

Bescherming en beheersing van PepMV in de tomatenteelt

Onderdeel Cross-protectie

Martijn Schenk, Ineke Stijger, Roel Hamelink, René van der Vlugt,
Adriaan Vermunt, Ruud Kaarsemaker & Rob Meijer





Bescherming en beheersing van PepMV in de tomatenteelt

Onderdeel Cross-protectie

Martijn Schenk¹, Ineke Stijger¹, Roel Hamelink¹, René van der Vlugt²,
Adriaan Vermunt³, Ruud Kaarsemaker³ & Rob Meijer¹

¹ Wageningen UR Glastuinbouw, Bleiswijk

² Plant Research International, Wageningen

³ Groen Agro Control, Delfgauw

© 2009 Wageningen, Wageningen UR Glastuinbouw

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, 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 Wageningen UR Glastuinbouw



PT projectnummer: 12384

Wageningen UR projectnummer: 3241110401

Wageningen UR Glastuinbouw

Adres : Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk
: Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk
Tel. : 0317 - 48 56 06
Fax : 010 - 522 51 93
E-mail : glastuinbouw@wur.nl
Internet : www.glastuinbouw.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
1 Inleiding	3
1.1 Veranderingen in de situatie rondom pepinomozaïekvirus	3
1.2 Omgang met pepinomozaïekvirus in de praktijk	4
1.3 Doelstelling	4
2 Uitvoering	5
2.1 Proefopzet	5
2.2 Zwakke isolaten	5
2.3 Agressieve isolaten	5
2.4 Behandelingen	8
2.5 Waarnemingen ELISA en RT-PCR	8
2.6 Waarnemingen bladsymptomen	8
2.7 Opzet vruchtproef	8
2.8 Waarnemingen vruchtproef	9
3 Resultaten	11
3.1 Symptoomverloop bij enkele besmetting	11
3.2 Cross-protectie	12
3.3 Bepaling virusratio's	16
3.4 Vruchtproef	17
4 Discussie en conclusie	21
4.1 Agressieve isolaten	21
4.2 Cross-protectie in het algemeen	21
4.3 Cross-protectie met bestaande en nieuwe zwakke stammen	22
4.4 Vruchtsymptomen van zwakke CH2-stammen	22
4.5 Conclusie	22
5 Literatuur	23
Bijlage I. Gestandaardiseerd scoreformulier voor symptomen	1 p.

Samenvatting

Het pepinomozaïekvirus (PepMV) is een mechanisch overdraagbaar virus. Het tegengaan van besmetting is in de praktijk zeer lastig. Naast het aanhouden van strikte hygiëne is de toepassing van cross-protectie een alternatieve strategie. Daarbij veronderstelt men dat besmetting met milde virusvarianten (zwakke stammen) de gevolgen van een besmetting met agressieve isolaten onderdrukt. Eerder is aangetoond dat cross-protectie met *VI* of *1066* tegen de Europese tomatenstam van PepMV werkt.

De doelstelling van dit onderzoek was om te bepalen of zwakke stammen in staat zijn om te beschermen tegen nieuwe agressievere isolaten van PepMV. Dit onderzoek vond plaats onder uniforme teeltcondities en op uniform plantmateriaal. De cross-protectie proeven zijn uitgevoerd met twee bestaande zwakke stammen (*VI* en *1066*) en enkele nieuwe potentieel zwakke stammen. Van deze nieuwe stammen is ook het eventuele optreden van vruchtsymptomen onderzocht. De werking van het cross-protectie mechanisme is getest met zes agressieve virusisolaten die matige tot zeer ernstige bladsymptomen gaven op tomaat als er geen cross-protectie werd toegepast.

Toepassing van cross-protectie verbeterde over het algemeen de situatie voor de tomatenplanten. Het meest duidelijke effect is dat door cross-protectie de piek in de symptomen, die kort na inoculatie optrad, lager is. Bestaande zwakke stammen (*VI* en *1066*) zijn niet in staat om tegen alle nieuwe agressieve isolaten van het pepinomozaïekvirus te beschermen. De ratio tussen *VI* en de totale hoeveelheid PepMV geeft daarbij geen voorspellende waarde voor de symptoomontwikkeling. Een zwakke stam die behoorde tot de CH2-stam (*Pep1*), bood wel bescherming, maar is minder zwak in zijn symptomen dan *VI* en *1066*. Het optreden van vruchtsymptomen onder cross-protectie omstandigheden dient nog onderzocht te worden.

1 Inleiding

Het pepinomozaïekvirus (PepMV) is een mechanisch overdraagbaar virus dat binnen de tomatenteelt voor de nodige problemen zorgt. Sinds de introductie en ontdekking van het virus in 1999 heeft het zich verspreid binnen de Europese tomatenteelt en is in diverse landen, waaronder Nederland, aanwezig [1-4]. Het virus weet zich gemakkelijk te verspreiden via bijvoorbeeld besmette handen, kleding of gereedschappen [5]. Direct contact tussen gezonde en geïnfecteerde planten gedurende het reguliere gewaswerk volstaat al voor verspreiding van het virus.

1.1 Veranderingen in de situatie rondom pepinomozaïekvirus

In voorafgaand onderzoek, wat door het Productschap Tuinbouw gefinancierd is, hebben Wageningen UR Glastuinbouw en Plant Research International (PRI) aangetoond dat er verschillende varianten van het virus binnen Nederland voorkomen [6]. Deze varianten van het pepinomozaïekvirus zijn op basis van de gelijkenis in het genetische materiaal van het virus in groepen te delen. In totaal worden vier groepen (stammen) onderscheiden, namelijk:

- de Peruviaanse stam die oorspronkelijk afkomstig is van pepino (*Solanum muricatum*) en wilde tomaat (*Lycopersicon peruvianum*) (afkorting: PE);
- de Europese tomatenstam (afkorting: EU);
- de Chili-2 stam (afkorting: CH2);
- de US-1 stam (afkorting: US1).

Isolaten van de Peruviaanse stam vertonen een sterke genetische gelijkenis met isolaten van de EU-stam. Deze EU-isolaten werden in 1999 voor het eerst in Nederland waargenomen [3]. Destijds gaven ze slechts beperkte blad-symptomen en veroorzaakten een geringe economische schade aan het gewas. PepMV heeft zich sinds deze eerste vondst sterk verspreid binnen de tomatenteelt. Vanaf 2005 komen in Europa - en ook in Nederland - besmettingen voor met nieuwe isolaten, welke blijken te behoren tot de CH2 stam [6]. Deze isolaten zijn in eerste instantie in Chili en de Verenigde Staten gevonden, maar doken in 2005 op diverse plekken binnen Europa op [1, 7, 8]. Isolaten van de vierde stam (de US1 stam) waren tot voorkort alleen in Amerika aanwezig, maar zijn recentelijk ook op de Canarische eilanden aangetroffen [9]. In Nederland is deze stam nog niet aangetroffen.

De situatie rondom PepMV is sinds 2005 aanzienlijk complexer door de introductie van nieuwe CH2 isolaten en het optreden van menginfecties van verschillende stammen in één plant. PepMV is een zeer veranderlijk en onvoorspelbaar virus wat in staat bleek te zijn om in één kas binnen enkele maanden te veranderen in diverse varianten die onderling aanzienlijke genetische verschillen vertoonden [6]. Binnen mengsels van varianten of stammen kan vermenging van het erfelijk materiaal optreden door het mechanisme van recombinatie [1]. Daardoor kunnen nieuwe varianten van het virus ontstaan, die mogelijk nieuwe eigenschappen hebben, zoals een verhoogde agressiviteit van de symptomen. Hoe complex de huidige situatie rondom PepMV daadwerkelijk is, blijkt wel uit onderdeel 2 van dit onderzoek [10]. Binnen dit onderdeel is door de genetische karakterisering van ruim 100 praktijkisolaten vastgesteld dat de CH2 stam inmiddels verspreid is binnen Nederland en dat er ook menginfecties zijn van de CH2 en EU stam. Ook isolaten van de Peruviaanse PepMV stam waren in sommige menginfecties aanwezig. Door de hoge infectiedruk is het lastig om vrij te blijven van PepMV [11].

Onder praktijkomstandigheden laat PepMV diverse virusbeelden zien. Dit is deels afhankelijk van teeltomstandigheden en verschillen tussen de geteelde rassen, maar hangt ook sterk af van het aanwezige virusisolaat. In een door Groen Agro Control (GAC) uitgevoerd onderzoek uit 2005 bleek dat er in Nederland verschillende varianten voorkomen van PepMV [12]. Deze varianten geven verschillende virusbeelden. Sommige isolaten zijn zeer mild, terwijl andere zeer heftige symptomen geven. Het is echter niet bekend welke genetische verschillen hiervoor verantwoordelijk zijn. Duidelijk is dat de problemen sinds 2005 zijn toegenomen, hetgeen samen zou kunnen hangen met de introductie van de CH2 stam of met een toename in het voorkomen van mengsels van meerdere stammen. Ook dit is in onderdeel 2 van dit onderzoek nader bestudeerd door de biologische karakterisering van een twintigtal isolaten

van diverse genetische herkomst [10]. Hierin bleek dat mengsels van verschillende stammen over het algemeen agressiever zijn dan infecties met één enkele stam. Echter, zowel infecties met isolaten van de EU als de CH2 stammen kunnen leiden tot heftige symptomen. Zowel isolaten van de EU als van de CH2 stam kunnen ook necrotische symptomen veroorzaken, waarbij delen van het blad of de stengels afsterven.

1.2 Omgang met pepinomozaïekvirus in de praktijk

Er zijn drie mogelijke benaderingen om met de problematiek rondom PepMV om te gaan:

- (I) Absoluut vrij blijven van PepMV door het volgen van een zeer strikt hygiënebeleid.
- (II) Geen bijzondere maatregelen nemen ter voorkoming van het virus.
- (III) Vroeg in de teelt bewust virus in het gewas brengen. Hiervoor zou een hiervoor een 'zwak' isolaat van het virus gebruikt kunnen worden.

Bij het volgen van strategie III is de veronderstelling dat besmetting met milde virusvarianten (zwakke stammen) de gevolgen van een besmetting met agressieve isolaten onderdrukt. De keuze van de te gebruiken zwakke isolaten is essentieel. Het is daarom belangrijk om een goed gekarakteriseerde en stabiele zwakke stam te hebben. De zwakke stam moet weinig of geen blad- en vruchtsymptomen geven en daarnaast afdoende bescherming bieden tegen agressieve isolaten.

De afgelopen jaren zijn er talloze varianten van PepMV verspreid via de methode van 'vroege besmetting'. Hierbij veronderstelt men dat besmetting met milde virusvarianten (zwakke stammen) de gevolgen van een besmetting met agressieve isolaten onderdrukt. De keuze van de gebruikte zwakke isolaten vond plaats op basis van symptomen in eerdere teelten. Vaak bleken dit (onbewust) mengsels en doordat PepMV zo snel kan veranderen, kan dit echter onvoorspelbare en ernstige gevolgen hebben. Het is daarom belangrijk om een goed gekarakteriseerde en stabiele zwakke stam te hebben. Bedrijven die bewust besmetten willen daarvoor een zwakke stam gebruiken die weinig of geen blad- en vruchtsymptomen geeft en daarnaast afdoende bescherming biedt tegen agressieve isolaten. Ook bedrijven uit de derde groep hebben hier enig belang bij, omdat als er in de loop van de teelt van buitenaf een infectie optreedt met een zwakke stam, de schade beperkt zal blijven.

De strategie waarbij men het gewas bewust infecteert met een zwakke virusstam is gebaseerd op het cross-protectie mechanisme. In een kasproef die in 2006 door Wageningen UR is uitgevoerd en waaraan ook PRI en GAC bijdroegen, is vastgesteld dat het mechanisme van cross-protectie werkt voor de EU-tomaten stam van PepMV [13]. De gevolgen van een besmetting met twee agressieve isolaten werden drastisch verminderd door een eerdere infectie met een zwakke stam. Deze agressieve isolaten veroorzaakten in enkele infecties een opbrengstverlies van respectievelijk 8 en 25%, wat gereduceerd werd tot 0-3% opbrengstverlies aan de hand van cross-protectie. Beide zwakke stammen (1066 en VI) werkten daarbij even goed. Echter, binnen deze proeven zijn alleen isolaten getoetst van de stam die op dat moment het meest in Nederland aanwezig was, namelijk de EU stam. Of cross-protectie ook werkt tegen nieuwe, agressieve (EU en CH2) isolaten, die sindsdien zijn opgedoken is zeer de vraag.

1.3 Doelstelling

De doelstelling van dit onderzoek is om te bepalen of zwakke stammen in staat zijn om de tomatenteelt te beschermen tegen nieuwe (agressievere) isolaten van het pepinomozaïekvirus.

Het onderzoek is onderverdeeld in drie fases. In de eerste fase vindt een vooronderzoek plaats waarin tomatenplanten eerst worden geïnfecteerd met een zwakke stam en daarna wordt besmet met een zestal nieuwe agressieve (praktijk)isolaten. Dit wijst uit in hoeverre de twee bestaande en drie nieuwe zwakke stammen ook hiertegen bescherming kunnen bieden. Daarbij wordt informatie ingewonnen over de bladsymptomen. Deze onderzoeksfase geeft geen informatie over opbrengst of kwaliteit van de vruchten. In de tweede fase is voor vier nieuwe isolaten, die mogelijk als zwakke stam kunnen dienen, bepaald of deze ook milde vruchtsymptomen hadden. De informatie die hieruit voortkomt, wordt gebruikt voor een grote praktijkproef omtrent cross-protectie die in 2009 zal plaatsvinden en waarover in een apart verslag gerapporteerd zal worden.

2 Uitvoering

2.1 Proefopzet

In drie kleine kasafdelingen bij Wageningen UR Glastuinbouw zijn in maart (serie 1) en april (serie 2) tomatenplanten in de kas geplaatst. De bakken waarin de planten stonden, zijn zodanig in de kas geplaatst dat onderling contact tussen planten uit verschillende behandelingen niet mogelijk was. Per behandeling zijn met het oog op uitvallers vijf planten ingezet. Na inoculatie met de agressieve isolaten zijn drie planten aangehouden.

Het onderzoek vond plaats onder uniforme teeltcondities en op uniform plantmateriaal. Daarbij is gekozen voor de cultivar *Mecano*. De teeltcondities (temperatuur, lichtintensiteit, relatieve luchtvochtigheid en CO₂ concentraties) zijn vastgelegd met data loggers. Bespuiting met insecticiden waren niet noodzakelijk vanwege de korte looptijd van de proef. Wel hingen er zwavelpotten tegen de meeldauw.

2.2 Zwakke isolaten

De cross-protectie proeven zijn in eerste instantie uitgevoerd met twee bestaande zwakke stammen (V1 en 1066). Daarna is in de tweede toetsserie een drietal nieuwe isolaten onderzocht (Pep1, Pep14 en Pep27) die afgaande op het symptoombeeld op toetsplanten potentieel als zwakke stam kunnen dienen. Deze isolaten zijn in de praktijk verzameld. De isolaten vertegenwoordigen de drie virusstammen die op dit moment in Nederland voorkomen, namelijk:

- de Europese tomatenstam (EU), waartoe de isolaten 1066, Pep14 en Pep27 behoren;
- de Chili-2 stam (CH2), waartoe het Pep1 isolaat behoort;
- de Peruviaanse stam (PE), waartoe het V1 isolaat behoort.

Van V1 en 1066 was al bekend uit het onderzoek van 2006 [13] dat ze onder praktijkomstandigheden milde symptomen geven. De isolaten Pep1, Pep14 en Pep27 zijn geselecteerd uit de biologische karakterisering die binnen onderdeel 2 van dit onderzoek plaatsvond. De resultaten hiervan staan verkort weergegeven in Tabel 1, terwijl in Figuur 1 het symptoombeeld van deze isolaten is afgebeeld.

2.3 Agressieve isolaten

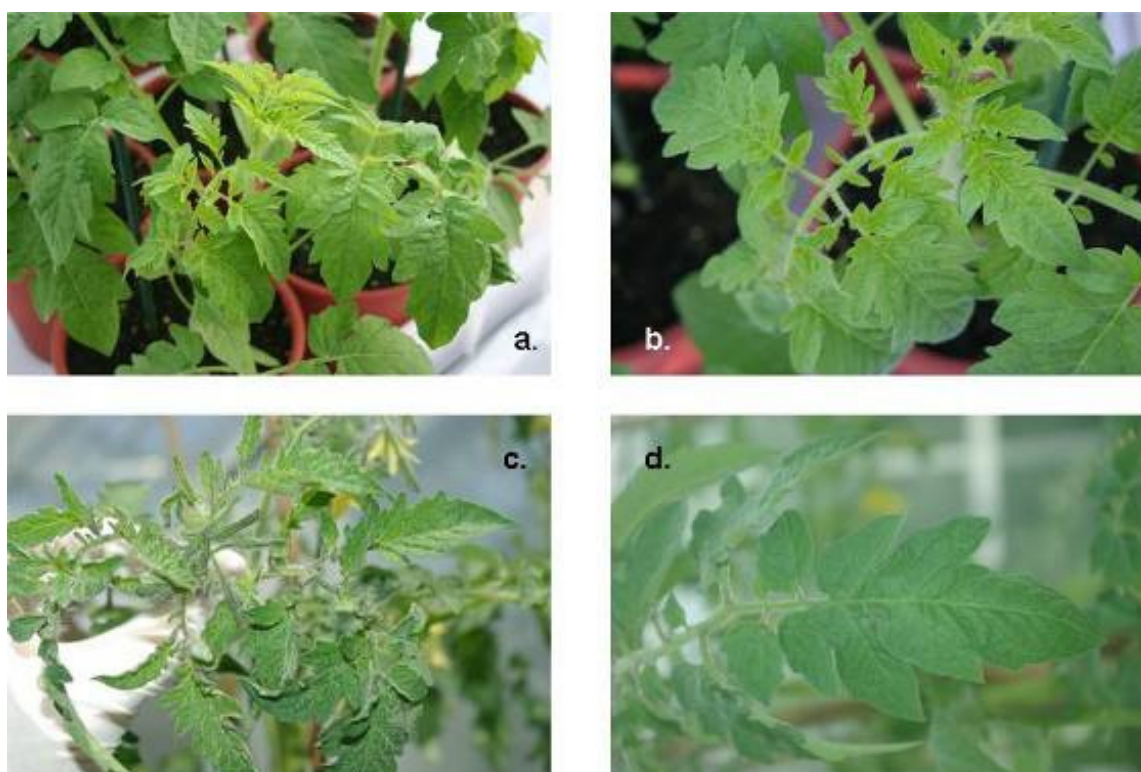
Voor beide toetsseries zijn zes isolaten gekozen die afkomstig zijn uit de set van isolaten uit onderdeel 2. Al deze isolaten zijn in de praktijk verzameld. Hierbij is gekozen voor een zestal isolaten die de gehele breedte van matige tot zeer ernstige symptomen afdekken (Tabel 2b). Daarnaast vertegenwoordigen deze isolaten de twee agressieve virusstammen die in de praktijk aanwezig zijn. Beide stammen komen vaak voor als mengsel en daarom zijn zulke mengsels ook meegenomen in het onderzoek. Onderzocht zijn:

- de Europese tomatenstam, waartoe de isolaten Pep6 en Pep24 behoren;
- de Chili-2 stam, waartoe het Pep48 isolaat behoort;
- een mengsel van de Europese tomatenstam en de Chili-2 stam, waartoe de isolaten Pep32, Pep37 en Pep47 behoren.

De Peruviaanse stam is minder wijd verspreid dan de andere stammen en hiervan zijn nog geen isolaten bekend die agressieve symptomen geven. De symptoombeelden van vier van de agressieve isolaten staan afgebeeld in Figuur 2.

Tabel 1. De mate waarin de zwakke stammen symptomen veroorzaken op tomaat. De symptomen zijn twee weken na inoculatie waargenomen. Omdat eventuele necrotische symptomen (bladverbruining) zich na twee weken nog niet altijd geopenbaard hebben, zijn de waarnemingen hiervan na vier weken gedaan.

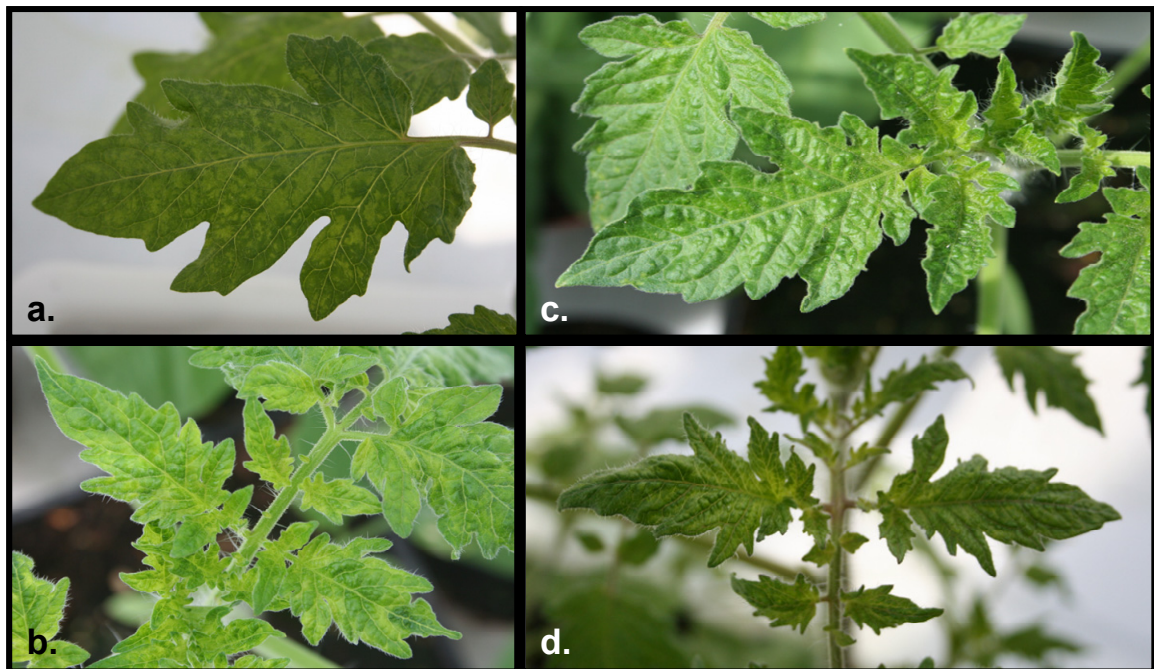
Isolaat	Omschrijving symptomen	Type isolaat	Ernst symptomen	Necrose
<i>Pep 1</i>	Licht brandnetelvormig blad en mozaïek	CH2	Matig	Nee
<i>Pep 14</i>	Licht mozaïek	EU	Licht	Nee
<i>Pep 27</i>	Licht mozaïek	EU	Licht	Nee
<i>1066</i>	Nauwelijks symptomen	EU	Licht	Nee
<i>V1</i>	Nauwelijks symptomen	PE	Licht	Nee



Figuur 1. Symptoombeelden van de zwakke PepMV isolaten die in de cross-protectie proeven zijn gebruikt: a. het bekende zwakke isolaat 1066, b. het bekende zwakke isolaat V1, c. het nieuwe zwakke isolaat Pep14 en d. het nieuwe zwakke isolaat Pep1.

Tabel 2. De ernst van de symptomen die de agressieve stammen op tomaat veroorzaken. De symptomen zijn twee weken na inoculatie waargenomen. Omdat eventuele necrotische symptomen zich na twee weken nog niet altijd geopenbaard hebben, zijn de waarnemingen hiervan na vier weken gedaan.

Isolaat	Omschrijving symptomen	Virusstam	Ernst symptomen	Necrose
<i>Pep 6</i>	Zeer heftig mozaïek, brandnetelvormig blad in de kop, chlorose, misvormde bladeren en gele stippen op het blad	EU	Ernstig	Nee
<i>Pep 24</i>	Bobbelig, brandnetelvormig blad met een enkele gele stip	EU	Behoorlijk	Nee
<i>Pep 32</i>	Nauwelijks symptomen, zeer licht mozaïek	EU + CH2 mengsel	Licht	Ja
<i>Pep 37</i>	Zeer sterk brandnetelvormig en bobbelig blad en misvormde bladeren	EU + CH2 mengsel	Ernstig	Nee
<i>Pep 47</i>	Mozaïek	EU + CH2 mengsel	Matig	Nee
<i>Pep 48</i>	Mozaïek en beginnende necrose	CH2	Matig	Ja



Figuur 2. Enkele karakteristieke symptomen van de agressieve PepMV isolaten op tomaat.
a. Chlorose op blad van een tomaat die geïnoculeerd is met het isolaat Pep6. b. Heftig mozaïek op het blad van een tomaat die geïnoculeerd is met het isolaat Pep10. c. Bobbeling op het blad in de kop van een tomaat die geïnoculeerd is met het isolaat Pep24. d. Brandnetelvormig tot naaldvormig blad in de kop van een tomaat die geïnoculeerd is met het isolaat Pep5.

2.4 Behandelingen

Op 28 maart 2008 is de eerste serie planten geïnoculeerd met virussuspensies van de zwakke isolaten (*1066* en *VI*) en agressieve isolaten (*Pep6*, *Pep24*, *Pep32*, *Pep37*, *Pep47* en *Pep48*). De symptoomontwikkeling van deze planten is gevolgd door na twee en vier weken waarnemingen te doen. Vier weken na de eerste inoculatie hebben we de planten die met het zwakke isolaat besmet zijn, opnieuw geïnoculeerd met virussuspensies van de agressieve stammen. Waarnemingen van de symptomen zijn toen nog gedaan na 5½ week. De proef is 7 weken na de eerste inoculatie beëindigd.

Op 29 april 2008 is de tweede serie planten geïnoculeerd met virussuspensies van de zwakke isolaten (zwakke stam: *Pep1*, *Pep14* en *Pep27*) en enkele infecties met agressieve isolaten (*Pep6*, *Pep24*, *Pep32*, *Pep37* en *Pep48*). De symptoomontwikkeling van deze planten is gevolgd door na twee en vier weken waarnemingen te doen. Vier weken na de eerste inoculatie hebben we de planten die met het zwakke isolaat besmet zijn, opnieuw besmet met virussuspensies van de agressieve stammen. Waarnemingen van de symptomen zijn toen nog gedaan na 5½ week. De proef is 7 weken na de eerste inoculatie beëindigd.

2.5 Waarnemingen ELISA en RT-PCR

Voordat de inoculatie met de zwakke stam is uitgevoerd, zijn bladmonsters genomen van alle planten. Deze bladmonsters zijn met een DAS-ELISA getoetst op de aanwezigheid van PepMV. Voordat inoculatie met de agressieve stam plaatsvond, zijn opnieuw bladmonsters genomen van alle planten. De bladmonsters zijn per behandeling samengevoegd en daarna getoetst met een DAS-ELISA op de aanwezigheid van PepMV. Tenslotte is aan het einde van de proef de aanwezigheid van PepMV met een DAS-ELISA getoetst.

Voor het zwakke *VI* isolaat zijn specifieke primers beschikbaar waarmee de verhouding tussen dit isolaat en de totale hoeveelheid PepMV bepaald kan worden met een RT-PCR. Aan het eind van de proef (na 50 dagen) zijn daarom bladmonsters genomen die door GAC zijn getoetst.

2.6 Waarnemingen bladsymptomen

De waarnemingen van de symptomen op de tomatenplanten zijn gemaakt met een gestandaardiseerd scoreformulier (Bijlage I) dat ook in voorafgaand en lopend onderzoek naar PepMV gebruikt is [13, 14]. De waargenomen symptomen in de kop van de plant zijn bobbeling van het blad, brandnetelblad, bladnecrose (bladverbruining), stengel-necrose en mozaïek. De waargenomen symptomen op de bladeren onder de kop waren gele vlekken, bladnecrose, stengel-necrose, bladmisvorming en chlorose. De ernst van elk symptoom is aangegeven op een schaal van 0 (geen symptomen) tot 4 (zeer ernstige symptomen). De scores van de afzonderlijke symptomen zijn gesommeerd tot een totaalscore.

2.7 Opzet vruchtproef

Omdat gaandeweg het onderzoek bleek dat zwakke isolaten die behoren tot de Chili-2 stam mogelijk meer perspectief boden voor cross-protectie dan de bestaande isolaten van de EU-tomaten stam, is in overleg met de BCO besloten om hier nader onderzoek aan te doen. Allereerst zijn zeven isolaten van de CH2 stam getoetst op de aanwezigheid van bladsymptomen (*Pep12*, *Pep15*, *Pep16*, *Pep22*, *Pep26*, *Pep28* en *Pep30*) om zo de mildste CH2 isolaten te selecteren voor verder onderzoek. Daartoe zijn per isolaat twee tomatenplanten geïnoculeerd met de isolaten conform de werkwijze van het onderzoek dat heeft plaatsgevonden in onderdeel 2. Na 14 dagen zijn waarnemingen van de planten gedaan met behulp van het gestandaardiseerde scoreformulier (Bijlage I). Omdat necrotische symptomen zich soms pas uitten na de 14 dagen die optimaal zijn voor de waarneming van de toetsplanten, zijn deze 2 weken langer aangehouden om eventuele necrose vast te kunnen stellen.

In twee kleine kasafdelingen bij Wageningen UR Glastuinbouw zijn op 4 juli 2008 tomatenplanten in de kas geplaatst. In overleg met de BCO is vanwege de tijdsdruk besloten om met ongeënte vleestomaten aan de slag te gaan, omdat er op dat moment geen andere rassen beschikbaar waren. Per behandeling zijn op 7 juli 2008 twintig ongeënte tomaten besmet met de vier nieuwe virusisolaten die uit de bovengenoemde toetsing zijn geselecteerd en die op basis van de bladsymptomen zijn aangeduid als zwak (*Pep1*, *Pep12*, *Pep16* en *Pep18*). Over de vruchtsymptomen van deze isolaten was voor aanvang van onze proef nog geen informatie beschikbaar.

Het onderzoek vond plaats onder uniforme teeltcondities en op uniform plantmateriaal. De teeltcondities (temperatuur, lichtintensiteit, relatieve luchtvochtigheid en CO₂ concentraties zijn vastgelegd met data loggers. Bespuiting met insecticiden waren niet noodzakelijk vanwege de korte looptijd van de proef. Wel hingen er zwavelpotten tegen de meeldauw.

2.8 Waarnemingen vruchtproef

Met een DAS-ELISA is vastgesteld of de besmetting van de tomatenplanten bij alle isolaten geslaagd is. Ook is de ontwikkeling van de bladsymptomen gedurende de looptijd van deze proef gevolgd bij zes planten met het gestandaardiseerde scoreformulier. De ernst van elk symptoom is gewaardeerd op een schaal van 0 (geen symptomen) tot 4 (zeer ernstige symptomen). De scores van de afzonderlijke symptomen zijn gesommeerd tot een totaalscore.

Binnen de proef hebben we van de middelste zes planten drie vruchten per tros beoordeeld op de aanwezigheid van vruchtsymptomen. In totaal zijn er dus per behandeling (3 x 6 x 3 =) 54 vruchten beoordeeld op de aanwezigheid van pepino-gerelateerde symptomen, te weten:

- aanwezigheid van necrose op de kroontjes;
- misvorming van de vruchten;
- aanwezigheid van opengebarsten vruchten;
- wankleurigheid;
- aanwezigheid van pepinoprint.

Elk van deze symptomen is gewaardeerd gescoord op een schaal van 0 to 4:

0 = Geen symptomen zichtbaar;	1 = Lichte symptomen zichtbaar;
2 = Behoorlijke symptomen zichtbaar;	3 = Veel symptomen zichtbaar.
4 = Ernstige symptomen zichtbaar;	

3 Resultaten

Voorafgaand aan de proeven zijn alle planten gecontroleerd op de afwezigheid van PepMV. Met een DAS-ELISA is daarna bepaald of de inoculaties met de zwakke isolaten geslaagd zijn, wat bij alle behandelingen het geval bleek. Ook aan het einde van de proef is in alle gevallen met een ELISA virus aangetoond in de planten. Tijdens de proeven zijn waarnemingen gedaan binnen zowel de behandelingen met enkele infecties van zwakke isolaten en agressieve isolaten als in de cross-protectie behandelingen. De waarnemingen op planten die alleen besmet zijn met het zwakke isolaat geven aan hoe mild de symptomen van deze isolaten zelf zijn. De waarnemingen op planten die alleen besmet zijn met de agressieve isolaten geven aan hoe ernstig de symptomen zouden zijn als er geen cross-protectie wordt toegepast. Tenslotte geven de cross-protectie behandelingen aan in hoeverre de zwakke PepMV-isolaten in staat zijn om tomatenplanten te beschermen tegen de agressieve isolaten.

3.1 Symptoomverloop bij enkele besmetting

Het verloop van de bladsymptomen is gevolgd door hiervan op verschillende tijdstippen waarnemingen te doen. De resultaten voor de enkele besmetingen staan in Tabel 3 weergegeven.

De bladsymptomen bij de zwakke isolaten waren gedurende de gehele looptijd van de proef minimaal. Dit was conform de verwachting aangezien deze isolaten vooraf op toetsplanten waren getest en er destijds alleen milde of helemaal geen symptomen zijn waargenomen. De isolaten *Pep1* en *Pep14* gaven meer symptomen dan de andere zwakke isolaten, maar zijn nog altijd als mild te beschouwen. De symptomen die in lichte mate zijn waargenomen zijn weergegeven in Tabel 4. Bij geen van de zwakke isolaten is necrose waargenomen. Opvallend is verder dat deze zwakke isolaten geen piek in de symptomen geven, maar dat de infectie ervan zeer gelijkmatig verloopt.

De agressieve isolaten gaven matige tot ernstige bladsymptomen op de tomatenplanten als er geen cross-protectie werd toegepast (Tabel 3). Bij een deel van de agressieve isolaten zijn de symptomen kort na de inoculatie het hevigst en nemen in de loop van de proef af. Een uitzondering hierop vormen de necrotische isolaten (*Pep32* en *Pep48*), waarbij de symptomen aan het begin beperkt zijn, maar gedurende de looptijd van de proef sterk in heftigheid toenemen. De symptomen die zijn waargenomen zijn weergegeven in Tabel 4. Zonder cross-protectie hebben deze planten dus een behoorlijke tot ernstige schade opgelopen door de PepMV infectie. Wat dit op de lange termijn voor de opbrengst zou betekenen is onduidelijk omdat de proeven conform de opzet na zeven weken beëindigd zijn en de vruchtsymptomen niet bekend zijn. Zeker is dat de bladsymptomen van *Pep6*, *Pep37*, *Pep47* en *Pep48* heftiger zijn dan die van een isolaat met sterke bladvergelting (*V3*) dat in de kasproef van 2006 gebruikt is en wat destijds 8% opbrengstverlies gaf [13].

Tabel 3. Het symptoomverloop op tomaat binnen de enkele besmettingen. De symptoomscore geeft een indicatie van de ernst van de PepMV-gerelateerde symptomen; hoe lager de score hoe minder symptomen er zichtbaar zijn.

Isolaat	Karakteristieke symptomen	Symptoomscore na			Verloop besmetting
		2 weken	4 weken	7 weken	
<i>1066</i>	Zwak isolaat	1	2	0	Gelijk
<i>VI</i>	Zwak isolaat	1	0	1	Gelijk
<i>Pep1</i>	Zwak isolaat	2	3	3	Gelijk
<i>Pep14</i>	Zwak isolaat	3	4	3	Gelijk
<i>Pep27</i>	Zwak isolaat	1	0	1	Gelijk
<i>Pep47</i>	Matige symptomen	5	3	1	Afname
<i>Pep24</i>	Behoorlijke symptomen	9	5	2	Afname
<i>Pep37</i>	Ernstige symptomen	10	8	5	Afname
<i>Pep6</i>	Ernstige symptomen	14	10	6	Afname
<i>Pep32</i>	Necrotische symptomen	3	4	14	Toename
<i>Pep48</i>	Necrotische symptomen	6	10	11	Toename

Tabel 4. De symptomen van de getoetste stammen die (in meer of minder mate) op enig moment zijn waargenomen in de enkele besmettingen.

Isolaat	Waargenomen symptomen
<i>1066</i>	Bobbeling op het blad en gele vlekjes
<i>VI</i>	Mozaïek
<i>Pep1</i>	Bobbeling op het blad, brandnetelblad (zeer licht), mozaïek en gele vlekjes
<i>Pep14</i>	Bobbeling op het blad, brandnetelblad (zeer licht), mozaïek en gele vlekjes
<i>Pep27</i>	Mozaïek
<i>Pep47</i>	Bobbeling op het blad, brandnetelblad, mozaïek en bladmisvorming (licht)
<i>Pep24</i>	Bobbeling op het blad, brandnetelblad, mozaïek, gele vlekjes en bladmisvorming
<i>Pep37</i>	Bobbeling op het blad, brandnetelblad (heftig), mozaïek, gele vlekjes en bladmisvorming (heftig)
<i>Pep6</i>	Bobbeling op het blad, brandnetelblad, mozaïek, gele vlekjes, bladmisvorming (heftig) en chlorose
<i>Pep32</i>	Bladmisvorming, stengel- en bladnecrose
<i>Pep48</i>	Bobbeling op het blad, brandnetelblad, mozaïek, gele vlekjes, bladmisvorming, stengel- en bladnecrose

3.2 Cross-protectie

Het verloop van de bladsymptomen is ook binnen de cross-protectie behandelingen gevolgd, waarbij er dus een tweede besmetting met een agressief virus plaatsvond. De resultaten hiervan staan weergegeven in Tabel 5 en 6.

Toepassing van cross-protectie in deze kleinschalige en kortdurende proeven verbetert over het algemeen de situatie voor de tomatenplanten. De agressieve isolaten gaven matige tot ernstige bladsymptomen op de tomatenplanten als er geen cross-protectie werd toegepast. In de meeste gevallen zijn de symptomen van de agressieve isolaten binnen de cross-protectie behandelingen lager dan zonder cross-protectie (Tabel 5 en 6). Het meest duidelijke effect is dat cross-protectie de piek in de symptomen - die kort na inoculatie optreedt - weet te vermin-

deren. Naarmate de besmetting vordert, herstellen de planten vanzelf al, waardoor het effect van cross-protectie niet altijd meer waarneembaar is aan het eind van de proef.

*Tabel 5. De ernst van de PepMV-gerelateerde symptomen na 50 dagen op tomaat binnen de cross-protectie behandelingen. Hoe lager de score hoe minder symptomen er zichtbaar waren. In de tweede kolom vanaf links staat ter controle weergegeven wat de ernst van de symptomen was na 50 dagen bij een enkele infectie (zie ook Tabel 3). Rechts daarvan staan de symptomen binnen de cross-protectie behandelingen met de afzonderlijke zwakke isolaten.*¹*

Isolaat	Bij enkele infectie	Cross-protectie na eerdere infectie met zwak isolaat				
		1066	VI	Pep1	Pep14	Pep27
Pep 47	1	1	1	n.b.	n.b.	n.b.
Pep 24	2	0	0	2	3	1
Pep 37	5	3	2	3	5	1
Pep 6	6	1	6	3	3	3
Pep 32	11	12	13	3	11	4
Pep 48	14	16	14	3	10	6

n.b. = niet bepaald.

*¹ De kleuren in de tabel geven aan of er een verbetering optrad ten opzichte van de enkele infecties. Blauw wil zeggen dat er een verbetering was bij toepassing van cross-protectie, rood wil zeggen dat er een verslechtering was, terwijl zwart aangeeft dat er geen sprake was van een wezenlijk verbetering of verslechtering.

*Tabel 6. De piek in de PepMV-gerelateerde symptomen op tomaat binnen de cross-protectie behandelingen. Hoe lager de score hoe minder symptomen er zichtbaar waren tijdens de piek. In de tweede kolom vanaf links staat ter controle weergegeven hoe hoog de piek in de symptomen was bij een enkele infectie (zie ook Tabel 3). Rechts daarvan staan de symptoompieken binnen de cross-protectie behandelingen met de afzonderlijke zwakke isolaten.*¹*

Isolaat	Bij enkele infectie	Cross-protectie na eerdere infectie met zwak isolaat				
		1066	VI	Pep1	Pep14	Pep27
Pep 47	5	1	1	n.b.	n.b.	n.b.
Pep 24	9	1	2	4	3	2
Pep 37	10	4	2	6	5	4
Pep 6	14	3	6	3	3	3
Pep 32	11	12	13	5	11	4
Pep 48	14	16	14	3	10	6

n.b. = niet bepaald.

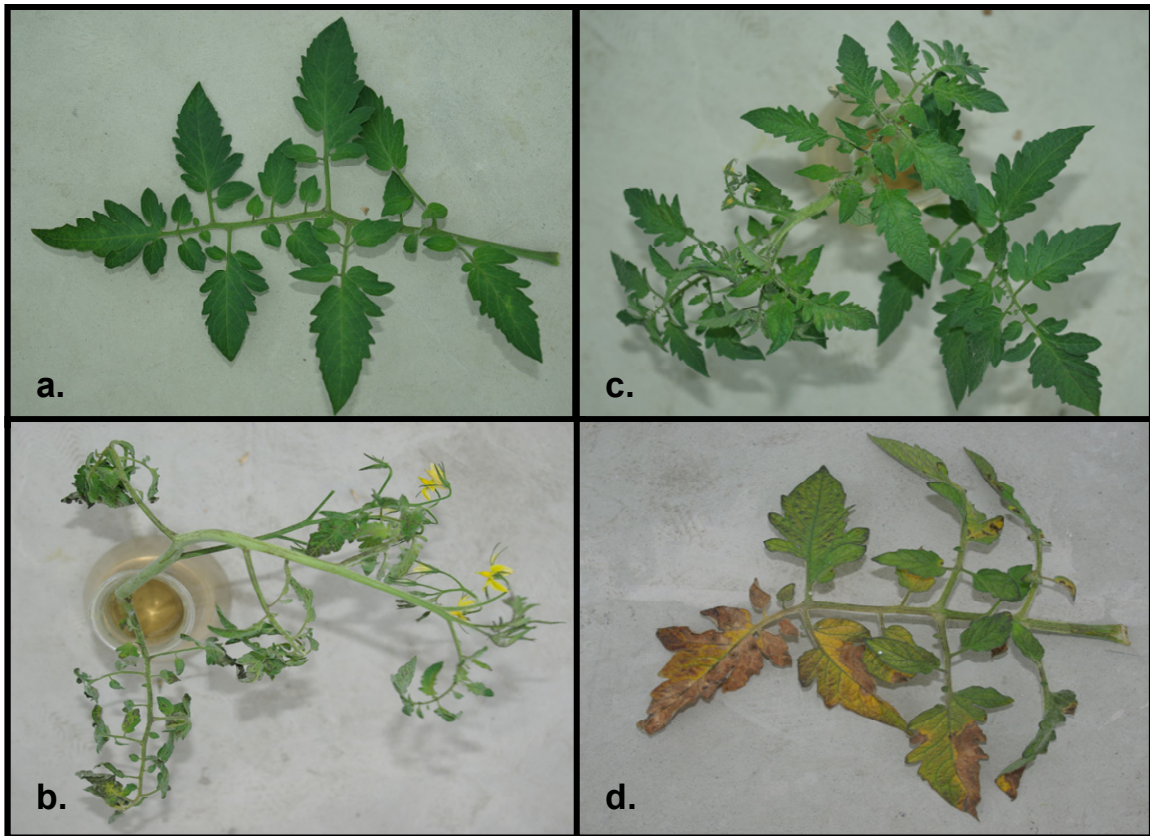
*¹ De kleuren in de tabel geven aan of er een verbetering optrad ten opzichte van de enkele infecties. Blauw wil zeggen dat er een verbetering was bij toepassing van cross-protectie, rood wil zeggen dat er een verslechtering was, terwijl zwart aangeeft dat er geen sprake was van een wezenlijk verbetering of verslechtering.

De isolaten *Pep24* en *Pep47* veroorzaken in een enkele besmetting behoorlijke symptomen kort na inoculatie (Tabel 3), maar de planten herstellen daarna. Na 50 dagen is het herstel zodanig dat er nauwelijks meer symptomen zichtbaar zijn. De scores voor deze planten zijn aan het eind van de proef na cross-protectie gelijk of iets beter dan bij een enkele besmetting (Tabel 4). Toch is er sprake van enige winst door cross-protectie, doordat de piek in de ernst van de symptomen daar lager is dan bij een enkele infectie (Tabel 5). Echter, deze winst is zodanig dat bij een besmetting met deze isolaten cross-protectie niet noodzakelijk lijkt.

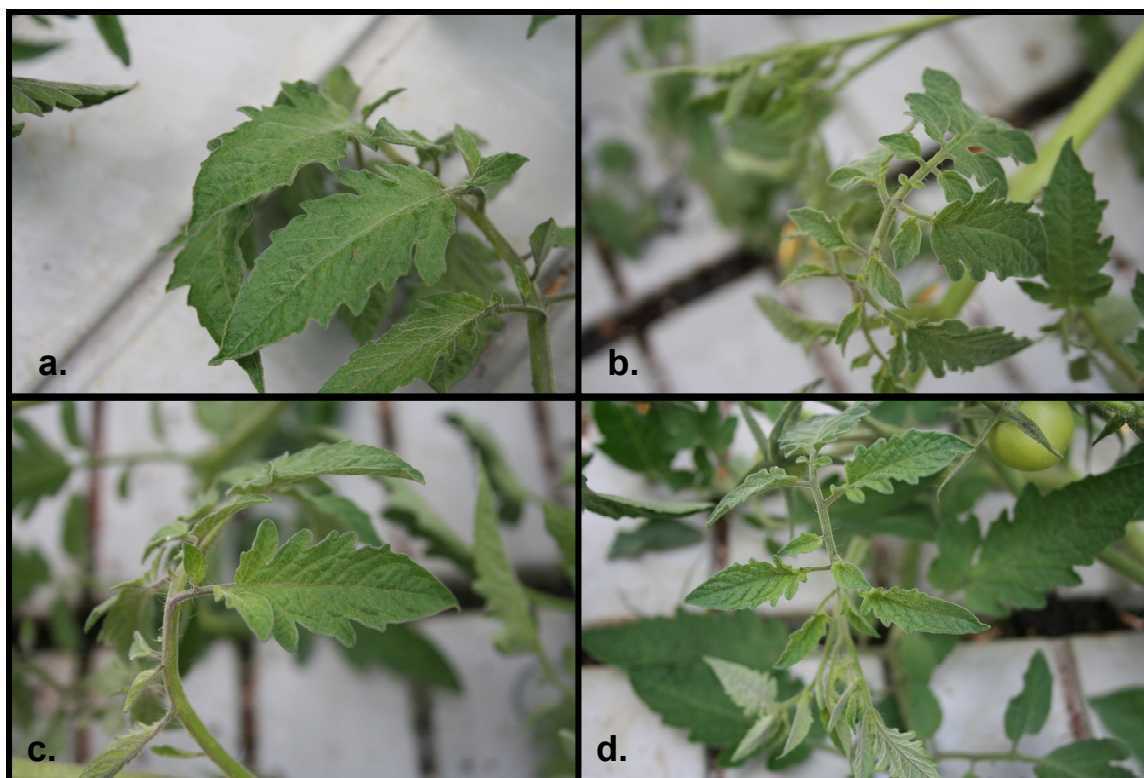
De isolaten *Pep6* en *Pep37* veroorzaken in een enkele besmetting ernstige symptomen kort na inoculatie (Tabel 3) en de planten herstellen daarna enigszins, maar niet helemaal. Na 50 dagen is het herstel zodanig dat er toch nog behoorlijke symptomen zichtbaar zijn. De scores voor deze planten zijn na cross-protectie beter dan bij een enkele besmetting (Tabel 4) en ook de piek in de symptomen wordt aanzienlijk gereduceerd (Tabel 5). Hier levert cross-protectie winst op, doordat zowel de piek in de ernst van de symptomen lager is dan bij een enkele infectie en doordat deze verbetering ook na enkele weken nog zichtbaar is (Figuur 3a en 3b).

De isolaten *Pep32* en *Pep48* veroorzaken in eerste instantie slechts milde symptomen bij een enkele besmetting (Tabel 3), maar de symptomen nemen naderhand zienderogen toe. Er treedt necrose op en na 50 dagen zijn er nog altijd ernstige symptomen zichtbaar. Voor deze isolaten zijn de resultaten van cross-protectie wisselend. De symptomen bij deze planten zijn na cross-protectie door *VI*, *1066* en *Pep14* (Peruviaanse en EU-tomaten stam) niet beter en soms zelfs slechter dan bij een enkele besmetting (Tabel 5). Ook de piek in de symptomen wordt niet wezenlijk gereduceerd. Er waren bij deze planten na 50 dagen ook duidelijk symptomen zichtbaar (Figuur 3c en 3d). De scores voor deze planten zijn na cross-protectie door *Pep1* en *Pep27* (CH2 resp. EU-tomaten stam) wél beter dan bij een enkele besmetting (Tabel 5). Vooral *Pep1* levert hier een sterke verbetering op. De behandeling met *Pep1* was ook de enige behandeling die voorkwam dat er necrose optrad.

De verschillen tussen de zwakke isolaten geven aan dat niet alle isolaten even geschikt zijn om als zwak isolaat te dienen. *Pep14* is ongeschikt doordat dit isolaat te weinig verbetering oplevert binnen de cross-protectiebehandeling. *1066* en *VI* werken goed, maar komen in de problemen als ze geconfronteerd worden met necrotische isolaten van de CH2 stam. Zij bieden dan geen bescherming tegen het optreden van necrotische bladsymptomen. *Pep1* en *Pep27* zijn het meest veelbelovend, aangezien ze onder bijna alle omstandigheden tot een verbetering lijden. Vooral *Pep1* springt in het oog, doordat het binnen de huidige proefopzet het optreden van necrose weet te voorkomen.



Figuur 3. Symptomenbeelden uit de cross-protectie proeven. Cross-protectie met V1 en 1066 werkt niet onder alle omstandigheden. De symptomen zijn 25 dagen na de tweede inoculatie vastgelegd.
a. Cross-protectie door V1 werkt enigszins tegen Pep6, b. cross-protectie door V1 werkt niet tegen Pep48, c. cross-protectie door 1066 werkt tegen Pep6, d. cross-protectie door 1066 werkt niet tegen Pep48.



Figuur 4. Symptomenbeelden uit de cross-protectie proeven. Cross-protectie met Pep1 lijkt wel onder alle omstandigheden te werken. De symptomen zijn 25 dagen na de tweede inoculatie vastgelegd. a. Cross-protectie door Pep1 tegen Pep6, b. cross-protectie door Pep1 tegen Pep24, c. cross-protectie door Pep1 tegen Pep32, d. cross-protectie door Pep1 tegen Pep48.

3.3 Bepaling virusratio's

Met RT-PCR is met specifieke primers de hoeveelheid *VI* bepaald in de cross-protectie behandelingen waarin dit isolaat is toegepast als zwakke stam. Ook is de totale hoeveelheid PepMV bepaald. Aan de hand hiervan is de ratio tussen *VI* en de totale hoeveelheid PepMV berekend zoals die ten tijde van de eindwaarneming was (Tabel 7). Uit deze metingen blijkt duidelijk dat het agressieve virusisolaat de beschermde planten weet binnen te dringen in de cross-protectie behandelingen met *VI*. In alle behandeling omvatte *VI* op dat moment minder dan de helft van de totale hoeveelheid PepMV.

De ratio tussen *VI* en de totale hoeveelheid PepMV lijkt geen voorspellende waarde te hebben voor de symptoomontwikkeling (Tabel 7). Zo waren er bij de behandeling waarbij de ratio het hoogst was (dus relatief het minste *VI* aanwezig in de plant), de minste symptomen zichtbaar. Een ander voorbeeld zijn de behandelingen met *VI* + *Pep32* en *VI* + *Pep37* die beide een ratio van 1:20 hebben, maar waarbij de symptoomscores wijd uiteen lopen.

De totale virusconcentratie geeft mogelijk wel enige aanwijzingen voor de symptoomontwikkeling (Tabel 7). Zo hebben de twee behandelingen met de hoogste virusconcentratie ook de ernstigste symptomen. Echter, de behandeling met de laagste concentratie was intermediair in zijn symptomen, dus ook hier is geen sprake van een eenduidige voorspellende waarde.

Tabel 7. Aan de hand van de monsters die verzameld zijn aan het eind van de proef is in de cross-protectie behandelingen met V1 de ratio bepaald tussen V1 en de totale hoeveelheid PepMV. De tabel geeft verder aan wat de symptoomscore in de cross-protectie behandeling was op het moment van de monstername.

Behandeling	Totale hoeveelheid PepMV	Hoeveelheid V1	Ratio V1: PepMV-totaal	Score in cross-protectie
V1	3.35	3.00	1:1	1
V1 + Pep6	6.16	4.09	2:3	6
V1 + Pep32	535.17	27.17	1:20	13
V1 + Pep37	148.45	7.59	1:20	2
V1 + Pep47	214.35	8.08	1:27	1
V1 + Pep48	277.02	7.18	1:39	14
V1 + Pep24	182.77	2.70	1:68	0

3.4 Vruchtproef

De tomatenplanten in de vruchtproef zijn besmet met PepMV om zo de eventuele vruchtsymptomen te bepalen van enkele potentieel zwakke CH2 isolaten. Met een ELISA is vastgesteld dat in alle planten van de behandelingen *Pep1*, *Pep12* en *Pep28* virus na één week aanwezig was. Na twee weken was dit ook bij *Pep16* het geval. De besmetting is dus bij alle isolaten geslaagd.

De bladsymptomen waren over het algemeen zeer beperkt. In een groot aantal planten zijn mozaïek en gele vlekjes gevonden, terwijl brandnetelvormig of bobbelig blad af en toe aanwezig was. Uit de ontwikkeling van de bladsymptomen komen geen opvallende zaken naar voren. De scores zijn kort na inoculatie kortstondig hoog en stabiliseren dan op een laag niveau, hetgeen ook de verwachten valt voor een zwakke stam. Wel zijn de waargenomen blad-symptomen van *Pep1* heftiger dan in de voorgaande cross-protectie proeven met dit isolaat. Dit werd mogelijk veroorzaakt door suboptimale groeiomstandigheden.

De vruchtsymptomen varieerden tussen de vier isolaten, waarbij alleen de isolaten *Pep1* en *Pep28* milde tot geen symptomen hadden (Figuur 5). We hebben in geen van de behandelingen necrose op de kroontjes of opengebarsten vruchten aangetroffen. Misvorming van de vruchten was moeilijk waarneembaar op deze vleestomaten, die van zichzelf al niet mooi rond waren. Op een deel van de vruchten was wankleurigheid en/of pepinoprint zichtbaar. Tabel 8 geeft de gemiddelde score per vrucht weer voor deze symptomen. Daarnaast zijn de symptoomscores bij elkaar opgeteld om een totaalscore te berekenen. Hierbij moet aangetekend worden dat we een 'worstcase scenario' getoetst hebben, aangezien het klimaat suboptimaal was doordat de planten in een enkele rij stonden, het toetsras een vleestomaat was en het moment van besmetten viel in een periode waarin de PepMV-symptomen in de praktijk vaak heftig zijn. De met groen gemarkeerde velden geven aan in welke gevallen de gemiddelde score voor de vruchtsymptomen laag is. *Pep1* scoorde dus gemiddeld het beste, terwijl *Pep12* ronduit slecht scoort.

Er is een tendens dat de vruchtsymptomen minder zijn op de latere trossen. Op tros 1 waren de symptomen het heftigst, terwijl ze bij tros 2 en tros 3 minder heftig waren. De enige uitzondering hierop was *Pep1*, waarbij op tros 3 ineens pepinoprint op kwam zetten. Mogelijk volgen de vruchtsymptomen een vergelijkbaar patroon als de blad-symptomen, waarbij er kort na de inoculatie een piek is in de symptomen die vervolgens geleidelijk weer afnemen. De planten in deze proef zijn relatief laat besmet, waardoor er al kort na de inoculatie vruchten geoogst konden worden. Een vroege besmetting had de symptomen op de eerste tros misschien kunnen voorkomen.

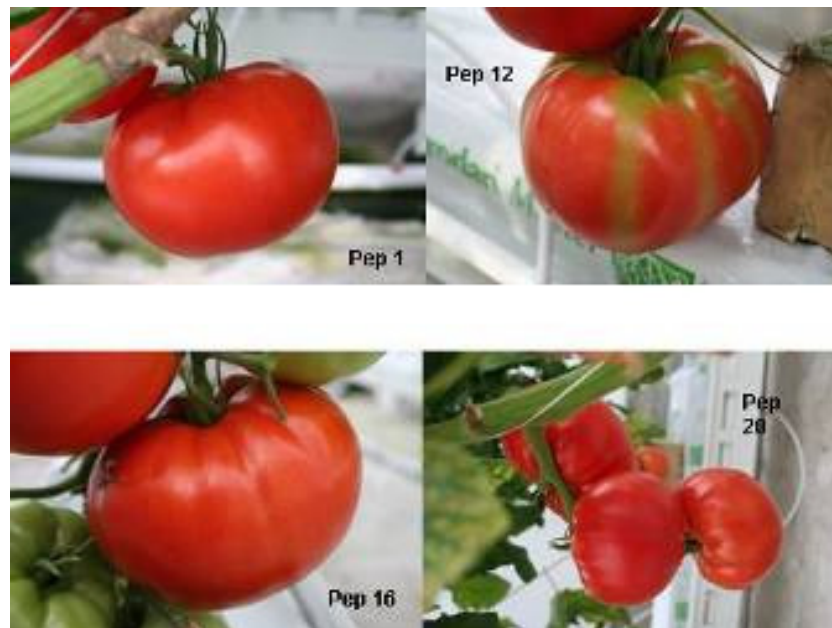
Tabel 8. De symptomen op tomaten na inoculatie met een viertal zwakke CH2 isolaten. De scores geven een indicatie van de ernst van de symptomen. Hoe lager de score hoe minder symptomen er zichtbaar waren.

Symptoom	Wankleurigheid			Pepinoprint			Totaalscore		
Tros	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Isolaat									
<i>Pep1</i>	0.2	0.3	0.3	0.2	0.1	0.7	0.4	0.4	1.0
<i>Pep12</i>	0.6	0.4	0.8	1.4	0.5	0.1	2.0	0.9	0.9
<i>Pep16</i>	0.1	0.0	0.5	0.8	0.5	0.3	1.0	0.5	0.8
<i>Pep28</i>	0.2	0.1	0.1	1.1	0.3	0.1	1.3	0.3	0.3

In principe kunnen de vruchten met een symptoomscore van 0 of 1 in ieder geval als 'klasse 1' doorgaan. Als we per behandeling kijken hoeveel vruchten goed genoeg zijn om als klasse 1 door te gaan (Tabel 9), dan zijn dat bij de behandeling met *Pep1* alle vruchten op vijf na. Op tros 1 en 2 waren nagenoeg alle vruchten van goede kwaliteit. Bij *Pep12* valt een groot deel van de vruchten uit; hier valt op tros 1 zelfs het merendeel van de vruchten uit. *Pep12* is daarom sowieso ongeschikt voor eventueel gebruik als zwakke stam. *Pep16* en *Pep28* scoren gemiddeld, maar bij *Pep28* zijn de vruchten van tros 2 en tros 3 erg goed van kwaliteit, waardoor gebruik van dit isolaat het overwegen waard is.

Tabel 9. De kwaliteit van tomatenvruchten na inoculatie met PepMV met een viertal zwakke CH2 isolaten. Er is onderscheid gemaakt tussen het aantal vruchten ($n=18$) dat door kan gaan als klasse 1 en als klasse 2 of afval.

Isolaat	Tros	Aantal vruchten klasse 1	Aantal vruchten klasse 2
<i>Pep1</i>	Tros 1	17	1
	Tros 2	18	0
	Tros 3	14	4
	Totaal <i>Pep1</i>	49	5
<i>Pep12</i>	Tros 1	7	11
	Tros 2	14	4
	Tros 3	14	4
	Totaal <i>Pep12</i>	35	19
<i>Pep16</i>	Tros 1	14	4
	Tros 2	17	1
	Tros 3	15	3
	Totaal <i>Pep16</i>	36	8
<i>Pep28</i>	Tros 1	12	6
	Tros 2	17	1
	Tros 3	17	1
	Totaal <i>Pep28</i>	36	8



Figuur 5. Enkele afbeeldingen van tomaten uit de vruchtproef. Pep1 en Pep28 leken ook qua vruchtsymptomen relatief mild, terwijl Pep12 dat zeker niet was.

4 Discussie en conclusie

De doelstelling van dit onderzoek is om te bepalen of zwakke stammen in staat zijn om de tomatenteelt te beschermen tegen nieuwe (agressievere) isolaten van het pepinomozaïekvirus. Daarbij zijn zowel bestaande zwakke stammen (*1066* en *VI*) als enkele nieuwe zwakke CH2-stammen onderzocht.

Dit verslag rapporteert over de fases 1 en 2 van dit onderzoek. De informatie die hieruit voortkomt, wordt gebruikt voor een grote praktijkproef omtrent cross-protectie die in 2009 zal plaatsvinden. Hierover zal in een apart verslag gerapporteerd worden.

4.1 Agressieve isolaten

Binnen dit onderzoek hebben we een zestal agressieve PepMV-isolaten geselecteerd om de werking van de zwakke stammen in cross-protectie te toetsen. We hebben getracht om deze selectie zo representatief mogelijk te maken voor de Nederlandse praktijksituatie waarin de CH2 stam momenteel een steeds belangrijkere rol lijkt te gaan spelen. De isolaten dekken een groot deel van de variatie af, zoals die in de praktijk onder pepino isolaten aanwezig is. Allereerst bevinden zich onder de zes isolaten vertegenwoordigers van twee stammen die in Nederland aanwezig zijn (de EU en CH2 stam) en mengsels van beide stammen. Daarnaast hebben we isolaten met een grote diversiteit aan symptomen onderzocht, variërend van licht tot ernstig. Tenslotte gaven twee van de zes isolaten necrotische symptomen en vier niet. De necrotische isolaten verschillen van de rest, doordat de symptomen aan het begin beperkt zijn, maar gedurende de looptijd van de proef sterk in heftigheid toenemen.

4.2 Cross-protectie in het algemeen

De agressieve isolaten gaven matige tot ernstige bladsymptomen op de tomatenplanten als er geen cross-protectie werd toegepast. Zonder cross-protectie zouden deze planten dus een behoorlijke tot ernstige schade hebben opgelopen door een PepMV infectie. Toepassing van cross-protectie verbetert over het algemeen de situatie voor de tomatenplanten. Het meest duidelijke effect is dat de piek in de symptomen die kort na inoculatie optreedt, lager is door toepassing van cross-protectie. Wel moet opgemerkt worden dat de geteste zwakke isolaten *1066* (EU-tomaten stam) en *VI* (Peruviaanse stam) minder goed beschermen tegen de agressieve CH2 isolaten dan tegen de zwakke CH2 isolaten.

Afgaande op de proefresultaten is cross-protectie niet altijd zinvol. Bij een besmetting met isolaten die van zichzelf mild of matig agressief zijn, geldt dat de planten zich vanzelf al herstellen. Weliswaar wordt de piek in symptomen verlaagd, maar ook zonder cross-protectie zouden in deze gevallen de gevolgen van een besmetting beperkt zijn geweest. Hierbij moeten we wel enig voorbehoud maken, want over het optreden van vruchtsymptomen onder cross-protectie omstandigheden hebben we geen informatie.

Bij een besmetting met isolaten die van zichzelf behoorlijk tot agressief zijn, geldt dat cross-protectie een duidelijke verbetering kan opleveren. Hierbij kan opnieuw niets gezegd worden over het optreden van vruchtsymptomen, maar de bladsymptomen zeggen wel iets over eventuele opbrengstverliezen en cross-protectie perkt deze dus in. Voor bepaling van de werking tegen vruchtsymptomen is een grote kasproef noodzakelijk die gedurende een geheel teeltseizoen loopt.

In alle cross-protectie proeven met *VI* weet het agressieve virusisolaat uiteindelijk wel de beschermde planten binnen te dringen. Dit zegt echter niets over het optreden van symptomen, want die kunnen na het binnendringen variëren van zeer mild tot zeer agressief.

4.3 Cross-protectie met bestaande en nieuwe zwakke stammen

Niet alle onderzochte isolaten zijn even geschikt als zwak isolaat. De bestaande zwakke isolaten *1066* en *VI* boden gedeeltelijke bescherming tegen infectie met agressievere isolaten, maar boden geen bescherming tegen de twee onderzochte necrotische isolaten. Hierbij werden de symptomen zelfs enigszins versterkt door de aanwezigheid van *1066* of *VI*. Dit gold ook voor twee andere nieuwe zwakke stammen die we onderzocht hebben. Alleen het nieuwe zwakke isolaat *Pep1* (CH2 stam) bood na 50 dagen nog bescherming tegen de beide necrotische isolaten.

Er kunnen verschillende redenen zijn waarom de bestaande zwakke stammen niet werken tegen de necrotische isolaten en *Pep1* dat wel kan. De eerste mogelijkheid is dat de genetische achtergrond van het virus een rol speelt. De geteste necrotische isolaten *Pep32* en *Pep48* zijn respectievelijk een mengsel van de EU- en CH2 stam en een isolaat van de CH2 stam. Doordat *1066* en *VI* respectievelijk tot de EU en PE stam behoren, kunnen zij mogelijk geen bescherming bieden tegen agressieve isolaten van de CH2 stam. *Pep1*, wat behoort tot deze CH2 stam, zou dat dan wel kunnen.

Wat betekent dit nu voor de huidige praktijk? Gezien het feit dat bij het merendeel van de infecties die in Nederland plaatsvinden er een virusvariant van de CH2 stam aanwezig is, ligt het voor de hand om als men cross-protectie zou willen toepassen, dit met een zwakke CH2 stam te doen. Als de hypothese correct is dat alleen een zwak CH2 virus kan beschermen tegen de agressieve CH2 varianten, zou dit ook betekenen dat bescherming met *VI* in deze gevallen zinloos is. In de situatie zoals die in 2006 bestond en waarbij alleen isolaten van de EU-stam aanwezig waren, was protectie met *VI* wel zinvol, maar dat is in de huidige situatie al minder het geval. Als de trend zich doorzet dat er steeds meer CH2 varianten komen, zal de keuze voor een bepaalde zwakke stam mee moeten veranderen.

Een tweede mogelijkheid is dat het zwakke CH2 isolaat, *Pep1*, een hogere virusconcentratie bereikt in de plant dan de EU- of PE-isolaten en daarom een betere bescherming biedt. Aanwijzingen hiervoor zijn dat de totale virusconcentratie enige voorspellende waarde geeft voor de symptoomontwikkeling binnen de cross-protectie behandelingen. De ratio tussen *VI* en de totale hoeveelheid PepMV heeft in onze proeven echter geen voorspellende waarde voor de symptoomontwikkeling.

4.4 Vruchtsymptomen van zwakke CH2-stammen

Stel dat er inderdaad met een zwak CH2 gewerkt moet worden voor succesvolle cross-protectie in de toekomst, dan is het van belang om een stam te selecteren die weinig of geen symptomen geeft. Er is echter binnen het Nederlandse onderzoek nog nooit bekeken wat de vruchtsymptomen zijn van zwakke CH2-stammen. *Pep1* is een Chili-2 isolaat uit de praktijk dat in 2007 is aangetroffen. De symptomen bestonden uit veel gele vlekken in het gewas en in beperkte mate print op de vruchten. Gezien de geringe beschikbare informatie bleek het noodzakelijk om een proef op te zetten om de vruchtsymptomen te bepalen die als gevolg van een infectie met een zwak CH2 isolaat optreden.

Van de vier getoetste CH2 isolaten, vielen er twee af vanwege de waargenomen vruchtsymptomen. Ook de symptomen van de overgebleven twee isolaten, *Pep1* en *Pep28*, waren niet optimaal. De symptomen zijn echter getoetst in een worstcase scenario en het valt te verwachten dat ze onder praktijkomstandigheden beter uit zullen pakken. Dit onderstreept des te meer de noodzaak van toetsing in een grote praktijkproef, waarbij het optreden van vruchtsymptomen en de werking van de cross-protectie gelijktijdig worden bepaald.

4.5 Conclusie

De bestaande zwakke stammen (*VI* en *1066*) zijn niet in staat om te beschermen tegen nieuwe agressieve isolaten van het pepinomozaïekvirus. Een nieuwe zwakke stam (*Pep1*) die behoort tot de CH2-stam, kan dat mogelijk wel.

5 Literatuur

1. Hanssen, I.M., A. Paeleman, L. Wittemans, K. Goen, B. Lievens, C. Bragard, A.C.R.C. Vanachter & B.P.H.J. Thomma.
Genetic characterization of Pepino mosaic virus isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *European Journal of Plant Pathology* 2007:1-16.
2. Jorda, C., A. Lázaro Pérez, P. Martínez-Culebras, P. Abad, A. Lacasa & M.M. Guerrero.
First Report of Pepino mosaic virus on Tomato in Spain. *Plant Disease* 2001, 85:1292.
3. Van der Vlugt, R.A.A., C.C.M.M. Stijger, J.T.J. Verhoeven & D.E. Lescmann.
First report of Pepino mosaic virus on tomato. *Plant Disease* 2000, 84:103.
4. Verhoeven, J.T.J., R.A.A. van Der Vlugt & J.W. Roenhorst.
High similarity between tomato isolates of Pepino mosaic virus suggests a common origin. *European Journal of Plant Pathology* 2003, 109:419-425.
5. Stijger, C.C.M.M. & R.A.A. van der Vlugt.
Pepino mosaic virus. In: *Encyclopedia of Virology Third Edition*. Edited by Mahy, B., Van Regenmortel, M.H.V.: Elsevier Publishers; 2008: 103-108.
6. Stijger, I., R. van der Vlugt, R. Hamelink, R. Kaarsemaker & A. Dulleman.
Op zoek naar de variabiliteit van pepinomozaïekvirus. In: *PT nummer (11598)*. Naaldwijk: Praktijkonderzoek Plant en Omgeving - Glastuinbouw; 2006.
7. Pagan, I., M.D.C. Cordoba-Selles, L. Martinez-Priego, A. Fraile, J.M. Malpica, C. Jorda & F. Garcia-Arenal.
Genetic structure of the population of Pepino mosaic virus infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology* 2006, 96:274-279.
8. Pospieszny, H., B. Hasiow & N. Borodynko
Characterization of two distinct Polish isolates of Pepino mosaic virus. *European Journal of Plant Pathology* 2008, 122:443-445.
9. Alfaro-Fernandez, A., M.C. Cebrian, C. Cordoba-Selles, J.A. Herrera-Vasquez & C. Jorda.
First report of the US1 strain of Pepino mosaic virus in tomato in the Canary islands, Spain. *Plant Disease* 2008, 92:1590.
10. Vermunt, A., R. van der Vlugt, R. Kaarsemaker, M. Schenk, I. Stijger, R. Hamelink & R. Meijer.
Bescherming en beheersing van PepMV in de tomatenteelt, onderdeel PepMV in de praktijk. 2009.
11. Vermunt, A., R. Kaarsemaker, M. Schenk & I. Stijger.
Haalbaarheid hygiëenstrategie bij tomatenbedrijven om vrij te blijven van pepinomozaïekvirus. 2009.
12. Vermunt, A.
Relatie tussen symptomen , PepMV-varianten en tomatenrassen. In.: PT-project 12265; 2006.
13. Stijger, I., R. Hamelink, R. van der Vlugt, R. Kaarsemaker & A. Vermunt.
Beschermende maatregelen tegen PepMV in de tomatenteelt. In: *Nota 548*. Bleiswijk: Wageningen UR Glastuinbouw. 2008.
14. Stijger, I. & R. Hamelink.
First year project report PEPEIRA (Pepino mosaic virus: epidemiology, economic impact and pest risk analysis. 2008.

[illegible]

