

Grip op virussen

René van der Vlugt¹,
Martin Verbeek¹,
Annelien Roenhorst²,
Marleen Botermans²,
Maarten de Kock³,
Ton van Schadewijk⁴,
Roberto Miglino⁴,
Ellis Meekes⁵,
Richard Kormelink⁶
en Jan van Lent⁶

¹ Plant Research
International

² nieuwe Voedsel- en Waren
Autoriteit, divisie Plant

³ Praktijkonderzoek
Plant en Omgeving -
Sector Bloembollen,
Boomkwekerij & Fruit

⁴ Bloembollenkeuringsdienst

⁵ Naktuinbouw

⁶ Wageningen University,
Laboratorium voor Virologie

Inleiding

Virusziekten hebben de afgelopen jaren bij mens en dier veel leed en schade veroorzaakt. SARS, vogelgriep, varkenspest en Mexicaanse griep hadden ieders aandacht en stonden -en staan nog steeds -volop in de belangstelling, zowel bij publiek als politiek. Het drukte ons maar weer eens met de neus op de feiten; virussen vormen een niet aflatend gevaar en kunnen juist als je er niet op bedacht bent (weer) opduiken. Ondanks het feit dat ze tot de kleinst bekende ziekteverwekkers behoren, hebben ze vaak een enorme impact, sociaal en economisch.

Plantenvirussen vormen hierop geen uitzondering. Bij het grote publiek zijn ze vrijwel onbekend maar toch veroorzaken ze ook heel veel leed en schade. Leed omdat ook nu nog epidemieën van plantenvirussen in veel ontwikkelingslanden tot ernstige voedseltekorten en zelfs hongersnood leiden. Een voorbeeld hiervan is Cassave mosaic disease. Schade, omdat bijvoorbeeld alleen al in Nederland de directe opbrengst- en kwaliteitsverliezen in land- en tuinbouw alsook exportbelemmeringen jaarlijks vele tientallen miljoenen Euro's kosten. Daarnaast wordt elk jaar een nog groter bedrag besteed aan het voorkomen van virusinfecties.

Het is een gegeven dat een virusziekte niet te bestrijden is. Mens en dier zijn uitgerust met een immuunsysteem om ziekteverwekkers de baas te kunnen. Vooraf activeren van dit systeem door gerichte vaccinatiecampagnes voorkomt dat infecties zich razendsnel verspreiden en kunnen uitgroeien tot ware epidemieën. Toch bewijst de jaarlijkse terugkerend griepgolf dat ook vaccinatie geen blijvende bescherming tegen virussen biedt. Planten hebben geen geavanceerd immuunsysteem waarmee ze zich kunnen verdedigen en ze zijn daarmee extra kwetsbaar. Mensen en dieren verplaatsen zich en zijn daarmee zelf de belangrijkste verspreiders ('vectoren') van virusziekten. Planten zijn niet mobiel en daarmee lijkt op het eerste gezicht grootschalige verspreiding niet aan de orde. Plantenvirussen gebruikten echter andere strategieën. Naast verspreiding via zaad, stek, bol en knol, maken ze vaak ingenieus gebruik van 'vectoren', zoals insecten, om zich te verspreiden naar andere planten. Met name bladluizen, wittevliegen en tripsen zijn berucht, maar ook kevers, aaltjes, schimmels en zelfs bijen en hommels worden gebruikt. Toch is vaak, onbewust, de mens de belangrijkste verspreider. Het niet op tijd (h)erkennen van virussymptomen,

vaak in combinatie met onvoldoende hygiënemaatregelen, maakt dat virussen zich tijdens normale teelthandelingen razendsnel kunnen verspreiden in een gewas.

Virusinfecties voorkomen is eigenlijk het enige wat een boer of tuinder kan doen om schade te beperken. Dit begint bij gezond zaai- en plantgoed. Nederland heeft op dit gebied een traditie hoog te houden. Na de 2^e wereldoorlog is een systeem opgezet waarbij het onderzoek, in nauwe samenwerking met de keuringsinstanties, gevoelige en betrouwbare toetsmethoden ontwikkelde die vervolgens werden geïmplementeerd in de praktijk. Certificering maakte dat de kwalitatief hoogwaardige rassen die door de Nederlandse veredelingsbedrijven werden ontwikkeld, ook gezond konden worden vermeerderd. Daarmee was de basis gelegd voor een zeer succesvolle exportindustrie die Nederland op de wereldkaart heeft gezet en ons land financieel geen windeieren heeft gelegd.

De stand van het land

Eén van de peilers onder dit succes was en is een gedegen kennis van de plantenpathogenen. Met het bestuderen van de biologische en fysieke eigenschappen van belangrijke plantenpathogenen, kwam kennis beschikbaar die het mogelijk maakte detectiemethoden te ontwikkelen en teeltsystemen te optimaliseren. Zo kon in nauwe samenwerking met de sector schade door ziekte worden voorkomen of beperkt. Werd er een (nieuw) virusprobleem gesignaleerd, dan kwam men al vlug terecht bij de onderzoeksinstututen en proefstations waar voldoende experts beschikbaar waren. Die wisten vaak in korte tijd het probleem te identificeren en op te lossen. Kortom, er was een geweldige hoeveelheid kennis en ervaring direct beschikbaar voor de Nederlandse land- en tuinbouwsector.

Tegenwoordig komen problemen op plantenvirologisch gebied op het bord van slechts een handjevol mensen. Om te zorgen dat hun kennis en expertise behouden blijft en optimaal wordt benut, is het van belang de krachten te bundelen. Temeer omdat plantenvirussen vaak onverwacht en in korte tijd tot problemen kunnen leiden. Zo worden naast plotselinge exportproblemen als gevolg van 'vondsten' in Nederlands materiaal, nog regelmatig 'nieuwe' virussen ontdekt zoals bijvoorbeeld het pepinomozaïekvirus begin jaren negentig of recentelijk het Allium virus X. Omdat de situatie

in andere landen vergelijkbaar is, vormt de afbrokkelende kennisinfrastructuur dan ook een serieuze bedreiging voor de concurrentiepositie van de Nederlandse én Europese land- en tuinbouwsector.

Q-bank

De titel van het FESprogramma, 'Versterking infrastructuur plantgezondheid' laat weinig aan duidelijkheid te wensen over. Een prioriteit is het vastleggen en toegankelijk maken van de nog aanwezige kennis. Hiervoor is onder andere een virusdatabase ontworpen, beschikbaar via Q-bank (www.q-bank.eu). In deze database worden kenmerken vastgelegd van belangrijke (gereguleerde) plantenvirussen. Het FES-project maakte het mogelijk beschikbare informatie te toetsen en ontbrekende kennis aan te vullen vanuit eigen onderzoek. Daarnaast konden aanvullende isolaten worden verzameld en gekarakteriseerd. De toegevoegde waarde van deze virusdatabase ten opzichte van de vele andere gegevensbestanden, is dat het merendeel van de isolaten ook fysiek beschikbaar is. Dit maakt Q-bank in positieve zin uniek. Gekarakteriseerde virusisolaten zijn dus eenvoudig en snel beschikbaar voor bijvoorbeeld de ontwikkeling en validatie van toetsmethoden en resistentietoetsingen. Zo is het mogelijk bij plotseling opkomende virusproblemen slagvaardig te opereren, zowel op het gebied van identificatie, toetsontwikkeling als het treffen van maatregelen. Juist in het geval van (potentiële) quarantainevirussen levert dit veel winst op, omdat het verzamelen van deze virussen vaak niet eenvoudig en altijd zeer tijdrovend is. Dit maakt de collectie ook interessant voor onderzoekers en inspectiediensten in het buitenland. De eerste stappen naar samenwerking zijn inmiddels gezet.

Aan het begin van het FES-project zijn de belangrijkste knelpunten op plantenvirologisch gebied in Nederland geïnventariseerd. Criteria hierbij waren vooral fytosanitaire status (d.w.z. Q-organisme of anderszins gereguleerd), economisch belang en de behoefte aan betrouwbare detectie- en identificatiemethoden. Op basis hiervan is een prioriteitenlijst opgesteld van de (gereguleerde) virussen uit de volgende virusgroepen:

1. Potyvirussen
2. Nepovirussen
3. Tospovirussen
4. Potexvirussen

Daarnaast werd zo'n lijst opgesteld voor viroïden en fytoplasma's. Viroïden zijn ziekteverwekkers die louter bestaan uit RNA. Fytoplasma's zijn kleine bacteriën zonder celwand. Beide soorten organismen hebben karakteristieken die overeenkomen met die van virussen en worden daarom vaak door virologen bestudeerd. Aan de prioriteitenlijst werden toegevoegd:

1. Pospiviroïden
2. Fytoplasma's

Bij deze lijst horen een aantal kanttekeningen. Naast door de EU geregleerde virussen, komt in elk van de genoemde groepen een groot aantal andere soorten voor. Deze zijn echter niet minder belangrijk. Enerzijds gaat het hierbij om virussen die directe schade veroorzaken of een belemmering vormen voor de export naar landen buiten de EU. Voorbeelden hiervan zijn verschillende nepovirussen in relatie tot de export van bloembollen naar verschillende Aziatische landen en Hostavirus X (potexvirus) in relatie tot de export van hosta's naar de Verenigde Staten. Anderzijds betreft het de zogenaamde 'look-alikes'. Deze zijn van groot belang bij het stellen van een juiste diagnose. Doordat ze beschikbaar zijn voor vergelijking helpen ze misidentificaties te voorkomen. Dit voorkomt onterechte schadeclaims als gevolg van maatregelen die op basis van een foute diagnose zijn opgelegd. Binnen het virusconsortium is er dan ook bewust

breder gekeken dan enkel de geregleerde virussen.

In de verschillende kaders binnen dit artikel worden een paar voorbeelden gegeven van de werkzaamheden en de resultaten die het FES-project heeft opgeleverd.

De uitdaging voor de toekomst

Inmiddels is de virusdatabase in Q-bank operationeel (www.q-bank.nl). Voor meerdere virussen uit bovengenoemde groepen zijn biologische eigenschappen, zoals waardplanten en toetsplanten (met bijbehorende foto's van karakteristieke symptomen), en serologische en genetische kenmerken vastgelegd. Deze kunnen worden gebruikt voor zowel detectie als identificatie. Deze gegevens zijn voor iedereen beschikbaar zowel in Nederland als daarbuiten. De bijbehorende virusisolaten zijn opgenomen in de collectie en eveneens beschikbaar. Om ze beschikbaar te houden, zullen ze echter met enige regelmaat moeten worden verversd omdat anders de infectiositeit verloren gaat.

Op dit moment beschikken we over een uniek systeem om kennis te behouden, te delen en te benutten. De uitdaging is om de komende jaren de database, met onlosmakelijk daaraan verbonden de fysieke collectie, te behouden en verder uit te bouwen, liefst samen met onze buitenlandse collega's.

Detectie van plantenvirussen: het gebruik van toetsplanten

De oudste methode om plantenvirussen te detecteren is het gebruik van toetsplanten (ook wel indicatorplanten genoemd). Bij deze methode worden planten – veelgebruikt zijn tabaksoorten en een aantal onkruiden – bestoven met carborundumpoeder en daarna ingewreven met sap van een viruszieke plant. Dit poeder zorgt ervoor dat er tijdens het wrijven kleine wondjes in het blad ontstaan waardoor het virus kan binnendringen. Nadat het virus de plant is binnengedrongen kan het virus zich gaan vermeerderen. Soms zijn slechts enkele virusdeeltjes genoeg voor een infectie. Hiermee is de toetsplant te vergelijken met een zeer effectieve biologische PCR-machine. De besmette toetsplant geeft soms al na enkele dagen een reactie op de virusinfectie. Deze reactie kan worden waargenomen doordat de toetsplant verschillende symptomen laat zien, variërend van chlorotische of necrotische vlekken, verkleuring, misvorming, dwerggroei tot afsterving. Door het gebruik van toetsplanten kan vaak uitsluitel worden gegeven of een bepaalde plant geïnfecteerd is door een virus en aan de hand van de symptomen kan een viroloog aanwijzingen krijgen welk virus in het spel is. Hiermee is het één van de generiekste methoden om op virussen te toetsen.

*Figuur 1. Karakteristieke kringvlekken van Tobacco ringspot virus (TRSV) op de toetsplant *Nicotiana benthamiana**



¹ RT-PCR

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, een detectietechniek waarmee minimale hoeveelheden virus RNA eerst overgeschreven wordt in een DNA kopie en vervolgens exponentieel vermenigvuldigd in een PCR.

² Sequencing

Het bepalen van de basenvolgorde in het DNA of (in dit geval) RNA.

Identificatie en epidemiologie van pospiviroïden

Sinds 1988 worden in Nederland af en toe viroïden aangetroffen in het gewas tomaat. Viroïden zijn de kleinste ziekteverwekkers van planten. Ze bestaan uit een circulair RNA-molecuul van ca. 350 nucleotiden. Het meest bekend is het aardappelspindelknolviroïde (Potato spindle tuber viroid; PSTVd), de 'type-soort' van het genus Pospiviroïd. Tot dit genus behoren ook de in tomaat aangetroffen viroïden. Omdat PSTVd een quarantainestatus heeft in de Europese Unie zijn bij de vondsten maatregelen getroffen om het viroïde te elimineren. Daarbij was het van belang de herkomst van het viroïde te achterhalen. In geen van de gevallen kon echter een relatie worden gelegd met de zaadpartij of de plantenkweker.

Rond de eeuwwisseling maakte de ontwikkeling en implementatie van moleculair-biologische technieken het mogelijk de uit tomaat geïsoleerde pospiviroïden te identificeren. Vanaf dat moment werden alle pospiviroïden op basis van RT-PCR (reverse-transcriptase PCR¹) en sequencing² geïdentificeerd. Binnen het FES-project werden vervolgens meerdere isolaten van verschillende pospiviroïden verzameld en gesequenced. Met de zo verkregen data konden fylogenetische analyses worden uitgevoerd, die in het geval van PSTVd sterke aanwijzingen opleverden over de herkomst van de verschillende infecties in tomaat. De sequentie van een aantal isolaten uit tomaat bleek namelijk identiek aan die van het meest voorkomende isolaat uit het siergewas *Solanum jasminoides*. Aanvullend onderzoek onderbouwde de hypothese dat *S. jasminoides* en andere vegetatief vermeerderde gewassen de bron waren geweest van de infecties in tomaat. Dit voorbeeld laat zien dat sequentiegegevens van de ziekteverwekker een belangrijk hulpmiddel kunnen zijn om relaties tussen uitbraken in beeld te brengen en de herkomst ervan te achterhalen. Meer algemeen vormen moleculair biologische technieken daarmee een nieuw en belangrijk instrument voor epidemiologisch onderzoek.

Fytoplasma's

Fytoplasma's zijn bacterie-achtige organismen zonder celwand. In tegenstelling tot bacteriën kunnen ze niet gekweekt worden op voedingsbodems. Qua detectie- en onderzoeksmethoden komt deze groep organismen dan ook het meest overeen met virussen. Fytoplasma's worden overgebracht door bladluizen en andere cicade-achtigen. Daarnaast is enten van besmet materiaal een belangrijke verspreidingswijze. Mechanische overdracht met sap van geïnfecteerde planten is daarentegen niet mogelijk. Dit maakt het lastig om ze in collectie te houden. Ingevroren materiaal is wel bruikbaar voor toetsing maar niet geschikt voor biologisch onderzoek en instandhouding. Een collectie *in planta* is in dit geval dan ook onontbeerlijk. Binnen het uitvoeringsconsortium plantenvirussen zijn er fytoplasma-collecties aangelegd van fruitbomen geïnfecteerd met apple proliferation (appel, Figuur 3), pear decline (peer) en het nauw verwante European stone fruit yellows fytoplasma (*Prunus*). De collectie bestaat uit kleine geïnfecteerde fruitbomen en wordt in een gaaskas in stand gehouden. De bomen worden regelmatig gecontroleerd op de aanwezigheid van het fytoplasma. Deze levende collectie is van groot belang om de vele vragen die er rond het voorkomen en de verspreiding van fytoplasma-ziekten zijn, te kunnen onderzoeken en beantwoorden. De detectie van fytoplasma's in de praktijk is niet eenvoudig. Omdat de verdeling in de boom onregelmatig is en de concentratie seizoensafhankelijk, is betrouwbare monsternamen en toetsing niet eenvoudig. Daarom is binnen het FES-project ingezet op het herkennen van symptomen in de praktijk. Hiervoor is gekeken naar de symptoomontwikkeling van de vijf verschillende isolaten van appel proliferation in zes gangbare apperassen. De eerste symptomen werden twee jaar na inoculatie waargenomen. Voorlopige resultaten wijzen uit dat er inderdaad verschillen bestaan, zowel tussen de fytoplasma-isolaten als de apperassen. De symptomen zijn zorgvuldig vastgelegd om zo aan de praktijk duidelijk te maken welke symptomen duiden op infectie door het fytoplasma.



Figuur 2. Fytoplasma-aantasting van gerbera.



Figuur 3. Roodverkleuring van bladeren van het appelras Jonagold als gevolg van appelheksenbezemfytoplasma.