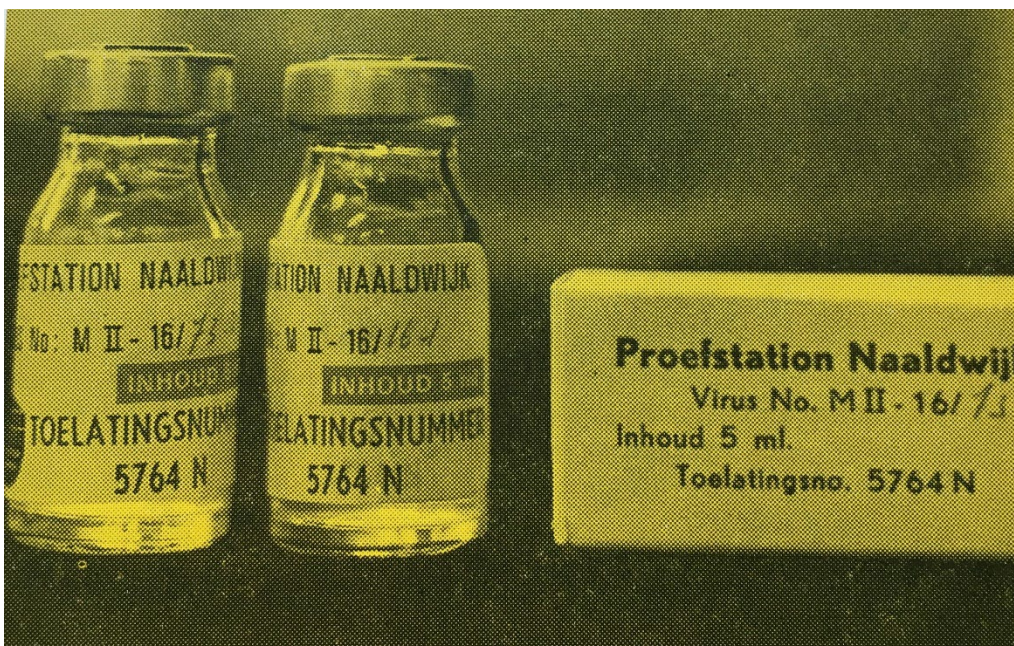


Cross-protectie in de strijd tegen plantenvirussen

Een literatuurstudie naar de mogelijkheden en beperkingen van cross-protectie door milde isolaten van plantenvirussen

M. Verbeek, C.C.M.M. Stijger en R.A.A. van der Vlugt



Cross-protectie in de strijd tegen plantenvirussen

Een literatuurstudie naar de mogelijkheden en beperkingen van cross-protectie door milde isolaten van plantenvirussen

M. Verbeek, C.C.M.M. Stijger en R.A.A. van der Vlugt

Wageningen University & Research

Dit literatuuronderzoek is in opdracht van het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit uitgevoerd door de Stichting Wageningen Research (WR), business unit Biointeracties en Plantgezondheid en de business unit Glastuinbouw en Bloembollen in het kader van beleidsondersteunend onderzoeksthema 102.04 Gezonde teeltsystemen (projectnummer BO-43-102.04-012).

WR is een onderdeel van Wageningen University & Research, samenwerkingsverband tussen Wageningen University en de Stichting Wageningen Research.

Wageningen, februari 2022

Rapport WPR-KD-2021-056

Verbeek, M., Stijger, C.C.M.M. en Van der Vlugt, R.A.A., 2022. *Cross-protectie in de strijd tegen plantenvirussen - Een literatuurstudie naar de mogelijkheden en beperkingen van cross-protectie door milde isolaten van plantenvirussen*. Wageningen Research, Rapport WPR- KD-2021-056.

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/561724>

Cross-protectie is het fenomeen dat zwakke isolaten van een bepaald plantenvirus een plant kunnen beschermen tegen schade die worden veroorzaakt als een agressievere variant van datzelfde virus later de plant infecteert. In dit rapport worden voor- en nadelen en aandachtspunten voor inzet van cross-protectie, gebaseerd op de literatuur, naar voren gebracht, maar ook een aantal voorwaarden aangedragen voor het produceren en inzetten van zulke zwakke virus-isolaten. Naar aanleiding van bovenstaande aandachtspunten zal worden ingegaan op de recente vraag vanuit de praktijk naar zwakke isolaten voor het komkommerbontvirus en het tomato brown rugose fruit virus. Voor deze beide virussen zijn op dit moment geen zwakke isolaten beschikbaar om in te zetten voor cross-protectie. Algemeen kan geconcludeerd worden dat de inzet van zwakke virusisolaten (mits beschikbaar) om de schade door meer 'agressieve' isolaten of stammen van een virus te verminderen slechts toepasbaar is voor specifieke virusziekten in bepaalde gewassen en onder bepaalde omstandigheden. Hiervoor worden in dit rapport een aantal aandachtspunten gegeven. De inzet van zwakke virusisolaten voor cross-protectie is pas aanvaardbaar wanneer er geen schade kan optreden voor het gewas zelf of andere gewassen, als er geen resistenties tegen het schadelijke virus beschikbaar zijn in het te behandelen gewas of als andere teeltmaatregelen, en dan met name hygiëne, om uiteenlopende redenen geen effect (meer) hebben.

Trefwoorden: plantenvirussen, cross-protectie, zwakke en agressieve virus-isolaten

© 2022 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Biointeracties en Plantgezondheid en Business unit Glastuinbouw en Bloembollen, Postbus 16, 6700 AA Wageningen; T 0317 48 07 00; www.wur.nl/plant-research

KvK: 09098104 te Arnhem
VAT NL no. 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. 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 Stichting Wageningen Research.

Stichting Wageningen Research is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Rapport WPR-KD-2021-056

Foto omslag: Een zwak virusisolaat als toegelaten gewasbeschermingsmiddel: ToMV M-II-16.

Inhoud

Inhoud	3
Woord vooraf	5
Samenvatting	7
1 Inleiding	9
2 Wat is cross-protectie?	11
2.1 Werkingsmechanismen van cross-protectie	12
3 Hoe kan cross-protectie worden toegepast?	16
4 Aandachtspunten van de inzet van zwakke stammen	19
5 Voorwaarden voor een effectief en veilig gebruik van zwakke isolaten van plantenvirussen	22
6 Toepassing van zwakke isolaten van ToBRFV en CGMMV	23
Literatuur	25

Woord vooraf

In het kader van de Toekomstvisie Gewasbescherming 2030 is de werkgroep “Actuele vraagstukken” opgericht. Deze werkgroep richt zich op het zoeken naar oplossingen voor actuele vraagstukken die zich in de praktijk voordoen.

Eén van die vraagstukken heeft betrekking op het toepassen van “cross-protectie”, oftewel het gebruik van zwakke isolaten van plantenvirussen om gewassen te beschermen tegen schade veroorzaakt door agressievere varianten van diezelfde plantenvirussen. In de praktijk worden die zwakke isolaten ook wel vaccins genoemd, maar de werking ervan heeft geen overeenkomst met de vaccinatie van dieren en mensen.

Bij de werkgroep is er behoefte aan een literatuurstudie naar het toepassen van ‘vaccins’ tegen plantenvirussen en met name het komkommerbontvirus en het tomato brown rugose fruit virus. Het nu voorliggende rapport is uitgegaan van kennis in de internationale literatuur en gaat in op de vraag welke kansen, bedreigingen en risico’s er zijn met betrekking tot het gebruik van zwakke virus-isolaten in land- en tuinbouwgewassen.

Samenvatting

Het is op dit moment bijna 100 jaar geleden (1929) dat voor de eerste keer werd waargenomen dat planten minder heftige symptomen ontwikkelden na een virusinfectie wanneer dezelfde planten daarvoor met een milder isolaat van hetzelfde virus waren geïnfecteerd. Daarna zijn er talloze rapportages gedaan van de toepassing van zwakke isolaten in een zogenaamde cross-protectie-strategie om schade door agressieve isolaten te voorkomen. Toch zijn er vandaag de dag nog niet heel veel voorbeelden van een langdurige succesvolle toepassing van cross-protectie. De oorzaken van niet succesvolle inzet van cross-protectie zijn zeer divers, van terugmuteren van het zwakke virus naar het wild-type agressieve virus, de opkomst van nieuwe virusvectoren, infectie vanuit het behandelde gewas naar andere gewassen waarin het zwakke virus wel schade veroorzaakt, tot de hoge kosten van productie en kwaliteitscontrole van zwakke virusisolaten.

In de hier voorliggende literatuurstudie wordt aangegeven dat er niet een éénduidig antwoord gegeven kan worden op de vraag wat cross-protectie nu precies is. Er worden verschillende werkingsmechanismen beschreven die waarschijnlijk allemaal, hetzij alleen of in combinatie, ten grondslag liggen aan het fenomeen cross-protectie. Er worden verschillende voorbeelden gegeven van de inzet van cross-protectie, hetzij onder gecontroleerde omstandigheden, hetzij in de praktijk (in het veld of in bedekte teelten). Er worden vanuit de literatuur aandachtspunten genoemd bij het gebruik van zwakke isolaten, maar ook een aantal voorwaarden aangedragen voor het ontwikkelen en produceren van zulke zwakke virus-isolaten.

Naar aanleiding van bovenstaande aandachtspunten zal worden ingegaan op de recente vraag vanuit de praktijk naar zwakke isolaten voor het komkommerbontvirus en het tomato brown rugose fruit virus. Voor deze beide virussen zijn op dit moment geen zwakke isolaten beschikbaar om in te zetten voor cross-protectie. Algemeen kan geconcludeerd worden dat de inzet van zwakke virusisolaten (mits beschikbaar) om de schade door meer 'agressieve' isolaten of stammen van een virus te verminderen slechts toepasbaar is voor specifieke virusziekten in bepaalde gewassen en onder bepaalde omstandigheden. Hiervoor worden in dit rapport een aantal aandachtspunten gegeven. De inzet van zwakke virusisolaten voor cross-protectie is pas aanvaardbaar wanneer er geen schade kan optreden voor het gewas zelf of andere gewassen, als er geen resistenties tegen het schadelijke virus beschikbaar zijn in het te behandelen gewas of als andere teeltmaatregelen, en dan met name hygiëne, om uiteenlopende redenen geen effect (meer) hebben.

1 Inleiding

Het is nu ruim 120 jaar geleden dat Martinus Willem Beijerinck aan de toenmalige Landbouwschool in Wageningen aantoonde dat een ziekte in de lokale tabaksteelt werd veroorzaakt door pathogenen die kleiner waren dan bacteriën (Bos, 1999). Hij werd daarmee de grondlegger van de plantenvirologie. Sinds die tijd is het onderzoek aan deze kleine ziekteverwekkers vooral gericht geweest op die virussen die schade veroorzaken in de door de mens geteelde gewassen. Pas recent richt de wetenschap zich echter ook op virussen die weinig of geen schade veroorzaken en zelfs in sommige gevallen een nuttige invloed hebben op planten (Roossinck, 2011a, b).

De schade die plantenvirussen kunnen veroorzaken in gewassen is zeer divers: van opbrengstderving door een verminderde groei van planten tot onverkoopbare producten doordat de virusinfectie leidt tot verkleuring, misvorming of zelfs afsterving (Hull, 2013). Een eenmaal geïnfecteerde plant is niet te genezen en blijft een virusbron van waaruit het virus zich verder kan verspreiden. Het virus heeft zelf geen levende cellen, maar kan zich uitsluitend vermeerderen in de cellen van de waardplant en kan dus niet worden bestreden zonder de plantencel te vernietigen (Pallas and García, 2016). Beheersing van virusziekten in planten richt zich dan ook op starten met virusvrij - liefst resistent en anders gecertificeerd – plant- en uitgangsmateriaal, het bestrijden van de overbrengers (vectoren) van plantenvirussen, het verwijderen van bronnen (geïnfecteerde planten in of buiten het gewas) en hygiënemaatregelen (Rubio et al., 2020).

De waarneming dat planten minder heftige symptomen ontwikkelden na een virusinfectie wanneer dezelfde planten daarvoor met een milder isolaat van hetzelfde virus waren geïnfecteerd werd al in 1929 voor het eerst gerapporteerd (McKinney, 1929). McKinney zag in zijn onderzoek naar mozaïekziekten van o.a. tabak dat planten geïnfecteerd met het milde “donker-groene” isolaat van de mozaïekziekte na een tweede inoculatie met de “geel-mozaïek” variant nog steeds milde symptomen vertoonden en niet het fel-gele mozaïek dat de laatste variant normaal gesproken veroorzaakt. Het fenomeen werd door verschillende wetenschappers bestudeerd en wordt aangeduid met de term “cross-protectie”. Het duurde echter tot de jaren 70 van de vorige eeuw voordat cross-protectie op grote schaal werd toegepast. Het was de inzet van A.Th.B. Rast bij het toenmalige Proefstation voor de Groenten- en Fruitteelt onder Glas in Naaldwijk die het gebruik van een zwak isolaat van het tomatenmozaïekvirus (ToMV) mogelijk maakte voor de beheersing van ToMV in de teelt van tomaten in Nederland. Bij gebrek aan resistentie in de destijds beschikbare tomatenrassen bleek het besmetten van jonge tomatenplanten met dit zwakke isolaat, M II-16, een efficiënte manier om schade door de sterkere isolaten van ToMV te voorkomen (Broadbent, 1976; Rast, 1972). Dit zwakke isolaat werd geregistreerd als gewasbeschermingsmiddel met toelatingsnummer 5764N. Het gebruik van een zwak isolaat van ToMV voor cross-protectie verdween echter geheel toen er TMV/ToMV-resistente tomatenrassen op de markt kwamen.

Een meer recente, maar zeker zo omvangrijke, toepassing van cross-protectie is het gebruik van zwakke isolaten van het pepinomozaïekvirus (PepMV) in de bedekte tomatenteelt. Na de ontdekking van dit oorspronkelijk in pepino (*Solanum muricatum*) beschreven virus in tomaat in 1999 (Van der Vlugt et al., 2002) greep het snel om zich heen. Van PepMV bestaan meerdere stammen en sommige isolaten uit die stammen bleken slechts zeer lichte symptomen in tomaat te veroorzaken. Ook bleken deze zwakke isolaten (abusievelijk ook wel zwakke stammen genoemd) de tomatenplant te beschermen tegen symptoomontwikkeling door sterkere en agressievere PepMV isolaten (Hanssen et al., 2010; Schenk et al., 2010; Vermunt and Kaarsemaker, 2017). Op dit moment worden er door twee bedrijven zwakke isolaten (door één bedrijf zelfs een mengsel van twee isolaten) geproduceerd en commercieel aangeboden. Deze beide producten hebben een toelating om te worden toegepast als gewasbeschermingsmiddel.

Door het succes van cross-protectie bij de beheersing van TMV/ToMV en PepMV is er vanuit de praktijk belangstelling voor de inzet van deze methode voor andere virussen. Hier wordt met name gedacht

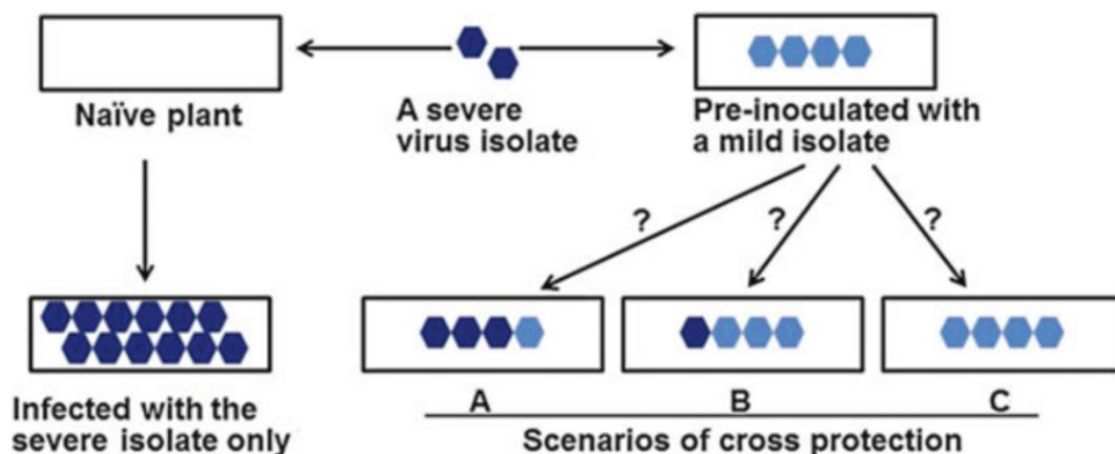
aan het komkommerbontvirus (CGMMV) in de teelt van komkommer en het tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in de teelt van tomaat en paprika. Toch zijn er bij een eventuele inzet van zwakke isolaten voor deze virussen de nodige vragen over de bredere impact en langetermijneffecten van deze strategie. In deze literatuurstudie zullen vanuit de literatuur de mogelijkheden van zwakke isolaten tegen agressieve isolaten van plantenvirussen in het algemeen, en CGMMV en ToBRFV in het bijzonder, aan bod komen, maar ook de beperkingen en bedreigingen zullen worden belicht.

2 Wat is cross-protectie?

Hoewel de term cross-protectie al heel lang wordt gebruikt in de plantenvirologie, is op de vraag wat crossprotectie precies is geen eenduidig antwoord te geven. In de literatuur komen we twee omschrijvingen van het fenomeen cross-protectie tegen:

- planten die geïnfecteerd zijn met een plantenvirus dat niet of nauwelijks symptomen veroorzaakt, worden beschermd tegen **de symptomontwikkeling van** agressievere isolaten van hetzelfde virus;
- planten die geïnfecteerd zijn met een plantenvirus dat niet of nauwelijks symptomen veroorzaakt, worden beschermd tegen **infectie met** agressievere isolaten van hetzelfde virus.

Soms worden in artikelen deze omschrijvingen door elkaar gebruikt (Ziebell and Carr, 2010). De twee omschrijvingen hierboven lijken op elkaar, maar er is een wezenlijk verschil dat met name voor de te behandelen aandachtspunten bij cross-protectie later in dit rapport van groot belang is. Bij de eerste omschrijving wordt de symptomontwikkeling van het agressieve isolaat onderdrukt, maar is het agressieve virus wel in de plant aanwezig. In de tweede omschrijving wordt uitgegaan van de situatie dat het agressieve virus zich niet meer vermeerderd in de met het milde isolaat geïnfecteerde plant (zie ook fig. 1.).

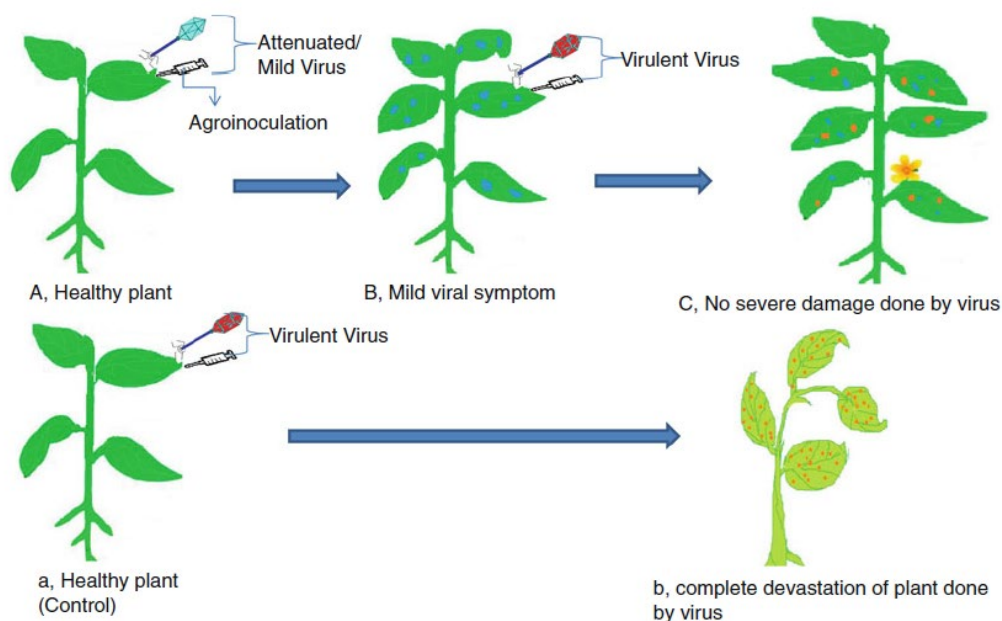


Figuur 1: verschillende scenario's van cross-protectie: een met het milde isolaat geïnfecteerde plant kan nog wel worden geïnfecteerd met het agressieve isolaat (severe) maar ontwikkelt mildere of geen symptomen (A en B) of de plant is geheel beschermd tegen infectie van het agressieve isolaat (C). Figuur overgenomen uit Zhang and Qu (2016).

Niet alleen over de omschrijving van het fenomeen cross-protectie is geen eenduidigheid, ook over de achterliggende mechanismen zijn veel verschillende inzichten. Dit blijkt al uit de grote verscheidenheid aan omschrijvingen van het achterliggend mechanisme die door de jaren heen zijn gebruikt: verkregen immuniteit, geïnduceerde resistentie, interferentie, premunitie, profylactische inoculatie, beschermende inoculatie, et cetera. Deze omschrijvingen hebben inmiddels specifieke betekenissen gekregen in de plantenpathologie, maar worden vandaag de dag niet meer gebruikt om cross-protectie te omschrijven (Ziebell and Carr, 2010). Hieronder zullen we gedetailleerd ingaan op de verschillende werkingsmechanismen die in de literatuur worden genoemd.

2.1 Werkingsmechanismen van cross-protectie

Cross-protectie bij virusinfecties van planten werkt met name wanneer het milde isolaat nauw verwant is aan het sterke of agressieve isolaat. Dit gegeven werd na de ontdekking van het fenomeen aanvankelijk gebruikt om zo de relatie tussen plantenvirussen te onderzoeken met betrekking tot hun classificatie en taxonomische indeling en mate van verwantschap. Virussen die nauw met elkaar verwant zijn (isolaten cq. stammen van hetzelfde virus) gaven wel cross-protectie terwijl het uitblijven van cross-protectie gezien werd als een bewijs dat het om verschillende virussoorten ging. Daarna werden praktische toepassingen gezocht in het 'vaccineren' met milde isolaten voor de bescherming van planten tegen de agressievere isolaten van tomatenmozaïekvirus (ToMV) (Cassells and Herrick, 1977; Rast, 1972).



Figuur 2: schematische weergave van het fenomeen cross-protectie volgens Chaudhary en Mukherjee (2014).

In een review van Morange (2012) wordt gesteld dat door het gebruik van de termen immunisatie en vaccinatie bij zowel planten als bij dieren en mensen, men zou kunnen denken dat het in beide gevallen om het zelfde werkingsmechanisme kan gaan. Niets is echter minder waar, planten maken tenslotte geen antilichamen aan om lichaamsvreemde eiwitten – zoals virusdeeltjes – aan te vallen en onschadelijk te maken. Voor het werkingsmechanisme van cross-protectie in planten ontstonden in de loop van de jaren de volgende hypothesen:

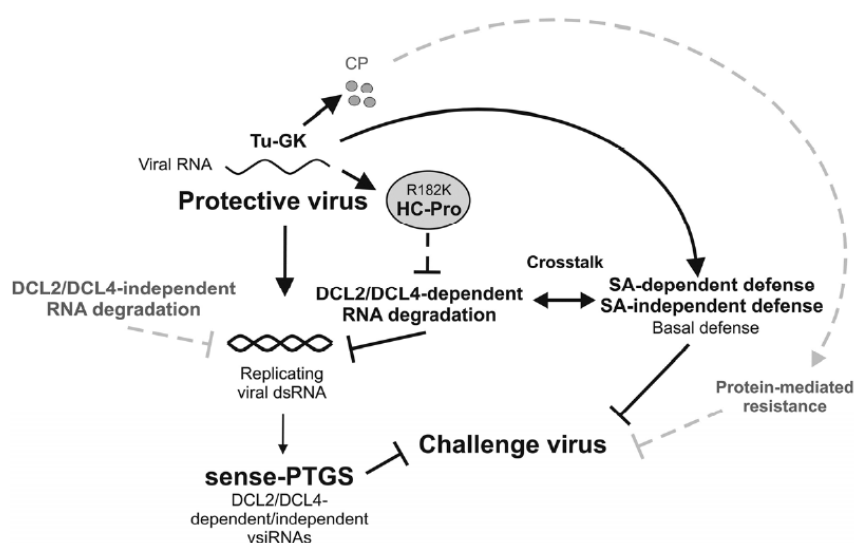
Hypothese 1: Een bepaalde stof in planten, die noodzakelijk is voor virusvermeerdering, wordt verbruikt door het zwakke isolaat zodat het sterke/agressieve isolaat zich niet kan vermeerderen nadat het de plant was binnengekomen. Deze verklaring was ook de verklaring die Pasteur en zijn volgers gaven aan het succes van vaccinatie totdat de ontdekking van immuniteit en antilichamen deze verklaring onderuithaalde.

Hypothese 2: Er is een unieke cellulaire plaats voor virus-replicatie en er ontstaat competitie tussen het zwakke en het sterke virus. Deze gedachte is ook niet uniek en werd afgeleid van het werk aan lysogene bacteriofagen.

Hypothese 3: Het sterke virus wordt 'gevangen' door het eerste zwakke virus dat begonnen was aan zijn replicatie. Dit 'gevangen worden' kon gebaseerd zijn op niet-specifieke absorptie of doordat het manteleiwit van het zwakke virus verhindert dat het sterke virus uitgepakt wordt.

Ook andere auteurs proberen het fenomeen cross-protectie te verklaren met bepaalde specifieke processen en interacties. Een aantal van hen zoekt het in een rol van het eiwit van de virusmanteel. Loebenstein (1960) beschrijft een methode waarbij een inoculatie met het gezuiverde manteleiwit van tabaksmozaïekvirus (TMV), dat zelf geen symptomen op toetsplanten veroorzaakt, beschermt tegen infectie met het intacte virus waarbij de symptomen (aantal lesies op bladeren) tot 50% werd gereduceerd. Gesuggereerd wordt dat het eiwit de vorming van 'protective substances' veroorzaakt in de plant. Ook Lu et al. (1998) zien in hun experimenten een rol van het manteleiwit. Zij namen een vertraging in symptoomontwikkeling waar van twee weken bij een pre-inoculatie met wild type manteleiwit van TMV. Maar ook mutanten die wel manteleiwit vormen, maar geen virusdeeltjes kunnen vormen (alleen zogenaamde 'helical aggregates'), hadden hetzelfde effect. Hun conclusie is dat het RNA van het sterke virus nadat het deeltje in de plantencel is uitgepakt, meteen weer ingepakt wordt door het aanwezige manteleiwit van de eerdere beschermende inoculatie. Reimann-Philipp geeft in zijn uiteenzetting over de rol van het manteleiwit in resistentiemechanismen voorbeelden van op manteleiwit gebaseerde cross-protectie bij verschillende plantenvirussen, zoals TMV, Alfalfa mosaic virus (AMV), tobacco streak virus (TSV), potato virus X (PVX) en cucumber mosaic virus (CMV). Ook hij ziet onderscheid tussen *coat-protein mediated resistance* (het agressieve virus vermeerdert zich niet in de plant) en *coat-protein mediated protection* (het agressieve virus vermeerdert zich wel, maar veroorzaakt geen heftige symptomen) (Reimann-Philipp, 1998). De onderzoekers Nishiguchi en Kobayashi (2011) zien zelfs twee achterliggende mechanismen die op het manteleiwit zijn gebaseerd: een verstoring van de ontmanteling van het inkomende virus en een verstoring van vermeerdering van het inkomende virus (door accumulatie van replicatie-complexen door het aanwezige manteleiwit). Daarnaast zien deze onderzoekers ook een proces dat niet op eiwit is gebaseerd, maar op nucleïnezuur: het proces van RNA-silencing.

Kung et al. (2014) zien dat laatste ook en verklaren dat cross-protectie voornamelijk start met een initiatie van RNA-silencing door de vorming van dubbelstrengs RNA (dsRNA) bij de replicatie van het zwakke virus. Doordat de RNA-sequentie van het zwakke virus in hoge mate overeenkomt met dat van het sterke virus, vormt het dsRNA ook een blauwdruk voor de afbraak van het RNA van het sterke virus. Daarnaast geven deze onderzoekers in hun hypothese ook aan dat er een uitwisseling ('crosstalk') plaatsvindt tussen het proces van RNA-silencing en andere verdedigingsmechanismen in de plant, zoals de door Salicylzuur (SA) geïnduceerde resistentie (zie fig. 3).

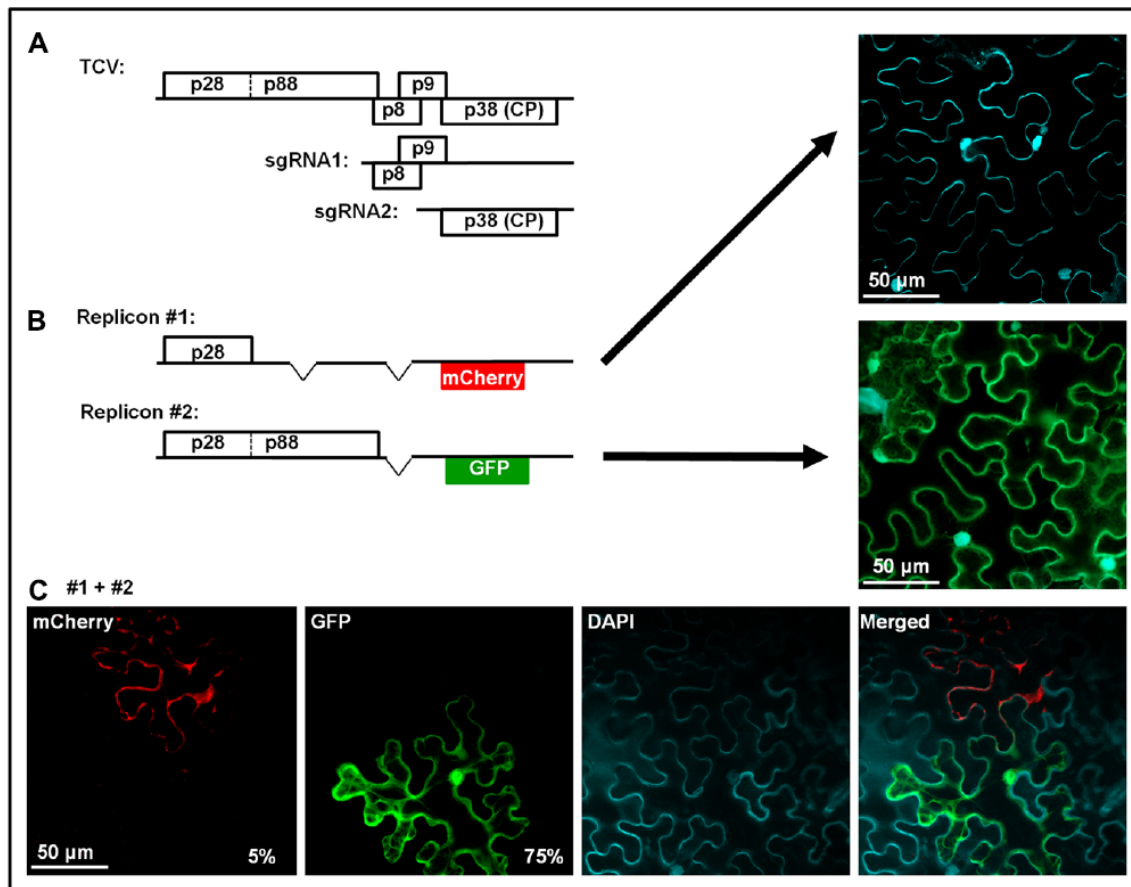


Figuur 3: Mogelijk werkingsmodel van cross-protectie volgens Kung et al. (2014) gebaseerd op RNA-silencing, PTGS (post transcriptional gene silencing) en crosstalk met andere verdedigingsmechanismen in de plant.

In hetzelfde jaar publiceren Chaudhary en Mukherjee (2014) in een boekhoofdstuk over de rol van specifieke kleine RNAs die verantwoordelijk zouden zijn voor het fenomeen cross-protectie. Toch vinden anderen dat niet alles kan worden verklaard door RNA-silencing. Dodds en zijn medeauteurs melden bijvoorbeeld dat de mate van cross-protectie afhankelijk is van het type inoculum. Wanneer alleen dsRNA in plaats van hele virusdeeltjes wordt gebruikt als inoculum van het milde isolaat, dan is het beschermende effect beduidend minder (Dodds et al., 1985).

Het werk aan papaya ringspot virus (PRSV) in courgetteplanten laat zien dat er na het inoculeren van een mild isolaat en vervolgens met een sterk isolaat concurrentie ontstaat op de plaatsen waar het virus replicateert (Freitas and Rezende, 2008). Ook bij het werk aan aardappelvirus Y (PVY) isolaten uit verschillende stammen (PVY^O, PVY^{NTN}, PVY^{N-Wi}) wordt waargenomen dat er waarschijnlijk een remming ontstaat op replicatie en concentratieopbouw van virusdeeltjes. Microscopisch onderzoek geeft aanwijzingen dat de verschillende isolaten zich separaat ophouden in verschillende weefsels (Grupa et al., 2018).

Ook de onderzoeksgroep van Zhang rapporteert in hetzelfde jaar de observatie dat verschillende replicatievormen (mutanten) van turnip crinkle virus (TCV) verschillende cellen infecteren (zie fig. 4). Zij noemen dit effect "superinfection exclusion", een term die aangeeft dat een infectie met de ene variant van het virus binnen een cel de infectie met de andere variant uitsluit (Zhang et al., 2018).



Figuur 4: Menginfecties met twee verschillende mutanten van turnip crinkle virus laten infecties van deze varianten zien in separate cellen (de verschillende mutanten hebben een verschillend fluorescent label en lichten rood of groen op). Dat de beide varianten wel eerst tegelijkertijd in de cel voorkwamen wordt bewezen door het feit dat de rode variant niet kan repliceren wanneer de groene variant niet in de cel aanwezig is. Figuur afkomstig uit Zhang et al., 2018.

Er bestaan dus verschillende hypothesen rond de werkingsmechanismen van cross-protectie. Hoe zo'n hypothese tot stand komt is afhankelijk van het virus of de virusgroep, de waardplant en de manier waarop metingen worden verricht. Maar het mag duidelijk zijn dat er niet slechts één

werkingsmechanisme (of combinatie van mechanismen) verantwoordelijk kan worden gehouden voor het fenomeen cross-protectie.

Het is belangrijk om vast te stellen dat cross-protectie alleen toepasbaar is voor verwante isolaten van een virus, waarin zelfs de mate waarin isolaten serologisch op elkaar lijken indicatief is voor de mate van cross-protectie (Wen et al., 1991). Soms, zoals bij Citrus tristeza virus (CTV) wordt effectieve cross-protectie pas waargenomen bij isolaten die binnen een zelfde virusstam vallen (Folimonova, 2013). Toch zijn ook hier weer uitzonderingen op en is er sporadisch literatuur te vinden waarin cross-protectie tussen minder verwante virussen, die zelfs tot andere soorten behoren, is beschreven (Silva-Rosales et al., 2019; Singh and Singh, 1995) of tussen verschillende soorten viroïden (Niblett et al., 1978). Ook hier dient te worden opgemerkt dat de achterliggende mechanismen niet zijn opgehelderd en de waargenomen effecten onder de gemene deler "cross-protectie" worden geschaard.

Daarbij komt nog dat cross-protectie zich niet alleen beperkt tot de virus-plant interacties, maar zich ook manifesteert in virus-vector-plant interacties. Voorbeelden daarvan zijn de cross-protectie van twee isolaten van het corn stunt virus, die optreedt in twee vectoren van dit virus: de cicade-achtigen *Dalbulus maidis* en *D. elimatus* (Maramorosch, 1958) en het wegvallen van cross-protectie in een veldexperiment met CTV na de introductie van een nieuwe bladluisoort die ook in staat bleek CTV over te brengen (de 'brown citrus aphid') (Powell et al., 2003).

3 Hoe kan cross-protectie worden toegepast?

Sinds de eerste beschrijvingen van cross-protectie zijn er veel verschillende toepassingen gepubliceerd. Hieronder volgen een aantal voorbeelden van deze toepassingen, echter met de kanttekening dat veel publicaties zich beperken tot laboratorium- of anderszins gecontroleerde omstandigheden.

Slechts een beperkt aantal van deze publicaties beschrijft ook daadwerkelijk de toepassing over langere tijd onder praktijkcondities.

In een aantal meerjarige gewassen zijn langdurige experimenten uitgevoerd. Bijvoorbeeld bij cacao m.b.t. het cacao swollen shoot virus (CSSV). In een 12-jarige veldproef is gekeken naar de effecten van twee milde isolaten van CSSV op de groei en opbrengst van de met deze milde isolaten geïnoculeerde planten en die van niet geïnoculeerde planten. Hieruit bleek een verschil in effectiviteit tussen de twee gebruikte isolaten en dat één van de twee isolaten een geschiktere kandidaat voor cross-protectie in cacao is dan de andere (Domfeh et al., 2019).

Kajihara et al. (2008) beschrijven een succesvolle toepassing van een zwakke stam van Japanese yam mosaic virus (JYMV-T3) in Chinese yam (*Dioscorea opposita*). Over een periode van 6 jaar bleken planten die groeiden uit knollen die waren geïnoculeerd met de zwakke stam T3 van JYMV, bijna helemaal beschermd tegen infectie met natuurlijke JYMV stammen in het veld. Deze beschermde planten hadden ook een duidelijk hogere opbrengst in vergelijking met niet-geïnoculeerde planten.

Kondo et al. (2015) beschrijven een vergelijkbaar resultaat met een zwakke stam van Chinese yam necrotic mosaic virus (CYNMV), ook op Chinese yam (*D. opposita*). Planten bleken in het veld gedurende 5 jaar beschermd tegen natuurlijke infecties met CYNMV waarbij ze tussen de 25 en 57% hogere opbrengsten hadden dan niet geïnoculeerde planten. De geïnoculeerde planten bleken echter niet beschermd tegen infecties met het niet verwante broad bean wilt virus (BBWV).

Een ander voorbeeld van een toepassing in veldproeven was van stekken van cassave geïnfecteerd met een mild isolaat van het virus dat cassava mosaic disease (CMD) veroorzaakt en de vergelijking met gezonde stekken. Alle gezonde planten ontwikkelden CMD symptomen binnen 5 maanden na planten en bleven uiteindelijk duidelijk kleiner. Vooraf met het milde isolaat geïnfecteerde planten hadden minder symptomen en een duidelijk hogere opbrengst (Owor et al., 2004). Dit is een voorbeeld van cross protectie tegen een persistent, door wittevlies overgedragen virus.

In een modelsysteem met Citrus tristeza virus (CTV), leek infectie met een mild isolaat de vermeerdering van een agressief isolaat in cellen te kunnen voorkomen, ook wel superinfectie-uitsluiting ("superinfection exclusion") genoemd. Dit concept faalde echter in veldproeven en daarop werd het proces van uitsluiting in de cel nader bestudeerd. Uitsluiting gebeurde alleen wanneer het agressieve isolaat genetisch vrijwel identiek was aan het milde isolaat. Het succes bleek ook nog verschillend te zijn in verschillende weefsels van de plant. Uit de verkregen data bleek dat cross-protectie geen eenvoudig proces is maar een complexe interactie tussen zwak en agressief virus-isolaat en waardplant (Harper et al., 2017).

Maar sporadisch zijn ook voorbeelden te vinden van veldproeven in de teelt van kruidachtige gewassen. Zo is, om opbrengstverlies door het door PVY veroorzaakte potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) tegen te gaan, in de aardappelteelt in Egypte een zwakke stam van PVY succesvol toegepast. Dit is toegepast bij een gewas geteeld onder kas- en veld-condities. De zwakke stam was afkomstig van natuurlijk geïnfecteerde Cherry-tomaten (Abdalla et al., 2018). Ook in de teelt van komkommerachtigen zijn toepassingen ontwikkeld: een milde stam van papaya ringspotvirus (PRSV-W-1), is zeer effectief gebleken bij de het tegengaan van de schade door papaya ringspot ziekte in

courgetteplanten onder kas- en veldomstandigheden. Geen van de planten vertoonde symptomen maar de agressievere stam kon nog wel worden gedetecteerd na toepassing van de zwakke stam. Deze gegevens toonden aan dat concurrentie voor virale replicatieplaatsen een rol speelt bij de bescherming tussen stammen van PRSV-W (Freitas and Rezende, 2008). Ook is een mild isolaat van het zucchini yellow mosaic virus (ZYMV-WK) succesvol toegepast in komkommerachtigen (Lecoq and Katis, 2014). ZYMV-WK werd jarenlang succesvol toegepast in Frankrijk, Israël en Hawaï, maar toen er resistente cultivars beschikbaar kwamen werd cross-protectie overbodig (Lecoq and Katis, 2014).

In beschermde teelten (teelten onder glas of plastic) zijn met name in de teelt van tomaten voorbeelden te vinden van de toepassing van zwakke virusisolaten voor cross-protectie. Een eerste voorbeeld is het aardappelvirus X (PVX), waarbij twee zwakke mutanten van PVX in staat bleken te zijn om zowel tomaat als de tabaksoort *Nicotiana benthamiana* te beschermen tegen een wild-type van PVX (Cong et al., 2019). Een ondertussen veel bekender en meer toegepast voorbeeld is dat van het pepinomozaïekvirus (PepMV). Van PepMV bestaan verschillende stammen en sommige isolaten uit verschillende stammen veroorzaken slechts weinig symptomen op commercieel geteelde tomatenrassen. De inzet van deze zwakke isolaten kan bescherming bieden tegen symptomontwikkeling van agressievere isolaten (Hanssen et al., 2010; Schenk et al., 2010; Vermunt and Kaarsemaker, 2017). Het is echter noodzakelijk goed te blijven monitoren omdat cross-protectie van het ene zwakke isolaat niet altijd tegen alle agressieve isolaten hoeft te werken. Het is bijvoorbeeld aangetoond dat een zwak isolaat uit de Chili 2 stam alleen leek te werken tegen agressieve isolaten uit dezelfde stam (De Nayer et al., 2011) en dat de interactie tussen PepMV-isolaten grotendeels afhangt van de homologie van de RNA-sequentie en dus post-transcriptionele gen-uitschakeling ('gene-silencing') een belangrijke rol speelt bij deze cross-protectie (Hanssen et al., 2010). Ook werd door Hasiów-Jaroszewska et al. (2014) aangetoond dat in tomatenplanten die waren geïnoculeerd met een mild isolaat van PepMV en vervolgens met een necrotisch isolaat, de ernst van de symptomen significant werden verminderd in vergelijking met de niet beschermde planten. Echter twee maanden na co-infectie verschenen er toch necrotische symptomen en bleek de concentratie van het necrotische isolaat in tomatenplanten zelfs 5-7 keer hoger te zijn dan die van het milde isolaat (Hasiów-Jaroszewska et al., 2014) door het wegconcurreren van het zwakke isolaat door het necrotische isolaat.

Bovengenoemde voorbeelden gaan uit van natuurlijk voorkomende zwakke isolaten van plantenvirussen. Het is echter ook mogelijk om kunstmatig verzwakte virussen in te zetten voor cross-protectie. Het bekendste voorbeeld in de Nederlandse tuinbouw is het in de jaren zeventig van de vorige eeuw ingezette zwakke isolaat van ToMV. Rast behandelde sap van een ToMV-geïnfecteerde plant met salpeterigzuur (HNO₂) en onderzocht de zo verkregen isolaten op hun werking als zwak isolaat voor cross-protectie tegen agressieve isolaten van ToMV. Eén van die isolaten, M II-16, bleek zeer efficiënt en werd later als officieel toegelaten gewasbeschermingsmiddel ingezet (Rast, 1972) (zie ook figuur 5). Ook anderen demonstreerden het verkrijgen van mildere isolaten door behandeling van virus met salpeterigzuur (Ogawa et al., 2013), een behandeling met lage of hoge temperatuur (Nakazono-Nagaoka et al., 2004; Ravelonandro et al., 2008) of door selectie in weefselweek (Ogawa et al., 2013). Al deze behandelingen introduceren willekeurige veranderingen ('mutaties') in het genetisch materiaal van het virus waardoor de eigenschappen kunnen veranderen.

In een aantal gevallen bleek het ook mogelijk om een zwakke stam te maken door het aanbrengen van gerichte mutaties in het genetisch materiaal van het virus wat resulteert in veranderingen in bepaalde eiwitten van het virus. Onder de huidige EU wetgeving resulteert deze methodiek echter wel in een genetisch gemodificeerd organisme (GMO). Kurihara en Watanabe (2003) hebben specifieke mutaties geïntroduceerd in het replicatie-eiwit van het zogenaamde Crucifer tobamovirus Cg. Deze drie mutaties waren identiek aan natuurlijke mutaties die gevonden werden in de zwakke L₁₁A stam van ToMV. De introductie van deze mutaties resulteerde in een zwak isolaat van Crucifer tobamovirus Cg dat *Arabidopsis* planten wel kon infecteren maar geen symptomen gaf. Liu et al (2020) beschrijven twee mutaties aangebracht in een infectieuze kloon van cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV; komkommerbontvirus) die een 100% bescherming gaven tegen wild-type CGMMV. Hierbij moet aangetekend worden dat het hier waarschijnlijk alleen gaat om het uitblijven van symptomen en niet om een bescherming tegen infectie van agressievere isolaten.

Li et al (2019) beschrijven het maken van recombinante virussen op basis van apple spherical latent virus (ASLV). Dit virus wordt veel gebruikt in zogenaamde VIGS-experimenten ('Virus Induced Gene Silencing') en heeft een brede waardplantreeks waarin het in het algemeen geen symptomen geeft. Recombinante virussen waarin stukken van andere niet-verwante virussen tot expressie werden gebracht gaven cross-protectie tegen bean yellow mosaic virus (BYMV), ZYMV, soybean mosaic virus (SMV), cucumber mosaic virus (CMV), Impatiens necrotic spot virus (INSV), Iris yellow spot virus (IYSV) en tomato spotted wilt virus (TSWV). Toepassingen van genetische modificatie van plantenvirussen vallen vanzelfsprekend onder de huidige Genetisch Gemodificeerde Organismen wetgeving.



Figuur 5: Toepassing van een zwak isolaat van ToMV (M II-16) in de praktijk in de zeventiger jaren. Het virus wordt met een verfspuit op planten gespoten, samen met Carborundum-poeder dat kleine wondjes veroorzaakt waardoor het virus de plant kan binnendringen.

4 Aandachtspunten van de inzet van zwakke stammen

Zoals uit de bovenstaande voorbeelden (hoofdstuk 3) blijkt, zijn zwakke stammen op verschillende gewassen meer of minder succesvol ingezet. Als voordelen worden vooral genoemd dat het gebruik van natuurlijke zwakke virusisolaten voor cross-protectie een GMO-vrije technologie is en dat het inzetbaar zou zijn als er in het te beschermen gewas geen resistentiegenen tegen het virus beschikbaar zijn.

Toepassing van cross-protectie valt onder de gewasbeschermingswetgeving. Zolang het zwakke virusisolaat (en de formulering ervan) geen toelating heeft als gewasbeschermingsmiddel gelden voorwaarden voor toepassing en moet een proefonthefing worden aangevraagd.

Naast de eis voor toelating als gewasbeschermingsmiddel kleven er echter ook beperkingen en nadelen aan het gebruik van zwakke isolaten voor cross-protectie. Daarom wordt door veel auteurs benadrukt dat cross-protectie alleen een aanvaardbare strategie is wanneer er geen andere mogelijkheden of alternatieven zijn (Lecoq and Katis, 2014; Pechinger et al., 2019; Rubio et al., 2020; Takács et al., 2014; Ziebell and Carr, 2010; Ziebell and MacDiarmid, 2017).

We laten een aantal aandachtspunten aangaande cross-protectie de revue passeren:

1. Niet voor alle virussen zijn zwakke stammen beschikbaar. Vaak wordt een natuurlijk zwak virus-isolaat gebruikt, maar in de literatuur zijn ook enkele voorbeelden te vinden van (chemische) methoden om van bestaande isolaten verzwakte varianten te maken (zie hoofdstuk 3). De ontwikkeling van een artificieel zwak isolaat is echter door het vele selectiewerk zeer tijdrovend en kostbaar.
2. Het is nog niet goed begrepen waarom sommige isolaten van bepaalde virussen 'zwak' zijn en anderen niet. Uit diverse onderzoeken blijkt wel dat er (soms kleine) verschillen in het RNA of de eiwitten van het virus zijn, maar in vrijwel alle gevallen ontbreekt het bewijs dat een dergelijke verandering ook verantwoordelijk is voor het gevonden zwakke fenotype. Nakazono-Nagaoka et al (2004; 2009) identificeerden één enkele mutatie in het HC-Pro eiwit van bean yellow mosaic virus (BYMV) die verantwoordelijk bleek voor de cross-protectie eigenschappen. Ook zijn er met betrekking tot cross-protectie mutaties beschreven bij andere virussen in de genen die coderen voor het manteleiwit, HC-Pro, RdRp of RNA silencing suppressor (Huang et al., 2019; Liu et al., 2020; Tuo et al., 2020). Het is waarschijnlijk dat door de verschillende werkingsmechanismen achter het fenomeen cross-protectie, er niet één bepaald gebied in het genetisch materiaal van virussen is aan te wijzen waarin mutaties tot zwakke isolaten zullen leiden.
3. Een zwak isolaat is mogelijk niet inzetbaar in de teelt van uitgangsmateriaal of plantmateriaal dat wordt geëxporteerd naar derde landen waar het bewuste virus niet in het plantmateriaal aanwezig mag zijn, afhankelijk van de eisen van het ontvangende "derde land". De fytosanitaire status van een bepaald virus speelt hierin een belangrijke rol. Ook al betreft het een zwak "onschadelijk" isolaat, het virus is wel aanwezig in het plantmateriaal en kan worden aangetoond met virustoetsen.
4. Gebruik van zwakke virusisolaten in productieteelten kan ook tot risico's leiden voor zaadbedrijven en plantenkwekers. Deze bedrijven zullen extra moeite moeten doen om de aanwezigheid van een zwak virusisolaat in de zaadproductieteelten en in de plantenopkweek te voorkomen.

-
5. Sommige zwakke virusisolaten kunnen in andere gewassen wel symptomen veroorzaken. Er zijn zelfs gevallen bekend dat in het ene gewas een zwak isolaat beschermt tegen ernstige symptomen van sterkere isolaten terwijl in een ander gewas juist synergie (versterking van symptomen) optreedt (Takács et al., 2014).
 6. Synergie kan ook optreden door interactie tussen de zwakke stam en een niet-verwant virus. Menginfecties van meerdere verschillende virussen zijn in veel landbouwsystemen eerder regel dan uitzondering (Rubio et al., 2020).
 7. Een zwakke stam kan (terug)muteren naar een sterke stam. Hoe meer een virus zich vermeerdert en verspreidt, des te meer mutaties in het genetisch materiaal van het virus ontstaan en daarmee dus virusvarianten. Het is dus van het grootste belang om zwakke virusisolaten te onderwerpen aan een continue kwaliteitscontrole om te voorkomen dat planten met een onbedoeld mengsel van zwakke en sterke varianten worden behandeld. Omdat het onduidelijk is welke mutaties (of combinaties van mutaties) verantwoordelijk zijn voor zwakke of juist agressieve eigenschappen van virusisolaten is het lastig om goede toetsmethoden te ontwerpen voor een efficiënte kwaliteitscontrole. Vaak kan dit alleen door uitgebreide planttoetsen.
 8. Zwakke varianten kunnen een lagere 'fitness' hebben ten opzichte van 'sterke' varianten. Dit kan bijvoorbeeld leiden tot een lagere concentratie of een ongelijke verdeling in de plant (de Novaes and Rezende, 2003). Omdat in de meeste gevallen na eerste toepassing van een zwakke stam een infectie met meer agressieve stammen van hetzelfde virus nog mogelijk is, kan dat door concurrentie leiden tot een onwerkzame lage concentratie of uiteindelijk zelfs verdwijnen van de zwakke stam (Medina-Salguero et al., 2021).
 9. Cross-protectie kan niet (of nauwelijks) gebruikt worden voor virussen die niet mechanisch te inoculeren zijn. Gecontroleerde – en veelal grootschalige - besmetting van plantmateriaal met een zwakke stam is een voorwaarde voor de toepassing van cross-protectie onder praktijkcondities.
 10. Cross-protectie is afhankelijk van de combinatie van waardplant (ook verschillen in rassen / cultivars) en virus (Maia et al., 2017; Pechinger et al., 2019) en lokale teeltomstandigheden. Het is dus niet vanzelfsprekend dat één zwakke stam gebruikt kan worden voor de bescherming van verschillende plant cultivars onder verschillende condities / locaties.
 11. De grootste beperking van een cross-protectie strategie is de specificiteit: het werkt alleen tegen 'aanvallende' virussen met een grote overeenkomst met het beschermende virus in het genetisch materiaal. In de praktijk kan dat betekenen dat er geen goede bescherming is tegen alle varianten van het virus. Bij menginfecties tussen verschillende isolaten van een zelfde virus of verwante virussen uit dezelfde groep ('genus') in dezelfde plant, bestaat juist het gevaar op recombinaties (dit is uitwisseling van genetisch materiaal tussen virussen onderling). Door recombinatie kunnen nieuwe, schadelijkere, virusvarianten ontstaan.
 12. Het aantonen van efficiëntie en stabiliteit van cross-protectie is vaak lastig en staat grootschalige introductie (nog) in de weg.

De essentie van een cross-protectiestrategie is dat er altijd sprake is van een infectie met een (potentieel schadelijk) virus. Zelfs als dit een zwak isolaat is dat weinig tot geen symptomen veroorzaakt, betekent dit toch een infectie van de plant met alle daarbij behorende fysiologische stress, (milde) symptoomontwikkeling en opbrengstderving. In principe kan het planten ook gevoeliger maken voor andere virussen (cross-protectie voorkomt geen infecties met andere virussen) of andere pathogenen.

Uit de literatuur zijn slechts enkele voorbeelden bekend van een succesvolle en stabiele langdurige toepassing van cross-protectie. Vrijwel altijd betreft dit een toepassing in meerjarige, vaak houtige

gewassen. Cross-protectie met citrus tristeza virus (CTV) is zo'n voorbeeld. Ook deze systemen zijn echter gevoelig voor het doorbreken van cross-protectie door veranderingen in het (ecologische) systeem bijvoorbeeld door de introductie van een nieuwe virus vector (Powell et al., 2003). In de jaren 70 van de vorige eeuw is een zwakke stam van ToMV (M II-16) toegelaten als gewasbeschermingsmiddel en succesvol toegepast in de kasteelt van tomaten (Rast, 1972). Een recenter praktijkvoorbeeld is het gebruik in tomatenteelten van zwakke isolaten van PepMV in de toegelaten gewasbeschermingsmiddelen V10 (Vermunt and Kaarsemaker, 2017) en PMV[®]-01 (Hanssen et al., 2010).

5 Voorwaarden voor een effectief en veilig gebruik van zwakke isolaten van plantenvirussen

In de voor dit rapport geraadpleegde literatuur komt duidelijk naar voren dat een succesvol gebruik van milde isolaten ter voorkoming van schade veroorzaakt door agressievere isolaten van plantenvirussen geen vanzelfsprekendheid is en pas aangewend dient te worden wanneer er geen andere beheersmaatregelen mogelijk zijn. Dit betekent dus dat er geen resistente cultivars van het aangetaste gewas beschikbaar en geen andere effectieve beheersmaatregelen voorhanden zijn. Daarnaast geldt dat het toepassen van zwakke virusisolaten moet voldoen aan de fytosanitaire en gewasbeschermingswetgeving.

Wanneer dan de inzet van een mild isolaat de enige optie is die overblijft, dan zal dit zwakke isolaat ook nog aan een aantal voorwaarden moeten voldoen wil het veilig over een langere periode ingezet kunnen worden in de praktijk. Deze voorwaarden zijn:

1. Het zwakke isolaat veroorzaakt geen of slechts milde symptomen in het gewas. Dit zal moeten worden geverifieerd in alle gangbare cultivars van het gewas onder verschillende teeltomstandigheden, omdat symptoomontwikkeling kan variëren in verschillende cultivars maar ook onder invloed van verschillende klimaatfactoren.
2. Het zwakke isolaat moet stabiel zijn en niet snel (terug)muteren naar een agressieve variant. Het zwakke virus zal in de productie continu moeten worden gemonitord om eventuele mutaties snel op te sporen (kwaliteitscontrole).
3. Het zwakke isolaat moet een beperkte waardplantenreeks hebben en geen gevaar vormen voor andere gewassen, waar het mogelijk wel schade kan veroorzaken. Dit geldt ook voor eventuele onkruiden omdat verspreiding naar de wilde vegetatie kan leiden tot het ontstaan van nieuwe agressieve isolaten.
4. Het zwakke isolaat moet gemakkelijk mechanisch inoculeerbaar zijn, wil het breed toepasbaar zijn in een commercieel geteeld gewas.
5. De productie van een zwak isolaat dient onder zeer goed gecontroleerde omstandigheden plaats te vinden zodat besmetting met andere virussen niet kan optreden.
6. Er zal moeten worden onderzocht of de inzet van een zwak isolaat leidt tot uitsluiting van het agressieve virus of niet. Wanneer in het laatste geval de agressieve isolaten zich wel kunnen vermeerderen in de behandelde planten kunnen door recombinatie nieuwe varianten ontstaan.
7. In de praktijk moet men alert blijven en nog steeds werken onder schone en virus-werende omstandigheden. Dit om te voorkomen dat andere virussen (dan waartegen de toegepaste cross-protectie werkt) kans krijgen om de teelt binnen te dringen en tot mogelijke schade leiden.

6 Toepassing van zwakke isolaten van ToBRFV en CGMMV

Een aanzienlijk aantal van de in hoofdstuk 4 en 5 genoemde aandachtspunten zijn ook van toepassing op de mogelijke inzet van een cross-protectie-strategie tegen het tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) en het komkommerbontvirus (CGMMV). Beide virussen behoren tot de groep van de tobamovirussen. Deze virussen bereiken in het algemeen heel hoge concentraties in geïnfecteerde planten en vruchten, zijn zeer infectieus (er is meestal maar weinig virus nodig om een infectie te veroorzaken) en zijn zeer persistent en daarmee dus erg moeilijk af te doden of onschadelijk te maken.

Op dit moment zijn van beide virussen nog geen zwakke isolaten bekend, al zijn er in het verleden wel isolaten van CGMMV gevonden die minder symptomen gaven in een aantal cultivars (C.C.M.M. Stijger, persoonlijke mededeling).



Figuur 6: Symptomen van CGMMV in komkommer (links) en ToBRFV in tomaat (rechts)

Omdat ToBRFV en CGMMV beiden tobamovirussen zijn en zich snel en in hoge concentraties vermenigvuldigen, zullen er al snel verschillende virusvarianten in geïnfecteerde planten ontstaan. Dit geldt zowel voor het zwakke isolaat als een eventueel daarna infecterend agressief isolaat. Ook leidt een infectie met een zwak isolaat niet automatisch tot een lagere virusconcentratie. Daarmee is het risico op het terugmuteren van zwakke isolaten naar agressieve isolaten voor deze virussen zeker groter dan bij virussen met lagere concentraties in planten. Onder terugmuteren wordt verstaan het terugvallen van een zwak isolaat, dat door een mutatie is ontstaan uit een agressief wild-type, naar het oorspronkelijke agressieve wild-type. De vorming van zulke terugmutanten uit zich in het ontstaan van virussymptomen in het gewas waarbij het beheersen van de verdere verspreiding sterk afhangt van het tijdig herkennen en onderkennen van zo'n schadelijk isolaat en het nemen van passende hygiënemaatregelen.

Met betrekking tot de productie van gewasbeschermingsmiddelen op basis van zwakke virusisolaten is een continue aantoonbare strenge kwaliteitscontrole op het terugvallen naar de oorspronkelijke agressieve varianten onmisbaar.

CGMMV heeft geen gereguleerde status binnen de EU. Dit betekent dat in principe zwakke isolaten van CGMMV toegepast zouden kunnen worden. Ook is de waardplantreeks van CGMMV beperkt tot

gewassen uit de *Cucurbitaceae* en daarmee lijkt er weinig gevaar voor andere economisch belangrijke gewassen bij een eventuele toepassing van een zwak isolaat, in ieder geval bij toepassing in gesloten teeltsystemen.

Voor ToBRFV geldt echter een andere situatie. Voor dit virus geldt op dit moment een specifieke gereguleerde status binnen de EU (Uitvoeringsverordeningen EU 2020/1191 [http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2020/1191/oj] en 2021/1809 [http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2021/1809/oj]) waarbij de verbodsbepaling geldt dat ToBRFV niet mag worden binnengebracht op, verplaatst binnen, of gehouden, vermeerderd of vrijgelaten op het grondgebied van de Unie. Daarmee is een toelating of toepassing van een zwak isolaat van ToBRFV als gewasbeschermingsmiddel of de opzettelijke verspreiding en export van geïnfecteerde planten of plantendelen (waaronder ook vruchten) niet toegestaan. De aanwezigheid van ToBRFV in een productieteelt - ongeacht of het een zwakke stam is of niet - is op dit moment reden voor het opleggen van maatregelen m.b.t. hygiëne en afvoer van besmet materiaal. Een bedrijf dat cross-protectie toepast kan daarbij als besmettingsbron fungeren voor andere teeltbedrijven. Voor onderzoek naar de identificatie of toepassing van zulke zwakke isolaten van ToBRFV is een ontheffing nodig conform Verordening (EU) 2019/829 [http://data.europa.eu/eli/reg_del/2019/829/oj]. Daarnaast heeft ToBRFV een bredere waardplantenreeks dan alleen tomaat en is vastgesteld dat het o.m. paprika en peper, diverse tabakken en petunia kan infecteren (Abou Kubaa et al., 2021; Luria et al., 2017; Magaña-Álvarez et al., 2021; Oladokun et al., 2019; Rizzo et al., 2021). Voor een eventueel zwakke stam van ToBRFV zal dan met zekerheid moeten worden vastgesteld dat deze geen schade kan veroorzaken in andere gewassen, met speciale aandacht voor die uit de familie van nachtschadeachtigen.

Op dit moment zijn er aanwijzingen dat er al resistenties in tomaat tegen ToBRFV geïdentificeerd zijn. Hoewel op dit moment nog niet beschikbaar in commerciële rassen, zullen deze in de toekomst naar verwachting de inzet van zwakke isolaten van ToBRFV overbodig maken.

Geconcludeerd kan worden dat de inzet van zwakke virusisolaten (mits beschikbaar) om de schade door meer 'agressieve' isolaten of stammen van een virus te verminderen slechts toepasbaar is voor specifieke virusziekten in bepaalde gewassen en onder bepaalde omstandigheden. Hiervoor worden in dit rapport een aantal aandachtspunten gegeven. De inzet van zwakke virusisolaten voor cross-protectie is pas aanvaardbaar wanneer er geen schade kan optreden voor het gewas zelf of andere gewassen, als er geen resistenties tegen het schadelijke virus beschikbaar zijn in het te behandelen gewas of als andere teeltmaatregelen, en dan met name hygiëne, om uiteenlopende redenen geen effect (meer) hebben.

Literatuur

- Abdalla, O.A., Eraky, A.I., Mohamed, S.A., Fahmy, F.G., 2018. Management of Potato virus Y (PVY-NTN) causing potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) in potato by prior treatment with a mild PVY strain. *Journal of Plant Protection Research* 58, 130-136.
- Abou Kubaa, R., Choueiri, E., Heinoun, K., Cillo, F., Saponari, M., 2021. First report of tomato brown rugose fruit virus infecting sweet pepper in Syria and Lebanon. *Journal of Plant Pathology*, DOI 10.1007/s42161-021-00987-y.
- Bos, L., 1999. Beijerinck's work on tobacco mosaic virus: Historical context and legacy. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 354, 675-685.
- Broadbent, L., 1976. Epidemiology and control of Tomato mosaic virus. *Annual Review of Phytopathology* 14, 75-96.
- Cassells, A.C., Herrick, C.C., 1977. Cross protection between mild and severe strains of tobacco mosaic virus in doubly inoculated tomato plants. *Virology* 78, 253-260.
- Chaudhary, A., Mukherjee, S.K., 2014. The role of small RNAs in vaccination, *Methods in Molecular Biology*, pp. 479-501.
- Cong, Q.Q., Wang, Y., Liu, J., Lan, Y.F., Guo, Z.K., Yang, J.G., Li, X.D., Tian, Y.P., 2019. Evaluation of Potato virus X mild mutants for cross protection against severe infection in China. *Virology Journal* 16.
- De Nayer, F., Goen, K., Wittemans, L., Vandewoestijne, E., Paeleman, A., Parra, N.O., Vanachter, A.C.R.C., Hanssen, I.M., 2011. Cross-protection as a control strategy for Pepino mosaic virus (PepMV) in greenhouse tomato, *Acta Horticulturae*, pp. 163-169.
- de Novaes, Q.S., Rezende, J.A.M., 2003. Selected mild strains of passion fruit woodiness virus (PWV) fail to protect pre-immunized vines in Brazil. *Scientia Agricola* 60, 699-708.
- Dodds, J.A., Lee, S.Q., Tiffany, M., 1985. Cross protection between strains of cucumber mosaic virus: Effect of host and type of inoculum on accumulation of virions and double-stranded RNA of the challenge strain. *Virology* 144, 301-309.
- Domfeh, O., Ameyaw, G.A., Dzahini-Obiatey, H.K., 2019. Effects of cacao swollen shoot virus mild strains N1 and SS365B on growth and yield of cacao - a follow-up report. *Tropical Plant Pathology* 44, 503-510.
- Folimonova, S.Y., 2013. Developing an understanding of cross-protection by citrus tristeza virus. *Frontiers in Microbiology* 4.
- Freitas, D.M.S., Rezende, J.A.M., 2008. Protection between strains of Papaya ringspot virus - Type W in zucchini squash involves competition for viral replication sites. *Scientia Agricola* 65, 183-189.
- Grupa, A., Otulak-Kozieł, K., Syller, J., 2018. Serological, molecular and immunofluorescent evidence for interference competition between isolates of Potato virus Y. *Plant Pathology* 67, 1997-2012.
- Hanssen, I.M., Gutiérrez-Aguirre, I., Paeleman, A., Goen, K., Wittemans, L., Lievens, B., Vanachter, A.C.R.C., Ravnikar, M., Thomma, B.P.H.J., 2010. Cross-protection or enhanced symptom display in greenhouse tomato co-infected with different Pepino mosaic virus isolates. *Plant Pathology* 59, 13-21.
- Harper, S.J., Cowell, S.J., Dawson, W.O., 2017. Isolate fitness and tissue-tropism determine superinfection success. *Virology* 511, 222-228.
- Hasiów-Jaroszewska, B., Minicka, J., Pospieszny, H., 2014. Cross-protection between different pathotypes of Pepino mosaic virus representing Chilean 2 genotype. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 13, 177-185.
- Huang, X.D., Fang, L., Gu, Q.S., Tian, Y.P., Geng, C., Li, X.D., 2019. Cross protection against the watermelon strain of Papaya ringspot virus through modification of viral RNA silencing suppressor. *Virus Research* 265, 166-171.
- Hull, R., 2013. *Plant Virology: Fifth Edition*. DOI:10.1016/C2010-0-64974-1.
- Kajihara, H., Kameya-Iwaki, M., Oonaga, M., Kimura, I., Sumida, Y., Ooi, Y., Ito, S., 2008. Field studies on cross-protection against Japanese yam mosaic virus in Chinese yam (*Dioscorea opposita*) with an attenuated strain of the virus. *Journal of Phytopathology* 156, 75-78.
- Kondo, T., Kogawa, K., Ito, K., 2015. Evaluation of cross protection by an attenuated strain of Chinese yam necrotic mosaic virus in Chinese yam. *Journal of General Plant Pathology* 81, 42-48.
- Kung, Y.J., Lin, P.C., Yeh, S.D., Hong, S.F., Chua, N.H., Liu, L.Y., Lin, C.P., Huang, Y.H., Wu, H.W., Chen, C.C., Lin, S.S., 2014. Genetic analyses of the FRNK motif function of turnip mosaic virus uncover multiple and potentially interactive pathways of cross-protection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 944-955.

- Kurihara, Y., Watanabe, Y., 2003. Cross-protection in Arabidopsis against crucifer tobamovirus Cg by an attenuated strain of the virus. *Mol. Plant Pathol.* 4, 259-269.
- Lecoq, H., Katis, N., 2014. Control of Cucurbit Viruses, *Advances in Virus Research*, pp. 255-296.
- Li, C., Yamagishi, N., Yoshikawa, N., 2019. RNA Silencing-Mediated Apple Latent Spherical Virus Vaccine in Plants, *Methods in Molecular Biology*, pp. 273-288.
- Liu, J., Li, X.D., Xu, S., 2020. Single amino acid substitutions in the coat protein and RNA-dependent RNA polymerase alleviated the virulence of Cucumber green mottle mosaic virus and conferred cross protection against severe infection. *Virus Genes* 56, 228-235.
- Loebenstein, G., 1960. Native Protein, an Immunizing Agent against Virus Infection. *Nature* 185, 122-123.
- Lu, B., Stubbs, G., Culver, J.N., 1998. Coat protein interactions involved in tobacco mosaic tobamovirus cross- protection. *Virology* 248, 188-198.
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y., Sela, N., Abu-Ras, A., Ezra, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O., Dombrovsky, A., 2017. A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. *PLoS ONE* 12, e0170429.
- Magaña-Álvarez, A.A., Pérez-Brito, D., Vargas-Hernández, B.Y., Ramírez-Pool, J.A., Núñez-Muñoz, L.A., Salgado-Ortiz, H., de la Torre-Almaraz, R., Medrano, R.R., Xoconostle-Cázares, B., 2021. Detection of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in solanaceous plants in Mexico. *Journal of Plant Diseases and Protection*, |DOI 10.1007/s41348-021-00496-1.
- Maia, L.M., Lima, J.A.A., do Nascimento, A.K.Q., Filho, F.A.C.R., 2017. Biological differences and unilateral cross-protection between biotypes of Cowpea aphid-borne mosaic virus. *Revista Ciencia Agronomica* 48, 310-317.
- Maramorosch, K., 1958. Cross protection between two strains of corn stunt virus in an insect vector. *Virology* 6, 448-459.
- McKinney, H.H., 1929. Mosaic Diseases in the Canary Islands, West Africa, and Gibraltar. *Journal of Agricultural Research* 39, 557-578.
- Medina-Salguero, A.X., Cornejo-Franco, J.F., Grinstead, S., Mowery, J., Mollov, D., Quito-Avila, D.F., 2021. Genetic characterization of a mild isolate of papaya ringspot virus type-P (PRSV-P) and assessment of its cross-protection potential under greenhouse and field conditions. *PLoS ONE* 16.
- Morange, M., 2012. What history tells us XXIX. Transfers from plant biology: From cross protection to RNA interference and DNA vaccination. *Journal of Biosciences* 37, 949-952.
- Nakazono-Nagaoka, E., Sato, C., Kosaka, Y., Natsuaki, T., 2004. Evaluation of cross-protection with an attenuated isolate of Bean yellow mosaic virus by differential detection of virus isolates using RT-PCR. *Journal of General Plant Pathology* 70, 359-362.
- Nakazono-Nagaoka, E., Takahashi, T., Shimizu, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., Omura, T., Sasaya, T., 2009. Cross-protection against bean yellow mosaic virus (BYMV) and clover yellow vein virus by attenuated BYMV Isolate M11. *Phytopathology* 99, 251-257.
- Niblett, C.L., Dickson, E., Fernow, K.H., Horst, R.K., Zaitlin, M., 1978. Cross protection among four viroids. *Virology* 91, 198-203.
- Nishiguchi, M., Kobayashi, K., 2011. Attenuated plant viruses: Preventing virus diseases and understanding the molecular mechanism. *Journal of General Plant Pathology* 77, 221-229.
- Ogawa, T., Nakamura, S., Sayama, M., Ohshima, K., 2013. Attenuated mutants of Potato virus Y necrotic strain produced by nitrous acid treatment and mutagenesis-in-tissue culture methods. *European Journal of Plant Pathology* 135, 745-760.
- Oladokun, J.O., Halabi, M.H., Barua, P., Nath, P.D., 2019. Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge and future prospects. *Plant Pathology*, DOI 10.1111/ppa.13096 68, 1579-1586.
- Owor, B., Legg, J.P., Okao-Okuja, G., Obonyo, R., Kyamanywa, S., Ogenga-Latigo, M.W., 2004. Field studies of cross protection with cassava mosaic geminiviruses in Uganda. *Journal of Phytopathology* 152, 243-249.
- Pallas, V., García, J.A., 2016. Viral pathogenesis: Still many missing pieces in the puzzle. *Curr. Opin. Virol.* 17, v-vii.
- Pechinger, K., Chooi, K.M., Macdiarmid, R.M., Ziebell, H., Harper, S.J., 2019. A new era for mild strain cross-protection. *Viruses* 11.
- Powell, C.A., Pelosi, R.R., Rundell, P.A., Cohen, M., 2003. Breakdown of cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolates of Citrus tristeza virus following introduction of the brown citrus aphid. *Plant Disease* 87, 1116-1118.
- Rast, A.T.B., 1972. M II-16, an artificial symptomless mutant of tobacco mosaic virus for seedling inoculation of tomato crops. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 78, 110-112.
- Ravelonandro, M., Briard, P., Glasa, M., Adam, S., 2008. The ability of a mild isolate of Plum pox virus to cross-protect against sharka virus, *Acta Horticulturae*, pp. 281-286.

-
- Reimann-Philipp, U., 1998. Mechanisms of resistance. Expression of coat protein. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 81, 521-532.
- Rizzo, D., Da Lio, D., Panattoni, A., Salemi, C., Cappellini, G., Bartolini, L., Parrella, G., 2021. Rapid and Sensitive Detection of Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Tomato and Pepper Seeds by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays (Real Time and Visual) and Comparison With RT-PCR End-Point and RT-qPCR Methods. *Frontiers in Microbiology*, DOI 10.3389/fmicb.2021.640932 12.
- Roossinck, M.J., 2011a. Environmental viruses from biodiversity to ecology editorial overview. *Curr. Opin. Virol.* 1, 50-51.
- Roossinck, M.J., 2011b. The good viruses: Viral mutualistic symbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 99-108.
- Rubio, L., Galipienso, L., Ferriol, I., 2020. Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. *Frontiers in Plant Science* 11.
- Schenk, M.F., Hamelink, R., van der Vlugt, R.A.A., Vermunt, A.M.W., Kaarsenmaker, R.C., Stijger, I.C.C.M.M., 2010. The use of attenuated isolates of Pepino mosaic virus for cross-protection. *European Journal of Plant Pathology* 127, 249-261.
- Silva-Rosales, L., Vargas, P., Alcalá-Briseño, R., Casarrubias, K., 2019. Revisiting cross-protection in the form of antagonism: The case of Papaya mosaic virus protecting papaya plants against Papaya ringspot virus, *Acta Horticulturae*, pp. 55-61.
- Singh, M., Singh, R.P., 1995. Host dependent cross-protection between pvyN, pvy^o, and pva in potato cultivars and solarium brachycarpum. *Canadian Journal of Plant Pathology* 17, 82-86.
- Takács, A., Gáborjányi, R., Horváth, J., Kazinczi, G., 2014. Virus-virus interactions, *Plant Virus-Host Interaction: Molecular Approaches and Viral Evolution*, pp. 385-394.
- Tuo, D., Zhou, P., Zhao, G., Yan, P., Tan, D., Li, X., Shen, W., 2020. A double mutation in the conserved motifs of the helper component protease of Papaya leaf distortion mosaic virus for the generation of a cross-protective attenuated strain. *Phytopathology* 110, 187-193.
- Van der Vlugt, R.A.A., Cuperus, C., Vink, J., Stijger, I.C.M.M., Lesemann, D.E., Verhoeven, J.T.J., Roenhorst, J.W., 2002. Identification and characterization of *Pepino mosaic potexvirus* in tomato. *EPPO Bulletin* 32, 503-508.
- Vermunt, A.M.W., Kaarsemaker, R.C., 2017. Multi-genotype cross-protection against Pepino mosaic virus in tomato. *Crop Prot.* 96, 116-122.
- Wen, R., Lister, R.M., Fattouh, F.A., 1991. Cross-protection among strains of barley yellow dwarf virus. *Journal of General Virology* 72, 791-799.
- Zhang, X.F., Qu, F., 2016. Cross protection of plant viruses: Recent developments and mechanistic implications, *Current Research Topics in Plant Virology*, pp. 241-250.
- Zhang, X.F., Zhang, S., Guo, Q., Sun, R., Wei, T., Qu, F., 2018. A new mechanistic model for viral cross protection and superinfection exclusion. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Ziebell, H., Carr, J.P., 2010. Cross-protection: a century of mystery. *Advances in virus research* 76, 211-264.
- Ziebell, H., MacDiarmid, R., 2017. Prospects for engineering and improvement of cross-protective virus strains. *Curr. Opin. Virol.* 26, 8-14.

Correspondentie adres voor dit rapport:

Postbus 16
6700 AA Wageningen
T 0317 48 07 00
www.wur.nl/plant-research

Rapport WPR-KD-2021-056

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.