

Molecular and biological characterization of aphid viruses and the analysis of their potential as bio-insecticides

M. van Munster

Op 15 november 2002 promoveerde Manuela van Munster aan de universiteit van Montpellier op een onderzoek getiteld: 'Caractérisation biologique et moléculaire de virus infectant les pucerons et évaluation de leur potentiel comme biopesticides'. Engelse vertaling: '**Molecular and biological characterization of aphid viruses and the analysis of their potential as bio-insecticides**'.

Dit onderzoek is uitgevoerd bij Plant Research International B.V. in Wageningen. Promotor was dr. A. Clériveret (Unité de Phytopathologie, IRD, Montpellier Frankrijk), co-promotor was dr. J.F.J.M. van den Heuvel (De Ruiter Seeds, Bergschenhoek, Nederland).

Korte inhoud van het proefschrift

Bladluizen veroorzaken grote schade aan vele soorten gewassen. Door hun manier van voeden (aanprikken van bladeren) veroorzaken ze directe zuigschade, maar belangrijker nog, ze brengen tevens verschillende plantenvirussen over. Deze plantenvirussen veroorzaken op hun beurt weer ernstige schade aan de plant en het gewas en daarmee zijn bladluizen ook indirect verantwoordelijk

voor gewasschade. Bestrijding van bladluizen is van groot belang en vindt nog hoofdzakelijk plaats met behulp van chemische bestrijdingsmiddelen. Het gebruik van dergelijke chemische insecticiden heeft echter geleid tot insecticide-resistente bladluispopulaties en dit maakt het bestrijden van deze insecten steeds moeilijker zonet onmogelijk. Er zijn dan ook nieuwe methoden nodig. Ook omdat de gangbare bestrijdingsmiddelen voor bladluizen leiden tot verontreiniging van het milieu en daardoor op korte termijn verboden zullen worden, is het voor de handliggend om op zoek te gaan naar alternatieve, biologische bestrijdingsmethoden. In dit proefschrift is dan ook een studie verricht naar de mogelijkheid om bladluizen te bestrijden m.b.v. één van hun natuurlijke vijanden, insectenvirussen.

Bladluisvirussen als biopesticide

In 1965 is er al beschreven, dat er virussen voorkomen in bladluizen. Sindsdien zijn er diverse kleine, ronde virussen geobserveerd in deze insecten. Pas veel later, in 1981 is het eerste bladluisvirus gezuiverd en gekarakteriseerd en in 1997 is er voor het eerst het erfelijk

materiaal van een bladluisvirus opgehelderd. Ondanks het feit dat bladluisvirussen bestudeerd werden in het verleden en gebleken natuurlijke vijanden te zijn van bladluizen, is er nog nooit een biopesticide ontwikkeld op basis van deze vijanden. Gezien het succes van andere biopesticiden gebaseerd op insectenvirussen (bijvoorbeeld baculovirussen) is het zeer interessant om te kijken of bladluisvirussen potentieel te gebruiken zijn voor dit doeleinde en tevens om bladluisvirussen nader te karakteriseren.

Karakterisering van een bladluisvirus: 'Aphid Lethal Paralysis Virus'

Het eerste deel van het promotieonderzoek bestond uit het nader karakteriseren van het bladluisvirus, Aphid Lethal Paralysis Virus (ALPV), wat potentieel geschikt zou zijn als basis voor een biopesticide. Het RNA-genoom van dit virus is in kaart gebracht en vergeleken met andere genomen van insectenvirussen. Hieruit is gebleken, dat ALPV geclassificeerd moet worden binnen de Cripavirussen (een nieuw genus van de *Dicistroviridae* virusfamilie). Tevens is er

PROMOTIE

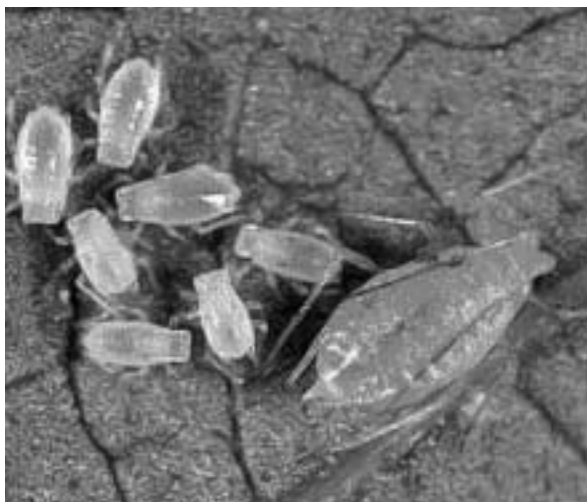


Foto 1. Bladluis met nakomelingen

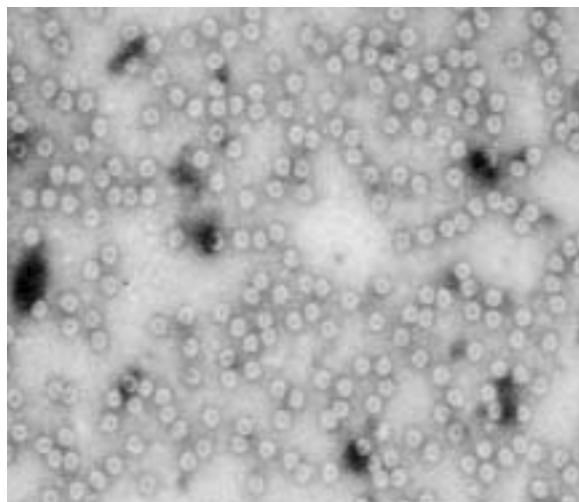


Foto 2. Elektronenmicroscopische opname van het gezuiverde virus, *Myzus persicae* densovirus.

voor dit virus vastgesteld dat het een breder gastheerbereik heeft dan alleen bladluizen. Aan de hand van deze uitkomsten is inmiddels een internationale patentaanvraag gehonoreerd en het komende jaar zal worden onderzocht hoe dit virus kan gaan worden ingezet in de praktijk.

Een nieuw bladluisvirus, *Myzus persicae* densovirus

Het tweede deel van het onderzoek concentreerde zich op een virus, dat gevonden werd in een bladluiskweek van INRA, Colmar. In geïnfecteerde groene perzikbladluizen (*Myzus persicae*) werden virusdeeltjes waargenomen, maar er bestond onduidelijkheid over de vraag of deze virusdeeltjes een nieuw insectenvirus of een al eerder waargenomen virus vertegenwoordigden. Om deze vraag te beantwoorden zijn er daarom allereerst serologische testen uitgevoerd op de geïnfecteerde bladluizen. Uit deze analyse bleek al snel dat het betreffende virus niet reageerde met antisera tegen al eerder geïdentificeerde bladluisvirussen en dat er dus waarschijnlijk sprake was van een nieuw virus. Dit virus is vervolgens gezuiverd

om diagnostische antisera te kunnen maken tegen het virus en om het virus nader te kunnen karakteriseren en vast te stellen of dit virus een interessante kandidaat zou zijn om als basis te fungeren voor een bio-pesticide.

De zuivering van het virus en het maken van diagnostische antisera verliep bijzonder succesvol en heeft geleid tot verdere karakterisering van het virus. Genoomanalyse van het virus en vergelijking van dit DNA-genoom met dat van andere virussen heeft aangetoond dat er inderdaad sprake is van een nieuw virus. Dit nieuwe virus blijkt sterke overeenkomsten te vertonen met zogenaamde densovirussen en heeft dan ook de voorlopige naam toegekend gekregen van *Myzus persicae* densovirus (MpDNV).

Opname en overdracht van MpDNV via verschillende routes

Na moleculaire karakterisering van dit nieuwe virus zijn er een aantal biologische parameters bestudeerd zoals de opname en overdracht (transmissie) van het virus. Uit deze experimenten is onder andere gebleken, dat het nieuwe

virus, MpDNV, net als andere insectenvirussen, via een geïnfecteerde bladluis kan worden overgedragen naar nakomelingen (zogenaamde verticale transmissie). Tevens is aangetoond dat het virus via speeksel en honingdauw van bladluis naar bladluis kan worden overgedragen (horizontale transmissie).

Gebruik van het nieuwe virus als biopesticide? Effect van MpDNV op bladluispopulaties

Om vast te stellen of dit nieuwe virus potentie heeft als bio-insecticide zijn er vervolgens experimenten gestart waarmee het effect van het virus op een bladluispopulatie kan worden bepaald. Uit deze biologische karakterisering blijkt dat het virus de groei en ontwikkeling van de bladluizen vertraagt en tevens dat het virus een negatief effect heeft op het aantal nakomelingen van de bladluizen. Kortom, er is een duidelijk biologisch effect meetbaar en daarmee ligt de weg open om dit virus te gebruiken als basis voor een nieuwe soort bio-pesticide voor bladluizen.

PROMOTIES