtse curve) zat er weinig virus in het monster.

2 Materiaal en methode

2.1 Virusisolaten

Als referenties zijn verschillende virusisolaten van CyMV en ORSV besteld uit collecties in Nederland en Duitsland. Tevens zijn praktijkisolaten getest van cymbidiumtelers. Dit zijn positieve controles die positief dienen te reageren met de te ontwikkelen toets. Daarnaast zijn negatieve controles meegenomen om de specificiteit van de afzonderlijke toetsen voor CyMV en ORSV te bepalen. Hiervoor zijn isolaten van de volgende virussen getest: pepinomozaïekvirus (PepMV), komkommerbontvirus (cucumber green mottle mosaic virus; CGMMV), CyMV en ORSV.

2.2 Real-time PCR

Real-time PCR is uitgevoerd met een apparaat van Groen Agro Control en methodes die door Groen Agro Control zijn ontwikkeld. Schematisch is de methode weergegeven in Fig. 3.

2.3 Primers voor real-time PCR

Primers voor de real-time PCR zijn ontwikkeld aan de hand van vergelijkingen van nucleotidensequenties van het genetisch materiaal (RNA) van verschillende virussen. Hiervoor is gebruik gemaakt van speciale software en databases met sequenties. De primers zijn zo ontwikkeld dat die voor CyMV alle bekende CyMV-varianten oppikt en niet kruisreageert met andere virussen. Hetzelfde geldt voor ORSV. De primers zijn vervolgens getest op RNA van virusisolaten uit collecties en de praktijk.

2.4 Monstername bij telers

Bij drie telers is de verspreiding van het virus in kaart gebracht. Daarvoor zijn de volgende monsters genomen:

- Gewasmonsters:
 - o Bladeren van planten met symptomen
 - o Bladeren van planten zonder symptomen
 - o Bladeren van jonge planten
 - o Wortels
 - o Oude bladeren die op de grond liggen
 - o Guttatievocht
- Watermonsters:
 - o Drainwater
 - o Druppelvoeding
- Materiaal:
 - o Katrollen (yoyo, nie-co)
 - o Monorails
 - o Oogstkarren
 - o Gaas waar potten op staan
 - o Stekers
 - o Mesjes ontsmetter
 - o Schort
 - o Pot van besmette plant
- Insecten:
 - o Schildluis op besmette plant
 - o Spint op besmette plant
- Handen
 - o Handen van teler

Er is op drie tijdstippen bemonsterd bij beide telers:

- Mei 2006
- September 2006
- Oktober 2006

Van gewasmonsters is direct RNA geëxtraheerd voor de real-time PCR toets. Voor watermonsters werd eerst het eventueel aanwezige virus geconcentreerd om zodoende de kans te verhogen dat het gedetecteerd wordt. Om te testen of materialen besmet waren met virus, werden de materialen afgenomen met een vochtige tissue en werd vervolgens hieruit RNA geëxtraheerd. De RNA-monsters zijn geanalyseerd met de bovenstaande real-time PCR toets.

2.5 Verspreiding door insecten

Om een indicatie te krijgen of insecten CyMV overdragen is een klein proefje opgezet. In de proefkas van Groen Agro Control zijn 2 cymbidiumplanten die sterk besmet waren met CyMV geplaatst bij twee jongere planten die negatief waren voor CyMV. Om de planten heen is een insectenkooi geplaatst bestaande uit een frame met insectengaas. Daarna zijn de volgende plaaginsecten, die schadelijk zijn voor cymbidium, op de planten gezet: schildluis, spint en trips. Twee weken daarna zijn er vervolgens de volgende biologische bestrijders van Koppert bijgezet: *Amblyseius californicus* en *Phytoseiulus persimilis* tegen spint en *Amblyseius cucumeris* tegen trips. De planten zijn zo geplaatst dat ze elkaar niet aanraakten. Om contact tussen insecten en planten te bevorderen zijn er stekers weggelegd op de potten waarin de planten staan zodat insecten makkelijker van de ene naar de andere plant kunnen lopen. Eén, twee en drie maanden nadat de eerste insecten op de cymbidiumplanten zijn gezet, zijn de planten die schoon in de kooi gingen, getest op de aanwezigheid van CyMV m.b.v. real-time PCR toets.

2.6 Ontsmettingsproef

Een paar middelen zijn getest of ze CyMV effectief ontsmetten. Ontsmettingen zijn op drie manieren uitgevoerd:

- virus en ontsmettingsmiddel in waterige oplossing
- met CyMV-besmet mesje in ontsmettingsmiddel dopen
- besmette handen van teler wel en niet behandelen met MennoH

Voor de ontsmetting in waterige oplossing is 0,1 ml besmet plantensap van cymbidiumbladeren met duidelijke virussympptomen gemengd met 0,9 ml water met en zonder ontsmettingsmiddel. Het plantensap met virus en ontsmettingsmiddel is vervolgens 5 minuten geïncubeerd op kamertemperatuur. Daarna is het mengsel 5x verdund in water en met dit verdunde materiaal zijn de toetsplanten *Datura stramonium* geïnoculeerd. De volgende middelen zijn getest: MennoClean (op basis van benzoëzuur; 3%), MennoH (onverdund om handen te ontsmetten; op basis van een alcohol) en natrium-hypochloriet (eindconcentratie 1%).

Voor ontsmetting van besmette mesjes zijn eerst aardappelschilmesjes in besmette bladeren gesneden. Daarna zijn de besmette mesjes 20 seconden gedoopt in 25 ml ontsmettingsmiddel waar ook eerder 0,5 ml besmet plantensap is toegevoegd. Vervolgens zijn met de behandelde mesjes toetsplanten (*Datura stramonium*) licht beschadigd om eventueel infectieus virus over te brengen. Voor deze ontsmettingen zijn de volgende middelen gebruikt: 3% MennoClean, MennoH en 1% natrium-hypochloriet.

Om te testen of een teler zijn handen goed ontsmet met MennoH, heeft een teler in besmet gewas handelingen aan het gewas uitgevoerd. Daarna heeft de teler zijn handen ongeveer 15 seconden ingewreven met MennoH en vervolgens zijn handen gewassen in een handschoen met water. Het waswater is getest op infectieus virus door het in te smeren op toetsplanten. Als positieve controle is hetzelfde uitgevoerd maar dan zonder MennoH.

3 Resultaten

3.1 Huidige hygiëne bij telers

Om beter inzicht te krijgen in mogelijke knelpunten betreffende de virusproblematiek in de cymbidiumteelt, zijn drie bedrijven bezocht. Als eerste is hele bedrijfsproces doorgenomen. Op de bedrijven zijn praktijkmonsters genomen om getest te worden op de aanwezigheid van CyMV en ORSV (paragraaf 3.4). Daarnaast zijn de genomen hygiënemaatregelen in kaart gebracht. Hiertoe is een checklist “Hygiëneprotocol Cymbidium” ingevuld door drie telers samen met een medewerker van Groen Agro Control. Samenvattingen hiervan staan in Bijlage 1.

Teler 1 en 2 hadden relatief veel virusproblemen. Qua hygiëne voeren ze de volgende maatregelen uit. Zij verwijderen beide onkruid en gewasresten op de grond. De ene doet dit intensiever dan de ander. Potten worden of alleen nieuw gebruikt of ontsmet. Drainwater wordt niet hergebruikt. Zieke planten worden gedeeltelijk verwijderd. De meeste aandacht ging bij beide uit naar het ontsmetten van mesjes. Na het snijden van elke plant wordt het mesje ontsmet in een bakje dat op een schortje wordt gedragen. In zo'n bakje zitten twee mesjes die om de beurt gebruikt worden. Teler 1 gebruikt MennoClean als ontsmettingsmiddel en teler 2, MennoH.

Het bedrijf van teler 3, die relatief weinig virusproblemen heeft, is ook bezocht. Deze teler heeft instructies voor gewaswerkzaamheden op papier gezet. De belangrijkste hygiënische maatregelen om virusbesmettingen te voorkomen gedurende de teelt zijn bij deze teler:

- Voor en na werkzaamheden handen wassen en desinfecteren met MennoH.
- In een pad met veel virusplanten een overall of stofjas dragen.
- Virusplanten markeren.
- Bij besmette planten het mesje gebruiken dat boven een plant hangt.
- Handen desinfecteren na het werken met virusplanten.
- Handen desinfecteren aan het einde van een pad en bij overgaan op een ander soort
- Per kant van een pad ongeveer drie keer een nieuw, schoon mesje gebruiken. Het vuile mesje in het "vuile" vak van de buidel stoppen.
- Alles opruimen na een taak.

3.2 Het volgen van het Hygiëneprotocol Orchidee

In het algemeen nemen de telers wel hygiënemaatregelen, maar de ene is daar scherper in dan de ander. Dit heeft ook te maken met het aantal virusplanten die er op een bedrijf staan. Als een teler maar een paar virusplanten heeft, is de motivatie hoger om die op te ruimen om zodoende de rest schoon te houden en een betere productie te krijgen van de overgebleven schone planten. Maar als meer dan de helft besmet is, dan is het economisch niet haalbaar om die allemaal te verwijderen. Daarnaast kan de aandacht verslappen om dat men kan denken dat er toch al veel virus is. Het “Hygiëneprotocol Orchidee” dat opgesteld is door PPO in 2002 (3), kennen de meeste telers wel, maar het wordt in de meeste gevallen niet in detail opgevolgd omdat dit praktisch moeilijk haalbaar is. Zo kan de gehele teeltruimte nooit helemaal in één keer schoongemaakt worden omdat er een continue teelt is van verschillende rassen van verschillende leeftijden. Wel kunnen gedeeltes van afdelingen goed schoongemaakt worden als oud gewas verwijderd wordt. Het is ieder geval belangrijk om alle oude gewasresten te verwijderen

Bij geen van de telers zijn ontsmettingsmatten aanwezig. Het ontsmetten van mesjes gebeurt intensiever dan in het protocol is aangeraden. Teler 1 en 2 ontsmetten de mesjes na elke plant in MennoClean of MennoH. Teler 3 gebruikt ongeveer 3 mesjes per rij, zonder te ontsmetten. Na de werkzaamheden worden alle gebruikte mesjes ontsmet in MennoClean. Bij planten met symptomen hangen mesjes waar alleen die planten mee gesneden worden.

Het drainwater wordt niet ontsmet zoals aangeraden is in het hygiëneprotocol. Dit wordt niet gedaan omdat het drainwater niet hergebruikt wordt.

Het werken in dezelfde werkrichting heeft alleen zin met bedden van twee rijen. Verder proberen de telers zo veel mogelijk te voorkomen dat bezoekers van geïnfecteerde planten naar schone planten lopen zonder ontsmetten of omkleden.

Teler 3 markeert besmette en verdachte planten. Teler 1 en 2 doen dit niet vanwege het hoge aantal virusplanten. Teler 3 is duidelijk in de instructies naar de medewerkers. Met name wordt benadrukt dat handen voor en na gewaswerkzaamheden gewassen dienen te worden.

3.3 Ontwikkeling en validatie van een real-time PCR-toets voor CyMV en ORSV

De uiteindelijk ontwikkelde real-time PCR-toets voor CyMV was positief voor CyMV en negatief voor andere virussen. Hetzelfde geldt voor de toets voor ORSV. Deze was positief voor ORSV en negatief voor andere virussen.

In een verdunningsreeks van CyMV-besmet plantensap is de gevoeligheid van de ELISA-toets met de real-time PCR-toets vergeleken. Verdunningen die nog net positief waren met ELISA konden nog 1000x verder verdund worden en dan waren ze nog steeds positief met real-time PCR.

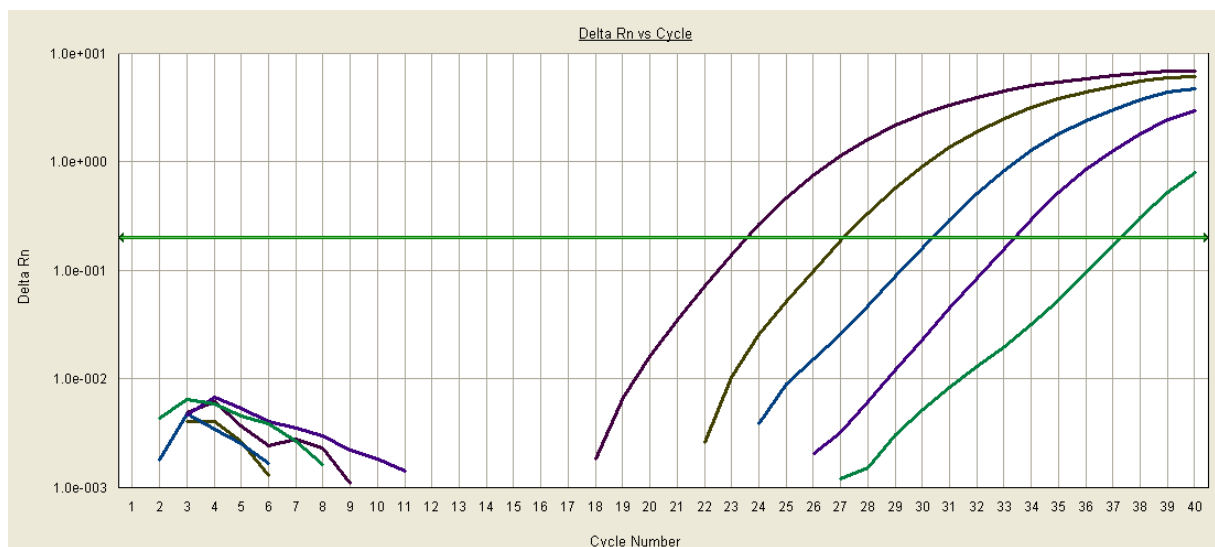


Fig. 4 A. Verdunningscurves van 1000x, 10.000x, 100.000x, 1.000.000x en 10.000.000x (van links naar rechts) CyMV-besmet plantensap. Op de x-as staat uitgezet het aantal cycli van het PCR-programma. Op de y-as staat fluorescentie uitgezet. Tijdens het PCR-programma neemt de fluorescentie toe als er viraal RNA aanwezig is. Hoe eerder de curve door de drempelwaarde (groene horizontale lijn) schiet, des te meer virus was er aanwezig in het oorspronkelijke monster.

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct
B5	10-3 12,5	SYBRgreen	Unknown	23.49
B6	10-4 12,5	SYBRgreen	Unknown	27.10
B7	10-5 12,5	SYBRgreen	Unknown	30.29
B8	10-6 12,5	SYBRgreen	Unknown	33.30
B9	10-7 12,5	SYBRgreen	Unknown	37.23

Fig. 4 B. Ct-waarden (cycle treshold, punt waar curve door drempel gaat) per verdunning (zie Fig. 4 A).

3.4 Verspreiding van virus bij telers

Bij drie telers zijn monsters genomen om de verspreiding van virus in kaart te brengen. Teler 1 en teler 2 hadden relatief veel planten met virussymptomen. Hier is dan ook intensief bemonsterd. Teler 3 heeft een beperkt virusprobleem, bij enkele rassen zitten enkele virusplanten. Verschillende monsters zijn bij de bedrijven genomen en deze zijn getest op de aanwezigheid van CyMV en ORSV. De resultaten van deze metingen staan in Tabel 1.

Tabel 1. Overzicht van monsters genomen bij drie telers die getest zijn voor CyMV en ORSV (apart vermeld). De getallen geven per teler weer het totaal aantal viruspositieve monsters op het totaal aantal monsters van een bepaalde categorie (aantal positief/totaal aantal monsters).

Monstercategorie	aantal positieve / totaal aantal monsters		
	Teler 1 (L)	Teler 2 (D)	Teler 3 (P)
Bladeren met symptomen	4/4 , 1/1 ORSV	3/3	2/2
Bladeren zonder symptomen	0/3	1/1	0/2
Blad zonder sympt. van plant met sympt.	3/4	1/1	
Bloementak plant symptomen	1/1		
Oud blad van besmette planten op grond	2/2	3/3	0/1
Wortels van besmette planten		3/3	
Guttatievocht	1/6	3/4	
Drainwater	5/6	5/5	
Druppelvoeding	0/1	0/1	
Katrollen (yoyo, nie-co)	4/4	3/3	
Ontsmette katrollen		3/3	1/1
Monorails	1/1		
Oogstkarren		1/1	
Gaas waar potten met planten op staan		1/1	
Stekers bij besmette plant		2/2	
Mesjes in ontsmet bakje		2/2	
Schort	1/1	1/1	1/1
Pot van besmette plant		1/1	
Schildluis op besmette plant		2/2	
Spint op besmette plant		1/1	
Besmette handen van teler	1/1		
Ontsmette handen van teler	1/1		0/1

ORSV is alleen aangetoond bij teler 1. Hier waren planten van één ras besmet met ORSV. De andere virusbesmettingen betroffen allemaal CyMV. In alle verdachte planten met symptomen, is CyMV aangetoond. Een enkele plant zonder symptomen, bleek toch besmet te zijn met CyMV. De meeste bladeren, die zelf geen symptomen vertoonden, maar die afkomstig waren van planten met andere bladeren wel met symptomen, bleek het merendeel ook geïnfecteerd te zijn met CyMV. Andere delen van een besmette plant, kunnen ook geïnfecteerd zijn, zoals bloementak en wortels. Oude bladeren die op de grond lagen en afkomstig waren van besmette planten, waren in de meeste gevallen ook positief. In guttatievocht van besmette planten was in 4 van de 10 gevallen virus aangetoond. Dit vocht moet dus als een mogelijke besmettingsbron gezien worden. Al het materiaal en handen die in contact zijn gekomen met dit vocht kunnen dan ook besmet raken.

Bijna alle monsters van drainwater, dat afkomstig was van besmette planten, bleken positief te zijn voor CyMV. Materiaal dat in contact is geweest met besmette planten kunnen allemaal besmet raken met virus, zoals katrollen, schort, monorails, oogstkarren, potten en stekers. Tevens bleken insecten op virusplanten ook besmet te zijn, maar dat wil nog niet zeggen dat de insecten ook virus over kunnen dragen van de ene naar de andere plant. Dat is onderzocht in een andere proef (paragraaf 3.5)

Bij één teler (teler 1) zijn de handen na ontsmetten met MennoH getest. Deze bleken na ontsmetten nog steeds virus te bevatten. Wel moet hierbij vermeld worden dat het inwrijven met MennoH ongeveer 15 seconden duurde in plaats van de voorgeschreven minuut. De hoeveelheid virus was wel minder. Met een kwantitatieve real-time PCR was aangetoond dat er ongeveer een factor 100 minder virus op de handen bleek te zitten na het inwrijven met MennoH. Of dit virus nog infectieus was, kan met de huidige real-time PCR-toets niet bepaald worden. Hiervoor zijn toetsplanten (*Datura stramonium*, doornappel) geïnfecteerd en hieruit bleek dat het virusmateriaal nog steeds infectieus was (paragraaf 3.6). Bij een andere teler (teler 3) kon geen virus aangetoond worden nadat besmette handen ingewreven waren met MennoH. Hieruit kan men concluderen dat het ontsmetten van de handen uitgevoerd moet worden volgens de aanwijzingen van de fabrikant. Een andere verklaring voor het feit dat de handen van teler 1 niet goed ontsmet zijn geweest, is dat er altijd plant- en/of sapresten met virus onder de nagels of plekken op de hand kunnen zitten waar het ontsmettingsmiddel niet goed bij is gekomen.

3.5 Verspreiding door insecten

Om te testen of insecten CyMV kunnen overdragen van de ene naar de andere plant, zijn twee CyMV-besmette cymbidiumplanten en twee virusvrije cymbidiumplanten bij elkaar gezet in een kooi met insectengaas. Hierin zijn eerst een aantal plaaginsecten geplaatst (schildluis, spint en trips) en twee weken daarna ook biologische bestrijders (*Amblyseius californicus* en *Phytoseiulus persimilis* tegen spint en *Amblyseius cucumeris* tegen trips). Gedurende drie maanden is maandelijks getest met de real-time PCR-toets of de insecten het virus overgedragen hadden van de besmette naar de virusvrije planten. Bij alle metingen kon geen virus aangetoond worden in de planten die er virusvrij in gezet zijn. Dus in drie maanden tijd is er geen virusoverdracht door insecten aangetoond.

3.6 Ontsmettingsproef

Om te testen of ontsmettingen effectief zijn, moet men een toets gebruiken waarmee infectieus virus aangetoond kan worden. Real-time PCR is een zeer gevoelige toets om virus aan te tonen, maar er kan geen uitspraak mee gedaan worden of het virus dood of levend. Ook ELISA kan geen uitsluitel geven of virus al dan niet levend is. Alleen het levende virus kan planten infecteren. De enige manier tot nu om infectieus virus aan te tonen, is door toetsplanten te inoculeren. Cymbidium zelf is ongeschikt als toetsplant omdat de incubatietijd maanden tot jaren kan duren voordat het virus zich in redelijke mate heeft vermeerderd en uiteindelijk symptomen gaat vertonen. Doornappel (*Datura stramonium*) zou een geschikte toetsplant zijn om infectieus CyMV mee aan te tonen (1, 2).

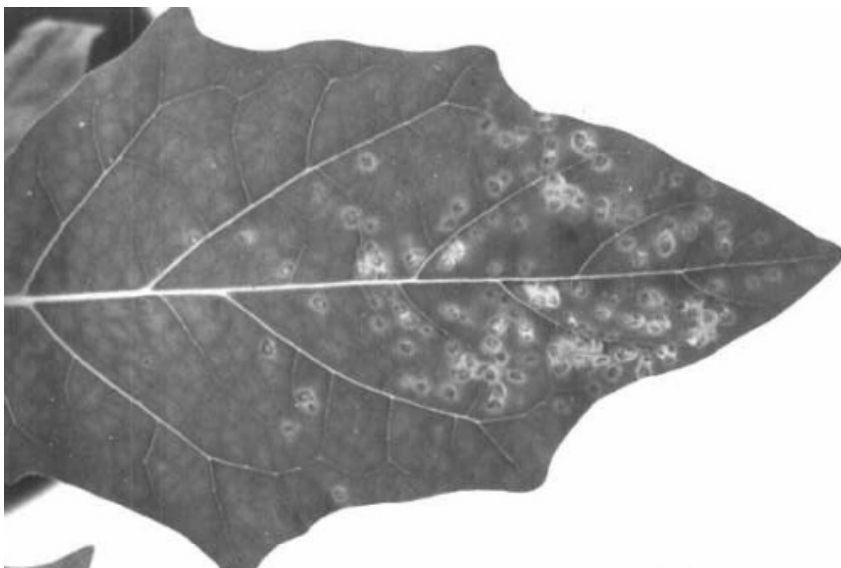


Fig. 4. Lesies in blad van *Datura stramonium* dat geïnoculeerd is met CyMV.

Datura's die geïnoculeerd zijn met CyMV geven soms duidelijke symptomen (Fig. 4 en Fig.5). Maar vaak zijn de symptomen niet goed te scoren, omdat wrijfschade bij het inoculeren en andere schades (bijvoorbeeld door insecten) het virusbeeld kunnen verstoren. Daarnaast zijn symptomen vaak alleen waarneembaar op het geïnoculeerde blad. Hierdoor kan beter getest worden met ELISA of real-time PCR om te testen of het virus zich vermeerderd heeft in de toetsplanten. De uitslagen in Tabel 2 zijn dan ook bepaald aan de hand van virusanalyses in het lab en niet aan de hand van het scoren van symptomen.

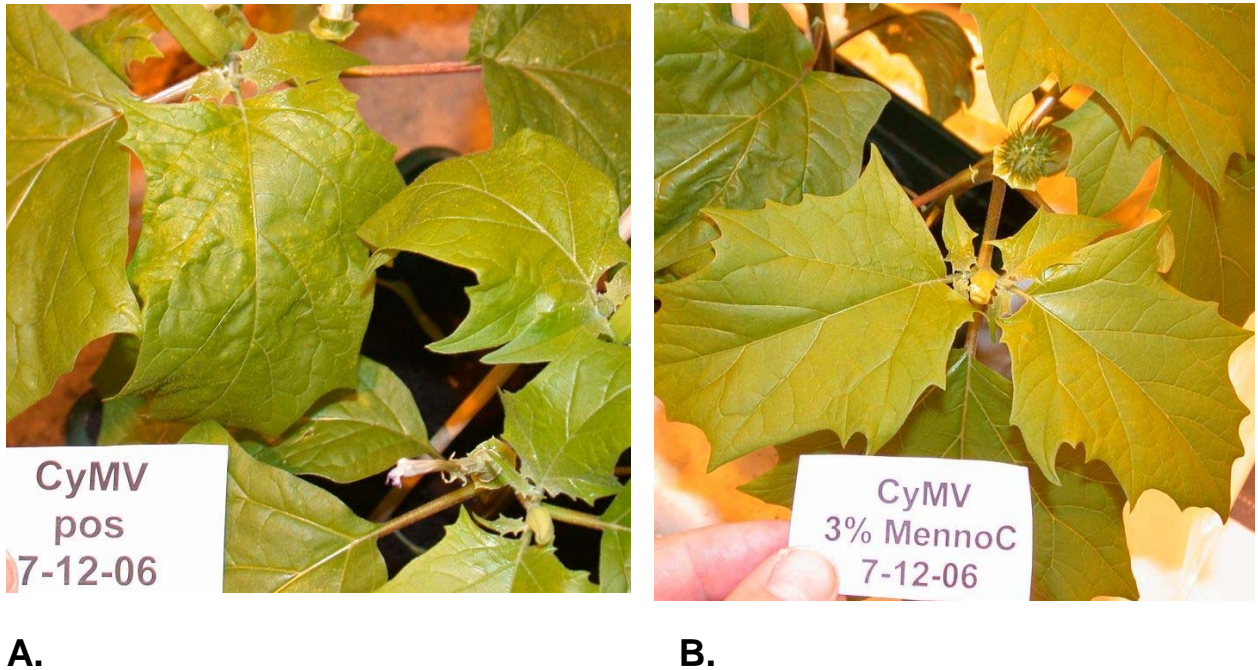


Fig. 5. *Datura stramonium* planten die geïnoculeerd zijn met CyMV (A) en CyMV dat ontsmet is met 3% MennoClean (B). Bij de positieve controle (A) zijn virussymptomen te zien op het blad, middenboven in de foto, die afwezig zijn bij het ontsmette materiaal (B).

Tabel 2. Verschillende ontsmettingsmiddelen getest door behandeling uit te voeren op infectieus virus met een middel en daarna op doornappel te toetsen of het virus geen infecties geeft.

Middel	Virus in oplossing	Virus op mesje	Virus op handen
geen	positief	positief	positief
MennoClean, 3%	negatief	negatief	
MennoH, 10-20 sec	negatief	negatief	positief
Na-hypochloriet, 1%	negatief	negatief	

De middelen MennoClean, MennoH en natrium-hypochloriet ontsmetten het virus goed, zowel in oplossing als op een mesje (Tabel 2). Zoals eerder vermeld in paragraaf 3.3, is bij het ontsmetten van handen met MennoH, belangrijk dat de hele hand ingewreven wordt en dit gedurende een minuut zoals voorgeschreven. Waar MennoH niet gekomen is of moeilijk in kan werken, zoals bijvoorbeeld bij plantresten onder de nagels, kan het voorkomen dat MennoH niet al het virus goed ontsmet heeft. Dit is ook aangetoond in deze proef, waarbij op besmette handen van een teler, na inwrijven met MennoH gedurende 15 seconden, nog steeds infectieus virus bleek te zitten.

4 Conclusies

- De ontwikkelde real-time PCR-toets voor ORSV en CyMV is ongeveer 1000x gevoeliger dan bestaande ELISA-toetsen.
- In praktijkmetingen die in dit project uitgevoerd zijn, zijn er geen aanwijzingen dat uitgangsmateriaal besmet was.
- Virus is vaak aanwezig in of op alles dat in aanraking is gekomen met besmette planten. Via handen, mesjes, materialen en drainwater kan het virus zich verspreiden. Om planten te infecteren kan het virus alleen via wondjes de plant inkomen.
- Er zijn tot nu toe geen aanwijzingen dat insecten ORSV en CyMV actief over kunnen dragen van plant naar plant.
- Voor het ontsmetten van handen en materiaal geldt dat de aanwijzingen van de fabrikant zorgvuldig gevolgd dienen te worden.

5 Aanbevelingen

Door de hoge gevoeligheid van de real-time PCR-toets voor ORSV en CyMV, kunnen lage hoeveelheden van deze virussen aangetoond worden. Uit de praktijkmetingen bleek dat al het materiaal dat in contact komt met geïnfecteerde planten, besmet kan raken met virus. Hiermee dient rekening gehouden te worden met de te nemen hygiënische maatregelen.

Het is belangrijk qua hygiëne om onderscheid te maken tussen schoon beginnen en schoon blijven

5.1 Schoon beginnen

Tijdens de teeltwisseling dienen alle oude gewasresten verwijderd te worden. Tevens dienen potten, stekers, slangen, leidingen, goten en gaas verwijderd of ontsmet te worden. Pas als alle gewasresten zijn verwijderd, kan de kas of een afdeling uitgespoten worden met reinigingsmiddelen.

Steekproefsgewijs dient nieuw plantmateriaal getoetst te worden met de real-time PCR-toets voor ORSV en CyMV, waarmee latente infecties aangetoond kunnen worden. Ook gedurende de eerste paar jaar dat er nog weinig gewashandelingen zijn en eventueel latente infecties aanwezig kunnen zijn, zouden de planten getoetst kunnen worden. Gedurende de periode van bloemproductie zouden alleen verdachte planten getoetst kunnen worden op de aanwezigheid van virus.

5.2 Schoon blijven

Tijdens de teelt heeft werken in dezelfde werkrichting alleen zin met bedden van twee rijen. Bij het werken met mesjes dienen schone ontsmette mesjes gebruikt te worden wanneer men in een ander ras gaat werken, en bij voorkeur ook per rij. Tijdens het snijden kunnen mesjes ontsmet worden. Eventueel kan in plaats van ontsmetten in een bakje, meerdere mesjes gebruikt worden per rij met schone planten. De gebruikte mesjes worden dan na de werkzaamheden verzameld en grondig ontsmet. Belangrijk bij deze laatste strategie is wel dat bij besmette planten een apart mesje per plant gebruikt wordt, die bij een plant gehangen kan worden.

Voor het ontsmetten van handen tijdens gewashandelingen dient in ieder geval bij het wisselen van ras de handen ontsmet te worden of andere latex wegwerphandschoenen aan te trekken. In een besmet ras is het beter om daarnaast ook bij het wisselen van bed handen te ontsmetten of nieuwe handschoenen aan te trekken.

Bij een beperkte hoeveelheid besmette planten, is het aan te raden om besmette rijen af te bakenen en eventueel losse besmette planten te markeren.

Verder is het beter om te voorkomen dat bezoekers onnodig door het gewas gaan. Als dit toch gebeurt, dan met schoon schoeisel en kleding (eventueel aangeboden en verplicht door teler).

Plantensap van besmette planten is de bron van waaruit verspreiding plaatsvindt. Al het gereedschap en materiaal die besmette planten beschadigen, kunnen potentieel besmet zijn.

Als bladeren van besmette planten op de grond liggen en men loopt door het gewas, kan men de bladeren stuk lopen en kan er besmet sap op het schoeisel terechtkomen. Als men dan vervolgens door schone planten loopt waarbij de bladeren op de grond hangen en die raken ook beschadigd dan is er een redelijke kans dat op die manier de schone planten besmet raken. Daarom kan het beste eerst in schoon en daarna in besmet gewas gewerkt worden. Schoeisel dient ontsmet te worden nadat door besmet gewas is gelopen of apart schoeisel kan gebruikt worden in een besmette afdeling. Daarnaast is het ook beter om er voor te zorgen dat de bladeren van planten niet op de grond hangen.

Voor het effectieve gebruik van ontsmettingsmiddelen dienen de instructies van de fabrikant goed opgevolgd te worden.

In het algemeen geldt dat alle medewerkers zich bewust moeten zijn van hoe het virus zich kan verspreiden. Hiervoor zijn instructies op papier en mondeling essentieel.

6 Literatuur

1. ICTVdB - *The Universal Virus Database*, version 3.
www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB
2. Descriptions of Plant Viruses, Association of Applied Biologists (AAB)
www.dpvweb.net
3. Stijger C.C.M.M. & Kromwijk J.A.M. (2002) Hygiëneprotocol Orchidee. Opvraagbaar bij Productschap Tuinbouw.

Bijlage 1

Checklist hygiëneprotocol Cymbidium - samenvatting

Belangrijke onderdelen in bedrijfshygiëne

Onderdeel	Bedrijf 1	Bedrijf 2	Bedrijf 3
Druppelaars	nieuw	nieuw	nieuw
Goten	Ontsmet met Menno ter Forte	Niet van toepassing	nvt
Onkruid uit de kas verwijderen	Ja	1x per jaar	Ja
Gewasresten van grond verwijderen	Ja	1x per jaar	Ja
Potten altijd nieuw	Ja	Nee, oude potten met chloor schoonmaken, daarna ontsmetten	Ja
Substraat altijd nieuw	Ja	Ja	Ja
Betonpad schoonmaken	Met water	Vegen	Vegen
Werkrichting altijd zelfde *	Ja	Nee	Ja
Kas altijd op temperatuur	Ja	Ja	Ja
Druppelleidingen ontsmet	Ja, Menno ter Forte	Nee	Nee
Drainwater	Geen hergebruik	Geen hergebruik	Geen hergebruik
Bassinwater ontsmet	Nee	Nee	Nee
Reiniging mesjes	Ja, na elke plant, MennoClean	Ja, na elke plant, MennoH	Ja, MennoClean
Reiniging spuitkar	Nee	1x per jaar	Ja
Reiniging oogstkarren	Nee	1x per jaar	Ja
Werkkleding reiniging	Dagelijks	Na enkele dagen	Ja
Schoeisel personeel reiniging	Nee	Nee	Nee
Hobbyplanten in kas	Nee	Nee	Nee
Handen ontsmetten personeel	Ja, na elk soort	Ja, na elke soort (10-15x per afdeling)	Ja, MennoH + handschoenen
Handen ontsmetten bezoekers	Nee	Nee	Niet in gewas
Voeten ontsmetting bezoekers en personeel	Nee	Nee	Niet in gewas
Watermonstername door derden	Nee	Ja	Nee
Gebruik oppervlakte water	Nee	Nee	Nee
Vroegtijdige herkenning ziekten (visueel)	Ja	Ja	Ja
Verwijdering zieke planten	Ja, max. 5%	Ja	Ja, hele partij
Inschakeling lab bij onbekende ziekte	Ja	Nee	Ja

* (heeft bij bedden met 1 pad aan elke zijde geen zin om verspreiding tegen te gaan)