

## Zijn zwakke virusstammen wondermiddelen?

René van der Vlugt,  
Ineke Stijger en  
Martin Verbeek

Wageningen University &  
Research

**De roep om goede beheersingsstrategieën wordt na recente problemen met plantenvirussen steeds luider. Eén van die strategieën is het toepassen van een zwak virusisolaat dat de plant beschermt tegen de schade veroorzaakt door sterkere virusisolaten van dat bepaalde virus, ook wel ‘vaccinatie’ of ‘cross-protectie’ genoemd. In dit artikel een overzicht van wat dat nu precies is, een aantal voorbeelden en de voor- en nadelen van toepassing van cross-protectie.**

### Inleiding

De Nederlandse land- en tuinbouw is continu in beweging. Er zijn veel factoren waar rekening mee gehouden en waarop gereageerd moet worden. Eén van die factoren is hoe er omgegaan wordt met ziekten en plagen. De toelating van bepaalde gewasbeschermingsmiddelen valt weg en de roep om een natuurinclusieve landbouw neemt vanuit de samenleving toe. Daarnaast zien we door de intensieve handelsstromen, maar ook door het opwarmende klimaat, nieuwe ziekten en plagen de kop opsteken.

Ook als het gaat om plantenvirussen zien we toenemende problemen. Niet alleen met ‘oude bekenden’, zoals het Aardappelvirus Y (PVY), maar ook met voor Nederland nieuwe virussen zoals recent in de tomatenteelt de virussen Tomaten chlorose virus (ToCV) en het ‘tomato brown rugose fruit virus’ (ToBRFV). Nu zijn virussen niet direct in de plant te bestrijden. In een ideale wereld is er volop resistentie in planten beschikbaar, maar de praktijk is helaas anders. Het is vaak moeilijk om resistentie in te kruisen, het duurt vaak lang voordat commerciële rassen beschikbaar komen en doordat virussen snel muteren komt het vaak voor dat de resistentie doorbroken wordt. Beheersing van virusziekten, waarvoor geen resistentie in de geteelde planten aanwezig is, is erop gericht om met schoon en gecertificeerd plantmateriaal te beginnen, de hygiëne hoog in het vaandel te houden en eventuele overbrengers van plantenvirussen (vectoren) te bestrijden. Vooral het laatste punt is onder druk komen te staan door een steeds beperkter aanbod van toegelaten gewasbeschermingsmiddelen. Men is naarstig op zoek naar ‘nieuwe’ manieren om planten tegen virussen te beschermen. Een alternatieve manier om schade door plantenvirussen in het gewas te onderdrukken is het gebruik van cross-protectie. Deze methode werd in de

### KWALITEIT VAN HET ZWAKKE VIRUS

Zoals bekend, is de in de handel gebrachte smetstof niet geheel vrij van het gewone mozaïekvirus. Dit virus geeft in de wintermaanden aanleiding tot het ongewenste naaldblad-verschijnsel. Er wordt bij de kwaliteitscontrole van het zwakke virus naar gestreefd het percentage naaldblad-planten niet hoger te laten zijn dan 1 pct. Vorig jaar moest nog genoeg worden genomen met smetstof, welke tot 3 pct. naaldblad veroorzaakte.

Hierbij moet worden opgemerkt dat voor de kwaliteitscontrole het zwakke virus wordt aangebracht, nadat de uit virusvrij zaad opgekweekte planten zijn verspeend. Wanneer echter de besmetting bijvoorbeeld vier dagen vóór het verspenen of oppotten zou plaats hebben is het niet uitgesloten, dat in plaats van 1 pct. wel 6 tot 7 pct. naaldblad wordt waargenomen.

Men dient te bedenken, dat het gewone virus zich zeer snel vermeerdert en dat de hiermee geïnfecteerde plantjes spoedig een bron van besmetting voor de andere plantjes vormen. Immers, deze laatste kunnen weliswaar met zwak virus zijn geïnfecteerd, maar toch onvoldoende beschermd zijn op het moment van verspenen of oppotten.

Voor een volledige bescherming van de plantjes tegen het gewone virus heeft het zwakke virus, dat zich veel langzamer in de plant vermeerdert, minstens 10 dagen nodig.

Momenteel is een nieuw gevonden zwakke stam in beproeving, welke waarschijnlijk in veel geringer mate door gewoon virus is verontreinigd dan de thans gebruikte stam.

*Figuur 1: Gedeelte uit een vakbladartikel over het belang van een strenge kwaliteitscontrole van de zwakke stam MII-16 van tomatenmozaïekvirus (ToMV) (begin jaren '70).*

jaren 70 van de vorige eeuw succesvol toegepast bij het beheersen van Tomatenmozaïekvirus in de tomatenteelt en is momenteel ook ingeburgerd bij het beheersen van Pepinomozaïekvirus (PepMV).

### Wat is cross-protectie?

Cross-protectie is het gebruik van een zwakke stam van een virus om een plant te beschermen tegen de effecten van een meer agressieve stam van datzelfde virus. Het fenomeen werd al in 1929 voor het eerst beschreven. Het is min of meer te vergelijken met vaccinatie zoals we die bij mensen

en dieren kennen. Ook daarbij wordt een 'zwak' virus ingebracht om het afweermecanisme te stimuleren. Vaccinatie bij mens en dier is vooral gebaseerd op het opbouwen van een 'geheugen' tegen een virus of een andere ziekteverwekker zodat bij een volgende infectie de afweer, in de vorm van specifieke antilichamen, heel snel gemobiliseerd wordt.

Bij cross-protectie of 'vaccinatie' met een zwak plantenvirus gebeurt eigenlijk hetzelfde. Ook planten blijken afweermecanismen tegen virussen te hebben, al werken die wel anders dan bij mensen en dieren. Een van de belangrijkste mechanismen in planten is gebaseerd op het herkennen van stukjes van het genetisch materiaal (het RNA) van virussen die binnendringen. Wanneer een virus een plantencel infecteert en begint te vermenigvuldigen, wordt zijn genetisch materiaal als 'vreemd' herkend. Daarbij wordt het

in kleine stukjes geknipt die vervolgens in heel specifieke eiwitcomplexen worden ingebouwd (de zgn. RISC-complexen). Komt er later hetzelfde virus opnieuw die plant in, dan worden die RISC-complexen 'wakker' gemaakt en door de plant vermeerderd. De fragmentjes genetisch materiaal die ingebouwd zijn in deze complexen herkennen vervolgens het nieuwe binnendringende virus aan zijn genetisch materiaal en de RISC-complexen knippen dan het virus RNA (deels) kapot.

Daardoor wordt het 'nieuwe' virus grotendeels, maar niet helemaal, afgeremd. Dit hele proces wordt ook wel de siRNA-respons genoemd (siRNA staat voor *small interfering RNA*).

Het kapot knippen van het viraal RNA werkt alleen als er een goede herkenning van het virus door het RISC-complex is. Daarom moet het genetisch materiaal van het nieuwe virus heel sterk lijken op de stukjes in het RISC-complex. Dat verklaart ook dat vaccinatie met bijvoorbeeld een zwakke stam van virus A niet werkt tegen virus B. Het genetisch materiaal van virus B verschilt te veel van dat van A en wordt dus niet door de RISC-complexen tegen virus A herkend. Die specifieke herkenning kan zelfs zover gaan dat cross-protectie soms zelfs niet tegen een andere stam van hetzelfde virus werkt. Zo werkt bijvoorbeeld vaccinatie met een zwakke variant van de EU-tomatenstam van PepMV niet tegen de Chili-2 stam van PepMV. Beide stammen verschillen te veel van elkaar in hun genetisch materiaal zodat de herkenning door het RISC-complex niet werkt.

### Toepassingen van cross-protectie

Zoals al gezegd is het fenomeen van zwakke stam vaccinatie al sinds 1929 bekend. In de loop van de tijd zijn er veel voorbeelden beschreven. Een recente wetenschappelijke publicatie in het tijdschrift *Viruses* (Pechinger *et al*, 2019) geeft in een uitgebreide tabel een overzicht van de verschillende virussen waarmee cross-protectie is bewezen in laboratorium- maar in een aantal gevallen ook in veldsituaties. Het vermeldt maar liefst 39 verschillende virussen die bekend staan als belangrijke ziekteverwekkers in een diversiteit aan gewassen.

Zo is een aantal jaren geleden in Rusland onderzoek uitgevoerd met een zwakke stam van Komkommerbontvirus (CGMMV). In het laboratorium en kleinschalige kasproeven op verschillende komkommerrassen werden goede resultaten behaald met ook een hogere productie. Maar aan het eind van de teelt kregen toch een aantal planten heftige symptomen die mogelijk zijn veroorzaakt door terugmutatie van de zwakke stam. Daarbij moet ook worden aangetekend dat



Figuur 2: Ook in 1971 zag men al het belang van 'de kas op slot' (Westlandsche Courant aug 1971).



*Toepassing van MII-16 op tomatenzaailingen met behulp van een schildersspuit (begin jaren '70).*

deze Russische stam van CGMMV effectief kan zijn tegen de daar voorkomende agressieve stammen maar dat dit mogelijk niet zal werken tegen de Nederlandse stammen van CGMMV. In het onderzoek was vastgesteld dat Russische stammen verwant zijn met isolaten uit Spanje, Griekenland, USA en Israël.

In Frankrijk is in begin jaren '90 een zwakke stam van Courgettegeelmozaïekvirus (ZYMV) gevonden die erg efficiënt bleek in het beschermen van komkommer, meloen en courgette. Deze zwakke stam beschermde goed tegen vier agressieve isolaten van het virus uit de USA, Frankrijk en Taiwan. Uit dat onderzoek bleek een 40x hogere opbrengst behaald te kunnen worden wanneer de virusdruk hoog was.

In het overzicht ontbreekt echter een belangrijke toepassing van een zwakke stam. In Nederland is in de jaren '70 door Ben Rast van het voormalig Proefstation voor de Groenten-en Fruitteelt onder Glas in Naaldwijk, een zwakke stam van het Tomatenmozaïekvirus (ToMV) ontwikkeld. In die tijd was er nog geen goede resistentie tegen dit virus in tomaat. Deze zwakke stam, MII-16 (spreek uit als M-2-16) bleek bijzonder effectief in het beschermen van tomaten tegen agressieve stammen van het virus.

II-16 is door Ben Rast gemaakt door ToMV zo te behandelen dat er mutanten van het virus ontstonden. Door vervolgens deze mutanten allemaal te bekijken op hun reactie op tomatenplanten, kon er uiteindelijk een zwakke vorm van het virus worden geïsoleerd die slechts zwakke tot geen

symptomen op tomaat geeft. Werden tomaten als kiemplant met MII-16 geïnfecteerd dan bleken ze later goed beschermd tegen de gevolgen van een infectie met meer agressieve stammen van ToMV. Het 'agressieve' virus kon nog wel de tomatenplant infecteren maar dit leidde niet tot ernstige symptomen

II-16 is veel toegepast en heeft zelfs tot de jaren '90 een officiële Nederlandse registratie als biologisch gewasbeschermingsmiddel gehad. Daarom en door de brede toepassing was de productie van deze zwakke stam een serieuze zaak. Vermeerdering van het virus gebeurde op tomaat en er was een zeer strenge selectie op alleen zwak virus. MII-16 is een biologisch product en virussen kunnen soms snel veranderen en daarom was het belangrijk om 'terug-mutanten' die wel weer sterkere symptomen kunnen veroorzaken, tijdig te ontdekken en te verwijderen. Zoals uit figuur 1 blijkt kon de aanwezigheid van 'sterk' virus in MII-16 niet worden uitgesloten en daarom was het ook zaak om de zwakke stam op de juiste wijze en het juiste tijdstip toe te passen.

### **Voordelen en nadelen**

Het gebruik van een zwakke stam is natuurlijk een heel 'groene' manier van gewasbescherming. Je gebruikt een afweermechanisme dat al in elke plant aanwezig is, zonder dat er stoffen die niet al van nature aanwezig zijn in het milieu gebracht worden. Plantenvirussen zijn ook absoluut veilig voor mens en dier. Het is ook heel specifiek gericht tegen één virus en zal geen enkele schade doen aan bijvoorbeeld nuttige insecten. Mits 'zwakke stammen' op de plank liggen, kan het ook erg snel toegepast worden, hoewel zoals hierboven al genoemd, bij de productie een strenge kwaliteitscontrole bijzondere aandacht verdient.

Zijn er dan geen nadelen? Zeker wel. Toepassing is beperkt omdat het alleen tegen zeer nauw verwante virussen of virusstammen werkt. Ook bestaat er altijd het gevaar dat de zwakke stam weer terug muteert en symptomen kan veroorzaken. Infectie met een 'sterke' stam wordt niet voorkomen en daarmee blijft het 'sterke virus' wel aanwezig. Dat laatste betekent ook dat je ongewilde verspreiding van zowel het zwakke virus als het 'sterke' virus moet voorkomen. Daarbij is het dus ook belangrijk op welke wijze het virus wordt verspreid. Mechanisch, dus bijvoorbeeld met alle gewashandelingen zoals ToMV, PepMV en ook ToBRFV, of door vliegende of kruipende insecten (bijvoorbeeld bladluizen, wittevlieg of trips) zoals PVY. Inperkingen en strenge hygiëne-maatregelen waarbij effectief de kas 'op slot' gaat



*Symptomen van tomatenmozaïekvirus (ToMV) op tomatenras Barbara (rechts) naast zwakke symptomen van MII-16 (links).*

om deze ongewilde verspreiding te voorkomen, blijven belangrijk. Ook daar was men zich vroeger al terdege van bewust zoals wel blijkt uit figuur 2 uit 1971. Ook toen al begreep men dat vaccinatie met MII-16 geen volledige veiligheid gaf en dat het beter was om bezoekers buiten de kas te houden. Veel virussen zijn in staat om meerdere gewassen te infecteren en vaak kunnen ze, of zullen ze, dan een heel ander (schade)beeld geven. Ook daarom is voorkomen van onbedoelde verspreiding van het zwakke virus belangrijk. In dat verband is de huidige situatie rond het tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) interessant. Dit virus, dat tot dezelfde groep als ToMV en TMV behoort, doorbreekt de bekende resistentiegenen tegen ToMV en TMV in tomatenrassen wereldwijd. De huidige tomatenrassen zijn dus niet beschermd tegen dit virus. Vanwege dit duidelijke gevaar heeft het per 1 november binnen de Europese Unie de quarantainestatus gekregen. Daarmee moeten zaad en plantgoed vrij zijn van het virus en is, na vaststellen van een infectie, het tegengaan van verdere verspreiding van het virus verplicht. Het moge duidelijk zijn dat onder deze restricties, toepassing van een zwakke stam van ToBRFV simpelweg verboden is. Voor dit virus geldt nog een ander zorgpunt. Naast tomaat is ook vastgesteld dat het paprika's en peper (*Capsicum annuum*) kan infecteren en verder aubergine, petunia en zeer waarschijnlijk ook andere nachtschade-achtigen. Ook kan het verschillende onkruiden zoals melganzevoet infecteren. Dit virus heeft dus een brede waardplantreeks. Als er ooit een moment komt waarop een zwakke stam van ToBRFV beschikbaar zou komen, en toegelaten zou worden, dan zal er

zeer terdege nagegaan moeten worden dat deze zwakke stam ook veilig is voor andere gewassen. Dit om te voorkomen dat het kind met het badwater weggegooid wordt.

Zoals al boven gesteld, sluit vaccinatie met een zwak virus een infectie met een sterke stam van hetzelfde virus niet uit. Het vermindert alleen de negatieve effecten ervan. Beide stammen komen dus samen voor in de plant en dat kan leiden tot een vermenging van hun genetisch materiaal. Dit heet recombinatie en is voor veel virussen een van de manieren waarop ze zich snel kunnen aanpassen. Door recombinatie kan een virus andere eigenschappen krijgen zoals bijvoorbeeld een andere waardplant of minder, of juist heftigere symptomen. Nog een reden om na toepassing van een zwakke stam infecties van buitenaf met andere virussen zoveel mogelijk te voorkomen.

Toepassing van een zwakke stam-strategie in gewassen die als bol, knol of plantgoed worden geëxporteerd stuit nog op een ander praktisch bezwaar. Ontvangende landen verlangen vaak een gezondheidsverklaring en daarbij wordt ook naar de aanwezigheid van eventuele virussen gekeken. En gewassen met een zwak virus, zijn per definitie niet virusvrij.

### **Ter afsluiting**

In bepaalde gewassen, waarin geen stabiele resistentie aanwezig is, kan de toepassing van een zwakke stam (biologische gewasbeschermingsmiddel) van toegevoegde waarde zijn bij de noodzakelijke hygiënemaatregelen om te voorkomen dat een virusaantasting desastreuze gevolgen heeft voor een teelt. Er zijn inmiddels in de loop der jaren de nodige voorbeelden van toepassingen van zwakke virusstammen geweest. Toch is een zwakke virusstam geen wondermiddel. Voor een veilige en legale toepassing moet er aan nogal wat randvoorwaarden voldaan worden. Het is en blijft formeel een gewasbeschermingsmiddel waar een officiële registratie voor nodig is. Het garanderen van een goede en veilige kwaliteit vereist veel aandacht. Daarbij is een zwak virus nog altijd een virus dat van nature veranderlijk is en moeilijk in de hand te houden.

### **Literatuur**

Pechinger K, Mun Chooi K, MacDiarmid RM, Harper SJ and Ziebel H (2019) A new era for mild strain cross protection. *Viruses* 11: 670. doi:10.3390/v11070670