

Eindrapport

Relatie tussen symptomen, PepMV-varianten en tomatenrassen

Groen Agro Control

Delfgauw, juni 2006

Distributieweg 1
2645 EG Delfgauw

Eindrapport

Relatie tussen symptomen, PepMV-varianten en tomatenrassen

Uitvoerder project: Groen Agro Control

Opdrachtgever en financier:
Productschap Tuinbouw



Begeleidingscommissie: LTO Groeiservice
Gewas Tomaat



Looptijd project: mei 2005-november 2005

COLOFON:

Auteur: Adriaan Vermunt
Groen Agro Control
Distributieweg 1
2645 EG Delfgauw
Telefoon: 015-2572511
Telefax: 015-2572522
E-mail: info@agrocontrol.nl

Datum:	juni 2006
Titel Rapport:	Relatie tussen symptomen, PepMV-varianten en tomatenrassen
Opdrachtgever en financier:	Productschap Tuinbouw
PT-Projectnummer:	12265
Kernwoorden:	Tomaat, pepinomozaïekvirus.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm, elektronisch of op geluidsband of op welke andere wijze ook en evenmin in een retrieval systeem worden opgeslagen zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgevers.



Samenvatting

Pepinomozaïekvirus (PepMV) veroorzaakt in de tomatenteelt de laatste jaren steeds ernstigere symptomen, waaronder groeivertraging, necrose, wankleurigheid van de vruchten en vruchtmisvorming. Naar aanleiding van de toenemende problemen bestond de vraag bij de telers of de symptomen afhankelijk waren van:

- verschillen in PepMV-varianten;
- plaats van infectie;
- concentratie van het virus;
- verschillen in tomatencultivars;
- gebruik van onderstammen.

Daarnaast bleek uit vooronderzoek van Groen Agro Control in 2004 dat een milde virusvariant tomatenplanten kan beschermen tegen de ernstige gevolgen van virulente virusvarianten. De vraag was of dat reproduceerbaar was.

Groen Agro Control heeft een onderzoek uitgevoerd om deze vragen te beantwoorden. In het onderzoek zijn vier verschillende PepMV-isolaten uit de praktijk gebruikt met verschillende symptomen (aangeduid met GAC V1-V4). Voor deze vier isolaten zijn specifieke DNA-testen ontwikkeld om de concentratie van de individuele PepMV-varianten te kunnen bepalen. Met deze vier varianten zijn plantproeven uitgevoerd op negen tomatencultivars (rassen). Tevens zijn herbesmettingen uitgevoerd met agressieve varianten na een besmetting met een milde variant. De planten zijn wekelijks beoordeeld op virussymptomen. Tevens zijn wekelijks de concentraties van de vier virusvarianten in de planten gemeten.

Uit de beoordelingen bleek dat de symptomen afhankelijk waren van de PepMV-variant. GAC-V1 en GAC-V2 gaven geen of heel lichte virussymptomen. GAC-V3 veroorzaakte bij alle cultivars typische chlorosepatronen op de bladeren en GAC-V4 liet typische necroseplekken zien op blad en stengel. Uit de genetische testen was al gebleken dat de varianten genetisch verschillend waren, uit de symptomen bleek dat de varianten ook een verschillende werking op de plant hadden.

Tussen de verschillende tomatencultivars waren er verschillen waar te nemen in de mate van symptomen. De cherry-tomaten Aranca en Favorita lieten minder symptomen zien dan de andere cultivars. Planten die geënt waren op onderstammen vertoonden duidelijk minder virussymptomen dan ongeënte planten. De verschillende gevoeligheid voor PepMV tussen rassen enerzijds en enten op onderstammen anderzijds heeft mogelijk te maken met de groeikracht.

In tegenstelling tot de symptomen lieten de verschillende tomatencultivars geen noemenswaardige verschillen zien in het concentratieverloop van de vier PepMV-isolaten. Dus de verschillen in de geuite symptomen bij de tomatencultivars werden niet veroorzaakt door verschillen in virusconcentratie. De concentratie virus bleek zich in de planten na infectie snel op te bouwen. De concentratie nam na twee maanden af tot een laag, stabiel niveau. De plek op de plant waar de infectie plaatsvond had geen invloed op de symptomen die de planten vertoonden.

Wanneer planten eerst besmet werden met een mild PepMV-isolaat en vervolgens met een virulent PepMV-isolaat, bleek dat het milde isolaat zowel de concentratie als de symptomen van het virulente isolaat te onderdrukken.



Inhoudsopgave

	Pagina
Samenvatting	3
1. Inleiding	5
2. Materiaal & Methoden	6
2.1 Virussen en planten	6
2.2 Opzet plantproeven in kas	7
2.3 Monsternamen en beoordeling	7
2.4 Hygiënemaatregelen	7
2.5 Inoculatie	7
2.6 Virusmetingen	8
3. Resultaten	9
3.1 Afhankelijkheid van tomatencultivars en virusvariant	9
3.2 Plaats van infectie	16
3.3 Concentratie-afhankelijkheid	18
3.4 Effect van enten	20
3.5 Effect van herbesmetten	22
4. Conclusies	27
Bijlage 1 Schema plantproeven in kassen PPO	



1. Inleiding:

Pepinomozaiekvirus (PepMV) is in Nederland voor het eerst in 1999 bij tomaten geconstateerd. Het virus behoort tot de potexvirusfamilie, waarvan ook aardappelvirus X lid is. Tot 2004 waren de PepMV-symptomen redelijk mild. Maar in 2004 kwamen er bij de diagnostische service van Groen Agro Control (GAC), steeds meer tomatenplanten binnen met symptomen als ernstige groeivertraging, necrose op blad en stengel en vruchtmisvorming. De enige plantpathogeen die door GAC in deze monsters aangetroffen werd was PepMV. Andere plantpathogenen (bacteriën, schimmels en virussen) werden niet aangetroffen. Door de Plantenziektkundige Dienst (PD) werden ook geen andere plantpathogenen dan PepMV aangetoond. Meteen kwam toen de vraag op of een nieuwe PepMV-variant deze ernstige aantastingen zou kunnen hebben veroorzaakt. Daarnaast waren er ook aanwijzingen uit de praktijk dat teeltomstandigheden, concentratie van virus en plaats van infectie, van invloed konden zijn op de aard van de symptomen. Uit de praktijk kwam tevens de vraag of bij vroeg besmetten met een milde stam de planten beschermd worden tegen latere ernstige PepMV-symptomen.

Onderzoek door GAC heeft aangetoond dat er verschillende PepMV-isolaten voorkomen die variëren in symptomen in hetzelfde tomatenras. Tevens is rasafhankelijkheid geconstateerd en dat de symptomen sterk afhankelijk zijn van teeltomstandigheden. Eén virusisolaat kan in een bepaalde cultivar zeer ernstige symptomen geven, terwijl in een andere cultivar geen of lichte symptomen waar te nemen zijn.

Tevens werd in een herbesmettingsonderzoek, uitgevoerd in begin 2005, een spectaculaire bescherming vastgesteld nadat in tomatenplanten eerst een mild PepMV-isolaat werd ingebracht en daarna een necrotisch PepMV-isolaat. Planten alleen behandeld met het necrotische isolaat lieten ernstige necrose en groeiremming zien. (Fig. 1, links). De planten die eerst behandeld waren met de milde en daarna met het necrotische isolaat, waren beschermd tegen de groeiremming en necrose (Fig. 1, rechts).



Fig. 1. Voorexperiment met links een tomatenplant die alleen met een necrotische PepMV-isolaat is besmet en rechts een plant die eerst besmet is met een mild PepMV-isolaat en daarna herbesmet met het necrotische isolaat. De herbesmette plant is door het milde isolaat beschermd tegen de necrose van het necrotische isolaat. Deze manier van beschermen wordt ook wel cross-protectie genoemd.



In het hier gerapporteerde onderzoek is de invloed van een aantal veel gebruikte tomatenrassen (negen) op de aantasting onderzocht. Daarbij werd ook bekeken wat de effecten waren van verschillende PepMV-isolaten (vier), plek van infectie, de concentratie van het virus, het enten en het herbesmetten.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Virussen en planten

Virusisolaten:

Vier virusisolaten zijn gebruikt voor de besmettingen (Tabel 1). GAC-V1 is een zeer mild pepinomozaïekvirus-isolaat, die weinig symptomen geeft in tomaat. GAC-V2 is afkomstig uit een collectie van de Plantenziektenkundige Dienst (PD), die oorspronkelijk geïsoleerd is in 1999 bij een teler in Nederland. GAC-V3 is geïsoleerd in 2004 en afkomstig uit planten die typische chlorose op het blad vertoonden. GAC-V4 is in begin 2005 geïsoleerd uit planten die sterke necrose op blad en stengel lieten zien.

Tabel 1. Gebruikte PepMV-varianten.

PepMV-varianten	Isolatiejaar	Eigenschappen	Opmerkingen
GAC-V1	2004	zeer mild	
GAC-V2	1999	mild	gelijk aan isolaat nr. PD99901066
GAC-V3	2004	chlorose	
GAC-V4	2005	necrose	

Tomatenrassen:

Voor de besmettingsproeven werden negen tomatencultivars gebruikt die gangbaar zijn in de Nederlandse tomatenteelt: Aranca, Cedrico, Clotilde, Favorita, Ingar, Tricia, Ever, Growdena en Brilliant (Tabel 2). Telers die betrokken waren bij het project, hebben deze cultivars zo uitgekozen, dat de selectie representatief is voor het momenteel gangbare assortiment in Nederland.

Tabel 2. Gebruikte tomatencultivars.

Nummer	Cultivar	Zaadfirma	Type	Gewicht vrucht (gr)
T1	Aranca	Enza	cherry, tros	35
T2	Cedrico	RijkZwaan	tros	115
T3	Clotilde	Syngenta	tros	125
T4	Favorita	De Ruiter	cherry, los	15
T5	Ingar	Enza	los	100
T6	Tricia	De Ruiter	tros	150
T7	Ever	Bruinsma	tros, grof	130
T8	Growdena	Syngenta	vlees	230
T9	Brilliant	Bruinsma	tros, grof	140



2.2 Opzet plantproeven in kas

Van 13 mei 2005 tot 19 oktober 2005 zijn plantproeven uitgevoerd door Groen Agro Control. De proeven werden uitgevoerd in de kassen PPO (Praktijkonderzoek Plant & Omgeving) in Naaldwijk. De gewasverzorging werd door PPO uitgevoerd. De eerste besmettingen met de vier pepinomozaïekvirus (PepMV)-varianten GAC-V1, GAC-V2, GAC-V3 en GAC-V4 zijn uitgevoerd op 18 mei 2005. De planten die hiervoor gebruikt zijn, kwamen van plantenkweker Vreugdenhil en waren vier weken oud na zaaien toen ze op 13 mei afgeleverd waren in de kas. In deze planten werd door Groen Agro Control geen virus aangetoond. De verschillende experimenten zijn uitgevoerd in vier compartimenten. Schema's van de compartimenten met de gebruikte tomatencultivars en PepMV-varianten staan in Bijlage 1.

2.3 Monsternamen en beoordeling

Elke week zijn bladmonsters geanalyseerd op de aanwezigheid, varianttype en concentratie van de virusvarianten. Tevens zijn de planten elke week beoordeeld op de aanwezigheid en aard van virussymptomen en foto's genomen van planten met en zonder symptomen.

2.4 Hygiënemaatregelen

Tijdens de gewasverzorging, monsternamen en waarnemingen is een strikte hygiëneprotocol in acht genomen. Gedurende de looptijd van de proeven zijn geen ongewenste kruisbesmettingen geconstateerd. De beschreven effecten zijn dus volledig toe te schrijven aan de virusisolaten die volgens het plan zijn ingebracht.

2.5 Inoculatie

Tomatenplanten van vier weken oud, zijn besmet met PepMV (V1, V2, V3 en V4), door de bladeren licht te beschadigen met schuurpapier en vervolgens 2 µl van een viruspreparaat aan te brengen. Dit is uitgevoerd op twee verschillende hoogtes van elke plant.

Voor de herbesmetting zijn planten tijdens de eerste besmetting op bovenstaande manier geïnoculeerd met een mild PepMV-isolaat (V1 of V2). Zes weken na de eerste besmetting is er besmet met een virulente PepMV-isolaat (V3 of V4). Voor de tweede besmetting is plantensap met virus ingesmeerd op bladeren die licht zijn beschadigd met schuurpapier. Dit is uitgevoerd op twee hoogtes van elke plant.



2.6 Virusmetingen

ELISA

De aan- of afwezigheid van PepMV is bepaald met de methode *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA). Hierbij wordt gebruik gemaakt van antistoffen die alle PepMV-isolaten herkennen.

Real-time PCR

Met de DNA-techniek real-time PCR kan de hoeveelheid PepMV gekwantificeerd worden. Tevens kan er met deze techniek onderscheid gemaakt worden tussen de verschillende PepMV-varianten. Hiervoor worden PCR-primers gebruikt die specifiek één variant herkennen. Voor deze methode wordt eerst het RNA van het virus geïsoleerd, daarna wordt het RNA omgezet in cDNA. Op dit cDNA kan in de Polymerase Chain Reaction (PCR) met specifieke primers een stukje DNA geamplificeerd en gedetecteerd worden. Door verschillende monsters met elkaar te vergelijken kunnen de verhoudingen van PepMV in de monsters worden bepaald. Voor de hier omschreven experimenten is een algemene PCR-primerset gebruikt die alle PepMV-varianten aantonen en vier specifieke PCR-primersets die speciek GAC-V1, GAC-V2, GAC-V3 of GAC-V4 aantonen. Voor elke serie metingen werd voor elke variant een bestaande standaard meegenomen die geïndexeerd is op 100. De te meten monsters krijgen een waarde t.o.v. deze standaard. De standaarden zijn monsters die met ELISA sterk positief waren. Als in een monster bijvoorbeeld V1 en V3 gemeten wordt en V1 geeft in de grafiek een waarde van 50 en V3 een waarde 10, dan is de concentratie van V1 50% van de V1-standaard en de concentratie van V3, 10% t.o.v. de V3-standaard. De standaarden voor V1, V2, V3 en V4 zijn allemaal nagenoeg gelijk in concentratie.



3. RESULTATEN

3.1 Afhankelijkheid van tomatencultivars en virusvariant

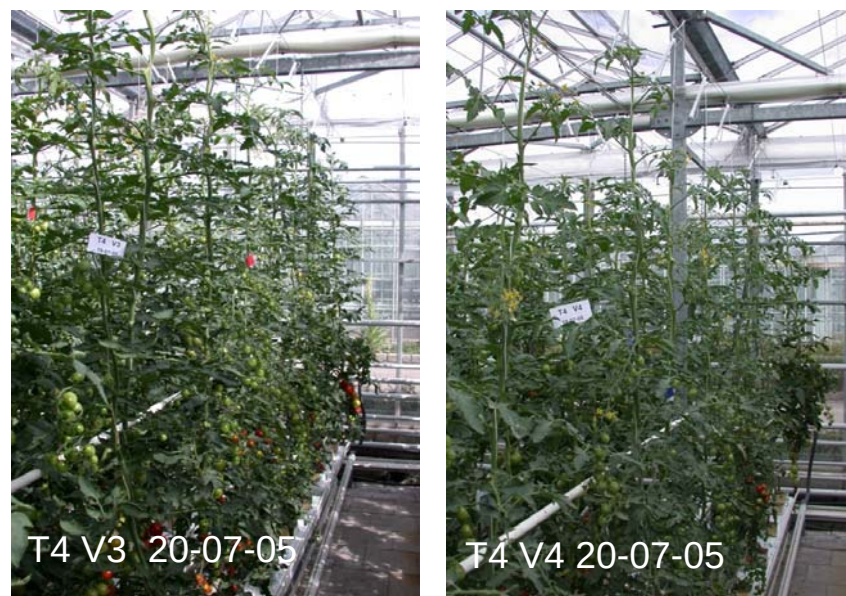
Gedurende de besmettingsproeven met vier PepMV-varianten (Tabel 1), bleek het type virussymptomen sterk afhankelijk te zijn van de gebruikte virusvariant. Hiertoe werden negen verschillende tomatencultivars (Tabel 2) besmet met de vier virusvarianten.

Virusproductie veroorzaakt groeiachterstand

Alle planten met virus lieten na 3 weken dunnere koppen zien ten opzichte van planten zonder virus. Ook op andere delen van de plant was duidelijk te zien dat de aanwezigheid van virus groeiachterstand opleverde. In Fig. 2. is goed te zien dat het gewas, in dit geval cultivar Favorita, met virus (V1, V2, V3 en V4) er dunner bij staat dan zonder virus (V0). De verschillen waren het grootst bij Favorita. Bij andere cultivars waren de verschillen ook duidelijk maar toch niet zo groot als bij Favorita.



Fig. 2. Overzicht gewas van cultivar Favorita (T4) zonder virus (V0) en met de PepMV-varianten GAC-V1, -V2, -V3 en -V4. Alle PepMV-varianten veroorzaakten groeivertraging, hetgeen zich uitte in planten die dunner in het blad zaten (V1, V2, V3 en V4) dan planten zonder virus (V0).





De varianten GAC-V1 en GAC-V2 gaven bij alle negen cultivars lichte virussymptomen, zoals licht trekken van het blad in de kop, iets meer bobbeligheid op de bladeren net onder de kop en enige groeiremming (Fig. 2). GAC-V2 gaf iets meer groeiremming dan GAC-V1 en bij GAC-V2 was af en toe een geel virusvlekje waar te nemen, terwijl dit niet het geval was bij GAC-V1. De twee andere varianten GAC-V3 en GAC-V4 gaven ook groeiremming. Deze was tot en met juli gelijk of sterker in vergelijking tot GAC-V2 (Fig. 2).

Variant GAC-V3, die in het najaar van 2004 uit de praktijk is geïsoleerd, gaf in alle cultivars typische chlorose, felgele vlekpatronen op de bladeren (Fig. 3 en Fig. 4). Deze chlorose was alleen waar te nemen in de maand juni.



Fig. 3. Chlorotische symptomen op het blad in het cultivar Aranca (T1) met PepMV-isolaat GAC-V3 op 16 juni 2005 (links) en 30 juni 2005 (rechts).



Fig. 4. Chlorotische symptomen op het blad in het cultivar Growdena (T8) met PepMV-isolaat GAC-V3 op 9 juni 2005 (links) en 16 juni 2005 (rechts).



Een virulente variant die geïsoleerd is in januari 2005, genaamd GAC-V4, gaf bij alle cultivars typische necrose op het blad (Fig. 5 en Fig. 6). Het ontstaan van bladnecrose is opgemerkt in twee periodes gedurende de proef, namelijk in de maand juli tot begin augustus en in de periode van september tot en met half oktober, het einde van de proef. In de tussenliggende periode, augustus, kwamen er geen nieuwe necrosesymptomen bij. Hier en daar was ook necrose op de onderkant van bladstelen waar te nemen in augustus (Fig.7) In de tweede periode van nieuwe necrosesymptomen (september, oktober) ontstonden er naast necrosesymptomen op de bladeren (Fig. 8) ook duidelijke necrosevlekken op de bladstelen en stengels. Een overzicht van de symptomen is weergegeven in Tabel 3. Gedurende de proef waren er geen duidelijke vruchtsymptomen waar te nemen. Dit is te verklaren doordat de besmetting is uitgevoerd in een relatieve gunstige tijd voor de tomaten (eind mei). In de praktijk komen vruchtsymptomen voornamelijk voor in het vroege voorjaar en het late najaar.



Fig. 5. Beginnende bladnecrose van V4 in Ever.



Fig. 6. Bladnecrose van V4 in Clotilde.



Fig. 7. Bladsteel necrose van V4 in Tricia.



Fig. 8. Bladnecrose van V4 in Brilliant.



De cherry-tomaten Aranca en Favorita

Aranca liet met de necrotische variant minder symptomen zien dan de andere rassen. In juli en augustus was er helemaal geen necrose waar te nemen, terwijl dit wel het geval was bij de andere cultivars. Eind september was er alleen bij enkele planten lichte necrose op blad en stengel te zien. De chlorotische PepMV-variant V3 veroorzaakte bij Aranca wel sterke chlorotisch symptomen, maar alleen bij enkele planten (Fig. 3). De andere cherry-tomaat die meegenomen is in het experiment, Favorita, liet net zoals Aranca, met V4 geen necrose zien tijdens de eerste periode van necrose in juli. Maar, in de tweede periode van necrose, half september tot half oktober, was er echter wel blad- en stengel necrose waar te nemen bij zowel Aranca als Favorita. Alhoewel, de mate van necrose bij Aranca in de meeste planten ook in deze periode lichter was dan bij de meeste andere cultivars.

De vleestomaat Growdena

In de tweede periode van necrose viel verder op dat bij Growdena, de enige vleestomaat in het experiment helemaal geen necrosesymptomen, met V4, waar te nemen waren.

De grove trostomaten Ever en Brilliant

Ever en Brilliant waren beide gevoelig voor het optreden van chlorose- en necrosesymptomen. Bij Ever was de chlorose (vergeling) iets minder sterk dan bij Brilliant (Tabel 3)

De trostomaten Cedrico, Clotilde en Tricia en de losse tomat Ingarr

De ander cultivars, Cedrico, Clotilde, Tricia en Ingarr waren ook allemaal gevoelig voor chlorose- en necrosesymptomen. Wat betreft de chlorose was deze minder prominent aanwezig bij Cedrico en Clotilde dan bij Tricia en Ingarr.

Tabel 3. Overzicht van optreden virussympptomen in negen cultivars.

- : geen chlorose of necrose geobserveerd in 11 besmette planten van een cultivar;
- + : lichte mate van chlorose/necrose en maar enkele van 11 besmette planten vertoonden symptomen;
- ++: duidelijke chlorose/necrose en meeste van 11 besmette planten vertoonden symptomen.

nrs.	cultivars	juni bladchlorose V3 (chlorose)	juli - begin aug bladnecrose V4 (necrose)	half sept – half okt blad- en stengel necrose V4 (necrose)
T1	Aranca	+	-	+
T2	Cedrico	+	++	++
T3	Clotilde	+	++	++
T4	Favorita	++	-	++
T5	Ingarr	++	++	++
T6	Tricia	++	++	++
T7	Ever	+	++	++
T8	Growdena	++	+	-
T9	Brilliant	++	++	++
T9 ent	Brilliant ent	+	+	+



Concentratieverloop van PepMV-varianten in de negen tomatencultivars

Naast het waarnemen van virussymptomen zijn virusconcentraties bepaald van onbesmette en PepMV-besmette planten. Hiervoor zijn monsters genomen van bladeren net onder de kop (eerst volgroeide blad onder de kop). Van deze monsters is bepaald of er PepMV aanwezig was en in welke relatieve concentratie (ten opzichte van standaarden). Als er twee PepMV-varianten bij elkaar zaten, in het geval van de herbesmettingen, zijn de afzonderlijke varianten gemeten om zodoende te bepalen welke variant de overhand heeft en in welke verhouding.

Gedurende de hele proef bleven de onbesmette planten vrij van PepMV. Er zijn dus geen kruisbesmettingen opgetreden door gewashandelingen en monsternamen in de onbesmette planten (V0).

De concentratie van GAC-V1 nam toe na de besmetting op 18 mei (Fig. 9). Daarna daalde de concentratie. Eind juni was er een tweede piek van GAC-V1 in alle cultivars. Gedurende de maanden juli en augustus was de concentratie heel laag. In september en oktober nam de virusconcentratie weer iets toe (Fig. 9).

Ook voor GAC-V2 was er een viruspiek eind juni, vier weken na de besmetting (Fig. 10). De gemiddelde hoogte van de pieken van V2 was ongeveer een factor 7 hoger dan de gemiddelde hoogte van de V1-pieken. In de maanden juli en augustus was ook bij V2 de virusconcentratie heel laag en nam weer toe in september en oktober. Op het eind was de virusconcentratie een factor 3 hoger dan bij V1. De virusconcentratie en het verloop daarvan gaven geen noemenswaardige verschillen tussen de verschillende cultivars.

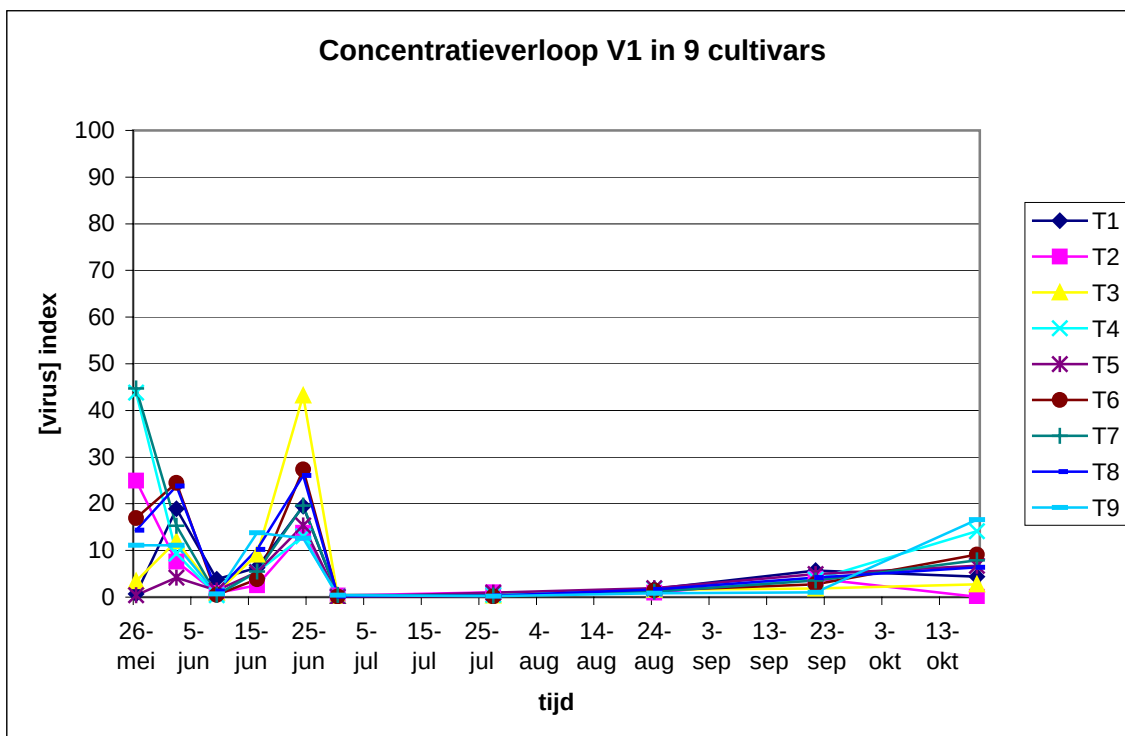


Fig. 9. Concentratieverloop van GAC-V1. RT-PCR met algemene PepMV-primers. Een GAC-V3 standaard is op 100 gezet.

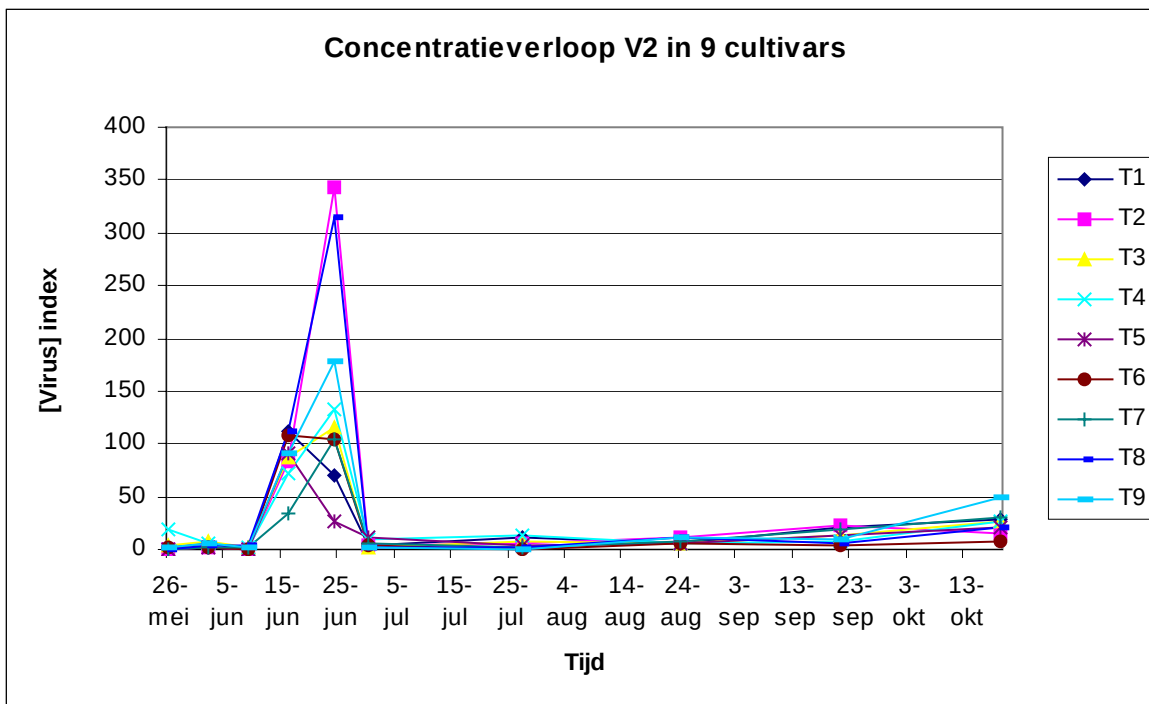


Fig. 10. Concentratieverloop van GAC-V2 in 9 cultivars. RT-PCR met algemene PepMV-primers. Een GAC-V3 standaard is op 100 gezet.

Ook voor V3 en V4 waren er geen serieuze verschillen tussen de verschillende cultivars (Fig. 11 en 12). En ook hier was er bij beide virusvarianten een kleine piek in de eerste twee weken. Daarna zakte de concentratie om vervolgens een hoge piek te geven vier weken na de besmetting. Bij V4, de necrotische variant, was de eerste piek hoger dan bij V1, V2 en V3. De chlorotische virusvariant V3, gaf de hoogste viruspiek na vier weken, een factor 60 hoger dan V1, een factor 9 hoger dan V2 en een factor 3 hoger dan V4. Ook bij V3 en V4 was een geleidelijke toename te zien van virusconcentratie in augustus en september. Maar de concentratie bereikte echter niet de hoogte van de piek van 4 weken na besmetting. Op het eind van de proef was de gemiddelde virusconcentratie in planten met V3 bijna even hoog als in planten met V4. V3 en V4 zaten op het einde van de proef een factor 15 hoger dan V1 en een factor 5 hoger dan V2.

Een opvallend verschil tussen V3 en V4 is dat V3-symptomen (chlorose) gelijk vallen in de tijd met de viruspiek, terwijl V4-symptomen (necrose) na de viruspiek verschijnen. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat bij chlorose de plantencellen niet afsterven en bij necrose wel. Tijdens de virusvermeerdering wordt chlorofyl afgebroken (chlorose) en de virussen kunnen zich verspreiden naar andere cellen waar vervolgens weer vermeerdering en weer chlorose optreedt. Hierdoor valt de viruspiek en de symptoompiek samen. Dus hier geldt veel virus vermeerdering en tegelijkertijd veel verspreiding. In het geval van necrose sterft bladmateriaal af, dan is er lokaal veel virus, maar het virus verspreidt zich dan niet zo snel omdat de plantencellen afsterven. Lokaal is er veel virus, maar de celsterfte voorkomt verdere verspreiding. Bij necrose vermeerderd dus eerst het virus en bij het optreden van de symptomen zal de virusconcentratie dalen.

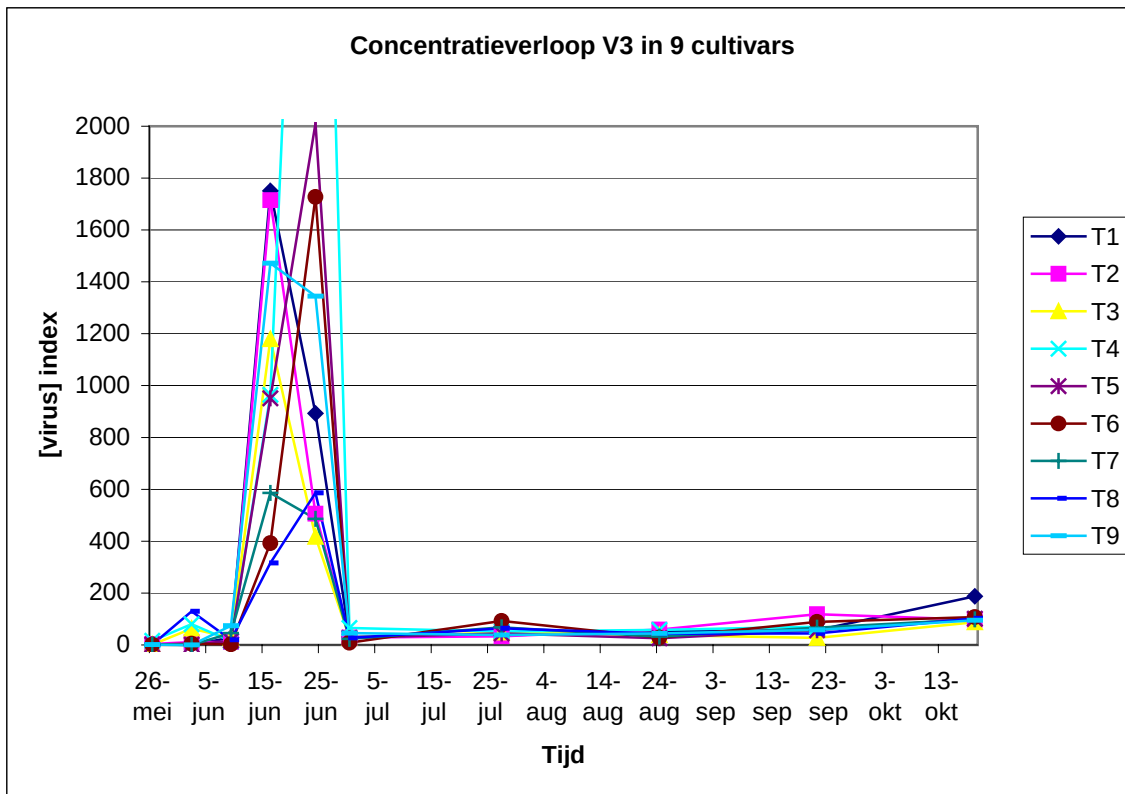


Fig. 11. Concentratieverloop van GAC-V2 in negen cultivars. RT-PCR met algemene PepMV-primers. Een GAC-V3 standaard is op 100 gezet.

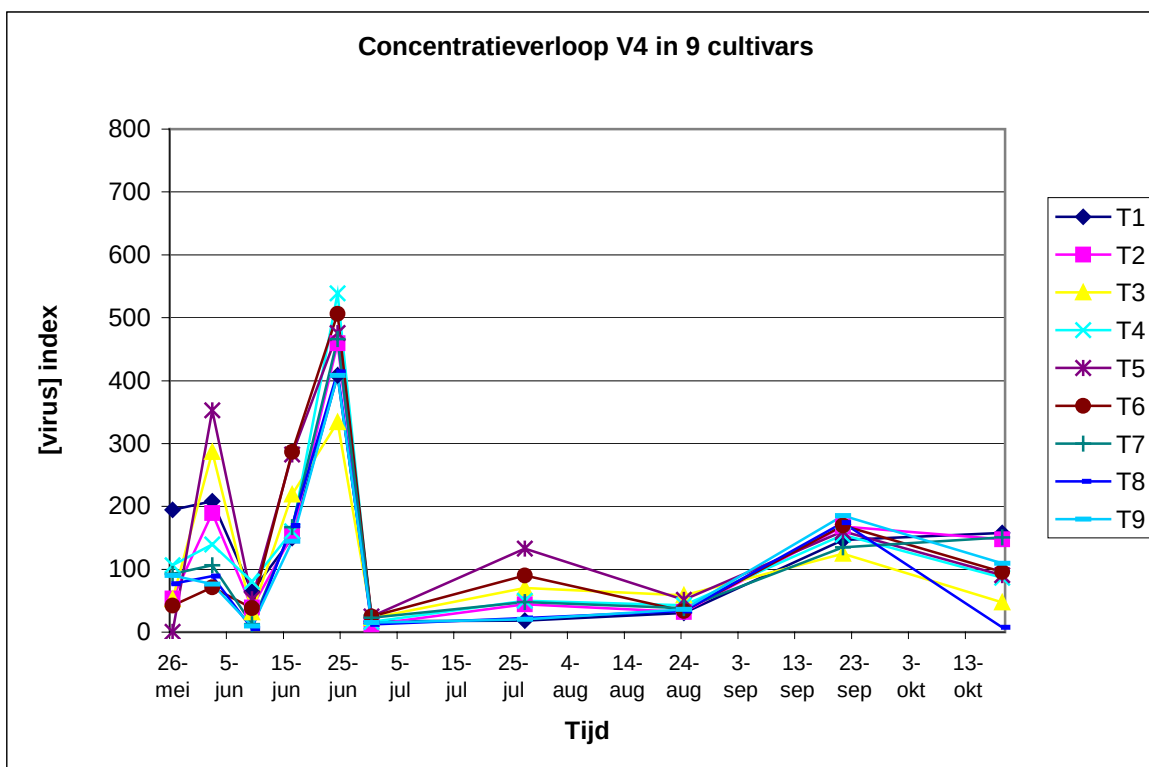


Fig. 12. Concentratieverloop van GAC-V4 in negen cultivars. RT-PCR met algemene PepMV-primers. Een GAC-V3 standaard is op 100 gezet.



3.2 Plaats van infectie

Bij het ras Brilliant is onderzocht of de plaats van infectie van invloed is op de uiting van symptomen en het concentratieverloop van de virusvarianten. Er is op verschillende plaatsen geïnoculeerd met V3 en V4: hoog in de stengel, laag in de stengel, in het blad hoog in de plant en in het blad laag in de plant. In de bladeren net onder kop is de virusconcentratie bepaald. Voor het optreden van symptomen was er geen duidelijke relatie aantoonbaar. De aard van de symptomen veroorzaakt door V3, was voor alle plaatsen van infectie hetzelfde als in Fig. 3 en Fig. 4, waar in het blad op middenhoogte van de plant geïnfecteerd is. Hetzelfde geldt voor V4. De symptomen waren ook hier, op verschillende plaatsen van infectie (Fig. 13), vergelijkbaar met die van infectie in het blad op middenhoogte (Fig. 5 t/m Fig. 8). Voor zowel V3 als V4 geldt dat het concentratieverloop (Fig. 14) globaal hetzelfde is als in Fig. 11 en Fig. 12, waar geïnoculeerd is op middenhoogte van de plant. Ook hier was er gedurende de eerste twee weken een klein piekje en twee weken daarna een grote viruspiek. Vervolgens bleef de concentratie laag in juli en nam daarna langzaam toe in augustus in september. Voor V3 zijn wel enkele verschillen te zien in de piekhoogte voor de verschillende plekken van inoculatie. Maar deze verschillen kwamen echter niet tot uiting bij de V4-besmettingen. Er kunnen dus geen conclusies getrokken worden welke plaats van besmetting de hoogste virusconcentratie geeft. In de eerste paar weken zullen er waarschijnlijk wel verschillen zijn, maar na een paar weken als de grote viruspiek komt zijn de verschillen tussen de verschillende behandelingen klein geworden.



Fig. 13. Voorbeelden van symptomen veroorzaakt door GAC-V4 in cultivar Brilliant (T9). Plaats van infectie had geen invloed op aard van symptomen. Bl, blad; st, stengel; la, laag in de plant; ho, hoog in de plant.

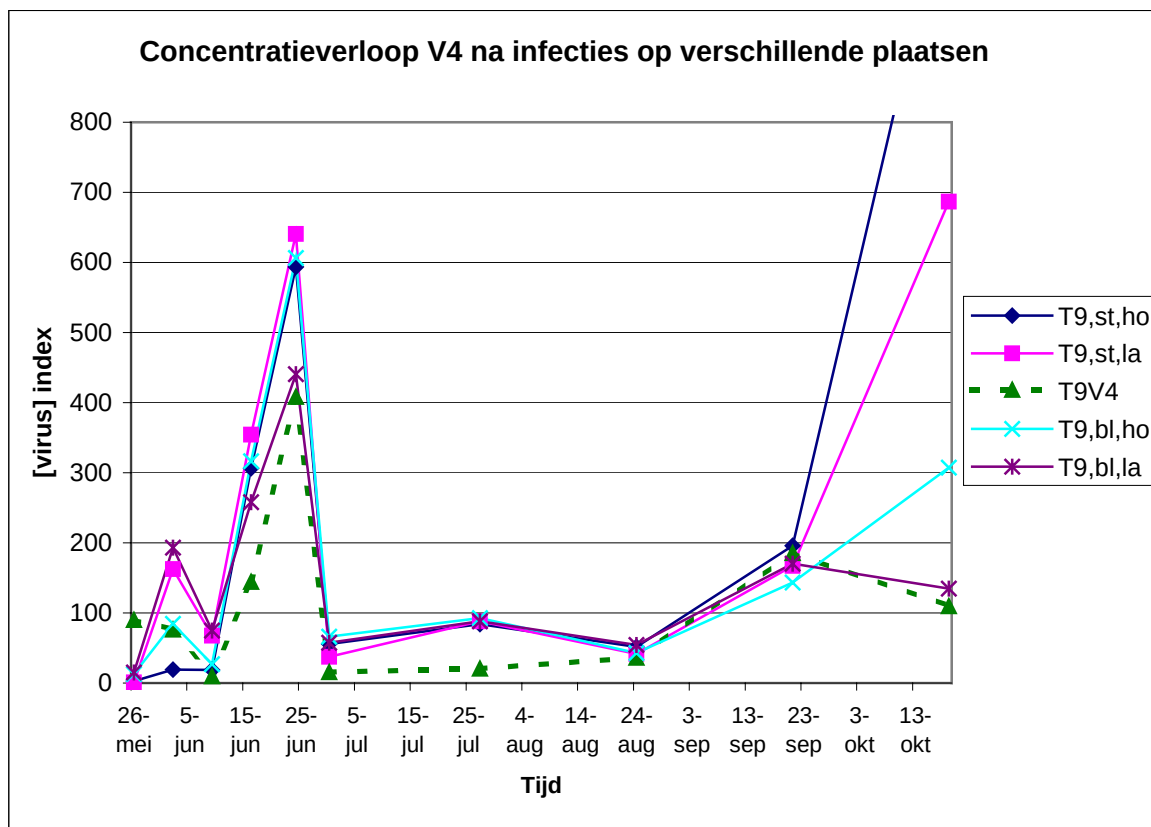
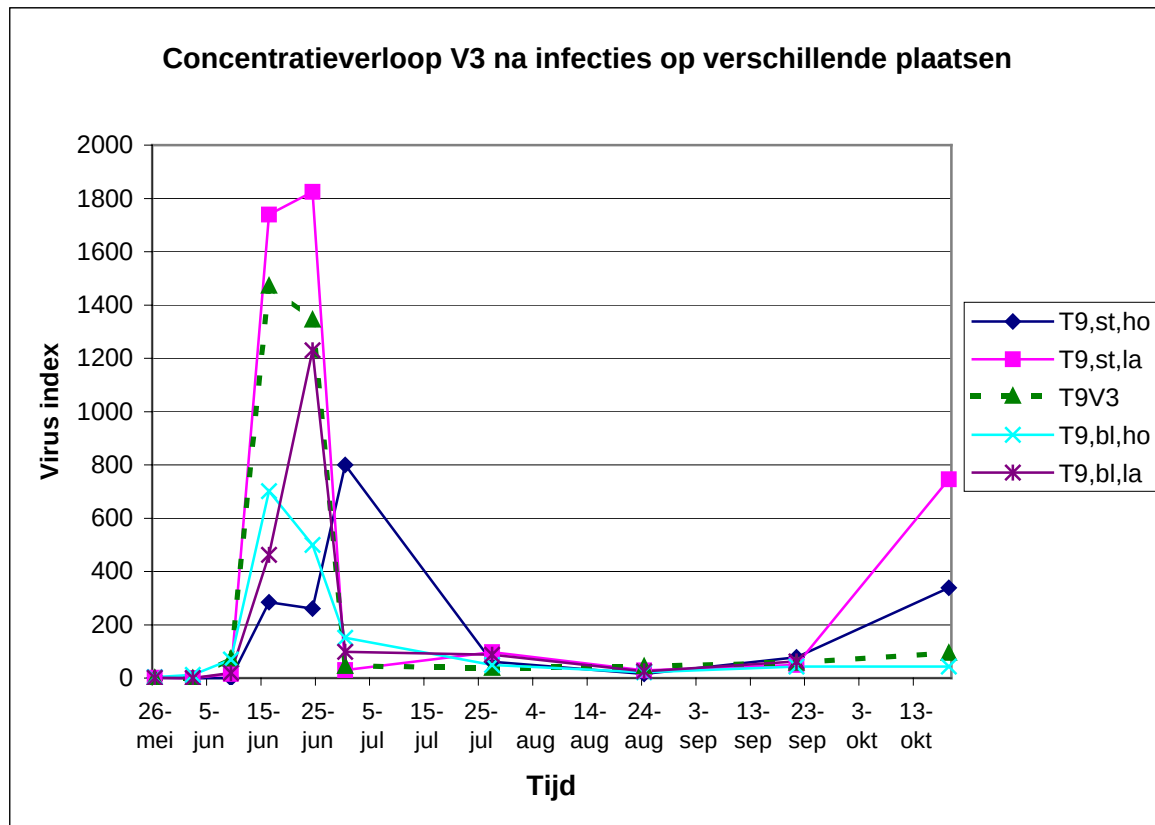


Fig. 14. Concentratieverloop van GAC-V3 (A) en GAC-V4 (B) in cultivar Brilliant (T9) na besmetting met PepMV op vijf verschillende plaatsen: T9V3 en T9V4 (blad, middenhoogte); T9, st, ho (stengel, hoog in de plant); T9, st, la (stengel, laag in de plant); T9, bl, ho (blad, hoog in de plant); T9, bl, la (blad, laag in de plant). RT-PCR met algemene PepMV-primers. Een GAC-V3 standaard is op 100 gezet.



3.3. Concentratie-afhankelijkheid

Tevens is er gekeken of de virusconcentratie van invloed is op de symptomen en concentratieverloop van het virus na inoculeren. Dit is weer alleen bij het cultivar Brilliant (T9) bekeken. Bij de lagere concentraties van V4 (100x en 10.000x verdund; resp. 10^{-2} en 10^{-4} V4) kwamen de symptomen een paar weken later opzetten dan bij onverdunde viruspreparaten (Fig. 15).

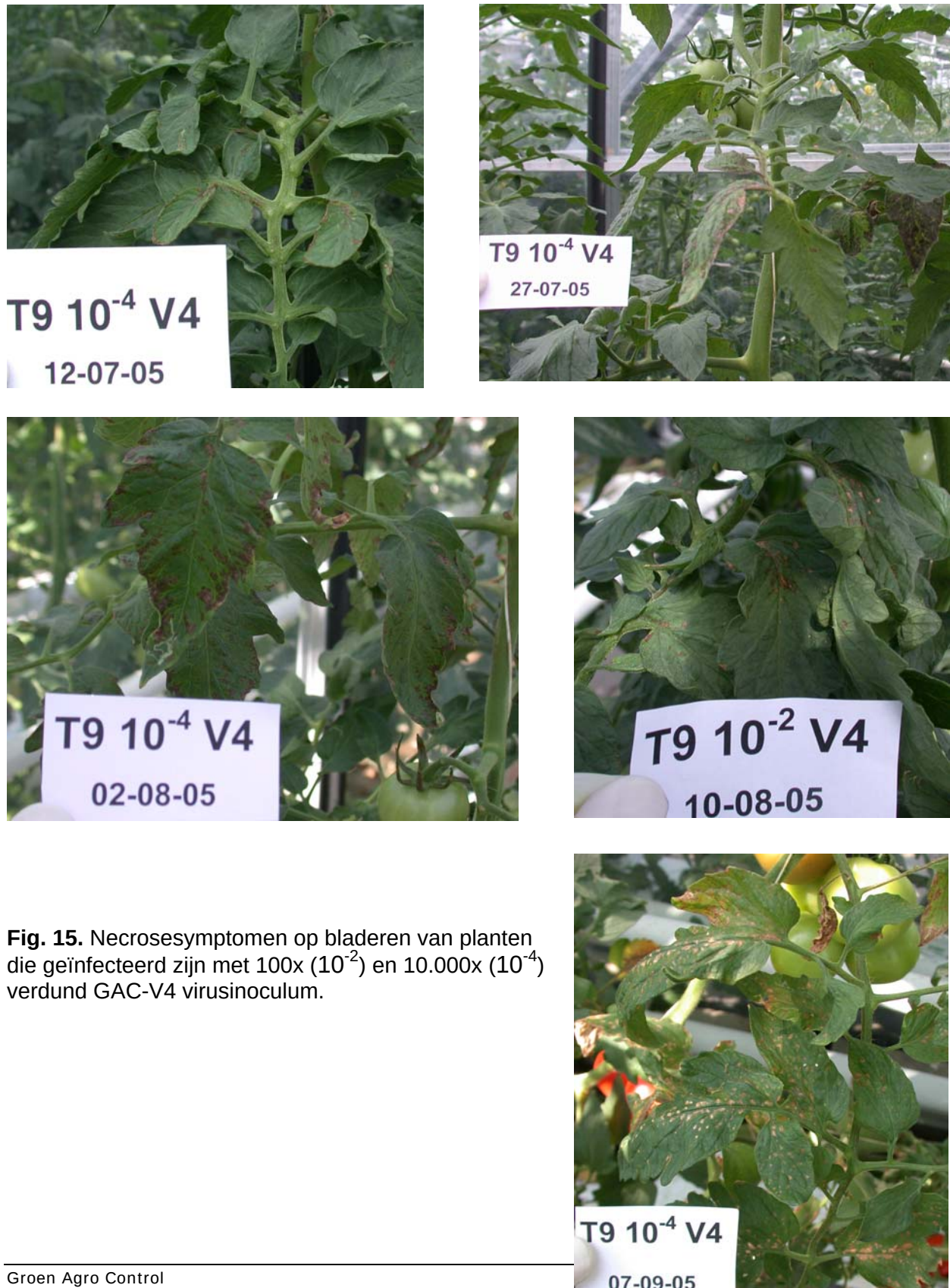


Fig. 15. Necrosesymptomen op bladeren van planten die geïnfecteerd zijn met 100x (10^{-2}) en 10.000x (10^{-4}) verdund GAC-V4 virusinoculum.

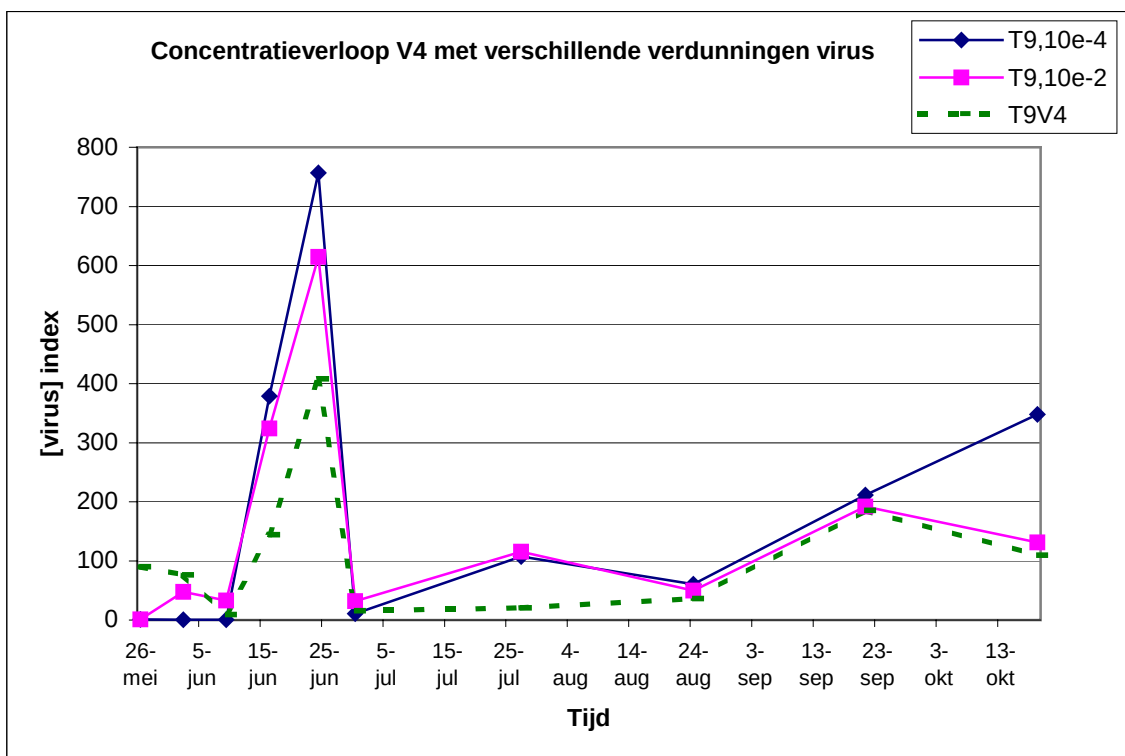
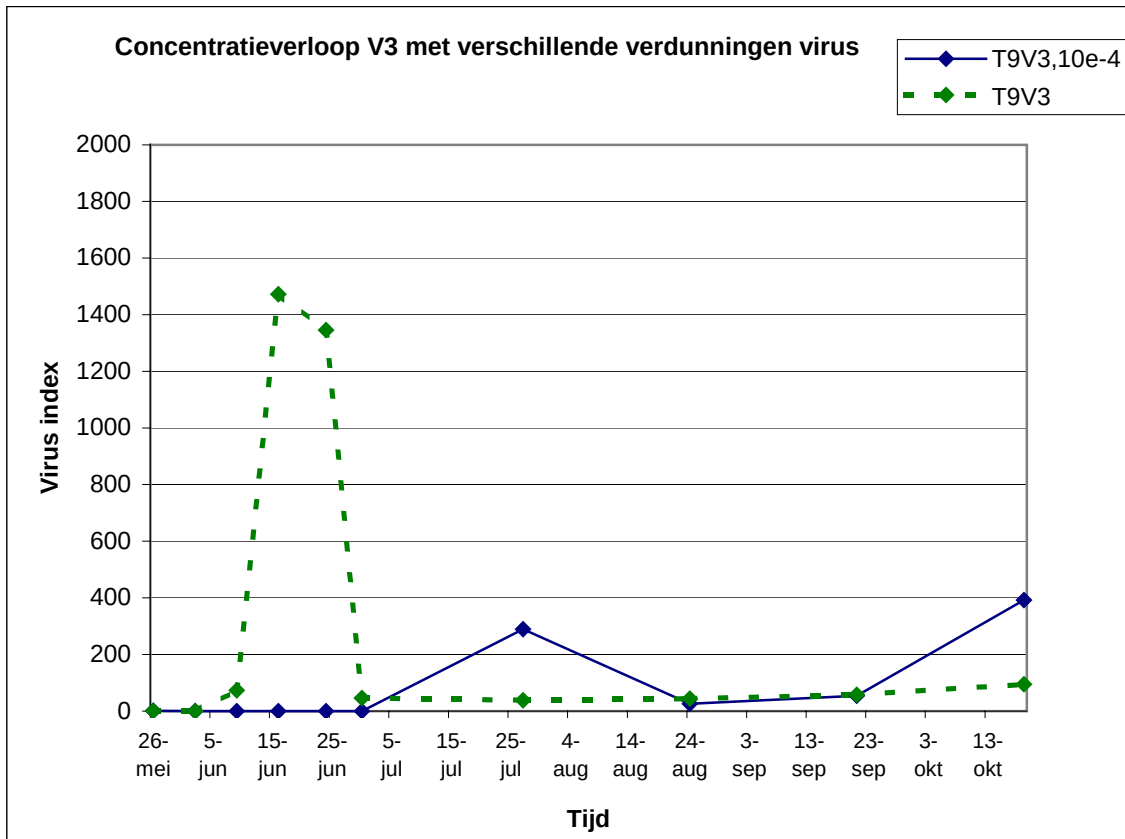


Fig. 16. Concentratieverloop van GAC-V3 (A) en GAC-V4 (B) na inoculatie van cultivar Brilliant (T9) met onverdund en 100 x en 10.000x verdund virusinoculum. RT-PCR met algemene PepMV-primers. Een GAC-V3 standaard is op 100 gezet.

Het onverdunde V3-inoculum geeft een gigantische hoge viruspiek 2 tot 4 weken na inoculatie op 18 mei (Fig. 16, boven). Daarna daalt de concentratie drastisch en blijft een



paar maanden laag. Eind augustus en september neemt de virusconcentratie weer iets toe. Als V3 10.000x verdund wordt, ontbreekt de extreem hoge viruspiek die bij het onverdunde virusinoculum na een paar weken op komt zetten (Fig. 16, boven). Wel was er een viruspiek waar te nemen eind juli. Eind augustus daalde de concentratie om eind september weer toe te nemen. De typische chlorotische V3-symptomen zijn uitgebleven bij deze verdunning.

Het onverdunde V4-inoculum gaf al na een week een redelijk hoge virusconcentratie terwijl die van de 100x en 10.000x verdunde V4-inoculum heel laag was. De hoogte van de viruspiek een maand na inoculatie was een factor 1,5 tot 2 hoger bij de verdunningen dan bij het onverdunde (Fig. 16, onder). Gedurende juli en augustus was de virusconcentratie van de verdunningen aanzienlijk hoger dan het onverdunde virusinoculum. Dit was waarschijnlijk ook de oorzaak waarom de necrosesymptomen van de verdunningen ernstiger waren dan bij de onverdunde (Fig. 16). In september en oktober waren de virusconcentraties hoger dan in juli en augustus. Dit kwam ook tot uiting in het opkomen van nieuwe necrotische vlekken op de bladeren, stelen en stengels gedurende de maand september.

3.4 Effect van enten

Bij Brilliant is ook het effect van enten onderzocht. Het is bekend dat enten over het algemeen een groeikrachtiger gewas oplevert. Dit kwam ook tot uiting in de besmettingsproeven. De planten die gebruikt zijn in deze proef, betrof Brilliant ongeënt en Brilliant geënt op de onderstam Maxifort. De geënte tomaten stonden over het algemeen voller in het blad dan de ongeënte planten, zoals ook verwacht was. Het viel op dat de geënte planten, zowel voor V3 als V4, veel minder planten virussymptomen lieten zien dan de ongeënte planten. Bij de planten die wel symptomen hadden, waren deze ook minder ernstig dan bij de ongeënte (minder vergeling bij V3 en minder necrose bij V4). Niettemin bleven ernstige symptomen niet helemaal uit (Fig. 16).



Fig. 16. Necrosesymptomen op bladeren van geënte planten (Brilliant als bovenstam en Maxifort als onderstam). De symptomen waren minder in frequentie en ernst dan bij ongeënte planten.

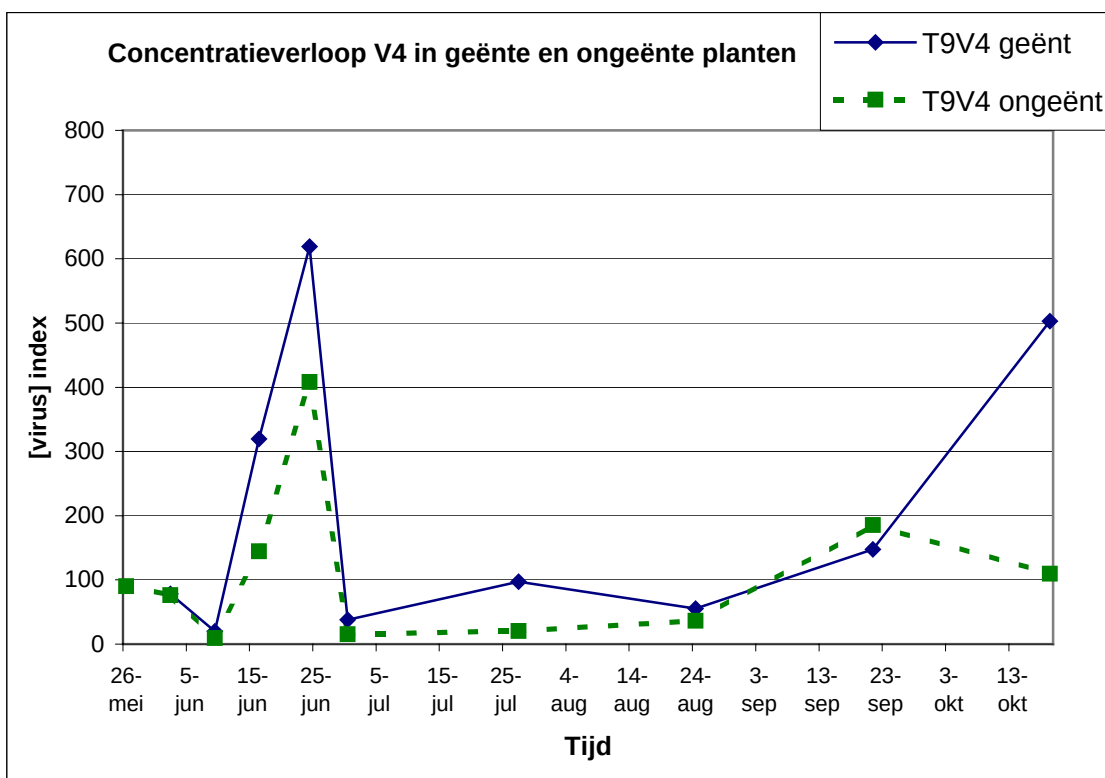
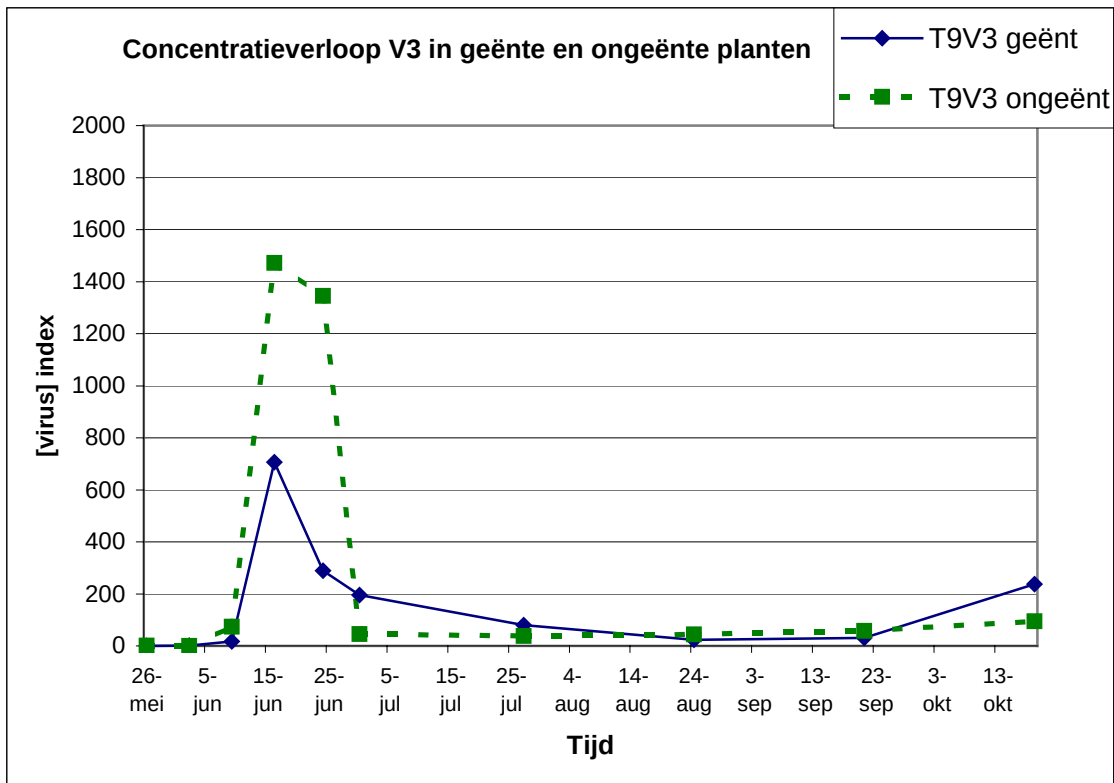


Fig. 17. Concentratieverloop van GAC-V3 (A) en GAC-V4 (B) na inoculatie van cultivar Brilliant (T9) ongeënt en geënt op onderstam Maxifort. RT-PCR met algemene PepMV-primers. Een GAC-V3 standaard is op 100 gezet.



De verschillen in het optreden van symptomen kwamen niet ondubbelzinnig tot uiting in het concentratieverloop van V3 en V4 in ongeënte en geënte planten. Bij V3 was de virusconcentratie alleen in de grote piek beduidend lager in de geënte dan in de ongeënte (Fig. 17, boven). Bij V4 echter was de virusconcentratie gedurende de hele proef meestal hoger in de geënte dan in de ongeënte (Fig. 17, onder). Het feit dat er minder necrosesymptomen waar te nemen waren terwijl de virusconcentratie toch hoger was bij de geënte, kan verklaard worden doordat bekend is dat de geënte planten groeikrachtiger zijn en daardoor meer bouwstenen aanleveren voor het virus, maar ook voor de plant zelf zodat de plant beter met het virus kan omgaan en daardoor minder symptomen waar te nemen zijn.

3.5 Effect van herbesmetten

De eerste besmetting met milde virusisolaten was uitgevoerd op 18 mei. Daarna is gevolgd hoe het virus zich vermeerdeert in de planten. Na 4-5 weken bleek dat in alle geteste planten de virusconcentratie goed hoog zat. De tweede besmetting met virulente virusisolaten is vervolgens uitgevoerd op 30 juni 2005. De virusconcentratie van de varianten zijn afzonderlijk gevolgd vanaf 30 juni 2005. De metingen hiervan zijn weergegeven in de Figuren 18-21.

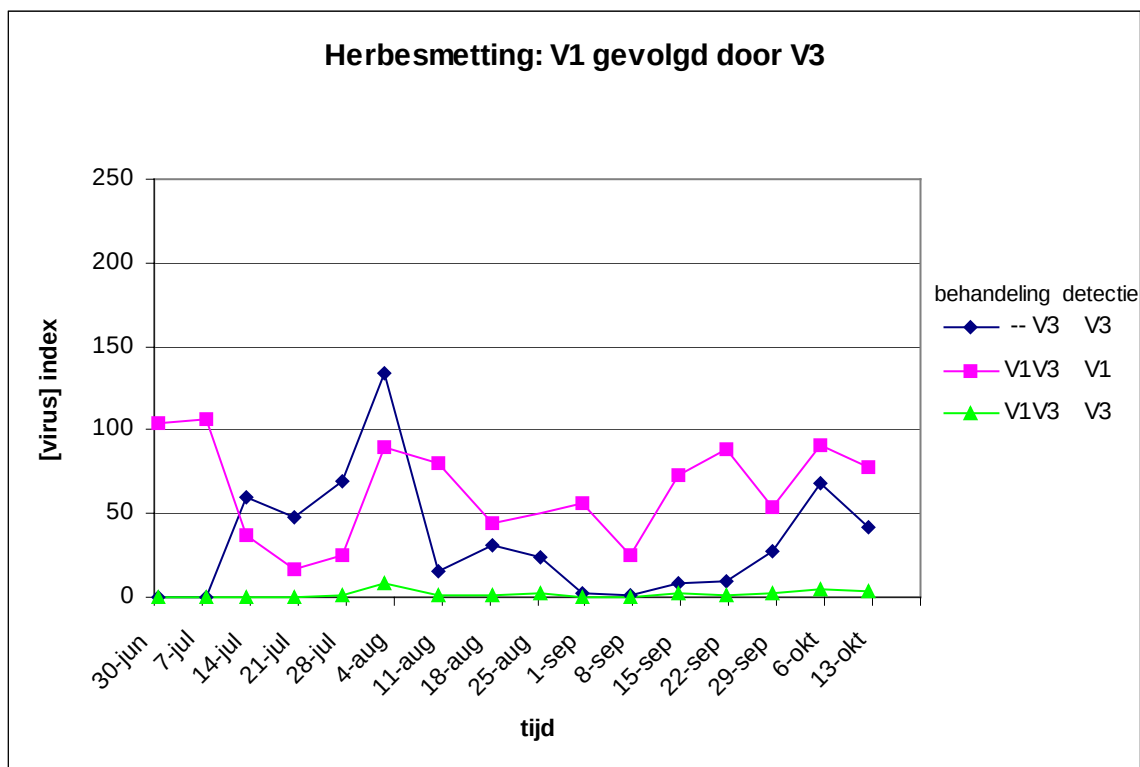


Fig. 18. Concentratieverloop van V1 en V3 in planten die alleen geïnoculeerd zijn met V3 op 30 juni (- V3) en planten die eerst geïnoculeerd zijn met V1 op 18 mei en daarna op 30 juni met V3 (V1V3). RT-PCR met V1- en V3-specifieke primers. Voor V3 is V3-standaard op 100 gezet en voor V1 is een V1-standaard op 100 gezet.



In de planten die alleen met V3 geïnoculeerd waren op 30 juni, kon na 2 weken virus aangetoond worden (Fig. 18). De piek lag op eind juli – begin augustus. Daarna daalde de V3-concentratie om in september geleidelijk toe te nemen en te pieken in begin oktober. In de planten die eerst besmet waren met V1 en 6 weken daarna met V3, kwam de V3-virusconcentratie helemaal niet opzetten. Begin augustus was er echter wel een kleine hoeveelheid V3 te detecteren. Ook op het einde van de proef komt V3 iets opzetten (Fig. 18). V1 zat op het moment van V3 besmetting (30 juni) hoog, daalde daarna en piekte vervolgens eind juli – begin augustus. Gedurende de rest van de proef schommelde de concentratie, zonder echt diepe dalen of hoge pieken. Hier is overduidelijk aangetoond dat de planten met hoge V1 concentratie, de vermenigvuldiging van V3 bijna helemaal onderdrukt (Fig. 18).

Hetzelfde beeld was waar te nemen bij planten die eerst met V2 besmet zijn en daarna met V3 (Fig. 19). Ook hier schommelt de concentratie van het milde virus, in dit geval V2. In juli en de eerste helft van augustus is de virusconcentratie relatief hoog. Eind augustus en de eerste helft van september daalt de concentratie. Eind september is er een grote V2-viruspiek. In de planten met V2 is ook na 6 weken geïnoculeerd met V3. Ook hier is te zien dat het milde virus (V2 hier) de V3-concentratie onderdrukt. De onderdrukking is echter niet zo sterk als met V1.

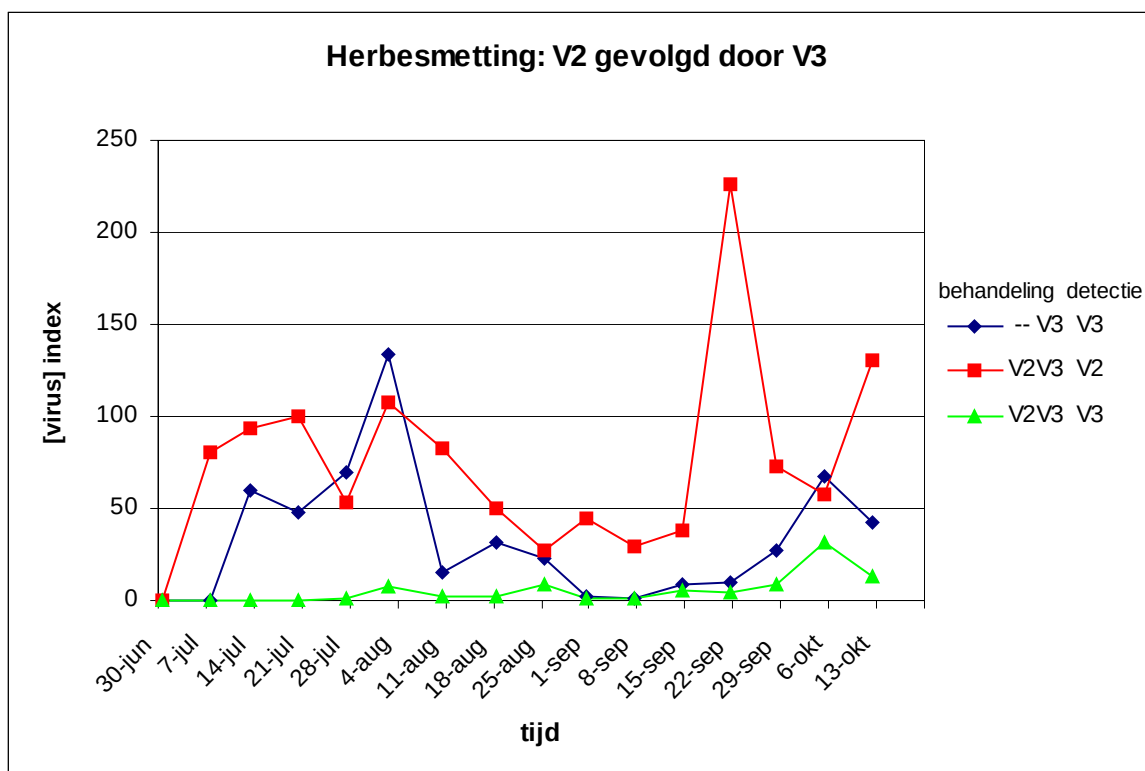


Fig. 19. Concentratieverloop van V2 en V3 in planten die alleen geïnoculeerd zijn met V3 op 30 juni (- V3) en planten die eerst geïnoculeerd zijn met V2 op 18 mei en daarna op 30 juni met V3 (V2V3). RT-PCR met V2- en V3-specifieke primers. Voor V3 is een V3-standaard op 100 gezet en voor V2 is een V2-standaard op 100 gezet.



Ook bij de planten die eerst besmet zijn met V1 en daarna met V4 is er een duidelijke onderdrukking te zien van V4 (Fig. 20). Alleen op 14 juli, was een piekje van V4 waar te nemen. Gedurende de andere tijdspunten was de V4-concentratie beduidend lager dan in de planten met alleen V4. Het feit dat er op 14 juli een piekje te zien was, werd veroorzaakt door 2 van de 22 planten die V4 bevatten. De andere planten zaten op zeer laag niveau, zoals het gemiddelde van verderop in juli. Voor 14 juli was er naar de verdeling van V1 in de planten gekeken. Toen bleek dat V1 niet in alle planten homogeen verdeeld was. Dat is waarschijnlijk de reden dat in enkele planten V4 op 14 juli iets kon toenemen. In deze planten waren ook lokaal op enkele bladeren lichte necrosesymptomen te zien half juli. In de andere planten met V1V4 waren geen necrosesymptomen waar te nemen. In tegenstelling tot de controle, V0V4, met alleen V4, waarbij alle planten half juli duidelijke necrosesymptomen lieten zien (Fig. 22). Eind september nam de concentratie van V1 iets af en de concentratie van V4 nam iets toe. Gedurende deze tijd waren er ook bij enkele V1V4-planten lichte necrosesymptomen op de bladeren waar te nemen.

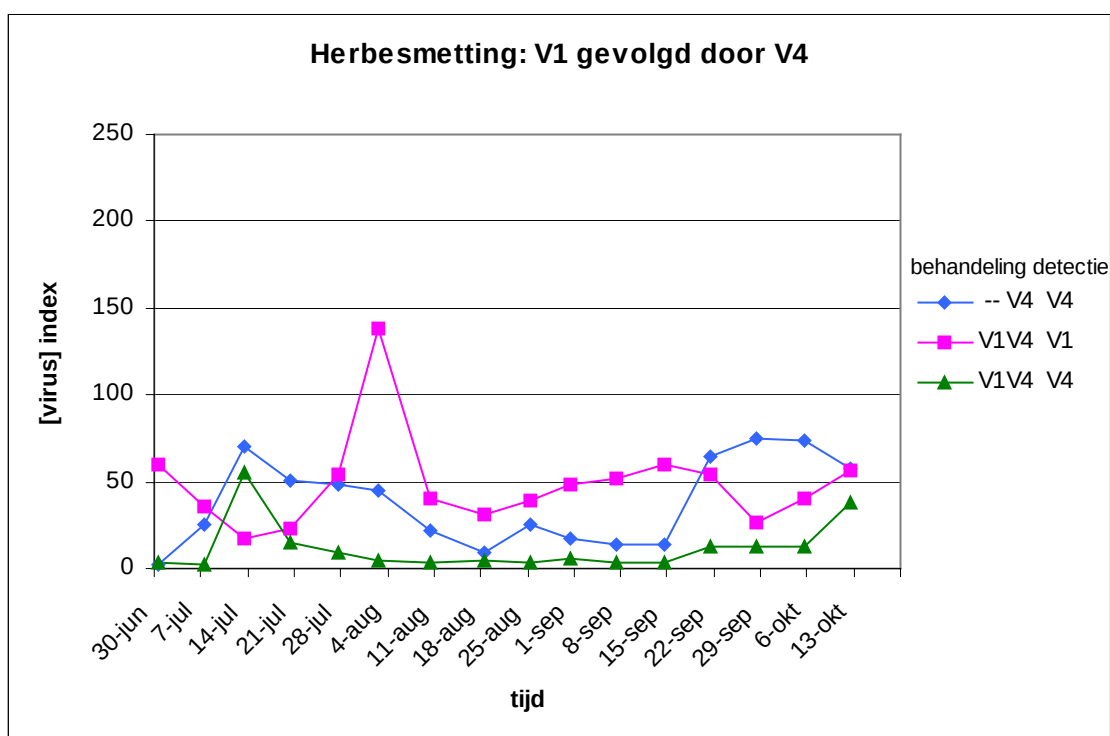


Fig. 20. Concentratieverloop van V1 en V4 in planten die alleen geïnoculeerd zijn met V4 op 30 juni (- V4) en planten die eerst geïnoculeerd zijn met V1 op 18 mei en daarna op 30 juni met V4 (V1V4). RT-PCR met V1- en V4-specifieke primers. Voor V4 is V4-standaard op 100 gezet en voor V1 een V1-standaard.

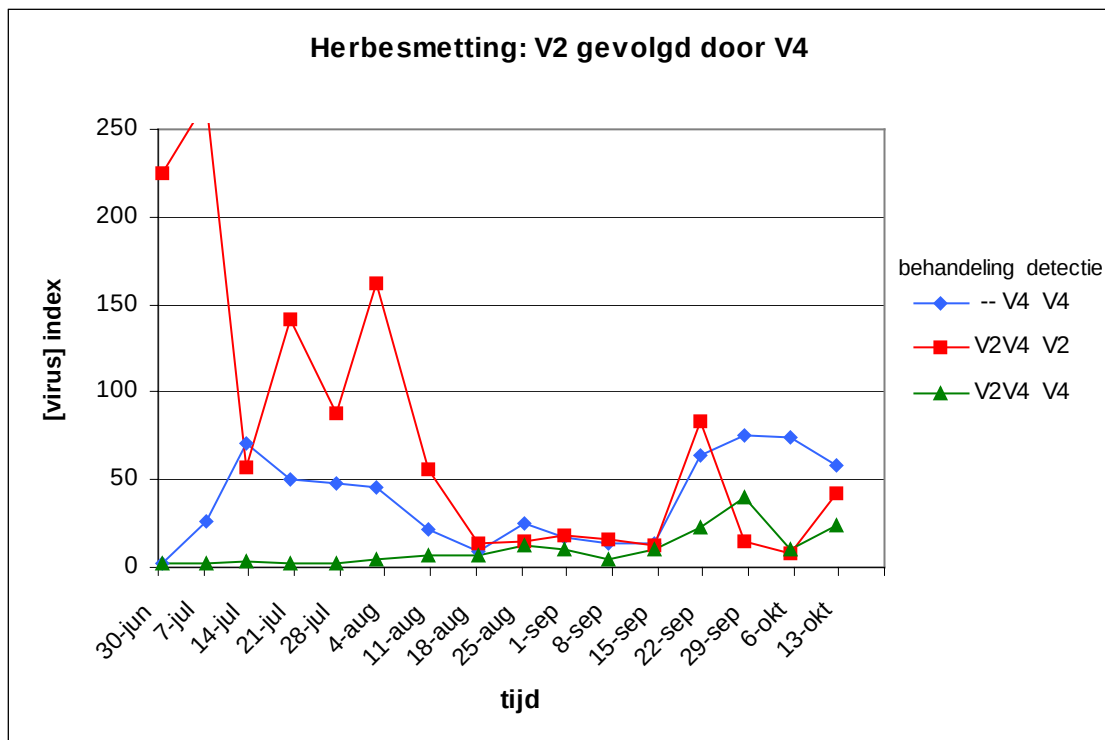


Fig. 21. Concentratieverloop van V2 en V4 in planten die alleen geïnoculeerd zijn met V4 op 30 juni (- V4) en planten die eerst geïnoculeerd zijn met V2 op 18 mei en daarna op 30 juni met V4 (V1V4). RT-PCR met V2- en V4-specifieke primers. Voor V4 is een V4-standaard op 100 gezet en voor V1 is een V1-standaard op 100 gezet.

Bij de planten die eerst besmet zijn met V2 en daarna met V4 zien we een soortgelijk beeld als bij V1V4. V2 onderdrukt ook hier de vermenigvuldiging van V4. Wat hier verder opvalt is dat V2 in het begin veel hoger in concentratie zat dan V1. Gedurende juli en de eerste helft van augustus wordt V4 bijna helemaal onderdrukt door V2 (Fig. 21). Dit kwam ook tot uiting in de onderdrukking van necrosesymptomen (Fig. 22). Wat verder opviel was dat in september de concentratie van V2 sterk daalt, waardoor V4 in concentratie kon toenemen. Bij V2V4 waren er eind september zeven planten meer die lichte necrose op het blad lieten zien dan bij V1V4 (15 van 22 planten t.o.v. 8 van 22 planten).



Fig. 22. Aan- of aanwezigheid van necrosesymptomen op planten (T9, Brilliant) die alleen met V4 zijn geïnoculeerd (V0V4) of eerst met V1 of V2 en daarna met V4 (resp. V1V4 en V2V4). Op de planten met alleen V4 (V0V4) waren op de aangegeven tijdstippen duidelijke necrosesymptomen waarneembaar, terwijl op de planten die eerst besmet waren met V1 of V2 en daarna met V4 (resp. V1V4 en V2V4), bijna geen symptomen te zien waren.



CONCLUSIES:

Virusafhankelijkheid

De aard van virussymptomen is sterk afhankelijk van het gebruikte PepMV-isolaat. GAC-V1 laat geen vlekken op de bladeren zien. GAC-V2 heel af en toe een klein geel vlekje. GAC-V3 geeft bij alle cultivars typische chlorosepatronen op de bladeren. GAC-V4 veroorzaakt typische necroseplekken op blad en stengel. Verschillende symptomen worden dus veroorzaakt door verschillende PepMV-isolaten. Alle PepMV-isolaten hebben wel de gemeenschappelijke eigenschap dat ze alle leiden tot een lichte groeiachterstand, hetgeen het eerste tot uiting komt in de kop van de plant.

Cultivarafhankelijkheid

De negen verschillende tomatencultivars laten geen noemenswaardige verschillen zien in concentratieverloop van de vier PepMV-isolaten. Wel zijn er verschillen in de mate van geuite symptomen. De cherry-tomaten Aranca en Favorita lieten minder symptomen zien dan de andere cultivars. Bij de vleestomaat Growdena was als enige in september helemaal geen necrosesymptomen waar te nemen met GAC-V4.

Plaats van infectie

De plaats van inoculatie heeft weinig invloed op het concentratieverloop van het virus in de plant. Tevens is er weinig invloed op het optreden van symptomen.

Concentratie-afhankelijkheid

Een lagere concentratie van virus veroorzaakt een vertraging van enkele weken op het optreden van symptomen. De concentratie van het ingebrachte virus heeft geen noemenswaardig effect op de aard van de symptomen.

Enten

Geënte planten vertonen minder virussymptomen dan ongeënte planten.

Herbesmettingen

Milde PepMV-isolaten onderdrukken, zowel de concentratie, als het optreden van virussymptomen, van virulente PepMV-isolaten.

Bijlage 1. Schema plantproeven in kassen van PPO

Nrs. Cultivars	Tomaten cultivars
T1	Aranca (Red Pearl, Enza)
T2	Cedrico (RijkZwaan)
T3	Clotilde (Syngenta)
T4	Favorita (De Ruiter)
T5	Ingar (Enza)
T6	Tricia (De Ruiter)
T7	Ever (Bruinsma)
T8	Growdena (Syngenta)
T9	Brilliant (Bruinsma)
T9, geënt	Brilliant, geënt
P	paprika, Goal

PepMV virussen:	
V0	geen virus
V1	milde symptomen
V2	isolaat PD99901066, milde symptomen
V3	virulent isolaat
V4	zeer-virulent isolaat

compartiment

1 blanco's en 1 mild virusisolaat

	11 planten			11 planten	
rij nr.	cultivar	virusisolaat	cultivar	virusisolaat	
1	T9		T9		
2	T1	V0	T2	V0	
3	T3	V0	T4	V0	
4	T5	V0	T6	V0	
5	T7	V0	T8	V0	
6	T9	V0	T9	V0	
7	P		P		
8	P		P		
9	P		P		
10	P		P		
11	T1	V1	T2	V1	
12	T3	V1	T4	V1	
13	T5	V1	T6	V1	
14	T7	V1	T8	V1	
15	T9	V1	T9	V1	
16	T9		T9		

compartiment**2** twee virusisolaten (V2, V3)

	11 planten			11 planten	
rij nr.	cultivar	virusisolaat	cultivar	virusisolaat	
1	T9,10e-4	V3	T9,10e-4	V3	
2	P		P		
3	T9,st,ho	V3	T9, st,la	V3	
4	T9,bl,ho	V3	T9,bl,la	V3	
5	P		P		
6	T1	V3	T2	V3	
7	T3	V3	T4	V3	
8	T5	V3	T6	V3	
9	T7	V3	T8	V3	
10	T9, ge-ent	V3	T9	V3	
11	P		P		
12	T1	V2	T2	V2	
13	T3	V2	T4	V2	
14	T5	V2	T6	V2	
15	T7	V2	T8	V2	
16	T9	V2	T9	V2	

st: stengel

ho: hoog

bl: blad

la: laag

compartiment**3** 1 virulent virusisolaat (V4)

	11 planten			11 planten	
rij nr.	cultivar	virusisolaat	cultivar	virusisolaat	
1	T9, 10e-4	V4	T9, 10e-4	V4	
2	P		P		
3	T9, 10e-2	V4	T9, 10e-2	V4	
4	P		P		
5	T9, st, ho	V4	T9, st, la	V4	
6	T9, bl, ho	V4	T9, bl, la	V4	
7	P		P		
8	T1	V4	T2	V4	
9	T3	V4	T4	V4	
10	T5	V4	T6	V4	
11	T7	V4	T8	V4	
12	T9	V4	T9	V4	
13	T9, ge-ent	V4	T9, ge-ent	V4	
14	P		P		
15	P		P		
16	T9	Tijdst1: 0	T9	Tijdst2: V4	

compartiment
4 herbesmettingsproeven

rij	22 planten	virusisolaat	
	cultivar	tijdstip 1	tijdstip 2
1	T9		
2	T9	V0	V3
3	P		
4	P		
5	T9	V1	V3
6	P		
7	P		
8	T9	V1	V4
9	P		
10	P		
11	T9	V2	V4
12	P		
13	P		
14	T9	V2	V3
15	T9		
16	T9		

tijdstip 1: direct als planten in kas staan

tijdstip 2: 6 weken na tijdstip 1