

# Op zoek naar de variabiliteit van pepinomozaïekvirus

Overzicht van onderzoek uitgevoerd van 1 januari 2003 tot 31 december  
2005

## **Vertrouwelijk verslag**

Ineke Stijger<sup>1</sup>, René van der Vlugt<sup>2</sup>, Roel Hamelink<sup>1</sup>, Ruud Kaarsemaker<sup>1</sup>, Annette  
Dullemans<sup>2</sup>

© 2006 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

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 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



PT nummer: 11598

Intern projectnummer: 3240350400 (oorspronkelijk 433504 daarna 41103504)

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.**

Glastuinbouw

Adres : Kruisbroekweg 5, 2671 KT Naaldwijk  
: Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk  
Tel. : 0174 636817  
Fax : 0174 636835  
E-mail : [ineke.stijger@wur.nl](mailto:ineke.stijger@wur.nl)  
Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

pagina

1	INLEIDING .....	5
1.1	Doel .....	5
2	INFORMATIE VAN PRAKTIJKBEDRIJVEN.....	7
2.1	Enquête .....	7
2.1.1	Inleiding .....	7
2.1.2	Uitvoering .....	7
2.1.3	Resultaten .....	7
2.1.4	Conclusie .....	7
2.2	Praktijkbemonstering 2004 .....	8
2.2.1	Inleiding .....	8
2.2.2	Uitvoering .....	8
2.2.3	Resultaten .....	8
2.2.4	Conclusie .....	10
2.3	Praktijkbemonstering 2005 .....	12
2.3.1	Inleiding .....	12
2.3.2	Uitvoering .....	12
2.3.3	Resultaten .....	12
2.3.4	Conclusie .....	13
3	GENETISCHE INFORMATIE .....	15
3.1	Sequenties .....	15
3.1.1	Inleiding .....	15
3.1.2	Uitvoering .....	15
3.1.3	Resultaten .....	15
4	KASPROEVEN.....	17
4.1	Kasproef 2004.....	17
4.1.1	Inleiding .....	17
4.1.2	Uitvoering .....	17
4.1.3	Resultaten .....	17
4.1.4	Conclusie .....	21
4.2	Kasproef 2005.....	22
4.2.1	Inleiding .....	22
4.2.2	Uitvoering .....	22
4.2.3	Resultaten .....	22
4.2.4	Conclusie .....	29
5	CONCLUSIE.....	31

# Samenvatting

Pepinomozaïekvirus (PepMV) was tot 6 jaar geleden nog een volkomen onbekend virus. Toch heeft het sinds 1999, toen het voor het eerst in zowel de Nederlandse als Engelse tomatenteelt werd aangetroffen, vaste grond onder de voeten gekregen. Een van de belangrijkste redenen hiervoor is zijn gemakkelijke verspreiding (door gewashandelingen en via besmette oppervlakten zoals fust en gereedschappen) en de zeker kort na de introductie van het virus, zwakke tot zeer zwakke symptomen in de teelt.

Sinds de introductie zijn de meldingen rond problemen met het virus in de teelt echter wel toegenomen, het was onduidelijk welke factoren hiervoor verantwoordelijk waren; teeltomstandigheden, rasinvloeden dubbelinfecties met andere ziekteverwekkers of de eigenschappen van het virus zelf. Vooral over dat laatste was de nodige onduidelijkheid omdat virussen, als notoire opportunisten, als geen ander in staat zijn om hun eigenschappen snel aan te passen aan andere omstandigheden.

Binnen dit project is onderzocht welke variatie er binnen pepinomozaïekvirus bestaat zowel in biologische eigenschappen zoals symptomen, virusconcentratie etc. als in de genetische eigenschappen en mogelijke veranderingen daarvan tijdens de teelt. Ook is gekeken naar het mogelijk voorkomen van andere isolaten of stammen van het virus in de Nederlandse teelt en naar de (on)mogelijkheden van beschermende maatregelen.

Uit onze onderzoeken blijkt dat:

- Het virus sinds de eerste introductie in 1999 van het tomatenisolaat van pepinomozaïekvirus inmiddels duidelijke genetische veranderingen laat zien.
- Dat op dit moment (mei 2006) diverse varianten van pepinomozaïekvirus binnen de Nederlandse tomatenteelt voorkomen.
- Dat er sinds 2005 (en wellicht al eerder) ook US2, een duidelijk afwijkende stam van PepMV, in de Nederlandse tomatenteelt voorkomt en dat deze stam in menginfectie met de tomatenstam voorkomt.
- Dat er onder de huidige Nederlandse praktijk steeds mengsels van virusvarianten in planten voorkomen en dat het niet te voorspellen is wat de effecten hiervan op de schade door het virus zullen zijn.
- Dat het virus, afhankelijk van het tijdstip tijdens het teeltseizoen, zich extreem snel of juist langzaam door de plant kan verspreiden.
- Het virus zich snel naar snelgroeïende delen van de plant beweegt en daar zeer hoge concentraties kan bereiken.
- Dat het virus ook in hoge concentraties in kroonblaadjes voorkomt.
- Dat de concentratie van het virus in de plant tijdens het teeltseizoen opvallende schommelingen vertoont.
- Dat er geen verband is tussen deze schommelingen en het optreden of de heftigheid van symptomen in planten en vruchten.
- Dat uit de kasproef van 2005 aanwijzingen zijn gekomen dat planten die eerst met 1066 en vervolgens met het necrotisch isolaat DB1 zijn geïnfecteerd minder heftige symptomen geven dan planten die alleen met DB1 zijn geïnfecteerd.

# 1 Inleiding

In het begin van 1999 werd pepinomozaïekvirus (PepMV) voor het eerst in de Nederlandse tomatenteelt waargenomen. Tot dan was het pepinomozaïekvirus eenmalig beschreven in het gewas pepino (*Solanum muricatum*) in Peru. Inmiddels blijkt dat het virus ook in andere landen in Europa en daarbuiten (Amerika, Canada en China) voorkomt. Halverwege 1999 is er door drie onderzoeksinstellingen (PPO Glastuinbouw, PRI en PD) een onderzoek gestart naar dit nieuwe virus. De aandacht ging in de eerste plaats uit naar de identificatie van dit op dat moment voor Europa nog onbekende en nieuwe virus en de ontwikkeling van een antiserum t.b.v. detectie.

In de daarop volgende jaren is onderzoek gedaan naar de overdracht en verspreiding van het virus. Tot op heden zijn zowel in de praktijk als in het onderzoek diverse zaken waargenomen waar nog geen verklaring voor is. Het betreft vooral verschillen in symptoomontwikkeling op diverse bedrijven en in de proeven met herkomsten van het virus uit het buitenland. Onderscheid maken tussen het pepino en tomatenisolaat is met de huidige routine detectie methode niet mogelijk en uit voorlopig onderzoek o.a. van PRI blijkt dat er slechts geringe verschillen in het genetisch materiaal lijken te bestaan tussen het pepino en het tomaat isolaat van het virus. Toch bestaan er grote verschillen in aantasting tussen deze twee isolaten. Ook zijn er reeds op tomaat sterke necrotische isolaten van PepMV gevonden. Wat de verschillen tussen deze isolaten precies zijn is onduidelijk evenals het gevaar wat ze voor de toekomst inhouden. Zo is nog onbekend hoe snel het virus zich aan veranderende (teelt)omstandigheden kan aanpassen. Betere herkenning van de verschillende isolaten en stammen zal een betere risico-inschatting mogelijk maken, ook van een eventuele cross protectie strategie ("vroege besmetting"). Hiervoor is echter wel gedetailleerder onderzoek aan de verschillende stammen van het virus nodig, o.a. van hun genetisch materiaal.

Om meer inzicht te verkrijgen in het pepinomozaïekvirus zelf en niet zozeer de verspreiding worden hieronder kort weergegeven welke onderwerpen binnen dit project aan de orde zijn gekomen:

- Onderzoek naar de verschillen in symptoomontwikkeling op praktijkbedrijven en in de kasproeven
- verzamelen van isolaten om de eventuele variabiliteit van isolaten te bepalen
- onderzoek naar mogelijk verschillende stammen van het virus (binnen- en buitenland) (mogelijke mutaties)
- onderzoek naar een eventuele natuurlijke resistentie bij bijvoorbeeld een vroege besmetting in de teelt
- de mogelijkheden van cross-protectie onderzoeken
- nagaan of er in de praktijk al sprake is van cross-protectie
- veranderingen van het virus tijdens een teelt

## 1.1 Doel

Doel van het onderzoek is om na te gaan of er verschillende isolaten (of stammen) van PepMV bestaan, ze te leren herkennen en wat de risico's zijn van het ontstaan van mutanten en na te gaan welke gevaren deze mogelijke mutanten van PepMV voor de tomatenteelt inhouden.



## 2 Informatie van praktijkbedrijven

### 2.1 Enquête

#### 2.1.1 Inleiding

In 2003 is een enquête opgesteld met vragen (zie Bijlage 1) in het kader van het onderzoek naar pepinomozaïekvirus in de tomatenteelt. Het doel van deze enquête was om inzicht te krijgen in de verscheidenheid aan symptomen en uiteindelijk om na te gaan of er verschillende isolaten (of stammen) van pepinomozaïekvirus bestaan en voorkomen in de Nederlandse tomatenteelt. Aan de hand van de ingevulde formulieren en de bereidheid om wat plantmateriaal af te staan zou hieraan verder onderzoek gedaan kunnen worden. Resultaten uit de enquête en uit de toetsen van het bladmateriaal zouden een bijdrage kunnen leveren om na te gaan of en hoe het virus veranderd en de mogelijke gevaren voor de toekomst in te kunnen schatten.

#### 2.1.2 Uitvoering

De vragen voor de enquête zijn in overleg met de groepsleiders van de ronde en de tostomaat opgesteld. Dit is gedaan om meer draagvlak te krijgen voor het invullen van de enquête door de Nederlandse tomatentelers. De bedoeling was dat de enquête zou worden ingevuld door de telers onder code. De enquête is uitgevoerd door PPO Glastuinbouw onder auspiciën van LTO Groeiservice.

#### 2.1.3 Resultaten

De enquête is niet door individuele telers ingevuld maar in overleg met de groepsleiders van de ronde en de tostomaat is besloten dat zij de vragenlijst voor hun groep konden invullen. Dit is uiteindelijk ook onder code gedaan.

Op basis van de antwoorden is een verdeling in drie groepen gemaakt.

- Een groep van telers die het virus bewust vroeg (januari) in het gewas heeft gebracht. Meestal worden er dan een week na infectie bladsymptomen waargenomen. Bij het ene bedrijf worden er in de loop van het jaar wel vruchtsymptomen waargenomen en bij de ander niet.
- De tweede groep is een groep waarbij schoon is gestart en is na het constateren van het virus bij een aantal planten de rest van de planten ook (bewust) geïnfecteerd.
- Een andere groep heeft niet bewust besmet. Een aantal daarvan had geen virus en aantal kreeg in de loop van de teelt wel virus maar heeft niet de rest van de planten bewust besmet.

Wat de symptoomontwikkeling betreft blijkt uit de enquête dat die zeer divers kan zijn. Of zoals één groepsleider voor zijn groep (telers met hetzelfde ras, wel besmetting maar niet opzettelijk ingebracht, wel doorgelopen) invulde: in de groep heeft ieder een ander symptoom. In deze groep bestond dat uit veel gele vlekjes en bobbeling op het blad maar ook een slechte zetting, kromme kroontjes en gevlekte vruchten die bovendien zacht werden.

#### 2.1.4 Conclusie

Door het niet individueel in laten vullen van de enquête is er alleen een globaal beeld weer te geven en kan er geen uitgebreide symptoomanalyse worden gedaan. Daarnaast was door de beperking van het onder code invullen ook niet mogelijk om aan bladmateriaal te komen en na te gaan of het virus veranderd.

## 2.2 Praktijkbemonstering 2004

### 2.2.1 Inleiding

In 2003 is de vragenlijst niet door individuele telers ingevuld en dat kwam vooral door de vraag over bewust besmetten. Uiteindelijk is er door de groepsleiders voor hun groep de vragenlijst ingevuld. Dit leverde wel wat informatie op maar niet voldoende om daar mee verder te kunnen gaan. Daarom is besloten om het in 2004 over een andere boeg te gooien om op die manier aan meer informatie te komen om zo aan het doel van het project te kunnen voldoen.

### 2.2.2 Uitvoering

Bij de groepsleiders (ZHG) van de losse en trostomaat is een presentatie gegeven over het hoe en waarom van het project en daarbij is een oproep gedaan om bladmonsters naar PPO te sturen zodat deze geanalyseerd konden worden. Uitgangspunt voor het onderzoek is liefst groepen telers die hetzelfde ras telen en die hun planten besmet hebben met geïnfecteerd materiaal van één herkomst. Geprobeerd is om meerdere groepen telers te vinden met elk hun eigen bron. Op deze manier zou een nauwkeurig vergelijk mogelijk moeten zijn tussen verschillende bronnen. De bladmonsters zijn onder code ingestuurd (zie Bijlage 2 voor datum van inzending en de monstercode) en bij de onderzoekers was dus niet bekend wie die telers waren die iets hadden ingestuurd.

Op alle bladmonsters zijn PCR toetsen uitgevoerd met minstens drie verschillende primersets per monster. Van de verkregen PCR-fragmenten zijn de DNA-sequenties bepaald en onderling en met sequenties van de tomaten en pepino stam van PepMV vergeleken op overeenkomsten en verschillen. In totaal werden van meer dan 65 verschillende monsters en een aantal controles meer dan 200.000 nucleotiden sequentie bepaald. Dit komt overeen met meer dan 30 complete virusgenomen.

Nadat de telersvereniging zich bekend had gemaakt en mee wilde werken aan het onderzoek is naar deze groep een vragenlijst (Bijlage 4) gegaan met vragen betrekking op eerste infectie, wel of niet-bewust besmetten en symptomen.

### 2.2.3 Resultaten

Na de oproep bij de groepsleiders van de losse en trostomaten zijn ongeveer 60 bladmonsters uit de praktijk binnengekomen. Van één telersvereniging waren dat er totaal 36 onderverdeeld in 7 excursiegroepen. Dit was voor het onderzoek zeer interessant om met behulp van genetische analyse naar de eventuele verschillen of overeenkomsten te kijken. Door de grote hoeveelheid PCR primers die al door PRI waren ontwikkeld was een analyse van de variatie mogelijk.

Wat het meest opviel was dat er wel duidelijke veranderingen in het virus zijn aan te wijzen. Ten opzichte van het type-isolaat dat in 1999 in Nederland gevonden is (PD99901066) zijn er duidelijke verschillen. Het virus is dus in de loop van de tijd veranderd. Opgemerkt moet worden dat deze veranderingen tussen alle bekeken isolaten steeds op dezelfde plaatsen terug te vinden zijn. Ze zijn dus niet willekeurig over het genetische materiaal van het virus verdeeld. Dit wijst op gerichte veranderingen en niet op willekeurige puntmutaties. Het is niet mogelijk om uit de biologische, kasproef en genetische gegevens af te leiden of deze veranderingen samenhangen met mogelijke biologische verschillen.

De veranderingen zijn voor een aantal monsters, afkomstig uit verschillende excursiegroepen, schematisch weergegeven in figuur 1. Binnen en tussen de verschillende groepen zien we duidelijk verschillende virussen:

A: zgn. 'rood' type virus

B: zgn. 'blauw' type virus

C: mengsels van 'rood' en 'blauw' type virus

D: virussen die een samensmelting zijn van rood en blauw (aangegeven met zwart)



## Overzicht mutaties in tomaten isolaten

# isolaat	Monstercode in Kloon A	Pos on ORF3								pos ORF4				pos CP		
2	8-XA01	C	C	T	G	G	C	C	T	G	C	C	T	G	A	T
3	7-XA01	C	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	19-XA01	C	C	T	A	G	C	C	T	G	C	C	T	G	A	T
27	XA-02	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
21	24-XA02	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
24	6-XA02	T	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	25-XA02	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
6	15-XA03	C	C	T	G	G	C	A	T	G	C	A	T	G	A	T
22	27-XA03	C	C	T	G	G	C	A	T	G	C	A	T	G	A	T
28	XA-03	C	C	T	G	G	C	A	T	G	C	A	T	G	A	T
29	XA-04	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
30	XA-05	C	C	T	G	G	C	A	T	G	C	A	T	G	A	T
1	4-XA05	T	T	C	A	A	T	C	C	C	T	C	C	C	G	C
4	17-XA05	C	C	T	G	G	C	A	T	G	C	A	T	G	A	T
5	20-XA05	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
8	21-XA05	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
9	23-XA05	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
11	12-XA05	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
12	18-XA06	T	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	14-XA05	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
18	10-XA05	C	C	T	G	G	C	A	T	G	C	A	T	G	A	T
23	1-XA05	T	T	C	A	R	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
25	22-XA05	T	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	18-XA06	T	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	XA-06	C	C	T	G	G	C	A	T	G	C	A	T	G	A	T
19	13-XA07	C	C	T	A	G	C	C	T	G	C	C	T	G	A	T
32	XA-07	C	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	3-XA08	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
14	9-XA08	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
33	XA-08	T	T	C	A	G	Y	C	Y	K	Y	C	Y	K	R	C
7	11-XA09	T	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	XA-09	T	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	2-XA-10	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
35	XA-10	T	T	C	G	G	C	M	Y	K	C	M	Y	K	A	C
17	26-XA11	C	C	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	XA-11	C	C	T	G	G	C	A	T	G	C	A	T	G	-	-
37	09-1 1908	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
38	09-2 1908	T	T	C	-	-	-	-	-	-	T	C	C	T	-	-
39	09-3 1908	C	C	T	A	G	T	C	T	T	T	C	T	T	A	C
40	09-4 1908	T	T	C	A	A	T	C	C	T	T	C	C	T	G	C
41	09-5 1908	C	C	T	A	G	T	C	T	G	T	C	T	G	A	T
42	09-6 1908	C	C	T	G	G	C	A	T	G	C	A	T	G	A	T
	1066	C	T	T	A	G	T	C	T	G	T	C	T	G	A	T

Y = T of C  
 K = G of T  
 R = G of A  
 M = A of C

Figuur 1. Overzicht van de verschillende veranderingen in sequenties in de praktijkmonsters uit 2004. Voor de duidelijkheid worden de verschillen aangeduid met kleuren. Vandaar de aanduidingen 'rood' en 'blauw' virus. Zwart staat voor een virus waarin zowel rood als blauw samen voorkomen.

Omdat van een aantal excursiegroepen ook materiaal beschikbaar was dat gebruikt was om mee te besmetten (zgn 'moedervirus'), was het ook mogelijk om te zien of en eventueel in hoeverre er veranderingen t.o.v. het moedervirus op zouden treden.

Uit die vergelijking werden een paar dingen duidelijk:

Binnen een groep die bijv. met '*blauw*' virus besmet zou moeten zijn, werden telers aangetroffen die volledig met '*rood*' virus besmet waren maar ook telers die met mengsels van rood en blauw virus of met 'samengesmolten virus' besmet waren.

Dit betekent tenminste drie dingen:

1. Sommige tuinders waren vrijwel zeker al besmet met '*rood*' virus voordat ze zelf opzettelijk besmetten met '*blauw*' virus (of omgekeerd).
2. Na opzettelijke besmetting met bijv. '*blauw*' virus kan er nog steeds '*rood*' virus in de planten binnenkomen (en omgekeerd).
3. Wanneer '*rood*' virus en '*blauw*' virus bij elkaar komen dan vermengt hun genetisch materiaal

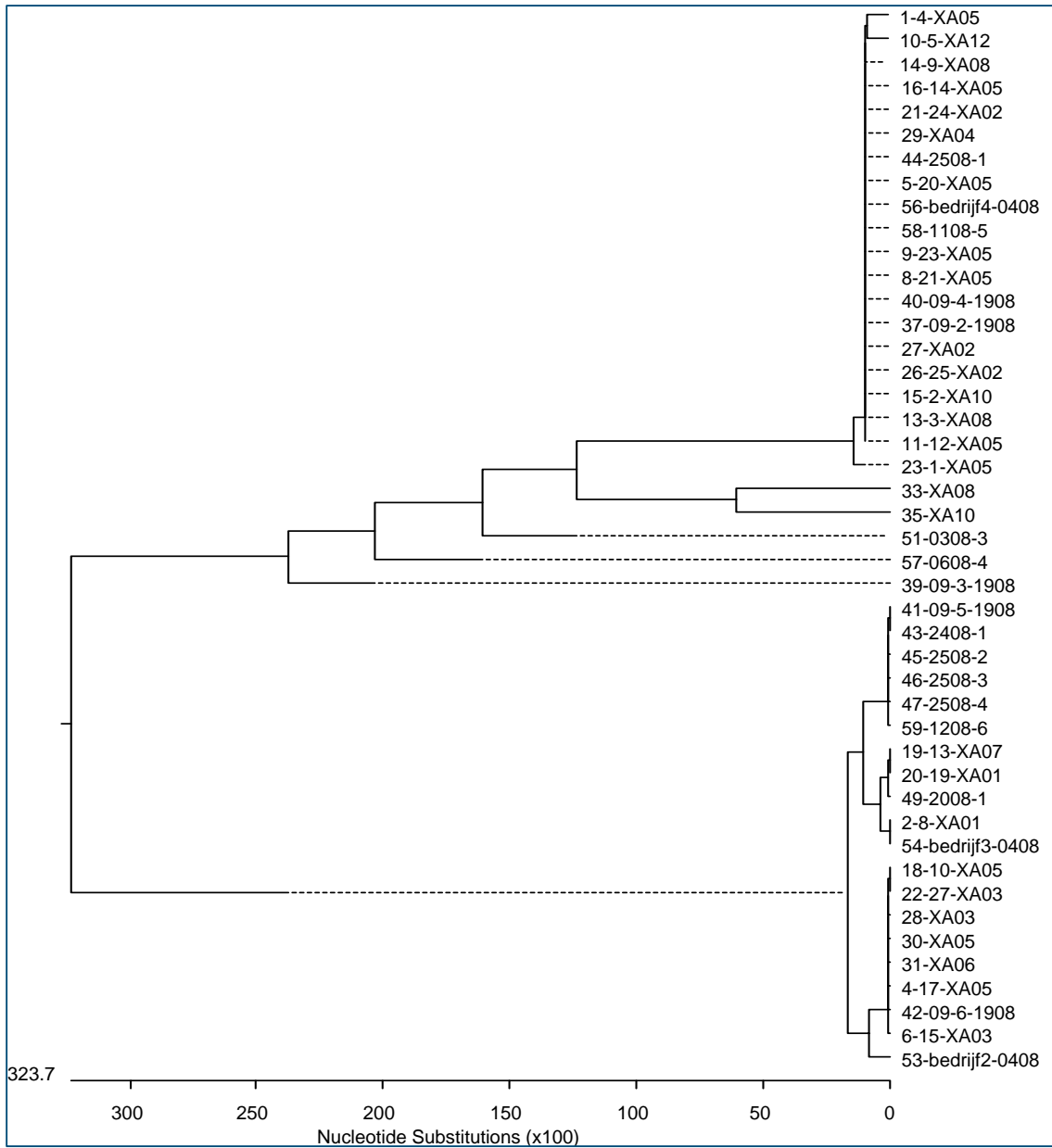
In figuur 2 is een overzicht gegeven van de diverse bladmonsters en hoe ze na analyse gegroepeerd zijn. Uit deze figuur wordt duidelijk dat er een groep '*rood*' virus is, een groep alleen '*blauw*' virus, een groep met een mengsel van '*rood*' en '*blauw*' virus en een kleine tussengroep die bestaat uit virussen waarin het genetische materiaal van '*rood*' en '*blauw*' virus vermengd is. Uit deze figuur blijkt duidelijk dat er is geen indeling op kleur van het virus mogelijk wat betreft excursiegroepen. Dit geeft op een andere manier de conclusies 1, 2 en 3 van hierboven weer.

Uit de resultaten van de vragenlijst blijkt dat de meeste telers al vroeg in het seizoen virus in de planten hebben vastgesteld. Daarbij geven een aantal aan dat er gelijk heftige symptomen in het blad zijn waargenomen en een paar geven aan dat er zwakke symptomen zijn gevonden. Ook zijn er bij de meeste bedrijven vruchtsymptomen waargenomen en dat varieert van één tros waar wat op te zien is geweest tot het hele jaar vruchten met een grauwe kleur. De meeste telers geven aan dat de bladsymptomen die in het begin van de infectie te zien waren over het algemeen na een aantal weken zijn verdwenen. Op de vraag of er later (na de eerste symptomen) nogmaals symptomen zijn opgetreden geeft 85% van de telers aan dat dit inderdaad het geval is.

#### 2.2.4 Conclusie

Uit de genetische DNA-analyses van de PCR-fragmenten van de meer dan 60 praktijkmonsters afkomstig van verschillende telersverenigingen en excursiegroepen komen een paar belangrijke conclusies:

- In Nederland komen in 2004 al verschillende vormen van PepMV voor
- Het virus is in staat zich aan te passen en heeft dat ook daadwerkelijk gedaan sinds de eerste vondst in 1999 in Nederland
- Mengsels van verschillende vormen van PepMV in dezelfde plant zijn mogelijk.
- Het vermengen van de eigenschappen van verschillende vormen van het virus is mogelijk. Het is niet in deze proef aangetoond maar op den duur zal dit zeker tot nieuwe eigenschappen van het virus leiden. Het zou zich onder andere door meer heftige symptomen kunnen uiten.
- Uit de ingevulde vragenlijst blijkt dat een vroege besmetting met PepMV niet automatisch leidt tot het symptoomvrij blijven van de planten gedurende de rest van het seizoen.



Figuur 2. Overzicht van praktijkmonsters gegroepeerd op 'kleur'.

## 2.3 Praktijkbemonstering 2005

### 2.3.1 Inleiding

In 2004 is op slechts één moment, relatief aan het eind van het teelt seizoen, materiaal verzameld voor verder onderzoek aan de genetische eigenschappen. Omdat uit de resultaten van 2004 was gebleken dat het virus toch verandert in de tijd, werd voor 2005 besloten om gedurende het teeltseizoen op diverse tijdstippen materiaal te onderzoeken en op die manier mogelijk een verandering in de tijd waar te nemen. Uitgangspunt daarbij was een kleine groep van vijf telers waarbij bij elke teler een aantal vaste planten en een aantal wisselende planten op verschillende tijdstippen bemonsterd zou worden. Tegelijk zou door alle telers een logboek bijgehouden worden met daarin per week de belangrijkste symptomen.

### 2.3.2 Uitvoering

Bij elk van de vijf telers werd vrijwel elke maand bladmateriaal van een vijftal vaste planten en van een vijftal wisselende planten geplukt. De vijf wisselende planten werden op basis van afwijkende of opvallende symptomen maandelijks geselecteerd. Van elk monster werd in DAS-ELISA bepaald of en hoeveel PepMV aanwezig was en werd met 2 ofwel drie PCR-primersets (dezelfde als gebruikt in 2004) een DNA fragment gemaakt waarvan de DNA-sequentie bepaald werd. De telers hebben een logboek bijgehouden waarin ze de symptomen per week hebben opgeschreven (Bijlage 5).

### 2.3.3 Resultaten

#### **Virus en virus concentraties**

Uit de eerste serie monsters bleek dat op twee van de vijf bedrijven niet alle planten besmet waren met PepMV hoewel er toch enkele weken na start van de teelt en besmetting pas bemonsterd werd. Bij één bedrijf bleek de concentratie PepMV in de planten beduidend lager en bij een bedrijf is de concentratie in alle planten heel hoog. Bij twee bedrijven die wel volledig besmet waren was de concentratie PepMV in alle planten vrijwel gelijk.

Uit de tweede serie monsters bleek dat drie bedrijven inmiddels een vrijwel gelijke concentratie virus hadden in alle planten. Bij een bedrijf bleef de concentratie van het virus iets achter ten opzichte van de drie andere bedrijven en bevatten 2 van de 10 planten (nog) geen virus. Bij het vijfde bedrijf had één plant geen virus en bleef de concentratie in de andere planten behoorlijk achter.

Bij de vierde serie monsters bleef bij hetzelfde bedrijf als uit serie 1 en 2 de concentratie virus in de planten weer achter. Een bedrijf heeft wel een hoge concentratie maar volgens het logboek nauwelijks symptomen. Een van de drie bedrijven met een hoge concentratie virus in serie 2, heeft nu een lagere concentratie. Uit het logboek blijkt ook dat de symptomen (wankleurigheid van de vruchten) ook afneemt.

Uit de analyse van de zesde serie monsters blijkt dat de concentratie virus op alle vijf de bedrijven inmiddels hoog is. De mate van symptomen die gemeld worden verschillen echter nogal per bedrijf.

#### **Genetische analyses**

In principe was voor het jaar 2005 de herkomst van het inoculum bekend. Daarmee zou dus een vergelijking met 2004 mogelijk moeten zijn. Echter uit een eerste analyse van de eerste en tweede serie bleek al snel dat het aangetroffen virus binnen verschillende bedrijven niet hetzelfde was als in 2004 en uit een mengsel of mengsels van verschillende genetische varianten bestond.

Bij de meeste bedrijven bleek dat -per bedrijf- het virus in alle planten in de verschillende series (vrijwel) gelijk was. De minimale verschillen in genetisch materiaal zijn een afspiegeling van de normale sequentievaryatie die je in elke populatie virus aantreft. Exacte dezelfde verschillen in genetisch materiaal die ook in de isolaten van 2004 te vinden waren (zie figuur 1) waren ook in de isolaten van 2005 zichtbaar. Per bedrijf veranderde het virus ook niet of nauwelijks in de loop van het jaar. Echter bij één bedrijf week het virus in de vierde serie duidelijk af van het virus in de tweede serie. Ook waren er verschillen in de

virussequenties verkregen van de verschillende planten binnen dat bedrijf. Bij datzelfde bedrijf bleek ook dat een specifieke RT-PCR primer set niet meer werkte. Uit eindelijk bleek dat dit te wijten was aan het niet goed meer herkennen van het genetische materiaal van het virus door een primer. De vraag was nu dus of in dit speciale geval het virus inderdaad sterk veranderd was.

Het afwijkende virus is nader onderzocht en na het maken van nieuwe RT-PCR primer sets bleek het mogelijk om ook sequentie-informatie van het afwijkende virus te verkrijgen. De sequentie bleek 100% overeenkomst te vertonen met het vrij recent beschreven US2 isolaat van PepMV uit Noord-Amerika. Genetisch wijkt dit isolaat vrij sterk (gemiddeld  $\pm 30\%$ ) af van zowel het tomaten als het pepino-isolaat van PepMV. Helaas is er op dit moment nog vrijwel geen extra informatie over dit isolaat. In het Amerikaanse materiaal komt het wel samen met een andere stam (US1 genoemd) voor in een en dezelfde plant. Ook het US1 isolaat wijkt genetisch nogal sterk af van zowel de tomatenstam als de pepinostam. Helaas is van beide stammen geen bruikbaar materiaal voor verder onderzoek beschikbaar.

### 2.3.4 Conclusie

Evenals in 2004 bleek ook in 2005 PepMV in mengsels van verschillende genetische varianten voor te komen. Deze varianten verschillen op heel specifieke plaatsen van elkaar. De genetische verschillen zijn niet groot. Het is weliswaar mogelijk om specifieke RT-PCR-testen te maken om deze varianten van elkaar te onderscheiden, maar dat geeft geen zinnige informatie omdat het simpelweg met de huidige informatie niet mogelijk is om ook maar iets te zeggen of bepaalde sequentieverschillen verantwoordelijk zijn voor verschillen in (heftigheid van) symptomen of symptoomontwikkeling. Als dit echt duidelijk moet worden is, zoals al eerder aangegeven, de enige manier om daar achter te komen opzettelijke veranderingen aan te brengen in het genetische materiaal en het effect daarvan te testen op planten.

Binnen één en het zelfde gewas van een teler bleek het virus vrijwel niet te veranderen in de loop van een groeiseizoen. De in 2004 opgemerkte verschillen tussen verschillende varianten zijn dan zeer waarschijnlijk ook eerder een gevolg van een ontwikkeling over langere tijd (sinds 1999) dan van snelle veranderingen. Wel wordt het ook in 2005 duidelijk dat mengsels relatief vaak voorkomen. Dit wijst erop dat in de loop van een of meerdere groeiseizoenen er ook echt diverse introducties van virusvarianten in een kas plaatsvinden. Dit wordt helemaal duidelijk door de vondst in 2005 van de US2 stam. Deze kwam samen met de tomatenstam in een gewas voor. De herkomst van deze US2 stam is onbekend maar het ondersteunt de hypothese dat er diverse stammen en varianten van PepMV rondwaren (zowel in binnen- als in buitenland) die zich onopgemerkt verspreiden en vermengen. Ondertussen (mei 2006) is het uit de wetenschappelijke literatuur duidelijk geworden dat de US2 stam al enige jaren ook in Spanje voorkomt. Ook daar tot voor kort onopgemerkt en in menginfecties met de tomaten of pepinostam. Ernstiger is dat in Spanje ook al de eerste recombinanten (= mengvormen) van de US2 stam en de tomatenstam gevonden zijn. Wat deze 'nieuwe' stam en de gevonden recombinant, precies betekenen voor de ernst van de problemen die door PepMV worden veroorzaakt is simpelweg niet bekend.

De US2 stam verschilt aanzienlijk in zijn genetisch materiaal van de tomatenstam en de pepinostam. Dit heeft als belangrijkste consequentie dat uitslagen van moleculaire testen die nu gebruikt worden voor de detectie van PepMV op zijn minst voorzichtig moeten worden geïnterpreteerd. Door de sequentieverschillen zullen primersets niet meer automatisch goed reageren met het genetische materiaal van US2. Het manteleiwit van US2 wijkt ongeveer 13% af in aminozuur sequentie van de tomatenstam. Dit betekent dat ook de reactie van US2 in een DAS-ELISA mogelijk minder zal zijn. Helaas is de US2 stam niet schoon (d.w.z. zonder vermenging met de tomaten- of pepinostam) voorhanden zodat dat (nog) niet gecontroleerd kan worden.



## 3 Genetische informatie

### 3.1 Sequenties

#### 3.1.1 Inleiding

Bij PRI is in 2003 gestart met de bepaling van de volledige sequentie van het RNA genoom van de tomatenstam van het pepinomozaïekvirus.

#### 3.1.2 Uitvoering

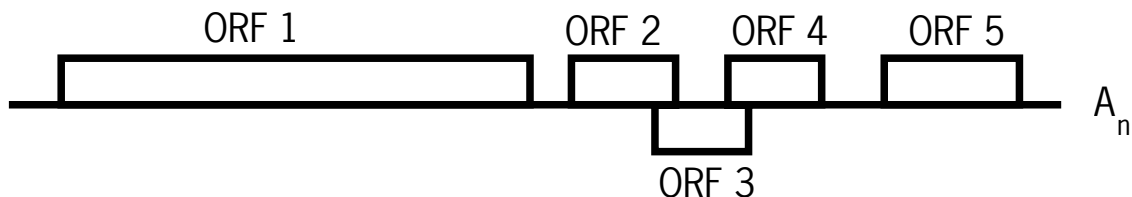
Vanuit zieke tomatenplanten werden verschillende tabaksplanten geïnfecteerd met de origineel beschreven tomatenstam van PepMV (PD99901066). Uit geïnfecteerde tabaksplanten (*Nicotiana occidentalis*P1) werd het virus gezuiverd met behulp van een eerder door ons ontwikkelde efficiënte zuiveringsmethode. Uit het gezuiverde virus werd m.b.v. een Quiagen RNeasy kit viraal RNA gezuiverd wat gebruikt werd in Reverse Transcriptase en cDNA reacties. Na klonering, en het verkrijgen van gedeeltelijke sequentieinformatie werden virus-specifieke primers ontworpen en ontbrekende stukken sequentie ingevuld door het sequencen van RT-PCR fragmenten. Het 5'-uiteinde van het viraal RNA werd bepaald m.b.v. een 5'-RACE kit.

Sequenties van alle fragmenten verkregen door klonering of RT-PCR werden m.b.v. het LASERGENE software pakket samengevoegd tot een complete sequentie.

#### 3.1.3 Resultaten

Het enkelstrengs plus-sense RNA genoom van de tomatenstam van PepMV is 6410 nucleotiden lang zonder de poly-A staart ( $A_n$ ) meegerekend (zie bijlage 4). Het bevat informatie ('open reading frames' of ORFs) voor een vijftal eiwitten (Orf 1 t/m ORF5, zie figuur 3).

ORF1 codeert voor het polymerase eiwit, betrokken bij de vermeerdering van het virus in de cel, ORF 2, 3 en 4 vormen samen het zgn. 'triple gene block', drie eiwitten die betrokken zijn bij o.a. het transport van het virus door de plant. ORF5 codeert voor het manteleiwit van het virus.



Figuur 3. Schematische weergave van het genoom van de tomatenstam van pepinomozaïekvirus

Dit genoom vertoont alle kenmerken van een zgn. potexvirus, wat bevestigt dat PepMV inderdaad tot die groep virussen behoort.

Deze sequentie vormde de basis voor het ontwerpen van verschillende RT-PCR primers die voor de verdere analyse van praktijkmonsters gebruikt zijn en voor vergelijkingen van sequentie verkregen uit deze praktijkmonsters.





## 4 Kasproeven

### 4.1 Kasproef 2004

#### 4.1.1 Inleiding

Naast de informatie uit de praktijk is in 2004 een kasproef gestart waarbij naar een aantal zaken is gekeken. Belangrijk in deze proef was de twee tijdstippen van besmetten (vroeg en laat) en wat de concentratie van het virus in de plant is en vooral of er verschil is bij een vroege en een late besmetting.

#### 4.1.2 Uitvoering

Begin januari 2004 is de kasproef gestart waarbij één ras (Axxion) is geplant. Tussen twee rijen tomatenplanten is steeds als buffer 1 rij met paprikaplanten geplaatst (plattegrond van de kas zie bijlage 2). Verder zijn er uitgebreide hygiëne maatregelen genomen om ongewenste verspreiding binnen de proef te voorkomen en is er gewerkt met aparte overalls, handschoenen en haarnetjes en is de werkvolgorde in een protocol opgenomen. Aan het begin van iedere rij is plastic opgehangen om verspreiding van het virus door langslopen te voorkomen.

In deze proef is op twee tijdstippen een deel van de planten opzettelijk geïnfecteerd met PepMV. Dit is uitgevoerd begin februari (05.02.04) en begin mei (03.05.04). De inoculatie van PepMV (isolaat 1066) is voor alle planten hetzelfde; het eerste gestrekte blad onder de kop.

##### *Symptomen en toetsingen*

Per rij zijn van vijf planten de symptoomontwikkeling gevolgd en bladmonsters genomen. De bladmonsters zijn steeds genomen van zes gelabelde bladeren. Van elk monster is in DAS-ELISA bepaald of en hoeveel PepMV aanwezig was. Doordat de monsters van gemerkte bladeren zijn genomen is het virusverloop in de tijd te volgen. Kanttekening hierbij is wel dat de gelabelde serie steeds versprong omdat de oudere bladeren van de plant zijn gehaald. Na het inoculeren van de planten is de bemonstering per dag uitgevoerd totdat er symptomen in de kop verschenen en vervolgens is de rest van het teeltseizoen wekelijks bemonsterd. Van half juli zijn lipjes van de kronen bemonsterd om ook meer van de virusconcentratie rond de vruchten te weten te komen. Vruchten zelf bemonsteren was geen optie omdat er dan teveel wordt beschadigd en dit weer andere (schimmel) problemen aan de plant zou geven.

##### *Oogst*

Eén maal per week zijn de vruchten geoogst. Hiervan zijn geen gegevens bijgehouden omdat de veldjes te klein waren om betrouwbare oogstgegevens van te verzamelen.

##### *Vaatverbruining*

Aan het eind van de teelt zijn alle stengels doorgesneden op verschillende hoogte van de plant en beoordeeld op het voorkomen van vaatverbruining.

##### *Stralingsgegevens*

De stralingsgegevens zijn naast de gegevens van de concentratie van zowel blad als vruchtkroontjes gelegd en de symptomen op blad en vruchten.

#### 4.1.3 Resultaten

##### *Symptomen*

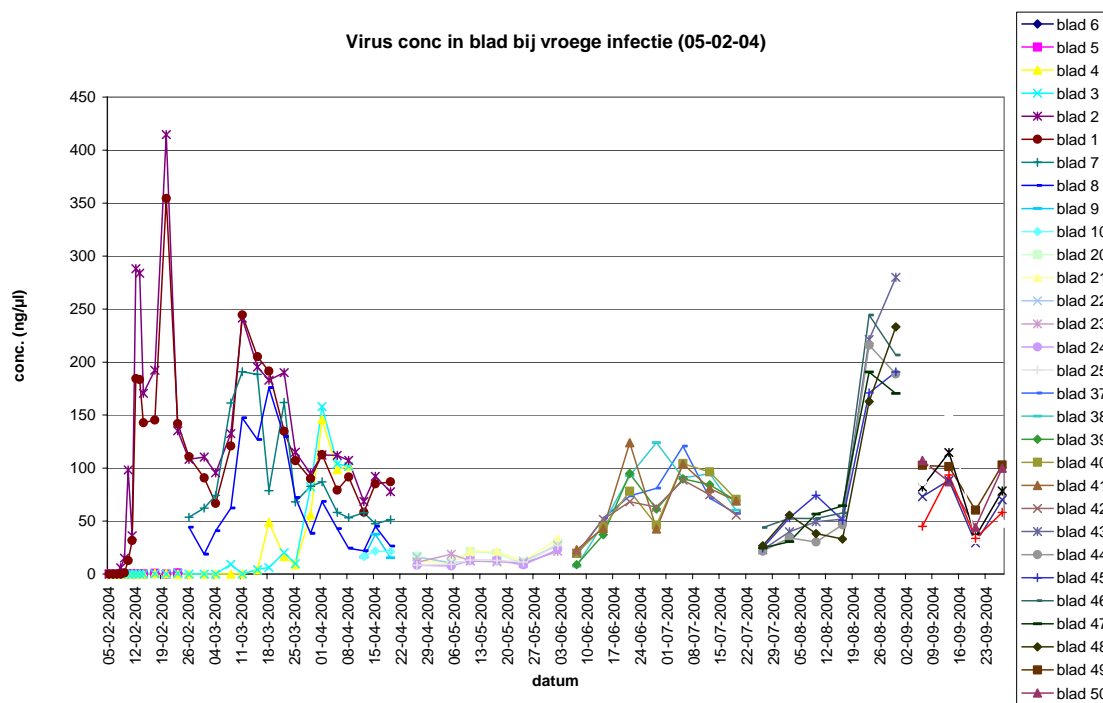
Bij de vroege infectie zijn zeven dagen na inoculatie de eerste symptomen zichtbaar geworden. Achttien dagen na inoculatie zijn op alle planten symptomen waargenomen en deze bestonden uit bladmisvorming en een grauwe kleur van de bladeren en opvallend veel felgele vlekjes.

Bij de planten die laat zijn geïnfecteerd zijn niet of nauwelijks bladsymptomen waargenomen, wel zijn daar wankleurige vruchten van de planten gekomen.

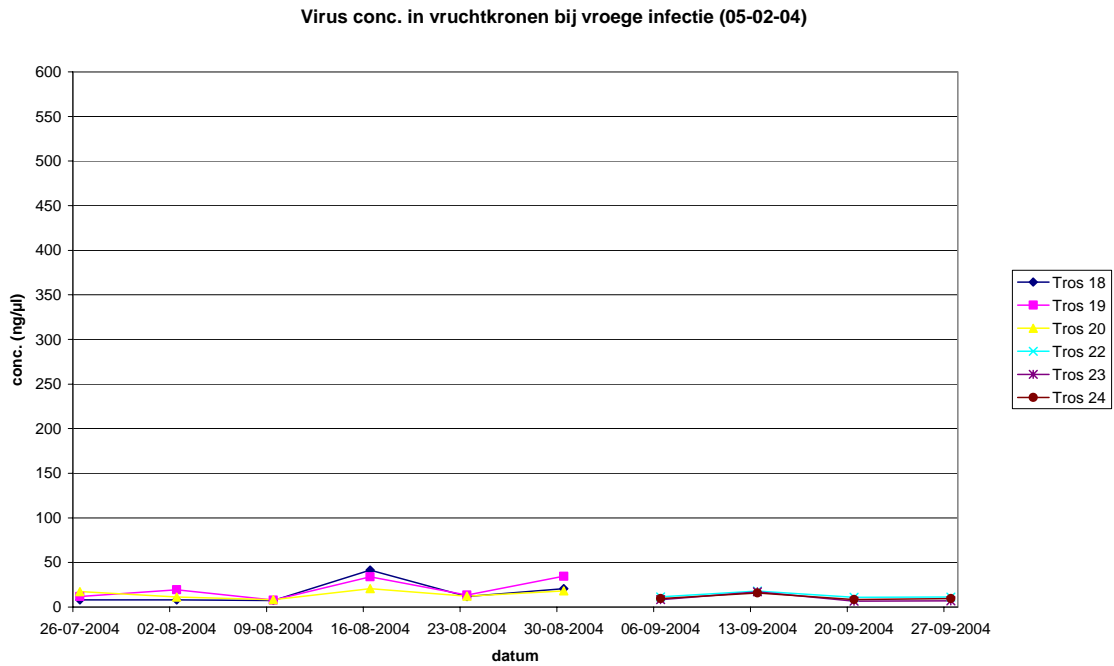
##### *Toetsingen*

Twee dagen na inoculatie is het virus al aangetoond in een blaadje in de kop van de plant. Na drie dagen in het geïnoculeerde blad en na vier dagen in het eerste blad boven het geïnoculeerde blad. In de twee onderste bladeren is het virus nooit aangetoond maar wel weer in de wortels. Daarin is een hoge concentratie virus aangetoond. Vijftien dagen na inoculatie is virus aangetoond in de twee bladeren net onder het geïnoculeerde blad en vervolgens liep de concentratie virus vrij snel op en na vier weken is daarbij de hoogste concentratie gemeten. Het geïnoculeerde blad en het blad daar net boven blijven tot dat ze van de plant gaan nagenoeg dezelfde concentratie virus behouden. Dit is totaal gedurende tien weken. Bij de late infecties is nauwelijks virus waargenomen in de geïnfecteerde bladeren en in het blad direct onder het geïnfecteerde blad werd heel weinig virus gevonden. Blad boven het geïnfecteerde blad begon na 14 dagen een lage concentratie virus te geven. Blad 7 en verder (naar boven) zijn 1 maand na infectie voor het eerst bemonsterd en daar is gelijk virus gemeten. Bij een paar monsters van de kroontjes is vanaf dag 1 al virus gemeten. Een eerste piek met hoge waarden (ELISA toets) in de kroontjes is 9 dagen na infectie gevonden. Een tweede piek lag rond zes weken na inoculatie daarna liep de virusconcentratie terug maar is nooit nul geworden.

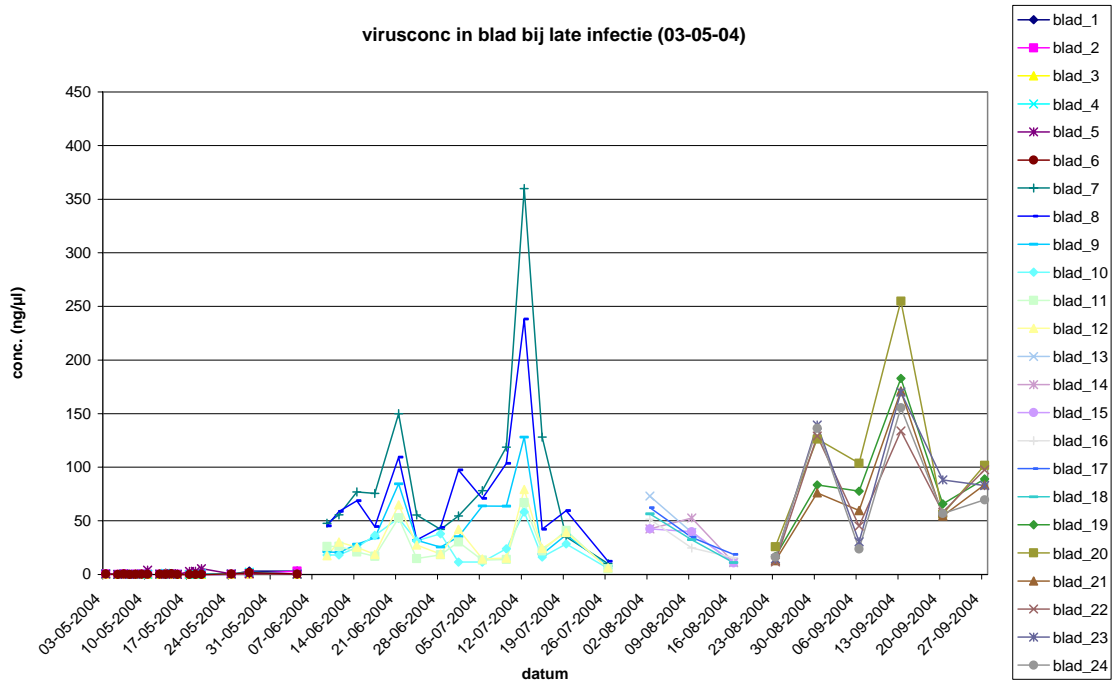
Zie figuur 4 voor het verloop van de concentratie van het virus (in blad) in de planten die vroeg zijn geïnfecteerd met het virus (figuur 5 voor de vruchtkroontjes). In figuur 6 is de concentratie verloop te zien in het blad van de laat geïnfecteerde planten (figuur 7 voor de vruchtkroontjes).



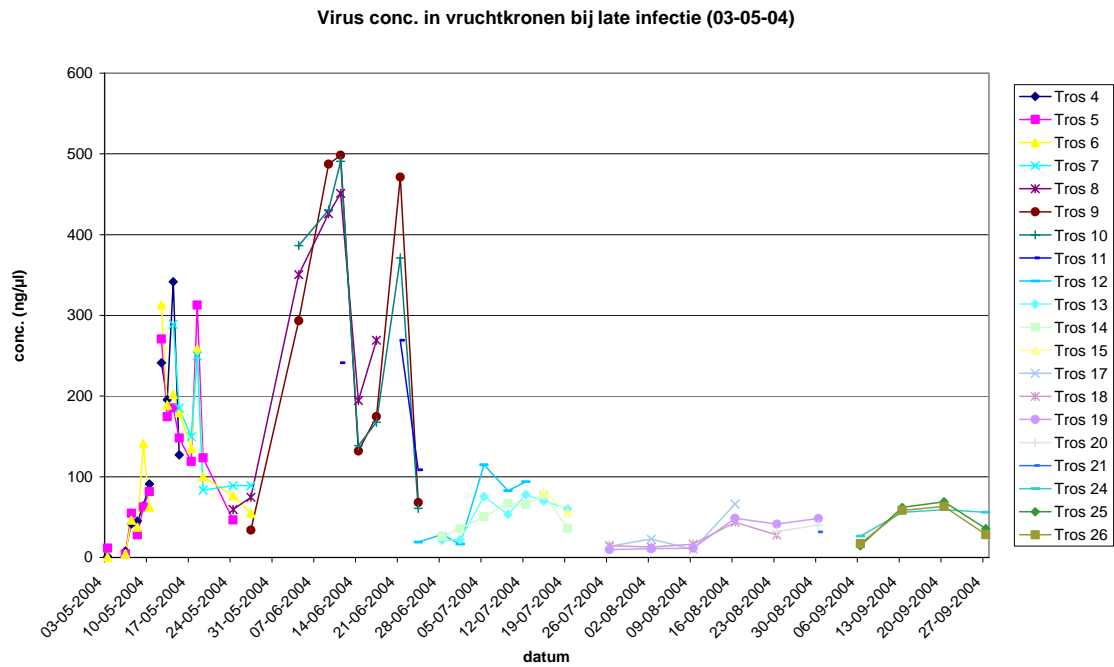
Figuur 4 Virusconcentratie in blad bij vroege infectie.



Figuur 5 Virusconcentratie in vruchtkroontjes bij vroege infectie.



Figuur 6 Virusconcentratie in blad bij late infectie.



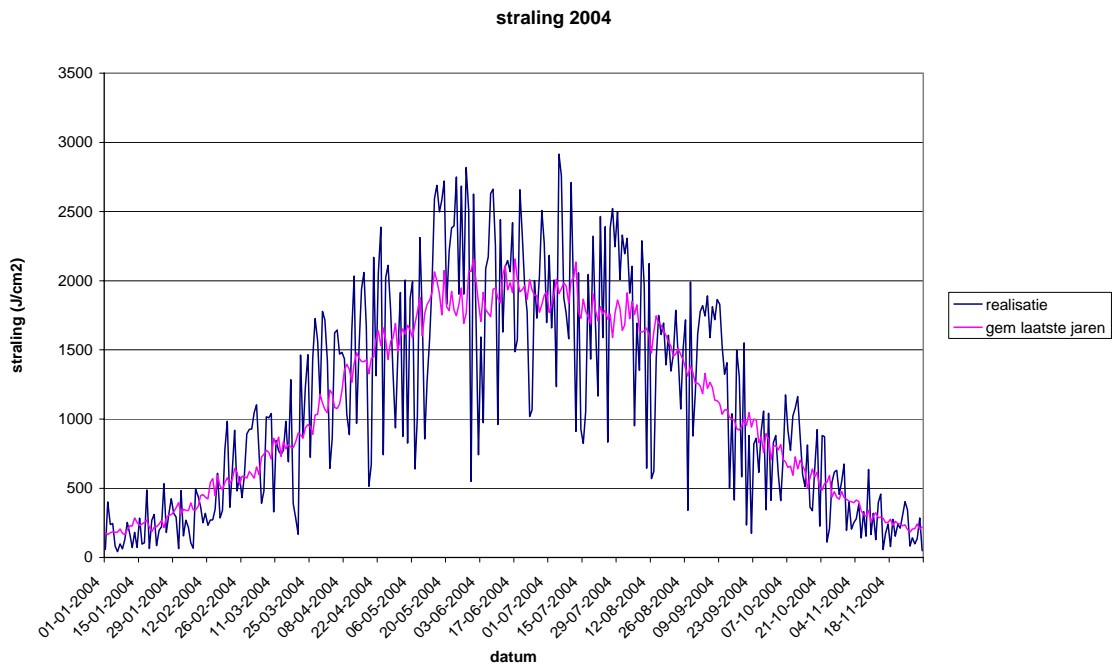
Figuur 7 Virusconcentratie in vruchtkronen bij late infectie.

*Vaatverbruining*

De vaatverbruining die is waargenomen was over het algemeen maar plaatselijk en veroorzaakt door *Botrytis*. In het merendeel van planten is geen vaatverbruining waargenomen.

*Straling*

Zie figuur 8 voor de gegevens van de straling in 2004 en de gemiddelde van de laatste jaren. De gegevens van de concentratie en de symptomen zijn vergeleken met straling en daarbij is niets gevonden wat op enig onderling verband wijst.



Figuur 8 Gegevens van de straling in 2004 en de gemiddelde straling van de laatste jaren.

#### 4.1.4 Conclusie

Bij zowel de vroeg als laat geïnfecteerde planten zijn twee pieken in de concentratie waar te nemen in het blad. De piek in de concentratie staat niet altijd gelijk aan een piek in symptomen. Alleen bij de eerste piek van de vroeg geïnfecteerde planten is dit wel het geval.

Bij de vruchtkroontjes is bij de laat geïnfecteerde planten een piek waar te nemen in de periode kort na het inoculeren en vervolgens blijft deze concentratie op een vrijwel gelijk niveau. Opvallend is wel dat de hoogte van de concentratie bij de vroeg geïnfecteerde planten een stuk lager is dan bij de laat geïnfecteerde planten. Ook hier weer geen verband tussen de pieken in concentratie en een piek in symptomen al zijn er wel meer vruchtsymptomen waargenomen bij de laat geïnfecteerde planten dan bij de vroeg geïnfecteerde. Bij een infectie vroeg in het teeltseizoen (= bij een jonge en snel groeiende plant) is er een zeer snelle verspreiding van het virus door de plant, vooral naar de jonge bladeren en vruchten. Bij een infectie later in het seizoen (= bij een oudere en minder snel groeiende plant) is de snelheid van verspreiding van het virus door de plant lager. Bij oudere planten zijn de delen die veel vruchten voornamelijk de vruchten en dat betekent dan dat er veel virus naar de vruchten gaat. Over het algemeen verspreidt virus zich naar die delen van de plant die snel groeien.

## 4.2 Kasproef 2005

### 4.2.1 Inleiding

Het doel van de kasproef is een mogelijk verband tussen de relatieve concentratie van het virus in de diverse delen van de plant en het optreden en heftigheid van symptomen op bladeren en vruchten duidelijker te krijgen. Daarnaast is nagegaan of een tweede infectie mogelijk is en of dit afhankelijk is van de eerste infectie (=cross-protectie??). Ook is nagegaan wat het effect is van een tweede infectie op verspreiding in plant en gewas en heftigheid van symptomen.

Ook voor deze kasproef zijn net als bij de kasproef in 2004 uitgebreide hygiëne maatregelen genomen om verspreiding tussen de isolaten te voorkomen. Zoals het maken van een extra ingang in de gevel om geen onnodig geloop te krijgen tussen de verschillende groepen. Daarnaast is de werkvolgorde in een protocol opgenomen.

### 4.2.2 Uitvoering

In een kas zijn drie groepen tomatenplanten gezet en deze groepen zijn gescheiden door rijen paprikaplanten. Eén groep planten is vroeg in de teelt geïnfecteerd met het isolaat 1066 (is oorspronkelijk tomatenstam van het PepMV), één groep planten is vroeg geïnoculeerd met een necrotisch isolaat (isolaat DB1 verzameld in Nederland in 2004) en een groep planten die vroeg zijn geïnoculeerd met 1066 en later (mei) in het seizoen met het necrotische isolaat.

Daarnaast zijn er ook drie manieren van infecteren toegepast namelijk:

- eerste blad onder de kop met besmet plantensap inoculeren
- met besmet blad langs de onderste bladeren lopen
- de eerste twee planten van de rij besmetten.

Van deze planten is de symptoomontwikkeling nagegaan en zijn zowel bladmonster als monsters van vruchtkroontjes genomen. De bladmonsters zijn per keer van zowel de op dat moment bovenste als de onderste bladeren genomen. De vruchtkroontjes zijn steeds van de op dat moment onderste tros genomen. Met behulp van DAS-ELISA is de aanwezigheid van het virus gecontroleerd en de concentratie van het virus bepaald.

#### *Oogst*

De vruchten zijn per week geoogst en de gegevens van de eerste drie geoogste trossen zijn verzameld. Verdere gegevens zijn hier niet van verzameld omdat de proefveldjes te klein waren en er teveel buitenrijen zijn om betrouwbare gegevens te krijgen.

### 4.2.3 Resultaten

#### *Symptomen*

De groepen met planten die (vroeg) geïnfecteerd zijn met isolaat 1066 lieten in het begin niet of nauwelijks bladsymptomen zien. Omdat er getwijfeld werd of er wel virus in de planten aanwezig was zijn alle planten getoetst met ELISA. Daaruit bleek dat alle planten wel virus bevatten. De groep met planten die met het necrotische isolaat zijn besmet gaven heel heftige necrose op het blad en stengel. Daarin kon ook onderscheid worden gemaakt in manier van infecteren. De planten waarvan het eerste blad is geïnfecteerd lieten het snelst symptomen zien. Met enige vertraging is bij de planten waar met besmet blad is langsgelopen necrotische symptomen vooral op de jongste bladeren waargenomen. Als laatste is bij de groep waarvan de eerste twee planten van de rij zijn besmet ook necrose op blad en stengel bovenin de plant opgetreden.

In de groep met planten waarin eerst het isolaat 1066 is ingebracht en later in het seizoen met het necrotische isolaat is herbesmet zijn gedurende de gehele teelt niet of nauwelijks symptomen en dan in het bijzonder de necrotisch waargenomen. In deze planten zijn beide isolaten teruggevonden.

Vanaf augustus zijn weer necrotische symptomen in de kop van de planten waargenomen. Deze symptomen

zijn alleen in de planten die geïnoculeerd waren met isolaat DB1 (necrotisch isolaat) gezien. In de planten met alleen 1066 bleven de symptomen gedurende de gehele teelt zeer beperkt.



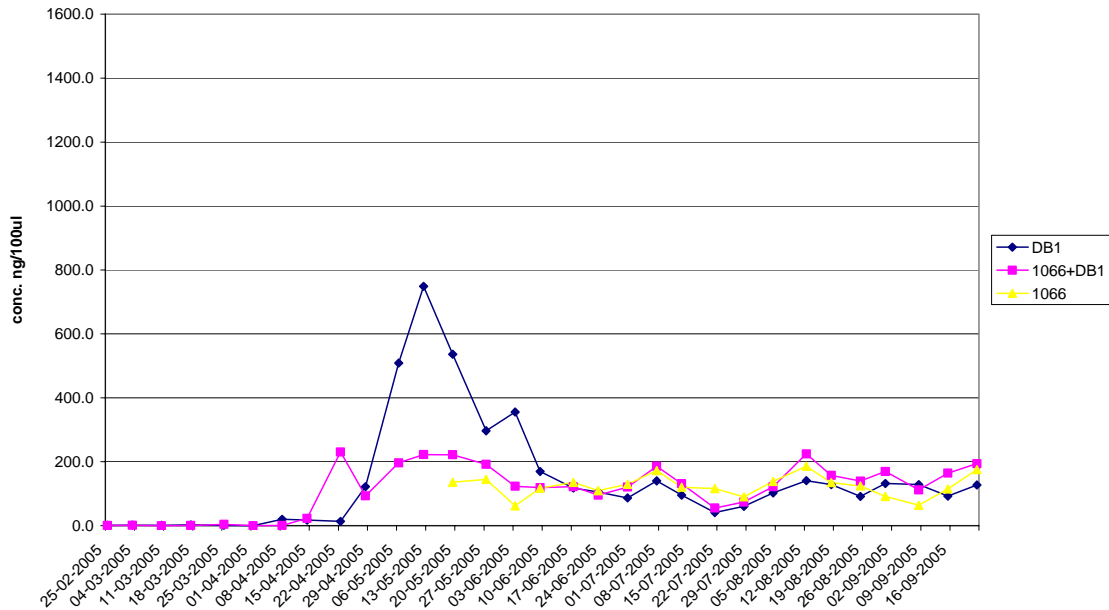
Symptomen van het necrotisch isolaat (DB1)

### *Toetsingen*

Uit de resultaten van de toetsingen van het onderste blad is te zien dat over het algemeen de concentratie van het virus niet erg hoog is zeker in vergelijking met de concentratie uit de bovenste bladeren. Bij alle manieren van infecteren is in de maand mei een lichte piek te zien (figuren 9 tot en met 11) bij de bladmonsters van de onderste bladeren.

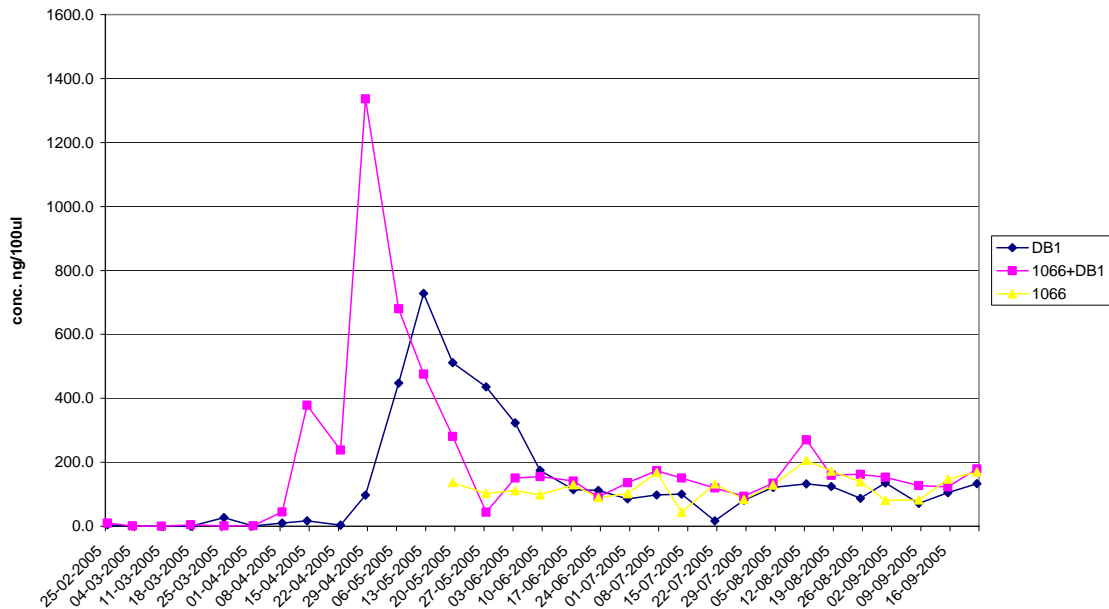
Bij de resultaten van de toetsingen uit het bovenste blad blijkt dat de virusconcentratie een stuk hoger ligt dan bij de onderste bladeren. Opvallend is ook dat de eerste piek op 8 april 2005 ligt bij de bladmonsters van de met DB1 geïnfecteerde planten en geen verschil zit tussen de manier van infecteren (figuren 12 tot en met 14). Wordt deze piek in concentratie vergeleken met de piek in symptomen dan ligt deze niet gelijk. De piek in symptomen bij het infecteren van het eerste blad ligt op 17 maart 2005, bij het langslopen met besmet blad op 25 maart 2005 en bij het besmetten van de eerste twee planten aan het begin van de rij op 1 april 2005. Opvallend is ook in deze grafieken is dat het concentratieverloop nogal grillig is en dat de concentratie van de combinatie niet heel erg hoog of heel erg laag is in vergelijking met de concentraties van de isolaten afzonderlijk.

virusconcentratie in onderste blad, inoculatie blad in de kop



Figuur 9 Virusconcentratie in onderste blad, planten geïnfecteerd door virus op blad in de kop te inoculeren.

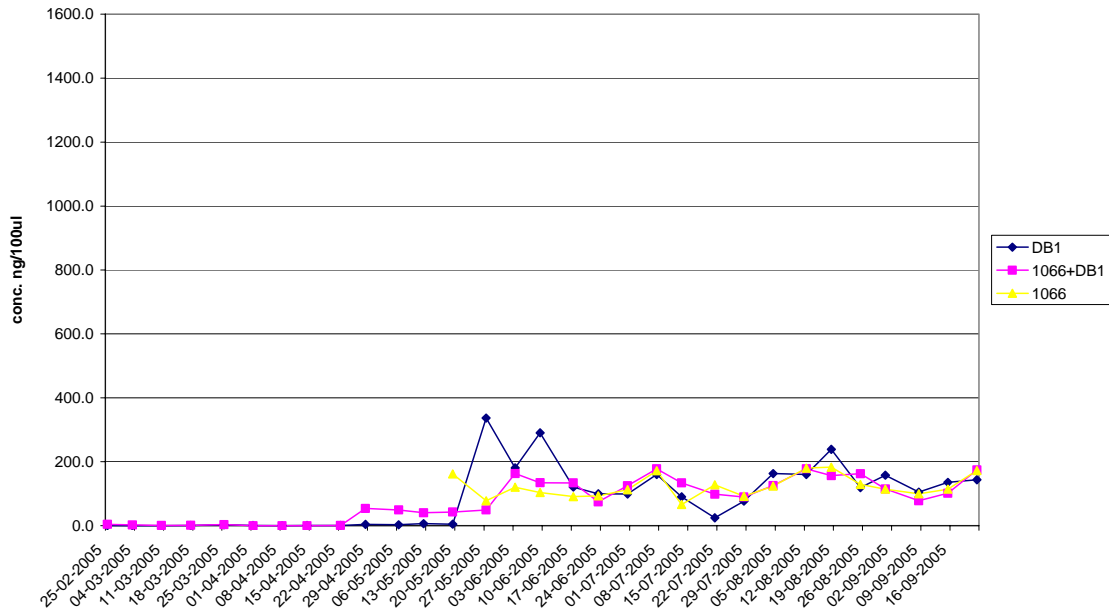
virusconcentratie in onderste blad, inoculatie door langslopen



Figuur 10 Virusconcentratie in onderste blad, planten geïncouleerd door langs te lopen met besmet blad.

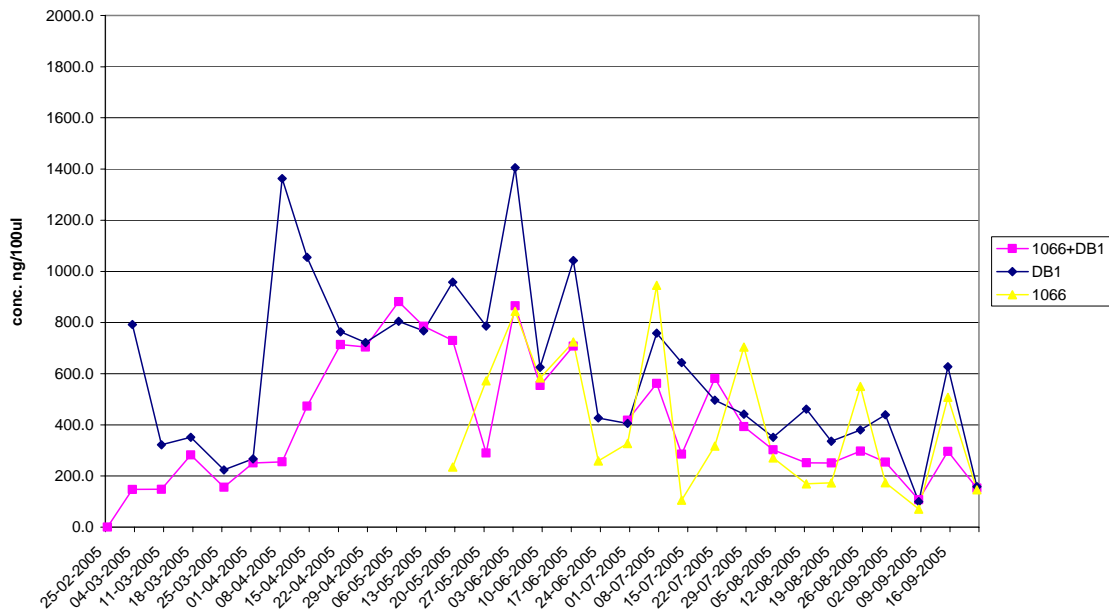


virusconcentratie in onderste blad, inoculatie door gewaswerkzaamheden



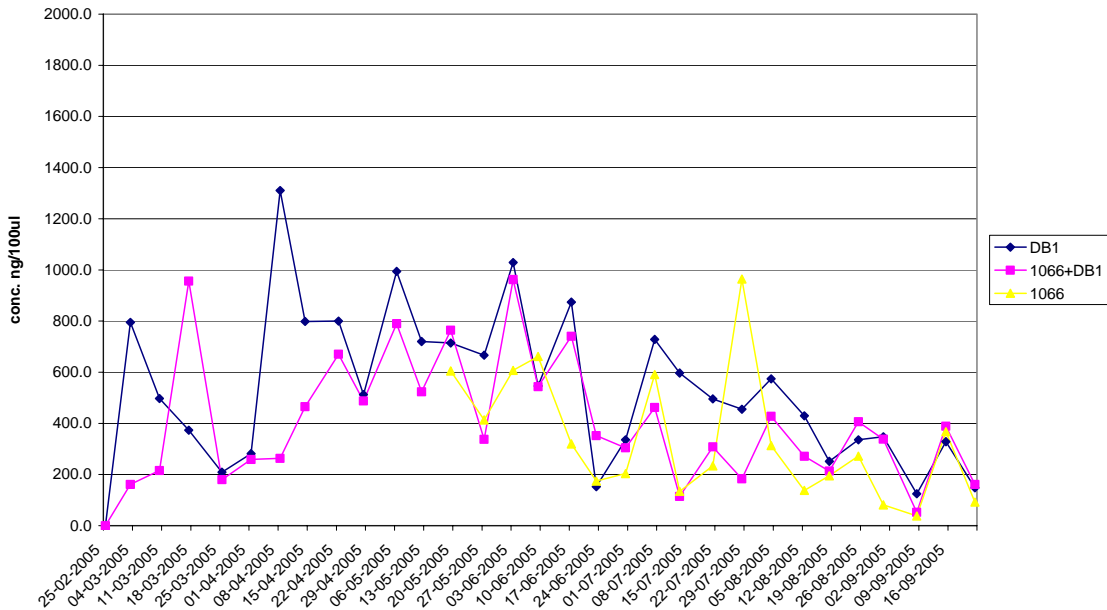
Figuur 11 Virusconcentratie in onderste blad, planten geïnoculeerd door doorlopen via gewaswerkzaamheden.

virusconcentratie in bovenste blad, inoculatie blad in de kop



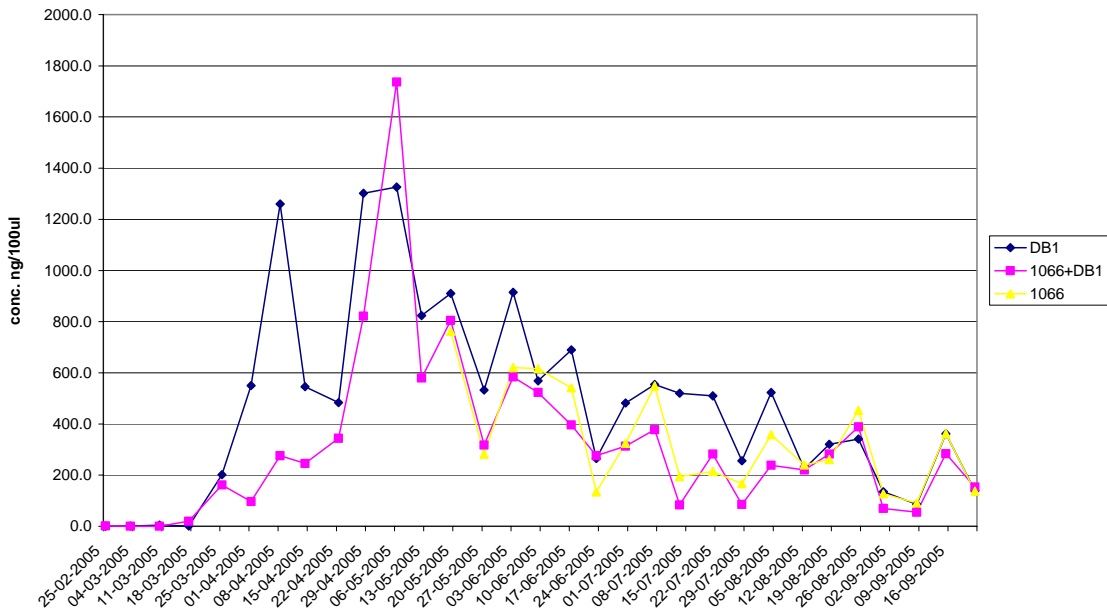
Figuur 12 Virusconcentratie in bovenste blad, planten geïnfecteerd door virus op blad in de kop te inoculeren.

virusconcentratie in bovenste blad, inoculatie door langs lopen



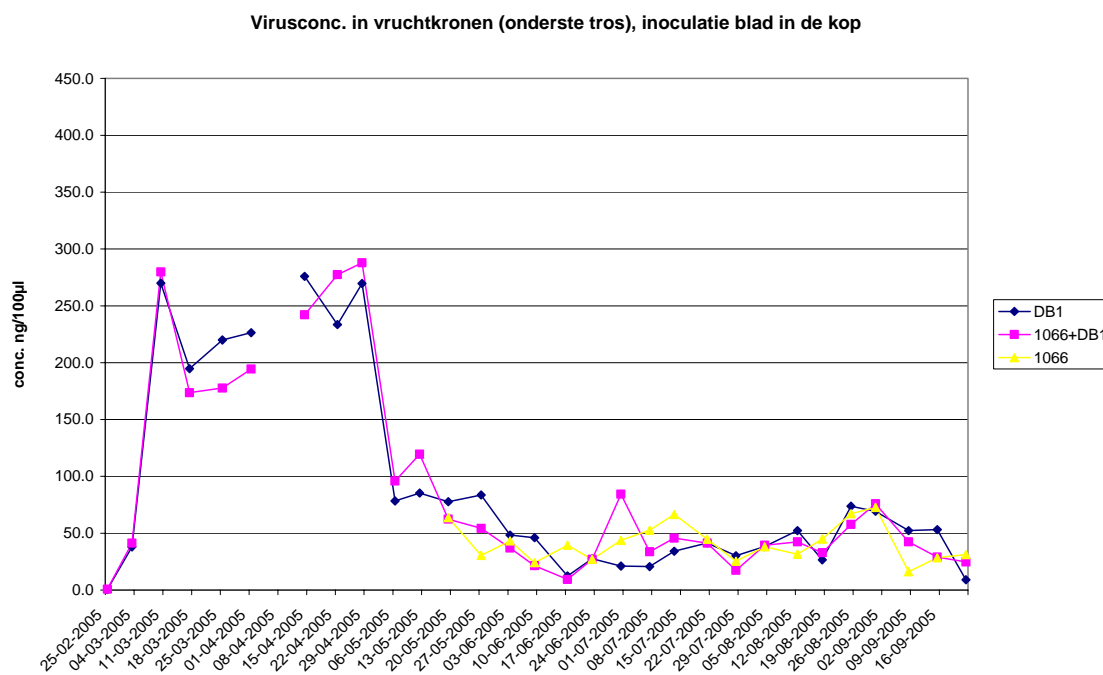
Figuur 13 Virusconcentratie in bovenste blad, planten geïnoculeerd door langs te lopen met besmet blad.

virusconcentratie in bovenste blad, inoculatie door gewaswerkzaamheden

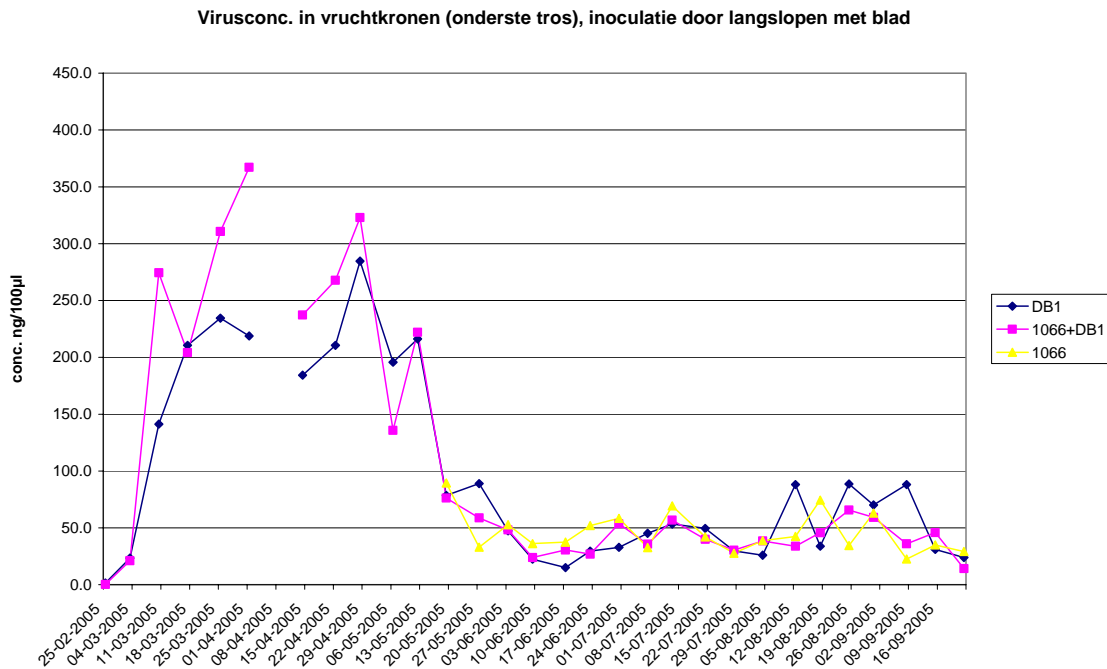


Figuur 14 Virusconcentratie in bovenste blad, planten geïnoculeerd door doorlopen via gewaswerkzaamheden.

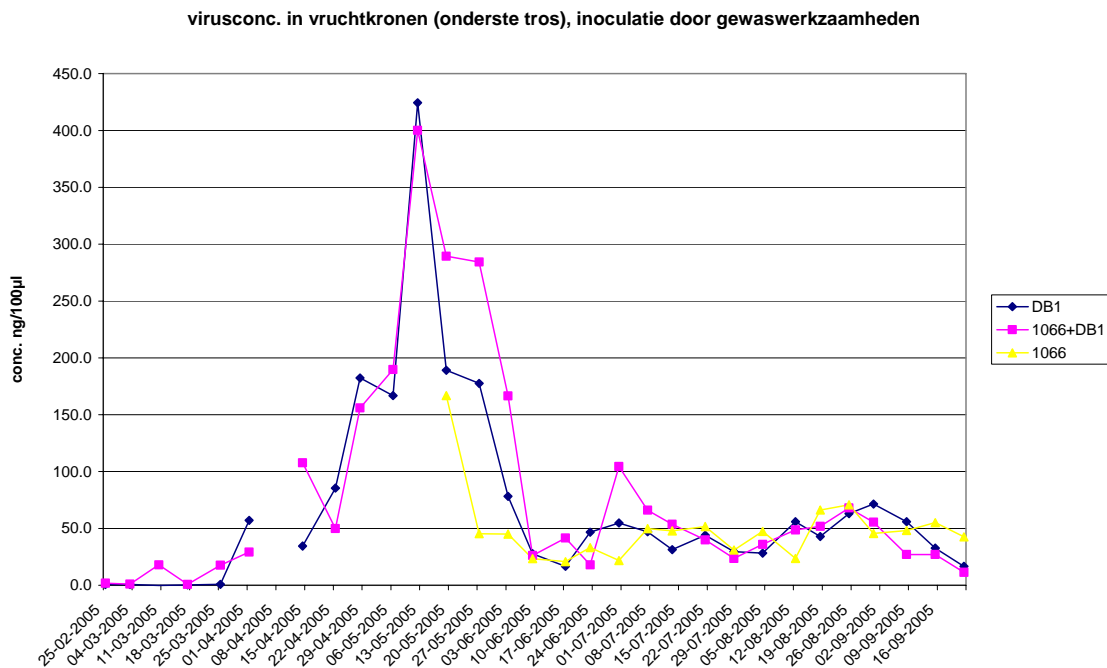
Bij de vruchtkroontjes is er bij alle manieren van infecteren een piek waar te nemen na de inoculatie van de planten en vervolgens neemt de concentratie af en blijft op een nagenoeg gelijk niveau liggen. Wel valt op dat de piek van de planten die geïnfecteerd zijn door het doorlopen met gewaswerkzaamheden later ligt dan bij de andere manieren van infecteren (zie figuren 15 tot en met 17). Net als in het blad is de virusconcentratie van de combinatie niet of nauwelijks afwijkend van de concentratie van de beide isolaten afzonderlijk.



Figuur 15 Virusconcentratie in vruchtkronen, planten geïnfecteerd door virus op blad in de kop te inoculeren.



Figuur 16 Virusconcentratie in vruchtkronen, planten geïnoculeerd door langs te lopen met besmet blad.



Figuur 17 Virusconcentratie in vruchtkronen, planten geïnoculeerd door doorlopen via gewaswerkzaamheden.

### Oogst

In tabel 1 is de opbrengst aangegeven van het aantal vruchten en gewicht van drie trossen per planten en per rij. In rij A,B en C zijn de planten geïnfecteerd met DB1, van rij D,E en F zijn de planten geïnfecteerd met 1066 (en later met DB1) en dat geldt ook voor rij G,H en I. Opvallend is hierbij de opbrengst van rij B die lager licht in totaal gewicht maar niet het laagste aantal vruchten heeft. De totale opbrengst is van de rijen A,B en C de laagste.

Tabel 1 Totale opbrengst per rij van drie trossen per plant.

rij	totaal #vr	totaal #wk	totaal gewicht (g)
A	258	67	28100
B	251	70	22800
C	276	107	31000
D	274	63	30800
E	248	74	25900
F	261	79	31800
G	271	71	31700
H	265	81	29200
I	270	79	32900

### 4.2.4 Conclusies

De manieren van infecteren hebben uiteindelijk geen invloed op de symptomen alleen kan er een vertraging van het ontwikkelen van symptomen ontstaan. In planten die eerst met 1066 zijn geïnfecteerd en later met het necrotische isolaat DB 1 geven minder symptomen dan de planten die alleen waren geïnfecteerd met DB1.

In deze proeven heeft een herbesmetting geen invloed op de virusconcentratie.

Voor wat de oogst betreft kan worden geconcludeerd dat planten die alleen met het necrotische isolaat zijn geïnfecteerd (rij A,B en C) het laagste totale gewicht hebben maar dit niet wordt veroorzaakt door veel minder vruchten. Wel zijn er meer wankleurige vruchten geteld. De planten eerst infecteren met een zwak isolaat (1066) en vervolgens met een necrotisch isolaat (rij D, E en F) heeft voor de oogst geen negatief effect ten opzicht van planten die alleen met een zwak isolaat (rij G, H en I) zijn geïnfecteerd.



## 5 Conclusies

Uit de vele proeven die uitgevoerd zijn binnen het project 'Op zoek naar de variabiliteit van pepinomozaïekvirus in tomaat' kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- De algemene conclusie van dit project is dat de variatie in virus en symptomen enorm is toegenomen sinds de start van dit project.
- Dat er verschillende varianten van PepMV, alleen of in mengsels, in de teelten voorkomen.
- Dar er geen enkele relatie gevonden is tussen het voorkomen van bepaalde varianten van het virus en de symptomen die in dat gewas gezien worden.
- Dat er inmiddels ook een nieuwe sterk afwijkende stam van het virus in Nederland voorkomt.
- Dat er steeds nieuwe introducties van het virus in de verschillende teelten plaatsvindt.
- Dat zich dat uit in steeds wisselende mengsels van virussen.
- Dat de effecten van deze nieuwe introducties en de daaruit ontstane mengsels op de symptomen in de teelt niet bekend zijn.
- Dat verwacht mag worden dat bij het doorgaan van deze ongecontroleerde introducties de problemen met het virus alleen nog maar zullen toenemen.
- Dat het virus, afhankelijk van het tijdstip tijdens het teeltseizoen, zich extreem snel of juist langzaam door de plant kan verspreiden.
- Het virus zich snel naar snelgroeiende delen van de plant beweegt en daar zeer hoge concentraties kan bereiken.
- Dat het virus ook in hoge concentraties in kroonblaadjes voorkomt.
- Dat de concentratie van het virus in de plant tijdens het teeltseizoen opvallende schommelingen vertoont.
- Dat er geen duidelijk verband is tussen deze schommelingen en het optreden of de heftigheid van symptomen in planten en vruchten.
- Dat uit de kasproef van 2005 aanwijzingen zijn gekomen dat planten die eerst met 1066 en vervolgens met het necrotisch isolaat DB1 zijn geïnfecteerd minder heftige symptomen geven dan planten die alleen met DB1 zijn geïnfecteerd.

### Aanbevelingen

Wat kan de praktijk ermee?

- Duidelijk is in dit project geworden dat ongecontroleerd inbrengen van virus grote kans geeft op problemen.
  - Aandacht voor allerlei hygiëne maatregelen is uiterst belangrijk en zal dat ook blijven ongeacht of er een (tijdelijke) oplossing in de vorm van het vroeg besmetten met een zwakke stam komt. Eén van de voorwaarden voor het op langere termijn slagen van een "zwakke stam strategie" is dat "sterke stammen" uitgebannen worden. De aanwezigheid en daarmee samengaande besmetting met andere stammen of varianten van PepMV, ook in planten die al met een andere stam geïnfecteerd zijn, leidt tot menginfecties. De effecten van deze menginfecties zijn onvoorspelbaar en leiden bovendien op den duur tot nieuwe recombinante stammen van pepMV met weer onvoorspelbare eigenschappen. Dit voorkomen zal alleen mogelijk zijn als iedereen zich houdt aan een aantal strikte uitgangspunten. Door toepassing van dezelfde zwakke stam door alle telers die besluiten opzettelijk te besmetten, wordt per teelt in ieder geval gestart met een en hetzelfde virus. Willekeurige en mogelijk schadelijke genetische mutaties worden hiermee zo veel mogelijk beperkt.
- Cruciaal in deze strategie is echter wel dat:**
1. elk jaar iedere teler die besluit vroeg te besmetten dit alleen doet met getest en goedgekeurd zwakke isolaat
  2. niemand nog onbekend en niet gekarakteriseerd materiaal hiervoor gebruikt
  3. strikte hygiëne tijdens de teelt geldt en infecties met onbekende isolaten of andere

- virussen voorkomen worden**
- 4. alle gewassen en alle mogelijke bronnen van PepMV aan het eind van de teelt totaal vernietigd worden.**

### **Vervolgonderzoek**

PT project

De resultaten van het afgelopen project hebben als basis gediend voor een vervolgproject. Dit ook door Productschap Tuinbouw gefinancierd project "Beschermende maatregelen tegen PepMV in de tomatenteelt" (projectnummer 12384) omvat een viertal onderdelen:

- A. selectie en karakterisering (symptomen en verspreiding) van verschillende zwakke isolaten
- B. in kasproeven vaststellen van de mate van bescherming van twee zwakke isolaten (V1 en 1066) tegen twee isolaten (V3 en DB1)
- C. monitoring van PepMV besmetting en symptomen in de praktijk
- D. laboratoriumonderzoek om een bio-assay te ontwikkelen waarmee snel en eenvoudig de agressiviteit van het virus vastgesteld kan worden.

EU project

Eind 2006 is door de EU in de laatste ronde van Kaderprogramma 6 een oproep geplaatst voor een projectvoorstel mbt pepinomozaïekvirus. Het gevraagde projectvoorstel moest de wetenschappelijke gegevens leveren op basis waarvan een definitieve analyse van de gevarenstatus van dit virus ('Pest Risk Analysis' ofwel PRA) opgesteld kan worden.

De algemene doelstelling van het project luidt: het leveren van kennis over de epidemiologie en economische invloed van pepinomozaïekvirus in de EU op basis waarvan een grondige Pest Risk Analysis uitgevoerd kan worden. Deze PRA zal de basis vormen voor de beslissing om te bepalen of en in hoeverre de bestaande regelgeving en fytosanitaire status van dit virus aangepast dient te worden. Om die grondige PRA mogelijk te maken zal in dit project:

- Vastgesteld worden wat de werkelijke economische impact van PepMV op commerciële tomatenteelten onder uiteenlopende klimatologische en teeltomstandigheden. Hiertoe zullen gedurende twee opeenvolgende teeltseizoenen op vier verschillende plaatsen in Europa (Nederland, Engeland, Spanje en Hongarije) praktijkproeven worden aangelegd met een identieke cultivar welke geïnfecteerd zal worden met een gelijk en goed gekarakteriseerd tomatenisolaat van PepMV. De exacte mate van schade in de teelt en opbrengst zal op gestandaardiseerde manier bepaald worden.
- Onderzocht worden wat de gevaren zijn van verschillende nieuwe varianten en stammen van het virus.
- Nieuwe wetenschappelijke data verzameld en gecombineerd worden met bestaande data om meer inzicht te krijgen in het voorkomen en de verspreiding van het virus en zijn verschillende stammen binnen Europa en om te bepalen wat het werkelijke risico is op verspreiding van het virus via zaad.
- Getracht worden om een model te ontwikkelen waarmee vastgesteld kan worden wat de gevolgen zijn van het definitief en breed vestigen van het virus in de Europese tomatenindustrie.
- Europees gestandaardiseerde en geharmoniseerde detectie protocollen worden ontwikkeld voor gebruik door nationale Plantenziektenkundige diensten, keuringsdiensten en de sectoren.





# Bijlage 1

## Enquête pepinomozaïekvirus (2003)

1. Teelt u losse of trostomaten:.....
2. Welk ras heeft u:.....
3. Wanneer heeft u gezaaid:.....
4. Wanneer heeft u geplant ( in de kas en op het plantgat):.....
  
5.
  - a. Is het gewas geïnfecteerd met pepinomozaïekvirus?
  - b. Zo ja, wanneer zijn de eerste symptomen waargenomen:.....
  - c. Waren dit zwakke of sterke symptomen?.....
  
6.
  - a. Is deze aantasting een gevolg van het virus bewust in het gewas brengen?
  - b. Zo ja, wanneer is dit gedaan:.....
  - c. Of is na het zien van de eerste symptomen van het virus op een paar planten de rest van de planten ook (bewust) geïnfecteerd?
  - d. Zo ja, hoe is deze infectie uitgevoerd, is dit gedaan door (aub. doorhalen wat niet van toepassing is)
    - met blad door het gewas lopen
    - door planten flink te beschadigen
    - door de planten aan het begin van de rij te infecteren (eventueel in het midden)
    - anders en wel.....
  
7.
  - a. Na hoeveel dagen na het eventueel bewust besmetten zag u de eerste symptomen:.....
  - b. Waren dit:
    1. zwakke symptomen zoals bijv. een paar gele vlekjes.....
    2. matige symptomen zoals bijv. veel gele vlekjes, bobbels op het blad.....
    3. sterke symptomen zoals bijv. bruine vlekjes op het blad, misvorming van het blad.....
  - c. Waar zag u de symptomen?
    - waren dit meerdere planten per rij.....
    - pleksgewijs.....
    - meerdere plaatsen tegelijk.....
    - of anders.....
  
8.
  - a. Zijn er later (na de eerste symptomen) nogmaals symptomen opgetreden:.....
  - b. Zo ja, waar bestonden die symptomen uit:.....
  - c. Waren deze symptomen: zwak, matig of sterk.....
  
9.
  - a. Zijn er vruchtsymptomen waargenomen?
  - b. Zo ja, wanneer:.....
  - c. Hoe zagen ze eruit:.....
  - d. Hoelang zijn er vruchtsymptomen geweest:.....
  
10.
  - a. Worden gewashandelingen zoals dieven en draaien, trossnoei en laten zakken in één ronde gedaan of apart:.....
  - b. Worden deze gewashandelingen uitgevoerd door vast personeel of door een

- aanneemploeg.....
- d. Parttimers (bv. scholieren):.....
11. Hoeveel maal per week wordt er door het gewas gegaan:.....
12. Wordt blad gebroken of gesneden:.....
13. Bent u bereid om wat bladmateriaal voor onderzoek af te staan indien u dit wordt gevraagd:.....
14. Opmerkingen:.....  
.....

Wij danken u hartelijk voor uw medewerking

## Bijlage 2

Overzicht ontvangen praktijkmonsters en de monstercode

<b>Datum binnenkomst</b>		<b>Monstercode</b>
02-08-04		0208-1
03-08-04		0308-2
03-08-04		0308-3
04-08-04		Bedrijf 1 04-08
		Bedrijf 2 04-08
		Bedrijf 3 04-08
		Bedrijf 4 04-08
		Bedrijf 5 04-08
06-08-04		0608-4
11-08-04		1108-5
12-08-04		1208-6
18-08-04	Excursiegroep 1	4-XA05
		8-XA01
		7-XA01
		17-XA05
		20-XA05
18-08-04	Excursiegroep 2	15-XA09
		11-XA09
		21-XA05
		23-XA05
18-08-04	Excursiegroep 3	5-XA12
		12-XA05
		18-XA06
18-08-04	Excursiegroep 4	3-XA08
		9-XA08
		2-XA10 (vruchtmonster)
18-08-04	Excursiegroep 5	14-XA05
		26-XA11
18-08-04	Excursiegroep 6	10-XA05
		13-XA07
		19-XA01
		24-XA02
		27-XA03
18-08-04	Excursiegroep 7	1-XA05
		6-XA02
		22-XA05
		25-XA02
18-08-04	Moedervirus	XA-02
		XA-03
		XA-04
		XA-05
		XA-06
		XA-07
		XA-08
		XA-09
		XA-10
		XA-11
190804		09-1 1908
		09-2 1908
		09-3 1908
		09-4 1908
		09-5 1908
24-08-04		24-08-1
25-08-05		25-08-1
		25-08-2
		25-08-3
		25-08-4

# Bijlage 3 Volledige nucleotidenvolgorde van het genoom van de tomatenstam van pepino mozaïek virus

GAAAACAAAACAAAATAAACAAATATACAAAGTTAAACTAACACAACATAACCACGTTGGAAAAACAGCGAAAGCACTTTAC  
CACATTATGTCTCGTGTCCAGAAATACCTTTGGAAAAAGATCAGAGACCCACAAGTACAGTCCAGCATTTGTGAAGCTGCCTA  
TCAACATGTTTCGACCTGTACTTAAAGAATCTCTAATCAATTTGCTTACGCGCTTAATGATTATGAAGCAGACACCCCTTG  
AGAATCTTGGTGTACAATTAACCCCATGCAATCCAAACACACACATGCGCAGCCAAAGTAGTCGAAAATCGTATG  
CTTGAAATTTGTTGGACATCACTTGCCTAAAGATGAAAAAGTAACTTTCATCTTCTCAAACGTAGCAAGCTGCGTTACAT  
GAGAAGAGCTGCTGTGCATAAAGATGTCTTTGTCAATCATAACATTTGAACCCAAAAGACTTCTTTCAGGTATGATGAAGAGT  
CTACATCAACCAGCTTTTCCGTTGATACGAGAATCGCATACATTTTTCAGATTCTCTACACTTTTATGGAACTGCTGATGTG  
ACTCACTTGTGTTGACCGTTGCCAAAACCTTAAAAATTTGATGGCAACTGTTGTAATCTTCTGTTGAAAGCTATACACAGACA  
GACATCTCTATTCCCTGCATTTTACTCCATTAACATCAATGAAGAGGCTTTGAGTATATCCAGGATCACACGGTGTGTG  
GGGCATATTTCCACAAATATGAAACCTAGAAATGGCTCAAACTCTAGATTCTTTGACAAAGATCCATTGACTGGTTTA  
AAATACACATTACGATTCAAATGGTGGAGAGTCTTGGTGCCAAACCACTTTTCTCTTCCAAAAGAGGAAAACCTTTGAGAC  
GCCGCTATACAGGACGTTTCAAAGAAATAGTTTGTGACATTTCCAAAATATATTTCCATCCCGACACGCTCAATGCCACAA  
AACCTATGCCTAGATCAAGGGCCATACAGCTGACTTATATGTGAAATCAGTAAATAAAGTTACGCAAAGAGATATATTT  
GCCAAGTTAGACAACATGATTTCCCTGCTGAGCTAGAATTTGATGACCCCTGATGAACTCACGCAATGTGTAATTTAT  
CACATATGTGTCACAACTGTCTATCAATGATTATGACAACATGCTCAAATCCAGTTTCTTCAAAAACTGGTTGCAC  
CCATGCAACACGACTGGAGGTGCATGATTGAAATTTCTTCCGGGGAAAGAGTGAATTTCAATCAACTGCTCACAGCTCTTCAA  
TGGAAAGATTTTCTTACTATTAAGACTGAAGAGCTTGTAAATTTACTACACACACTGCTATAGGCAAGCAATAGCA  
TGCAGCTGCCACATATAAAGAAAGAATGCAGCTGACTCAATGGTCAAAGAAAGGTACAATATCTTAGCAGATTTTGAAC  
AGAGAGAACTGAAATAACTTACACTGAGTTTGGCCCTGAAACTAGGCCCAAGTGGACTGCGTTACTAATTATAAATAAT  
GCAGTTAAAAATTTAGGTCTTCTGCACTTGTGTAACAGCCCAATGTTTCACTTCTAACAGTCAATACCCCTGCAATGA  
AATATCCCTTAGCAATGACTGATGACGACAATGCTGCGGCCATTTATGAAATGAATCTCTATTGCTGAAACCGATAATAG  
CTCCTCAACTCCAGCATTTGCCACACAAGACATGGGCCAGTTATGCTTTCAGACTTCCATGAAAGAACCGTGTAGATT  
GAGAACATAATTTGCTGAGCTTGAATTTCCAGGAAAGGAAATAATGTGCAAGAACTACTCATGATTACCATGCTGTGTTT  
TGATACCTGCTCAAACTCTGGAGGTCTCCCATGGAAAGCATGGATTTCCACTTCTGAATGCACACCGCTTTAAGGGAGACC  
AACTTCAATACAGTCTGATGGCAAAGTGAATTCAGCCAAATTCAGGACATCAATAACAAAAACCAAGATCTGAGTACCCA  
TCCAGTATCTTCCGAGATCTTGTAACTACACTGCGAAACATTAAGAGAGCAGTGTATGCCATTTCTATTAGCCATCGAAG  
GGCAAGTGTCTACAGCTGATATCAAAAACAATAGGACCGGCAAAATTTACTCTGTTCCCAATCAAAGAAATGGAAGGAAA  
GTTTTGCTTTCAAATGCAACATGAAGACATCGTTAAATCTGGAGTAGTCAATTCATGGCTGTGGCGCTCTGGAAAAATCA  
CAAGCATTACAAAACCTTTCTCAGAACTCTTGGCGACTCTAATGACTGCTGCACAGTGGTTGTGCCAACTGTTGAACCTCAG  
AAATGATTGGGTGAACAAATTTGTGTAAGCTACCCATGGAAACATTAATAAATTTGAAAAAGCAATGATTCAACAGGAT  
TCCAGTGTATCTTTGATGACTACATAAATGGCCACTTGGTTACATTTGAACTGAACTTATTTGTTCCCACTGCAAGTCA  
GAACTTTTCACTTACTGGAGACTCGCGCAAAGTGTATATCATGAGTCCAACAATGAAGCATACTTGCCTCATTAGA  
TGAAGCCGCTCGCTTATTATGCTAACTACTGTGGATTTTACTTAATGCTACACACAGAAATGTTTCGCAAGTTTGGCCAAAT  
AGCTAGTGTTTTACAGTGAAGAAAGAGGTCACCTCAAATTTACCTTTGCTTCAAATGCTCTACAAAAGTCAAGGAGTCCA  
ATTTTGGTGCCTCTCAAATGAAGAAGAGTGTATGCAAGACATAGGGCACAAATCCATGACCTACGCTGGGTGTCAAGG  
GCTTACTGCACAGAGAGTCCAAATTTGCTTGAACACACACACACTGCTCAGACAGGGTGTGTACACTTGTCTCT  
CCAGAGCTGTGGATTTCCATCCACTTTATCAATACAGGCCAAACAAATTTCTGAATTTTGGGCAAGCTTGAGGCAACACCA  
TACCTCAAAGCATTTTATGATACTTACAGAGATGAGAAAACAGAAATGCTCAATTTCAAGCCTGCTGATGACAGTCCCGC  
TGAGCCTGAAGCTCCATTGACTCATTTCAGTGTCAAACGGCAATAACTTGGAAAAGTTAGCTTTCAGCGCTTCTGAAA  
AATTTGCAAGAGAGTTATATGATAAACACCATGGATACTCTAATAACAATCCAACTGAAAATCCAGTGGTGCACAAATTT  
CAGCATCAACAAGCCAAAGATGAAACACTTTTCTGGGCAACATAAGAACTAGACTTTCTATTACAACCTCCGGAAGCCAA  
CTTACGAGAATTTGTGCTAAAGAAAGATGTTGGAGATATCTTGTTTTTCAATTAACCAATGTGATGTGCTTACCTGCCG  
ACCCAGTGGATTTTCGAGCCAAAGACATGGGAAATATGTGCTGCTGAAGTTAAAAATACATACTTAGCCAAACCAATGGCT  
AACTTGATCAATGCTGCTAGCAGACAATCTCTGATTTTCGACGCTAACAAAAATTTCCCTGTTCTTAAAATCTCAATGGGT  
CAAGAAAGTGGAAAAATTTAGGTGCTGTCAAGTCAAAGCCTGGCCAGACATTTGCAGCTTTTGTGCAACAAACAGTATGT  
TGTATGGGACCATGGCCAGATACCTCAGAAAGATGAGACAAAGATTTCAACCAAAAACATATTTTTCATCAATTTGTGAAACA  
ACAACCTGATAATCTGAACCAATTTGTTAAACAAGGTTGGAATTTTAAACAGAACAGCTCAGACAAATGATTTTACAGCTTT  
TGACCAATCAACAAGATGGTGAATGCTTCAATTTGAAGTCAATGAAGGCAAAAATTTCTTCAATATCCCTGCGGACATCTTG  
AAGGATACATCAACATCAAATTTGAACGCCAAAATTTTCTTGGCACATTTGCTCATTATGAGGTTGTCTGGTGAAGGTCCA  
ACTTTTGTATGCCAACACAGAATGTTCAATAGCATATACTGCTACAAGATACCATTTGATTTCTACAGTCAAGCAGGTTTA  
TGCTGGAGATGATATGGCAATGATGAGGTTGTTCCAAAGAAACCCCTTTTAAAAAACTACAGAAACAGCTTAAACTCA  
CCTCAAAGACACTATTTCCAAAACAGGTTAAAGGTGATTATGCTGAATTTCTGTGGTTGGACTTTTCACTCTGGTGGTATC  
ATTAAAAACCCCTTTGAAAATGCATGCTTCCATTTATGTTGCAAGAGGCAATCGGCAATTTACACACTGCTGCCAGATCATA  
CGCCATGACATGAAGCATTCAACAAAATGGGTGATGAGCTGCACAATTACTTAAACACAGATGAAGCTGAACAACACT  
TCTTTGCTGTTCCGAAGTTGCACAAGTTACACCAAGGAAAGCAATGAGACTTGGTGAAGAAAGACCCCTCAAAGGCAACA  
CATTGAGGGGTTAAGTTTTCCCGAGTTGCAAAATGGAAAGATCAACTGATTAATTTACTTCAATTCACCACCTTCGAGC  
CAAACTCAGTGTGAAGGAATCATAGTTGTGCACGGAATGCAGGCACTGGGAAAACCACTTTTACTTAGGACTTTATTT  
TCTGCTTACCCTAGCTTAGTTATAGGTTTACCTAGGCTTGTCTATTAGATAAACAAAACAAAATTTCACAAGTTTGTCTT  
ATCTTGTCTTTCCCAATACCCATTTGTGATATTTGTCGATGAGTATCAATTTGCTAGAAAGTTTTCAGAACCAAAAATTTGGCTA  
TCTTTGGTGAACCCCTGTCAATGCACATACATTGAGAGACTTAGAGTCCACATTAACATTTCTTCAAGACTCATAGATTT  
GGAAAGTCAACTGCTGAGATTTTGAACAACTGTTTGACCTTAATAATAGTCTCAGTTAAGAAAGAAGACGATCGTTTGA  
ATTTCTTTAAACCCCTTTTGAAGTTGACCCACTGAGCATACTCTGCTCTGAAGAAAGAGTCTTGGACTTTGTTTCTGACC  
AAGTGTGACCACTAGCTCAGAGGAACTAGCAGGACTTGTGTTGCAAGAAACAACTTTTACTGCAACATTTGGCCGCA  
GCTGTTGCTGAAAATCCTGCTAAGACTTTTCACTCTCTGACTAGACACACCCCAAACTCACCATTGGGGAACTAAATGC  
CAGGCTAACTCCTAGAGCTGACCTCACTGACACATACAAAATCATTTGCCATTGCTTTCTTGTGTGACGTTGCATTTAC

TTCCAAAATAGCCACTACCAACCTGTTGCTGGAGACAACTTGCACCGTTTGCCTTTTGGTGGCCAATATCAAGACGGCAC  
CAAAAAGATATCTTATTTTCCACAACAGCAGTCATACTTTCATTCTGGAAAACAAATTAATGTCTCATACTTATCTTCA  
TTCTCACATTGGGTATTGTCCTCACCAATAAATTTAGTTTTAGCTTTAGTCGTACTACTCACCAGCATTCTTGCTATAAC  
ACACATTCAGCAACCAACAATACACAACCAATTGTCAGGTCATCATGACGGTGCTGCAATAGTCATAACAAATTTGTGAGA  
ACACACCAGAAGTGCTTAAAGCAATCAACTTCTCCCCTTGGAACGGGTTAAGTTTTCTAAATTTGAAAATTAATATTGA  
GTGTTTCAAAAAATCAACTTCAATAAACAATCATGCCTGACACAACACCTGTTGCTGCCACTTCAAGTGCACCACCACA  
GCCAAAGATGCTGGTGCCAAAGCTCCTTCTGACTTCTCAAATCCCAATACAGCTCCTAGTCTCAGTGATTTGAAGAAAGT  
CAAGTATGTCTCCACCGTGACCTCCGTGGCCACACCAGCTGAAATTGAAGCCCTAGGCCAAAATCTTCACCGCTATGGGCC  
TTGCCGCAATGAGACTGGTCCGGCCATGTGGGATCTAGCTCGTGATATGCTGATGTGCAGAGTTCTAAATCGGCACAG  
CTGATTGGAGCTACCCCTTCCAACCTGCACATATCACGCCGAGCCCTTGCTGCTCAGTTTGATCGAATCAATATAACCC  
CAGGCAATTTTGCATGTACTTTTGCCAAAGTTGTTGGAACATACTTCTCGACAGCAACATTCCACCAGCAATTTGGGCCA  
AACTTGGTTACCAAGAAGATACAAAATTTGCTGCATTTGACTTCTTCGATGGAGTCACCAACCCTGCCAGCCTGCAGCCT  
GCTGATGGTCTTATCAGGCAGCCAAATGAGAAAGAACTAGCTGCTCACTCCGTAGCTAAGTACGGCGCCTTGGCTAGGCA  
AAAGATCTCCACAGGTAATTATATTACCACACTTGGAGAAGTCACACGTGGACACATGGGAGGAGCTAACACCATGTACG  
CGATAGACGCACCCCTGAACTTTAAACACTCGAACTTAATCAGAGTGGGGTTTTCTACAGTTTATTTTCTAATTATT  
TCTTTGAAATAAAAAAAAAA

## Bijlage 4

### Algemene vragenlijst onderzoek variabiliteit PepMV

1. Welk ras heeft u:.....
2. Wanneer heeft u gezaaid:.....
3. Wanneer heeft u geplant ( in de kas en op het plantgat):.....
4. Zijn de planten geënt?.....

5

- a. is het gewas geïnfecteerd met pepinomozaïekvirus?
  - b. Zo ja, wanneer zijn de eerste symptomen waargenomen:.....
  - c. Waren dit zwakke of sterke symptomen?.....

6.

- a. Is deze aantasting een gevolg van het virus bewust in het gewas brengen?
- b. Zo ja, wanneer is dit gedaan:.....
- c. Of is na het zien van de eerste symptomen van het virus op een paar planten de rest van de planten ook (bewust) geïnfecteerd?
- d. Zo ja, hoe is deze infectie uitgevoerd, is dit gedaan door (aub. doorhalen wat niet van toepassing is)
  - met blad door het gewas lopen
  - door planten flink te beschadigen
  - door de planten aan het begin van de rij te infecteren (eventueel in het midden)
  - anders en wel.....

7.

- a. Na hoeveel dagen na het eventueel bewust besmetten zag u de eerste symptomen:.....
- b. Waren dit:
  1. zwakke symptomen zoals bijv. een paar gele vlekjes.....
  2. matige symptomen zoals bijv. veel gele vlekjes, bobbels op het blad.....
  3. sterke symptomen zoals bijv. bruine vlekjes op het blad, misvorming van het blad.....
- d. Waar zag u de symptomen?
  - waren dit meerdere planten per rij.....
  - pleksgewijs.....
  - meerdere plaatsen tegelijk.....
  - of anders.....

8.

- e. Zijn er later (na de eerste symptomen) nogmaals symptomen opgetreden:.....
- f. Zo ja, waar bestonden die symptomen uit:.....
- g. Waren deze symptomen: zwak, matig of sterk.....

Opmerkingen:.....  
.....

# Bijlage 5

## Waarneming symptomen PepMV

Bedrijf  
Datum  
Weeknr

score    1    weinig  
          2    veel  
          3    zeer  
          3    hevig

### Bladsymptomen

Kop	bobbeling	
	brandnetelblad	
	necrose	
	grauw	
	verkleuring	
	<i>anders</i>	

Gehele plant	gele vlekken	
	bladmisvorming	
	stengelnecrose	
	blادنecrose	
	slap	
	<i>anders</i>	

### Vruchtsymptomen

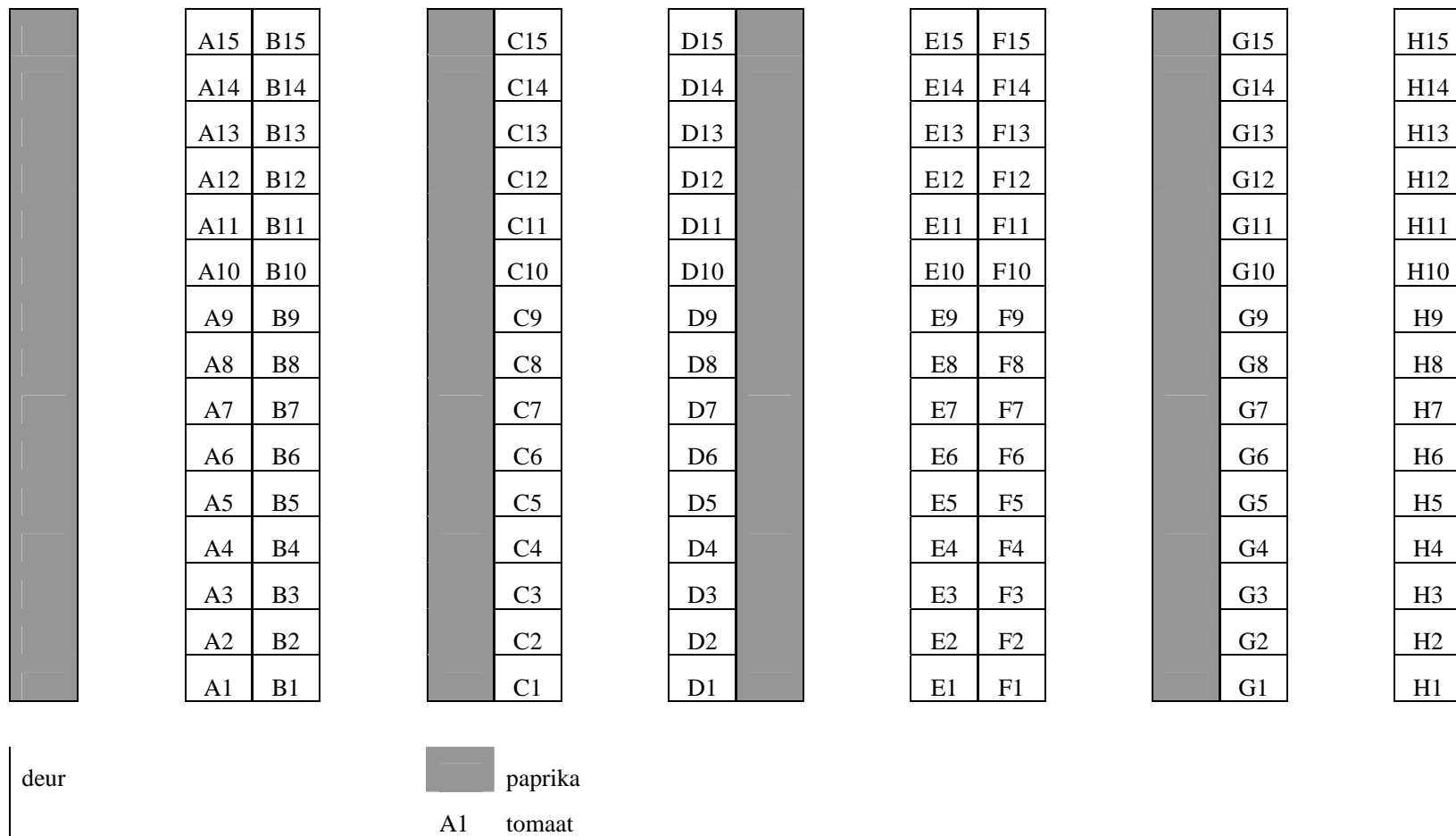
Vruchten	marmer	
	meer glans dan normaal	
	% wankleur	
	<i>anders</i>	

Kronen	grauw	
	verkleuring	
	<i>stand</i>	
	necrose	
	<i>anders</i>	

### Opmerkingen



# Bijlage 6 kasplattegrond 403-1

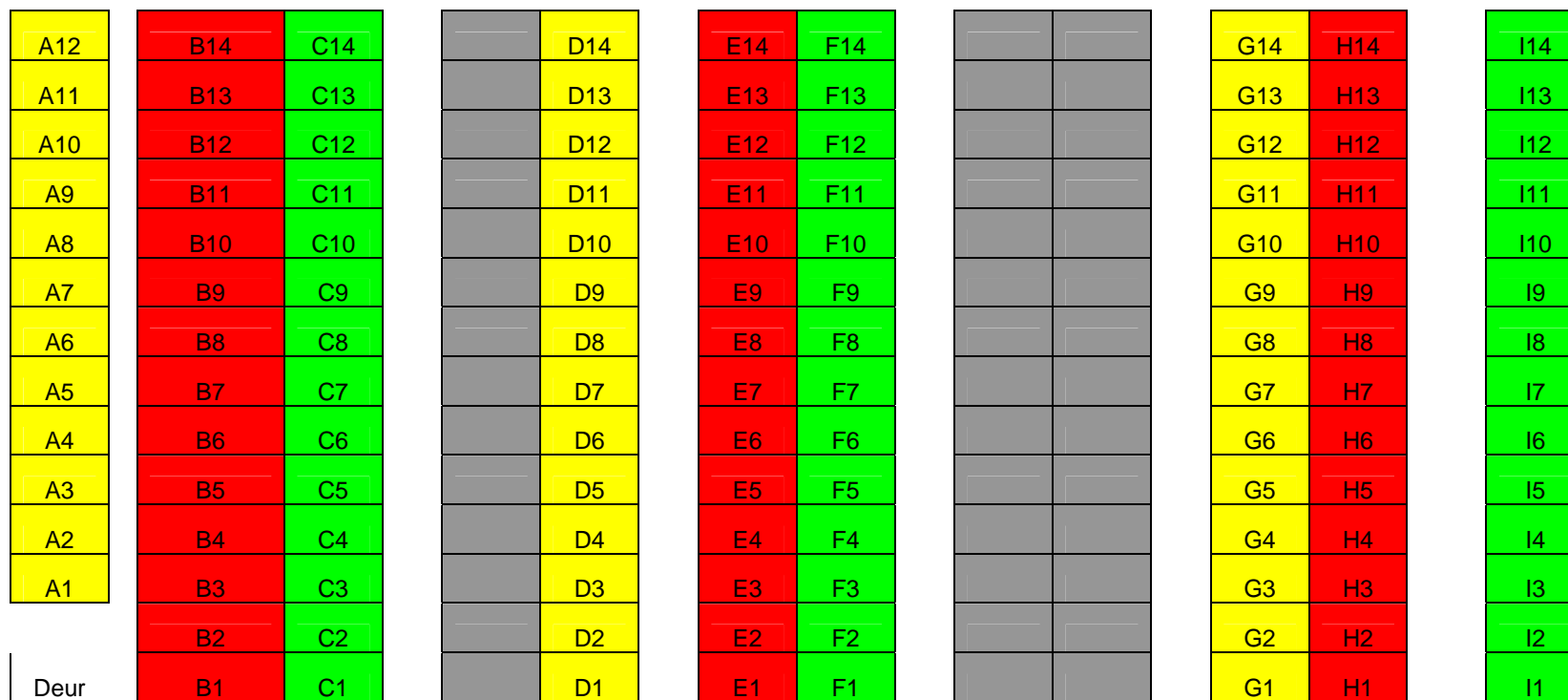


# Bijlage 7 kasplattegrond 403-7

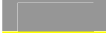



Ras Clothilde  
isolaat necrose

1066 + necrose (late infectie)

1066



ingang voor 1066

-  paprika
-  inoculatie in de kop van de plant
-  inoculatie door langslopen met besmet blad
-  inoculatie van plant 1 t/m 3 door inwrijven met besmet materiaal (onderin de plant)



