

Viroïde-infecties in Nederland

J.Th.J. Verhoeven en J.W. Roenhorst

Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen

Inleiding

Ziekten die door viroïden worden veroorzaakt, zijn in het veld vaak moeilijk te onderscheiden van virusziekten. Tot zo'n 35 jaar geleden werd dan ook aangenomen dat dergelijke ziekten door virussen werden veroorzaakt: intrinsieke en moleculair-biologische eigenschappen waren niet bekend en de symptomen en wijzen van overdracht toonden sterke gelijkenis met die van virussen.

Verschillen tussen viroïden en virussen

Lange tijd is aangenomen dat virussen de kleinste ziekteverwekkers van planten zouden zijn. Viroïden zijn echter nog aanzienlijk kleiner. Plantenvirussen bestaan meestal uit enkelstrengs (soms dubbelstrengs) RNA-moleculen (soms DNA), omgeven door een eiwitmantel. Het RNA of DNA bevat de genetische informatie voor alle eigenschappen van het virus. Viroïden bestaan louter uit een cirkelvormige, enkelvoudige RNA-streng, die

door interne basenparing gedeeltelijk dubbelstrengs is (Figuur 1). Een eiwitmantel ontbreekt. Het genoom van viroïden is dusdanig klein (afhankelijk van de soort variërend van circa 250 tot circa vierhonderd nucleotiden) dat het onvoldoende genetische informatie bevat voor het aanmaken van eiwitten. Daardoor zijn viroïden bijvoorbeeld voor hun vermeerdering volledig afhankelijk van door de plant geproduceerde eiwitten en enzymen.

Overeenkomsten tussen viroïden en virussen

Viroïden veroorzaken bij waardplanten symptomen die vergelijkbaar zijn met die van virussen, zoals groeiverminderingen, kleurafwijkingen, afstervingen (soms) en misvormingen. Ook hun wijze van overdracht komt sterk overeen. Zo worden alle viroïden overgedragen door vegetatieve vermeerdering van gewassen (stekken, enten, knollenvermeerdering enzovoorts). Veel viroïden kunnen bovendien

vrij gemakkelijk via contact worden overgedragen, bijvoorbeeld tijdens werkzaamheden in het gewas. Verder is van een aantal viroïden overdracht via zaad en stuifmeel bekend. Overdracht door insecten komt bij viroïden nauwelijks voor, dit in tegenstelling tot bij virussen.

Taxonomie

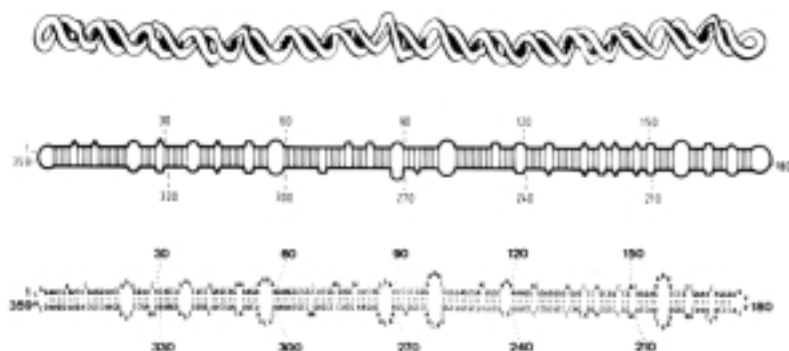
Momenteel zijn 28 soorten viroïden geïdentificeerd in twee families, respectievelijk de *Pospiviroïdaceae* en de *Avsunviroïdaceae* (zie Figuur 2). Daarnaast zijn er nog enkele voorlopig ingedeelde soorten en onvolledig gekarakteriseerde soorten. De classificatie op familieniveau is gebaseerd op drie eigenschappen:

1. de aanwezigheid van een centraal, geconserveerd gebied in het viroïde-genoom,
2. de aanwezigheid van zogenaamde 'hamerkop' ribozymen die een rol spelen bij het initiëren van de replicatie,
3. de wijze van replicatie.

Tot de familie van de *Avsunviroïdaceae* behoren drie viroïden die in dit artikel niet nader worden besproken. De *Pospiviroïdaceae* zijn ingedeeld in vijf geslachten op basis van:

1. het type centraal geconserveerd gebied,
2. de aanwezigheid van bepaalde terminale, geconserveerde gebieden.

Het belangrijkste criterium om soorten binnen een genus te onderscheiden is de sequentie-



Figuur 1. Nucleotide-volgorde, secundaire structuur en een 3D-model van een isolaat van het aardappelspindelknolviroïde (Sänger, 1988)

ARTIKEL

Figuur 2. Classificatie van viroïden

Familie	Geslacht	Soort
	Avsunviroid	<i>Avocado sunblotch viroid</i>
Avsunviroidae	Pelamoviroid	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i> (chrysantembontviroïde)* <i>Peach latent mosaic viroid</i> (perzikzwakmozaïekviroïde)
	Apscaviroid	<i>Apple dimple fruit viroid</i> <i>Apple scar skin viroid</i> <i>Australian grapevine viroid</i> <i>Citrus bent leaf viroid</i> <i>Citrus viroid III</i> <i>Grapevine yellow speckle viroids 1</i> <i>Grapevine yellow speckle viroids 2</i> <i>Pear blister canker viroid</i> (perenblaasjeskankerviroïde)
	Cocadviroid	<i>Citrus viroid IV</i> <i>Coconut cadang-cadang viroid</i> <i>Coconut tinangaja viroid</i> <i>Hop latent viroid</i> (latent hopviroïde)
Pospiviroidae	Coleviroid	<i>Coleus blumei viroid 1</i> <i>Coleus blumei viroid 2</i> <i>Coleus blumei viroid 3</i>
	Hostuviroid	<i>Hop stunt viroid</i> (hopdwerggroeviroïde)
	Pospiviroid	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (chrysantendwergziekteviroïde) <i>Citrus exocortis viroid</i> (Citrus-exocortisviroïde) <i>Columnnea latent viroid</i> (latent <i>Columnnea</i> -viroïde) <i>Iresine viroid 1</i> <i>Mexican papita viroid</i> <i>Potato spindle tuber viroid</i> (aardappelspindelknolviroïde) <i>Tomato apical stunt viroid</i> <i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i> <i>Tomato planta macho viroid</i>

* tussen haakjes Nederlandse naam

overeenkomst van het volledige genoom. Ligt dit percentage onder de 90% dan is er sprake van een andere soort. Daarnaast spelen waardplantenreeks en symptomatologie een rol bij de soortafbakening (Flores *et al.*, 2005)

Detectie en identificatie

In Nederland is lange tijd ge-

bruikt gemaakt van return-polyacrylamidegelelektroforese (r-PAGE) voor detectie van het chrysantendwergziekteviroïde en het aardappelspindelknolviroïde (Huttinga *et al.*, 1987; Roenhorst *et al.*, 2000). De techniek is gebaseerd op het verschil in de conformatie van het viroïde-molecuul bij kamertemperatuur en onder denaturerende omstandigheden. De eerste 'run' wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur waarbij de viroïdedeeltjes een vergelijkbaar

electroforetische mobiliteit vertonen als de lineaire nucleïnezuren van de plant. De kleine nucleïnezuren (waaronder het viroïde-RNA) worden zo gescheiden van de grotere nucleïnezuren. De tweede 'run' vindt plaats onder denaturerende omstandigheden (bij ca. 65°C). De hoge temperatuur verbreekt de interne basenparing van de viroïden waardoor deze circulair worden en de mobiliteit vermindert ten opzichte van de lineaire nucleïnezuren van de plant. Na kleuring van de gel met zilvernitraat worden viroïden zichtbaar in een afzonderlijke band, die duidelijk gescheiden ligt van de nucleïnezuren van de plant. De positie van het bandje op de gel bepaalt of er een viroïde aanwezig is; het betreffende gewas kan een indicatie geven over de identiteit van het betreffende viroïde.

Vanaf de jaren tachtig zijn er ook diverse hybridisatie-technieken ontwikkeld voor de detectie en identificatie van viroïden. Deze zijn nauwelijks toepast in NL vanwege het gebruik van het radio-actieve ³²P. De gevoeligheid van deze technieken was bovendien vergelijkbaar met die van de r-PAGE (Huttinga *et al.*, 1987). Ook deze technieken waren niet geschikt voor definitieve identificatie daar de gebruikte 'probes' in het algemeen niet specifiek genoeg waren.

Momenteel spelen moleculair biologische methoden als RT-PCR een belangrijke rol bij de detectie en identificatie van viroïden. Bij deze techniek wordt (een deel van) het viroïde-genoom zo vaak vermenigvuldigd dat het vervolgens op een gel kan worden gedetecteerd. RT-PCR's kunnen worden uitgevoerd met zowel soortspecifieke als genusgenerieke primers (Verhoeven *et al.*, 2004). Met de

soortspecifieke primers wordt gericht op één viroïde-soort getoetst; met generieke primers worden in één toets meerdere, verwante viroïden gedetecteerd. In dit geval vindt identificatie in tweede instantie plaats via analyse van de sequentie van het amplicon.

Voor routinematig gebruik is de 'real-time' RT-PCR technologie beter geschikt. Deze techniek is vergelijkbaar met de conventionele RT-PCR. Voor detectie zijn echter geen gels nodig, daar deze is gebaseerd op fluorescentie (Roehorst, Gewasbescherming, dit nummer, p.194-197) Voor detectie van het aardappelspindelknolviroïde is inmiddels een real-time RT-PCR ontwikkeld (Boonham *et al.*, 2004).

Viroïde-infecties in Nederland

Infecties door viroïden zijn in Nederland vooral bekend bij de bloemisterijgewassen *Coleus* en chrysant. Daarnaast worden door viroïden veroorzaakte ziekten soms waargenomen bij komkommer en tomaat.

Bij *Coleus* treden drie verwante viroïden op, respectievelijk *Coleus blumei*-viroïde 1, 2 en 3



Figuur 3. De chrysantenplanten rechtsvoor tonen groeivermindering en een vervroegde bloei a.g.v. een infectie door het chrysantendwergziekteviroïde.

(*Coleus blumei* viroid 1, 2 en 3). Er is geen relatie bekend tussen infecties en het optreden van symptomen. Ook in Nederland zijn viroïden vastgesteld bij *Coleus*, maar deze zijn niet nader geïdentificeerd. Naar verwachting komen in *Coleus* regelmatig viroïden voor, gezien de vegetatieve vermeerdering van dit gewas en de gegevens uit het buitenland.

Bij chrysant komen wereldwijd regelmatig infecties door het chrysantendwergziekteviroïde (*Chrysanthemum stunt viroid*)

voor. De symptomen zijn sterk cultivarafhankelijk en bestaan uit: groeivermindering, enigszins lichtgroen gekleurde bladeren, iets krullende bladeren, witachtige bladvlekken, vervroeging van de bloei en kleurverandering in de bloemen (Figuur 3). Vaak worden echter geen of nauwelijks symptomen waargenomen. Naast chrysant en de verwante soort *Argyranthemum frutescens* is het viroïde ook aangetroffen bij *Ageratum*, *Petunia* en *Solanum jasminoides* (Bouwen & Van Zaayen, 2003; Verhoeven *et al.*, in druk).



Figuur 4. 'Flesvormige' komkommervruchten a.g.v. een infectie door het hopdwerggroeviroïde.

Bij komkommer komt in Nederland de blekevruchtenziekte voor. Deze ziekte wordt veroorzaakt door het hopdwerggroeviroïde (*Hop stunt viroid*). Geïnfecteerde vruchten hebben een blekere kleur, zijn enigszins flesvormig, de bloemen zijn misvormd, de internodiën verkort en de bladnerven liggen enigszins verdiept (Figuur 4). Vaak zijn er slechts enkele aangetaste planten en is er een langzame uitbreiding in de rij (Van Dorst & Peters, 1974)



Figuur 5. Groeivermindering door het aardappelspindelknolviroïde (rechts) en hevige dwerggroei door het latent *Columnea*-viroïde (links) na mechanische inoculatie van tomaat.

Tot slot hebben we in Nederland te maken gehad met een beperkt aantal viroïde-infecties bij tomaat (Verhoeven *et al.*, 2004). De symptomen waren in alle gevallen vergelijkbaar: groeiremming, chlorose tot bronsverkleuring of paarsverkleuring in de kop van de plant en bladmisvormingen (Figuur 5). Kenmerkend was dat het aantal zieke planten zich in het algemeen in de rij uitbreidde, hetgeen wijst op mechanische overdracht. Het percentage aangetaste planten was meestal minder dan 1%; in één kas waren echter nagenoeg alle planten geïnfecteerd. Hoewel de symptomen sterk overeenkwamen, zijn in totaal drie verschillende viroïden geïdentificeerd: het *Citrus-exocortis*-viroïde (*Citrus exocortis viroid*) op drie bedrijven, het aardappelspindelknolviroïde (*Potato spindle tuber viroid*) op vier bedrijven en het latent *Columnea*-viroïde (*Columnea latent viroid*) op vijf bedrijven. De twee eerstgenoemde viroïden waren in het buitenland al eerder bij tomaat vastgesteld. Het latent *Columnea*-viroïde was slechts alleen bekend van

enkele symptoomloze infecties bij enkele bloemisterijgewassen in het buitenland (Hammond, 2003).

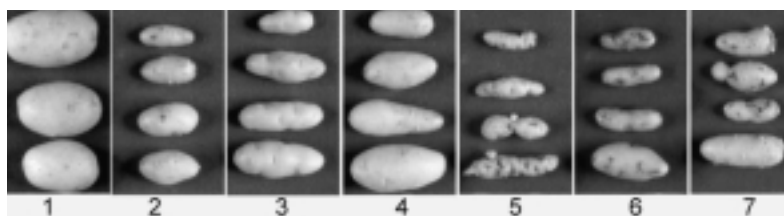
Herkomst van viroïde-infecties in Nederlandse teelten

Voor vegetatief vermeerderde gewassen zoals chrysant en *Coleus* is geïnfecteerd plantmateriaal een belangrijke bron van infectie. Alle viroïden worden namelijk overgedragen tijdens de vegetatieve vermeerdering van planten. Om de verspreiding van viroïden tegen te gaan is het dan ook be-

langrijk het uitgangsmateriaal voor aanvang van de vermeerdering te toetsen op viroïden. Daarnaast kunnen de betreffende viroïden mechanisch worden overgedragen vanuit geïnfecteerde planten. In dit verband is het een nadeel dat chrysantengewassen meestal per kap worden geoogst en vervangen, zodat er bij aanplant van nieuwe planten altijd nog oude, mogelijk geïnfecteerde planten in de kas aanwezig zijn. De rol van andere waardplanten dan chrysant als infectiebron voor chrysantengewassen wordt vooralsnog als minder belangrijk beschouwd. Chrysant wordt in het algemeen als enige waardgewas in een kas geteeld en de teelten van de andere waardplanten van het viroïde hebben een beperkte omvang in Nederland.

Nieuwe introducties van het hopdwerggroeviroïde in een komkommernewas zijn waarschijnlijk via mechanische overdracht afkomstig uit nog onbekende waardplanten. Het viroïde heeft namelijk diverse waardplanten, zowel onder geteelde als wilde planten. Er zijn geen aanwijzingen voor zaadoverdracht van dit viroïde bij komkommer (Van Dorst & Peters, 1974).

Bij tomaat zijn in Nederland drie verschillende viroïden vastgesteld. Bij de twee eerste infecties door het aardappelspindelknolviroïde zijn er aan-



Figuur 6. Verschillende mate van knolmisvorming: 1) normale vorm (niet geïnfecteerd); 2 en 3) geïnfecteerd door isolaten van het aardappelspindelknolviroïde; 4) geïnfecteerd door het *Citrus-exocortis*-viroïde; 5, 6 en 7) geïnfecteerd door verschillende isolaten van het latent *Columnea*-viroïde.

wijzingen dat de infectiebron destijds geïnfecteerd pepino-zaad (*Solanum muricatum*) uit Nieuw-Zeeland is geweest. Op beide locaties - waar gelijktijdig infecties door dit viroïde waren vastgesteld - bleken pepino-planten te staan die waren opgekweekt uit zaad uit Nieuw-Zeeland en Griekenland. Deze planten bleken ook te zijn geïnfecteerd door hetzelfde viroïde. Toen in 2000 in Nieuw-Zeeland de eerste infecties door het aardappelspindelknolviroïde bij tomaat werden vastgesteld (Verhoeven *et al.*, 2004), bleek dat de in Nederland aangetroffen isolaten bij tomaat en pepino sterk overeenkwamen met de Nieuw-Zeelandse isolaten. Samen vormen deze isolaten een afzonderlijke fylogenetische groep met nog enkele isolaten uit Australië.

Bij alle overige viroïde-infecties bij tomaat kon de herkomst niet worden achterhaald. Hoogst waarschijnlijk zijn ook hier andere plantensoorten infectiebron geweest, net als bij de infecties door het hopdwerggroeiviroïde bij komkommer. Zo zijn van het latent *Columnea*-viroïde in het buitenland infecties vastgesteld in drie bloemisterijgewassen, behorende tot de geslachten *Brunsfelsia*, *Columnea* en *Nematanthus* (Hammond, 2003). Echter in alle deze gevallen betrof het symptoomloze planten. Dit vergroot de kans op ongemerkte verspreiding, daar het moeilijk is om dergelijke infectiebronnen op te sporen en te vernietigen. Er zijn geen aanwijzingen dat de infecties het gevolg zijn van zaadoverdracht. Hoewel het aardappelspindelknolviroïde zaadoverdraagbaar is, betroffen de infecties met dit viroïde verschillende rassen. Er was

geen relatie met één zaadpartij. Bovendien werden de meeste infecties pas laat in het teeltseizoen ontdekt, terwijl bij een infectie vanuit het zaad symptomen in een eerder stadium worden verwacht.

Quarantainestatus

Binnen de Europese Unie (EU) hebben het aardappelspindelknolviroïde (IAI) en het chrysantendwergziekteviroïde een quarantainestatus (IIAI). De status IAI houdt in dat het betreffende viroïde niet in de EU is gevestigd, er niet mag worden binnengebracht en dat bij eventuele vondsten verspreiding moet worden voorkomen. Gezien de mogelijkheid van mechanische overdracht van het viroïde, betekent dit dat geïnfecteerde planten moeten worden vernietigd. De status IIAI voor het chrysantendwergziekteviroïde houdt in dat dit viroïde in de EU is gevestigd en dat de status alleen betrekking heeft op plantmateriaal van chrysant en niet geldt voor het eindproduct.

Bij de Nederlandse viroïde-infecties van tomaat is geconstateerd dat de ernst van de aantastingen door het latent *Columnea*-viroïde en het *Citrus-exocortis*-viroïde – beide zonder quarantainestatus – tenminste gelijk was aan de schade als gevolg van een aantasting door het aardappelspindelknolviroïde. Bovendien bleek in experimenten met het aardappelras ‘Nicola’ dat het latent *Columnea*-viroïde zelfs tot ernstiger knolafwijkingen en een aanzienlijk lagere productie leidde dan het aardappelspindelknolviroïde (Verhoeven *et al.*, 2004; figuur 6). Deze gegevens zijn aanleiding om

een quarantainestatus voor het latent *Columnea*-viroïde te overwegen. Bij quarantainewaardigheid van dit viroïde zal ook de status van de andere bij tomaat aangetroffen viroïden uit het geslacht *Pospiviroid* moeten worden geëvalueerd.

Referenties

- Boonham, N., Gonzales-Perez, L., Mendez, M.S., Blockley, A., Walsh, K., Narker, I. & Mumford, R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid*. *Journal of Virological Methods* **116**: 139-146.
- Bouwen, I., & Zaayen, A. van, 2003. Chrysanthemum stunt viroid. In Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik J.S. (eds). *Viroids* (pp 218-223). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Dorst, H.J.M. van & Peters, D., 1974. Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. **80**: 85-96.
- Flores, R., Randles, J.W., Owens, R.A., Bar-Joseph M. & Diener, T.O., 2005. Subviral agents: Viroids. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L.A. (eds). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (pp 1147-1161). Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Hammond, R.W., 2003. *Columnea* latent viroid. In Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik J.S. (eds). *Viroids* (pp 231-232). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Huttinga, H., Mosch, W.H.M. & Treur, A., 1987. Comparison of bidirectional electrophoresis and molecular hybridization methods to detect potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid. *EPPO Bulletin*. **17**: 37-43.
- Roehorst, J.W., Butôt, R.P.T., Van der Heijden, K.A., Hooftman, M & Zaayen, A. van, 2000. Detection of chrysanthemum stunt viroid and potato spindle tuber viroid by return-polyacrylamide gel electrophoresis. *EPPO Bulletin* **30**: 453-456.
- Sänger, H.L., 1988. Viroids and viroid diseases. *Acta Horticulturae* **234**: 79-87.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemsen, T.M., Kox, L.E.F., Owens, R.A. & Roehorst, J.W., 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis* viroid, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 823-831.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C. & Roehorst, J.W., 2006. First reports of *Potato virus M* and *Chrysanthemum stunt viroid* in *Solanum jasmonoides*. *Plant Disease* (in druk).