

Vaccinatie van lelies tegen LMoV: een haalbare of ongewenste resistentiestrategie?

Maarten de Kock



Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
April 2009
PPO nr. 32 340718 00
PT nr. 13433

© 2009 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervaelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



Projectnummer : 32 340718 00
PT nummer : 13433

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen, Boomkwekerijk & Fruit

Adres : Prof. van Slogterenweg 2, Lisse
: Postbus 85 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 – 48 21 00
Fax : 0252 – 48 21 21
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

Pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
1.1 Cross protectie tegen agressieve virussen	7
1.2 Aanleiding van project	8
1.3 Doelstelling	8
1.4 Werkwijze.....	9
2 KETEN- EN STAKEHOLDERANALYSE	11
2.1 Van schubbol naar leverbaar.....	11
2.2 Van leverbaar naar droogverkoop en bloem	12
2.3 Keuringen op virus	12
2.4 Stakeholders bij implementatie van vaccinatietechnologie	13
3 CRITERIA VOOR EIGENSCHAPEN VAN VACCIN.....	15
4 CONCLUSIE: LMOV-VACCINATIE NIET GEWENST IN NL	19
5 GERAADPLEEGDE LITERATUUR.....	21
BIJLAGE 1 – MEMO VOOR NIPPON DEL MONTE	23
BIJLAGE 2 – REACTIE NIPPON DEL MONTE OP MEMO	25

Samenvatting

Virusinfecties veroorzaken opbrengstverliezen en beperken tevens het internationale handelsverkeer tussen landen die strikte regelgeving hebben met betrekking tot de aanwezigheid van virussen in het plantenmateriaal. Wanneer een plant met een mild virusisolaat wordt geïnfecteerd, komt het vaak voor dat deze plant niet meer vatbaar (of minder vatbaar) is voor virusisolaten die heftige virussymptomen veroorzaken. Deze natuurlijke manier van geïnduceerde resistentie tegen agressieve virussen wordt cross-protectie genoemd. Het actief besmetten van een plant met een virusisolaat dat milde symptomen laat zien, wordt ook wel 'vaccineren' genoemd.

Het vaccineren van planten wordt door het Japanse bedrijf Nippon Del Monte (NDM) in de praktijk reeds toegepast. NDM is in het bezit van een mild isolaat van *Lily mottle virus* (leliemozaïekvirus, LMoV) dat geen of nauwelijks virussymptomen veroorzaakt en is op zoek naar partners in Nederland om voor dit isolaat de mogelijkheden van cross-protectie te bestuderen. Omdat de vaccinatietechnologie positieve verwachtingen heeft, maar ook onzekerheden, beperkingen en potentiële risico's kent, wordt in dit rapport toegewerkt naar een collectief besluit of de vaccinatietechnologie in Nederland voeten aan de grond kan gaan krijgen.

PPO-BBF heeft een stakeholder- en ketenanalyse gemaakt waarin aangegeven is welke nationale en internationale partijen in de keten betrokken zijn bij de implementatie van de vaccinatie technologie. Tevens is samen met Nederlandse lelieveredelingsbedrijven een lijst met criteria opgesteld waaraan een plantenvaccin (in algemene zin) moet voldoen. In een workshop is de vaccinatietechnologie van NDM getoetst aan deze criteria en vraagstellingen zijn geformuleerd die door middel van vervolgonderzoek beantwoord moeten worden of onderdeel kunnen zijn van validatieonderzoek van de vaccinatietechnologie tegen LMoV onder Nederlandse teeltomstandigheden.

Er wordt vooral veel waarde gehecht aan de criteria dat de vaccinatietechnologie niet mag leiden tot teeltbeperkingen, niet mag leiden tot risico-inperkende maatregelen en niet mag leiden tot handelsbeperkingen. Juist omdat introductie van de door NDM voorgestelde vaccinatietechnologie volledig van toepassing is op deze criteria, en deze bezwaren niet eenvoudig op te lossen zijn, is gezamenlijk besloten dat er vanuit Nederland geen interesse is in de ontwikkeling van de vaccinatietechnologie tegen LMoV in lelie. Daarmee komt ook een potentiële collectieve samenwerking met NDM voor een gezamenlijke ontwikkeling van de technologie te vervallen. Tevens wordt er geen vervolgonderzoek opgestart waarin aanvullende onderzoeksvragen worden uitgewerkt. Deze conclusie is samengevat in een Memo die aan NDM is toegestuurd.

1 Inleiding

1.1 Cross protectie tegen agressieve virussen

Inmiddels zijn er ruim 900 plantenvirussen gerapporteerd waarvan een aantal virussen jaarlijks miljoenen euro's schade veroorzaakt in de bloembollenteelt. Virusinfecties veroorzaken opbrengstverliezen en beperken tevens het internationale handelsverkeer tussen landen die strikte regelgeving hebben met betrekking tot de aanwezigheid van virussen in het plantenmateriaal.

Van frequent voorkomende virussen zijn vaak verschillende isolaten bekend waarbij het ene isolaat heftige symptomen veroorzaakt (agressief isolaat) en een ander isolaat mogelijk milde symptomen veroorzaakt (mild isolaat). Wanneer een plant met een mild virusisolaat wordt geïnfecteerd, dan komt het vaak voor dat deze plant niet meer vatbaar (of minder vatbaar) is voor virusisolaten die heftige virussymptomen veroorzaken. Deze natuurlijke manier van geïnduceerde resistentie tegen agressieve virussen wordt cross-protectie genoemd. Er kunnen verschillende processen ten grondslag liggen aan cross-protectie:

- Als gevolg van de aanwezigheid van mantelwit van het reeds aanwezige virus in de plant, is een nieuw binnendringend virus niet in staat om het erfelijk materiaal vrij te maken voor verdere vermeerdering. Dit proces is bekend onder de term *coat protein mediated resistance*.
- Tijdens de replicatie / vermeerdering van virusdeeltjes ontstaan bepaalde moleculaire structuren (dubbelstrengs RNA moleculen) die een afweersysteem van de plant induceren dat gebaseerd is op sequentie-specifieke afbraak van RNA. Dit proces is bekend onder de term *post transcriptional gene silencing* of *RNA-silencing*.

Het actief besmetten van een plant met een virusisolaat dat milde symptomen laat zien, wordt ook wel vaccineren genoemd.

Cross-protectie is inmiddels onder lab (L), kas (K) of veldomstandigheden (V) aangetoond voor een groot aantal virussen (Gal-On and Shibolet, 2006):

African cassava mosaic virus (V)
Alfalfa mosaic virus(L)
Apple mosaic virus (V)
Arabidopsis mosaic virus (L)
Barley yellow dwarf virus (L)
Beet soilborne mosaic virus (L, V)
Cauliflower mosaic virus (L)
Citrus mosaic virus (V)
Cocoa swollen shoot virus (V)
Cucumber mosaic virus (L,K,V)
Papaya ringspot virus (V)
Pepino mosaic virus (L,K)
Pepper severe mosaic virus (L)

Plum pox virus (L)
Potato leaf roll virus (L)
Potato virus A (L)
Potato virus X
Potato virus Y (L)
Soybean mosaic virus (L, V)
Tobacco mosaic virus (L, V)
Tomato aspermy virus (L)
Tomato ringspot virus (L)
Tomato spotted wilt virus (L)
Vanilla melon mosaic virus (L)
Wheat streak mosaic virus (L)
Zucchini yellow mosaic virus (L, V)

Naast deze "natuurlijke" manier van bescherming tegen agressieve virussen, zijn het laatste decennium nog twee alternatieve manieren ontwikkeld:

- Bescherming tegen virussen door het kunstmatig induceren van het *RNA-silencing* proces tegen specifieke virussen. Deze biotechnologietoepassing maakt gebruik van genetisch gemodificeerde planten (Prins et al, 2008).
- Bescherming tegen virussen door de *in planta* productie van "plantibodies": antilichaam-achtige moleculen die (kunstmatig) door de plant worden geproduceerd en specifiek binden aan essentiële eiwitten van virussen. Door de interactie van plantibodies en viruseiwitten wordt de functie van deze

eiwitten verstoord waardoor virusvermeerdering niet mogelijk is (Prins et al, 2008). Deze biotechnologietoepassing maakt gebruik van genetisch gemodificeerde planten.

Kort samengevat zijn er vier manieren waarmee planten beschermd kunnen worden tegen agressieve virusisolaten:

1. Cross-protectie door middel van *coat protein mediated resistance*
2. Cross-protectie door middel van nature voorkomende *RNA-silencing*
3. Geïnduceerde *RNA-silencing* (GMO-toepassing)
4. Productie van *plantibodies* (GMO-toepassing)

Al deze vier methoden werken echter specifiek tegen één species; ze bieden geen bescherming tegen andere (eventueel verwante) virusspecies binnen hetzelfde genus, laat staan dat deze methoden genusoverschrijdend zijn. Een hoge effectiviteit van bescherming zou kenmerkend moeten zijn voor deze strategieën en de werkzaamheid van gewasbeschermingsmiddelen overschrijden.

1.2 Aanleiding van project

Het vaccineren van planten wordt door het Japanse bedrijf Nippon Del Monte (NDM) in de praktijk reeds toegepast in o.a. Japan en Korea ter bescherming van bijvoorbeeld tomaat, gentiaan en peper tegen agressieve isolaten van het Cucumber Mosaic Virus (CMV). In het voorjaar van 2008 heeft NDM een bezoek gebracht aan Nederlandse lelieveredelaars en gesproken met M. de Kock, onderzoeker virologie bij Praktijkonderzoek Plant en Omgeving. NDM is in het bezit van een mild isolaat van *Lily mottle virus* (leliemozaïekvirus, LMoV) dat geen of nauwelijks virussymptomen veroorzaakt. NDM is op zoek naar partners in Nederland om voor dit isolaat de mogelijkheden van cross-protectie te bestuderen. Volgens NDM moet dit milde isolaat volgens het cross-protectie principe bescherming geven tegen agressieve isolaten van LMoV. Behalve bescherming tegen agressieve LMoV isolaten, zou volgens NDP de teelt van gevaccineerde lelies leiden tot een drastische reductie van gewasbeschermingsmiddelen ter bescherming van virusoverdracht door bladluizen. Het is onbekend of het milde LMoV isolaat ook bescherming geeft tegen andere, niet-verwante virussen, maar dit is zeer onwaarschijnlijk.

Naar aanleiding van het bezoek van NDM hebben de Nederlandse lelieveredelaars PPO-BBF uitgenodigd een project uit te voeren waarin de haalbaarheid van deze technologie en mogelijke toepassing in de veredeling en teelt van lelies (knol en bloemproductie) wordt onderzocht. Omdat deze vaccinatietechnologie positieve verwachtingen heeft, maar ook onzekerheden, beperkingen en potentiële risico's kent, wordt in dit rapport toegewerkt naar een opsomming van positieve en negatieve aspecten van de vaccinatietechnologie. De Nederlandse lelieveredelingsbedrijven kunnen met dit rapport uiteindelijk de keuze maken of de vaccinatietechnologie in Nederland voeten aan de grond kan gaan krijgen.

1.3 Doelstelling

Een rapport dat mede door inbreng van de Nederlandse lelieveredelaars tot stand is gekomen waarin:

- mogelijkheden, maar ook onzekerheden, beperkingen en potentiële risico's van de vaccinatie technologie onder Nederlandse teeltomstandigheden worden geïdentificeerd.
- vraagstellingen worden geformuleerd die beantwoord moeten worden tijdens het validatieonderzoek van de vaccinatietechnologie tegen LMoV in lelie onder Nederlandse teeltomstandigheden.

1.4 Werkwijze

1. Er is een stakeholder- en ketenanalyse gemaakt waarin aangegeven is welke nationale en internationale partijen in de keten betrokken zijn bij de implementatie van de vaccinatie technologie.
2. Deze analyse is in een workshop besproken met de leliebedrijven die door NDM zijn benaderd.
3. Tijdens deze workshop is een lijst van wensen opgesteld waaraan volgens PPO-BBF en de Nederlandse leliebedrijven een ideaal plantenvaccin moet voldoen.
4. Algemene kenmerken van bescherming tegen agressieve isolaten door middel van cross-protectie en specifieke gegevens over het NDM vaccin tegen agressieve LMoV isolaten zijn getoetst aan de wensenlijst opgesteld in punt 3.
5. Indien relevant zijn naar aanleiding van deze toetsing vraagstellingen geformuleerd die door middel van vervolgonderzoek beantwoord moeten worden of onderdeel kunnen zijn van validatieonderzoek van de vaccinatietechnologie tegen LMoV onder Nederlandse teeltomstandigheden.

2 Keten- en stakeholderanalyse

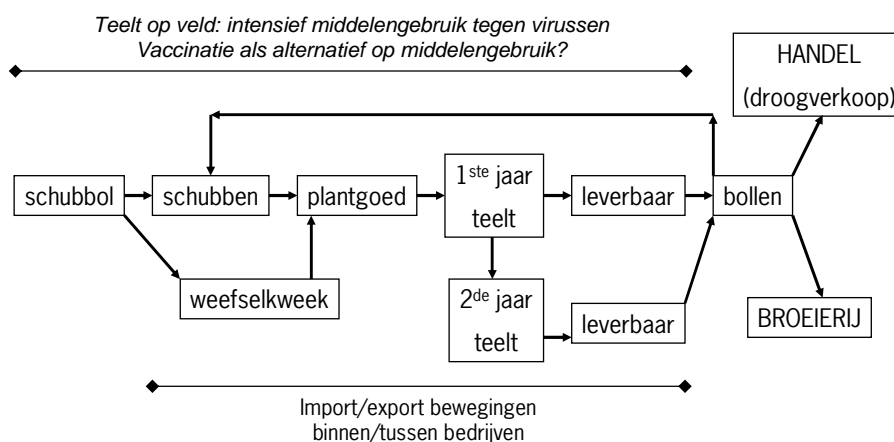
Een keten- en stakeholderanalyse is gemaakt om goed in te kunnen schatten wat de impact is van de implementatie van een vaccinatiestrategie in lelies. In deze analyse is het teeltproces van schubbol naar bollen leverbare bollen voor de handel en broeierij in kaart gebracht (Figuur 1), de route die leliebollen tijdens de handel en broeierij af kunnen leggen (Figuur 2), en de keuringen op virus die tijdens de teelt en handel plaats vindt (Figuur 3).

2.1 Van schubbol naar leverbaar

De productie van leverbare bollen voor broeierij of handel is een proces dat enkele jaren duurt (Figuur 1). Van een schubbol worden schubben afgebroken welke na een temperatuurbehandeling uitgroeien tot plantgoed. De temperatuurbehandeling vindt plaats in cellen, de teelt vindt buiten plaats. Afhankelijk van de situatie kan plantgoed na 1 of 2 jaar teelt leverbare bollen opleveren voor de handel (droogverkoop) of voor de broeierij. In principe is het volledige productieproces van leverbare bollen een buitenteelt. Tijdens de teelt op het veld lopen lelies het risico door bladluizen met virus geïnfecteerd te raken. Tijdens de teelt van lelie verspreiding bladluizen met name het leliemozaïekvirus (LMOV) en liesymptoomloosvirus (LSV). LSV veroorzaakt in de bollenteelt een opbrengstreductie. In de broeierij is het taggewicht lager en zijn de knoppen korter. Leliemozaïekvirus veroorzaakt naast opbrengstreductie in bollenteelt en broeierij ook diverse soorten kleurbrekingen in blad en bloem. Daarnaast kunnen er necrotische vlekken ontstaan. Virusinfectie leidt ook tot verhoogde gevoeligheid voor andere ziekteverwekkers zoals de schimmel *Botrytis* (vuur).

Omdat een virusgeïnfecteerde plant of bol niet meer virusvrij gemaakt kan worden, is er alles aangelegd om het proces van schubbol naar leverbare bollen zo goed als mogelijk virusvrij te houden. Verspreiding van deze virussen wordt daarom bestreden door in de maanden mei, juni en juli wekelijks te spuiten met een combinatie van minerale oliën en pyrethroïden. Vanaf augustus wordt er doorgaans voor gekozen om één keer per twee weken te spuiten. Als alternatief kan het proces van schubbol naar plantgoed door middel van weefselkweek onder gecontroleerde omstandigheden plaats vinden.

Volgens NDM moet vaccinatie een oplossing bieden tegen agressieve stammen van LMOV. De vaccinatietechnologie zou daarom al moeten worden toegepast zodra buitenteelt van schubben, plantgoed of leverbaar plaats vindt.



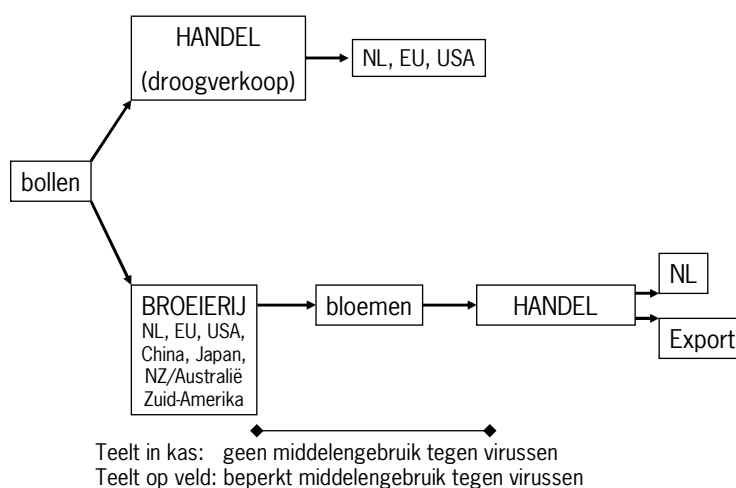
Figuur 1. Schematische weergave van de keten van schubbol naar leverbare bol voor handel en broeierij.

Een belangrijk kenmerk van het productieproces van leverbare bollen is dat de teelt voornamelijk in Nederland plaats vindt (± 4000 ha), maar ook in Frankrijk (± 400 ha), China (± 200 ha) en op het zuidelijk halfrond (Chili en Nieuw Zeeland, ± 600 ha). Tijdens het productieproces kunnen er vanuit Nederland diverse import- en export bewegingen plaatsvinden en is er uitwisseling van plantmateriaal tussen bedrijven.

2.2 Van leverbaar naar droogverkoop en bloem

Leverbare bollen worden verhandeld voor de droogverkoop of worden verhandeld voor de broeierij (Figuur 2). De droogverkoop vindt plaats binnen Nederland, maar bollen worden voornamelijk geëxporteerd naar diverse EU-landen en de Verenigde Staten.

Leverbare bollen die voor de broeierij zijn bestemd, worden verhandeld binnen Nederland en de EU-landen, maar worden ook geëxporteerd naar de Verenigde Staten, China, Japan, Nieuw Zeeland, Australië en diverse landen in Zuid-Amerika. De productie van snijbloemen kan afhankelijk van het klimaat plaats vinden als kasteelt of als buitenteelt op het veld. Tijdens de kasteelt worden geen middelen gebruikt tegen virussen. Daarentegen wordt er tijdens teelt op het veld beperkt middelen gebruikt. Het gebruik van middelen is afhankelijk van de aanwezige virusdruk, de eindbestemming van de bollen (herhaalde snijbloemproductie) en de gewenste kwaliteit van de snijbloemen. Een vroege infectie van met name LMoV kan leiden tot visuele virussymptomen tijdens de teelt.

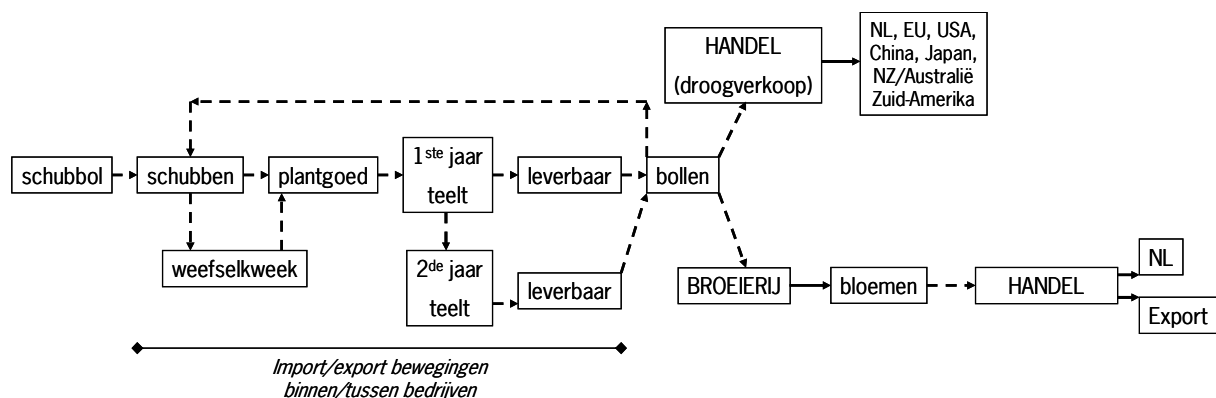


Figuur 2. Schematische weergave van de keten van leverbare bol naar droogverkoop en bloem.

2.3 Keuringen op virus

Tijdens het productieproces van leverbare bollen voor handel en broeierij vindt op verschillende momenten keuringen op virus plaats (Figuur 3). Dit kunnen vrijwillige virustoetsen zijn voor het bepalen van de kwaliteit van schubbol- of weefselkweekmateriaal, maar bevat ook verplichte viruskeuringen op het veld, in de kas of tijdens de bewaring. Keuring kan visueel of door middel van ELISA plaats vinden en er wordt voornamelijk gekeurd op LMoV, LSV en lelievirus X (LVX). De aanwezigheid van virus wordt uitgedrukt in een percentage van besmetting. Afhankelijk van het percentage en het type materiaal vindt er een klassering plaats. Voor aanvullende details over keuringen op virus in lelie wordt verwezen naar de Bloembollenkeuringsdienst (www.bloembollenkeuringsdienst.nl).

Het keuringsbeleid is er op gericht zo laag mogelijke viruspercentages te hebben tijdens de teelt en handel om verder virusverspreiding zo veel mogelijk te beperken en de kwaliteit van plantgoed veilig te stellen.



Figuur 3. Schematische ketenweergave voor keuringen op virus tijdens teelt, handel en broeierij. Tijdens het proces van schubbol tot leverbare bol wordt op diverse tijdstippen op virus gekeurd (weergegeven met stippellijn). Tevens vindt keuring op virus plaats tijdens de handel van snijbloemen en potlelies.

2.4 Stakeholders bij implementatie van vaccinatietechnologie

Diverse type stakeholders zijn betrokken bij de implementatie:

Stakeholders direct betrokken zijn bij de implementatie:

- Bedrijven/telers die plantgoed leveren
- Bedrijven/telers die leverbare bollen leveren
- Nippon Del Monte als leverancier van het “vaccin”
- Handelsbedrijven voor nationale handel en export
- Bedrijven betrokken bij de broeierij

Stakeholders betrokken bij keuring en fytosanitaire aangelegenheden:

- Bloembollenkeuringsdienst
- Plantenziektenkundige dienst (PD)
- Veiling (nationaal/internationaal)
- Plantenziektenkundige diensten en overige inspectieorganisaties van importerende landen

Stakeholders indirect betrokken bij implementatie:

- Bedrijven/telers van lelie plantgoed, -leverbare bollen, broeierij die geen gebruik maken van het LMoV vaccin
- Bedrijven/telers van tulpenbollen en tulpenbroeierijproducten. Het is belangrijk te realiseren dat LMoV ook tulp kan infecteren en daar heftige visuele symptomen kan veroorzaken

3 Criteria voor eigenschappen van vaccin

Voordat de vaccinatietechnologie voor LMoV onder Nederlandse omstandigheden verder ontwikkeld kan worden, is een lijst met criteria opgesteld waaraan een vaccin voor crossprotectie tegen agressieve isolaten van LMoV aan moet voldoen. Tijdens de workshop met leliebedrijven zijn deze criteria besproken en hebben geleid tot de formulering van enkele onderzoeksvragen die in een mogelijk vervolgtraject bestudeerd zouden moeten worden. Deze lijst van criteria is specifiek van toepassing op vaccinatie van lelie tegen LMoV, maar kan tevens dienen als algemene lijst van criteria voor vaccinatie van planten met een zwak virusisolaat.

Een vaccin in de vorm van een zwak virusisolaat:

1. induceert geen of milde virussymptomen

Op basis van de aangeleverde informatie van NDM levert het desbetreffende isolaat geen visuele symptomen op blad of bloem bij een systemische infectie.

2. heeft geen nadelig effect op kwaliteit en opbrengst

Hierover is door NDM geen informatie aangeleverd. Dit zou onderwerp voor een vervolgstudie zijn.

3. heeft een systemische, en meerjarige werking

Door NDM is nog geen bewijsmateriaal gepresenteerd dat aantoont dat het desbetreffende isolaat een systemische, en eventueel een meerjarige cross-protectie geeft tegen LMoV isolaten die matige of heftige symptomen veroorzaakt.

4. biedt bescherming tegen isolaten die matige en heftige symptomen geven

Door NDM is nog geen bewijsmateriaal gepresenteerd dat aantoont dat het desbetreffende isolaat cross-protectie geeft tegen LMoV isolaten die matige of heftige symptomen veroorzaakt. Dit is essentiële informatie om eventuele implementatie van de vaccinatiestrategie te overwegen.

5. heeft een breed werkingsmechanisme

Het vaccin tegen agressieve isolaten van LMoV biedt geen cross-protectie tegen LSV, het andere belangrijke virus dat door bladluizen wordt overgebracht. Het is daarom te verwachten dat er nog steeds gewasbeschermingsmaatregelen toegepast moeten worden om infectie met LSV te beperken. Dit wordt als een kritisch punt gezien in de acceptatie van de vaccinatietechnologie.

6. is genetisch stabiel; gedurende de meerjarige teelt muteert dit virusisolaat niet in een agressief isolaat

Over de genetische stabiliteit van het desbetreffende vaccin is door NDM geen informatie verstrekt. Dit zou een onderwerp voor een vervolgstudie zijn.

7. geeft geen synergistisch effect met andere virussen

Over eventuele synergistische effecten van het desbetreffende vaccin met bijvoorbeeld andere LMoV isolaten, LSV en LVX is door NDM geen informatie verstrekt. Dit zou onderwerp voor een vervolgstudie zijn.

8. is niet (eenvoudig) te verspreiden voor vectoren

Over de mogelijkheid van verspreiding van het desbetreffende LMoV isolaat door bladluizen is door NDM geen informatie verstrekt. Dit zou een onderwerp voor een vervolgstudie zijn. Er wordt in algemene zin getwijfeld aan een afname in de efficiëntie van virusoverdracht. LMoV wordt voornamelijk door bladluizen verspreid. Het is niet uit te sluiten dat LMoV ook via mechanische wijze via machines, gereedschap, kisten, transportbanden en spoelwater overgedragen kan worden op virusvrij plantmateriaal. Omdat 100% van de planten gevaccineerd is met een virulent

virusisolaat, wordt een grote virusdruk gecreëerd waardoor virusverspreiding via mechanische wijze een belangrijk risico kan vormen voor niet-gevaccineerde, virusvrije planten. Dit zou onderwerp voor een vervolgstudie zijn.

9. is eenvoudig te produceren

Productie van het vaccin vindt plaats in lelieplanten. Het vermalen van virusgeïnfecteerd plantmateriaal levert de basis voor het vaccin. NDM heeft nog geen toelichting gegeven over de commerciële kant van het gebruik van het vaccin. Omdat het LMoV vaccin eenvoudig te bereiden is, zal er het gebruik van het vaccin waarschijnlijk gekoppeld worden aan financiële afspraken tussen NDM en de gebruiker. De productie van het vaccin is verder niet te reguleren of te controleren.

10. is eenvoudige toe te dienen aan het gewas

Toediening van het vaccin vindt volgens NDM plaats door middel van mechanische inoculatie. Het plantmateriaal wordt besprayd met het vaccin waarna het vaccin door middel van lichte mechanische beschadiging het weefsel de plant binnen dringt. Bij een eenjarige werking van het vaccin vindt deze handeling jaarlijks plaats, bij een meerjarige werking vindt deze handeling slechts één keer plaats. Er wordt opgemerkt dat mechanische inoculatie van LMoV in lelie niet eenvoudig is. Efficiëntie vaccinatie van alle lelieplanten is essentieel omdat niet-gevaccineerde planten het risico lopen besmet te raken met een agressieve LMoV isolaat.

11. leidt niet tot teeltbeperkingen of risico-inperkende maatregelen

Het wordt als een groot risico gezien dat het vaccin-isolaat door bladluizen kan worden verspreid naar niet-gevaccineerde lelies en tulpen. In combinatie met mogelijke genetische instabiliteit wordt een zeer grote virusinfectiebron gecreëerd die een oncontroleerbare virustoename tot gevolg kan hebben met mogelijk heftige virussymptomen. Om deze verspreiding te beperken is het van belang voldoende beperkingen aan te brengen waarmee virusverspreiding door bladluizen (en eventuele mechanische verspreiding) kan worden beperkt.

12. leidt niet tot handelsbeperkingen

Criteria 1 t/m 11 zijn vooral van technische en biologische aard en zijn daarom mogelijk te overwinnen. Criterium 12 heeft een politieke lading en bestaat uit vier onderdelen:

- a) De kwaliteit van lelies met betrekking tot virus wordt uitgedrukt in het percentage virusbesmet materiaal. De gevaccineerde lelies zijn voor 100% virusgeïnfecteerd en zullen onder het huidige keuringsstelsel afgekeurd worden en geen handelswaarde hebben. Het Nederlandse keuringsbeleid moet daarom allereerst aangepast worden voordat de vaccinatietechnologie voeten aan de grond kan krijgen. Bij deze discussie zijn de Bloembollenkeuringsdienst en de Plantenziektenkundige Dienst directe gesprekspartner. Daarnaast zijn diverse andere (Nederlandse) stakeholders direct of indirect betrokken bij deze discussie (zie §2.4).
- b) Export van gevaccineerd leliemateriaal wordt vervolgens beperkt door eisen die derde landen stellen aan de kwaliteit van plantmateriaal met betrekking tot virus. Elk land dat momenteel dergelijke kwaliteitseisen stelt zal haar kwaliteitsbeleid moeten aanpassen. Plantenziektenkundige diensten en overige inspectieorganisaties van importerende landen zijn directe gesprekspartners bij deze discussies.
- c) Wanneer handel en export van gevaccineerd plantmateriaal op basis van discussies uit 12a. en 12b. wordt geaccepteerd, dan zal een belangrijke voorwaarde zijn dat gevaccineerd plantmateriaal te onderscheiden is van plantmateriaal dat door andere, van nature voorkomende LMoV-isolaten is geïnfecteerd. De huidige viruskeuringen vinden plaats door middel van visuele inspectie of serologische ELISA detectie van LMoV. Geen van beide methoden kan onderscheid maken tussen de aanwezigheid van het vaccin-virus of een ander LMoV isolaat. Een discriminerende ELISA-toets is technisch gezien niet haalbaar. Als alternatief kan LMoV met een PCR-toets worden aangetoond. Ondanks dat sequentie-informatie ontbreekt over het LMoV-vaccin, wordt niet verwacht dat de huidige

PCR-toets voor LMoV onderscheid kan maken tussen het LMoV vaccin en overige LMoV isolaten. Daarnaast wordt verwacht dat het technisch onhaalbaar is om een dergelijke PCR-toets te ontwikkelen, succesvol te valideren en geïmplementeerd te krijgen in exportlanden. Mocht dit echter wel haalbaar zijn, dan is kwaliteitskeuring op LMoV door middel van PCR financieel niet haalbaar.

- d) Het is niet aannemelijk dat alle landen waar lelies naar toe worden geëxporteerd, de vaccinatietechnologie zullen accepteren. Een gescheiden teelt van gevaccineerd en niet-gevaccineerd leliemateriaal is daarom niet te ontlopen. Om deze twee teelten gescheiden te laten plaatsvinden is een strikte scheiding van teelt, opslag, verwerking en handel noodzakelijk. Dit vraagt om vergaande risico-inperkende maatregelen ten aanzien van virusverspreiding door bladluizen (criterium 11) en een solide tracking-and-tracing systeem.

4 Conclusie: LMoV-vaccinatie niet gewenst in NL

NDM heeft Nederlandse veredelingsbedrijven gevraagd een rol te spelen bij het verder ontwikkelen van een vaccinatiestrategie tegen infecties met agressieve LMoV isolaten. De informatie die NDM aanvankelijk heeft aangeleverd beperkt zich tot een symptoombeschrijving van een mild LMoV isolaat. Aan criterium #1 uit H.3 is daarmee voldaan. Echter, geen enkele informatie over cross-protectie in lelie tegen agressieve LMoV isolaten is door NDM aangeleverd, noch heeft NDM een toelichting gegeven op andere onzekerheden van biologische aard (criteria #2 t/m #8, H.3).

Tijdens de workshop met de Nederlandse lelieveredelingsbedrijven werd vooral veel waarde gehecht aan criteria #11 en #12: vaccinatie mag niet leiden tot teeltbeperkingen, niet leiden tot risico-inperkende maatregelen en niet leiden tot handelsbeperkingen. Omdat juist deze twee criteria niet eenvoudig op te lossen zijn, is gezamenlijk besloten vanuit Nederland geen interesse te tonen in de ontwikkeling van de vaccinatietechnologie tegen LMoV in lelie. Daarmee komt ook een potentiële collectieve samenwerking met NDM voor een gezamenlijke ontwikkeling van de technologie te vervallen. Er wordt ook geen vervolgonderzoek opgestart waarin onderzoeksvragen uit H.3 worden uitgewerkt. Deze conclusie is samengevat in een Memo die aan NDM is toegestuurd (zie pagina 23).

De reactie van NDM op deze memo is weergegeven op pagina 25-27. Naar aanleiding van deze reactie zijn nog steeds veel onduidelijkheden. NDM heeft in ieder geval aangegeven dat het huidige LMoV vaccin een systemische, en meerjarige werking heeft (criterium #3). Het blijft echter onduidelijk in welke cultivar dit is getest en hoe representatief deze waarnemingen zijn voor de diverse lelietypen en het grote assortiment aan cultivars. Daarnaast geeft NDM aan er op te vertrouwen dat de huidige handelsbeperkingen tussen Nederland en Japan met betrekking tot LMoV in lelie te zijner tijd op te lossen zijn. Aan dit vertrouwen wordt ernstig getwijfeld, zeker omdat de Bloembollenkeuringsdienst en de Plantenziektenkundige Dienst nog niet door NDM zijn benaderd.

De reactie van NDM is schriftelijk gecommuniceerd aan de deelnemers van de workshop, maar heeft niet geleid tot een wijziging in de negatieve interesse met betrekking tot optimalisatie en introductie van de vaccinatie-technologie tegen LMoV in lelie.

5 Geraadpleegde literatuur

- Gal-On, A. and Y.M. Shibolet (2006). Cross-Protection. Natural Resistance Mechanisms of Plants and Viruses, 261-288. G. Loebenstein and J.P. Carr (eds). Springer, The Netherlands.
- Prins, M., M. Laimer, E. Noris, J. Schubert, M. Wassenegger and M. Tepfer (2008). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant Pathol.* 9(1), 73-83.

Bijlage 1 – Memo voor Nippon Del Monte

Lisse – December 2, 2008

Subject: Decision on introduction of vaccination technology against LMoV in The Netherlands

On request of Mr. Sayama (Nippon Delmonte, NDM) and Dutch lily breeding companies, a workshop was organized to discuss advantages, risks and disadvantages of the vaccination technology against LMoV in lily. This technology was presented by NDM to the major lily breeding companies and Applied Plant Research in April 2008.

The workshop was organized by M. de Kock, scientist Virology at Applied Plant Research and the workshop was attended by representatives of the main Dutch lily breeding companies and the Crop specialist Lily of Applied Plant Research.

At the workshop a general introduction to virus protection by vaccination was presented and LMoV vaccination results supplied by NDM were discussed. Additionally, a stakeholder and market analyses for lily bulb production and trading was presented that was used during the discussion on beneficial and negative characteristics of the vaccination technology, potential risks and topics for future research. The workshop was concluded by a collective statement:

Implementation of the NDM vaccination technology against LMoV in Dutch lily agriculture and trading will result in many farming and trading limitations and does not result in any reduction of crop protective agents.

This statement is substantiated by the following two main arguments:

1. The vaccination technology results in plants that are 100% infected with the virus isolate used for vaccination. Standard ELISA testing can not differentiate between LMoV-vaccinated plants and naturally LMoV-infected plant. Since current national and international inspection policies do not allow any virus infection, vaccinated plants do not have any value during (inter)national trading.
2. The suggested vaccination technology does only protect against LMoV and crop protection against e.g. LSV is still required. A reduction of pesticide spray is therefore not expected upon introduction of the vaccination technology.

Based on this negative statement, criteria were discussed to which a vaccination technology should comply with:

1. A vaccination technology does not result in farming limitations.
2. A vaccination technology does not result in trading limitations.
3. Vaccinated and non-vaccinated plants must be distinguishable by standard diagnostic protocols.
4. The vaccine cannot be transmitted by a vector (e.g. aphids, thrips or nematodes) to non-vaccinated plants.
5. The vaccine protects against the most imported viruses (LMoV, LSV and LVX) or at least against aphid-transmitted viruses (LMoV and LSV).
6. The vaccine has a systemic, multiyear and stable protective mode of action.
7. The vaccine can be applied successfully in different lily species and cultivars at different culture conditions.

These essential criteria are not valid, or not clearly demonstrated for the NDM vaccination technology against LMoV. Reevaluation of the statement could be considered when a future vaccination technology complies with these seven requirements.

This memo was signed by representatives of Dutch lily breeding companies and Applied Plant Research.

Bijlage 2 – Reactie Nippon Del Monte op Memo

This statement is substantiated by the following two main arguments:

1. The vaccination technology results in plants that are 100% infected with the virus isolate used for vaccination. Standard ELISA testing can not differentiate between LMoV-vaccinated plants and naturally LMoV-infected plant. Since current national and international inspection policies do not allow any virus infection, vaccinated plants do not have any value during (inter)national trading.

NDM: I discussed on this matter two times (several days ago and also last June) with people in Japanese quarantine. They told me that national and international inspection policies should be changeable and flexible depending on importance of matters and advancement of technology. They suggested that inspection policies of trading vaccinated lily for import and export should be discussed in the last step after all the available data of experiments of LMoV vaccines are obtained. I heard similar opinions from BKD people whom I met in last April at the ISVDOP meeting in Haarlem. Therefore, current inspection policies will not be necessarily suitable in the future and therefore should not become an obstacle before our collaborated research starts. If LMoV vaccines are acknowledged to be important in both Holland and Japan, we will be able to change the policies. Please notice that we are not discussing present situation of inspection policies but future inspection policies of which people in plant quarantine of both Holland and Japan suggested prospective opinions if we provide satisfactory and persuadable data. I think that your statement above is little bit short-sighted and impatient.

2. The suggested vaccination technology does only protect against LMoV and crop protection against e.g. LSV is still required. A reduction of pesticide spray is therefore not expected upon introduction of the vaccination technology.

NDM: I am considering as follows about your question whether LMoV vaccines can not reduce pesticide spray. If your lily breeders develop a LMoV resistant cultivar, do you consider it worthless because the cultivar does not reduce pesticide spray? I think lily growers are, of course, willing to grow this cultivar even if they can not reduce pesticide spray. Because growers can at least get rid of LMoV problems. I think we can consider LMoV vaccines in the same way as LMoV resistant cultivars. I know that it is ideal if we could develop three vaccines of aphid-transmitted viruses, LMoV, LSV and CMV, and then we can certainly reduce pesticide spray. This could be our final goal. To approach the goal, we have to solve problems step by step. We cannot solve all the problems at once as most innovative technologies couldn't. This time, we are solving the first step, LMoV problem which is the most problematic virus disease to Japanese lily growers. We have, in fact vaccine candidates for LSV and CMV, however I rather concentrate to work on LMoV vaccines at this moment. Because we will probably learn many things through application of LMoV vaccines in real lily farming system in both Holland and Japan. After we succeed in LMoV vaccines, we should develop vaccines for LSV and CMV. I think the first step of developing LMoV vaccines will certainly contribute to lily farming, and then next development of LSV and CMV vaccines will eventually reduce pesticide spray. Please consider that there is no chance to reduce pesticide spray without the first step.

Based on this negative statement, criteria were discussed to which a vaccination technology should comply with:

1. A vaccination technology does not result in farming limitations.

NDM: This statement is too abstract for us to consider. What kind of farming limitations do you imagine? Can you explain more concretely? I think farming limitations if any, will be found out after we conduct collaborated research of LMoV vaccines in Holland and Japan. This statement seems to be biased before testing it.

2. A vaccination technology does not result in trading limitations.

NDM: National and international inspection policies should be changeable and flexible depending on importance of matters and advancement of technology by the reason mentioned above. We are not discussing present trading limitations but should discuss future trading limitations.

3. Vaccinated and non-vaccinated plants must be distinguishable by standard diagnostic protocols.

NDM: Standard diagnostic protocols have to be changeable by the same reason mentioned above as people in plant quarantine suggested in Japan and Holland. We are confident to distinguish vaccinated plants from non-vaccinated ones by ELISA and/or other methods.

4. The vaccine cannot be transmitted by a vector (e.g. aphids, thrips or nematodes) to non-vaccinated plants.

NDM: LMoV in nature is only transmitted by aphids. We are conducting now transmission experiments using different aphid species. Our preliminary experiment suggested that our LMoV vaccine seems to be non-transmissible by an aphid species. However, we have to verify it by using more numbers of aphids and also different kind of aphid species.

6. The vaccine protects against the most imported viruses (LMoV, LSV and LVX) or at least against aphid-transmitted viruses (LMoV and LSV).

NDM: I think you are expecting too much at once. Do you expect a miracle or almighty drug? As I explained above by comparing LMoV vaccines with LMoV resistant cultivars, we are trying to improve gradually and step by step, not jumping to our ultimate goal of growing pesticide-free lily. Please understand that the first step will eventually lead to our goal.

6. The vaccine has a systemic, multiyear and stable protective mode of action.

NDM: Our LMoV vaccine translocates systemically from bulbs to top of the plants and is transmitted to offspring through bulbs as well as scales. So far we have tested three years protective effects by comparing vaccinated lily plants with non-vaccinated ones. Our experiment indicates that the protective effect seems to continue at least three years. We will continue this experiment. However, this experiment also has to be done in Holland, and stability of effectiveness has to be verified in two countries, too.

7. The vaccine can be applied successfully in different lily species and cultivars at different culture conditions.

NDM: Here, I have to ask you again a non-sense question. If your lily breeders develop a LMoV resistant cultivar, do your lily growers not use the cultivar until other cultivars and lily species become resistant to LMoV? I think we should test at first in Oriental hybrid cultivars which are most important at least in Japanese market. After we succeed in Oriental hybrids, we may consider its application to other lily species. Of course, application of LMoV vaccines have to be tested in different cultural conditions, Holland and Japan. That is why we are asking you to collaborate with us on this project.

These essential criteria are not valid, or not clearly demonstrated for the NDM vaccination technology against LMoV. Reevaluation of the statement could be considered when a future vaccination technology complies with these seven requirements.

I hope that I have informed you well with the results of the workshop. Unfortunately, I do not see opportunities for collaboration on your vaccination technology.

I would really appreciate when you can give any comments on the given statement and the formulated criteria to which a vaccination technology should comply with to enable introduction of a vaccination technology in Dutch agriculture and international trading.

NDM: I was very disappointed about your statement. I can not see any valid reason why you do not collaborate with us on this project. This is still an experimental stage, should not seek perfect one. I will also send this e-mail to Mr. Evert van Zanten, P.F. Onings B.V. who introduced us Dutch lily breeding companies in last April, and would like to ask his opinion.

Best regard.

Haruki Sayama

Nippon Del Monte Corporation

Department of Plant Vaccine

Address: 3748 Shimizu-cho, Numata, Gunma 378-0016, Japan.

Phone: +81-278-24-9755

Fax: +81278-24-0213

Email: hsayama@delmonte.co.jp