

Het plantenvirologisch onderzoek bij Plant Research International

René van der Vlugt, Martin Verbeek, Inge Bouwen, Daniella Kasteel, Annette Dullemans, Chris Cuperus, Jan Vink en Paul Piron

Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen; Rene.vanderVlugt@wur.nl

Plant Research International is voortgekomen uit de fusie van drie vooraanstaande landbouwkundige DLO-instituten nl. het AB-DLO (DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek), het CPRO-DLO (Centrum voor Plantenveredeling en Reproductieonderzoek) en het IPO-DLO (DLO-Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek).

Bij de overgang naar PRI is het virusonderzoek terecht gekomen in de businessunit Biointeracties en plantgezondheid. PRI maakt binnen Wageningen UR deel uit van de Plant Science Group (PSG), waarbinnen samengewerkt wordt met PPO en verschillende leerstoelgroepen van WU. Elk van deze onderdelen richt zich op een bepaald segment van het plantkundig onderzoek. PRI richt zich vooral op het strategisch onderzoek en positioneert zich daarmee tussen PPO (vooral praktijkgericht) en de WU (vooral fundamenteel gericht). Voor de inhoud van het plantenvirologische onderzoek betekent dit dat wij ons vooral bezighouden met aan plantenvirussen gerelateerde praktijkproblemen en proberen werkbare oplossingen te vinden voor die virusproblemen. Indien nodig vergaren we fundamentele kennis zelf of in samenwerking met andere groepen en evenzo werken we nauw samen met PPO in het directe praktijkonderzoek. De plantenvirologen van PRI generen kennis rechtstreeks voor het bedrijfsleven maar ook voor Productschappen, keuringsdiensten, de Plantenziektkundige Dienst of LNV. Daarmee leveren we onze bijdrage aan beleidsvraagstukken, fytosanitaire kwesties en het op peil houden van de concurrentiekracht van het Nederlandse bedrijfsleven. Het onderzoek vindt zo mogelijk in samenwerking met anderen plaats. Goede en open contacten met bedrijfsleven, (semi)overheidsinstellingen en wetenschappelijke partners in binnen- en buitenland zijn daarbij van vitaal belang.

Onze belangrijkste expertises kort op een rijtje:

- Identificeren en karakteriseren van plantenvirussen, hun stammen en isolaten
- virusspecifieke symptomen op zowel waardplanten als toetplanten
- ontwikkelen van specifieke en gevoelige detectiemethodieken, zowel serologisch (antiseren) als moleculair –biologisch
- virus-overdracht en verspreiding door vectoren
- de epidemiologie en ecologie van virusziekten

Daarnaast beheert de plantenvirusgroep een collectie met de belangrijkste stammen en isolaten van vooral voor Nederland belangrijke virussen. Die vormt nog steeds een basis voor de levering van virussen die gebruikt worden bij resistentie toetsingen, maar ook voor de ontwikkeling van specifieke antisera, hun kwaliteitsborging en de benodigde positieve controles.

De door PRI geproduceerde antisera worden wereldwijd vermarkt onder de naam Prime Diagnostics. Naast alle Nederlandse keuringsdiensten gebruiken ook veel internationale bedrijven onze antisera in hun keurings- en kwaliteitsprogramma's. Meer over de Prime Diagnostics en nieuwe ontwikkelingen op het gebied van serologische diagnostiek elders in dit nummer.

Hieronder volgen enige voorbeelden van ons onderzoek van de afgelopen jaren:

Identificatie en karakterisering van de virussen verantwoordelijk voor slabobbelblad

Slabobbelblad is een ziekte die al tientallen jaren voor proble-

ARTIKEL



Figuur 1. Typische symptomen van slabbobbelblad op ijsbergsla in een veld nabij Pulpi, Zuid-Spanje.

men zorgt in de teelt van sla maar ook andijvie. Het is een internationaal probleem en zorgt met name in Spanje in de teelt van ijsbergsla de laatste jaren voor steeds meer schade (zie figuur 1). Grote oplichtend nerven en een slechte kropzetting maken het product slechter verkoopbaar en opbrengstverliezen kunnen oplopen tot wel 100%. De ziekte wordt verspreid door de oomyceet *Oplidium brassicae*. Deze schimmel maakt rustsporen die wel tot 30 jaar in de bodem kunnen overleven en ook dan nog steeds in staat zijn om sla met bobbelblad te infecteren. Bestrijding van de ziekte is alleen mogelijk door drastische grondontsmetting bijv. met methylbromide. Introductie van resistentie zou een goede bijdrage kunnen leveren aan een duurzame beheersing van het probleem en vermindering van het gebruik van bestrijdingsmiddelen. Nederlandse zaadbedrijven zijn al jaren op zoek naar een vorm van resistentie maar die zoektocht werd ernstig bemoeilijkt door het feit dat de ziekteverwekker niet bekend was en er geen be-

trouwbare toetsmethoden beschikbaar waren.

Door PRI is enige jaren geleden het voortouw genomen om in samenwerking met Rijk Zwaan en partners uit Duitsland, Spanje en Engeland, een Europees project van de grond te krijgen om meer duidelijkheid te krijgen in de veroorzaker van slabbobbelblad en mogelijke oplossingen. Er waren duidelijke aanwijzingen dat er vermoedelijk een virus in het spel was maar niemand was ooit in staat gebleken om dat te bewijzen. Door PRI is binnen dit project aangetoond dat er twee virussen betrokken zijn bij slabbobbelblad: het Mirafiori lettuce big-vein virus (MLBVV, een ophiovirus) en het Lettuce big-vein associated virus (LBVaV, een varicosavirus). Door het ontwikkelen van nieuwe inoculatiemethoden konden beide virussen uiteindelijk van elkaar gescheiden worden en apart bestudeerd. Na zuivering zijn tegen beide virussen antisera geproduceerd en is de volledige RNA sequentie opgehelderd van het gevonden ophiovirus, waarbij voor het eerst bleek dat het genoom van MLBVV uit vier

RNA-segmenten bestaat. Op basis van de sequenties van beide virussen zijn gevoelige en specifieke PCR-toetsen uitgewerkt. MLBVV bleek uiteindelijk verantwoordelijk voor de typische bobbelbladsymptomen, de rol van LBVaV is nog onzeker al is dit virus ook vrijwel altijd aanwezig in zieke planten. Beide virussen lijken sterk met elkaar verbonden maar de precieze details van hun relatie zijn nog niet bekend.

Uiteindelijk heeft het onderzoek geresulteerd niet alleen in de identificatie van de ziekteverwekkers maar ook in gevoelige en specifieke detectiemethodieken. Hiermee kan het bedrijfsleven eindelijk gericht op zoek naar bronnen van duurzame resistentie tegen deze virusziekte met een grote impact op economie en milieu.

Freesiablادنecrose

Freesia bladnecrose (FBN) is al ruim veertig jaar een bekend probleem in de freesiateelt. Deze ziekte veroorzaakt een ernstige necrose in het freesiablاد hetgeen leidt tot aanzienlijke opbrengstverliezen. De typische symptomen van FBN beginnen als chlorotische vlekjes op het blad die later necrotisch worden (figuur 2). FBN is een grond-gebonden ziekte en wordt overgedragen door de obligate schimmel *Oplidium brassicae*. De ziekte kan overleven in de rustsporen van de schimmel, die zelfs na ruim twintig jaar nog levensvatbaar en infectieus zijn. Tot nu toe zijn er geen resistentie freesia cultivars gevonden.

Het is lange tijd onduidelijk geweest wat de oorzaak van FBN kon zijn. Het werd algemeen aangenomen dat er een virus bij deze ziekte betrokken



Figuur 2. Symptomen van freesia bladnecrose in freesia 'Blue Moon'.

moest zijn, maar alle pogingen om een virus te isoleren bleken vruchteloos. Pas in 2003 kon op PRI een virus worden geïsoleerd uit freesia's met FBN. Dit virus behoort tot het genus *Ophiovirus*. Dit genus is vrij onlangs ontdekt, mede doordat de virusdeeltjes in de elektronenmicroscopie moeilijk zijn te zien en lange tijd niet als virusdeeltjes werden herkend. De deeltjes, die bestaan uit strenge RNA die rechtstreeks zijn omgeven met eiwit, zien er uit als lange opgerolde draden (figuur 3). Door hun 'slang-achtige' uiterlijk hebben zij de naam *Ophiovirus* gekregen (Ophis is een Grieks woord voor slang). In het recente verleden zijn ophiovirussen gevonden in onder andere citrus (*Citrus psorosis virus*, CPsV), tulp (*Tulip mild mottle mosaic virus*, TMMMV) en sla (*Mirafiori lettuce bigvein virus*, MLBVV en *Lettuce ring necrosis virus*, LRNV). Het ophiovirus uit Freesia wordt voorlopig freesia ophiovirus (FOV) genoemd. Het is nog niet bewezen dat het gevonden

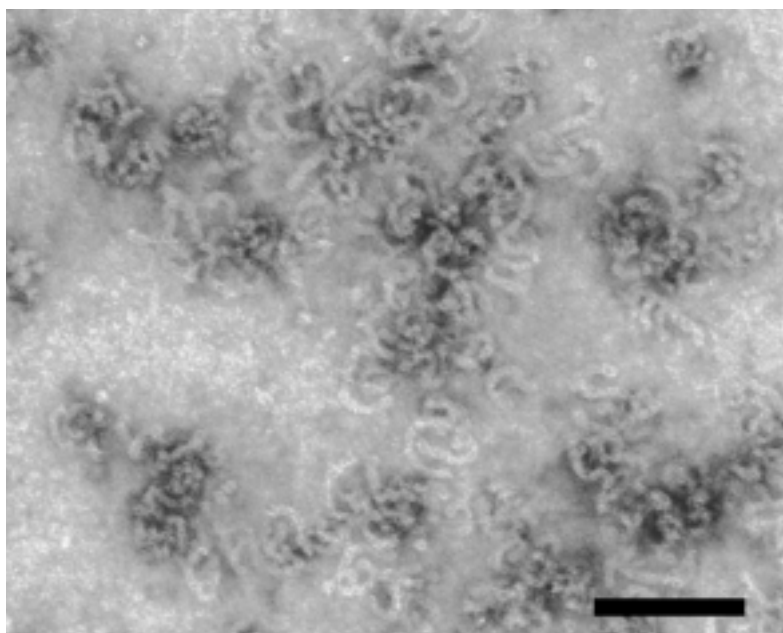
FOV ook de werkelijke veroorzaker is van FBN. Het is namelijk nog niet mogelijk gebleken om FOV mechanisch over te brengen naar gezonde freesia, waardoor de Postulaten van Koch nog niet rond zijn.

Een van de karakteristieken van ophiovirussen is de extreme instabiliteit van de virusdeeltjes. Hierdoor is dit virus moeilijk mechanisch te inoculeren op toetsplanten en moeilijk te zuiveren. De standaard methoden voor inoculatie en viruszuivering bleken niet te voldoen. Op PRI zijn nieuwe methoden ontwikkeld om FOV naar toetsplanten over te brengen en het virus zuiver in handen te krijgen. Het lukte om FOV over te brengen naar *Nicotiana glauca* '67A' en *N. occidentalis* 'P1' (figuur 4). Deze planten konden ook worden gebruikt voor de vermeerdering van het virus, waarna het virus gezuiverd kon worden. Het gezuiverde virus werd gebruikt om een polykonaal antiserum te maken dat prima bleek te voldoen in ELISA. Het antiserum detecteert FOV in bladmateriaal en knolmateri-

aal van freesia en vertoont geen achtergrondreactie met gezond freesia-materiaal. Deze detectiemethode wordt nu verder door Naktuinbouw geëvalueerd aan de hand van praktijkmonsters. De resultaten wijzen erop dat het gevonden ophiovirus een hoge correlatie heeft met de aanwezigheid van symptomen van FBN. Met deze detectiemethode hebben veldelaars van freesia al een belangrijk hulpmiddel in handen voor de ontwikkeling van resistentie tegen FBN.

Epidemiologie van aardappelvirus Y

Virussen die op non-persistent wijze door bladluizen worden overgedragen zorgen jaarlijks voor aanzienlijke problemen. Zo wordt de jaarlijkse schade in de bollensector op circa 39 miljoen Euro geschat, de schade in de pootaardappelteelt doet hier verhoudingsgewijs niet voor onder. Naast een intensief keuringsstelsel om schoon planten en pootgoed te garanderen



Figuur 3. Elektronenmicroscopische opname van gezuiverde deeltjes van het freesia ophiovirus. Balk=100nm.



Figuur 4. Systemische symptomen van freesia ophiovirus in *Nicotiana occidentalis* 'P1'.

vormen directe bespuitingen tegen bladluizen een belangrijk wapen in de beheersing van de virusproblemen. In veel gewassen worden wekelijks pyrethroiden en/of minerale olie gebruikt. De schadelijke gevolgen hiervan voor het milieu worden vaak onderschat. Een onderbouwd advies wanneer precies begonnen of juist gestopt moet worden met bespuitingen is vaak niet mogelijk omdat de data over m.n. de start en de duur van bladluisvluchten ontbreken. Bij een onderbouwde advisering kan het gebruik van chemische gewasbeschermingsmiddelen worden teruggebracht. Ook wordt toenemende middelenresistentie in bladluizen een steeds groter probleem.

De advisering, mede gebaseerd op bladluisvangsten, is om de bestrijding te starten in begin mei of half april bij een vroeg, warm voorjaar. Echter, in o.a. Zeeland zijn er in warme voorjaren al eerder dan half april bladluizen waargenomen. Het is niet bekend of met deze vroege bladluisvluchten virus overgebracht wordt. Lelietelers in Drenthe geven aan dat er nog bladluisvluchten zijn in begin oktober, terwijl voor de lelieteelt geadviseerd wordt om

de bespuitingen te stoppen in eind september.

De groene perzikbladluis (*Myzus persicae*, Sulzer) wordt algemeen beschouwd als de allerbelangrijkste vector van non-persistent overgedragen virussen. Daarom krijgt deze bladluis de hoogste Relatieve Efficiëntie Factor (REF) in de bladluistellingen die aan de basis staan voor de bepaling van de loofdoodingsdata voor pootaardappelen en bespuitingsschema's. Deze REF's zijn echter al bijna dertig jaar oud en gebaseerd op proeven waarbij de overdracht van alleen PVY^N door één kloon van de bladluis bepaald werd. Zeer waarschijnlijk wordt in de diverse teeltsystemen in de aardappel- en bloembollenteelt de rol van andere bladluisoorten onderschat.

In de pootaardappelteelt zijn de afgelopen jaren toenemende problemen met Aardappelvirus Y (PVY) gemeld. Zo is in de jaren 2002-2004 ong. 10-15% van het pootgoed uiteindelijk gedeclasseerd onder andere vanwege overschrijding van de normen voor aanwezigheid van dit virus. In deze problemen spelen bladluizen als belangrijkste verspreiders van het virus een zeer grote rol, maar de toenemende problemen met PVY kunnen onvoldoende verklaard worden door de analyses van de bladluisvangsten.

Ook zijn een aantal nieuwe stammen van PVY beschreven die ernstige problemen veroorzaken. Een aantal van deze stammen blijken recombinanten te zijn en hebben zich al gevestigd in Europa (PVY^{NTN}, PVY^{NW}), maar hun precieze voorkomen en verspreiding binnen Nederland is onbekend. Om te zien in hoeverre nieuwe buitenlandse stammen

al tot Nederland doorgedrongen zijn en een betere risico-inschatting van PVY voor de Nederlandse teelt te kunnen maken is een veel beter inzicht nodig van de in het veld voorkomend stammen en recombinanten.

De kennisvragen die er in de verschillende sectoren liggen met betrekking tot virusoverdracht door bladluizen ontlopen elkaar niet veel. Er is in het algemeen te weinig inzicht in het relatief belang van de verschillende bladluisoorten, het tijdstip van hun verschijnen, de precieze bronnen van virusbesmettingen en het belang van verschillende virusstammen in het optreden van schade.

In 2006 is in het kader van het LNV- fytosanitair onderzoeksprogramma rond de problematiek met PVY een project gestart, in samenwerking met de NAK (Nederlandse Algemene keuringsdienst) en mede gefinancierd door HPA (Hoofdproductschap akkerbouw). Dit project richt zich vooral op de volgende onderwerpen:

1. Het vaststellen van de belangrijkste bladluisoorten die verantwoordelijk zijn voor de overdracht van PVY.
2. Bepaling van de REF's van diverse veldpopulaties van deze bladluisoorten, voor de belangrijkste PVY stammen.
3. Een inventarisatie op het voorkomen van stammen en recombinanten van PVY in Nederlands veldmateriaal
4. Het onderzoeken van de relatie tussen bladluispopulaties en virusstammen.

Op dit moment worden de vangsten van de bladluisvluchten nog volop geanalyseerd en is een begin gemaakt met de inventarisatie van de in Nederland aanwezige stammen en

isolaten van PVY. In de loop van dit jaar zullen deze gegevens gebruikt worden om met historische data te vergelijken, en daar al eerste conclusies uit te trekken, en gedetailleerde plannen voor volgend jaar uit te werken.

Een nieuw virus in kastanje

Enkele jaren geleden dook er in Nederland een nieuwe mysterieuze ziekte op in paardenkastanje (*Aesculus* sp.). Er verschenen necrotische plekken op de stam waaruit een bruin sap lekte. De naam kastanjabloedingsziekte werd al snel algemeen bekend omdat in de pers uitgebreid melding werd gemaakt van een desastreuze ziekte die alle kastanjes in Nederland bedreigde. Onder leiding van PPO werd de werk-

groep Aesculaap opgericht die in opdracht van LNV onderzoek doet naar deze ziekte. Deze werkgroep bestaat uit een groot aantal onderzoekers van onder andere PPO, PRI, WU en PD. In 2005 werden door PRI zowel een bacterie (*Pseudomonas syringae*) als een virus gevonden. Het virus heeft closterovirus-achtige deeltjes en bleek algemeen in zowel gezonde als zieke kastanjes voor te komen. De bacterie werd voornamelijk geassocieerd met de bloedingsplekken gevonden. Inmiddels is bewezen dat de bacterie de primaire veroorzaker is van de bloedingsziekte, maar een belangrijke rol van het gevonden virus is niet uit te sluiten. Het virus kan een stressfactor zijn waardoor de bacterie de kans heeft gekregen zich zeer snel te verspreiden. Verder onderzoek is nodig om het virus verder te karakteriseren.

Toenemende problemen met pepinomozaïekvirus

In 1999 was een Nederlandse groep met daarin toenmalige IPO-DLO, Proefstation Naaldwijk en de PD, het eerste in de beschrijving van een toen nog geheel nieuw virus in de Nederlandse tomatenteelt. Sinds die tijd heeft dat virus, pepinomozaïekvirus, zich razendsnel door de tomatenteelt in binnen- en buitenland verspreid. Op dit moment zorgt het voor veel problemen omdat door nog onbekende oorzaak de ernst van de symptomen sterk aan het toenemen is. Meer over dit virus, zijn geschiedenis en de problemen die het veroorzaakt dit nummer p232-238.

ARTIKEL