

Ken uw vijanden!!

René van der Vlugt

Plant Research International. Postbus 16, 6700 AA Wageningen.
E-mail: Rene.vanderVlugt@wur.nl

Geachte lezer,

Voor u ligt weer een speciale uitgave van 'Gewasbescherming', ditmaal geheel gewijd aan plantenvirussen. Misschien niet direct de meest bekende en in het oog springende groep van plantenziekten, maar wel een die voor een land als Nederland, met zijn bloeiende handel in plantaardig uitgangsmateriaal en eindproducten, zeer belangrijk is.

Vanuit economisch oogpunt is de directe en indirecte schade die plantenvirussen elk jaar toebrengen aan de verschillende Nederlandse land- en tuinbouwsectoren aanzienlijk en loopt al vlug in de tientallen miljoenen euro's. Directe schade bestaat vooral uit opbrengst- en kwaliteitsverliezen, indirecte schade vooral uit de kosten verbonden aan preventieve maatregelen, keuringen, exportcertificaten en, als het dan toch een keer mis gaat, geleden imagoschade. Fytosanitair zijn virussen belangrijk omdat Nederland, naast een grote producent van land- en tuinbouwproducten, ook een doorvoerland is en de kans dat daarmee nieuwe ziekten en plagen geïntroduceerd worden, is heel reëel. Pepinomozaïekvirus is daar een recent voorbeeld van. Handelsmateriaal moet voldoen aan hoge eisen wat betreft gezondheid. Het materiaal moet vrij zijn van symptomen, maar ook moeten garanties kunnen worden gegeven dat er geen sprake is van latente infecties. De beschikbaarheid van gevalideerde

toetsen voor het aantonen van virussen is dus van cruciaal belang.

Omdat ze op celniveau aangrijpen, is directe bestrijding van virussen niet mogelijk. De ervaring van tientallen jaren leert dat slechts één aanpak effectief is: voorkomen is beter dan genezen. Problemen moet je voorblijven. Die (mogelijke) problemen moeten dan wel tijdig onderkend worden. Een adequate en tijdige reactie op een virusprobleem is niet alleen afhankelijk van herkenning van de ziekte, hetzij door getrainde personen of betrouwbare en betaalbare diagnostica, maar ook van erkenning van de ziekte. We moeten ook rekening houden met de mogelijkheid dat een bepaald virus ook Nederland kan bereiken en zorgen dat we daarop voorbereid zijn. Het ontwikkelen van de juiste diagnostica duurt al snel enkele maanden en in die tijd kan het virus al lang vaste grond onder de voeten hebben gekregen. Uitroeien van een ziekte, zo leert het verleden, is vaak nagenoeg onmogelijk en gaat in ieder geval gepaard met aanzienlijke kosten.

Nederland heeft altijd kunnen bogen op een grote internationale reputatie op het gebied van het onderzoek aan plantenvirussen. De kennis die daaruit voortvloeide kwam rechtstreeks ten goede aan het bedrijfsleven en keuringsdiensten en heeft zonder twijfel aanzienlijk bijgedragen aan de vooraanstaande positie die Ne-

derland opgebouwd heeft als exporteur van land- en tuinbouwproducten. Nederland staat niet voor niets bekend als leverancier van kwaliteit. Maar de concurrentie staat niet stil en kwaliteit heeft een prijs. De investeringen in landbouwkundig onderzoek, door zowel het bedrijfsleven als de overheid, lopen al jaren terug en ook het plantenvirologisch onderzoek heeft daaronder te lijden. Dit leidt uiteindelijk tot het verdwijnen van kennis. Kennis die over tientallen jaren opgebouwd is en niet zomaar een-twee-drie weer tevoorschijn getoverd kan worden.

Virussen zijn opportunisten bij uitstek. Ze zijn in staat om zich in heel korte tijd aan te passen aan allerlei nieuwe omstandigheden. Ze kunnen zich zeer snel ongemerkt verspreiden en voor grote problemen zorgen. De afgelopen jaren is de wereld daar diverse malen aan herinnerd; de SARS-crisis staat veel mensen nog bij en het gevaar van de vogelgriep is nog altijd niet geweken.

Ook plantenvirussen zijn daarop geen uitzondering. Waakzaamheid blijft geboden en nieuwe maar ook oude virusproblemen zullen steeds blijven opduiken. Resultaten behaald in het verleden bieden wat dat betreft geen garantie voor de toekomst. Tekenend zijn bijvoorbeeld de hernieuwde problemen met aardappelvirus Y maar ook het plots weer opduiken van *Arabis*-mozaïekvirus in de sierteelt.

ARTIKEL

Een goede herkenning en detectie van virus is belangrijk. Specifieke, robuuste en betaalbare diagnostica zijn dan ook onontbeerlijk. Nieuwe technieken en nieuwe kennis, zeker ook over het genetische materiaal van plantenvirussen, levert hier nieuwe mogelijkheden op. Maar met de nieuwste en meest gevoelige detectiemethoden alleen kom je er niet. Detectie vertelt je of je wel of niet een probleem hebt. Belangrijk, maar nog belangrijker is om de problemen voor te blijven. Kennis van het gedrag

van een virus, de interactie met zijn omgeving, de waardplanten en zijn vectoren, kortom van de epidemiologie van plantenvirussen, is daarvoor van groot belang. Die kennis is nodig om tijdig adequate beheersmaatregelen te kunnen treffen. Die kennis kan echter alleen met onderzoek vergaard worden. Gelukkig wordt er nog steeds plantenvirologisch onderzoek in Nederland bedreven. De artikelen in dit nummer van 'Gewasbescherming' getuigen hiervan en geven een goed beeld van het praktijkge-

richt onderzoek. Plantenvirologen van de keuringsdiensten, PD, PPO, PRI en WU zitten regelmatig met elkaar om de tafel en werken in alle openheid nauw samen. Ook het bedrijfsleven wordt hierbij betrokken.

Nederland is een kenniseconomie. Kennis is cruciaal voor het behoud van onze concurrentiepositie. Laten we daarom vooral niet het oude motto vergeten dat zo treffend van toepassing is op plantenvirussen: **Ken uw vijanden!!**

ARTIKEL

Virologie bij de Plantenziektenkundige Dienst

J.W. (Annelien) Roenhorst, J.Th.J. (Ko) Verhoeven en A.W. (Arjen) Werkman

Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, j.w.roenhorst@minlnv.nl

De Plantenziektenkundige Dienst (PD) is een agentschap van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. De missie van de PD is het bewaken en bevorderen van de gezondheid van planten vanuit een internationale context. Dit werken aan een gezonde groene sector waarborgt de import en export van betrouwbare plantaardige producten, een veilige land- en tuinbouw en het behoud van het landschap en de biodiversiteit. Het hoofdkantoor van de PD is gevestigd in Wageningen. Hier bevindt zich ook de afdeling Diagnostiek (DK), het nationale referentielaboratorium. Bij deze afdeling werken ruim vijftig mensen, verdeeld over de zes disciplines Bacteriologie, Entomologie, Moleculaire Biologie, Mycologie, Nematologie en Virologie. Binnen de PD is DK verantwoordelijk voor de diagnostiek van plantenziekten en -plagen en voor het leveren van de kennis over de taxonomie, biologie en epidemiologie van deze organismen. Tevens levert de afdeling een belangrijke bijdrage aan het opstellen van risicoanalyses. In 2006 is een nieuw quarantainelaboratorium in gebruik genomen dat voldoet aan de hoogste (internationale) eisen voor het werken met schadelijke organismen van planten (richtlijn 95/44/EG). Deze voorzieningen aangevuld met gedragsregels moeten voorkomen dat schadelijke organismen kunnen ontsnappen en zich verspreiden.

Werkzaamheden Virologie

De discipline Virologie werkt aan plantenvirussen, viroïden en fytoplasma's. De kennis en expertise is beschikbaar voor iedereen die werkzaam is op het gebied van plantgezondheid. De belangrijkste werkvelen van de discipline Virologie zijn:

- stellen van diagnoses aan ingezonden monsters (alle gewassen);
- identificeren en karakteriseren van (quarantaine) organismen;
- uitvoeren van 'post-entry quarantine testing' programma's, met name bij aardappel en andere *Solanaceae*;
- uitvoeren van toetsen voor monitoring en surveys;
- valideren en implementeren van methoden;
- opstellen van diagnostische protocollen;
- toezicht op keuringsdiensten en private laboratoria;
- kennis en expertise voor beleidsontwikkeling en implementatie;
- uitvoeren van risicoanalyses voor uitheemse en/of 'nieuwe' virussen;
- participeren in (inter)nationale fora, o.a. EU en EPPO;
- verzorgen van opleidingen.

Beschikbare faciliteiten en methoden

Voor de uitvoering van de diagnostische activiteiten beschikt de discipline over quarantainelaboratoria en -kassen. Hierbij worden de volgende toetsmethoden gebruikt:

- toetsplantenonderzoek, vijftien soorten doorlopend beschikbaar;
- serologische toetsen (met name ELISA) gebruikmakend van circa 130 verschillende antisera;
- (immuno-) electronenmicroscopie (locatie Wageningen Universiteit);
- polyacrylamide-gelelectoforese (PAGE) voor detectie van viroïden;
- moleculaire technieken, zoals (real-time)(RT-)PCR, RFLP en sequentieanalyse;

Daarnaast beschikt de discipline over diverse referentiecollecties en documentatiesystemen.

Bij al haar activiteiten werkt de discipline nauw samen met de ander disciplines van de afdeling Diagnostiek. Tevens beschikt zij over een netwerk waarin intensieve contacten worden onderhouden met diverse virologen in binnen- en buitenland.

Voor meer informatie over de PD: www.minlnv.nl/pd

ARTIKEL

[AANKONDIGING

23 september 2006
CITY OF INSECTS
Wageningen



onderzoek
kinderuniversiteit
insecten, ja lekker!
insecten en kunst
wat is dat voor insect?
insecten maken je gezond
insecten als huisdier
filmfestival
insectenmuziek
bijen
weg fobie!
sieraden
kleding
insectenverhalen
insectenmarkt

voor meer informatie:
www.insect-wur.nl en
www.academischejaarprijs.nl/wageningen



Viroïde-infecties in Nederland

J.Th.J. Verhoeven en J.W. Roenhorst

Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen

Inleiding

Ziekten die door viroïden worden veroorzaakt, zijn in het veld vaak moeilijk te onderscheiden van virusziekten. Tot zo'n 35 jaar geleden werd dan ook aangenomen dat dergelijke ziekten door virussen werden veroorzaakt: intrinsieke en moleculair-biologische eigenschappen waren niet bekend en de symptomen en wijzen van overdracht toonden sterke gelijkenis met die van virussen.

Verschillen tussen viroïden en virussen

Lange tijd is aangenomen dat virussen de kleinste ziekteverwekkers van planten zouden zijn. Viroïden zijn echter nog aanzienlijk kleiner. Plantenvirussen bestaan meestal uit enkelstrengs (soms dubbelstrengs) RNA-moleculen (soms DNA), omgeven door een eiwitmantel. Het RNA of DNA bevat de genetische informatie voor alle eigenschappen van het virus. Viroïden bestaan louter uit een cirkelvormige, enkelvoudige RNA-streng, die

door interne basenparing gedeeltelijk dubbelstrengs is (Figuur 1). Een eiwitmantel ontbreekt. Het genoom van viroïden is dusdanig klein (afhankelijk van de soort variërend van circa 250 tot circa vierhonderd nucleotiden) dat het onvoldoende genetische informatie bevat voor het aanmaken van eiwitten. Daardoor zijn viroïden bijvoorbeeld voor hun vermeerdering volledig afhankelijk van door de plant geproduceerde eiwitten en enzymen.

Overeenkomsten tussen viroïden en virussen

Viroïden veroorzaken bij waardplanten symptomen die vergelijkbaar zijn met die van virussen, zoals groeiverminderingen, kleurafwijkingen, afstervingen (soms) en misvormingen. Ook hun wijze van overdracht komt sterk overeen. Zo worden alle viroïden overgedragen door vegetatieve vermeerdering van gewassen (stekken, enten, knollenvermeerdering enzovoorts). Veel viroïden kunnen bovendien

vrij gemakkelijk via contact worden overgedragen, bijvoorbeeld tijdens werkzaamheden in het gewas. Verder is van een aantal viroïden overdracht via zaad en stuifmeel bekend. Overdracht door insecten komt bij viroïden nauwelijks voor, dit in tegenstelling tot bij virussen.

Taxonomie

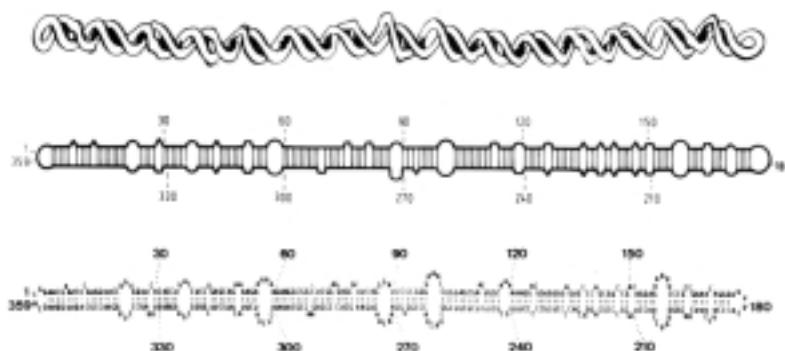
Momenteel zijn 28 soorten viroïden geïdentificeerd in twee families, respectievelijk de *Pospiviroidae* en de *Avsunviroidae* (zie Figuur 2). Daarnaast zijn er nog enkele voorlopig ingedeelde soorten en onvolledig gekarakteriseerde soorten. De classificatie op familieniveau is gebaseerd op drie eigenschappen:

1. de aanwezigheid van een centraal, geconserveerd gebied in het viroïde-genoom,
2. de aanwezigheid van zogenaamde 'hamerkop' ribozymen die een rol spelen bij het initiëren van de replicatie,
3. de wijze van replicatie.

Tot de familie van de *Avsunviroidae* behoren drie viroïden die in dit artikel niet nader worden besproken. De *Pospiviroidae* zijn ingedeeld in vijf geslachten op basis van:

1. het type centraal geconserveerd gebied,
2. de aanwezigheid van bepaalde terminale, geconserveerde gebieden.

Het belangrijkste criterium om soorten binnen een genus te onderscheiden is de sequentie-



Figuur 1. Nucleotide-volgorde, secundaire structuur en een 3D-model van een isolaat van het aardappelspindelknolviroïde (Sänger, 1988)

ARTIKEL

Figuur 2. Classificatie van viroïden

Familie	Geslacht	Soort
	Avsunviroid	<i>Avocado sunblotch viroid</i>
Avsunviroidae	Pelamoviroid	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i> (chrysantembontviroïde)* <i>Peach latent mosaic viroid</i> (perzikzwakmozaïekviroïde)
	Apscaviroid	<i>Apple dimple fruit viroid</i> <i>Apple scar skin viroid</i> <i>Australian grapevine viroid</i> <i>Citrus bent leaf viroid</i> <i>Citrus viroid III</i> <i>Grapevine yellow speckle viroids 1</i> <i>Grapevine yellow speckle viroids 2</i> <i>Pear blister canker viroid</i> (perenblaasjeskankerviroïde)
	Cocadviroid	<i>Citrus viroid IV</i> <i>Coconut cadang-cadang viroid</i> <i>Coconut tinangaja viroid</i> <i>Hop latent viroid</i> (latent hopviroïde)
Pospiviroidae	Coleviroid	<i>Coleus blumei viroid 1</i> <i>Coleus blumei viroid 2</i> <i>Coleus blumei viroid 3</i>
	Hostuviroid	<i>Hop stunt viroid</i> (hopdwerggroeviroïde)
	Pospiviroid	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (chrysantendwergziekteviroïde) <i>Citrus exocortis viroid</i> (Citrus-exocortisviroïde) <i>Columnea latent viroid</i> (latent <i>Columnea</i> -viroïde) <i>Iresine viroid 1</i> <i>Mexican papita viroid</i> <i>Potato spindle tuber viroid</i> (aardappelspindelknolviroïde) <i>Tomato apical stunt viroid</i> <i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i> <i>Tomato planta macho viroid</i>

* tussen haakjes Nederlandse naam

overeenkomst van het volledige genoom. Ligt dit percentage onder de 90% dan is er sprake van een andere soort. Daarnaast spelen waardplantenreeks en symptomatologie een rol bij de soortafbakening (Flores *et al.*, 2005)

Detectie en identificatie

In Nederland is lange tijd ge-

bruikt gemaakt van return-polyacrylamidegelelektroforese (r-PAGE) voor detectie van het chrysantendwergziekteviroïde en het aardappelspindelknolviroïde (Huttinga *et al.*, 1987; Roenhorst *et al.*, 2000). De techniek is gebaseerd op het verschil in de conformatie van het viroïde-molecuul bij kamertemperatuur en onder denaturerende omstandigheden. De eerste 'run' wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur waarbij de viroïdedeeltjes een vergelijkbaar

electroforetische mobiliteit vertonen als de lineaire nucleïnezuren van de plant. De kleine nucleïnezuren (waaronder het viroïde-RNA) worden zo gescheiden van de grotere nucleïnezuren. De tweede 'run' vindt plaats onder denaturerende omstandigheden (bij ca. 65°C). De hoge temperatuur verbreekt de interne basenparing van de viroïden waardoor deze circulair worden en de mobiliteit vermindert ten opzichte van de lineaire nucleïnezuren van de plant. Na kleuring van de gel met zilvernitraat worden viroïden zichtbaar in een afzonderlijke band, die duidelijk gescheiden ligt van de nucleïnezuren van de plant. De positie van het bandje op de gel bepaalt of er een viroïde aanwezig is; het betreffende gewas kan een indicatie geven over de identiteit van het betreffende viroïde.

Vanaf de jaren tachtig zijn er ook diverse hybridisatie-technieken ontwikkeld voor de detectie en identificatie van viroïden. Deze zijn nauwelijks toepast in NL vanwege het gebruik van het radio-actieve ³²P. De gevoeligheid van deze technieken was bovendien vergelijkbaar met die van de r-PAGE (Huttinga *et al.*, 1987). Ook deze technieken waren niet geschikt voor definitieve identificatie daar de gebruikte 'probes' in het algemeen niet specifiek genoeg waren.

Momenteel spelen moleculair biologische methoden als RT-PCR een belangrijke rol bij de detectie en identificatie van viroïden. Bij deze techniek wordt (een deel van) het viroïde-genoom zo vaak vermenigvuldigd dat het vervolgens op een gel kan worden gedetecteerd. RT-PCR's kunnen worden uitgevoerd met zowel soortspecifieke als genusgenerieke primers (Verhoeven *et al.*, 2004). Met de

soortspecifieke primers wordt gericht op één viroïde-soort getoetst; met generieke primers worden in één toets meerdere, verwante viroïden gedetecteerd. In dit geval vindt identificatie in tweede instantie plaats via analyse van de sequentie van het amplicon.

Voor routinematig gebruik is de 'real-time' RT-PCR technologie beter geschikt. Deze techniek is vergelijkbaar met de conventionele RT-PCR. Voor detectie zijn echter geen gels nodig, daar deze is gebaseerd op fluorescentie (Roehorst, Gewasbescherming, dit nummer, p.194-197) Voor detectie van het aardappelspindelknolviroïde is inmiddels een real-time RT-PCR ontwikkeld (Boonham *et al.*, 2004).

Viroïde-infecties in Nederland

Infecties door viroïden zijn in Nederland vooral bekend bij de bloemisterijgewassen *Coleus* en chrysant. Daarnaast worden door viroïden veroorzaakte ziekten soms waargenomen bij komkommer en tomaat.

Bij *Coleus* treden drie verwante viroïden op, respectievelijk *Coleus blumei*-viroïde 1, 2 en 3



Figuur 3. De chrysantenplanten rechtsvoor tonen groeivermindering en een vervroegde bloei a.g.v. een infectie door het chrysantendwergziekteviroïde.

(*Coleus blumei* viroid 1, 2 en 3). Er is geen relatie bekend tussen infecties en het optreden van symptomen. Ook in Nederland zijn viroïden vastgesteld bij *Coleus*, maar deze zijn niet nader geïdentificeerd. Naar verwachting komen in *Coleus* regelmatig viroïden voor, gezien de vegetatieve vermeerdering van dit gewas en de gegevens uit het buitenland.

Bij chrysant komen wereldwijd regelmatig infecties door het chrysantendwergziekteviroïde (*Chrysanthemum stunt viroid*)

voor. De symptomen zijn sterk cultivarafhankelijk en bestaan uit: groeivermindering, enigszins lichtgroen gekleurde bladeren, iets krullende bladeren, witachtige bladvlekken, vroeging van de bloei en kleurverandering in de bloemen (Figuur 3). Vaak worden echter geen of nauwelijks symptomen waargenomen. Naast chrysant en de verwante soort *Argyranthemum frutescens* is het viroïde ook aangetroffen bij *Ageratum*, *Petunia* en *Solanum jasminoides* (Bouwen & Van Zaayen, 2003; Verhoeven *et al.*, in druk).



Figuur 4. 'Flesvormige' komkommervruchten a.g.v. een infectie door het hopdwerggroeiviroïde.

Bij komkommer komt in Nederland de blekevruchtenziekte voor. Deze ziekte wordt veroorzaakt door het hopdwerggroeiviroïde (*Hop stunt viroid*). Geïnfecteerde vruchten hebben een blekere kleur, zijn enigszins flesvormig, de bloemen zijn misvormd, de internodiën verkort en de bladnerven liggen enigszins verdiept (Figuur 4). Vaak zijn er slechts enkele aangetaste planten en is er een langzame uitbreiding in de rij (Van Dorst & Peters, 1974)



Figuur 5. Groeivermindering door het aardappelspindelknolviroïde (rechts) en hevige dwerggroei door het latent Columnea-viroïde (links) na mechanische inoculatie van tomaat.

Tot slot hebben we in Nederland te maken gehad met een beperkt aantal viroïde-infecties bij tomaat (Verhoeven *et al.*, 2004). De symptomen waren in alle gevallen vergelijkbaar: groeiremming, chlorose tot bronsverkleuring of paarsverkleuring in de kop van de plant en bladmisvormingen (Figuur 5). Kenmerkend was dat het aantal zieke planten zich in het algemeen in de rij uitbreidde, hetgeen wijst op mechanische overdracht. Het percentage aangetaste planten was meestal minder dan 1%; in één kas waren echter nagenoeg alle planten geïnfecteerd. Hoewel de symptomen sterk overeenkwamen, zijn in totaal drie verschillende viroïden geïdentificeerd: het *Citrus-exocortis-viroïde* (*Citrus exocortis viroid*) op drie bedrijven, het aardappelspindelknolviroïde (*Potato spindle tuber viroid*) op vier bedrijven en het latent *Columnea-viroïde* (*Columnea latent viroid*) op vijf bedrijven. De twee eerstgenoemde viroïden waren in het buitenland al eerder bij tomaat vastgesteld. Het latent *Columnea-viroïde* was slechts alleen bekend van

enkele symptoomloze infecties bij enkele bloemisterijgewassen in het buitenland (Hammond, 2003).

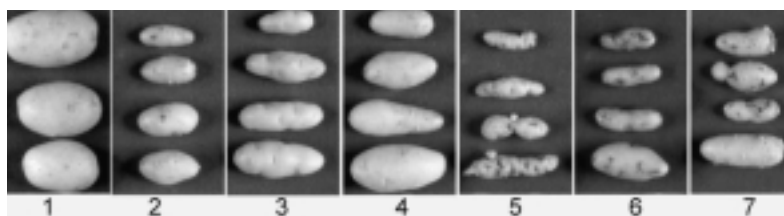
Herkomst van viroïde-infecties in Nederlandse teelten

Voor vegetatief vermeerderde gewassen zoals chrysant en *Coleus* is geïnfecteerd plantmateriaal een belangrijke bron van infectie. Alle viroïden worden namelijk overgedragen tijdens de vegetatieve vermeerdering van planten. Om de verspreiding van viroïden tegen te gaan is het dan ook be-

langrijk het uitgangsmateriaal voor aanvang van de vermeerdering te toetsen op viroïden. Daarnaast kunnen de betreffende viroïden mechanisch worden overgedragen vanuit geïnfecteerde planten. In dit verband is het een nadeel dat chrysantengewassen meestal per kap worden geoogst en vervangen, zodat er bij aanplant van nieuwe planten altijd nog oude, mogelijk geïnfecteerde planten in de kas aanwezig zijn. De rol van andere waardplanten dan chrysant als infectiebron voor chrysantengewassen wordt vooralsnog als minder belangrijk beschouwd. Chrysant wordt in het algemeen als enige waardgewas in een kas geteeld en de teelten van de andere waardplanten van het viroïde hebben een beperkte omvang in Nederland.

Nieuwe introducties van het hopdwerggroeiviroïde in een komkommernewas zijn waarschijnlijk via mechanische overdracht afkomstig uit nog onbekende waardplanten. Het viroïde heeft namelijk diverse waardplanten, zowel onder geteelde als wilde planten. Er zijn geen aanwijzingen voor zaadoverdracht van dit viroïde bij komkommer (Van Dorst & Peters, 1974).

Bij tomaat zijn in Nederland drie verschillende viroïden vastgesteld. Bij de twee eerste infecties door het aardappelspindelknolviroïde zijn er aan-



Figuur 6. Verschillende mate van knolmisvorming: 1) normale vorm (niet geïnfecteerd); 2 en 3) geïnfecteerd door isolaten van het aardappelspindelknolviroïde; 4) geïnfecteerd door het *Citrus-exocortisviroïde*; 5, 6 en 7) geïnfecteerd door verschillende isolaten van het latent *Columnea-viroïde*.

wijzingen dat de infectiebron destijds geïnfecteerd pepino-zaad (*Solanum muricatum*) uit Nieuw-Zeeland is geweest. Op beide locaties - waar gelijktijdig infecties door dit viroïde waren vastgesteld - bleken pepino-planten te staan die waren opgekweekt uit zaad uit Nieuw-Zeeland en Griekenland. Deze planten bleken ook te zijn geïnfecteerd door hetzelfde viroïde. Toen in 2000 in Nieuw-Zeeland de eerste infecties door het aardappelspindelknolviroïde bij tomaat werden vastgesteld (Verhoeven *et al.*, 2004), bleek dat de in Nederland aangetroffen isolaten bij tomaat en pepino sterk overeenkwamen met de Nieuw-Zeelandse isolaten. Samen vormen deze isolaten een afzonderlijke fylogenetische groep met nog enkele isolaten uit Australië.

Bij alle overige viroïde-infecties bij tomaat kon de herkomst niet worden achterhaald. Hoogst waarschijnlijk zijn ook hier andere plantensoorten infectiebron geweest, net als bij de infecties door het hopdwerggroeiviroïde bij komkommer. Zo zijn van het latent *Columnea*-viroïde in het buitenland infecties vastgesteld in drie bloemisterijgewassen, behorende tot de geslachten *Brunsfelsia*, *Columnea* en *Nematanthus* (Hammond, 2003). Echter in alle deze gevallen betrof het symptoomloze planten. Dit vergroot de kans op ongemerkte verspreiding, daar het moeilijk is om dergelijke infectiebronnen op te sporen en te vernietigen. Er zijn geen aanwijzingen dat de infecties het gevolg zijn van zaadoverdracht. Hoewel het aardappelspindelknolviroïde zaadoverdraagbaar is, betroffen de infecties met dit viroïde verschillende rassen. Er was

geen relatie met één zaadpartij. Bovendien werden de meeste infecties pas laat in het teeltseizoen ontdekt, terwijl bij een infectie vanuit het zaad symptomen in een eerder stadium worden verwacht.

Quarantainestatus

Binnen de Europese Unie (EU) hebben het aardappelspindelknolviroïde (IAI) en het chrysantendwergziekteviroïde een quarantainestatus (IIAI). De status IAI houdt in dat het betreffende viroïde niet in de EU is gevestigd, er niet mag worden binnengebracht en dat bij eventuele vondsten verspreiding moet worden voorkomen. Gezien de mogelijkheid van mechanische overdracht van het viroïde, betekent dit dat geïnfecteerde planten moeten worden vernietigd. De status IIAI voor het chrysantendwergziekteviroïde houdt in dat dit viroïde in de EU is gevestigd en dat de status alleen betrekking heeft op plantmateriaal van chrysant en niet geldt voor het eindproduct.

Bij de Nederlandse viroïde-infecties van tomaat is geconstateerd dat de ernst van de aantastingen door het latent *Columnea*-viroïde en het *Citrus-exocortis*-viroïde – beide zonder quarantainestatus – tenminste gelijk was aan de schade als gevolg van een aantasting door het aardappelspindelknolviroïde. Bovendien bleek in experimenten met het aardappelras ‘Nicola’ dat het latent *Columnea*-viroïde zelfs tot ernstiger knolafwijkingen en een aanzienlijk lagere productie leidde dan het aardappelspindelknolviroïde (Verhoeven *et al.*, 2004; figuur 6). Deze gegevens zijn aanleiding om

een quarantainestatus voor het latent *Columnea*-viroïde te overwegen. Bij quarantainewaardigheid van dit viroïde zal ook de status van de andere bij tomaat aangetroffen viroïden uit het geslacht *Pospiviroid* moeten worden geëvalueerd.

Referenties

- Boonham, N., Gonzales-Perez, L., Mendez, M.S., Blockley, A., Walsh, K., Narker, I. & Mumford, R.A. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid*. *Journal of Virological Methods* **116**: 139-146.
- Bouwen, I., & Zaayen, A. van, 2003. Chrysanthemum stunt viroid. In Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik J.S. (eds). *Viroids* (pp 218-223). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Dorst, H.J.M. van & Peters, D., 1974. Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. **80**: 85-96.
- Flores, R., Randles, J.W., Owens, R.A., Bar-Joseph M. & Diener, T.O., 2005. Subviral agents: Viroids. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L.A. (eds). *Virus Taxonomy*. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (pp 1147-1161). Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Hammond, R.W., 2003. *Columnea* latent viroid. In Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik J.S. (eds). *Viroids* (pp 231-232). CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Huttinga, H., Mosch, W.H.M. & Treur, A., 1987. Comparison of bidirectional electrophoresis and molecular hybridization methods to detect potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid. *EPPO Bulletin*. **17**: 37-43.
- Roehorst, J.W., Butôt, R.P.T., Van der Heijden, K.A., Hooftman, M & Zaayen, A. van, 2000. Detection of chrysanthemum stunt viroid and potato spindle tuber viroid by return-polyacrylamide gel electrophoresis. *EPPO Bulletin* **30**: 453-456.
- Sänger, H.L., 1988. Viroids and viroid diseases. *Acta Horticulturae* **234**: 79-87.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemsen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A. & Roehorst, J.W., 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis* viroid, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 823-831.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C. & Roehorst, J.W., 2006. First reports of *Potato virus M* and *Chrysanthemum stunt viroid* in *Solanum jasmonoides*. *Plant Disease* (in druk).

Potentiële virologische bedreigingen in de (glas)tuinbouw

A.W. (Arjen) Werkman en J.W. (Annelien) Roenhorst

Plantenziektenkundige Dienst, afdeling Diagnostiek, Virologie, Wageningen, email: a.w.werkman@minlnv.nl

Virusziekten spelen een belangrijke rol in de productie en handel van tuinbouwproducten. De Nederlandse (glas)tuinbouwsector is één van de meest dynamische in de wereld. Met name door de kwaliteit van de producten behoort de Nederlandse export van plantaardig uitgangsmateriaal en eindproducten tot de top van Europa. Zo was Nederland in 2003 verantwoordelijk voor 47% van de export van groentezaden en plantmateriaal vanuit de Europese Unie (EU). De exportwaarde van groentezaden was in dat jaar bijna 500 miljoen euro (Eurostat, 2003).

bouw. Hierbij ligt de focus op mechanisch en door insecten overgedragen virussen.

Mechanisch overgedragen virussen

Inleiding

Garantie van de export en dus de kwaliteit van Nederlandse producten vereist dat de teelten vrij zijn van virussen. Daar virussen niet bestreden kunnen worden betekent dit, dat de beschikbaarheid van virusvrij uitgangsmateriaal essentieel is. Om de exportpositie te handhaven is het eveneens van belang dat er geen quarantaineorganismen in Nederland of Nederlandse producten aanwezig zijn. Ook op het gebied van import van groentezaden is Nederland met een importwaarde van 127 miljoen euro één van de belangrijkste spelers op de wereldmarkt (Eurostat, 2003). Een groot deel van deze importen vloeit voort uit (zaad)productie door Nederlandse zaad- en vermeerderingsbedrijven in het buitenland. Dit zaad wordt na behandeling in Nederland weer geëxporteerd.

Naast positieve effecten brengt de handel in plantaardige pro-

ducten tegelijkertijd risico's met zich mee als het gaat om de introductie van nieuwe organismen in Nederlandse teelten. Deze risico's worden beperkt zowel door wetgeving als maatregelen door telers en bedrijven. Een volledige garantie op het weren van nieuwe schadelijke virussen valt echter niet te geven. Voor alle virussen geldt dat ze worden overgedragen door vegetatieve vermeerdering van het gewas (stekken, enten, knollenvermeerdering enzovoorts). Daarnaast kunnen virussen, afhankelijk van de soort, worden overgedragen via zaad, via contact (mechanisch) en door vectoren zoals insecten, nematoden en schimmels. Naast de introductiekans bepaalt de verspreidingswijze in sterke mate in hoeverre een 'nieuw' virus een bedreiging vormt voor de Nederlandse teelten. In dit artikel worden enkele voorbeelden gegeven van virussen die momenteel problemen opleveren of die potentieel gevaarlijk zijn voor de Nederlandse glastuin-

Mechanisch overgedragen virussen kunnen worden geïntroduceerd door import van geïnfecteerd (uitgangs)materiaal en zaad. Als het virus eenmaal in een kas aanwezig is kan het zich via contact en gewashandelingen snel verspreiden. Hierdoor kunnen in korte tijd veel planten geïnfecteerd worden. Na de teeltwisseling kan een virus gemakkelijk achterblijven op het bedrijf en zo bij de volgende teelt weer problemen veroorzaken.

Pepinomozaïekvirus bij tomaat

Een actueel voorbeeld van een mechanisch overgedragen virus is het pepinomozaïekvirus (*Pepino mosaic virus*; PepMV) bij tomaat. PepMV behoort, net zoals het aardappelvirus X en Hosta virus X, tot het geslacht *Potexvirus*. In 1999 is het voor het eerst beschreven in Nederland (Van der Vlugt *et al.*, 2000), maar al snel bleek dat het virus ook elders voorkwam. Het virus is zeer besmettelijk en persistent en kan afhanke-

ARTIKEL

lijk van ras en teeltomstandigheden hevige symptomen op blad en vruchten veroorzaken, waardoor kwaliteitsverlies optreedt. Momenteel heeft het virus in de EU een voorlopige beschikking (quarantainestatus) op tomatenzaad. De reden hiervoor is dat vondsten van het virus direct konden worden gerelateerd aan besmet tomatenzaad. Experimenteel is inderdaad vastgesteld infectieus virus kan achterblijven in resten vruchtweefsel bij slecht geschoond zaad. In de praktijk lijkt zaad echter geen belangrijke rol te spelen in de verspreiding. Er zijn aanwijzingen dat met name geïnfecteerde vruchten en besmet transportmateriaal belangrijker zijn voor de introductie en verspreiding van PepMV. Daarnaast is eliminatie van het virus niet eenvoudig gebleken en is het strikt opvolgen van een hygiëneprotocol noodzakelijk om van het virus af te komen en vervolgens vrij te blijven.

Tobamovirussen bij komkommer

Het komkommerbontvirus (*Cucumber green mottle mosaic virus*; CGMMV) bij komkom-



Figuur 1. Komkommerblad met chlorotische vlekkeligheid en mozaïek veroorzaakt door het Kyuri green mottle mosaic virus (KGMMV)

mer is eveneens een zeer persistent virus. Dit tobamovirus komt al langer voor in Nederland, maar lijkt zich de laatste jaren verder uit te breiden en tot meer problemen te leiden. Bovendien kan infectieus virus gemakkelijk achter blijven in de kas en zo tot infecties in volgende teelten leiden. Naast de overdracht door contact wordt het virus ook via de bodem (drainwater en substraat) en via zaad overgedragen. Andere komkommerinfecterende to-

bamovirussen die nog niet in Nederland voorkomen zijn het *Kyuri green mottle mosaic virus* (KGMMV, Figuur 1) en het *Cucumber fruit mottle mosaic virus* (CFMMV). KGMMV is gerapporteerd vanuit Japan en CFMMV in Israël. Zaadwinning en productie van onderstammen in het buitenland vormen een risico voor introductie van deze virussen, al wordt de kans hierop niet hoog ingeschat.

Zuidelijk bonenmozaïekvirus bij boon

Het zuidelijk bonenmozaïekvirus (*Southern bean mosaic virus*; SBMV) is een virus waarbij zaadwinning in het buitenland een reële bron voor introductie vormt. Het virus komt onder andere voor in Zuid-Amerika, China, Marokko en enkele Centraal-Afrikaanse landen (CABI, 2005). In Europa is het virus in het verleden ook gemeld in Frankrijk. Sinds een aantal jaren veroorzaakt SBMV problemen bij sperzieboon in Spanje (Verhoeven *et al.*, 2003). De planten laten zwakke symptomen zien waarbij de peulen mozaïekpatronen tonen en soms misvormd zijn (Figuur 2). Daarnaast kunnen zowel het aantal als de grootte van de bo-



Figuur 2. Bij snijboon kan het zuidelijk bonenmozaïekvirus (SBMV) leiden tot bleke, licht misvormde peulen



Figuur 3. Komkommerplant met hevige tussennervige vergeling op het oudere blad door het komkommergeelwerggroeivirus (CYSDV)

nen afnemen, hetgeen leidt tot economische schade. Er zijn aanwijzingen dat het virus in Spanje via zaad van geïnfecteerde planten is geïntroduceerd. Daar infecties zich hier vooral in de rij uitbreiden lijkt het virus zich gemakkelijk via contact te verspreiden. In Marokko heeft het virus zich in zeer korte tijd over het land verspreid, waarschijnlijk als gevolg van veldwerkers die in meerdere kassen werkzaam waren (Segundo *et al.*, 2005). Gezien bovenstaande lijkt de kans op introductie en ver-

spreiding van SBMV reëel en is alertheid geboden.

Viroïden bij tomaat

Viroïden vormen voor wat betreft mechanische overdracht eveneens een potentieel probleem. Veel viroïden kunnen vrij gemakkelijk worden overgedragen via contact, bijvoorbeeld tijdens werkzaamheden in het gewas. Het bekendste viroïde is het aardappelspindelknolviroïde (*Potato spindle tuber viroid*; PSTVd). Dit viroïde heeft in de EU een quarantainestatus, met name vanwege

de schade in aardappel. In Nederland is dit viroïde nooit aangetroffen in de aardappelteelt. Er zijn echter wel vondsten van PSTVd en ook enkele andere viroïden in tomaat bekend, onder andere *Citrus-exocortisviroïde* (*Citrus exocortis viroid*; CEVd) en het latent *Columnnea-viroïde* (*Columnnea latent viroid*; CLVd) (Verhoeven *et al.*, 2004). In alle gevallen ging het om incidentele vondsten waarbij de infecties konden worden geëlimineerd. De omvang van de infecties varieerde van enkele geïnfecteerde planten tot een bijna volledig besmette kas met hevige symptomen bestaande uit chlorotisch tot paarsachtige bladeren. Daar viroïden in sommige (bloemisterij)gewassen latent aanwezig kunnen zijn, vormen deze een reëel gevaar voor introductie. Met name wanneer geïnfecteerde planten, bijvoorbeeld bij overwintering in de kas van een plantkweker, in contact komen met een gevoelig gewas zoals tomaat.

Virussen met insecten als vectoren

Virussen die door insecten worden overgedragen hebben andere eigenschappen dan mechanisch overgedragen virussen. Ze zijn namelijk niet of slecht via contact overdraagbaar en ook zaadoverdracht speelt zelden een rol. Vaak worden deze virussen dan ook via uitgangsmateriaal of via de insecten (vectoren) geïntroduceerd. Voor verdere verspreiding en eventuele vestiging is de rol van deze vectoren noodzakelijk. In de glasgroenteteelt komen de belangrijkste virusoverbrengende vectoren vaak alleen voor in de kassen en zelden daarbuiten. Virussen worden dan wel binnen een kas,

maar zelden naar andere kassen verspreid. Met de teeltwisseling is het probleem vaak opgelost omdat dan zowel het gewas als de insecten verdwijnen. Hierbij is van essentieel belang dat goed wordt opgeruimd en schoongemaakt zodat geen (infectieus) virus achterblijft. Naar verwachting neemt de kans toe dat door insecten overgedragen virussen in Nederland tot problemen zullen leiden. Als gevolg van klimaatveranderingen ('global warming') breidt het natuurlijk leefgebied van sommige insecten zich uit. Hierdoor kunnen ook de door deze insecten overgedragen virussen vanuit bijvoorbeeld het Middellandse Zeegebied richting Nederland opschuiven. Naast de introductie via de handel draagt de natuurlijke verspreiding hier dus eveneens bij aan de kans op virusproblemen.

Wittevlieg overgedragen virussen

Twee belangrijke virusgeslachten die door wittevlieg worden overgedragen zijn de begomovirussen en crinivirussen. Voorbeelden van begomovirussen zijn *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Squash leaf curl virus* (SLCV) en het complex van tomatengeelkrulbladvirussen (Tomato yellow leaf curl virus; TYLCV). Het merendeel van deze virussen wordt overgedragen door de tabakswittevlieg (*Bemisia tabaci*), en de verspreiding van deze virussen is beperkt tot de warmere gebieden rond de evenaar. TYLCV heeft zich echter al verder verspreid naar de subtropische gebieden. In Europa komt TYLCV voor in het Middellandse Zeegebied en is recent ook in Frankrijk gemeld (CABI, 2005). In tomaat veroorzaakt het virus een gedrongen groei en hevige tussennervige chlorose en misvormingen van het jongere blad. Ook al veroor-



Figuur 4. Felgele tussennervige chlorose op een tomatenblad afkomstig van halverwege de plant, veroorzaakt door het tomaten-infectieuschlorosevirus (TICV)

zaakt het virus verder geen vruchtsymptomen, toch veroorzaakt het in sommige gebieden grote opbrengstverliezen, vaak in combinatie met grote aantallen *B. tabaci*. Onderzoek in Frankrijk heeft aangetoond dat de tabakswittevlieg het virus ook kan opnemen vanuit tomatenvruchten (Delatte *et al.*, 2003). Mogelijk vormen vruchten dan ook een introductieroute. Het belang hiervan lijkt echter gering, daar de kans klein is dat wittevliegen die het virus uit vruchten opnemen dit vervolgens overdragen naar de tomatenteelt. Naast infecties bij tomaat zijn er van TYLCV ook infecties bij paprika en boon bekend.

De belangrijkste crinivirussen zijn het tomaten-infectieuschlorosevirus (*Tomato infectious chlorosis virus*; TICV), tomatenchlorosevirus (*Tomato chlorosis virus*; ToCV), pseudo-sla-vergelingsvirus (*Beet pseudo yellows virus*; BPYV), komkommergeeldwerggroeivirus (*Cucurbit yellow stunting disorder virus*; CYSDV) en het bonenvergelingsvirus (*Bean yellow disorder virus*; BnYDV). Deze worden met name overge-

bracht door de tabakswittevlieg en kaswittevlug (*Trialeurodes vaporariorum*). De symptomen van crinivirussen bestaan over het algemeen uit vergeling van het (oudere) blad. Vaak worden de symptomen dan ook aangezien voor abiotische afwijkingen. Crinivirussen komen alleen voor in het floëemweefsel waardoor de concentratie laag is en ze dus vaak moeilijk te detecteren zijn. Van de genoemde virussen komt alleen BPYV voor in Nederland. Al in 1980 zijn vondsten door dit virus bij kas-sla in Nederland beschreven (Bos *et al.*, 1980). Naast sla kan het virus ook problemen veroorzaken bij o.a. andijvie en komkommer. Een ander crinivirus dat komkommer infecteert maar nog niet in Nederland voorkomt is CYSDV. Dit virus wordt door de tabakswittevlieg overgedragen en komt o.a. voor in het Middellandse Zeegebied. De symptomen bestaan uit tussennervige vergeling en groeireductie (Figuur 3). Daarnaast komen in dit gebied TICV en ToCV voor bij tomaat. TICV wordt alleen overgedragen door de kaswittevlug, terwijl TICV ook door de tabakswittevlieg wordt



Figuur 5. Ernstig gebobbelde komkommervruchten met tussen de ribben lichtgroene strepen door het courgettegeelmozaïekvirus (ZYMV)

overgedragen. De symptomen bij tomaat komen voor beide virussen grotendeels overeen. Ze bestaan uit tussennervige vergeling van het oudere blad, waarbij het blad omkrult en bros aanvoelt (Figuur 4). Op de vruchten verschijnen geen symptomen, wel is het aantal vruchten vaak verminderd en zijn ze kleiner. Naast tomaat hebben de virussen nog een aantal andere waardplanten, waaronder onkruiden. Met name deze onkruiden vormen een mogelijke bron voor verspreiding daar TICV/ToCV gedurende de winterperiode hierin kunnen overleven. Tenslotte is in Spanje recent schade gemeld door BnYDV. Symptomen bestaan uit tussennervige chlorose en verbruining van met name het ouder blad.

De schade is bij de wittevlieg overgedragen virussen sterk afhankelijk van het aantal geïnfecteerde planten en dus uiteindelijk van de vectordruk. In Nederland zullen deze virussen daarom waarschijnlijk weinig problemen geven indien ze geïntroduceerd worden. De vectoren worden in de kassen over het algemeen goed bestre-

den en zullen daardoor niet tot situaties leiden zoals in Zuid Europa.

Bladluizen en potyvirusen

Een andere belangrijke groep van insecten die virussen overbrengen zijn de bladluizen. De belangrijkste virussen die door bladluizen worden overgedragen zijn potyvirusen. In Nederland wordt komkommer o.a. aangetast door het courgettegeelmozaïekvirus (*Zucchini yellow mosaic virus*; ZYMV) en het watermeloenmozaïekvirus (*Watermelon mosaic virus*; WMV). ZYMV wordt in de nazomer incidenteel gevonden in buitenteelten van courgette en komkommer (Figuur 5). Gedurende de winterperiode verdwijnt het virus weer, maar blijft incidenteel terugkomen. Een verklaring hiervoor is dat ZYMV met straalwinden vanuit het Middellandse Zeegebied deze kant op wordt geblazen (Verhoeven *et al.*; 1999). Daar het virus tot ruim één dag aan de monddelen van de bladluis kan blijven plakken, kan het virus dus met de bladluis vanuit het Middellandse Zeegebied in een straalwind uit de Sahara in Nederland worden geïntroduceerd. Op deze

wijze kan een virus over relatief grote afstanden worden verspreid. Verwante virussen zoals het *Moroccan watermelon mosaic virus* (MWMV) en *Zucchini yellow fleck virus* (ZYFV) zijn gemeld in enkele landen in Zuid-Europa (Roggero *et al.*, 1998; CABI, 2005). Van deze virussen is echter weinig bekend over schade.

Trips en tospovirusen

Tospovirusen worden overgedragen door tripsen. Het bekendste tospovirus is het tomatenbronsvlekkenvirus (*Tomato spotted wilt virus*; TSWV) dat een zeer brede waardplantenreeks heeft, waaronder veel bloemisterijgewassen en groentegewassen zoals paprika, aubergine, tomaat en sla. Op deze gewassen veroorzaakt TSWV met name necrotische symptomen. TSWV kan zowel door de tabakstrips (*Thrips tabaci*) als de californische trips (*Frankliniella occidentalis*) worden overgedragen. Een goede tripsbeheersing houdt de problemen over het algemeen binnen de perken. Tot vijftien jaar geleden werden alle tospovirusen TSWV genoemd. Sindsdien zijn door betere identificatiemethoden meer soorten onderscheiden, zoals het *Watermelon silver mottle virus* dat in Azië bij meloen problemen veroorzaakt, het *Capsicum chlorosis virus* in Australië bij paprika en tomaat en het *Tomato chlorotic spot virus* in Zuid-Amerika bij tomaat, witlof en sla. Introductie van deze virussen zou incidenteel tot problemen kunnen leiden.

Tot slot

Virussen vormen een reëel gevaar voor de Nederlandse glastuinbouw daar ze onopgemerkt met zaad,

plantmateriaal of vectoren kunnen worden geïntroduceerd. In 2004 is door Anderson *et al.* de term 'Emerging infectious diseases' (EID), die al langer gebruikt werd voor humane en dierlijke ziekten, toegepast op plantenziekten. EID bestaan uit pathogenen die (i) toegenomen zijn in incidentie, geografisch verspreiding of waardplantenreeks, (ii) een veranderde pathogenese hebben, (iii) zich recentelijk hebben ontwikkeld of (iv) recentelijk zijn ontdekt of erkend. Analyse van gegevens uit de internationale database voor melding van plantenziekten (www.promed-mail.org) gaf aan dat vanuit dit perspectief 47 % van de gerapporteerde EID voor planten bestaan uit virussen. De factoren die plantenvirussen tot EID maken zijn introductie via zaad/plantmateriaal (71%), veranderende vectorpopulaties (16%), re-combinatie (5%), weersveranderingen (beide 5%) en ten slotte veranderende teeltwijzen (3%). Deze cijfers gaan in grote lijnen ook op voor Nederland.

Hierbij kan onderscheid worden gemaakt tussen introducties via uitgangsmateriaal en zaad en introducties via natuurlijke verspreiding. Met name de introducties via uitgangsmateriaal en zaad vallen te voorkomen door goede controle op de gezondheid van het materiaal. Natuurlijke verspreiding via vectoren is moeilijker in te perken. Alertheid op 'nieuwe' problemen maakt echter dat ze vroegtijdig worden onderkend waardoor de kans op een effectieve aanpak toeneemt.

Literatuur

- Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R., Daszak, P., 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution* **19** (10): 535-543
- Bos, L., van Dorst, H.J.M., Huijberts, N., 1980. Het door kaswittevlies overgebrachte pseudo-slavergelingsvirus, een novum voor Europa. *Gewasbescherming* **11**(4): 107-114
- CABI 2005. Reproduced from the Crop Protection Compendium, 2005 Edition. © CAB International, Wallingford, UK
- Delatte, H., Dalmon, A., Rist, D., Soustrade, I., Wuster, G., Goldbach, R.W., Peterschmitt, M., Reynaud, B., 2003. Tomato yellow leaf curl virus can be acquired and transmitted by Bemisia tabaci (Gennadius) from tomato fruit. *Plant Disease* **87**: 1297-1300
- Eurostat, 2006. © European Communities, 1995-2006. <http://europa.eu.int/comm/eurostat/>
- Roggero, P., Dellavalle, G., Lisa, V., 1998. First report of Moroccan watermelon mosaic potyvirus in zucchini in Italy. *Plant Disease* **82**: 351
- Segundo, E., Remah, A., Saez, E., Martin, G., Gil-Salas, Cuadrado, I.M., Cano, M., Belmonte, A., Lopez, C. F. Velasco, L., Ruiz, L., Janssen, D., 2005. Southern bean mosaic virus in green bean cultures in Spain and Morocco. In Abstracts of the IX International Plant Virus Epidemiology Symposium, 4-7 April 2005, Lima, Peru, p88
- Vlugt, R.A.A., van der, Stijger, C.C.M.M., Verhoeven, J.Th.J., Leseemann, D., 2000. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato. *Plant Disease* **84**: 103
- Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., 1999. Zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 infections in the Netherlands. *Petria* **9**: 295
- Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Leseemann, D.-E., Segundo, E., Velasco, L., Ruiz, L., Janssen, D., Cuadrado, I.M., 2003. *Southern bean mosaic virus* the causal agent of a new disease of *Phaseolus vulgaris* in Spain. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 935-941
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willems, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A., Roenhorst, J.W., 2004. Natural infection of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology* **110**: 823-831

Dreigende virusproblemen voor de bloemisterij

J.Th.J. Verhoeven¹, E.T.M. Meekes² en J.W. Roenhorst¹

¹Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen

²Naktuinbouw, Postbus 40, 2370 AA Roelofarendsveen

Dit artikel gaat over virussen die een bedreiging vormen voor de Nederlandse bloemisterij. Hierbij gaat het om zowel al in Nederland voorkomende als nieuwe virussen. De bedreiging houdt met name in dat er ernstige economische schade kan optreden. Dit kan het gevolg zijn van productieverlies en kwaliteitsvermindering van het geïnfecteerde gewas, te nemen extra beheersingsmaatregelen en verminderde handelsmogelijkheden. In het artikel wordt eerst kort ingegaan hoe nieuwe virusproblemen ontstaan. Vervolgens worden een aantal bedreigingen kort uitgewerkt, aan de hand van de overdrachtswijzen van het virus.

Inleiding

Virussen zijn niet nieuw voor de bloemisterij. De eerste meldingen over een virusziekte in de Nederlandse land- en tuinbouw betreffen het verschijnsel van bloemkleurbreking bij tulp (Figuur 1) door Leidse botanicus Clusius in 1576. Aanvankelijk was het een rariteit met een onbekende oorzaak die de betreffende bollen tot gewild handelswaar met bijbehorende hoge prijzen maakte. Toen men ontdekte hoe het verschijnsel ook bij andere bollen kon worden opgewekt – eigenlijk ontdekte men hoe het virus kon worden overgedragen – raakte de markt verzadigd en daalden de prijzen snel. Inmiddels is al geruime tijd bekend dat de bloemkleurbreking wordt veroorzaakt door het tulpenmozaïekvirus (*Tulip breaking virus*) en verwante virussen. De bonte *Abutilon* is nog een voorbeeld van een virusziekte die bewust in stand wordt gehouden omdat de symptomen bijdragen tot de

sierwaarde van de plant. Deze voorbeelden vormen echter uitzonderingen. In het algemeen zijn de virussen van bloemisterijgewassen schadelijk waarbij de symptomen variëren van visueel niet of nauwelijks waarneembaar tot zeer ernstig.

Hoe ontstaan virusproblemen?

Virusproblemen zijn het resultaat van de interactie tussen virus, waardplant en vector (Figuur 2). Alle drie worden bovendien beïnvloed door de omgeving en wijzigen in de loop van de tijd. De interactie kan worden gezien zowel op grote (land/regio) als kleine schaal (kas/veld). In de natuur is er vaak een evenwicht ontstaan waarbij de aanwezige virussen slechts in beperkte mate voorkomen of weinig symptomen veroorzaken. Door in zo'n situatie één of enkele plantensoorten grootschalig te gaan verbouwen en andere plantensoorten terug te drin-



Figuur 1. Bloemkleurbreking door het tulpenmozaïekvirus

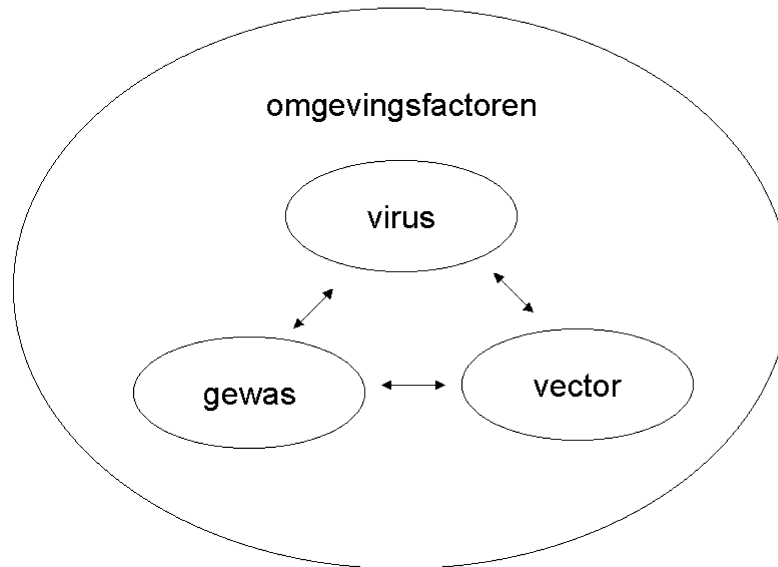
ARTIKEL

gen, treden er wijzigingen op in het 'evenwicht' tussen genoemde factoren. Hierdoor krijgen afhankelijk van het gewas, bepaalde virussen een kans zich dusdanig te ontwikkelen dat ernstige ziekten ontstaan. Daar de mens hierin stuurt, geeft hij vaak de aanzet tot nieuwe virusproblemen. Nieuwe bedreigingen komen dus voort uit verschuivingen in het evenwicht tussen de genoemde factoren. Dit kunnen zijn: introducties en vestigingen van nieuwe virussen of nieuwe virusstammen, maar ook verschuivingen in teelten en teeltwijzen, in aanwezige potentiële vectorpopulaties, in klimaatsomstandigheden en in combinaties hiervan.

Nieuwe virusproblemen

Bedreigingen door vegetatieve vermeerdering van gewassen

De meeste virussen worden overgedragen via vegetatieve vermeerdering van het gewas (stekken, weefselkweek): een



Figuur 2. Schematische weergave van de interactie tussen virus, gewas en vector. De mate van schade hangt af van de eigenschappen van betreffende virus/virusstam, het gewas/cultivar, de aanwezigheid van vectoren en/of mogelijkheden tot virusoverdracht. De interactie wordt bovendien beïnvloed door omgevingsfactoren zoals klimaat.

geïnfecteerde moederplant produceert in de regel geïnfecteerde nakomelingen. Daar de meeste bloemisterijgewassen vegetatief worden vermeerderd, kan deze vermeerderingswijze zeer sterk bijdragen aan de verspreiding van virussen. De Nederlandse bloemis-

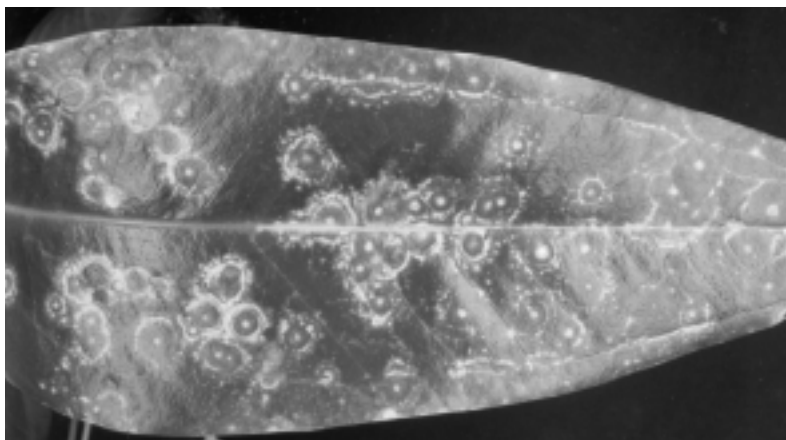
terijsector is bovendien zeer internationaal gericht: de vermeerdering van veel bloemisterijgewassen vindt bijvoorbeeld voor een groot deel buiten Nederland plaats. Dit betekent dat een eventuele verspreiding met plantmateriaal zich niet tot Nederland beperkt. Sterker nog de mogelijke verspreiding van virussen naar het buitenland of van het buitenland naar Nederland is qua potentiële risico's vele malen belangrijker. De ontwikkelingen binnen het assortiment gaan bovendien snel. Elk jaar worden nieuwe siergewassen geïntroduceerd die van origine niet in Nederland voorkomen. Aldus zijn er reële risico's dat met deze gewassen virussen vanuit andere werelddelen 'meeliften' naar Nederland of *vice versa*.

Mechanisch overgedragen virussen

Mechanisch overgedragen virussen (d.w.z. virussen die gemakkelijk met sap overgaan) zijn een groot probleem, omdat de meeste bloemisterijge-



Figuur 3: Hosta-plant met chlorose en mozaïek op de bladeren, veroorzaakt door het Hosta-virus X.



Figuur 4: Bij Anthurium veroorzaakt het tomatenbronsvlekkenvirus alleen lokale symptomen: chlorotische tot necrotische vlekjes vaak omgeven door een of enkele kringen.

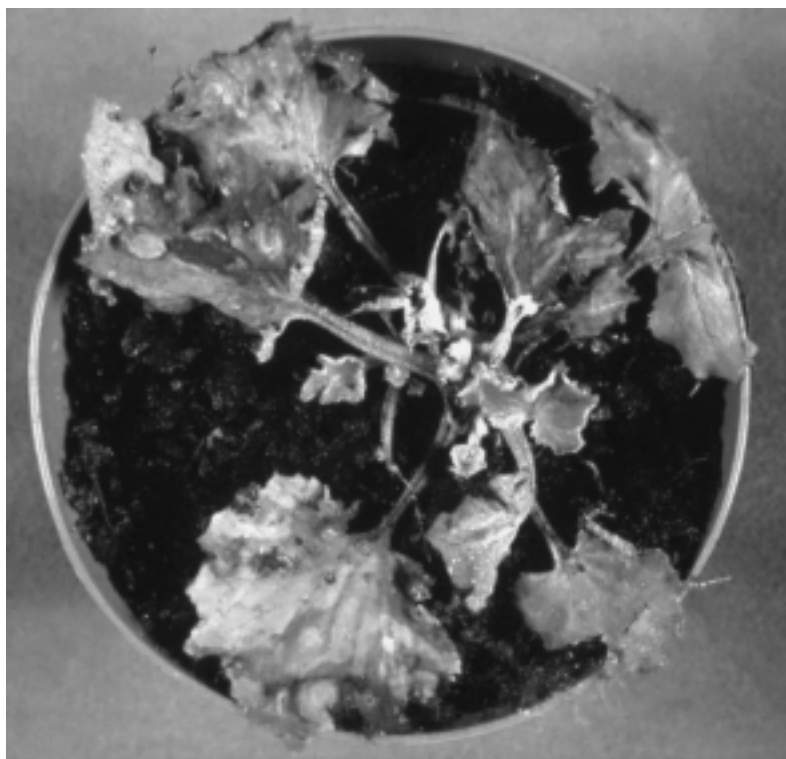
wassen vegetatief worden vermeerderd. Met name virussen die lange tijd symptomeloos blijven of virussen die in sommige soorten/rassen wel, maar in andere geen symptomen veroorzaken, vormen een sluipend gevaar. Een voorbeeld hiervan is het *Hosta*-virus X (*Hosta virus X*) dat door Lockhart en Currier (1996) voor het eerst werd beschreven in de Verenigde Staten. Het virus infecteert alleen *Hosta* spp. en wordt gemakkelijk verspreid met plantensap. Alle handelingen op een bedrijf waarbij planten worden beschadigd, houden dus een risico op virusoverdracht in. Symptomen (Figuur 3) variëren van nauwelijks/geen symptomen tot hevige chlorose, mozaïek en bladnecrose. Deze variatie maakt het 'ziek zoeken' moeilijk. In eerste instantie werden de rassen in drie categorieën ingedeeld: rassen met symptomen, rassen die latent geïnfecteerd kunnen zijn en onvatbare rassen (Lockhart, 2002). Deze indeling bleek echter niet altijd even hard, daar binnen de laatste categorie ook rassen bleken te zitten die toch konden worden geïnfecteerd. De herkomst van het virus is niet duidelijk, maar doordat het latent aanwezig kan zijn, komt het virus inmiddels wereldwijd voor in

de gebieden waar *Hosta* wordt geteeld.

Door bladluizen overgedragen virussen

Het in de inleiding genoemde tulpenmozaïekvirus is een voorbeeld van een al vele jaren voorkomend virus dat schadelijk is in de tulpenteeft. Dit komt niet zozeer door de mogelijke afwijkingen in de

bloemkleur maar is vooral het gevolg van een verminderde bolproductie. Het virus wordt beheerst door zowel de geïnfecteerde planten in het vermeerderingsmateriaal te vernietigen (selectie) als de vectoren (bladluizen) van het virus tijdens de teelt te bestrijden. Verschuivingen in de geteelde cultivars (wel vatbaar maar minder duidelijke symptomen), alsook schaalvergrotingen in de tulpenteeft (minder tijd voor selectie) leiden er echter toe dat het aantal door tulpenmozaïekvirus geïnfecteerde planten geleidelijk toeneemt. Daarnaast zijn er twijfels of de huidige bestrijdingswijze van bladluizen nog voldoet om de virusverspreiding onder controle te houden. Deze twijfels worden ingegeven door wijzigingen in het beschikbare pakket gewasbeschermingsmiddelen, mogelijke resistenties tegen bepaalde middelen en verschuivingen in de aanwezige, voor virus-



Figuur 5: Bij Senecio veroorzaakt het tomatenbronsvlekkenvirus alleen lokale symptomen: necrotische bladvlekken met chlorotische rand.

overdracht relevante bladluissoorten.

Door tripsen overgedragen virussen

De introductie en vestiging van de Californische trips (*Frankliniella occidentalis*) midden jaren tachtig van de vorige eeuw in Nederland leidde na enkele jaren tot ernstige aantastingen door het tomatenbronsvlekkenvirus (*Tomato spotted wilt virus*, Verhoeven & Roenhorst, 1995). Dit virus kwam tot dan toe slechts incidenteel in Nederland voor. Enkele jaren later werd ook het *Impatiens*-vlekkenvirus (*Impatiens necrotic spot virus*) in Nederland aangekomen en ook dit virus werd op grote schaal verspreid door de Californische trips. Beide virussen behoren tot het geslacht *Tospovirus*. De virussen van dit geslacht worden door één of meerdere soorten trips overgedragen. Zowel het tomatenbronsvlekkenvirus als het *Impatiens*-vlekkenvirus hebben zeer veel waardplanten en zijn momenteel de twee belangrijkste virussen voor in kassen geteelde bloemisterijgewassen. De symptomen verschillen per gewas. Sommige gewassen (bijvoorbeeld diverse *Araceae*) reageren alleen met locale, ch-



Figuur 7. Stengel necrose is het meest opvallende symptoom van het chrysantenstengel necrosevirus bij chrysant.



Figuur 6. Het irisgeelvlekkvirus veroorzaakt bij *Alstroemeria* alleen lokale symptomen: necrotische bladvlekken met een donkere rand.

lorotische en/of necrotische vlekken/kringen (Figuur 4), worden niet systemisch geïnfecteerd en ondervinden weinig groeiremming. Andere gewassen (bijvoorbeeld *Cyclamen*, *Impatiens*, *Senecio*) kunnen binnen korte tijd volledig afsterven (Figuur 5). In weer andere gewassen kunnen de virussen lange tijd latent aanwezig zijn (bijvoorbeeld *Lo-belia*) of kan de latentieperiode sterk variëren (bijvoorbeeld *Kalanchoë*). De schade door deze virussen is wel vermindert ten opzichte van de jaren kort na de introductie van de Californische trips. Dit komt omdat de symptomen momenteel sneller worden herkend en beter bekend is welke maatregelen moeten worden getroffen. De Californische trips blijft echter moeilijk te bestrijden. Daarom kunnen eventuele wijzigingen in bestrijdingsmogelijkheden van de vector, grote gevolgen hebben op de omvang van de tripspopulaties en daarmee ook op de schade door deze virussen.

Naast deze twee tospovirussen vormt ook het verwante irisgeelvlekkvirus (*Iris yellow spot*

virus) een bedreiging vormt voor de Nederlandse land- en tuinbouw. Het virus is incidenteel al in Nederland aangetroffen o.a. bij *Alstroemeria* (Figuur 6), *Iris* (Derks & Lemmers, 1996) en de groentegewassen prei (Roehorst & Verhoeven, 1998) en ui. In tegenstelling tot de al eerder genoemde tospovirussen lijkt voor het irisgeelvlekkvirus de tabakstrips (*Thrips tabaci*) de belangrijkste vector te zijn (Kritzman *et al.*, 2001). De tabakstrips komt ook buiten kassen regelmatig voor, waardoor het irisgeelvlekkvirus meer dan de twee eerstgenoemde virussen een bedreiging vormt voor in de openlucht geteelde gewassen. De impact van het irisgeelvlekkvirus is nog niet duidelijk daar er nog de nodige vragen zijn over de waardplanten en de overdrachtswijze(n) van het virus.

Het chrysantenstengel necrosevirus (*Chrysanthemum stem necrosis virus*, Figuur 7) is een Zuid-Amerikaans tospovirus dat eveneens een potentieel gevaar oplevert. Het virus is in het verleden al enkele malen in Europa geïntroduceerd. In 1994 en 1995 zijn in Nederland



Figuur 8. Bij *Paeonia* veroorzaakt het tabaksratelvirus chlorotische kringpatronen op het blad.

infecties vastgesteld op chrysantenbedrijven die met virus geïnfecteerde stekken uit Brazilië hadden geïmporteerd. Op de betreffende bedrijven werd het virus door de Californische trips verder verspreid. Door vernietiging van de geïnfecteerde planten en een consistente tripsbestrijding is het virus uitgeroeid (Verhoeven *et al.*, 1996). In 2002 werd het virus eveneens met plantmateriaal uit Brazilië meegebracht naar een chrysantenbedrijf in het Verenigd Koninkrijk. Ook daar is het virus uitgeroeid voordat het zich naar elders had verspreid (Mumford *et al.*, 2003).

Naast het chrysantenstengel-necrosevirus komen er in verschillende delen van de wereld diverse andere tospovirussen voor, die vooralsnog de meeste problemen veroorzaken bij groentegewassen. De volledige waardplantenreeks van deze virussen is echter niet bekend. Daar verschillende tospovirussen echter een brede waardplantenreeks hebben, is de kans groot dat een deel van deze uitheemse tospovirussen ook bloemisterijgewassen kan infecteren.

Door wittevlies overgedragen virussen

Ook de wittevlies-overdraagbare virussen behoren tot de bedreigingen, temeer daar de belangrijkste vectoren de tabakswittevlies (*Bemisia tabaci*) en in mindere mate de kaswittevlies (*Trialeurodes vaporariorum*) in de Nederlandse kassen aanwezig zijn. De door wittevlies overdraagbare virussen (hoofdzakelijk behorend tot de geslachten *Begomovirus* en *Crinivirus*) veroorzaken tot dusver vooral problemen bij groentegewassen in warmere klimaatszones. Van enkele zijn echter ook natuurlijke infecties bekend bij bloemisterijgewassen, zoals van het tomatengeelkrulbladvirus (*Tomato yellow leaf curl virus*) bij *Eustoma grandiflorum* (Cohen *et al.*, 1995) en het tomateninfectieus chlorosevirus (*Tomato infectious chlorosis virus*) bij o.a. *Callistephus chinensis*, *Ranunculus* en *Petunia* (Wisler *et al.*, 1998). Het is moeilijk om te bepalen hoe groot de dreiging van deze virussen voor de bloemisterij is. Ten eerste worden er jaarlijks verschillende nieuwe door wittevlies overdraagbare virussen beschreven en ten tweede komen deze vi-

russen tot op heden alleen voor in gebieden waar de bloemisterij geen belangrijke rol speelt.

Door nematoden overgedragen virussen

Een andere bedreiging vormen een aantal door nematoden overgedragen virussen. Deze veroorzaken met name problemen in gewassen die in de volgrond geteeld worden. Voor een deel zijn dit in Nederland gevestigde virussen, zoals het tabaksratelvirus (*Tobacco rattle virus*) en het *Arabis*-mozaïekvirus (*Arabis mosaic virus*). Beide virussen hebben een grote reeks waardplanten en zijn bij sommige plantensoorten bovendien zaadoverdraagbaar. Het tabaksratelvirus wordt overgedragen door diverse nematodensoorten uit de geslachten *Paratrichodorus* en *Trichodorus*. Deze nematoden komen algemeen voor op de lichte gronden in Nederland en bij gevolg komt het virus daar ook veel voor. Op zwaardere gronden wordt het virus ook wel aangetroffen, maar dan voornamelijk als het met vegetatief vermeerderd plantmateriaal is meegekomen. Het virus kan schade veroorzaken in diverse siergewassen waaronder *Astilbe*, *Epimedium*, *Gladiolus*, *Hosta*, *Hyacinthus*, *Narcissus*, *Paeonia* (Figuur 8), *Phlox* en *Tulipa*. De problemen door het tabaksratelvirus dreigen toe te nemen daar vegetatief vermeerderde, vatbare gewassen veelvuldig op besmette percelen worden geteeld. Bovendien neemt vector/virusdruk toe als gevolg van afgenomen bestrijdingsmogelijkheden voor de vectoren. Virusbestrijding door selectie wordt verder bemoeilijkt door het optreden van symptoomloze infecties.

Het *Arabis*-mozaïekvirus heeft als belangrijkste vector de vrijlevende nematode *Xiphinema*

diversicaudatum. Hoewel het virus symptomen kan veroorzaken, komt het vaak symptomeloos voor. Mede daardoor kan het percentage geïnfecteerde planten ongemerkt oplopen. Doordat het virus in Nederland in siergewassen over het algemeen geen ernstige symptomen veroorzaakt, vormt het virus geen grote bedreiging. Er is echter wel een bedreiging voor de export van in Nederland geteelde waardplanten naar diverse andere landen. In verschillende landen buiten de Europese Unie heeft het virus (plus nog enkele verwante virussen die ook in Nederland voorkomen) namelijk een quarantainestatus. Dit betekent dat een te exporteren partij vrij moet zijn van dit virus, onafhankelijk van het feit of het virus symptomen veroorzaakt in het betreffende gewas. In het verleden werden geïnfecteerde partijen nog wel eens onopgemerkt geëxporteerd. Importerende landen toetsen deze partijen echter steeds vaker op de betreffende virussen, waardoor latente infecties aan het licht komen. Dergelijke vondsten zijn nadelig voor de export naar deze landen.

Buiten Europa komen ook een aantal door nematoden overgedragen virussen voor, waarvan met het tabakskringvlekkenvirus (*Tobacco ringspot virus*) en het tomatenkring-

vlekkenvirus (*Tomato ringspot virus*) relevant zijn voor de bloemisterij. Ondanks vondsten van deze virussen in een aantal Europese landen hebben ze een quarantainestatus voor de Europese Unie. Ze hebben namelijk een grote waardplantenreeks en met name bij enkele fruitgewassen kunnen ze ernstige ziekten veroorzaken. Dat de kans op introductie van deze virussen in Nederland reëel is, bleek enkele jaren geleden toen het tabakskringvlekkenvirus werd aangetroffen in diverse uit Israël geïmporteerde partijen *Bacopa* en *Portulaca* (Verhoeven & Roenhorst, 2001).

Tot slot

Zowel bekende al in Nederland voorkomende, als nieuwe virussen vormen een bedreiging voor de Nederlandse bloemisterij. Ernstige viruschade kan ontstaan bij veranderingen in het labiele evenwicht tussen virus, gewas en vector. Alertheid en adequaat optreden zijn vereist om in de toekomst weerstand te kunnen bieden tegen de dreigende virusproblemen in de bloemisterij. Essentiële succesfactoren hierbij zijn: een goede samenwerking tussen bedrijfsleven, keuringsdiensten en overheid en de beschikbaarheid van zowel in het verleden vergaarde als nieuw te

ontwikkelen virologische kennis.

Literatuur

- Cohen, J., Gera, A., Ecker, R., Ben Joseph, R., Perlman, M., Gokkes, M., Lachman, O. & Antignus, Y. (1995). Lisianthus leaf curl a new disease of lisianthus caused by tomato yellow leaf curl virus. *Plant Disease* **79**: 416-420.
- Derks, A.F.L.M. & Lemmers, M.E.C. (1996). Detection of tospoviruses in bulbous crops and their transmissibility by vegetative propagation. *Acta Horticulturae* **432**: 132-139.
- Lockhart, B.E.L., 2002. Differential response of hosta cultivars to infection by hosta virus X potexvirus - a basis for practical disease management. *Acta Horticulturae* No. **568**: 69-72.
- Lockhart, B. E. L. & Currier, S., 1996. Viruses occurring in *Hosta* spp. in the USA. *Acta Horticulturae* No. **432**: 62-67.
- Kritzman, A., Lampel, M., Raccach, B. & Gera, A. (2001). Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease*: **85**: 838-842.
- Mumford, R.A., Jarvis, B., Morris, J. & Blockley, A. (2003). First report of *Chrysanthemum stem necrosis virus* in the UK. *Plant Pathology* **52**: 779.
- Roehorst, J.W. & Verhoeven, J.Th.J. (1998). Virology. Verslagen en Mededelingen Plantenziektenkundige Dienst Wageningen **193** (Annual Report Diagnostic Centre 1997): 106-123.
- Verhoeven, J.Th.J. & Roehorst, J.W. (1995). Tomatenbronsvlekkenvirus en *Impatiens-vlekkenvirus* in Nederland: Verleden en toekomst. *Gewasbescherming* **26**(2): 47-52.
- Verhoeven, J.Th.J. & Roehorst, J.W. (2001). Virology. Verslagen en Mededelingen Plantenziektenkundige Dienst Wageningen **216** (Annual Report Diagnostic Centre 2000): 11-124.
- Verhoeven, J.Th.J., Roehorst, J.W., Cortes, I. & Peters, D. (1996). Detection of a novel tospovirus in chrysanthemum. *Acta Horticulturae* **432**: 44-51.
- Wisler, G.C., Duffus, J.E., Liu, H.-Y. & Li, R.H. (1998). Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. *Plant Disease* **82**: 270-280.

Real-time PCR brengt routinematige toepassing van moleculair biologische technieken dichterbij

J.W. (Annelien) Roenhorst

Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, e-mail: j.w.roenhorst@minlnv.nl

Het gebruik van ELISA voor het grootschalig en routinematig toetsen van plantaardig materiaal op virussen is algemeen bekend. De techniek is betrouwbaar, robuust, goedkoop en grotendeels te automatiseren. Helaas kan deze serologische techniek niet in alle gevallen worden toegepast, bijvoorbeeld wanneer geen goed antiserum kan worden gemaakt, de ziekteverwekker geen eiwit heeft (viroïden) of wanneer kruisreacties optreden met andere organismen. De real-time PCR techniek biedt de mogelijkheid om in deze gevallen moleculair biologische toetsen te ontwikkelen die geschikt zijn voor routinematige toepassing. Deze techniek biedt daarmee een waardevolle aanvulling op ELISA.

Inleiding

Sinds de ontwikkeling van snelle en betrouwbare laboratoriumtoetsen zoals ELISA en PCR, worden deze methoden in de plantaardige sector steeds vaker ingezet om garanties af te geven over de gezondheid van het materiaal. Hierbij gaat het vaak om uitgangsmateriaal voor zowel de interne markt als voor export. Voorbeelden zijn de virustoetsingen in aardappelpootgoed, bloembollen, bloem- en boomkwekerijproducten en groentezaden. Al ruim dertig jaar wordt voor deze grootschalige en routinematige toetsingen gebruik gemaakt van ELISA. Daar deze techniek niet in alle gevallen kan worden toegepast, is het wenselijk om ook moleculair biologische toetsen als PCR op grotere schaal te kunnen in

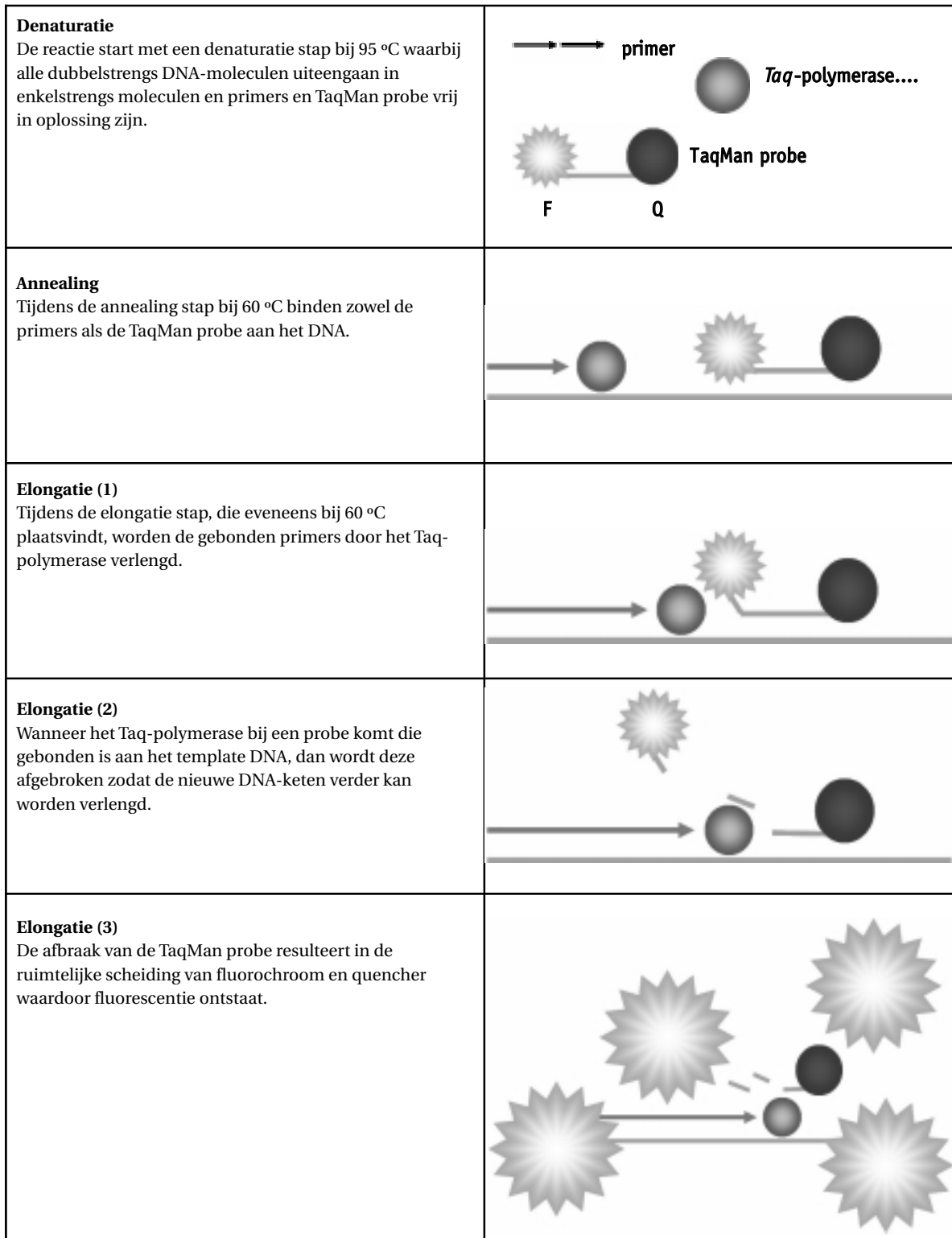
zetten. In de loop der jaren zijn verschillende technieken ontwikkeld waarmee specifieke nucleïnezuursequenties kunnen worden gedetecteerd, zoals nucleïnezuurhybridisatie, zowel met radioactieve als fluorescerende probes, polymerase chain reaction (PCR), nucleic acid sequence based amplification (NASBA) en real-time PCR. Met name deze laatste techniek blijkt geschikt te zijn voor opschaling. In dit artikel wordt het principe van deze techniek beschreven in relatie tot de mogelijkheden voor routinematige toepassing. De focus ligt hierbij op de TaqMan technologie daar deze vooralsnog het meest wordt toegepast.

Real-time PCR

Real-time PCR combineert twee technieken: PCR en nucleïnezuurhybridisatie. Net als bij de conventionele PCR wordt gebruik gemaakt van twee specifieke primers voor de amplificatie van een klein deel van het genoom van het te detecteren organisme. Anders dan bij de conventionele PCR, waar amplicons zichtbaar worden gemaakt in ethidiumbromide-gels, resulteert amplificatie bij deze techniek in fluorescentie. Deze fluorescentie kan 'real time', dat wil zeggen gedurende het verlopen van de reactie worden gemeten. Daarbij is de methode kwantitatief, hetgeen betekent dat het fluorescentiesignaal bij elke cyclus sterker wordt. De gemeten fluorescentie wordt per monster weergegeven in een grafiek die na afloop van de reactie wordt geanalyseerd.

De techniek

Bij een conventionele PCR bestaat het reactiemengsel uit een buffer met daarin *Taq*-polymerase, vier typen nucleotiden (ACGT) en een forward en reverse primer. In geval van re-



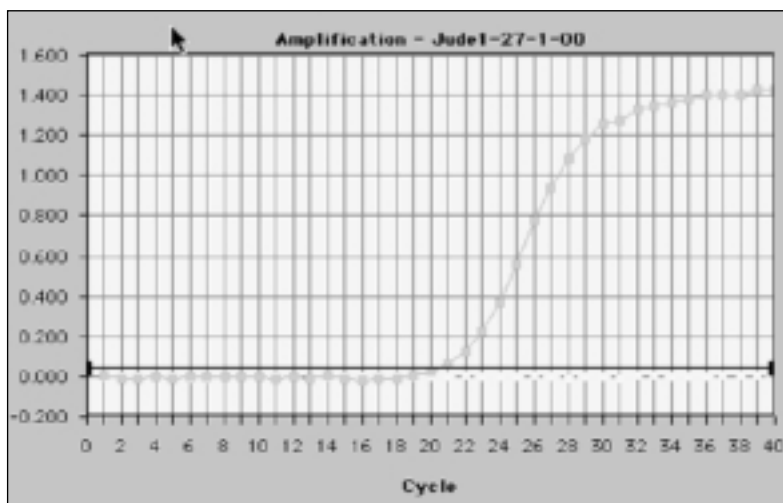
[ARTIKEL

Figuur 1. De stappen in real-time PCR. (Tekeningen N. Boonham en R. Mumford, Central Science Laboratory, York)

al-time PCR wordt aan dit mengsel een TaqMan probe toegevoegd die complementair is aan een deel van het DNA van het amplicon (Figuur 1). Deze TaqMan probe is aan de

uiteinden voorzien van twee extra moleculen. Aan de ene kant is een fluorochroom gekoppeld, aan de andere kant een quencher. Tijdens de PCR wordt het fluorochroom aan-

gestraald door UV-straling, waardoor het gaat fluoresceren. De fluorescentie wordt echter geabsorbeerd door de quencher zolang beide moleculen zich dicht bij elkaar be-



Figuur 2. Fluorescentiegrafiek

Deze grafiek toont de fluorescentie (Y-as) als functie van het aantal cycli (X-as). De positieve reactie toont een S-curve die na 20 cycli de cycle threshold (getrokken lijn) passeert. De Ct-waarde is in dit geval 20. De controle geeft geen fluorescentie, hetgeen wordt weergegeven door een rechte lijn die onder het niveau van de threshold blijft (Grafiek: N. Boonham en R. Mumford, Central Science Laboratory, York).

vinden, dus zolang ze gekoppeld zijn aan de probe. Dit betekent dat er aan het begin van de reactie geen fluorescentiesignaal wordt gemeten.

Evenals bij de conventionele PCR worden bij real-time PCR de volgende stappen onderscheiden: denaturatie, annealing en elongatie. Tijdens de annealing stap binden de primers aan de enkelstrengs DNA-moleculen. Bij real-time PCR bindt bovendien de TaqMan probe aan het DNA. Wanneer vervolgens het Taq-polymerase gaat repliceren dan bereikt dit enzym op zeker moment de probe. Om de nieuwe DNA-steng verder te kunnen verlengen, wordt de probe door de endoclease-activiteit van het Taq-polymerase afgebroken. Hierdoor raken fluorochroom en quencher los van de TaqMan probe waardoor de afstand tussen deze moleculen toeneemt. De fluorescentie van het fluorochroom wordt dan niet langer geabsorbeerd waardoor een meetbaar signaal ontstaat.

De essentie van de techniek is dus dat het optreden van replicatie zich via afbraak van de TaqMan probe vertaalt in een fluorescentiesignaal. Hoe vaker replicatie plaatsvindt, des te groter het aantal probes dat wordt afgebroken en des te sterker het signaal. Hierdoor is het dus mogelijk om zowel het verloop van de reactie in de tijd te volgen als na afloop van de reactie de oorspronkelijke hoeveelheid target DNA te berekenen.

Analyse meetgegevens

In het algemeen worden de drie PCR-stappen circa veertig maal herhaald (40 cycli). De fluorescentie wordt na iedere cyclus gemeten en in een grafiek gezet (Figuur 2). In geval van positieve monsters neemt de fluorescentie toe na elke cyclus. Gezonde en controlemonsters leiden niet tot fluorescentie waardoor het signaal onder de zogenaamde thres-

hold blijft. Voor de analyse van real-time PCR gegevens wordt over het algemeen gebruik gemaakt van de cycle threshold (Ct) waarde. Dit is het aantal cycli dat is verlopen wanneer het fluorescentiesignaal de cycle threshold passeert. Hoe eerder een monster de cycle threshold bereikt, dus hoe lager de Ct-waarde, des te hoger is de hoeveelheid target DNA in het oorspronkelijke materiaal. Daar gezonde en controlemonsters de cycle threshold niet passeren, is de Ct waarde in deze gevallen onbepaald.

Het bepalen of een toetsresultaat (Ct-waarde) positief dan wel negatief is, is mede afhankelijk van de kenmerken van de betreffende real-time PCR. Wanneer een hoge concentratie van het organisme aanwezig is in het oorspronkelijk materiaal dan zijn de Ct-waarden over het algemeen laag, circa vijftien tot twintig. Het onderscheid met gezonde monsters is dan niet moeilijk. Bij Ct-waarden die in de buurt liggen van het totaal aantal cycli van de PCR (40) kan een nadere analyse nodig zijn om uit te sluiten dat het een specifieke reactie of kruisbesmetting betreft. De afbakening tussen positief en negatief moet dan ook voor iedere real-time PCR afzonderlijk worden bepaald. Vaak zal een 'twijfelzone' worden gehanteerd, waarbij de monsters die hierin vallen opnieuw moeten worden getoetst.

Routinematige toepassing

Real-time PCR leent zich bij uitstek voor grootschalige en routinematige toepassingen. De PCR's worden uitgevoerd in 96 of 384 wells platen, vergelijkbaar met de microtiterpla-

ten die worden gebruikt bij ELISA. Deze platen worden handmatig gevuld of met behulp van pipetteerrobots. Zowel de monstergegevens als de bijbehorende fluorescentiegrafieken worden vastgelegd zodat de resultaten na afloop van de reactie kunnen worden geanalyseerd. Monsters hoeven dus niet meer handmatig op gel te worden gebracht zoals bij de conventionele PCR.

Daarnaast kan in één well gelijktijdig op meerdere organismen worden getoetst, een zogenaamde multiplex real-time PCR. De primers en Taqman probes voor de verschillende organismen worden namelijk zodanig ontworpen dat de real-time PCR met een universeel programma kan worden uitgevoerd. Over het algemeen hebben de amplicons een grootte van ongeveer honderd nucleotiden. Dit is kleiner dan bij de meeste conventionele PCR's.

Het voordeel hiervan is dat de verschillende stappen van de PCR sneller kunnen worden doorlopen.

Ook bij real-time PCR kost het voorbereiden van de monsters de meeste tijd. Het bemonsteren en vernalen blijft voor een groot deel handwerk. Voor de nucleïnezuurextractie zijn inmiddels kits beschikbaar die geschikt zijn voor geautomatiseerde systemen, zoals de KingFisher. Dit systeem maakt gebruik van magnetic beads voor het extraheren van het nucleïnezuur uit het plantensap en werkt eveneens met 96 wells platen.

Routinematige toetsen stellen hoge eisen aan het voorkomen van kruisbesmettingen. Zeker bij een zo gevoelige techniek als real-time PCR zijn enkele DNA-moleculen of amplicons voldoende om een positief toetsresultaat te geven. Dit

maakt dat ook bij deze techniek soortgelijke voorzorgsmaatregelen moeten worden genomen als bij de conventionele PCR. Het voordeel van real-time PCR hierbij is dat de reactievaatjes na de amplificatie niet meer open gaan, waardoor de kans op kruisbesmetting met amplicons aanzienlijk geringer is dan bij conventionele PCR. Verder is de techniek aanzienlijk gevoeliger dan de conventionele PCR, waardoor extra alertheid is gewenst tijdens het opwerken van de monsters.

In vergelijking met ELISA is real-time PCR een complexe techniek die gebruik maakt van geavanceerde apparatuur en reagentia. In situaties waar ELISA niet kan worden toegepast, biedt real-time PCR technologie de mogelijkheid om grootschalig te toetsen op organismen waarop dit voorheen niet mogelijk was.

Real-time RT-PCR voor grootschalige toetsting van aardappel op het aardappelspindelknolviroïde

J.W. (Annelien) Roenhorst¹, C.C.C. (Claudia) Jansen¹, L.F.F. Kox¹, E.G. (Eisse) de Haan², G.W. (Gé) van den Bovenkamp²

¹Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, e-mail: j.w.roenhorst@minlnv.nl

²NAK, Emmeloord

Vondsten van het aardappelspindelknolviroïde in aardappelklonen in Frankrijk in 2001 en het voorkomen van dit viroïde in landen die in 2004 zijn toegetreden tot de Europese Unie, maakten duidelijk dat er behoefte was aan een betrouwbare toetsmethode. De door Boonham et al. (2004) ontwikkelde real-time RT-PCR assay leek een veelbelovend uitgangspunt voor het opzetten van een protocol voor grootschalige toetsing. Dit artikel laat zien hoe door analyse en validatie van de verschillende stappen dit protocol tot stand is gekomen.

Inleiding

Het aardappelspindelknolviroïde (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) heeft een quarantainestatus in de Europese Unie (EU). Tot de uitbreiding van de EU in 2004 was het viroïde niet gevestigd in de EU en werd het slechts incidenteel aangetroffen in veredelingsmateriaal. De laatste melding in 2001 betrof een aardappelkloon in Frankrijk (Ollivier, 2004). In een aantal Oost-Europese landen echter, werd PSTVd in het verleden met enige regelmaat aangetroffen in de aardappelteelt. Door toetreding tot de EU maakten deze landen voortaan deel uit van de interne markt en kon het pootgoed vrij worden verhandeld. Het risico van verspreiding van PSTVd nam hierdoor toe, temeer daar grootschalige toetsing op dit viroïde niet mo-

gelijk was. Zowel de vondst in Frankrijk als het toegenomen risico van introductie vanuit de nieuwe EU-lidstaten, maakten duidelijk dat er dringend behoefte was aan een betrouwbare toetsmethode die op grote schaal zou kunnen worden ingezet.

Potato spindle tuber viroid

PSTVd behoort tot het genus *Pospiviroid*. Het bestaat uit een enkelstrengs circulair RNA-molecule waarvan de lengte varieert tussen 356 en 361 nucleotiden. Het genoom van viroïden bevat geen coderende sequenties, hetgeen betekent dat ze voor replicatie volledig afhankelijk zijn van de gastheer-cel. Het RNA-molecule heeft een complexe secundaire struc-

tuur waardoor het viroïde ook buiten de plant zeer stabiel is.

De schade die PSTVd in aardappel veroorzaakt, hangt af van zowel het viroïde-isolaat als de aardappelcultivar. Naast opbrengstderving die kan oplopen tot 64% (Pfannestiel and Slack, 1980), is er ook sprake van kwaliteitsvermindering door misvorming van de knollen (Figuur 1). Kenmerkend zijn de spoelvormige knollen, waaraan het viroïde zijn naam te danken heeft. Daarnaast leidt de aanwezigheid van PSTVd tot economische schade als gevolg van internationale handelsbelemmeringen.

Verspreiding van PSTVd vindt plaats via de klonale lijn (vegetatieve vermeerdering), pollen, zaad en contact (machines). Daarnaast kan het worden overgebracht door bladluizen wanneer sprake is van co-infectie met het aardappelbladrolvirus (Grasmick and Slack, 1986; Salazar *et al.*, 1995).

Toetsmethoden

In de loop der jaren zijn verschillende methoden ontwik-

ARTIKEL

keld voor de toetsing op PSTVd. De bekendste zijn 'return-polyacrylamide gel electrophoresis' (R-PAGE), nucleïnezuurhybridisatie en 'reverse-transcription polymerase chain reaction' (RT-PCR; Huttinga *et al.*, 1987; Roenhorst *et al.*, 2000; Shamloul *et al.*, 1997). Geen van deze methoden is echter geschikt voor grootschalige toepassing. De recent door Boonham *et al.* (2004) ontwikkelde 'real-time RT-PCR assay' bood daarentegen goede perspectieven. Deze methode presteerde het best tijdens een internationale ring test waarbij verschillende methoden voor de detectie van PSTVd in aardappel werden vergeleken (Jeffries and James, 2005). Real-time RT-PCR bleek de gevoeligste methode en bovendien kwamen de resultaten van de verschillende laboratoria het meest overeen. Tevens is deze methode bij uitstek geschikt voor grootschalige toepassing.

Real-time RT-PCR

Real-time PCR combineert twee technieken: PCR en nucleïnezuurhybridisatie. Net als bij de conventionele PCR wordt gebruik gemaakt van twee specifieke primers voor de amplificatie van een klein deel van het genoom van het te detecteren organisme. Anders dan bij de conventionele PCR, waar amplicons zichtbaar worden gemaakt in ethidiumbromide-gels, resulteert amplificatie bij deze techniek in fluorescentie. Deze fluorescentie wordt per monster weergegeven in een grafiek die na afloop van de reactie wordt geanalyseerd. Nadere uitleg over de techniek is te vinden in het artikel 'Real-time PCR brengt routinematige toepassing van moleculair biologi-



Figuur 1. Typische spoelvormige aardappelknollen als gevolg van een infectie met het aardappelspindelknolviroïde (*Potato spindle tuber viroid*). Rechts gezonde knollen.

sche technieken dichterbij', dit nummer p.194-197.

Protocol voor grootschalige toetsing

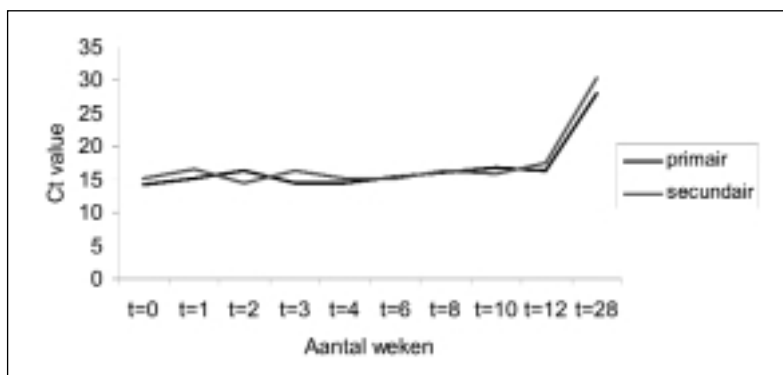
Op basis van de prestaties van real-time RT-PCR tijdens de ring test en de geschiktheid voor grootschalige toepassing, is de TaqMan assay van Boonham *et al.* (2004) gebruikt als startpunt voor de ontwikkeling van een protocol voor grootschalige toepassing. Bij de ontwikkeling van zo'n protocol is het van belang inzicht te hebben in de specificiteit en gevoeligheid van de methode. Daarnaast worden de volgende stappen onderscheiden: bemonstering, homogenisatie, nucleïnezuur-extractie en real-time RT-PCR. Verder is het van belang inzicht te hebben in de betrouwbaarheid van de toets. Hiervoor moeten verschillende typen 'controles' beschikbaar zijn zodat het verloop van de verschillende stappen kan worden gevolgd. Tenslotte zijn middelen en methoden nodig voor reiniging van materialen, onder andere om kruisbesmetting te voorkomen.

Specificiteit

De specificiteit van de RT-PCR wordt bepaald door de mate waarin primers en probe reageren met verschillende varianten van het target organisme en met verwante organismen. Voor een screeningsmethode zoals deze voor PSTVd, is het van belang dat alle varianten (isolaten) worden gedetecteerd en dat geen reactie optreedt met andere pospiviroiden. Zowel alle door Boonham *et al.* (2004) als de door Roenhorst *et al.* (2005) getoetste isolaten van PSTVd, gaven een positieve reactie. Beide vonden een kruisreactie met een isolaat van het *Tomato chlorotic dwarf viroid*, hetgeen kon worden verklaard door de grote overeenkomst tussen de sequenties van beide viroiden. Vier andere pospiviroiden en *Hop stunt viroid* gaven geen reactie.

Bemonstering

De betrouwbaarheid van een toetsingsprotocol wordt voor een belangrijk deel bepaald door de bemonstering. Wan-



Figuur 2. Effect van kiemrust op de detecteerbaarheid van PSTVd in knollen

Aardappelknollen van primair en secundair geïnfecteerde planten werden op verschillende tijdstippen na de oogst getoetst met real-time RT-PCR. De knollen werden bewaard bij 4°C. Tot 12 weken na de oogst neemt de hoeveelheid viroïde slechts weinig af en kan PSTVd betrouwbaar worden aangetoond in mengmonsters tot 100 knollen.

neer het te detecteren organisme niet of in onvoldoende hoeveelheid in het monster aanwezig is, kan ondanks de hoge gevoeligheid van de methode, de uitkomst fout zijn. Voor PSTVd in aardappel is gekeken naar de verdeling in planten en knollen. Er werden geen significante verschillen gevonden tussen bladeren van verschillende posities in de plant. Ook de verschillen tussen topoog, midden en navel-einde van de knol waren minimaal. In deze experimenten werd geen verschil gevonden tussen primair en secundair geïnfecteerd materiaal. Op basis van deze resultaten werd geconcludeerd dat de bemonstering niet bijzonder kritisch

is. In geval van 'jonge' primaire infecties valt in de praktijk echter een lagere concentratie te verwachten. Besloten werd om bij de toetsing van blad, een deelblaadje net onder de kop van de plant te bemonsteren en bij knollen het navel-einde te gebruiken. In geval van blad werd een ponsje met doorsnede van circa vijf millimeter per blad getoetst, bij knollen een klein stukje weefsel rond het navel-einde.

Verder is het bij de toetsing van knollen belangrijk om inzicht te hebben in de effecten van kiemrust op de toetsresultaten. Hiertoe zijn knollen van zowel primair als secundair geïnfecteerde aardappelplanten op

verschillende tijdstippen tot ruim een half jaar na de oogst getoetst op PSTVd. Figuur 2 laat zien dat de Ct-waarden in geringe mate toenemen in de tijd, hetgeen betekent dat de hoeveelheid viroïde in de knol in de tijd afneemt. Direct na de oogst liggen de Ct-waarden rond veertien. Na bewaring bij 4°C zijn de Ct-waarde toegenomen tot 18-21 na veertien weken en 28-30 na 28 weken. Deze resultaten geven aan dat PSTVd ook tijdens kiemrust betrouwbaar kan worden gedetecteerd. Wel heeft de afname van de hoeveelheid viroïde consequenties voor het kunnen samenvoegen van materiaal in mengmonsters, dit afhankelijk van de bewaarperiode. Mengmonsters tot honderd planten kunnen tot drie maanden na de oogst betrouwbaar worden getoetst.

Homogenisatie

Om blad- en knolstukjes te kunnen toetsen, wordt het plantmateriaal vermalen in een extractiebuffer (1 g/ml). Er zijn verschillende homogenisatiemethoden met elkaar vergeleken, waarbij werd gelet op de capaciteit (hoeveelheid materiaal), de effectiviteit, mogelijkheden tot automatisering, reiniging- en ontsmetting en het risico op kruisbesmetting. Tabel 1 geeft een overzicht van de resultaten. De Homex-6 in combinatie met de vermaalzakjes van Bioreba voldeden het best aan de criteria.

Nucleïnezuur-extractie

Verschillende methoden voor nucleïnezuur-extractie werden vergeleken op basis van opbrengst en mogelijkheid tot au-

Tabel 1. Vergelijking van verschillende homogenisatiemethoden

	Effectiviteit	Volume	Kruisbesmetting
Bead beater	-	-	•
Kleco mill	•	-	•
Pollähne pers	•	•	-
Qiagen mixer mill	-	•	•
Homex 6 (Bioreba)	•	•	•

Verschillende homogenisatiemethoden werden vergeleken op grond van de effectiviteit waarmee het materiaal werd vermalen, het maximale volume per monsters en de risico's m.b.t. het optreden van kruisbesmetting. Voor dit experiment werden 100 tot 200 bladponsjes van ca. 5 mm doorsnede vermalen in buffer. Symbolen: • goed/geschikt, - onvoldoende/niet geschikt.

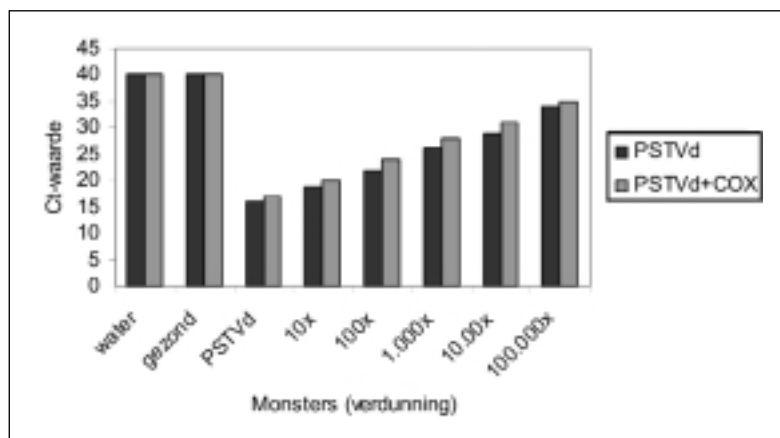
tomatiseren. De PureScript kit van Gentra gaf in het algemeen de hoogste opbrengst. Vervolgens werden kits van Toyoba en InviMag getoetst daar deze kits gebruikt kunnen worden in combinatie met de KingFisher, een apparaat waarmee nucleïnezuurextracties geautomatiseerd kunnen worden uitgevoerd. De InviMag kit was van deze twee duidelijk de beste. De opbrengsten waren vergelijkbaar met die van de handmatige uitgevoerde extracties met de PureScript kit.

Gevoeligheid

Het belang van gevoeligheid bij een grootschalige toets vertaalt zich in het aantal monsters dat kan worden samengevoegd. In het geval van de TaqMan assay voor PSTVd, waarbij de Ct-waarden van geïnfecteerd blad- en vers knolmateriaal over het algemeen tussen de vijftien en twintig liggen, betekent dit dat verdunningen tot 100.000x nog positief reageren (Figuur 3). Daar het samenvoegen van 100.000 planten in de praktijk niet haalbaar en niet wenselijk is, is besloten om materiaal van maximaal honderd planten samen te voegen.

Controles

Het optreden van vals positieve en negatieve resultaten bij routinematige toetsing is ongewenst. Allereerst speelt hier de invloed van de bemonstering, de steekproefgrootte in relatie tot het infectieniveau, en de plaats van bemonstering. Daarnaast kunnen ook tijdens het uitvoeren van de laboratoriumwerkzaamheden 'fouten' optreden die effect hebben op de uitkomst van de toets. Bij de real-time RT-PCR is het van be-



Figuur 3. Effect van verdunning op de detecteerbaarheid van PSTVd in blad

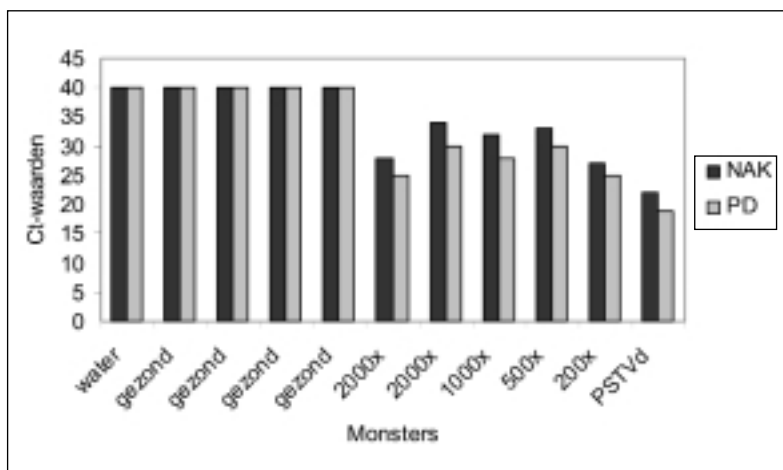
Toetsing van bladsap van PSTVd-geïnfecteerde planten in een decimale verdunningsreeks met bladsap van gezonde planten. De Ct-waarden nemen gelijkmatig toe met het toenemen van de verdunning. Bij een verdunning van 100.000x is PSTVd nog betrouwbaar te detecteren. Bij de controles is de Ct-waarde gelijk aan het aantal cycli (40) en dus onbepaald.

lang om zicht te houden op het verloop van de verschillende stappen van de toets. Hiertoe worden verschillende controles meegenomen waarbij onderscheid wordt gemaakt tussen externe en interne controles (Kox *et al.*, 2005). Externe controles zijn extra 'monsters' met alleen water, gezond en ziek plantmateriaal. Hiermee kan worden aangetoond dat de uitgangsmaterialen voldoen aan de eisen voor een betrouwbaar toetsresultaat. Interne controles maken deel uit van het te toetsen monster. Hierbij wordt onder andere gecontroleerd of de nucleïnezuurextractie goed is verlopen door te toetsen op de aanwezigheid van een stukje DNA van de plant, bijvoorbeeld het cytochroomoxidasegen (COX) bij de toets van aardappel op PSTVd. Deze reactie moet zowel in de gezonde als geïnfecteerde monsters een positief resultaat geven. Tevens geeft deze controle aan wanneer in een monster sprake is van remming. Daarnaast kunnen als interne controle stukjes (gemodificeerd) target RNA aan het monster worden toegevoegd (spike) om te controle-

ren of de specifieke primers werken. Bij grootschalige toetsen worden in het algemeen per run in elk geval alle bovengenoemde externe controles meegenomen. Verder wordt meestal ook een interne controle meegenomen om te controleren of de nucleïnezuurextractie en de PCR goed zijn verlopen.

Kruisbesmetting en reiniging

Bij zeer gevoelige toetsen zoals de real-time RT-PCR assay voor PSTVd bestaat er een groot risico op kruisbesmetting. Hoewel kruisbesmetting tijdens elke stap kan plaatsvinden, doen de grootste risico's zich echter voor tijdens de bemonstering en homogenisatie. Een strikte scheiding van verschillende monsters gedurende het gehele proces is dan ook van essentieel belang. Enerzijds vereist dit strikte procedures van handelen, anderzijds het gebruik van consumabels of effectieve reinigingsmiddelen en methoden. Voorbeelden zijn het ge-



Figuur 4. Vergelijking van de resultaten van real-time RT-PCR van twee laboratoria

Tien monsters (water, gezond blad, 2000-200x 'verdund' en PSTVd-geïnfecteerd blad) werden vermalen en vervolgens getoetst door NAK-Agro en PD. De resultaten van beide laboratoria waren vergelijkbaar, zij het dat de Ct-waarden bij de NAK in het algemeen iets hoger lagen dan die van de PD. De Ct-waarden van de COX-controle lagen tussen 22 en 25. Bij de controles is de Ct-waarde gelijk aan het aantal cycli (40) en dus onbepaald.

bruik van handschoenen tijdens het bemonsteren en wegwerpzakjes bij het vermalen en homogeniseren. Daarnaast zijn middelen en methoden nodig voor het reinigen van oppervlakten en materialen die worden hergebruikt. Vergelijking van een aantal schoonmaak- en ontsmettingsmiddelen leerde dat een oplossing van 1%-hypochloriet (viermaal verdund huishoudchloor) het effectiefst was. Bovendien bleek dit middel bij deze concentratie de PCR niet te remmen.

Pilot

Analyse van de verschillende stappen van de toets voor grootschalige screening van aardappel op PSTVd hebben geleid tot het opstellen van een protocol. Dit protocol is gebruikt voor een pilot waarbij honderd verschillende rassen uit het bewakingsprogramma aardappel werden getoetst door NAK-Agro. Van ieder ras

werden twee planten opgekweekt, waarbij van iedere plant vijftig bladponsjes van ongeveer vijf millimeter doorsnede werden verzameld en vervolgens als mengmonster van honderd ponsjes getoetst. Tevens werden acht blinde monsters toegevoegd, gezond materiaal en gezond gemengd met verschillende hoeveelheden ziek materiaal. Alle monsters werden getoetst zowel zonder (simplex) als met de COX-controle (duplex).

In geen van de getoetste monsters werd PSTVd aangetroffen. Bij 99 monsters lag de Ct-waarde op 40, en was dus onbepaald, bij één monster bedroeg de Ct-waarde 38 in de simplexreactie. In dit laatste geval werd in de duplexreactie echter een Ct-waarde van veertig verkregen. Derhalve werd de afwijkende waarde niet als significant beschouwd.

De blinde monsters werden zowel bij NAK-Agro als bij de PD getoetst. De uitkomst van de toetsing van deze monsters

was vergelijkbaar (Figuur 4). Hoewel de Ct-waarden van de blinde monsters verschillen lieten zien, beïnvloedde dit de uitkomst van de toets niet. Hoogst waarschijnlijk hadden de verschillen te maken met het feit dat de laboratoria met een verschillend type real-time PCR apparaat werken.

Vergelijking van de Ct-waarden van de simplex- en duplexreacties tonen een geringe toename van de Ct-waarde, dus een afname van de gevoeligheid, wanneer ook op COX wordt getoetst (Figuur 3).

Wanneer in de praktijk monsters in duplo worden getoetst, is het dan ook wenselijk om één reactie in afwezigheid van COX (simplex) en een reactie in aanwezigheid van deze controle (duplex) uit te voeren. Hierbij wordt de maximale gevoeligheid gehaald en wordt tevens gecontroleerd op de betrouwbaarheid van de toets.

Ringtest

Om meer inzicht te krijgen in de prestaties van het ontwikkelde de real-time RT-PCR protocol, werden 'identieke' blad en knolmonsters getoetst in vier laboratoria in Nederland en Engeland. De resultaten van drie laboratoria waren vergelijkbaar. Bij één laboratorium lagen de Ct-waarden significant hoger dan bij de andere drie, als gevolg van het feit dat de monsters in slechte staat waren aangekomen. De positieve monsters werden echter door alle laboratoria gedetecteerd. Dit resultaat bevestigde de conclusies van de eerder gehouden ringtest (Jeffries & James, 2005).

Conclusies en perspectieven

Dit artikel laat zien dat een grondige analyse van de verschillende stappen nodig is voor de ontwikkeling van een protocol voor grootschalige toetsing van aardappel op PSTVd. Een dergelijk proces staat niet op zich, validatie is essentieel voor ieder protocol dat wordt ontwikkeld.

Ook de validatie van het hier beschreven protocol voor aardappel is nog niet geheel afgerond. Zo is er nog een pilot gepland voor de toetsing van knolmateriaal. Hiervoor zullen net als bij de pilot met bladmateriaal monsters uit het bewaarsprogramma aardappel door NAK-Agro worden getoetst. Met het oog op de toe-

komst zal verder worden onderzocht in hoeverre de toetsing op PSTVd gecombineerd kan worden met de toetsing op de bacterieziekten bruinrot en ringrot.

Literatuur

- Boonham N, Gonzáles Pérez L, Mendez MS, Lilia Peralta E, Blockley A, Walsh K, Barker I & Mumford RA (2004) Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) *Journal of Virological Methods* **116**, 139-146
- Huttinga H, Mosch WHM & Treur A (1987) Comparison of bi-directional electrophoresis and molecular hybridization methods to detect potato spindle tuber viroid and chrysanthemum stunt viroid. *EPPO Bulletin* **17**, 37-43
- Jeffries C & James C (2005) Development of an EU protocol for the detection and diagnosis of *Potato spindle tuber viroid*. *EPPO Bulletin* **35**, 125-132
- Kox LFF, Boxman ILA, Jansen CCC & Roenhorst JW (2004) Reliability of nucleic acid amplification techniques: modified target RNA as exogenous internal standard for a real-time RT-PCR for *Potato spindle tuber viroid*. *EPPO Bulletin* **35**, 117-124
- Ollivier F (2004) L'hybridation moléculaire: une technique de détection du *Potato spindle tuber viroid* adaptée aux plans de surveillance. *EPPO Bulletin* **34**, 123-126
- Pfannenstiel MA & Slack SA (1980) Response of potato cultivars to infection by the potato spindle tuber viroid. *Phytopathology* **70**, 922-926
- Roenhorst JW, Bütot RPT, van der Heijden KA, Hooftman M & van Zaayen A (2000) Detection of *Chrysanthemum stunt viroid* and *Potato spindle tuber viroid* by return-polyacrylamide gel electrophoresis. *EPPO Bulletin* **30**, 453-456
- Roenhorst JW, Jansen CCC, Kox LFF, de Haan EG, van den Bovenkamp GW, Boonham N, Fisher T & Mumford RA (2005) Application of real-time PCR for large-scale testing of potato for *Potato spindle tuber viroid*. *EPPO Bulletin* 2005; 35:133-140 *EPPO Bulletin* **35**: 133-140
- Salazar LF, Querci M, Bartolini I & Lazarte V (1995) Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia* **30**, 56-58
- Shamloul AM, Hadidi A, Zhu SF, Singh RP & Sagredo B (1997) Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology* **19**, 89-96

Virustoetsing en virusdiagnostiek door de Bloembollenkeuringsdienst

Ton van Schadewijk

Bloembollenkeuringsdienst; Ton.van.schadewijk@bloembollenkeuringsdienst.nl

Virussen vormen een lastig probleem in de bloembollenteelt. Ze veroorzaken schade zoals verminderde opbrengst in kilogrammen en ze verlagen de sierwaarde van het product. Anders dan bij plantenziekten veroorzaakt door schimmels en bacteriën, kun je aan virus besmette bollen niet zien of ze ziek zijn. Ook helpt ontsmetten niet. Doordat bloembollen vegetatief worden vermeerderd en het virus veelal over gaat van moederbol op dochterbol, blijft de virusbesmetting door de jaren in een partij aanwezig. Het percentage viruszieke bollen in een partij neemt toe doordat vectoren virus verspreiden vanuit besmette planten naar gezonde planten. Door tijdig viruszieke planten uit een partij te verwijderen kunnen, bij bepaalde teelten, telers verdere verspreiding in een partij voorkomen en zelfs het percentage terugdringen. Viruszuivering is arbeidsintensief en daarmee kostbaar. Bij hoge aantastingspercentages is viruszuivering niet meer rendabel en zal een teler tot vervanging van de partij moeten overgaan. Dit betekent aankoop van uitgangsmateriaal van hoge kwaliteit.

voldoende herkenbaar zoals tulpenmozaïekvirus in witte en gele cultivars van Tulp. Daarom worden keuringen ondersteund door laboratoriumtoetsen. Voor elke kwaliteitsklasse gelden bepaalde toleranties wat betreft de aanwezigheid van virussen. Meestal mag dit niet meer dan enkele procenten bedragen. De normen zijn gebaseerd op de schadelijkheid van de betreffende virussen dus dient ook vastgelegd te worden welk type virus wordt aangetroffen.

ELISA virustoetsen

Voor grootschalige virustoetsing in het laboratorium wordt

Viruskeuringen

De aanwezigheid van virus is een van de aspecten waarop gelet wordt bij de kwaliteitskeuring van bolgewassen zoals de Bloembollenkeuringsdienst (BKD) deze uitvoert. De keuring is er op gericht om duidelijkheid te verschaffen over de kwaliteit van vermeerderingsmateriaal en dit vast te leggen door het certificeren van partijen. Alleen kwalitatief goed uitgangsmateriaal mag gebruikt en verhandeld worden. De viruskeuring is in ieder geval visueel, bestaande uit een veldkeuring of een keuring van opgeplante monsters op proeftuinen (Gladiool en Krokus) of monstercassen (Iris, Tulp, Muscari, figuur 2) van de BKD. Sommige virussen geven nau-

welijks symptomen zoals het symptoomloos lelievirus in Lelie of de symptomen zijn on-



Figuur 1. Virus in Rose Queen.

ARTIKEL



Figuur 2. Monsterkas bij de Bloembollenkeuringsdienst.

de ELISA-methode gebruikt. Deze serologische toets wordt uitgevoerd in microtiterplaten met 96 posities. Hierdoor is de uitvoering grotendeels te automatiseren en blijven de kosten laag. De benodigde antisera zijn veelal in Nederland ontwikkeld door het PPO te Lisse en PRI en de vakgroep Virologie te Wageningen. In het laboratorium van de Bloembollenkeuringsdienst in Lisse worden jaarlijks meer dan twee miljoen ELISA-bepalingen uitgevoerd. Het merendeel, 5800 monsters, betreft lelies terwijl ook nog 4200 tulpenmonsters en vierhonderd dahliamonsters worden getoetst. Ongeveer vijftien procent van de toetsen heeft betrekking op commerciële opdrachten. Dit betreft monsters die door bedrijven zelf worden ingestuurd. Het gaat daarbij om percentagebepalingen, selectie van gezond materiaal en identificatie van virussen.

Kwaliteitsverbetering

Een aantal bolgewassen is volledig besmet met één of meerdere virussen zonder dat de

consument dit als een nadeel ervaart. Voorbeelden zijn: Gladiool (bonenscherpmozaïekvirus), Iris (irismozaïekvirus) en Narcis (virussen uit de potyvirusgroep). In het verleden zijn pogingen ondernomen om de gewassen Iris en Gladiool virusvrij te maken door middel van meristeemcultuur. Dit is ook gelukt, met een kwalitatief goed en groeikrachtig gewas als resultaat, maar de ontwikkeling is niet doorgezet omdat er praktische bezwaren waren in de praktijk. Zo waren de symptomen bij opnieuw geïnfecteerde gladiolen extreem heftig en de bloemproductie bij virusvrije irissen bleek niet economisch. Bij andere gewassen zijn in de afgelopen jaren echter successen geboekt op kwaliteitsgebied. Na invoering van de kwaliteitskeuring voor Iris is het irisgrijsvirus en narcislatentvirus in dit gewas vrijwel verdwenen. Twintig jaar geleden was het gewas Lelie voor 100% geïnfecteerd met symptoomloos lelievirus. Door toepassing van ELISA kon een certificeringssysteem gestart worden waarna virusvrije partijen de markt veroverden. Een dreigende introductie van lelievirus X kon via serologische

toetsing effectief gekeerd worden. Inmiddels maakt ook een toets op aanwezigheid van leliemozaïekvirus deel uit van de toetsing. Door het introduceren van virusvrij uitgangsmateriaal neemt de infectiedruk in de teelt van lelies af met als gevolg dat het gewas inmiddels vrijwel virusvrij geteeld wordt.

Hoewel het gemiddelde percentage tulpenmozaïekvirus bij Tulp varieert tussen de 1 à 2%, is dit toch regelmatig een bron van zorg. Door variatie in het klimaat en door schaalvergroting in de bollenteelt kan een situatie ontstaan waarin de virusverspreiding niet meer voldoende door handmatige selectie kan worden tegengegaan.

ELISA en selectie

ELISA-virustoetsing resulteert meestal slechts in een cijfer dat het geschatte percentage virus in een partij aangeeft. Bij de keuring van Dahlia bestaat echter ook de mogelijkheid om de uitslag van de toets tevens te benutten voor selectie. Dit vergt een samenwerking tussen teler en keurmeester van de BKD: van elk van de bemonsterde knollen worden drie 'vingers' in een genummerd zakje verzameld terwijl de teler het restant van de knol van een label voorziet. De uitslag van de toets bestaat in dit geval uit een percentage virus (tomatenbronsvlekkenvirus, TSWV) en een lijst met besmet gevonden nummers. Valt het viruspercentage te hoog uit om de partij te mogen vermeerderen, dan kan een vermeerdering van de virusvrij getoetste knollen uitkomst. Met een vermeerderingsfactor van veertig kan snel een virusvrije selectie worden opgebouwd met de gezonde stekken. Geholpen door de tra-

ge verspreiding van TSWV te velde is op deze wijze de dahliateelt inmiddels nagenoeg vrij van dit virus geworden.

Ook bij lelies is een selectie van genummerde bollen effectief gebleken en in combinatie met vermeerdering via “schubben” vaak een sneller en goedkoper alternatief voor weefselkweek.

Diagnostiek

Virussen veroorzaken vaak, maar niet altijd, kenmerkende symptomen in planten en keurmeesters van de BKD zijn getraind op het herkennen van deze beelden. Ter ondersteuning van hun werk zijn beschrijvingen van beelden in de afzonderlijke cultivars beschikbaar en een databank met fotomateriaal. Vaak is echter een toets gewenst ter ondersteuning van keuringsbeslissingen. Virussympptomen kunnen variëren per cultivar en per seizoen en combinaties van virussen komen voor. Keurmeesters zijn ook alert op het aantreffen van nieuwe virussen.

In het kader van internationale handel zijn afspraken gemaakt met diverse landen. Voor sommige landen gelden nultoleranties voor bepaalde virussen zoals tabaksratelvirus (figuur 3) of tabaksnecrosevirus. In sommige gevallen bepaalt het aantreffen van één enkele besmette plant een beperking van de exportmogelijkheid van een partij. Een serologische toets verschaft in zo'n geval duidelijk naar zowel teler als keurmeester.

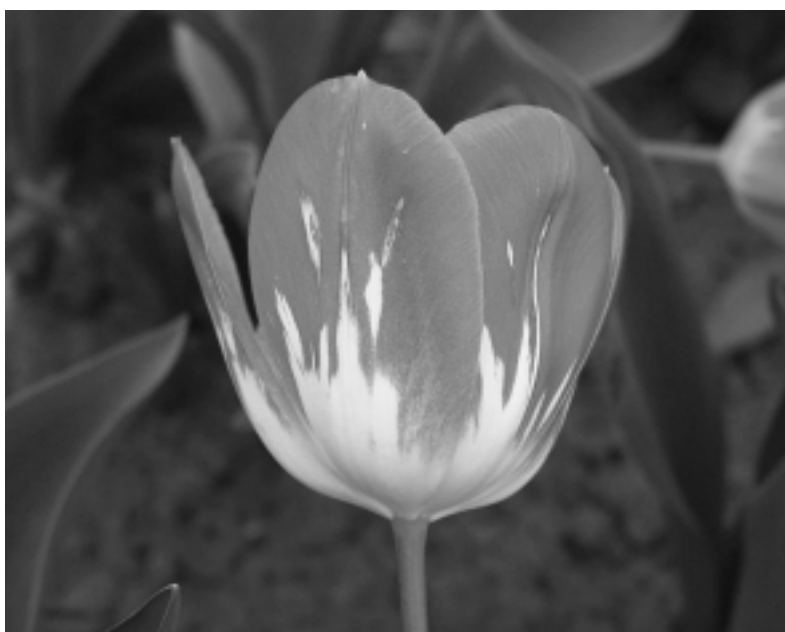
Protocol

Per gewas zijn gemiddeld zo'n drie virussen van belang in de Nederlandse teelt. Het lab van de Bloembollenkeuringsdienst heeft echter per gewas een veelvoud daarvan aan toetsen beschikbaar om alle uit de praktijk en literatuur bekende virussen te kunnen aantonen. De eerste serie toetsingen gebeurt meestal met ELISA's en daarbij wordt uitgegaan van de indicatie van de keurmeester alsmede de vakkennis van de laboratoriummedewerker. Indien geen

positieve reacties worden verkregen of de reacties die geen afdoende verklaring zijn voor de symptomen wordt een tweede serie toetsen opgestart waaronder dikwijls PCR-toetsen (zie onder). De aantoonbaarheid van virussen via ELISA is vaak afhankelijk van het groeistadium waarin de plant verkeert. Dit geldt in mindere mate voor PCR-toetsen. Tenslotte resteert de mogelijkheid van diagnostisch onderzoek door het Praktijkonderzoek Bollen en Bomen (PPO) in Lisse of de Plantenziektenkundige dienst in Wageningen en het aanhouden van materiaal voor eigen onderzoek door de BKD.

PCR-toetsen versus ELISA

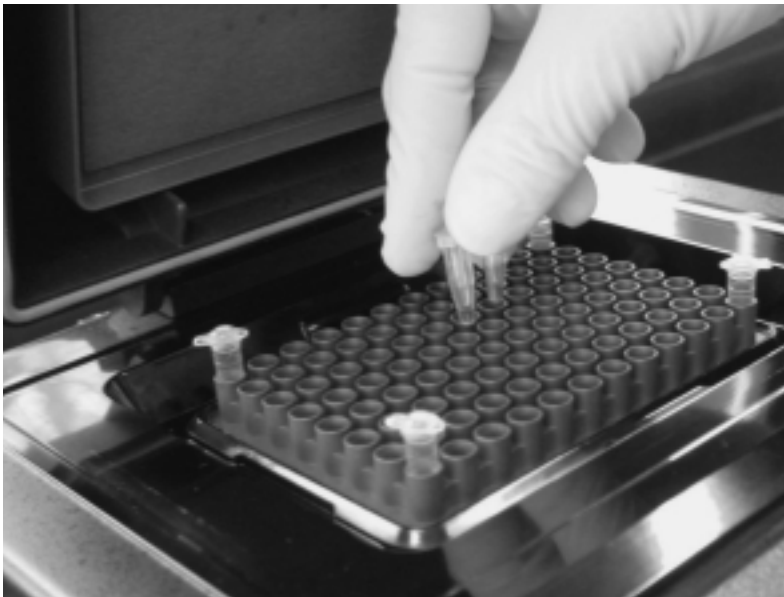
Toetsen op basis van de Polymerase Kettingreactie (PCR) maken gebruik van herkenning van viraal DNA of RNA terwijl ELISA-toetsen (figuur 4) viruseiwitten herkennen met behulp van antisera. Waar ELISA het moet doen met het aantal virusdeeltjes dat in het plantensap aanwezig is, kan via de PCR-reactie een stuk virus-DNA of RNA duizenden malen kunstmatig vermeerderd worden in een reactiemengsel. Dit levert een gevoeligheidswinst op ten opzichte van ELISA. Andere voordelen van PCR zijn de mogelijkheden om meerdere virussen behorende tot een groep met een toets te kunnen aantonen. Het lab van de BKD legt zich toe op het ontwikkelen van zogenaamde generieke primers voor dergelijke PCR-toetsen. Deze breedwerkende toetsen bewijzen hun nut bij diagnostiek doordat ze de kans verkleinen dat een plantenvirus aan de aandacht ontsnapt. Verder blijken PCR-



Figuur 3. TRV in Blenda.



Figuur 4. ELISA-toets materialen.



Figuur 5. PCR-toets materialen.

toetsen, beter dan via ELISA, in staat om virusdeeltjes in planten ook buiten de plekken met symptomen te kunnen detecteren. Een nadeel vormt de hogere kostprijs van deze toetsen.

PCR en onderzoek

PCR-toetsen (figuur 5) geven verder vaak indicaties over het bestaan van meerdere stappen of complexen van virussen. Zo bleek het verschijnsel Augustaziek in tulpen niet alleen sa-

men te hangen met het tabaksnecrosevirus maar ook met een ander necrovirus: het olijfla-tentvirus. De informatie over nieuw ontdekte virussen komt uit sequentiebepalingen van de PCR-producten. PCR helpt ook om twijfelgevallen bij ELISA-toetsen te verduidelijken. Dit type toetsen is zeer geschikt om na het proces van meristeamcultuur viruszieke weefselkweekplantjes te onderscheiden van gezonde.

Plantenvirussen internationaal

De tijd is voorbij dat de normen voor viruskeuring uitsluitend werden bepaald door invloed die plantenvirussen hebben op de kwaliteit van bloembolgewassen binnen het Nederlandse productieproces. Ook internationaal is men bezig met het opzetten van normen en stelt men eisen betreffende de afwezigheid van virussen. Vaak gaat het daarbij om virussen die nog niet in Nederland voorkomen of virussen die bij ons als latent, zonder aantoonbare schade, in gewassen voorkomen, maar in het buitenland een potentieel gevaar vormen in andere gewassen. Het is zaak om kennis te nemen van de virusproblematiek wereldwijd en over de middelen te beschikken om de aan- of afwezigheid van nieuwe virussen te kunnen bepalen. Dit enerzijds om discussie omtrent vermeende risico's aan te kunnen gaan maar anderzijds om onze internationale klanten de kwaliteit te kunnen bieden waarom ze vragen.

ARTIKEL

Virologisch onderzoek bij Praktijkonderzoek Plant & Omgeving

Ineke Stijger^{1,2}, Roel Hamelink¹, Ineke Valstar¹, Khanh Pham², Miriam Lemmers², Joop van Doorn²

¹PPO Glastuinbouw, Postbus 8, 2670 AA Naaldwijk

²PPO Bollen, Bomen & Fruit, Postbus 85, 2160 AB Lisse, ineke.stijger@wur.nl

Enige jaren geleden zijn de voormalige 'plantaardige' Proefstations opgegaan in een nieuwe organisatie te weten Praktijkonderzoek Plant & Omgeving (PPO). Deze organisatie maakt deel uit van de Plant Science Group (PSG), waarbinnen samengewerkt wordt met PRI en de leerstoelgroep virologie van WU. Binnen deze organisatie richt het PPO zich vooral op het praktijkgericht onderzoek.

Daarnaast wordt door PPO (BBF en Glastuinbouw) samengewerkt met de Bloembollenkeuringsdienst (BKD), Naktuinbouw en PD. Binnen specifieke projecten wordt er ook samengewerkt met particuliere onderzoeksbureaus, veredelings- en vermeerderingsbedrijven.

Het onderzoek bij PPO BBF wordt hoofdzakelijk uitgevoerd op de locatie Lisse. Hier zijn de kantoren en laboratoria gehuisvest en de kassen en proefvelden waar het onderzoek kan worden uitgevoerd. Daarnaast is er nog het Proefbedrijf de Noord met kantoor in 't Zand en proefvelden in Julianadorp en de proeflocatie Noordbroek. PPO Glastuinbouw is nu nog te vinden op twee plaatsen te weten Naaldwijk en Aalsmeer maar vanaf begin 2007 wordt de nieuwe locatie Bleiswijk in gebruik genomen.

De virusprojecten worden hoofdzakelijk uitgevoerd in opdracht van Productschap Tuinbouw en LNV. Maar ook in opdracht van bedrijfsleven zoals fabrikanten van gewasbeschermingsmiddelen en leveranciers van ontsmettingsapparatuur.

Voor virologisch onderzoek bij PPO is de volgende expertise aanwezig:

- Stellen van diagnose, waarbij de kennis, ervaring en faciliteiten aanwezig zijn om ook minder algemene en eventueel nieuwe virussen en fyto-

plasma's te detecteren en identificeren.

- Ontwikkelen, valideren, aanpassen (o.a. aan gewas) en toepassen van (nieuwe) detectie- en identificatiemethoden en de middelen daarvoor (antisera, primers).
- Epidemiologisch onderzoek/analyse van virusproblemen in de praktijk: virus-vector relaties, dynamiek van virusziekten, invloed van teelt- en bewaaromstandigheden, symptoomvorming en schade.
- Preventie en bestrijding van

virusziekten op basis van het epidemiologische onderzoek en chemische en fysische bestrijdingsmogelijkheden van vectoren.

- Ontwikkelen en toepassen van resistentietoetsen.
- Verzamelen en beheren van en verstrekken van informatie over virussen, fytoplasma's en detectiemiddelen (antisera en primers).

De groep virologie van PPO BBF beheert al jaren een collectie met de belangrijkste stammen en isolaten van virussen die vooral in de bollenteelt voorkomen. Daarnaast worden deze virussen gebruikt om antisera te ontwikkelen en dienen als positieve controles voor toetsingen.

Hieronder staan voorbeelden vermeld van onderzoek bij PPO:

Beperken van verspreiding van Tulpenvirus X in tulpen

Uit onderzoek bij PPO van door telers aangeleverde tulpenmonsters en via bedrijfsbezoeken lijkt het Tulpenvirus X in omvang toe te nemen, ook op bedrijven waar een goede bestrijding van tulpengalmijt

ARTIKEL

(de bekende vector van TVX) wordt uitgevoerd. Inventariserend onderzoek van de BKD en afkeuring van partijen voor export naar Japan vanwege TVX wijzen in dezelfde richting: In 2004 is bij de monsterkeuring in de kas in 98 monsters TVX aangetroffen. Het afgekeurde areaal is gestegen van drie hectare in 2000 naar 23 hectare in 2004 wegens meer dan 1,0% TVX.

De virusbestrijding richt zich op ziekzoeken (voor zover mogelijk, want niet alle cultivars laten symptomen zien) én op de bestrijding van de tulpengalmijt (de vector) met pirimifos-methyl tijdens de bewaring of ULO-bewaring.

Door de toename van het TVX in de praktijk, zelfs op bedrijven waar geen tulpengalmijt is waargenomen, wordt er steeds meer betwijfeld of TVX alleen wordt verspreid door de tulpengalmijt tijdens de bewaring.

Er leven veel vragen bij telers over het TVX in tulpen, vooral over hoe het virus wordt verspreid. Als hierover meer duidelijkheid komt, kan de verspreiding van TVX beter worden voorkomen. Dit voorkomt ook dat de export naar Japan in gevaar komt voor wat betreft dit virus.

Eind 2005 is in samenwerking met de BKD een onderzoek gestart en daarbij worden analyses uitgevoerd op bedrijven waar het virus al langer een probleem is. Belangrijkste onderdelen zijn het achterhalen waar het virus nu vandaan komt en of er nog andere/nieuwe vectoren zijn die het virus kunnen overbrengen. Door middel van een aantal bedrijfsbezoeken en het invullen van vragenlijsten door de kweker zal hier in het najaar meer dui-



Figuur 1. Tulpen met symptomen van Tulpenmosaïekvirus X.

delijkheid over moeten komen. Daarnaast wordt naar het belang van een mechanische verspreiding gekeken. De meeste bollen zijn nu geroid en kunnen in augustus worden getoetst. Daarna zullen de resultaten geanalyseerd kunnen worden.

Beperken van verspreiding van Tulpenmosaïekvirus in tulpen

In tulpen veroorzaakt het tulpenmosaïekvirus (TBV) van alle virussen de meeste directe (zichtbare schade en opbrengstverlies) en indirecte schade (keuringsmaatregelen, beheersingsmaatregelen, etcetera). Vooral in de gele (en witte) tulpencultivars is het virus steeds moeilijker onder controle te krijgen. De gele en witte tulpencultivars nemen ongeveer 1.350 hectare voor hun rekening van de circa 10.000 hectare tulpen. Percentages TBV van zes procent en hoger, waarbij virusbeheersing vrijwel onmogelijk is geworden, zijn geen uitzondering meer. Dit

heeft onder andere te maken met de schaalvergroting van bedrijven, waardoor er minder tijd en expertise beschikbaar is voor het ziekzoeken, de slechte of in tijd zeer beperkte zichtbaarheid van symptomen en mogelijk de grotere vatbaarheid van deze cultivars voor TBV.

Het verwijderen van virus(bron)planten in een partij levert het hoogste rendement op in de virusbestrijding: het viruspercentage kan daardoor worden verlaagd. Virusverspreiding kan worden beperkt door gebruik te maken van minder vatbare cultivars en bespuiting met bepaalde gewasbeschermingsmiddelen. Bij nadere analyse van het vluchtgedrag van bladluizen die het TBV in het veld overbrengen, en het koppen van tulpen zijn er nog aanvullende mogelijkheden om de virusverspreiding te beperken.

Het doel van het in 2005 gestarte onderzoek is de mate van virusverspreiding in het veld te beperken in het bijzonder bij de moeilijke, vooral gele tulpencultivars. Om dit te bereiken zijn de proeven gericht



Figuur 2. Bladluis op tulp.

op het bepalen van de mate van virusverspreiding bij de cvs. Yokohama en/of Strong Gold onder invloed van diverse teelthandelingen en –omstandigheden. Inmiddels zijn alle bollen van de proeven geroid en zullen over en aantal weken de bollen worden getoetst en kan de uitslag worden geanalyseerd en verwerkt.

Hostavirus X

Het Hostavirus X (HVX) kan symptomen geven in de vorm van vlekken/strepen op het blad. De consumenten die Hosta's verzamelen zijn erg beducht voor aangetaste planten. Hosta's is een van de belangrijkste producten voor vaste plantenexport naar Amerika en Canada (2004: circa twintig miljoen planten). Nederland wordt herhaaldelijk aangewezen als bron van besmette planten. Als het niet lukt om gezonde Hosta's te gaan leveren zal een belangrijker pijler onder de vaste plantenexport verdwijnen.

Het virus wordt, zover bekend, voornamelijk mechanisch

overgebracht en is bovendien zeer besmettelijk. Inzicht in het risico van de verschillende teelthandelingen met betrekking tot verspreiding van virus is nodig om verspreiding van het virus tegen te gaan. Juist het feit dat het virus kan voorkomen zonder symptomen te laten zien, maakt het extra belangrijk om de infectieroutes in kaart te hebben. Het onderzoek is in 2004 gestart en loopt dit jaar nog door. Van een aantal teelthandelingen is inmiddels vastgesteld dat er geen vi-

rusoverdracht plaatsvindt maar van andere teelthandelingen is dat nog niet duidelijk.

Beperken van virusverspreiding en invloeden op symptoomvorming door virussen in Zantedeschia

Zantedeschia is een gewas dat de laatste tien jaren sterk in opkomst is. De enorme uitbreiding van het areaal is mogelijk geworden door het gebruik van de knollen voor snijbloem- en potplantproductie. Voor de productie van snijbloemen en potplanten is een goede kwaliteit vereist. Enkele jaren geleden is de BKD op verzoek van het vak gestart met een keuring onder andere op zichtbaar virus. Virus kan een sterk negatieve invloed hebben op de kwaliteit door onder andere groeimisvorming en bloemkleurbreking. Sinds 2003 zijn de virusproblemen ondanks de keuring alleen maar groter geworden.



Figuur 3. Verspreidingsproef tulpenmozaïekvirus.

In het lopende onderzoek wordt gekeken naar een aantal aspecten zoals wat de bijdrage is aan de virusverspreiding van in de praktijk veel voorkomende afwijkingen in het spuit-schema, zoals bijvoorbeeld een tot drie weken na opkomst beginnen met spuiten (vanwege onregelmatige opkomst) of minder of geen minerale olie (maar nog wel pyrethroïde) spuiten tijdens de bloei (vanwege kwaliteitsverlies aan bloemen). Daarnaast wordt onderzocht wanneer en onder welke omstandigheden virus-symptomen zichtbaar worden. Daarbij wordt naar verschillende virussen gekeken bij planten gegroeid uit viruszieke knollen én bij planten met een primaire infectie (lopende jaarsinfectie). Ook wordt de invloed van grondsoort en het gebruik van een gibberelline-behandeling meegenomen in dit onderzoek. Eind augustus worden de planten getoetst en kunnen de gegevens geanalyseerd worden.

Identificatie van virussen in sieruien en beheersstrategieën

In *Allium giganteum*, de belangrijkste sierui die in Nederland geteeld wordt, komt een virusziekte voor met lichtgroene tot gele strepen op de bladeren, een kleinere bloeiwijze en/of een gedraaide bloemstengel. In eerder onderzoek werd de ziekte eerst geassocieerd met het uienmozaïekvi-

rus (uiengeelstreepvirus?) en later met verhoogde concentraties van het latent sjalottenvirus (SLV). Van vijftien partijen geteeld in verschillende regio's werden planten met en zonder symptomen in ELISA getoetst op de aanwezigheid van SLV, preigeelstreepvirus (LYSV) and potyvirusen. SLV was aanwezig in alle getoetste planten. In alle planten met een (streperig) mozaïek werd een potyvirus vastgesteld, dat niet aanwezig was in symptomloze planten. De aminozuurvolgorde van een gedeelte van het manteleiwit van dit virus vertoonde minder dan circa zestig procent overeenkomst met verwante potyvirusen, waaronder potyvirusen die in *Allium* soorten bekend zijn. Dit nieuwe potyvirus heeft sieruienstreepmozaïekvirus (OOSMV) als naam meegekregen. In planten met een ernstig streperig mozaïek, vaak in combinatie met necrotische strepen, werd naast het SLV and OOSMV ook nog het LYSV aangetoond. OOSMV werd ook steeds aangetoond in andere sieruien met een (streperig) mozaïek (vier van de zeven soorten en vier van de vijftien getoetste cultivars). Zeer waarschijnlijk komt er resistentie tegen OOSMV voor in een aantal soorten (bijv. *A. jesdianum* en *A. hirtifolium*) en cultivars. Dit biedt mogelijkheden voor veredeling op resistentie. In partijen met minder dan circa zes procent OOSMV kan het virus door ziekzoeken onder controle worden gehouden. In sommige gevallen zijn bespuitingen met pyrethroïde nodig ter ondersteuning.

Augustaziek

Augustaziekte is een virusziekte in tulpen, die wordt veroorzaakt door het tabaksnecrosevirus (TNV). In sommige jaren is de schade door deze ziekte aanzienlijk. Het virus wordt overgebracht door de bodemschimmel *Oplidium brassicae*.

Pepinomozaïekvirus

De laatste jaren heeft er heel veel onderzoek plaatsgevonden naar pepinomozaïekvirus in tomaat. Dit virus is in 1999 voor het eerst in de Nederlandse tomatenteelt waargenomen. Aanvankelijk werd gedacht dat het om een aantasting van aardappelvirus X ging maar dat was maar bij een deel van de bedrijven met problemen het geval. Het pepinomozaïekvirus heeft zich na de eerste aantasting enorm verspreid in zowel binnen- als buitenland. In eerste instantie is in het onderzoek gekeken om welk virus het precies ging (samenwerking PD, voormalig IPO en voormalig PBG), naar de wijze van verspreiding en de waardplantenreeks. In de loop van de tijd zijn daar meerdere aspecten bij gekomen zoals vatbaarheid van verschillende cultivars, teeltomstandigheden, verschillende isolaten en/of stammen van het virus en symptomontwikkeling. Zie het artikel voor meer informatie over pepinomozaïekvirus elders in dit nummer.

ARTIKEL

Fytoplasma's in siergewassen: een groeiend probleem?

Joop van Doorn, Miriam Lemmers, Khanh Pham, Bertus Meijer en Jelle Hiemstra

PPO Bollen, Bomen en Fruit, Lisse; joopvandoorn@wur.nl

Inleiding

Fytoplasma's zijn kleine (0,2-0,8 µm), bacterieachtige micro-organismen zonder celwand die leven in de zeefvaten van planten. Deze micro-organismen verspreiden zich op vergelijkbare wijze als virussen via zuigende insecten, meestal cicaden. Vermeerdering van fytoplasma's kan ook plaatsvinden in deze vectoren.

Bestudering van fytoplasma's in het laboratorium wordt sterk bemoeilijkt doordat deze niet *in vitro* kweekbaar zijn buiten de plant. De laatste jaren zijn berichten over gewassen met een fytoplasma in toenemende mate in het nieuws, vooral in houtige gewassen.

In 1994 werden deze micro-organismen (eerst bekend, analoog aan de in dierlijke cellen

voorkomende mycoplasma's als MLO's: Mycoplasma-Like Organisms) fytoplasma's genoemd. De symptomen die fytoplasma's veroorzaken in hun waardplanten variëren van geen (vaak zijn deze micro-organismen latent aanwezig), tot groene bloemen, heksenbezemgroei (proliferatie van scheuten), verkleuring van bladeren en verkorting van internodiën. Het effect op het gewas kan relatief mild zijn en leiden van verzwakking van het gewas tot grote opbrengstverliezen.

Via vegetatieve vermeerdering van gewassen zoals weefselkweek en het stekken van geïnfecteerde gewassen kan eveneens verspreiding plaatsvinden van deze micro-organismen. Fytoplasma's komen voor in veel belangrijke cultuurgewassen over de hele wereld: van siergewassen, groenten tot aan

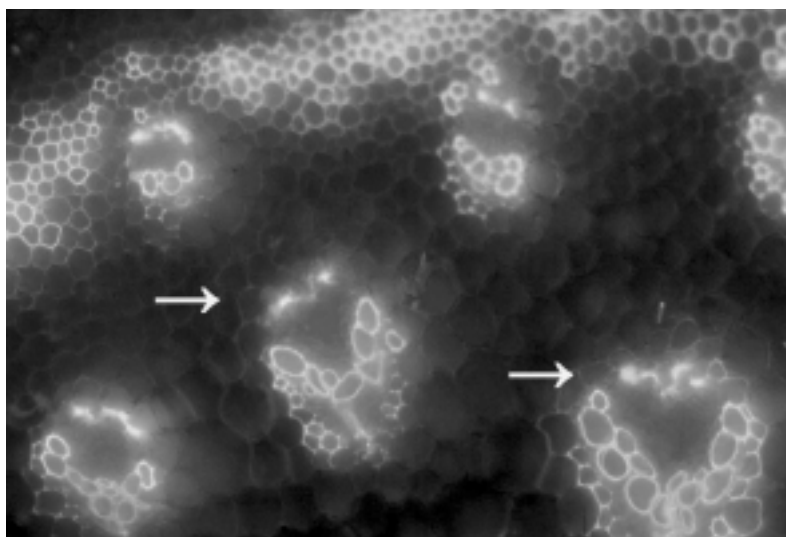
knolgewassen, fruit en andere houtige gewassen toe. Ook menginfecties komen voor; er zijn gewassen die waardplant zijn voor meerdere soorten fytoplasma's.

Voor sommige gewassen wordt fytoplasma niet als een ziekteverwekker, maar als een nuttig organisme gezien. Om mooiere (vollere en meer vertakte) Poinsettia's (Kerststerren) te produceren, enten telers jonge plantjes met fytoplasma geïnfecteerde takjes!

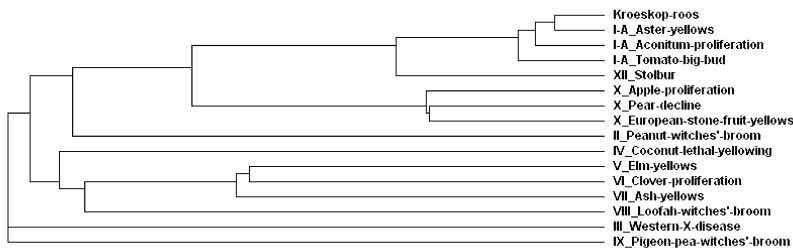
Identificatie en detectie van fytoplasma's

Daar fytoplasma's niet kweekbaar zijn, werden deze aanvankelijk alleen via aankleuren in coupes van plantmateriaal, en later ook via serologische technieken zoals immunodotblot en immunofluorescentie-microscopie aangetoond. Door kleuring van stengelcoupes van bv. gladiool met de fluorochromen 4'-6-Diamidino-2-fenylindole (DAPI, bindt aan dubbelstrengs DNA en berberinesulfaat (bindt aan RNA) zijn fytoplasma's goed zichtbaar te maken met behulp van fluorescentiemicroscopie (Hollinger 1984). Fytoplasma's lichten dan blauw-wit op (fig. 1).

Momenteel berust de identificatie van fytoplasma's, welke



Figuur 1. DAPI-kleuring van floeëm met fytoplasma's in gladiool. De pijltjes geven de fluorescerende fytoplasma's (blauw-wit) aan.



Figuur 2. Verwantschapsdiagram van een aantal groepen fytoplasma's, aangeduid met Romeinse cijfers, waaronder de soorten die roos (Aster Yellows) en peer (Pear Decline) aantasten.

taxonomische indeling nog gaande is, op verschillen in het 16 S rDNA. Hoewel de ribosomale DNA-sequentiever verschillen tussen de nu te onderscheiden soorten of groepen zeer klein zijn (minder dan drie procent) worden hiermee ongeveer veertien groepen onderscheiden (Lee, 2000). Een groep waar veel fytoplasma's toe behoren, is de Aster Yellows groep (16SI) die voornamelijk in Europa en Noord-Amerika wordt aangetroffen. De verwantschap tussen een aantal fytoplasmagroepen is weergegeven in Fig. 2. Identificatie berust enerzijds op restrictieanalyse van het ribosomale 16 S-gebied, anderzijds op directe sequentieanalyse van dit gebied. Voor diagnostische toepassing wordt vaak nested PCR gebruikt, waarbij de discriminerende primer in het groeps-specifieke variabele deel van het 16 S rDNA gebied ligt (Smart 1996). Momenteel zijn van twee fytoplasma's de totale genomesequenties bekend; het genoom van deze micro-organismen is 500 tot 1400 kb groot. Uit analyse van de genclusters bleek, dat genen verantwoordelijk voor de synthese van aminozuren of nucleotiden afwezig zijn, doordat fytoplasma's geen autonome organismen zijn maar afhankelijk zijn van de waardplant!

Een betrouwbare identificatie is noodzakelijk; er zijn bacteriesoorten zoals *Rhodococcus fascians* en *Pantoeae agglomerans*

die fytoplasma-achtige symptomen (heksenbezem-groei) kunnen veroorzaken. Verder bestaat er een risico dat er kruisreactie met bacteriën kan optreden bij toetsing op fytoplasma's met behulp van PCR (Skrzeczakowski, 2001).

Bestrijding

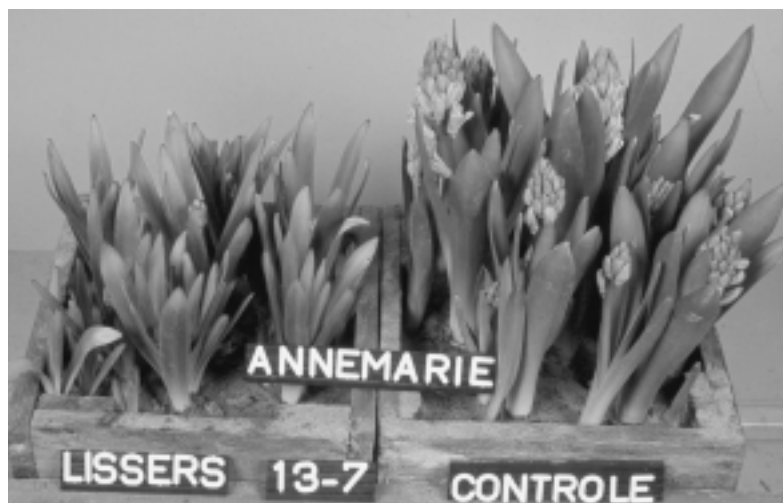
In de meeste gevallen betekent bestrijding van fytoplasma-aantasting en -verspreiding in gewassen het bestrijden van de vector; de cicaden. Om gewassen te 'genezen' van fytoplasma-aantastingen is toepassing van warmtebehandelingen een oplossing, indien de plant hier tegen kan. Bij gladiolen is het goed mogelijk om de knollen, kralen of pitten via een warmwaterbehandeling van een uur 51 °C vrij te maken van de heksenbezem-vergelingsziekte. Ook

zijn in het verleden antibiotica toegepast om de ziekteontwikkeling van dit bacterieachtige organisme te onderdrukken.

Problemen in bloembolgewassen

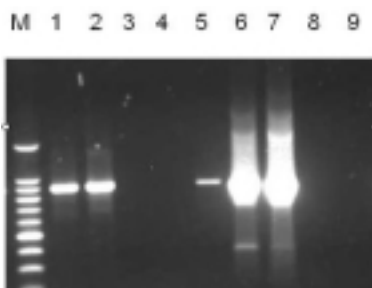
In de jaren zestig van de vorige eeuw werden afwijkingen gevonden in gladiool en ook hyacint ('Lissers', Fig. 3) die niet aan bacteriën konden worden toegeschreven (Asjes, 1983; Groen, 1974). Ook zijn er meldingen van 'mycoplasma-achtige' organismen in narcis, en recent ook in lelie (Bertacinni, 2005). In hyacint zijn de secundaire symptomen (symptomen na opplant van de bollen) groeiachterstand van de plant, een afwijkende lichtgroene bladkleur (chlorosis) en abnormale of (aan de top) zelfs afwezigheid van nagels in de bloeiwijze. Verbreking van de apicale dominantie van de planten was zichtbaar en de wortelgroei was dan vaak slecht en soms zelfs afwezig. Via DAPI-kleuring zijn fytoplasma's in dit bolgewas slecht of niet aantoonbaar als gevolg van storing door secundaire metabolieten ('slijm').

Sequentieanalyse van het met



Figuur 3. "Lissers" in hyacint.

ARTIKEL



Figuur 4. Nested PCR, uitgevoerd bij roos. De lanen 1, 2 en 5 zijn monsters van roos met fytoplasma; 3 en 4 zijn gezond. Positieve controles: lanen 6 en 7.

algemene primers geamplificeerde 16 S rDNA-gebied wees uit, dat het hier gaat om een lid van de subgroep 16SrI-A van de subgroep 16SrI (de Aster Yellows groep). In hyacinten, afkomstig uit Litouwen is een isolaat aangetroffen, behorende tot subgroep 16SrI-B.

Voor detectie van fytoplasma's in hyacint wordt een gevoelige nested PCR gebruikt.

Bij gladiool komen van oudsher fytoplasma's voor. De uitgroei van de top is kenmerkend voor deze infectie: heksenbezem-vergelingsziekte. Vergeling is zichtbaar in het eerset jaar, heksenbezemgroei in het tweede jaar. Een test op aanwezigheid van fytoplasma was ook een DAPI-kleuring van de zeefvaten. Via PCR is gevoelig vast te stellen, of fytoplasma's aanwezig zijn.

Roos

In de teelt van struikrozen doet zich sinds eind 1950 het verschijnsel 'kroeskoppen' voor: misvormde groeischeuten en bladeren die ontstaan na uitlopen van inoculaties. Deze gewasschade is ook gerapporteerd uit Frankrijk, Engeland, Polen, Australië en Californië. De schade in Nederland fluctueert, maar in het voorjaar van

2000, en ook 2002 was de geschatte schade tussen drie en vijf miljoen afgestorven of niet-goed groeiende planten, goed voor ongeveer 1,5 miljoen euro op jaarbasis.

Na inventarisatie en analyse van monsters uit rozen van rosaria en aangetaste stamrozen bleek een fytoplasma aanwezig te zijn. Toetsing van houtige gewassen kan lastig zijn; niet altijd werd fytoplasma gevonden in ogenschijnlijk ziek materiaal. Via nested PCR, uitgevoerd bij PPO Lisse, kon in de loop van 2005 betrouwbaar getoetst worden op aanwezigheid van dit organisme. Veel monsters van scheuten van onderstammen en uitgangsmateriaal zoals zaailingen en ent-hout zijn getoetst. Vervolgonderzoek richt zich momenteel op de ontwikkeling van een robuust en gevoelig detectieprotocol, inventarisatie van het voorkomen van fytoplasma's binnen het sortiment roos (typen, percentage enz.) en het zoeken naar mogelijkheden tot preventie en remediering (onder andere, warmtebehandeling van zaad en entmateriaal).

Bomen: peer en kastanje

De kastanjeziekte houdt de gemoederen behoorlijk bezig. De werkgroep Esculaap heeft, in opdracht van LNV, onderzoek gecoördineerd betreffende de mogelijke veroorzaker van deze aantasting (het bloeden en afsterven van kastanjabomen door vrijwel heel Nederland) en bestudering van het ziekteproces, fysiologische effecten en mogelijkheden tot beheersing. De vermoedelijke veroorzaker is een *Pseudomonas syringae* pathovar. Bij de analyse van DNA-monsters, bemonsterd van een groot aantal zie-

ke en mogelijk zieke kastanjabomen op vier plaatsen in Nederland bleek, na toetsing in PCR, in ongeveer dertig procent ook fytoplasma aanwezig, hoewel typische heksenbezemachtige symptomen ontbraken. Vaak waren deze DNA-monsters ook positief voor *Pseudomonas syringae*. Of er een correlatie bestaat tussen deze twee pathogenen is nog niet onderzocht. Mogelijk zijn deze kastanjes verzwakt door virussen of fytoplasma's, en daardoor gevoeliger voor allerlei infecties. Sequentieanalyse van de gevonden fytoplasma's wees uit, dat het gaat om het type Aster Yellows. Vervolgonderzoek moet uitwijzen, wat de invloed van deze micro-organismen is op de conditie van de bomen, en het gevolg hiervan op verdere aantasting door allerlei andere pathogene organismen.

In *Pyrus* (peer) is aftakelingsziekte (Pear Decline) een algemeen voorkomende aantasting. Zowel vruchtbomen en onderstammen, als ook laanbomen (sierpeer) kunnen worden aangetast. Er is geconstateerd, dat de laatste jaren deze aantasting steeds verder toeneemt. Pear Decline wordt veroorzaakt door een fytoplasma, behorende tot de Aster Yellows-groep. De vector is bekend; dit is de peregbladvlo (*Psylla pyrifolia*). Het fytoplasma kan zich vermeerderen in de bladvlo. Aangezien jaarlijks meerdere generaties van dit insect voorkomen, is duidelijk dat Pear Decline een grote overlevings- en verspreidingskans heeft. Pear Decline kan ook via mechanische weg zoals via inoculatie en enthout worden overgebracht.

Symptomen van Pear Decline zijn opgekruld blad, roodverkleurde topscheuten en gereduceerde groei van de boom.

Uiting van de symptomen is wisselend; vooral in hete, droge zomers zijn symptomen waarneembaar. Aangetaste perelaars produceren beduidend kleinere vruchten. Pear Decline is een quarantaineziekte. Daar goede gegevens ontbreken ten aanzien van de omvang van het probleem en de risicofactoren betreffende verdere verspreiding en toename van de aantasting zal een onderzoek worden gestart bij PPO Bollen, Bomen en Fruit.

Verder onderzoek

De wetenschappelijke literatuur staat de laatste jaren vol meldingen van nieuwe vondsten en meldingen van fytoplasma's in allerlei (nieuwe) waardplanten. Vooral in fruitbomen in Zuid-Europa is het probleem aanzienlijk. Door de verbeterde aantoonbaarheid door moleculaire technieken blijkt deze ziekte alom aanwezig. Kwantificering van fytoplasma's in de waardplant zal inzicht kunnen verschaffen in

de relatie met de ontwikkeling van zichtbare symptomen. Hoewel de taxonomische indeling van fytoplasma's, gebaseerd op ribosomale sequenties, geschikt lijkt, moeten de hierop gebaseerde identificatietechnieken verder ontwikkeld worden, daar er kans bestaat op kruisreactie met andere (endofytische) bacteriën. Tot slot: voor onderzoekdoeleinden is de beschikking over een collectie van ziek materiaal met (de niet-kweekbare) fytoplasma's zeer wenselijk.

Referenties

- Asjes, C. 1983. Mycoplasma-like organisms in Gladiolus and hyacinths. *Exotic Plant Quarantine Pests and Procedures for Introduction of Plant Materials* **1**, p. 273-280
- Bertaccini, A., J. Franova, S. Botti and D. Tabanelli 2005. Molecular characterization of phytoplasmas in lilies with fasciation in the Czech Republic. *FEMS Microbiol. Letters* **249**: 79-85.
- Christensen NM, KB Axelsen, M Nicolaisen, and A Schulz 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science* **10**: 526-535
- Groen NPA, en DHM van Slogteren. 1974. Symptomen en bestrijding van vergelings-heksenbezemziekte bij gladiolen. *Praktijkmededeling* **41**: 1-17.
- <http://www.kastanjeziekte.wur.nl/eindrapport%20aesculaap.pdf>
- Hollinger Th en AFLM Derks 1984. Het aantonen van mycoplasma's in gladiolen. *Gewasbescherming* **15**(6): 179-183
- Kaminska M., H.Sliwa, T. Malinowski, and Cz. Skrzypczak 2003. The association of Aster Yellows phytoplasma with rose dieback disease in Poland. *J. Phytopathol.* **151**: 469-476.
- Lee, I-M., R. E. Davis, and D. E. Gundersen-Rindal. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 221-255.
- Meijer B 2005. Kroeskop-mysterie stap verder ontrafeld. *De Boomkwekerij* **40**: 12-13
- Lee ME., CR Grau, LA Lukaesko, and I-M Lee 2002. Identification of aster yellows phytoplasmas in soybean in Wisconsin based on RFLP analysis of PCR-amplified products (16S rDNAs). *Can. J. Plant Pathol.* **24**: 125-130.
- Seemüller E., and B. Schneider 2004. 'Candidatus phytoplasma mali', 'Candidatus phytoplasma pyri' and 'Candidatus phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1217-1226.
- Skrzeczowski, L.J., W. E. Howell, K.C. Eastwell, T.D. Cavileer, Bacterial sequences interfering in detection of phytoplasma by PCR using primers derived from the ribosomal RNA operon, *Acta Hort.* **550**, ISHS 2001.
- Smart CD, B Schneider CL Blomquist, LJ Guerra, NA Harrison, U Ahrens, KH Lorenz, E Seemüller, and BC Kirkpatrick 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 2988-2993.

Virussen en Naktuinbouw

Ellis Meekes, Harrie Koenraadt en Gerard Jongedijk

Naktuinbouw, Postbus 40, 2370 AA Roelofarendsveen. E-mail: e.meekes@naktuinbouw.nl

Inleiding

Naktuinbouw staat voor Nederlandse Algemene Kwaliteitsdienst Tuinbouw. Zij bevordert en bewaakt de kwaliteit van producten, processen en ketens in de tuinbouw, en is met name gericht op teeltmateriaal. Het is een privaatrechtelijk Zelfstandig Bestuursorgaan (ZBO), dat onder toezicht van het ministerie van LNV uitvoering geeft aan de Zaaizaad- en Plantgoedwet en aan Europese regelgeving met betrekking tot teeltmateriaal. Daarnaast is Naktuinbouw in Nederland als enige bevoegd om kweekprodukten van groente-, landbouw- en sierteeltgewassen te beoordelen voor registratie of ter verkrijging van kwekersrecht. Haar activiteiten bestrijken de groente-, de bloemisterij- en de boomkwekerijsectoren.

Naktuinbouw voert in het kader van haar wettelijke taken standaardinspecties uit bij ongeveer vierduizend geregistreerde bedrijven. Door het uitvoeren van regelmatige bedrijfsbezoeken en steekproeven controleren keurmeesters raszuiverheid, rasechtheid, gezondheid en uitwendige kwaliteit en de administratie van het teeltmateriaal. Ook worden er administratieve controles op documenten uitgevoerd. Standaardmateriaal dat voldoet aan de minimum eisen - die de Europese Unie en de Nederlandse wetgever daarvoor hebben vastgesteld - mag verhandeld worden. Voor plantgezondheid betekent dit veelal dat het gewas 'visueel gezond' moet zijn.

Naast deze standaardkeuring kunnen veredelaars en vermeerderders in de verschillende sectoren, op vrijwillige basis, meedoen aan kwaliteits-*plus* systemen, zoals Naktuinbouw-Elite® en Select Plant®.

Naktuinbouw houdt zich niet alleen bezig met wettelijke taken, maar biedt de nationale en internationale tuinbouwsector een breed pakket van diensten aan, bijvoorbeeld op het gebied van detectie van ziekten en plagen. Het gaat hier om diensten, die in het verlengde liggen van de wettelijke taken die Naktuinbouw al heeft.

Laboratoria

Ter ondersteuning van haar activiteiten beschikt Naktuinbouw over verschillende laboratoria. In de eerste plaats is er in Roelofarendsveen een gezondheidslaboratorium, waar onder meer serologische en moleculaire methoden worden aangewend voor de detectie van virussen, bacteriën en schimmels. Daar is ook een zaadanalyselaboratorium, waar bovendien grond en plantmateriaal op de aanwezigheid van aaltjes kan worden onderzocht. In Horst staat het Toetscentrum, waar biotoetsen worden uitgevoerd en waar virusvrij materiaal van fruitgewassen wordt geproduceerd. De diagnostische service (Diagnoster®) ondersteunt de praktijk bij het opsporen van de oorzaken van problemen in de teelt.

Virusziekten spelen in alle tuinbouwsectoren een rol. Hoe belangrijk virusziekten zijn, is afhankelijk van de vermeerderingswijze. Per sector wordt dit onderstaand verder uitgediept.

Sierteelt

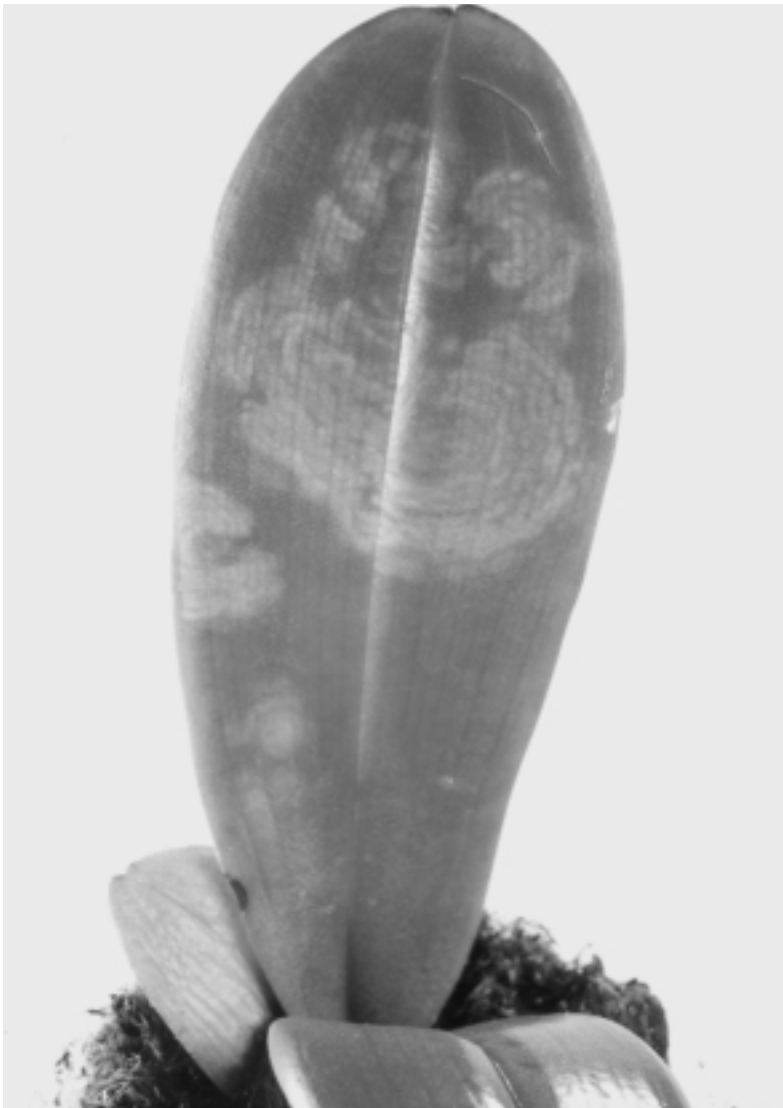
Siergewassen worden steeds vaker vegetatief vermeerderd. Dit gebeurt door bijvoorbeeld door middel van weefselkweek, door het nemen van stekken of het scheuren van planten. Hierdoor kan een snelle vermeerdering plaatsvinden en blijven genetische eigenschappen behouden. Het nadeel is echter dat de virussen die in de moederplant aanwezig zijn, ook in het teeltmateriaal terug te vinden zullen zijn.

De variatie binnen de sierteeltsector is groot. Binnen de sector wordt uitgangsmateriaal geproduceerd voor snijbloemen, perkplanten, potplanten en vaste planten. Zo zijn de afgelopen jaren gewassen uit circa 65 families (>200 geslachten) monsters getoetst op meer dan negentig verschillende virussen. Naast virussen met een brede waardplantreeks als komkommermozaïekvirus (CMV) en tabaksmozaïekvirus (TMV, figuur 1), hebben veel gewassen hun eigen specifieke virussen. Voorbeelden hiervan zijn anjervlekkenvirus (CarMV) en anjer-etsvirus (CERV) in anjer, freesiamozaïekvirus (FreMV) in freesia, *Hosta*-virus X in *Hosta* (HVX), *Cymbidium*-kringvlekkenvirus (CymMV) en *Odontoglossum*-kringvlekkenvirus.

virus (ORSV, figuur 2) in orchideeën. Elk jaar komen er nieuwe gewassen bij en elk jaar worden er nieuwe virussen ontdekt die een bedreiging kunnen vormen voor een teelt. Verder is de sector onderhevig aan trends, zo waren een aantal jaar geleden anjer en freesia belangrijke gewassen, nu komen orchideeën sterk op. Virussen kunnen symptomeloos in een plant voorkomen of pas laat tot uiting komen. In het eerste geval voldoet het materiaal aan de eisen van de basisinspectie. Toch kan het van belang zijn om deze latente besmettingen te voorkomen en uit te bannen. Een virus dat



Figuur 1. *Calibrachoa* met kringvlekken veroorzaakt door een menginfectie van tabaksmozaïekvirus (TMV) en *Calibrachoa mottle virus* (CbMV).



Figuur 2. *Phalaenopsis* met kringvlekken veroorzaakt door *Odontoglossum-kringvlekkenvirus* (ORSV).

bij het ene gewas geen symptomen veroorzaakt kan bij een ander gewas of cultivar versprekkende gevolgen hebben, temeer omdat er veel verschillende gewassen in een kas bij elkaar kunnen staan.

Wanneer kwekers op grote schaal (laten) bemonsteren en toetsen, bijvoorbeeld bij freesiamozaïekvirus, spelen prijs en snelheid van de toets een belangrijke rol. Om die reden wordt (nog steeds) vaak ELISA ingezet; de doorlooptijd is enkele dagen en de prijs is laag in vergelijking met die van andere technieken. Moleculaire technieken worden ingezet voor bevestiging, wanneer er een grotere gevoeligheid wordt vereist of wanneer er geen antiserum beschikbaar is. Dat laatste zal steeds vaker een rol gaan spelen. Het is namelijk niet rendabel om antiserum te produceren voor virussen met een beperkte waardplantreeks die voorkomen in kleine gewasgroepen. Binnen certificeringsprogramma's wordt gebruik gemaakt van toetsplantenonderzoek. Van nieuwe gewassen is namelijk vaak niet bekend wat voor virussen erin voor kunnen komen. Toets-



Figuur 3. Symptomen van appelhoutputjesvirus ('stenigheid', ASPV) in peer.

plantenonderzoek funktioneert als een soort vangnet voor onbekende (en bekende) virussen die mechanisch overdraagbaar zijn.

Boomkwekerij

Virussen spelen een grote rol in de professionele fruitteelt. Om die reden starten telers graag met virusvrij gecertificeerd materiaal. Voor de fruitteeler zijn vooral die virussen van belang, die negatieve invloed hebben op de kilogramproductie en op de kwaliteit van de vruchten. Een goed voorbeeld van een dergelijk virus is het appelhoutputjesvirus (ASPV), dat met name in peer flinke schade kan geven (zie figuur 3).

Vrijwel alle fruitgewassen worden vegetatief vermeerderd. Dit gebeurt door enten of oculeren op onderstammen, die zelf ook vegetatief worden vermeerderd door afleggen of stekken. In een dergelijke teelt kunnen virussen zich razendsnel met het voortkweekingsmateriaal verspreiden. Naktuinbouw toetst uitgangsmateriaal voor vrucht-

boomkwekers en produceert virusvrij materiaal door middel van warmtebehandeling.

Voor het overgrote deel van de virussen in fruit bestaat nog geen serologische of moleculaire detectiemethode en is men aangewezen op traditionele enttechnieken op houtige indicatoren die in de kas of in het veld worden geplant. Dergelijke toetsingen duren een tot enkele jaren. De behoefte aan alternatieve methoden is groot en gelukkig zijn er de afgelopen jaren voor een aantal virussen moleculaire technieken beschreven, waarmee veel sneller kan worden getoetst. Voorbeeld hiervan zijn PCR's voor appelhexenbezemfytoplasma, pruimensharkavirus (PPV) en virussen in appel. Sinds de komst van PCR kan visuele keuring effectief worden ondersteund en kunnen nieuwe rassen bij introductie in het vermeerderingssysteem snel worden gescreend.

Groente

Voor de vermeerdering van groenten worden vooral zaden gebruikt. In tegenstelling tot

vegetatief vermeerderd materiaal is het aantal virussen dat voor problemen in uitgangsmateriaal van groenten zorgt relatief klein. De meeste virussen zijn namelijk niet zaadoverdraagbaar. Zaadtransmissie kan vastgesteld worden in zogenaamde uitgroeioproeven, maar deze zijn vaak langdurig en kostbaar.

ELISA wordt gebruikt voor de detectie van bijvoorbeeld sla-mozaïekvirus (LMV), erwtenrolmozaïekvirus (PSbMV) en pompoenenmozaïekvirus (SqMV) in zaden. Voor deze virussen is behandeling van zaden geen optie, omdat de virusdeeltjes relatief stabiel zijn, en inwendig - in het embryo - zijn gelokaliseerd en daardoor onbereikbaar zijn voor ont-smettingsmiddelen.

Ook verschillende tobamovirussen [paprikamozaïekvirus (PMMV), tomatenmozaïekvirus (ToMV) en TMV] kunnen overgaan met zaad. Omdat deze virussen, en ook pepinomozaïekvirus (PepMV, een potexvirus), in en op de zaadhuid gelokaliseerd zijn is ontsmetting vaak wel mogelijk. Om de effectiviteit van de zaadbehandeling te bepalen wordt er vaak gebruik gemaakt van bio-toetsen, om onderscheid te kunnen maken tussen infectieus en niet-infectieus virus.

Aardbei vormt een uitzondering, aangezien teeltmateriaal vrijwel uitsluitend vegetatief vermeerderd wordt. In Nederland worden op grote schaal vegetatief vermeerderde, gecertificeerde aardbeiplanten geproduceerd. Binnen het certificeringssysteem worden door Naktuinbouw virustoetsingen verricht, vooral in de top van het systeem, in zogenaamd SEE materiaal. Veel van de virussen kunnen alleen met bio-toetsen (bijvoorbeeld bladen-

tingen op indicatoren) worden aangetoond. De laatste jaren zijn er PCR's beschreven voor een aantal bladluisoverdraagbare virussen van aardbei. Deze zullen de komende jaren ook door Naktuinbouw worden toegepast.

Onderzoek

Naktuinbouw beschikt over een team onderzoekers, dat zich vooral richt op de ontwikkeling van detectiemethoden. Het accent ligt op de gewassen die binnen het werkgebied van

Naktuinbouw vallen. Wetenschappelijke ontwikkelingen worden gevolgd en methoden, veelal uitgetest onder onderzoeksomstandigheden, worden geschikt gemaakt voor toepassing in de praktijk. Dit betekent dat een dergelijke methode wordt opgeschaald en dat er een validatietraject wordt ingezet. Daarnaast worden ook methoden in eigen huis ontwikkeld. Een belangrijke taak voor de onderzoekers is bovendien, de verschillende uitvoerende laboratoria en de keuringsafdelingen van Naktuinbouw technisch en wetenschappelijk te ondersteunen.

Tot slot

Virussen zijn voor vegetatief vermeerderd teeltmateriaal de belangrijkste pathogenen. Onderzoek naar detectiemethoden en methoden van verspreiding om zo virussen te kunnen voorkomen en uit te bannen, zijn voor de sectoren die Naktuinbouw vertegenwoordigd van essentieel belang. Dit onderzoek is noodzakelijk om de gezondheid van de uitgangproducten en daarmee samenhangend de goede naam van het Nederlandse teeltmateriaal te kunnen bewaken en bevorderen.

ARTIKEL

Bladluizen en Aardappelvirus Y: op weg naar meer begrip

G.W. van den Bovenkamp en A. Stolte

Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor zaaizaad en pootgoed van Landbouwgewassen (NAK), gbovenkamp@nak.nl

Zoals de naam aangeeft, houdt de Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor zaaizaad en pootgoed van Landbouwgewassen (NAK) zich, als onafhankelijke keuringsinstelling, voor een belangrijk deel bezig met de kwaliteitsbewaking van zaaizaad en pootaardappelen. De NAK vervult deze wettelijke taak in opdracht en onder toezicht van de Minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV). NAK AGRO, daarentegen, voert als volle dochter van de NAK alle niet wettelijk voorgeschreven inspectie- en analysewerkzaamheden uit. Voorbeelden daarvan zijn voedselveiligheids- en EurepGAP-inspecties, aardappelmoeheidonderzoek, Erwinia-onderzoek en bruin- en ringrotonderzoek.

Als onderdeel van zijn wettelijke taak neemt de NAK per jaar ongeveer 38.000 hectare pootaardappelen (basispootgoed en gecertificeerd pootgoed) in keuring en 35.000 hectare granen en grassen. Om de vastgestelde klasse te kunnen behouden, worden percelen pootaardappelen minimaal twee keer per seizoen door keurmeesters van de NAK te velde gecontroleerd op het vóórkomen van virus- en bac-

terieziekten. Het aardappelvirus Y (PVY) is daarbij de belangrijkste virusziekte. Wanneer het perceel niet aan bepaalde normen voor virusziek voldoet, volgt declassering naar een lagere klasse of zelfs afkeuring voor het gebruik als pootaardappelen.

De beheersing van virusziek in pootaardappelen is – naast bladluisbestrijding en selectie door de teler – gebaseerd op

een systeem van vroegtijdige loofdoding. Groepsgewijze loofdodingsdata voor verschillende rassen en klassen pootaardappelen, en voor verschillende regio's in Nederland, worden door de NAK mede vastgesteld aan de hand van dagelijkse bladluisvangsten in een drietal hoge zuigvallen. Ook staan er zo'n veertig gele vangbakken, verspreid over alle belangrijke pootaardappelgebieden in Nederland. Eenvoudig gezegd: wanneer de zomervluchten van de bladluizen in een bepaalde regio op gang komen, dient tien tot veertien dagen later het loof van de pootaardappelen daar dood te zijn zodat het virus de knol niet meer bereikt. Dit systeem wordt verder verfijnd door per regio en resistentiegroep zowel adviesdata als einddata vast te stellen. Wanneer de teler het loof dood heeft vóór de adviesdatum kan hij, voor de lagere

Tabel 1: Relatieve efficiency factoren (REF's) van de elf meest efficiënte aardappelvirus Y^N-vectoren (*Myzus persicae* = 1,0)

Latijnse naam	Nederlandse naam REF-waarden *	NAK standaard REF-waarden**	NAK schaduw
<i>Myzus persicae</i>	Groene perzikluis	1,00	1,00
<i>Myzus certus</i>	Bruine violenluis	0,44	0,50
<i>Aphis nasturtii</i>	Wegedoornluis	0,42	0,40
<i>Aphis frangulae</i>	Vuilboomluis	0,42	0,40
<i>Phorodon humuli</i>	Hopluis	0,15	0,25
<i>Aphis fabae</i>	Zwarte bonenluis	0,10	0,10
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Aardappeltopluis	0,10	0,20
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Erwttenbladluis	0,05	0,15
<i>Rhopalosiphum spp.</i>	Grasluis spp.	0,03	0,20
<i>Brachycaudus helichrysi</i>	Groene kortstaartluis	0,01	0,25
<i>Metopolophium dirhodum</i>	Roos-Grasluis	0,01	0,10

* naar: van Harten (1983) en De Bokx & Piron (1990)

** samengesteld door NAK op basis van literatuuronderzoek

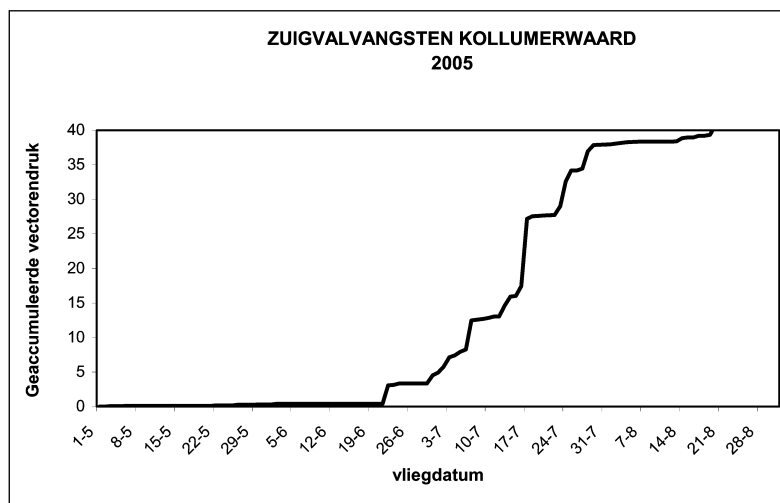
ARTIKEL

klassen van het pootgoed, in de regel ontheffing van de zogenaamde nacontroletest krijgen (zie verder onder Nacontroleonderzoek). Overschrijdt hij de einddatum dan leidt dit automatisch tot declassering. Hoge zuigvallen van de NAK staan in Zeeland, in de Noordoostpolder en in het Lauwersmeergebied.

Relatieve efficiency factoren (REF's)

Om een objectieve maat te vinden voor het vaststellen van loofdodingsdata is, in het verleden, onderzoek gedaan naar de efficiency waarmee verschillende bladluisoorten PVY kunnen overbrengen (van Harten, 1983; de Bokx & Piron, 1990). Daarbij richtte het onderzoek zich voornamelijk op PVY^N: de destijds belangrijkste stam van het Y-virus in Nederland. Door de waarde van de meest efficiënte overbrenger (vector) van PVY^N (*Myzus persicae*: de groene perzikluis) op één te stellen, en alle andere efficiency waarden aan *M. persicae* te relateren, ontstaat een systeem van relatieve efficiency factoren (REF's).

De NAK gebruikt de REF's van de elf meest efficiënte PVY^N-vectoren (tabel 1) voor het bepalen van zijn loofdodingsdata. Door de aantallen in de zuigval gevangen PVY^N-vectoren te vermenigvuldigen met hun respectievelijke REF's, en ze vervolgens – van dag tot dag – bij elkaar op te tellen, ontstaat een geaccumuleerde vectorendruk voor het gebied dat gerepresenteerd wordt door de betrokken zuigval. Via een grafiek wordt deze geaccumuleerde vectorendruk zichtbaar gemaakt. Een sterke stijging van de grafieklijn, samen met de eveneens dagelijks verzamelde



Figuur 1. Geaccumuleerde vectorendruk van 11 soorten bladluizen die het aardappelvirus Y kunnen overbrengen. Hoge zuigval Kollumerwaard, 2005.

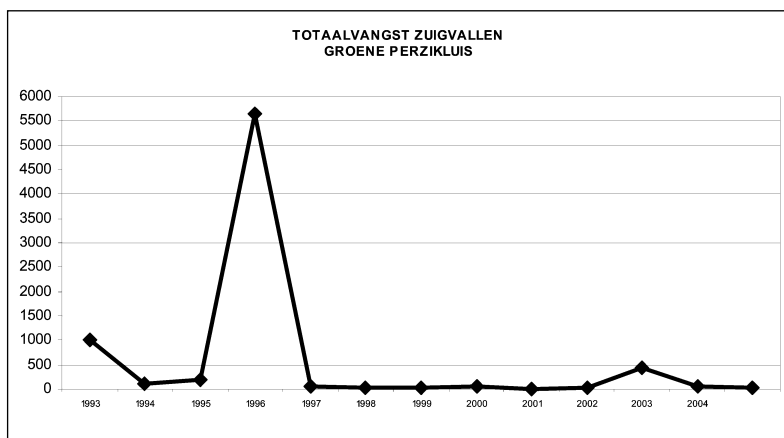
gegevens van de gele vangbakken, vormt een belangrijk hulpmiddel bij het vaststellen van de advies- en einddata. Figuur 1 toont het geaccumuleerde verloop van de elf meest efficiënte PVY^N-vectoren in 2005 in het noorden van het land.

Nacontroleonderzoek

Belangrijkste hulpmiddel voor de NAK bij het vaststellen van de virusbesmetting in percelen pootaardappelen is de veldinspectie door de keurmeester. Daarbij wordt een complete indruk verkregen van het gehele perceel. Om echter een extra waarborg in te bouwen worden, na de oogst, bepaalde klassen en resistentiegroepen alsnog in het laboratorium onderzocht. Immers: een late, primaire infectie zal niet meer tijdig zichtbaar worden in het loof terwijl de knollen al wel besmet kunnen zijn. Verder bestaan er symptomloze rassen die het virus in het veld niet of matig tonen, en ook een kwalitatief slechte loofdoding (hergroei van de aardappelplanten) kan alsnog tot aanzienlijke knolbesmettingen leiden. Tij-

dens dit zogenaamde nacontroleonderzoek wordt al het pootgoed van de klassen S en SE met Elisa onderzocht op PVY (alle stammen), de aardappelvirussen X en S en het aardappelvirus A (alleen voor die rassen welke een lage resistentie tegen dit laatste virus hebben). Tot 2002 werd al dit materiaal ook nog onderzocht op het aardappelbladrolvirus (PLRV). Afhankelijk van de virus- en bladluissituatie kan pootgoed van de klassen E, A en C worden vrijgesteld van het nacontroleonderzoek, mits het loof vóór de betreffende adviesdatum is doodgemaakt. Percelen pootaardappelen waarvan het loof na de adviesdatum wordt doodgemaakt komen niet in aanmerking voor vrijstelling van de nacontrole. Te hoge percentages virusziekte tijdens de nacontrole leiden altijd tot declassering of afkeuring van het betrokken pootgoed.

Gemiddeld onderzoekt de NAK per jaar tijdens de nacontrole, binnen een periode van zes maanden, 13.000 partijen pootaardappelen op verschillende aardappelvirussen. Dat zijn drie miljoen knollen en zo'n 1,5 miljoen Elisa-reacties.



Figuur 2. Aantallen groene perzikluizen (*Myzus persicae*) per vangseizoen. Som van drie hoge zuigvallen.

Aan vrijwillig onderzoek voor NAK AGRO komt daar jaarlijks nog eens een half miljoen Elisa-reacties bij.

Veranderingen

Door dit alles beschikt de NAK over langjarige reeksen cijfers betreffende zowel het optreden van bepaalde bladluissoorten in het veld als het vóórkomen van PVY (en andere virussen) tijdens de nacontrole.

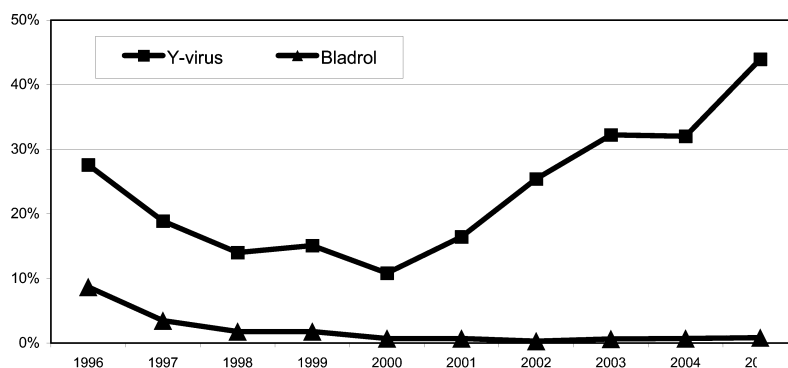
Uit de gegevens van de hoge zuigvallen (figuur 2) blijkt dat de groene perzikluis (*Myzus persicae*) sinds 1996 sterk is afgenomen. Dat beeld wordt bevestigd door de resultaten van de gele vangbakken, alhoewel de vangsten daar vanaf 2003 toch weer wat hoger liggen dan in de jaren ervoor. De groene perzikluis werd in het verleden als de belangrijkste en efficiëntste overbrenger van PVY^N beschouwd (van Harten 1983). Toch neemt het percentage met PVY besmette percelen, na een aanvankelijke afname eind jaren negentig van de vorige eeuw, sinds 2000 in het nacontroleonderzoek weer sterk toe (figuur 3). Deze toename van de virusbesmettingen kan, indachtig de afname van de groe-

ne perzikluis, niet goed verklaard worden. Ook uit de gegevens van de andere tien gemonitorde PVY^N-vectoren komt geen duidelijke kandidaat naar voren die de rol van de groene perzikluis, als belangrijkste overbrenger, kan hebben overgenomen. Het aardappelbladrolvirus, dat op persistente wijze door bladluizen wordt overgebracht, lijkt samen met de groene perzikluis zo goed als verdwenen (figuur 3).

De toename van het percentage met PVY besmette percelen tijdens de nacontrole, plus de afname van de belangrijkste vector (*Myzus persicae*) in het veld, roept de vraag op of er wijzigingen zijn opgetreden in de samenstelling van de groep luizensoorten die PVY overbrengt. Het veranderende kli-

maat zou daarbij een rol kunnen spelen. Ook is het mogelijk dat bepaalde, reeds bekende bladluissoorten ondertussen efficiëntere virusvectoren zijn geworden dan in het verleden (veranderde REF-waarden). Op basis van verspreide, soms fragmentarische, literatuur uit ons omringende landen heeft de NAK al eens een nieuwe set REF-waarden afgeleid (tabel 1). Schaduwtellingen op basis van deze alternatieve set laten zien dat de grafiek van de geaccumuleerde vectorendruk soms eerder tot het vaststellen van advies- en einddata zou leiden dan bij het hanteren van de standaardset.

En tenslotte kun je je ook afvragen of het virus veranderd is. Van PVY kennen we, sinds de jaren vijftig van de vorige eeuw, verschillende stammen in Nederland: PVY^O, PVY^C en PVY^N. Landelijke surveys van de NAK in 1999 en 2000 lieten zien dat PVY^C in Nederland op dat moment zo goed als verdwenen was. Ondertussen blijkt uit onderzoek van derden (Glais et al., 2002; Singh et al., 2003; Kerlan, 2004) dat PVY^O en PVY^N regelmatig recombineren: zo hebben we in Nederland ondertussen ook te maken met PVY^{NTN}. Deze PVY-stam kan bij bepaalde rassen aardappelen, vooral bij hogere zomertemperaturen, knolnecroses veroorzaken. Of



Figuur 3. Nacontroleonderzoek: percentage percelen besmet met virus.

PVY^{NW}, een andere in Europa (Polen, Duitsland, Frankrijk, Spanje) vastgestelde PVY^{NO}-recombinant, ook in Nederland voorkomt is niet bekend. Mogelijk speelt ook deze laatste PVY-stam een rol in het virus/bladluis-complex waar de Nederlandse pootaardappelteler tegenwoordig mee te maken heeft. PVY^{NW} zou overigens (net als PVY^{NTN}) tijdens de nacontrole wel door de NAK als 'PVY' gedetecteerd worden, maar wordt niet als zodanig apart herkend.

Onderzoek

Mede omdat de momenteel door de NAK gebruikte REF-waarden op relatief oud onderzoek zijn gebaseerd, is besloten

in 2006 een driejarig onderzoeksproject te starten. Plant Research International en NAK zullen bepalen wat tegenwoordig de belangrijkste PVY-vectoren in Nederland zijn en een actuele set REF-waarden opstellen. Verder zullen de in Nederland voorkomende PVY-stammen worden geïnventariseerd (inclusief PVY^{NW}) en zal onderzoek gedaan worden naar de relatie tussen deze PVY-stammen en hun vectoren. Het onderzoek wordt gezamenlijk gefinancierd door het Ministerie van LNV, het Hoofdproductschap Akkerbouw en de NAK. Samenwerking is gezocht met onderzoekers van het Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) in Rennes (Frankrijk), waar aan hetzelfde onderwerp wordt gewerkt.

Literatuur

- Bokx, J.A. de & Piron, P.G.M., 1990. Relative efficiency of a number of aphid species in the transmission of potato virus Y^N in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **96**: 237-246
- Glais, L., Tribodet, M. & Kerlan, C., 2002. Genomic variability in Potato virus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^{NO} and PVY^N isolates. *Archives of Virology* **2**: 363-378
- Harten, A. van, 1983. The relation between aphid flights and the spread of potato virus Y^N in the Netherlands. *Potato Research* **26**: 1-15
- Kerlan, C., 2004. Evolution in Potato Virus Y: from recombination in the genome to emergence and spreading of variants. Abstracts oral and poster presentations of the 12th EAPR Virology Section Meeting, Rennes – France 2004. INRA, Rennes: 26-30
- Singh, R.P., McLaren, D.L., Nie, X. & Singh, M., 2003. Possible escape of a recombinant isolate of Potato Virus Y by serological indexing and methods of its detection. *Plant Disease* **87**: 679-685

Detectie van tabaksratelvirus en aardappelzwabbertopvirus in pootaardappelen

G.W. van den Bovenkamp en E.G. de Haan

Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor zaaizaad en pootgoed van Landbouwgewassen (NAK), Emmeloord, gbovenkamp@nak.nl

Het Tabaksratelvirus (TRV), onder meer veroorzaker van stengelbont (plant) en kringrigheid (knol) bij aardappelen, is een tobavirus dat reeds lang in Nederland is gevestigd. Toch is TRV, bij de teelt van pootaardappelen, tijdens de veldkeuring zelden aanleiding tot declassering (figuur 1). Ook partijen pootaardappelen met in- of uitwendige knolsymptomen (necroses) ten gevolge van TRV zijn in veel jaren schaars. Mogelijk komt dit door het vroegtijdig doodmaken van het loof. TRV in aardappelen kan, vanwege het optreden van virusstammen zonder eiwitmantel, niet betrouwbaar serologisch worden aangetoond.

Vermeldingen van het Aardappelzwabbertopvirus (PMTV) in Nederland zijn zeldzaam (*Anonymus*, 1969; van Hoof & Rozenaal, 1969; Cuperus & de Bokx, 1990) en wetenschappelijk niet afdoende gedocumenteerd. In tegenstelling tot wat in sommige handboeken wordt gesteld, zijn beide virussen op basis van knolnecroses niet betrouwbaar visueel van elkaar, en van fysiologische verschijnselen c.q. gebreksziekten, te onderscheiden. De NAK toetst knollen met necroses dan ook op TRV met een reverse transcription (RT-)PCR (Cornelissen *et al.*, 1986) en – indien TRV-negatief – op PMTV met een Elisa-test. PMTV is binnen de EU geen quarantaine organisme. Noch tijdens een landelijke NAK-survey naar planten met stengelbontachtige symptomen (1999; n=41), noch tijdens een vergelijkbare survey in partijen pootaardappelen met knolnecroses (1999; n = 30), werd PMTV aangetroffen.

Multiplex real-time PCR

De publicatie van een multiplex real-time TaqMan® PCR (Mumford *et al.*, 2000) brengt een methode binnen handbereik waarbij plant- of knolmateriaal in één bewerking gelijktijdig op beide virussen kan worden getoetst.

De Taqman-methodiek combineert een gelabelde probe met

de 5'-exonuclease activiteit van *Taq*-polymerase. De probe is gelabeld met een reporter-fluorofoor en een 'quencher' (dimmer), en bindt aan het doel-RNA. Zolang de probe intact is wordt fluorescentie van het reportergedeelte gedoofd door de quencher. Tijdens de amplificatie wordt de probe gesplitst, de afstand tussen reporter en quencher neemt toe en de fluorescentie wordt, onder invloed van de hoeveelheid geamplifi-

ceerd product, meetbaar. De toename van de reporterfluorescentie tijdens de amplificatie wordt constant gemeten en rechtstreeks (real-time) zichtbaar gemaakt via een ABI PRISM 7000® detectiesysteem. Na de PCR-stap zijn dus geen verdere handelingen nodig: het betreft een gelvrij systeem. Dit laatste, plus het feit dat op beide virussen in één keer, en in één reactievatje (single tube reaction), getoetst kan worden behoort tot de belangrijkste voordelen van de methodiek.

Het aantal PCR-cycli dat nodig is om virusdetectie significant meetbaar te maken, wordt uitgedrukt in een zogenaamde Ct-waarde. Lage Ct-waarden duiden op grotere hoeveelheden van het doelorganisme, hoge Ct-waarden op geringere hoeveelheden. PCR-cycli en fluorescentie worden real-time tegen elkaar uitgezet in een grafiek. Het aantal PCR-cycli waarna de ingestelde drempelwaarde wordt overschreden (Ct), plus de vorm van de grafiek (logaritmische toename van de fluorescentie), geven extra inzicht in het verloop en de specificiteit van de reactie. Een Taqman-PCR is vaak specifiekier dan een normale RT-PCR omdat, naast de specifieke primers, ook nog eens gebruik gemaakt wordt van een specifieke probe.

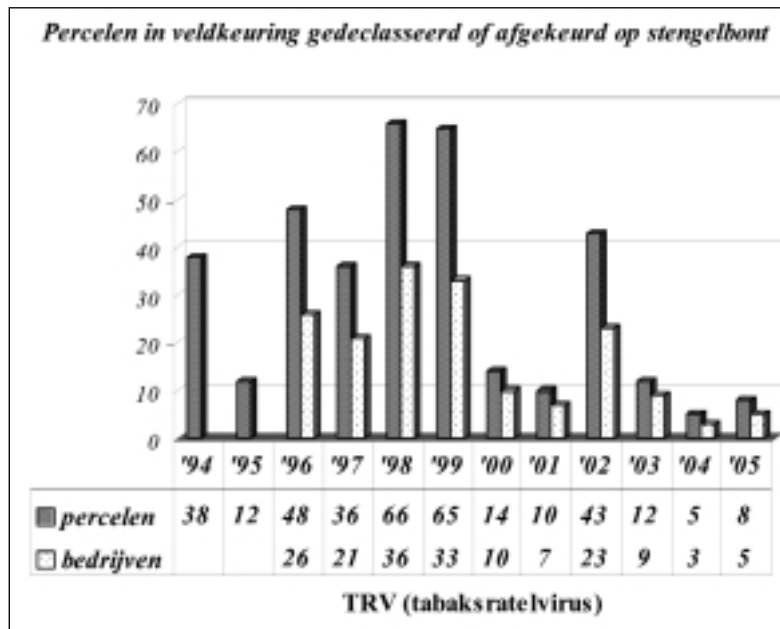
ARTIKEL

Bij implementatie van de methodiek bij de NAK is voornamelijk gebruik gemaakt van Nederlandse partijen aardappelen met TRV en van materiaal met PMTV uit Denemarken en Schotland.

Resultaten

Handmatige RNA-extractie met een gemodificeerde zout-precipitatie methode gaf voor beide virussen lagere Ct-waarden, en dus een hogere RNA-opbrengst, dan geautomatiseerde extractie met mag-nobeads. Zoals ook elders beschreven, bleken beide virussen erg onregelmatig in knol en plant verdeeld. Het samenvoegen van meerdere knollen uit een partij met kringrigheid, en van alle stengels per stengelbontplant, wordt voor diagnostische doeleinden door ons aanbevolen. Ook in volstrekt symptoomloze knollen uit een besmette partij kon soms TRV worden aangetoond.

Vanwege het uitgebreide werk van Mumford *et al.* werd een nieuw specificiteitonderzoek niet noodzakelijk geacht. Uit validatie-experimenten aan praktijkmonsters (rechtstreeks verdund plant- en knolsap) bleek dat de multiplex real-time Taqman PCR voor beide pathogenen, in onze handen, 10 tot 100 keer gevoeliger was dan de tot dan gebruikte Elisa-toets (PMTV; figuur 2) en de standaard RT-PCR (TRV; figuur 3). Op basis van de verkregen resultaten kon een beslissingsmatrix worden opgesteld (positief /negatief) voor materiaal met en zonder symptomen. Hoewel in het necrotische knolweefsel stoffen voorkomen die de PCR-reactie – vooral tijdens de latere cycli – remmen, bleek bemonstering direct naast de inwendige necrose



Figuur 1. Aantallen Nederlandse percelen pootaardappelen, gedeclasseerd of afgekeurd tijdens de veldkeuring op basis van stengelbontsymptomen (TRV). Gemiddeld jaarlijks in keuring: 29.000 percelen.

Monster nr.	10		28		22	
	ELISA (ex100)	Taqman (Ct)	ELISA (ex100)	Taqman (Ct)	ELISA (ex100)	Taqman (Ct)
10 ⁻⁰	69	25.82	147	22.61	145	20.11
10 ⁻¹	16	27.75	212	4.97	105	23.48
10 ⁻²	10	40	10	29.61	18	27.54
10 ⁻³	10	40	9	40	10	40
10 ⁻⁴	10	40	9	40	9	40

Figuur 2. Vergelijking Elisa (extinctiewaarden x 100) en Taqman PCR voor PMTV in aardappelknollen met inwendige necroses. Elisa-waarden zijn niet geblankt. Positieve uitslagen vet en cursief. Bij de Taqman PCR geldt: hoe meer virus, hoe lager de Ct-waarde.

Ct categorie	Taqman PCR aantal monsters in Ct-categorie	standaard PT-PCR aantal monsters positief op gel
Ct<20	5	5
Ct 20-25	5	4
Ct25-30	5	2
Ct 20-35	5	1
Ct 35-39	4	0

Figuur 3. Vergelijking Taqman PCR en standaard PT-PCR voor 24 mei met TRV (inwendige necroses) besmette knolmonsters. Positieve reacties (Ct-waarden in combinatie met real-time monitoring van de PCR-amplificatie) vet en cursief

optimaal. Uiteindelijk bleek de Taqman PCR zelfs minder gevoelig voor remmende stoffen dan de standaard-PCR (data niet getoond). Dit komt omdat

bij deze nieuwe methode productaccumulatie, tijdens de latere PCR-cycli, voor detectie niet echt noodzakelijk is. Het wegvallen van een PCR-reactie

bij een knolsapverdunding van 10^{-3} (figuur 2) sluit echter enige vorm van inhibitie, ook in het geval van de Taqman PCR, niet uit.

TRV kon met de Taqman PCR nog aangetoond worden in monsters knol- en plantsap die 5 jaar bewaard waren bij -80°C.

Tijdens een survey in praktijkmonsters pootaardappelen met inwendige necroses (2005, n=15) bleek TRV goed te onderscheiden van 'roestvlekken' ten gevolge van fysiologische oorzaken. De Taqman PCR werd daarbij ingezet naast andere diagnostische hulpmiddelen die verwarring met het aardappelvirus Y (met name PVY^{NTN}), het aardappelaucubamozaïekvirus (PAMV) en het

tabaksnecrosevirus (TNV) moeten uitsluiten.

Samenvatting

Met de door Mumford *et al.* beschreven multiplex real-time Taqman PCR kunnen planten en knollen met TRV en PMTV snel van elkaar, en van fysiologische oorzaken, worden onderscheiden. Opnieuw bleek dat in- en uitwendige necroses bij aardappelen alleen op basis van een laboratoriumtoets betrouwbaar zijn te diagnosticeren. Experimenten met praktijkmateriaal lieten zien dat de nieuwe combitest gevoeliger, robuuster en goedkoper is dan de tot nu toe door de NAK gehanteerde methodieken. De

methode wordt door de NAK ingezet om onderzoek te doen naar de status van TRV en PMTV in Nederland.

Literatuur

- Anonymus (1969) 'Mop top'virus van aardappel. In: Jaarverslag IPO 1969, 92
- Cornelissen, B.J.C., Linthorst, H.J.M., Brederode, F.T. & Bol, J.F. (1986) Analysis of the genome structure of tobacco rattle virus strain PSG. *Nucleic Acids Research* **14**: 2157-2169
- Cuperus, C. en de Bokx, J.A. (1990) Chemische middelen en bodemvirussen bij de pootgoedteelt. *Aardappelwereld*, september 1990 (3): 31-34
- Hoof, H.A. van & Rozendaal, A. (1969) Het voorkomen van 'potato mop top virus' in Nederland. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **75**: 275
- Mumford, R.A., Walsh, K., Barker, I. & Boonham, N. (2000) Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology* **90**: 448-453

Het plantenvirologisch onderzoek bij Plant Research International

René van der Vlugt, Martin Verbeek, Inge Bouwen, Daniella Kasteel, Annette Dullemans, Chris Cuperus, Jan Vink en Paul Piron

Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen; Rene.vanderVlugt@wur.nl

Plant Research International is voortgekomen uit de fusie van drie vooraanstaande landbouwkundige DLO-instituten nl. het AB-DLO (DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek), het CPRO-DLO (Centrum voor Plantenveredeling en Reproductieonderzoek) en het IPO-DLO (DLO-Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek).

Bij de overgang naar PRI is het virusonderzoek terecht gekomen in de businessunit Biointeracties en plantgezondheid. PRI maakt binnen Wageningen UR deel uit van de Plant Science Group (PSG), waarbinnen samengewerkt wordt met PPO en verschillende leerstoelgroepen van WU. Elk van deze onderdelen richt zich op een bepaald segment van het plantkundig onderzoek. PRI richt zich vooral op het strategisch onderzoek en positioneert zich daarmee tussen PPO (vooral praktijkgericht) en de WU (vooral fundamenteel gericht). Voor de inhoud van het plantenvirologische onderzoek betekent dit dat wij ons vooral bezighouden met aan plantenvirussen gerelateerde praktijkproblemen en proberen werkbare oplossingen te vinden voor die virusproblemen. Indien nodig vergaren we fundamentele kennis zelf of in samenwerking met andere groepen en evenzo werken we nauw samen met PPO in het directe praktijkonderzoek. De plantenvirologen van PRI generen kennis rechtstreeks voor het bedrijfsleven maar ook voor Productschappen, keuringsdiensten, de Plantenziektkundige Dienst of LNV. Daarmee leveren we onze bijdrage aan beleidsvraagstukken, fytosanitaire kwesties en het op peil houden van de concurrentiekracht van het Nederlandse bedrijfsleven. Het onderzoek vindt zo mogelijk in samenwerking met anderen plaats. Goede en open contacten met bedrijfsleven, (semi)overheidsinstellingen en wetenschappelijke partners in binnen- en buitenland zijn daarbij van vitaal belang.

Onze belangrijkste expertises kort op een rijtje:

- Identificeren en karakteriseren van plantenvirussen, hun stammen en isolaten
- virusspecifieke symptomen op zowel waardplanten als toetplanten
- ontwikkelen van specifieke en gevoelige detectiemethodieken, zowel serologisch (antiseren) als moleculair –biologisch
- virus-overdracht en verspreiding door vectoren
- de epidemiologie en ecologie van virusziekten

Daarnaast beheert de plantenvirusgroep een collectie met de belangrijkste stammen en isolaten van vooral voor Nederland belangrijke virussen. Die vormt nog steeds een basis voor de levering van virussen die gebruikt worden bij resistentie toetsingen, maar ook voor de ontwikkeling van specifieke antisera, hun kwaliteitsborging en de benodigde positieve controles.

De door PRI geproduceerde antisera worden wereldwijd vermarkt onder de naam Prime Diagnostics. Naast alle Nederlandse keuringsdiensten gebruiken ook veel internationale bedrijven onze antisera in hun keurings- en kwaliteitsprogramma's. Meer over de Prime Diagnostics en nieuwe ontwikkelingen op het gebied van serologische diagnostiek elders in dit nummer.

Hieronder volgen enige voorbeelden van ons onderzoek van de afgelopen jaren:

Identificatie en karakterisering van de virussen verantwoordelijk voor slabobbelblad

Slabobbelblad is een ziekte die al tientallen jaren voor proble-

ARTIKEL



Figuur 1. Typische symptomen van slabbobbelblad op ijsbergsla in een veld nabij Pulpi, Zuid-Spanje.

men zorgt in de teelt van sla maar ook andijvie. Het is een internationaal probleem en zorgt met name in Spanje in de teelt van ijsbergsla de laatste jaren voor steeds meer schade (zie figuur 1). Grote oplichtend nerven en een slechte kropzetting maken het product slechter verkoopbaar en opbrengstverliezen kunnen oplopen tot wel 100%. De ziekte wordt verspreid door de oomyceet *Ospidium brassicae*. Deze schimmel maakt rustsporen die wel tot 30 jaar in de bodem kunnen overleven en ook dan nog steeds in staat zijn om sla met bobbelblad te infecteren. Bestrijding van de ziekte is alleen mogelijk door drastische grondontsmetting bijv. met methylbromide. Introductie van resistentie zou een goede bijdrage kunnen leveren aan een duurzame beheersing van het probleem en vermindering van het gebruik van bestrijdingsmiddelen. Nederlandse zaadbedrijven zijn al jaren op zoek naar een vorm van resistentie maar die zoektocht werd ernstig bemoeilijkt door het feit dat de ziekteverwekker niet bekend was en er geen be-

trouwbare toetsmethoden beschikbaar waren.

Door PRI is enige jaren geleden het voortouw genomen om in samenwerking met Rijk Zwaan en partners uit Duitsland, Spanje en Engeland, een Europees project van de grond te krijgen om meer duidelijkheid te krijgen in de veroorzaker van slabbobbelblad en mogelijke oplossingen. Er waren duidelijke aanwijzingen dat er vermoedelijk een virus in het spel was maar niemand was ooit in staat gebleken om dat te bewijzen. Door PRI is binnen dit project aangetoond dat er twee virussen betrokken zijn bij slabbobbelblad: het Mirafiori lettuce big-vein virus (MLBVV, een ophiovirus) en het Lettuce big-vein associated virus (LBVaV, een varicosavirus). Door het ontwikkelen van nieuwe inoculatiemethoden konden beide virussen uiteindelijk van elkaar gescheiden worden en apart bestudeerd. Na zuivering zijn tegen beide virussen antisera geproduceerd en is de volledige RNA sequentie opgehelderd van het gevonden ophiovirus, waarbij voor het eerst bleek dat het genoom van MLBVV uit vier

RNA-segmenten bestaat. Op basis van de sequenties van beide virussen zijn gevoelige en specifieke PCR-toetsen uitgewerkt. MLBVV bleek uiteindelijk verantwoordelijk voor de typische bobbelbladsymptomen, de rol van LBVaV is nog onzeker al is dit virus ook vrijwel altijd aanwezig in zieke planten. Beide virussen lijken sterk met elkaar verbonden maar de precieze details van hun relatie zijn nog niet bekend.

Uiteindelijk heeft het onderzoek geresulteerd niet alleen in de identificatie van de ziekteverwekkers maar ook in gevoelige en specifieke detectiemethodieken. Hiermee kan het bedrijfsleven eindelijk gericht op zoek naar bronnen van duurzame resistentie tegen deze virusziekte met een grote impact op economie en milieu.

Freesiablادنecrose

Freesia bladnecrose (FBN) is al ruim veertig jaar een bekend probleem in de freesiateelt. Deze ziekte veroorzaakt een ernstige necrose in het freesiablاد hetgeen leidt tot aanzienlijke opbrengstverliezen. De typische symptomen van FBN beginnen als chlorotische vlekjes op het blad die later necrotisch worden (figuur 2). FBN is een grond-gebonden ziekte en wordt overgedragen door de obligate schimmel *Ospidium brassicae*. De ziekte kan overleven in de rustsporen van de schimmel, die zelfs na ruim twintig jaar nog levensvatbaar en infectieus zijn. Tot nu toe zijn er geen resistentie freesia cultivars gevonden.

Het is lange tijd onduidelijk geweest wat de oorzaak van FBN kon zijn. Het werd algemeen aangenomen dat er een virus bij deze ziekte betrokken



Figuur 2. Symptomen van freesia bladnecrose in freesia 'Blue Moon'.

moest zijn, maar alle pogingen om een virus te isoleren bleken vruchteloos. Pas in 2003 kon op PRI een virus worden geïsoleerd uit freesia's met FBN. Dit virus behoort tot het genus *Ophiovirus*. Dit genus is vrij onlangs ontdekt, mede doordat de virusdeeltjes in de elektronenmicroscopie moeilijk zijn te zien en lange tijd niet als virusdeeltjes werden herkend. De deeltjes, die bestaan uit strenge RNA die rechtstreeks zijn omgeven met eiwit, zien er uit als lange opgerolde draden (figuur 3). Door hun 'slang-achtige' uiterlijk hebben zij de naam *Ophiovirus* gekregen (Ophis is een Grieks woord voor slang). In het recente verleden zijn ophiovirussen gevonden in onder andere citrus (*Citrus psorosis virus*, CPsV), tulp (*Tulip mild mottle mosaic virus*, TMMMV) en sla (*Mirafiori lettuce big-vein virus*, MLBVV en *Lettuce ring necrosis virus*, LRNV). Het ophiovirus uit Freesia wordt voorlopig freesia ophiovirus (FOV) genoemd. Het is nog niet bewezen dat het gevonden

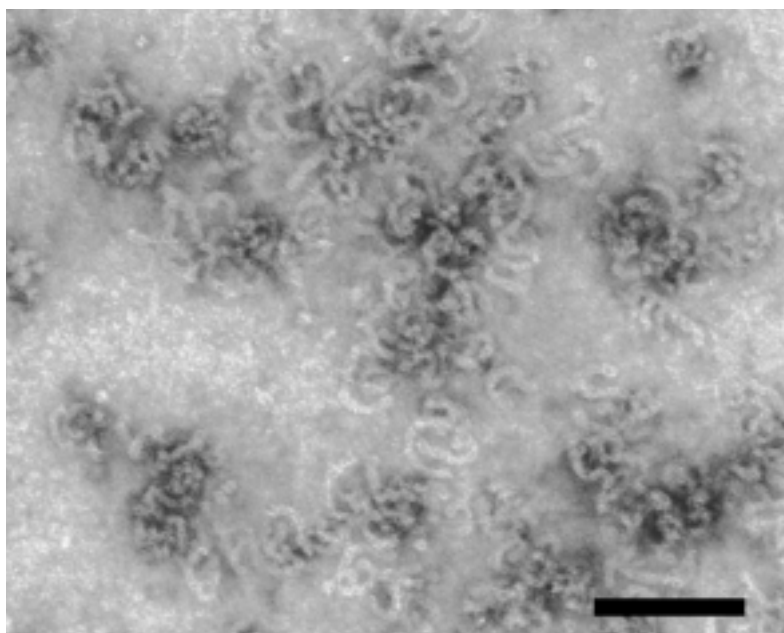
FOV ook de werkelijke veroorzaker is van FBN. Het is namelijk nog niet mogelijk gebleken om FOV mechanisch over te brengen naar gezonde freesia, waardoor de Postulaten van Koch nog niet rond zijn.

Een van de karakteristieken van ophiovirussen is de extreme instabiliteit van de virusdeeltjes. Hierdoor is dit virus moeilijk mechanisch te inoculeren op toetsplanten en moeilijk te zuiveren. De standaard methoden voor inoculatie en viruszuivering bleken niet te voldoen. Op PRI zijn nieuwe methoden ontwikkeld om FOV naar toetsplanten over te brengen en het virus zuiver in handen te krijgen. Het lukte om FOV over te brengen naar *Nicotiana glauca* '67A' en *N. occidentalis* 'P1' (figuur 4). Deze planten konden ook worden gebruikt voor de vermeerdering van het virus, waarna het virus gezuiverd kon worden. Het gezuiverde virus werd gebruikt om een polykonaal antiserum te maken dat prima bleek te voldoen in ELISA. Het antiserum detecteert FOV in bladmateriaal en knolmateri-

aal van freesia en vertoont geen achtergrondreactie met gezond freesia-materiaal. Deze detectiemethode wordt nu verder door Naktuinbouw geëvalueerd aan de hand van praktijkmonsters. De resultaten wijzen erop dat het gevonden ophiovirus een hoge correlatie heeft met de aanwezigheid van symptomen van FBN. Met deze detectiemethode hebben veldelaars van freesia al een belangrijk hulpmiddel in handen voor de ontwikkeling van resistentie tegen FBN.

Epidemiologie van aardappelvirus Y

Virussen die op non-persistent wijze door bladluizen worden overgedragen zorgen jaarlijks voor aanzienlijke problemen. Zo wordt de jaarlijkse schade in de bollensector op circa 39 miljoen Euro geschat, de schade in de pootaardappelteelt doet hier verhoudingsgewijs niet voor onder. Naast een intensief keuringsstelsel om schoon planten en pootgoed te garanderen



Figuur 3. Elektronenmicroscopische opname van gezuiverde deeltjes van het freesia ophiovirus. Balk=100nm.



Figuur 4. Systemische symptomen van freesia ophiovirus in *Nicotiana occidentalis* 'P1'.

vormen directe bespuitingen tegen bladluizen een belangrijk wapen in de beheersing van de virusproblemen. In veel gewassen worden wekelijks pyrethroiden en/of minerale olie gebruikt. De schadelijke gevolgen hiervan voor het milieu worden vaak onderschat. Een onderbouwd advies wanneer precies begonnen of juist gestopt moet worden met bespuitingen is vaak niet mogelijk omdat de data over m.n. de start en de duur van bladluisvluchten ontbreken. Bij een onderbouwde advisering kan het gebruik van chemische gewasbeschermingsmiddelen worden teruggebracht. Ook wordt toenemende middelenresistentie in bladluizen een steeds groter probleem.

De advisering, mede gebaseerd op bladluisvangsten, is om de bestrijding te starten in begin mei of half april bij een vroeg, warm voorjaar. Echter, in o.a. Zeeland zijn er in warme voorjaren al eerder dan half april bladluizen waargenomen. Het is niet bekend of met deze vroege bladluisvluchten virus overgebracht wordt. Lelietelers in Drenthe geven aan dat er nog bladluisvluchten zijn in begin oktober, terwijl voor de lelieteelt geadviseerd wordt om

de bespuitingen te stoppen in eind september.

De groene perzikbladluis (*Myzus persicae*, Sulzer) wordt algemeen beschouwd als de allerbelangrijkste vector van non-persistent overgedragen virussen. Daarom krijgt deze bladluis de hoogste Relatieve Efficiëntie Factor (REF) in de bladluistellingen die aan de basis staan voor de bepaling van de loofdoodingsdata voor pootaardappelen en bespuitingsschema's. Deze REF's zijn echter al bijna dertig jaar oud en gebaseerd op proeven waarbij de overdracht van alleen PVY^N door één kloon van de bladluis bepaald werd. Zeer waarschijnlijk wordt in de diverse teeltsystemen in de aardappel- en bloembollenteelt de rol van andere bladluisoorten onderschat.

In de pootaardappelteelt zijn de afgelopen jaren toenemende problemen met Aardappelvirus Y (PVY) gemeld. Zo is in de jaren 2002-2004 ong. 10-15% van het pootgoed uiteindelijk gedeclasseerd onder andere vanwege overschrijding van de normen voor aanwezigheid van dit virus. In deze problemen spelen bladluizen als belangrijkste verspreiders van het virus een zeer grote rol, maar de toenemende problemen met PVY kunnen onvoldoende verklaard worden door de analyses van de bladluisvangsten.

Ook zijn een aantal nieuwe stammen van PVY beschreven die ernstige problemen veroorzaken. Een aantal van deze stammen blijken recombinanten te zijn en hebben zich al gevestigd in Europa (PVY^{NTN}, PVY^{NW}), maar hun precieze voorkomen en verspreiding binnen Nederland is onbekend. Om te zien in hoeverre nieuwe buitenlandse stammen

al tot Nederland doorgedrongen zijn en een betere risico-inschatting van PVY voor de Nederlandse teelt te kunnen maken is een veel beter inzicht nodig van de in het veld voorkomend stammen en recombinanten.

De kennisvragen die er in de verschillende sectoren liggen met betrekking tot virusoverdracht door bladluizen ontlopen elkaar niet veel. Er is in het algemeen te weinig inzicht in het relatief belang van de verschillende bladluisoorten, het tijdstip van hun verschijnen, de precieze bronnen van virusbesmettingen en het belang van verschillende virusstammen in het optreden van schade.

In 2006 is in het kader van het LNV- fytosanitair onderzoeksprogramma rond de problematiek met PVY een project gestart, in samenwerking met de NAK (Nederlandse Algemene keuringsdienst) en mede gefinancierd door HPA (Hoofdproductschap akkerbouw). Dit project richt zich vooral op de volgende onderwerpen:

1. Het vaststellen van de belangrijkste bladluisoorten die verantwoordelijk zijn voor de overdracht van PVY.
2. Bepaling van de REF's van diverse veldpopulaties van deze bladluisoorten, voor de belangrijkste PVY stammen.
3. Een inventarisatie op het voorkomen van stammen en recombinanten van PVY in Nederlands veldmateriaal
4. Het onderzoeken van de relatie tussen bladluispopulaties en virusstammen.

Op dit moment worden de vangsten van de bladluisvluchten nog volop geanalyseerd en is een begin gemaakt met de inventarisatie van de in Nederland aanwezige stammen en

isolaten van PVY. In de loop van dit jaar zullen deze gegevens gebruikt worden om met historische data te vergelijken, en daar al eerste conclusies uit te trekken, en gedetailleerde plannen voor volgend jaar uit te werken.

Een nieuw virus in kastanje

Enkele jaren geleden dook er in Nederland een nieuwe mysterieuze ziekte op in paardenkastanje (*Aesculus* sp.). Er verschenen necrotische plekken op de stam waaruit een bruin sap lekte. De naam kastanjabloedingsziekte werd al snel algemeen bekend omdat in de pers uitgebreid melding werd gemaakt van een desastreuze ziekte die alle kastanjes in Nederland bedreigde. Onder leiding van PPO werd de werk-

groep Aesculaap opgericht die in opdracht van LNV onderzoek doet naar deze ziekte. Deze werkgroep bestaat uit een groot aantal onderzoekers van onder andere PPO, PRI, WU en PD. In 2005 werden door PRI zowel een bacterie (*Pseudomonas syringae*) als een virus gevonden. Het virus heeft closterovirus-achtige deeltjes en bleek algemeen in zowel gezonde als zieke kastanjes voor te komen. De bacterie werd voornamelijk geassocieerd met de bloedingsplekken gevonden. Inmiddels is bewezen dat de bacterie de primaire veroorzaker is van de bloedingsziekte, maar een belangrijke rol van het gevonden virus is niet uit te sluiten. Het virus kan een stressfactor zijn waardoor de bacterie de kans heeft gekregen zich zeer snel te verspreiden. Verder onderzoek is nodig om het virus verder te karakteriseren.

Toenemende problemen met pepinomozaïekvirus

In 1999 was een Nederlandse groep met daarin toenmalige IPO-DLO, Proefstation Naaldwijk en de PD, het eerste in de beschrijving van een toen nog geheel nieuw virus in de Nederlandse tomatenteelt. Sinds die tijd heeft dat virus, pepinomozaïekvirus, zich razendsnel door de tomatenteelt in binnen- en buitenland verspreid. Op dit moment zorgt het voor veel problemen omdat door nog onbekende oorzaak de ernst van de symptomen sterk aan het toenemen is. Meer over dit virus, zijn geschiedenis en de problemen die het veroorzaakt dit nummer p232-238.

ARTIKEL

Pepino mozaïekvirus; een blijvend probleem??

Ineke Stijger¹ en René van der Vlugt²

¹PPO Glastuinbouw, Postbus 8, 2670 AA Naaldwijk, ineke.stijger@wur.nl

²Plant Research International B.V., Postbus 16 6700 AA Wageningen, rene.vandervlugt@wur.nl

Pepinomozaïekvirus (PepMV) is een virus wat voor het eerst gevonden is in bladmonsters genomen in 1974 van pepino planten (*Solanum muricatum*) in de Canete vallei in Peru. Jonge bladeren van deze planten vertoonden wat geel mozaïek. In de elektronenmicroscop (EM) bleken er in deze planten typische draadvormige virusdeeltjes te vinden die alle kenmerken van potexvirusdeeltjes vertoonden. De virusdeeltjes reageerden niet met antiserum tegen aardappelvirus X (PVX) en bleek serologische het meest verwant met narcissemozaïekvirus (NaMV). Toch kwamen de reacties op toetsplanten niet overeen voor beide virussen. De conclusie was dat pepinomozaïekvirus een nieuw potexvirus was.

Sinds de eerste beschrijving is pepinomozaïekvirus nooit meer gerapporteerd en bleef het landbouwkundig volkomen onbelangrijk totdat het in 1999 plots gevonden werd in tomatenteelten in het Verenigd Koninkrijk en in Nederland. Sinds dat moment heeft het virus zich zeer snel en wijd verspreid. Het is officieel gerapporteerd uit België, Canada, Chili, Frankrijk, Duitsland, Italië, Finland, Marokko, Noorwegen, Peru, Portugal, Polen, Spanje, Nederland, Engeland, Oekraïne en de Verenigde Staten. Wat er tussen 1974 en 1999 met dit virus is gebeurd, in welk gewas het virus zich in die periode heeft vermeerderd, hoe het uiteindelijk in de verschillende landen is terecht gekomen, en of het virus zich in die tijd heeft aangepast, blijft een vraag. In dit artikel gaan we in op de laatste stand van zaken omtrent de kennis van het pepinomozaïekvirus en mogelijke oplossingen voor de problemen.

Waardplanten en symptomen

Het gastheerbereik van PepMV is vrij smal en voornamelijk beperkt tot de familie van de Solanaceae. Veel planten uit de familie worden systemisch geïnfecteerd. De belangrijkste waardplanten zijn *Lycopersicon* (tomaat) en *Solanum* (aardappel) soorten.

Het originele pepinomozaïekvirus isolaat bleek in staat om

wilde en gecultiveerde aardappels te infecteren, meestal met een symptoomloze systemische infectie of met een zwak mozaïek. Het virus ging wel over met de knollen.

De belangrijkste natuurlijke waardplanten zijn echter pepino en tomaat. Bij onderzoek in Peru bleken naast de gecultiveerde tomaat ook verschillende wilde *Lycopersicon* soorten geïnfecteerd te zijn met PepMV. Deze soorten (*L. peruvianum*, *L. parviflorum*, *L. chi-*

lense, *L. chmielewskii* en *L. pimpinellifolium*) vertonen geen symptomen na infectie.

Het origineel beschreven pepino-isolaat geeft een duidelijk geel mozaïek op jonge bladeren van pepino en de meeste geïnfecteerde planten vertonen ook donkergroen enaties op de onderkant van oudere bladeren. In *Lycopersicon*-soorten geeft die isolaat geen symptomen. Toch zijn de planten systemisch geïnfecteerd zoals blijkt uit teruginoculaties op gevoelige indicatorplanten zoals *Nicotiana glutinosa*.

In tegenstelling tot het pepino-isolaat geeft het virus dat in 1999 in West-Europa werd aangetroffen wel symptomen op tomatenplanten.

De symptomen van dit virus in tomaten kunnen verschillend zijn en zijn afhankelijk van de cultivar, leeftijd van de plant en leeftijd van de plant op moment van infectie en de omstandigheden waarbij de planten staan. De eerste symptomen in een jong gewas kunnen zijn brandnetelachtig blad en wat bobbeling. Over het algemeen hebben deze planten ook een bleke of grauwe kleur. Op oudere bladeren kunnen duidelijk gele vlekjes voorkomen. Ook kan er tussenervige chlorose optreden. Meestal verschijnt er een mozaïek op het blad of er ontstaan grotere chlorotische vlekken. Soms lijken de symptomen op

ARTIKEL

die van aardappelvirus X. In geval van bladsymptomen kan de groei wat achter blijven maar over het algemeen hersteld de plant zich binnen een paar weken. Wel is bekend dat met minder licht de bladsymptomen weer terug kunnen komen. Naast bovenstaande symptomen is inmiddels ook bekend dat bepaalde isolaten van het virus necrose op zowel blad als stengel kunnen veroorzaken.

In onderzoek is vastgesteld dat de wateropname van de planten veranderd na een (late, mei) besmetting met pepinomozaïekvirus. Planten namen na de (opzettelijke) infectie gedurende drie weken gemiddeld 0,3 liter water per dag en per vierkante meter meer op dan gezonde planten. Na deze drie weken gingen de planten slap en namen de planten gemiddeld 0,15 liter water per vierkante meter per dag minder op dan gezonde planten. Nog twee weken later was de verminderde wateropname inmiddels opgelopen tot 1 liter. Uit het onderzoek is ook naar voren gekomen dat de verminderde wateropname alleen te maken had met een aantasting door pepinomozaïekvirus en niets te maken had met een aantasting van *Verticillium* of *Pythium*.

In een latere fase van de teelt kunnen ook vruchtsymptomen voorkomen. Meestal gaat het om een paar vruchten van één of twee trossen per stengel. Vruchtsymptomen ontstaan door ongelijk rijpen van de vrucht. Er komen oranje of rode vlekken op voor. In sommige gevallen blijven delen van de vrucht groen (wankleurigheid). Overigens is dit niet specifiek voor dit virus want virussen als komkommermozaïekvirus en aardappelvirus X kunnen vergelijkbare symptomen laten zien.



Figuur 1. Een eerste symptoom van PepMV.

Karakteristieken van het virus

PepMV heeft typische draadvormige potexvirus deeltjes met een lengte van 510 nm. De deeltjes zijn opgebouwd uit een enkel manteleiwit (capsid protein of CP) van ong. 26 kDa. Ultradunne coupes van geïnfecteerd weefsel laten in de EM soms bundels virusdeeltjes zien.

De meeste potexvirussen zijn erg stabiel en PepMV is geen uitzondering. In eindpuntsverdundingstesten was bladsap van geïnfecteerde *N. glutinosa* bleek het virus altijd nog infectieus in verdunningen van 10⁻⁴, soms bij 10⁻⁵ maar nooit meer in verdunningen van 10⁻⁶. Sap verloor het meest van zijn infectiositeit na tien minuten bij 65°C en alle infectiositeit bij 70°C. Na drie maanden bewaren van geïnfecteerd sap bij 20°C was nog niet alle infectiositeit verdwenen en boven silicagel gedroogd blad was nog steeds infectieus na zes maanden. In de praktijk overleeft het virus enige weken in ziek plantmateriaal maar ook op oppervlakten zoals gereed-

schap, fust maar ook deurkrukken, die in aanraking zijn gekomen met het ziek bladmateriaal of zieke vruchten.

Genoom organisatie en expressie

Het genoom van PepMV heeft alle karakteristieken van een potexvirus. Het positieve enkelstrengs RNA is 6410 nucleotiden lang, heeft een cap aan het 5'-uiteinde, het 3'-eind een poly-(A) staart en vrij korte 5'- en 3'- niet vertaalde gebieden. Het RNA bevat vijf gedeeltelijk overlappende open leesramen (open reading frames of ORFs) die coderen voor in totaal vijf eiwitten.

ORF1 codeert een eiwit van 164 kDa dat verantwoordelijk is voor de replicatie van het virus. ORF 2, 3 en 4 vormen samen een blok van drie genen die eiwitten maken die zeer waarschijnlijk betrokken zijn bij het transport van het virus door de plant. ORF5 codeert voor het virale manteleiwit.



Figuur 2. Bladnecrose als gevolg van PepMV.

Virus isolaten en stammen

Het virus isolaat dat in 1999 beschreven is van tomaat verschilt op een aantal punten duidelijk van het originele pepino-isolaat uit Peru. Die verschillen zijn het duidelijkst in de reacties op tomaat (*L. esculentum*) waarin het pepino-isolaat symptomeloos is en het tomaten-isolaat wel symptomen veroorzaakt. Ook in toetsplanten kunnen beide isolaten worden onderscheiden, het meest duidelijk op *N. glutinosa* en *Datura stramonium*. Sinds 1999 zijn er al diverse PepMV-isolaten beschreven, allemaal afkomstig uit commerciële tomatenteelten of uit wilde *Lycopersicon* soorten. Een aantal vertonen sterke symptomen in tomaat waaronder blad en stengel necrose.

Van veel PepMV-isolaten zijn ondertussen sequentiegegevens beschikbaar. Vergelijking van de RNA-sequentie van het originele pepino isolaat en een aantal isolaten van tomaat in een gedeelte van het RdRp gen laat ongeveer 99% homologie zien tussen de tomaten-isola-

ten onderling en 95 % tussen alle tomaten-isolaten en het pepino-isolaat. Ook in andere gebieden van het genoom verschillen de tomaten- en pepino-isolaten van elkaar. Op basis van zowel biologische verschillen als de gevonden verschillen in de RNA sequentie worden de tomaten en pepino-isolaten nu als twee aparte stammen van PepMV beschouwd.

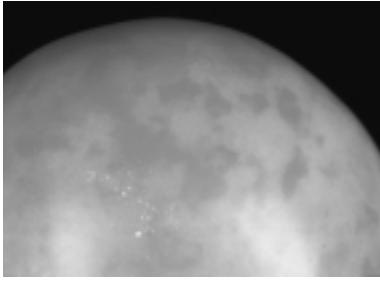
Vergelijkingen van volledige sequenties van verschillende iso-

laten van tomaat bevestigen de hoge sequentie homologie (>99%) tussen de tomaten isolaten. Uit een wilde *L. peruvianum* uit Peru werd een PepMV isolaat geïsoleerd dat in die plant maar een zeer zwak mozaïek veroorzaakte en geen symptomen gaf in *L. esculentum*. De volledige RNA sequentie vertoonde, afhankelijk van het gebied dat werd vergeleken tussen de 95 en 98% sequentie homologie met de tomaten stam.

In diverse studies zijn vele andere tomaten-isolaten nader bestudeerd. Op basis van sequentie gegevens en biologische data werden een aantal afwijkende isolaten geïdentificeerd. In 2000 werd in Italië een isolaat gevonden dat in een klein stukje van het RdRp-gen sterk afweek van de tomatenstam. Ook bleek dit isolaat in staat om *Chenopodium quinoa* en *C. amaranticolor* te infecteren. Beide soorten kunnen niet worden geïnfecteerd door de tomatenstam of de pepino-stam van PepMV. Het is nog niet duidelijk of dit isolaat daadwerkelijk een nadere stam van PepMV vertegenwoordigt.



Figuur 3. Heftige symptomen van PepMV in de kop van de plant.



Figuur 4. Tomaat met PepMV symptomen.

In de Verenigde Staten zijn de volledige sequentie van twee andere isolaten bepaald (US1 en US2). Helaas zijn deze twee isolaten samen in een mengmonster aangetroffen en ontbreken verdere biologische gegevens. Wel wijken de sequenties van deze isolaten, met 79-82% algemene homologie, sterk af van zowel de tomatenstam als de pepinostam. Ook onderling vertonen ze maar 86% homologie. Vergelijking van de aparte genen levert soms wel hogere niveaus van sequentie homologie op maar duidelijk is wel dat het hier twee nieuwe stammen van PepMV betreft. Helaas is het origineel materiaal niet meer beschikbaar voor verder onderzoek.

Onlangs zijn de resultaten van een uitgebreide studie naar het voorkomen van PepMV in Spanje gepubliceerd. Daaruit bleek duidelijk dat zowel de tomatenstam als de pepinostam aanwezig is. Opvallend is dat er ook nog een derde type aangetoond werd. Dit isolaat bleek 98% sequentie homologie te hebben met US2.

Op dit moment kunnen op basis van zowel biologische gegevens (symptomen op tomaat en diverse toetsplanten) als sequentiegegevens drie groepen binnen PepMV worden onderscheiden

1. De tomatenstam-isolaten
2. De pepinostam-isolaten
3. US1 en US2

De status van het afwijkende Italiaanse isolaat is nog onduidelijk bij gebrek aan nadere gegevens.

De epidemiologie van het virus

Het is duidelijk dat PepMV oorspronkelijk uit Zuid-Amerika afkomstig is. Studies hebben laten zien dat het wijdverspreid is in populaties van wilde *Lycopersicon* soorten in Peru. De pepinostam is symptoomloos of vertoont maar heel zwakke symptomen in commerciële tomatenrassen (*L. esculentum*). In tegenstelling daarmee geeft de tomatenstam wel veel duidelijke symptomen in tomaat. Daardoor werd het virus in 1999 voor het eerst in Engeland en Nederland opgemerkt en snel daarna ook in andere landen.

De tomatenstam is de meest voorkomend stam in alle landen die het virus tot nu toe gerapporteerd hebben. Vrijwel alle isolaten van deze stam verschillen in hun sequenties maar minimaal van elkaar en kunnen niet worden ingedeeld op basis van hun geografische vindplaats

of hun symptomen op tomaat of toetsplanten. Dit wijst op een vrij recente introductie en verspreiding van het virus in de commerciële tomatenteelt.

Analyses van monsters verzameld sinds 1998 op diverse plaatsen in Spanje, waaronder Murcia en de Canarische Eilanden, leidde tot een aantal interessante conclusies; PepMV bleek al in 1998 in Murcia aanwezig; er zijn verschillende onafhankelijke introducties van het virus in Spanje geweest, zowel op het Spaanse vaste land als op de Canarische Eilanden; naast de tomatenstam werden ook de pepinostam en het US2 isolaat aangetroffen; zowel de pepinostam als het US2 isolaat werden altijd samen met de tomatenstam in een plant aangetroffen, menginfecties zijn dus mogelijk. Dit laatste wordt door bevindingen in Nederlandse teelten bevestigd. Het belangrijkste echter is dat in een tweetal gevallen recombinante PepMV-isolaten werden gevonden.

PepMV in de USA kon voor het eerst in materiaal dat verzameld was in 2000 worden aangetoond. Toch lijkt de popula-



Figuur 5. Stengel necrose als gevolg van PepMV.

tie in dat land anders dan in Europa. Hoewel de tomatenstam ook in Noord-Amerika voorkomt (USA en Canada) komen er ook twee zeer afwijkende isolaten voor; US1 en US2. Het is zeer waarschijnlijk dat die twee rechtstreeks vanuit Zuid-Amerika geïntroduceerd zijn. Over het voorkomen van de pepinostam in Noord-Amerika is niets bekend.

Het bovenstaande suggereert dat verschillende stammen van PepMV, zich op verschillende tijdstippen verspreid hebben vanuit Zuid-Amerika. Dit is vermoedelijk gebeurd vanuit verschillende waardplanten zoals pepino, wilde *Lycopersicon* soorten of andere, nog onbekende waardplanten. Dit heeft geleid tot verschillende onafhankelijke introducties op verschillende plaatsen op deze wereld. Een aantal eigenschappen van het virus hebben hieraan bijgedragen:

- De originele pepinostam is (vrijwel) symptomeloos in commerciële tomaat
- Betrouwbare diagnostica voor het virus kwamen pas beschikbaar nadat de tomatenstam van het virus in

commerciële tomatenteelten was aangetroffen

- PepMV is een potexvirus en daarmee zeer gemakkelijk mechanisch overdraagbaar en het blijft tot enige weken infectieus in plantmateriaal, of op besmette oppervlakten
- Vruchten geoogst van geïnfecteerde planten bevatten (zeer) hoge concentraties van het virus

De aanwezigheid van PepMV in tomaat is zeer waarschijnlijk onopgemerkt gebleven totdat de tomatenstam zich manifesteerde. Het lijkt erop alsof de tomatenstam een verhoogde virulentie en fitness heeft in tomaat en dat bijgedragen heeft aan de snelle wereldwijde verspreiding van het virus. Wat de betekenis van de vondsten van dubbelinfecties met meerdere stammen in een plant en de virusrecombinanten voor de problemen met PepMV zullen betekenen blijft voorlopig gissen.

Virus schade en beheersing

De meningen over de schade veroorzaakt door pepinomo-

zaïekvirus lopen nogal uiteen. Het oorspronkelijke pepinomozaïekvirus-isolaat dat in 1999 voor het eerst in Nederland werd waargenomen, gaf in de beginperiode slechts beperkte bladsymptomen en de economische schade was gering. Pepinomozaïekvirus heeft zich sinds de eerste vondst sterk verspreid. Het niet altijd even goed schoonmaken aan het eind van de teelt heeft hieraan zeker bijgedragen.

Vanaf 2004 is er een duidelijke toename van de schade die pepinomozaïekvirus veroorzaakt in de tomatenteelt. Het virus kan zich veel duidelijker uiten in heftigere bladsymptomen in het begin van de teelt maar ook bijkomende vruchtsymptomen in de tweede helft van de teelt (vanaf juli – augustus). Deze symptomen uiten zich in de vorm van grauwe kronen tot vlekkerige en zachte vruchten en verminderde houdbaarheid, kortom een kwaliteitsprobleem.

Resultaten van onderzoek uit Engeland geven aan dat pepinomozaïekvirus vooral een effect heeft op de kwaliteit van de vruchten en daarvoor aanzienlijke economische schade zorgt omdat de afnemers niet of nauwelijks betalen voor een lagere klasse

Uit diverse publicaties over pepinomozaïekvirus blijkt dat de uiting van symptomen afhankelijk zijn van de omstandigheden waarbij de plant staat. In Spanje laten planten die geïnfecteerd zijn met pepinomozaïekvirus symptomen zien vanaf de herfst tot en met de lente daarna verdwijnen ze bij een hogere lichtintensiteit en temperaturen. Inmiddels zijn een aantal isolaten van pepinomozaïekvirus beschreven, met duidelijke verschillen in hun genetisch materiaal, die



Figuur 6. Necrose op jonge vruchten.

heftige symptomen op blad, vrucht en stengel veroorzaken. Echter, het is nog niet bekend welk verschil (of welke verschillen) daar voor verantwoordelijk is (of zijn).

Naast een infectie met alleen pepinomozaïekvirus kan er ook een combinatie voorkomen met *Verticillium*. Uit onderzoek hierover is bekend dat met bepaalde *Verticillium*-soorten verwelkingssymptomen kunnen optreden. Met name als er een vroege (januari) infectie met *Verticillium* heeft plaatsgevonden gevolgd door een latere (mei/juni) infectie met pepinomozaïekvirus dat verzwakt de plant zodanig dat planten zelfs dood kunnen gaan.

Virusverspreiding en overdracht

Pepinomozaïekvirus is een mechanisch overdraagbaar virus. De overdracht van dit virus vindt met name plaats bij gewashandelingen als dieven, draaien en oogsten. Maar ook via besmet materiaal zoals mesjes, scharen, kleding, sieraden en fust is verspreiding mogelijk. Het virus kan gemakkelijke enige weken overblijven in gewasresten zoals bladeren, wortels en vruchten.

In principe speelt zaadoverdracht bij pepinomozaïekvirus geen rol. Op basis van EC directive 2004/200/EC is het binnen de EU verboden om zaden te verhandelen die afkomstig zijn van planten die met pepinomozaïekvirus zijn geïnfecteerd of officieel getest op de afwezigheid van PepMV. Theoretisch is de kans dat het virus met het zaad meekomt zeer gering en zou zich alleen voor kunnen doen als men zich niet aan de regels houdt. In on-



Figuur 7. Wankleurigheid ten gevolge van PepMV.

derzoek is ooit vastgesteld dat in partijen slecht geschoond zaad pepinomozaïekvirus kan voorkomen. Het is echter niet duidelijk geworden dat dit tot een infectie van zaailingen leidt. In de praktijk zal dit nooit een grote rol spelen omdat de kans op een mechanische verspreiding vele malen groter zal zijn.

Uit onderzoek is gebleken dat hommels in staat zijn het virus over te brengen maar dit moet meer gezien worden als een mechanische verspreiding dan dat hommels werkelijk een vector zijn van het virus. Bij witte vlieg is helemaal geen overdracht vastgesteld en bij *Macrolophus* (roofwants) alleen onder proefomstandigheden. Virusoverdracht door *Macrolophus* afkomstig van een besmet bedrijf kon niet worden aangetoond.

Mogelijke oplossingen van het virusprobleem

Omdat het virus niet direct te bestrijden is zal een aantasting moeten worden voorkomen of

verspreiding worden tegengegaan. Dit kan alleen met het nemen van verschillende hygiëne maatregelen.

In 2000 (en herzien in 2001) is een Hygiëneprotocol Tomaat opgesteld en bevat vele maatregelen die zijn opgesteld als richtlijn voor toepassing op individuele bedrijven. Een teeltwisseling is de juiste periode om van een virusprobleem af te komen. Belangrijkste is dat hiervoor voldoende tijd wordt genomen omdat er heel veel moet gebeuren. Voor een gedegen aanpak is het gebruik van het protocol noodzakelijk. Dat begint met een duidelijke instructie aan het personeel en een controle op het juist handhaven van het protocol door iedereen. Heel belangrijk is dat als een bedrijf leeg en ontsmet is de deur ook letterlijk op slot moet. Gedurende de teelt zal daarom een zeer streng beleid gevoerd moeten worden wie op het bedrijf naar binnen mag. Een gezamenlijke aanpak over tijdstip teeltwisseling en start teelt bijvoorbeeld per straat, buurt of plaats zou aan te raden zijn.

In het verleden zijn goede re-

sultaten behaald met het toepassen van een zwakke stam van tomatenmozaïekvirus. Dit gaf een goede bescherming tegen de effecten van een besmetting met een sterke stam van tomatenmozaïekvirus. Toepassing van een zwakkere stam voorkomt echter niet een besmetting met een sterke stam.

De laatste tijd is meerdere malen geopperd dat een zwakke stam van pepinomozaïekvirus mogelijk ingezet zou kunnen worden om schade door sterke stammen van het virus te beperken. Het is op dit moment onduidelijk of een dergelijke strategie voor pepinomozaïekvirus toepasbaar zal zijn.

Resistentie zou de meest eenvoudige oplossing voor het probleem kunnen zijn maar is helaas nog geen optie omdat er nog geen enkele vorm van resistentie geïdentificeerd is. Alleen transgene resistentie zou een duurzame oplossing bieden maar is in de praktijk geen optie.

Welke maatregelen dragen bij aan een oplossing ?

Een oplossing voor de problemen met pepinomozaïekvirus zullen een flinke inspanning vergen. Om te beginnen is het van het grootste belang dat be-

drijven schoon moeten beginnen en ook schoon moeten blijven. Schoon beginnen is goed mogelijk omdat zaailingen en planten bij de plantenkwekers in het algemeen gezond zijn en controle al een onderdeel van het kwaliteitssysteem is. Schoon blijven zal voor individuele tuinders een grotere uitdaging zijn. Omdat het virus al wijd verspreid is, zal de kans op een nieuwe besmetting aanzienlijk zijn. Snel herkennen en direct verwijderen van nieuwe besmettingen moet een hoge prioriteit hebben. Een snelle dip-stick test voor pepinomozaïekvirus die enige jaren geleden door PRI is ontwikkeld kan daarin een rol spelen. De test op het virus geeft niet alleen binnen twintig minuten uitsluitel maar kan ook op het bedrijf zelf uitgevoerd worden zodat de kans op verspreiding van het virus geminimaliseerd wordt. Na het vaststellen van een infectie moet direct de infectiebron(nen) worden verwijderd. Dit zal consequent volgehouden moeten worden en daarbij zal training en bewustwording van het personeel een grote rol in spelen.

Nieuwe gevaren voor de tomatenteelt

Omdat pepinomozaïekvirus inmiddels over de hele wereld voorkomt en zich vaak onopgemerkt kan verspreiden via

fust en besmette vruchten blijft het gevaar bestaan dat er nieuwe en andere stammen van pepinomozaïekvirus in de teelt van tomaten binnenkomen.

De praktijk van de afgelopen jaren heeft al laten zien dat het virus niet alleen in de loop van de tijd verandert maar ook dat er verschillende stammen van pepinomozaïekvirus in dezelfde plant terecht kunnen komen. Dat heeft in Spanje al tot recombinanten geleid. Of die tot nog ernstiger problemen zullen leiden moeten we afwachten. Het is nog lang niet duidelijk hoe de verschillende stammen van het virus over de verschillende landen precies verspreid zijn. Het is te verwachten dat de US2 stam en pepino stam ook in andere landen buiten Spanje voorkomen.

Het is duidelijk dat de problemen rond pepinomozaïekvirus niet vanzelf zullen verdwijnen. Of pepinomozaïekvirus ook op de lange termijn een probleem zal blijven zal afhangen van de ruimte die het virus krijgt. Alle partijen zullen daarin hun verantwoordelijkheid moeten nemen.

Dit artikel is ondermeer gebaseerd op Nederlands onderzoek dat bij PPO en PRI is uitgevoerd en is gefinancierd door Productschap Tuinbouw.

Serologie en diagnostiek: een oud verbond in een nieuw jasje

José van Beckhoven, Paul Piron, Jan Vink en René van der Vlugt

Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen; Jose.vanBeckhoven@wur.nl

Inleiding

Diagnostiek van plant pathogenen met behulp van serologische diagnostica is in Nederland al vele tientallen jaren een standaard technologie. Het is een van de pijlers onder ons intensieve en hoogstaande keurings- en kwaliteitssysteem en heeft als zodanig duidelijk bijgedragen aan de voor- aanstaande positie die Nederland op agrarisch gebied inneemt. Ondanks de toenemende belangstelling voor moleculair biologische detectiemethoden in de laatste tien jaar, vindt het merendeel van de keuringen bij de Nederlandse Keuringsdiensten en bedrijven nog steeds plaats met behulp van detectiemethoden gebaseerd op antisera. Prime Diagnostics®, onderdeel van Plant Research International BV, is binnen Nederland een van de grootste leveranciers van deze serologische reagentia. Het producten pakket bestaat op dit moment voornamelijk uit polyclonale antisera gericht tegen plantenvirussen (58) en plantpathogene bacteriën (32). Voor meer informatie zie ook de website op www.primediagnosics.nl.

De handel in planten en plantmateriaal is sterk geïnternationaliseerd waardoor ook de dynamiek van plantenziekten is veranderd. De wensen van

klanten op het gebied van diagnostiek veranderen daarin mee. Voor Prime Diagnostics staan een goede aansluiting op wat de klant nodig heeft en een verbreding van het productenpakket centraal. In dit artikel wordt de huidige stand van zaken met betrekking tot toetsing, productontwikkeling en nieuwe technologieën binnen Prime Diagnostics toegelicht.

Serologie zoals het was en nog is

De vroegtijdige en betrouwbare detectie van plant pathogenen in diverse gewassen en uitgangsmaterialen is een van de voorwaarden voor de productie van gezond uitgangsmateriaal in Nederland en het waarborgen van de kwaliteit van exportmateriaal. Sinds jaar en dag worden hiervoor serologische methoden (met name ELISA) gebruikt. Deze methoden zijn simpel uit te voeren, kunnen gemakkelijk geautomatiseerd worden (zodat ook daadwerkelijk enige honderdduizenden monsters in een korte tijd getoetst kunnen worden), zijn relatief erg goedkoop en hebben bovendien een hoge specificiteit voor het doel pathogeen. Nieuwere moleculair biologische methoden bieden meestal wel een hogere gevoeligheid maar tegen een duide-

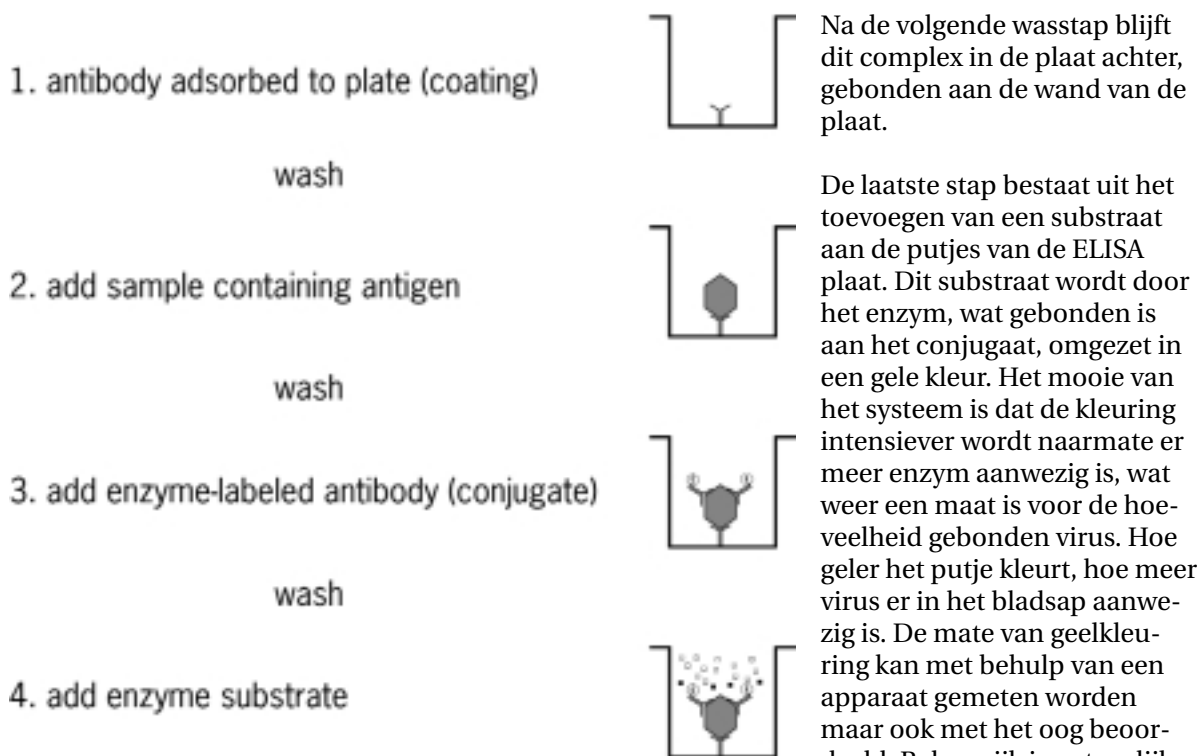
lijk hogere prijs. Monstervoorbereiding kost veel meer tijd waardoor niet alleen de prijs van de test aanzienlijk toeneemt maar de test ook veel minder geschikt wordt om grote aantallen te testen. Het 'scoren' van de uitslag is meestal een stuk bewerklijker dan voor ELISA en de robuustheid laat soms nog te wensen over. In de praktijk is een hogere gevoeligheid niet altijd noodzakelijk of een pré en hebben en een lage kostprijs en een grote toetscapaciteit vaak een doorslaggevende betekenis. Serologische detectiemethoden en m.n. ELISA worden daarom nog steeds veel toegepast binnen de agrarische sector.

Een van de eerste vereisten voor de ontwikkeling van een optimale serologische detectiemethode is de beschikbaarheid van een zuiver en specifiek antiserum. Dit kan alleen gemaakt worden al je in staat bent om het plantpathogeen waartegen je het antiserum wilt opwekken (in dit geval meestal een plantenvirus of plantpathogene bacterie) zuiver in handen te krijgen. Met name voor plantenvirussen geldt dat daar de nodige kennis en kunde voor nodig is. Kennis die in Nederland helaas niet meer breed voorhanden is.

Alleen met behulp van zuivere antigenen kunnen antisera

ARTIKEL

ELISA



Figuur 1. Schematische weergave van het principe van ELISA.

ontwikkeld worden die voldoende specifiek en gevoelig zijn. Met behulp van deze antigenen worden momenteel met name polyclonale en monoclonale antisera geproduceerd. Deze antisera worden vervolgens vooral gebruikt voor detectie van virus en bacterie met behulp van Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA). In figuur 1 wordt deze techniek schematisch toegelicht.

In een eerste stap worden het zogenaamde coating antilichaam aan een well in een 96-wels ELISA-plaat geplakt ('gecoat'). Dit antilichaam herkent specifiek een pathogeen (bijvoorbeeld aardappel virus Y). Na het wegwassen van niet gebonden antilichaam, wordt de plaat gevuld met sap van de te toetsen plant. Meestal wordt dit gemaakt door een of meerdere blaadjes fijn te malen samen met wat buffer en het sap

op te vangen. Door in elk putje van de ELISA plaat sap van een andere plant te brengen kunnen er meerdere planten tegelijk op een ELISA plaat getest worden. Het sap wordt dan enige tijd (meestal overnacht) in de putjes gelaten waarbij het eventueel aanwezige virus de tijd krijgt om aan het coating antilichaam te binden.

De putjes in de plaat worden weer gewassen waarna het virus gebonden aan het coating antilichaam aan de plaat gebonden overblijft.

De volgende stap bestaat dan uit het toevoegen van zgn. conjugaat. Dit is het antilichaam tegen aardappelvirus Y maar dan middels een chemische reactie gekoppeld aan een enzym; alkalisch fosfatase (AP). Weer herkent het antilichaam het virus en er vormt zich een "sand-

wich' van virus ingeklemd tussen twee antilichaam moleculen.

Na de volgende wasstap blijft dit complex in de plaat achter, gebonden aan de wand van de plaat.

De laatste stap bestaat uit het toevoegen van een substraat aan de putjes van de ELISA plaat. Dit substraat wordt door het enzym, wat gebonden is aan het conjugaat, omgezet in een gele kleur. Het mooie van het systeem is dat de kleuring intensiever wordt naarmate er meer enzym aanwezig is, wat weer een maat is voor de hoeveelheid gebonden virus. Hoe geler het putje kleurt, hoe meer virus er in het bladsap aanwezig is. De mate van geelkleuring kan met behulp van een apparaat gemeten worden maar ook met het oog beoordeeld. Belangrijk is natuurlijk wel het meenemen van positieve en negatieve controles in de test.

DAS-ELISA is zeer geschikt voor het toetsen op virusinfecties in een veelheid van gewassen maar wordt minder toegepast voor het aantonen van bacterie-infecties in plantmateriaal. Bij de detectie van bacterieziekten speelt de immunofluorescentie koloniekleuring (IF) een belangrijke rol. Bij IF worden antilichamen gelabeld met een fluorescent label in plaats van met alkalisch fosfatase zoals bij ELISA. Deze fluorescent gelabelde antilichamen worden gebruikt om hele bacteriën te kleuren door ze te incuberen met plantmateriaal of bacteriën op een voedingsbodem. Op deze manier kan een monster zowel morfologisch als serologisch beoordeeld worden op de aanwezigheid van specifieke bacteriën. Bovendien is het bij IF mogelijk om verschillende

antilichamen met verschillende fluorescente labels te conjugeren waardoor verschillende target antigenen in een mengsel gedetecteerd kunnen worden.

Serologische innovaties

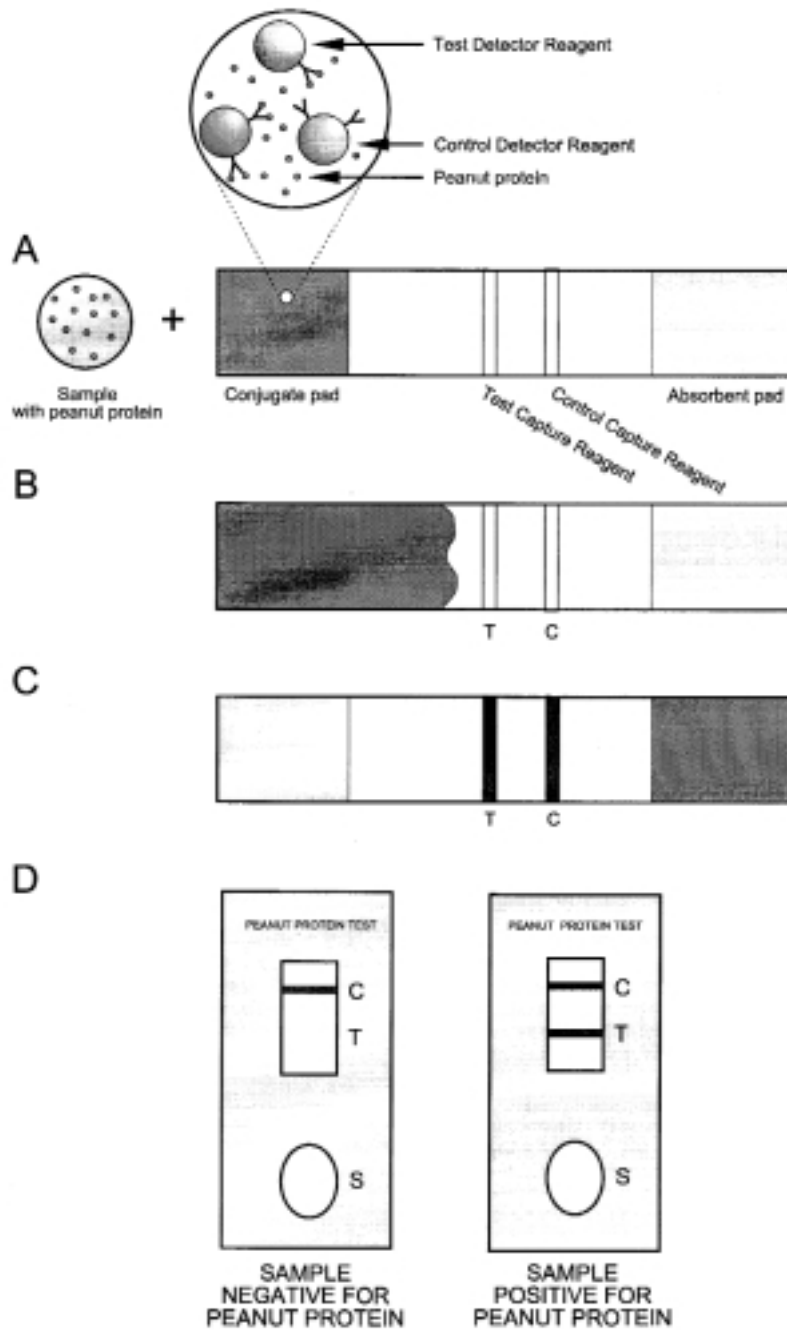
Een nadeel van de conventionele methodes voor de ontwikkeling van reagentia zoals hierboven is weergegeven is dat niet tegen alle gewenste pathogenen een antilichaam ontwikkeld kan worden. Een aantal virussen kan niet in voldoende hoeveelheden gezuiverd worden, bacteriën zijn niet altijd kweekbaar of het blijkt onmogelijk een antilichaam te produceren dat voldoende specifiek of reactief is. Nieuwe methoden kunnen dan wellicht een oplossing bieden.

Van steeds meer virussen en bacteriën komen gegevens over hun RNA of DNA en hun eiwitten beschikbaar. Wanneer zulke eiwit sequenties bekend zijn van delen van een virus of bacterie is het mogelijk deze gegevens te gebruiken voor de productie van een antigeen eiwit of peptide. Het gaat hier dan vaak om delen van de buitenkant van een virusdeeltje ('manteleiwit') of buitenmembraan van een bacterie. Een gedegen analyse van de beschikbare informatie van zoveel mogelijk stammen of isolaten van een virus of een bacterie geeft dan inzicht in welk stuk met best bruikbaar zou kunnen zijn. Een peptide wordt gesynthetiseerd aan de hand van de meest optimale sequentie en kan na koppeling aan een dragereiwit gebruikt worden als antigeen voor het antiserum productie. Voorwaarde hiervoor is dat het peptide vol-

doende immunogeen en bereikbaar moet zijn voor eventuele binding aan het specifieke antilichaam. Het antilichaam wat op deze ma-

nier geproduceerd wordt lijkt een beetje op een monoclonaal. Het is immers gericht tegen een heel specifiek eiwitmotief. Kleine veranderingen

PRINCIPLE OF THE LATERAL FLOW TEST



Figuur 2. Het principe van de lateral flow test uitgelegd a.d.h.v. de detectie van een allergie opwekkend eiwit uit pinda. A: De test strip met daarop het aan het goudbolletje gekoppelde antilichaam tegen het pinda-eiwit ('test detector reagent') en de twee detecterende antilichaamlijntjes. B: het te testen sap trekt over de test strip. C: Het antilichaamcomplex met de goudbolletjes is blijven plakken op het detectielijntje en wordt zichtbaar als een donker gekleurde lijn. D: makkelijk af te lezen testuitslag.

ARTIKEL

in het motief op de buitenkant van het virus of bacterie kunnen dan al snel leiden tot het niet meer herkennen door het antilichaam. Vals-negatieve toetsuitslagen zijn dan het gevolg.

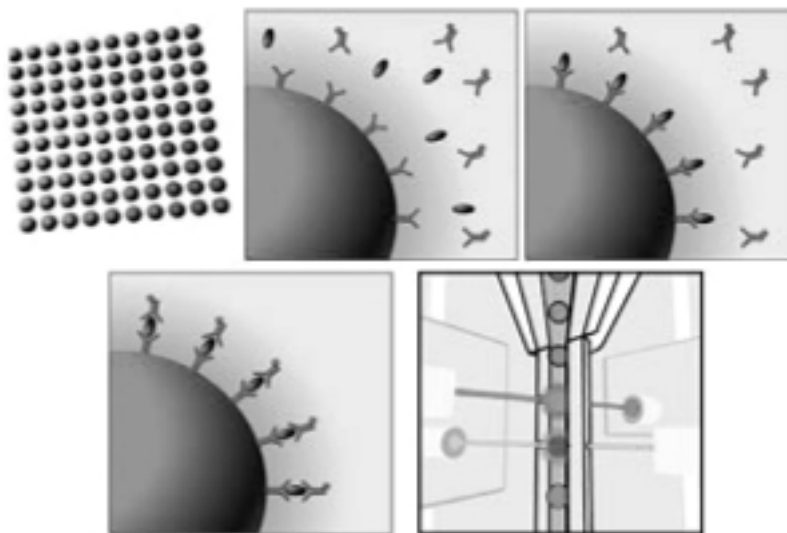
De keuze van de sequentie die gebruikt wordt voor het synthetisch peptide bepaald uiteindelijk hoe specifiek of hoe algemeen het antiserum kan worden. Op dit moment onderzoekt Prime Diagnostics of het op deze manier mogelijk is een antiserum te maken dat (vrijwel) alle potyvirusen herkent. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een viruseiwit dat alleen gemaakt wordt in geïnfecteerde cellen. Dit eiwit blijkt bepaalde motieven te bezitten die gelijk zijn voor alle potyvirusen waarvan die eiwitsequentie op dit moment bekend is. Theoretisch moet het dus mogelijk zijn om tegen deze geconserveerde motieven antiserum te maken die dan alle potyvirusen zullen herkennen. Het onderzoek is nog niet zo

lang geleden gestart en de eerste antisera zijn beschikbaar. De eerste testresultaten zijn bemoedigend maar het zal nog wel enige tijd duren voordat het duidelijk is of ze ook in de praktijk toegepast kunnen worden.

Een andere strategie voor de productie van antilichamen gericht tegen antigenen die moeilijk te zuiveren zijn is de Phage Display (PhD). Met behulp van deze methode kan via moleculair biologische technieken vrijwel elk gewenst antilichaam in *E.coli* (een bacterie) of gist tot expressie worden gebracht. Ook een antilichaam is een eiwit en wordt uiteindelijk gecodeerd door een gen. Op dit moment zijn er verschillende zogenaamde PhD banken ('libraries') beschikbaar. Dit zijn verzamelingen van genen die coderen voor antilichamen) Via slimme technieken is het mogelijk om precies dat gen op te sporen in de bank wat codeert voor het antilichaam dat reageert met jouw

pathogeen. Dat gen wordt dan tot expressie gebracht en kan na zuivering voor toetsing gebruikt worden.

De Phage Display technologie is echter nog sterk in ontwikkeling. Er zijn diverse problemen en met name de reactiviteit en stabiliteit van de antilichamen verdient nog de nodige aandacht. De techniek wordt momenteel vooral gebruikt om de productie van antilichamen gericht tegen schimmels van de grond te krijgen. Met conventionele technieken is het onmogelijk gebleken om goede antisera tegen schimmels te maken. Omdat veel schimmels ongeveer dezelfde oppervlaktegroepen en -structuren hebben, leidt dit tot onaanvaardbare kruisreacties. Uit eerder door LNV gefinancierd onderzoek zijn inmiddels wel al een aantal Phage Display antilichamen beschikbaar gekomen, die gericht zijn tegen virus en bacterie. Hoe bruikbaar deze antilichamen in de praktijk zullen zijn is momenteel nog niet bekend.



Figuur 3. Schematische weergave van het principe van de Luminex®. Een uniek gekleurd nanobolletje fungeert als drager voor een antilichaam. Na specifieke binding van een pathogeen aan het antilichaam gevolgd door binding van het conjugaat met een fluorescent label wordt het mengsel langs twee lasers geleid. Die kijken welk bolletje voorbijkomt en of er op dat bolletje een fluorescent signaal van het conjugaat aanwezig is; een maat voor de aanwezigheid van het pathogeen.

Nieuwe technieken

DAS-ELISA en Immunofluorescentie zijn goed ingeburgerde serologische technieken. Met name hun robuustheid en lage prijs maakt ze onverminderd populair. Toch zijn beide technieken redelijk bewerkelijk ondanks het feit dat door robotisering wel enige snelheidswinst te behalen valt. Daarvoor moeten er echter wel voldoende tests op jaarbasis uitgevoerd worden. Voor grote bedrijven en keuringsdiensten meestal niet zo'n probleem maar voor veel kleine bedrijven niet realiseerbaar.

Een van de beschikbare snelle alternatieve testmethoden is

de zgn. dipstick test. Deze test lijkt sprekend op de welbekende zwangerschapstest waarbij het verschijnen van een gekleurde lijn of stip uitsluitend geeft over goed of slecht nieuws. Beide testen zijn dan ook gebaseerd op hetzelfde, gepatenteerde principe, de zogenaamde 'lateral flow' (zie figuur 2). Een vloeistof met daarin de aan te tonen stof (zwangerschapshormoon of virus) wordt op een papieren strip gebracht. Op de plaats waar de vloeistof op de strip gebracht wordt komt het in aanraking met een voor de stof specifiek antilichaam, gekoppeld aan goudbolletjes. Het virus bindt aan het antilichaam en vormt een complex. Door capillaire werking zal het vocht met daarin het complex zich door de strip verplaatsten. Hierbij passeert het een lijn van antilichamen ook gericht tegen het virus. Het complex van virus met antilichaam en goudbolletjes blijft dan als het ware hangen op de lijn. Hierbij neemt de plaatselijke concentratie van goudbolletjes zodanig toe dat ze uiteindelijk als een lijn zichtbaar worden. Een positieve controlelijn (die altijd moet verschijnen) is in de test ingebouwd. Uitvoering van een dergelijke test duurt in de praktijk niet langer dan vijftien minuten zonder dat er ingewikkelde apparatuur nodig is. Terecht dat dit type test ook wel snelle veldtest genoemd wordt.

Een groot nadeel is echter hun prijs. Met vijf tot zeven euro per test zijn ze vele malen duurder dan een standaard DAS-ELISA test. De hoge prijs, vooral veroorzaakt door hoge productiekosten, staat grootschaliger toepassing in de weg. De afzet blijft daarom beperkt en rechtvaardigt geen investeringen in goedkopere productiemethoden.

Simplex vs. multiplex detectie

Een van de kenmerken van bovenstaande technieken is dat steeds een enkel pathogeen per test wordt gedetecteerd. Een multiplex detectie waarbij verschillende pathogenen in een en dezelfde test worden aangetoond wordt binnen het ELISA-format wel toegepast maar heeft nog de nodige haken en ogen. Met name de gevoeligheid neemt af in vergelijking met de standaard ELISA. De introductie van een nieuwe techniek, de Luminex[®] biedt echter nieuwe perspectieven op het gebied van serologische multiplex detectie. De basis van de Luminex[®] technologie vormen speciale nanobolletjes. Door toevoeging van heel speciale kleurstoffen tijdens de productie van de nanobolletjes worden tot wel honderd verschillende typen bolletjes gemaakt. Deze kunnen door een speciale laser van elkaar onderscheiden worden. Voor Luminex[®] worden bestaande antilichamen gekoppeld aan deze nanobolletjes, één bepaald antiserum aan één bepaald type (=kleur) nanobolletje. De bolletjes met daaraan gekoppeld de antilichamen, worden gemengd met bijvoorbeeld plantsap waarin het te detecteren pathogeen voorkomt. Het pathogeen bindt dan aan het antilichaam. (zie figuur 3). Vervolgens worden specifieke antilichamen met een fluorescent label (het conjugaat) aan het mengsel toegevoegd die weer aan het pathogeen binden. Het principe van de Luminex[®] is daarmee gelijk aan DAS-ELISA, alleen fungeert hier het nanobolletje als vaste drager en niet een plastic putje van een ELISA plaat. Een bijkomend voordeel is ook dat de bolletjes zo klein zijn dat ze in oplossing blijven. Daarmee

wordt het oppervlak waarop het pathogeen kan binden enorm vergroot.

Detectie van het pathogeen vindt uiteindelijk plaats door de vloeistofstroom via een dunne buis langs twee lasers te leiden. Een laser kijkt naar de kleur van het bolletje dat langskomt. Uit de kleur van het nanobolletje volgt welk pathogeen aan dat bolletje gebonden kan worden. De tweede laser bekijkt of er een fluorescent signaal van het conjugaat op het bolletje aanwezig is. Zo ja dan is daarmee de aanwezigheid van het pathogeen aangetoond. Tenslotte kan uit het aantal bolletjes met een positief fluorescentie signaal ook nog eens de hoeveelheid pathogeen afgeleid worden.

De antilichamen die voor Luminex[®] worden gebruikt zijn dezelfde als degenen die in ELISA gebruikt worden. Dit maakt niet alleen dat er geen nieuwe antilichamen voor deze techniek nodig zijn maar ook dat de specificiteit van beide methoden vergelijkbaar is. De meeste voordelen die voor ELISA gelden, gelden ook voor Luminex[®]. De monsterbereiding voor de Luminex[®] is identiek aan die voor ELISA en ook de logistiek van beide detectiemethoden is vrijwel gelijk. De Luminex[®] is eveneens gemakkelijk te automatiseren en de gegevensverwerking kan individueel aangepast worden. Het grootste voordeel van de Luminex[®] ten opzichte van ELISA is dat de techniek vele malen sneller is (binnen een uur zijn de resultaten bekend) en dat er op de aanwezigheid van meerdere pathogenen tegelijk in hetzelfde plantsap getoetst kan worden. Een echte multiplex test dus. De kosten van een Luminex[®] test zijn weliswaar op dit moment nog iets hoger dan die van ELISA maar nog steeds

ARTIKEL

aanzienlijk lager dan die van een moleculair biologische test.

De Luminex® wordt binnen de plantaardige sector momenteel vooral nog op onderzoeksniveau toegepast. Op laboratoriumschaal is het inmiddels mogelijk gebleken om vijf verschillende pathogenen van aardappel, zowel virus als bacterie, tegelijkertijd aan te tonen (zie figuur 3).

In deze test werden dus vijf verschillende nanobolletjes, elk gecoat met een eigen specifiek antiserum gelijktijdig met de vijf verschillende

conjugaten geïncubeerd in zieksap van aardappelschillextracten. Na een incubatie van een uur en een korte wasstap werd het sap doorgemeten op de Luminex machine.

Momenteel wordt er hard gewerkt aan de ontwikkeling van een Luminex® kit die voor de praktijk bruikbaar zal zijn. Diverse partijen hebben al serieus belangstelling getoond. Deze kit zal vooral gericht zijn op de gelijktijdige detectie van verschillende aardappelvirussen in plantextracten.

Ter afsluiting

Serologische detectie van virussen en bacteriën heeft zich de afgelopen decennia bewezen als goedkoop, robuust en betrouwbaar. Door de zeer snelle ontwikkelingen de afgelopen jaren op het gebied van moleculaire detectietechnologieën, waarbij vooral veel aandacht uitging naar vergroting van de gevoeligheid, was volgens sommigen de serologische detectie eigenlijk afgeschreven. Het bovenstaande heeft wel duidelijk gemaakt dat er ook voor de serologische detectie van virussen en bacteriën nog volop nieuwe mogelijkheden en kansen liggen.

Gezond verstand, waar is het gebleven?

Aan de Costa Blanca lezen wij 'de Telegraaf'. Ik schrijf dit enigszins gegeneerd, maar we kunnen niet anders. Het is de enige Nederlandse krant die hier gedrukt wordt en is dus echt een dagelijkse krant. Jongeren in Nederland lezen geen krant meer, maar wij zijn er aan gehecht, al kijken we bijna iedere avond ook nog naar het NOS Journaal. Ik ben dus wel wat gewend, wat betreft sensatie en platvloers vertier! Zou het mijn denkvermogen aantasten?

Ik heb met ergernis de discussies enige tijd geleden gevolgd over de bodemdaling van de Waddenzee als gevolg van de gaswinning in de provincie Groningen. Dat er in Oost Groningen kleine aardbevingen zijn omdat de grond zich moet zetten, en dat er gevolgen zijn voor de woningen daar, betwijfel ik niet. Maar dat er gevolgen voor de Waddenzee zelf zouden zijn, daar geloof ik niets van! Je hoeft toch werkelijk niet bijzonder kritisch te zijn om te begrijpen dat een bodemdaling van de Waddenzee met zelfs enkele centimeters geen enkel effect heeft. In zo'n tumultueus milieu als de Waddenzee worden een paar centimeter per zoveel jaar gecorrigeerd door andere slibafzettingen, verschuivende zandbanken en nieuwe geultjes. Lange, zelfs korte termijn effecten, nihil!

Van recentere datum is het gedoe over het fijn stof. Ik zag een paar maanden geleden met verwondering de kaartjes in de krant over de vervuiling door fijn stof in Europa. De grootste vervuiling vond plaats in Zuid-

west-Nederland. Dit als gevolg van de industrie, het verkeer, de bewoning en de westelijke winden. Hoezo? De regio Londen heeft bijna evenveel bewoners als heel Nederland, er is daar evenveel industrie en er zijn nog veel meer auto's. En Parijs? En het Ruhr-gebied? En de Plovlakte in Noord-Italië? Nergens waren die regio's zo zwart ingekleurd als dat deel van ons land. Als gevolg van wat ik gedoe noemde werden belangrijke bouwactiviteiten in de randstad gestopt, plannen opgeschort, enz. Kennelijk dachten weinig mensen wat ik dacht: dit kan toch niet waar zijn? Ergens moet er toch een fout in dit verhaal zitten? Inmiddels is bekend gemaakt dat het overwegend natuurlijk zeezout is dat binnen waait en dus is de bouw hervat! Waarom wordt zoiets niet direct bedacht? Als ik er niet in geloof, moeten er toch een paar miljoen mensen zijn, waarvan een paar op een in dit verband cruciale plaats, die dat ook niet geloven?

De kernenergie laat ik maar even, daar zit een kentering in en bovendien is er natuurlijk al lang een oplossing voor het zogenaamde 'opslagprobleem'.

Aan genetische modificatie begin ik in deze column ook maar even niet, hoewel dat er heel goed in zou passen en ik er na tien jaar actieve deelname in de subcommissie Planten van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM), best iets over zou kunnen zeggen.

In januari berichtte de Consumentenbond dat biologische groentes niet gezonder zijn

dan gewone; dit bericht sloeg zogenaamd in als een bom! Alsof we dat al niet lang wisten!

Recent was er een gebrek aan kritisch vermogen dat wel heel dicht bij ons als plantenziektkundigen staat en op termijn een grote invloed op ons werkgebied kan hebben. Het moselzaad uit de Ierse zee! Het mag niet meer naar Nederland gebracht worden om in de Oosterschelde uitgezet te worden in verband met de risico's. Niet dat er een soort van quarantaine ziekte zou zijn. Neen, alleen maar het feit dat er materiaal uit een niet-Nederlandse omgeving naar Nederland gebracht wordt. Alsof er geen schepen heen en weer varen tussen Nederland en de Ierse zee, alsof er geen zeestromingen zijn die van nature al water uit die regio langs de Nederlandse kust laat stromen, alsof er geen vissen en zoogdieren actief tussen die zeeën heen en weer zwemmen! Is er dan iets ernstigs gebeurd? Neen, dat niet, maar het zou kunnen (!).

Dat belooft nog wat voor onze import en export van land- en tuinbouwproducten. Als de bouw stil gelegd kan worden in West Nederland, kan dat met de handel in agrarische producten ook wel! Milieuorganisaties zijn machtig, dat wisten we al. Einde import van meloenen, appels en groente uit Zuid Amerika, einde import van sinaasappelen uit Spanje, Marokko en Zuid Afrika, einde import van bloemen uit Kenya en Tanzania, einde import van narcissen uit Engeland? Wat kan daar wel allemaal niet opzitten? Lopen we niet een ge-

COLUMN

weldig groot risico? Moet ons
hoogste gerechtshof daar niet
eens naar kijken en er een uit-
spraak over doen? En onze ex-
port! Gedragen we ons niet

volstrekt onverantwoordelijk
naar onze afnemende landen?

Waar is het gezonde verstand?
Waar is ons kritisch vermogen?

Of moet ik toch maar ophou-
den 'de Telegraaf' te lezen?

Paul van Halteren
(p.van.halteren@planet.nl)

Lidmaatschap van de KNPV

Het lidmaatschap biedt u:

- Vrije deelname aan de gewasbeschermingsdagen
- Gratis abonnement op 'Gewasbescherming'
- Deelname aan de algemene ledenvergaderingen met stemrecht; statuten worden op verzoek toegezonden
- Mogelijkheid van een collectief abonnement (tegen gereduceerd tarief) op het European Journal of Plant Protection

Het lidmaatschap loopt van 1 januari tot en met 31 december. Bij tussentijdse toetreding is een evenredig ge-
deelte van de contributie verschuldigd.

Opzeggen van het lidmaatschap dient voor 1 december schriftelijk te geschieden.

Aanmeldingen:

Mevr. M. Roseboom

Adm. Koninklijke Nederlandse Plantenziektkundige Vereniging,

Postbus 31,

6700 AA Wageningen

E-mail: m.roseboom2@chello.nl

Het secretariaat van de KNPV is telefonisch bereikbaar op 0317-483654

Als nieuw lid ontvangt u als welkomstgeschenk de 'Lijst van Gewasbeschermingskundige Termen' (verkoop-
prijs € 12,50). Na acceptatie door het bestuur volgt een acceptgiro



of copie

Ondergetekende meldt zich aan als:

	Nederland/België	Overige landen
<input type="checkbox"/> Gewoon lid van de KNPV	€ 25,-	€ 35,-
<input type="checkbox"/> Gewoon lid van de KNPV inclusief een abonnement op het EJPP	€ 159,-	€ 169,-
<input type="checkbox"/> Lid-donateur van de KNPV	€ 65,-	

Naam : _____

Straat : _____

Postcode : _____ Plaats : _____

Land : _____

Datum : _____ Handtekening : _____

Verenigingsnieuws

Samenvattingen van de 74e bijeenkomst van de werkgroep Bodempathogenen en bodemmicrobiologie KNPV, bijeenkomst op 30 maart 2006 in Lelystad

Immigreren In Internet – Het werven en opleiden van plantenziektkunde-studenten in Nederland

Jan-Kees Goud

Stichting Willie Commelin Scholten voor de Fytopathologie (WCS), Sorbonnelaan 16, 3584 CA Utrecht en de Koninklijke Nederlandse Plantenziektkundige Vereniging (KNPV), Postbus 31, 6700AA Wageningen, e-mail Jan-Kees.Goud@wur.nl

Als gevolg van teruglopende studentenaantallen is het plantenziektkundig onderwijs aan Nederlandse universiteiten en HBO-instellingen de laatste tien jaar sterk ingekrompen. Grofweg kan gesteld worden dat meer dan zestig procent van het onderwijsaanbod op dit gebied is verdwenen. Op korte termijn dreigt deze onderwijskennis verloren te gaan en op de lange termijn leidt dit tot een tekort aan goed opgeleide plantenziektkundigen.

In een project dat gesponsord wordt door WCS en KNPV samen, wordt geprobeerd om deze ontwikkeling te stuiten. Omdat voor jongeren het internet de belangrijkste informatiebron is, wordt er een aantrekkelijk uitziende website ontwikkeld die tot doel heeft interesse op te wekken bij VWO-scholieren voor het vakgebied gewasbescherming (www.plantenziektkunde.nl). Op deze website komt veel goede informatie over plantenziekten, nieuws, de invloed van plantenziekten op de maatschappij, een plantenziekten top 10, links en informatie voor studiekeuzers. Onderwerpen voor profielwerkstukken kunnen gebruikt worden in het middelbaar onderwijs biologie. Deze website dient als basis voor het schrijven van korte (elektronische) publicaties. Een soortgelijke website (in het Engels) komt ook beschikbaar

voor studenten die zich oriënteren voor het doen van een afstudeervak of stage. Hier ligt de nadruk op samenvattingen van het wetenschappelijk gewasbeschermingsonderzoek in Nederland en de mogelijkheden om daaraan zelf mee te werken. Ook is er aandacht voor epidemiologische computersimulaties. Een extra aandachtspunt binnen het project is het vastleggen en beschikbaar maken van gewasbeschermingscursussen. Vooral cursussen die niet meer gegeven worden en waarvoor de beschikbare kennis en materialen nog aanwezig zijn, kunnen op die manier (inter-) nationaal beschikbaar gemaakt worden voor studenten, om te specialiseren of kennis bij te spijkeren en voor docenten om te gebruiken in bestaand onderwijs.

Onderzoekers en docenten kunnen aan het project bijdragen door het aanleveren van foto's, het samenvatten van eigen onderzoek in een mini-publicatie gericht op jongeren en/of studenten en het toevoegen van lesstof.

Schimmel-bacterie interacties: bacteriegemeenschappen geassocieerd met witrotschimmels

L.B. Folman, P. Klein Gunnewiek, en
W. de Boer

NIOO-CTE, Boterhoeksestraat 48, 6666ZG Heteren,
The Netherlands

De afbraak van recalcitrant organisch materiaal zoals cellulose en lignine wordt gedomineerd door schimmels, die er -extracellulair- wateroplosbare koolhydraten en phenolische componenten uit vrijmaken. Mogelijkerwijs profiteren bacteriën die deze componenten als koolstofbron kunnen gebruiken van de activiteit van de schimmels. De bacteriën zouden op hun beurt de schimmels van beperkende nutriënten of groeifactoren kunnen voorzien, waardoor een mutualistische relatie ontstaat. In het hier gepresenteerde werk zijn effecten van de witrotschimmels *Hypholoma fasciculare* en *Resinicium bicolor* op bacteriën in bosgrond en hout onderzocht. Er is gekeken naar het effect van myceliumkoorden op bodembacteriën bij kolonisatie van (niet gesteriliseerde) bosgrond in pe-

trischalen gedurende twee weken, en het effect op bacteriën in hout na twintig tot dertig weken kolonisatie van (initieel steriele) houtblokjes door de schimmels. Ter controle werden op niet met schimmels geïnoculeerde bosgrond en houtblokjes bemonsterd. De volgende bepalingen werden gedaan: tellingen van de cultiveerbare bacteriën, PCR-DGGE analyse van partieel 16S rDNA, vergelijking van de soortensamenstelling van de cultiveerbare bacteriegemeenschappen. Voor deze laatste analyse zijn onder andere voor gekoloniseerd hout steekproefsgewijs dertig kolonies van drie replica's per behandelingsreingestreeken en gesequenced (partieel 16S rDNA).

Myceliumkoorden hadden een licht stimulerend effect op aantallen bacteriën in de onderliggende grond, mogelijk als gevolg van een verhoogde beschikbaarheid aan voedingsstoffen door exudatie of lek uit de koorden. DGGE analyse duidde op verrijking in onder andere alphaproteobacteriën gerelateerd aan *Beijerinckiaceae*, zoals bleek na sequenzen van DGGE-banden.

In beukenhoutblokjes, gekoloniseerd door de witrotschimmels, waren bacterieaantallen gemiddeld een factor 100 tot 1000 maal lager dan in controleblokjes, waarin vier 10^7 kolonievormende eenheden (kve) per g DW gedetecteerd werden. In sommige houtblokjes waren geen bacteriën detecteerbaar (detectiegrens 10^2 kve/g DW). Steekproefsgewijs gekozen kolonies uit controleblokjes waren *Burkholderiaceae* (69%) of *Xanthomonadaceae* (31%). De weinige bacteriën die in aanwezigheid van *R. bicolor* voorkwamen waren voornamelijk *Burkholderiaceae*. In hout gekoloniseerd door *H. fascicularis* maakten *Burkholderiaceae* en *Xanthomonadaceae* respectievelijk 36 en 23% van de gemeenschap uit, en werden verder *Acidobacteriaceae* en verschillende alphaproteobacteriën (onder andere gerelateerd aan *Beijerinckiaceae*) gedetecteerd. Ook DGGE analyses aan houtblokjes lieten effecten zien van de schimmels op de samenstelling van de bacteriële gemeenschappen.

De selectiedruk die de witrotschimmels op bacteriën uitoefenen zou een (neven)effect kunnen zijn van hun ligninolytische activiteit, waarbij verzuring van het milieu optreedt en onder andere radicalen en mogelijk toxische degradatieproducten gevormd worden. De voorkomende bacteriesoorten waren veelal acidofiel. De *Beijerinckiaceae* waren gerelateerd aan acidofiele, methylofiele, stikstof fixerende soorten, zoals

Methylocapsa. De normaliter moeilijk cultiveerbare *Acidobacteriën* werden geïsoleerd op voedingsarm, zuur medium. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of er een specifieke relatie tussen witrotschimmels en deze bacteriën bestaat, waarbij bijv. stikstofvoorziening of productie van groeifactoren door de bacteriën een rol speelt.

Ontwikkeling en implementatie van een moleculaire detectietechniek voor stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*) en witrot (*Sclerotium cepivorum*) in grondmonsters

Renske Landeweert¹, Hans Helder²,
Sven Van den Elsen², Roel Staps¹,
Nathalie Zwaardemaker¹, Johan Vos¹ en
Harm Keidel¹

¹Blgg Oosterbeek, Postbus 115, 6860 AC Oosterbeek

²Laboratorium voor Nematologie, Wageningen Universiteit, Postbus 8123, 6700 ES Wageningen

Duizenden grondmonsters afkomstig uit de Nederlandse akkerbouw worden jaarlijks door servicelaboratoria onderzocht op aanwezigheid van de nematode *Ditylenchus dipsaci* (het stengelaaltje, een quarantaine organisme) en de schimmel *Sclerotium cepivorum* (witrot). Het stengelaaltje is een plantparasitaire nematode die rot veroorzaakt in verschillende ui- en bologewassen, terwijl witrot een sclerotievormende schimmel is die rot veroorzaakt in ui-achtige gewassen.

In samenwerking met het Laboratorium voor Nematologie (WUR) heeft Blgg een moleculaire techniek ontwikkeld, gevalideerd en routinematig geïmplementeerd, waarmee zij *D. dipsaci* en *S. cepivorum* detecteert in grondmonsters afkomstig uit de uienteelt. Tijdens het ontwikkelen van beide testen is de specificiteit van de ontwikkelde primers uitgebreid getest tegen een brede achtergrond van nauw- en niet-verwante nematoden en bodemschimmels. Ter validatie van beide moleculaire testen werden 2500 (voor *D. dipsaci*) en 500 (voor *S. cepivorum*) grondmonsters parallel microscopisch en moleculair geanalyseerd. De grondmonsters werden tussen januari en maart (2005) verzameld. De voortrajecten van monstername en -behandeling bleven, ten opzichte van de klassieke detectie, onveranderd. Detectieondergrenzen van zowel de klassieke als moleculaire testen zijn één *D. dips-*

aci individu en één witrot sclerotium, tegen een achtergrond van bodemorganismen. Beide moleculaire testen zijn kwalitatief.

Voor *D. dipsaci* leverde klassieke- en moleculaire analyse van 2500 monsters in resp. 0,08% en 0,76% een positieve uitkomst op. Voor *S. cepivorum* leverde klassieke- en moleculaire analyse van vijfhonderd monsters in resp. 4,0% en 7,4% een positieve uitkomst op.

De moleculaire test toont in beide gevallen vaker een besmetting aan dan de klassieke, microscopische detectie. Voor *D. dipsaci* wordt dit waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat *D. dipsaci* in het vroege voorjaar voorkomt als adult met minder opvallende morfologische kenmerken, wat microscopische herkenning bemoeilijkt. Bij moleculaire detectie spelen morfologische kenmerken geen rol en is de aantoonbaarheid van *D. dipsaci* niet seizoensafhankelijk. De geringe grootte van witrot sclerotia maakt *S. cepivorum* per definitie lastig microscopisch detecteerbaar in grondmonsters. Het verleden laat dan ook zien dat op uienpercelen die na klassieke analyse 'witrotvrij' waren verklaard in de praktijk soms toch besmettingen voorkwamen. Voor moleculaire detectie van witrot is het zorgvuldig openbreken van de harde sclerotia cruciaal. Wanneer het witrot-DNA eenmaal is vrijgemaakt, blijkt de moleculaire techniek zeer gevoelig en voldoet een hoger aantal witrotbesmettingen in grondmonsters aan de verwachting.

De moleculaire testen vervangen bij Blgg reeds de traditionele microscopische detectie van *D. dipsaci* en *S. cepivorum*. In de (nabije) toekomst verwacht Blgg een groot deel van haar nematodenonderzoek moleculair uit te voeren. Behalve het feit dat moleculaire detectie niet morfologieafhankelijk is, maken de moleculaire testen het ook mogelijk om in één analyse een compleet nematodenmonster (> 50.000 nematoden) te onderzoeken. Dit in tegenstelling tot de huidige microscopische praktijk, waarin vaak slechts een klein deel van een nematodenmonster daadwerkelijk bekeken en geïdentificeerd wordt. De inzet van moleculaire technieken zorgt er zo waarschijnlijk voor dat er vaker plantparasitaire nematoden zullen worden aangetroffen in grondmonsters. De implementatie van moleculaire detectiemethodieken is daarom onlosmakelijk verbonden aan een hernieuwde discussie rond beleid en regelgeving, in het bijzonder rond de detectie van quarantaine organismen.

Biologische producten verbeteren bolopbrengst lelie

Gera van Os en Jan van der Bent

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving - Bloembollen,
Postbus 85, 2160 AB Lisse
Email: geravanos@wur.nl

Opbrengstderving door *Rhizoctonia solani* anastomose groep 2-2IIIB is een groot probleem in de lelieschubbenteelt op humeuze dekzandgronden. De schimmel tast de ondergrondse stengel aan, waardoor bij warm weer het gewas bovengronds verwelkt en afsterft. Daarnaast worden ook de bollen aangetast en kan de besmetting meegaan met de bollen in de vorm van mycelium en sclerotia. Het middel Amistar is momenteel het enige effectieve, toegelaten middel voor de bestrijding van de ziekte in lelie. Bij frequente toepassing bestaat echter de kans op resistentieontwikkeling bij de schimmel. Daarom wordt er door PPO Bloembollen onderzoek gedaan naar alternatieve bestrijdingsmethoden (gefinancierd door het Productschap Tuinbouw en de het ministerie van LNV). In een veldproef met lelie zijn twee antagonisten getest tegen *Rhizoctonia*: *Verticillium biguttatum* en *Gliocladium catenulatum*. De schimmel *V. biguttatum* (geleverd door Plant Research International) parasiteert op *Rhizoctonia* en is eerder al zeer effectief gebleken. Verder is gekeken naar het effect van mycorrhiza-schimmels en van zaadmeel van *Brassica carinata*. Mycorrhizaschimmels leven in symbiose met de plantwortels en zorgen voor een verbeterde opname van voedingsstoffen vanuit de bodem. Het zaadmeel dient als voedingsbron voor het bodemleven, waarbij meststoffen vrijkomen voor het gewas. Het meel is rijk aan o.a. stikstof en bevat ook glucosinolaten. In de grond kunnen deze verbindingen worden omgezet in isothiocyanaaten, die in werking vergelijkbaar zijn met het grondontsmettingsmiddel metamnatrium. Dit wordt ook wel biofumigatie genoemd. Het zaadmeelproduct is op de markt als organische meststof.

In onbesmette grond resulteerde de toediening van mycorrhiza's en zaadmeel in een aanzienlijke toename van het N- en P-opname en circa zestig procent meer bolopbrengst dan de onbehandelde controle. Zelfs in besmette grond met *Rhizoctonia* gaf de mycorrhiza-behandeling circa dertig procent meer opbrengst dan de onbehandelde, onbesmette controle. In onbehandelde, besmette grond was er

sprake van vijftig procent opbrengstreductie als gevolg van Rhizoctonia-aantasting. De behandelingen met zaadmeel, *Verticillium* en *Gladiolium* resulteerden in besmette grond in een bolopbrengst die gelijk was aan de chemische behandeling met Amistar en aan de onbesmette controle. *Verticillium biguttatum* en Amistar verminderden daarnaast ook nog de mate van bolaantasting. De overige behandelingen hadden geen effect op de bolaantasting.

De toediening van zaadmeel heeft geleid tot een bemestings- en/of plantversterkend effect. Er zijn echter geen aanwijzingen dat er ook een biofumigatie-effect is opgetreden. In een geïntegreerd teeltsysteem zouden mycorrhiza-schimmels en zaadmeel een nevenwerking kunnen hebben op de weerbaarheid van een leliegewas tegen Rhizoctonia. Beide producten zijn commercieel verkrijgbaar, zij het niet als gewasbeschermingsmiddelen. De perspectieven voor toelating van de antagonisten zijn op dit moment onduidelijk.

Nieuwe publicaties

Boeken en rapporten

Ast, A. van

The influence of time and severity of Striga infection on the Sorghum Bicolour: Striga hermonthica association

[S.l., s.n.], 2006

PhD thesis, ISBN 9085043999

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1803895

Avanzato, D. and Malvolti, M.E.

Proceedings of the Vth International walnut symposium, Sorrento, Italy, November 9-13, 2004

Leuven, ISHS, 2006

Acta horticulturae, 705

ISBN 9066054263

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1806222

Elektronisch (toc)

Baars, J.

Praktijk gereed maken van biologische bestrijding bacterievlekken: rapportage tot éérste go/no go moment

Horst, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Sector Paddestoelen, 2004

Projectnummer: 620162, PPO nr. 2004-22

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1807775

Bazzi, C. and Mazzucchi, U.

Proceedings of the Xth international workshop on fire blight, Bologna, Italy, July 5-9, 2004

Leuven, ISHS, 2006

Acta horticulturae, 704

ISBN 9066054077

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1806223

Bigler, F. and Babendreier, D.

Environmental impact of invertebrates for biological control of arthropods: methods and risk assessment

Wallingford, CABI, 2006

ISBN 0851990584 /

ISBN 9780851990583

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1804269

Blancard, D., Lot, H., Maisonneuve, B. and Ryder, E.J.

A colour atlas of diseases of lettuce and related salad crops: observation, biology and control

Boston, Academic Press, 2006

ISBN 0123725577 / ISBN

9780123725578

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1803440

Boer, M. de, en Lamers, J.G.

Deskstudie bodemmanagement: de smaak van morgen

Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, 2005

In deze deskstudie bodemmanagement is informatie verzameld over een aantal ziekten en plagen die kunnen optreden bij vruchtwisseling volgens verschillende bedrijfssystemen en die door bodemmanagement beheerst of bestreden kunnen worden. Verder zijn in een bijlage de resultaten van een twaalfjarige vruchtwisselingproef met nauwe bouwplannen van aardappelen en suikerbieten samengevat.

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1809019

Champion, G.

Protection and production of sugar beet and potatoes: Home-merton College, Cambridge, 15-16 December 2005

Warwick, Association of Applied Biologists, 2005

Aspects of applied biology, 76

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1808370

Cooke, B.M. and Jones, D.G.

The epidemiology of plant diseases: 2nd ed

Dordrecht, Springer, 2006

ISBN 1402045794 /

ISBN 9781402045790,

ISBN 1402045816 /

ISBN 9781402045813

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1803727

Duncan, A. and Joubert, P.H.

Proceedings of the Vth international pineapple symposium: Port Alfred, South Africa, April 11-16

Leuven, 2006

Acta horticulturae, 702)

ISBN 9066053070

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1804851

Gadd, G.M.

Fungi in biogeochemical cycles

Cambridge, Cambridge University Press, 2006

Conference proceedings. - (The British Mycological Society Symposium series, 24

ISBN 0521845793 /

ISBN 9780521845793

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1803185

Geels, F.P. en Rutjens, A.J.

Kurkvoetjes bij champignons: beïnvloeding door diverse teeltomstandigheden: proef 24320

America, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Sector Paddestoelen, 2002

PPO projectnummer 220055,

Publicatienummer: 2002-11

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/1808287

Gnanamanickam, S.S.

Plant-associated bacteria

Dordrecht, Springer, 2006

ISBN 1402045360 / ISBN

1402045387 e-book

ISBN 9781402045363 /

ISBN 9781402045387 e-book

<http://library.wur.nl/>

WebQuery/clcwwwf/

1808811

Hemming, S., Os, E. van, Kogel, W.J. de, Deventer, P. van, Wiegers, G., Belder, E. den, Elderson, J., Booij, K. en Brink, W. van den,

De invloed van de UV doorlathendheid van het kasdek materiaal op plaaginsecten en gewas: additionele voordelen van energiebesparende kasdekmaterialen

Wageningen, Plant Research International, 2006
(Report / Plant Research International, 120)
<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1807803>

Janse, J.D.

Phytobacteriology: principles and practice

Wallingford, CABI, 2005
ISBN 1845930258 /
ISBN 9781845930257
<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1806460>

Kearns, C.A. and Thomson, J.D.

The natural history of bumblebees: a sourcebook for investigations

Boulder, CO, University Press of Colorado, 2001
ISBN 0870815652 /
ISBN 0870816217 pbk
<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1805852>

Laveissière, C. et Penchenier, L.

Manuel de lutte contre la maladie du sommeil

Paris, IRD éditions, 2005
ISBN 2709915677
<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1804339>

Mostert, L.

Phylogeny and taxonomy of Phaeoacremonium and its relatives

[S.l., s.n.], 2006
PhD thesis, ISBN 908504460X
<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1805782>

Pijnakker, J., Hoogerbrugge, H., Scholte-Wassink, G., Kok, L. en

Berg, D. van der,
Roofmijten tegen Kaswittevlieg, Trialeurodes vaporariorum, in gerbera

Naaldwijk, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Business Unit Glastuinbouw, 2006
Project 41212068
<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1803756>

Riemens, M.M., Groeneveld, R.M.W., Weide, R.Y. van der, Schans, D. van der, Bleeker, P.O. and Uffing, A.

Managementstrategieën en hun effect op de onkruidbeheersing in het bouwplan op biologische bedrijven: rapportage van resultaten van het project BIO4

van 2003-2005 LNV-DWK programma 397-V
Wageningen, Plant Research International, 2006

Rapport / Plant Research International, 118

In dit rapport worden de resultaten beschreven van een driejarig project op zestien BIOM-bedrijven uit vier regio's; twee op klei, zuidwestelijk kleigebied en Noord-Holland, en twee op zandgrond, zuid-oost Nederland. Dit onderzoek had tot doel vragen ten aanzien van de bron en tijdstip van veronkruiding en de invloed van de managementinstelling van de ondernemer ten aanzien van onkruidbeheersing hierop in kaart te brengen
<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1803059>

Schans, D. van der, Bleeker, P., Molendijk, L., Plentinger, M., Weide, R. van der, Lotz, B., Bauermeister, R., Total, R. and Baumann, D.T.

Practical weed control: in arable farming and outdoor vegetable

cultivation without chemicals
Lelystad, Wageningen UR, Applied Plant Research, 2006
PPO publication ; no. 352

ISBN 9077861041 /
ISBN 9789077861042

A useful aid for arable farmers and outdoor-vegetable growers wishing to carry out weed control without using chemicals. Information about prevention, weeds, control strategies for specific types of crops or farm machinery is available under the relevant tab

<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1803155>

Schmidt, O.

Wood and tree fungi: biology, damage, protection, and use

Berlin, Springer, 2006
ISBN 3540321381 /
ISBN 9783540321385
<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1808947>

Schmidt, O.

Wood and tree fungi: biology, damage, protection, and use

Berlin, Springer, 2006
ISBN 3540321381 /
ISBN 9783540321385
<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1808947>

Seifert, H.S. and DiRita, V.J.
Evolution of microbial pathogens

Washington, DC, ASM, 2006
ISBN 1555813003 /
ISBN 9781555813000
<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1803807>

Sonnenberg, A.S.M., Baars, J.P.P. en Hendrickx, P.M.

Collectievorming en instandhouding

America, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Sector Paddestoelen, 2002
PPO projectnummer 220059, Publicatienummer: 2002-21
<http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1808296>

Vigoreaux, J.O.

Nature's versatile engine: insect flight muscle inside and out

Georgetown, Tex, Landes Bioscience/Eurekah.com, 2006
ISBN 0387257985

[http://library.wur.nl/
WebQuery/clcwwwf/1803231](http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1803231)

Vullings, L.A.W.

Pathogene bacteriën in de oesterzwamteelt nader bekeken

America, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Sector Paddestoelen, 2002

PPO projectnummer 220084,
Publicatienummer: 2002-12
[http://library.wur.nl/
WebQuery/clcwwwf/1808288](http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1808288)

Websites

Patlak, M. and Baker, T.

Insect pheromones: mastering communication to control pests

Washington, D.C., National Academy of Sciences, 2003
[http://library.wur.nl/
WebQuery/clcwwwf/1804128](http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1804128)

Rubiales, D. and Muehlbauer, F.J.

Resistance to biotic and abiotic stresses in legumes

Dordrecht, Springer, 2006
Euphytica, vol. 147, no. 1/2
[http://library.wur.nl/
WebQuery/clcwwwf/1805790](http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1805790)
(alleen toegankelijk binnen Wageningen UR)

Savary, S. and Cooke, B.M.

Plant disease epidemiology: facing challenges of the 21st century

[S.l.], Springer, 2006
European Journal of Plant Pathology, vol. 115, nr. 1
<http://library.wur.nl/>

[WebQuery/clcwwwf/1808562](http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1808562)
(alleen toegankelijk binnen Wageningen UR)

Looking after the woof and weft of life: arthropod diversity and its conservation

Dordrecht, Springer, 2006
Biodiversity and conservation, vol. 15, no. 1)
[http://library.wur.nl/
WebQuery/clcwwwf/1805411](http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1805411)
(alleen toegankelijk binnen Wageningen UR)

DVD

Reindboud, W. and Groot, T. de
Libellen in Nederland

/ Weina Reinboud, Tienke de Groot
Utrecht, KNNV Uitgeverij, 2006
DVD (70 min.) + Tekst en uitleg bij de DVD, [nl] Video recording
ISBN 9050112315
[http://library.wur.nl/
WebQuery/clcwwwf/1808561](http://library.wur.nl/WebQuery/clcwwwf/1808561)

Nieuws

Deze nieuwsrubriek brengt items over gewasbescherming die de redactie interessant vindt. Belangrijke criteria voor plaatsing van het nieuwsitem zijn:

- het bericht moet relevant zijn voor de gewasbescherming,
- het mag geen reclame boodschap bevatten,
- het moet afkomstig zijn van een van de erkende agrarische nieuwsbrennende tijdschriften, kranten, nieuwsbrieven, internetsites of autoriteiten,
- het moet naspeurbaar zijn naar de oorspronkelijke bron, die waar mogelijk wordt weergegeven.

Opinies van individuen of belangenorganisaties en visies en andere interpretaties van actuele onderwerpen kunnen als citaat worden opgenomen mits de bron bekend is.

Van harte nodigen wij u uit nieuwsitems bij de redactie aan te dragen.



bestoven af. Een nieuwe studie van Britse en Nederlandse onderzoekers levert het tot nu toe sterkste bewijs dat de voor tekenen zichtbaar worden van een wereldwijde bestuivingscrisis in de natuur. Zij hebben hun bevindingen gerapporteerd in Science van 21 juli (P).

De onderzoekers spreken van een zorgwekkende ontwikkeling, omdat zich waarschijnlijk vergelijkbare verschuivingen in andere regio's in Noordwest-Europa voordoen, of in andere delen van de wereld waar de invloed van de mens zich sterk doet gelden. Bovendien zullen de gevolgen zich niet tot de natuur beperken, maar mogelijk ook gelden voor de landbouw. Landbouwgewassen zijn wereldwijd voor zestig procent afhankelijk van bestuiving door insecten. Op wereldschaal wordt de bestuivingsfunctie door insecten getaxeerd op een jaarlijkse waarde tussen dertig en zeventig miljard euro. Bron: Persbericht Wageningen UR, 21 juli 2006

Koppert ontwikkelt revolutionair inzetsysteem voor de biologie

Koppert Biological Systems heeft een revolutionair systeem ontwikkeld om natuurlijke vijanden in sierteeltgewassen te verspreiden. Hierbij wordt de volledige arbeid van het inzetten geheel uit handen genomen van de teler. Een nieuw ontwikkeld, geheel geautomatiseerd inzetapparaat zal daarbij een belangrijk instrument zijn.

Het verblaasapparaat

Het apparaat bestaat uit 2 delen; het onderste deel verdeelt de insecten in het gewas. Het bovenste deel is een transportsysteem waarmee het apparaat zichzelf voortbeweegt. Met het apparaat kunnen een of meer-

dere natuurlijke vijanden in een keer ingezet worden. Op het apparaat is patent aangevraagd. (...)

Overkill

Het systeem werkt op basis van overkill van insecten. Er wordt een laag bestrijders ingezet om de plagen voor te zijn. Koppert focust zich met het systeem momenteel op spint en trips. De verwachting is dat ook luisen mineervliegbestrijders met het nieuwe apparaat goed toegepast kunnen worden. Het systeem is naar verwachting geschikt voor diverse siergewassen zoals chrysaant, gerbera, roos en anthurium.

Website:

<http://www.koppert.nl/>

Bron: Persbericht Koppert, 7 juli 2006

Bloemen en bijen dreigen samen ten onder te gaan

De verscheidenheid aan wilde bijen in Nederland en Engeland daalt. Tegelijkertijd neemt ook de verspreiding van plantensoorten die door bijen worden

Spintmijt legt de afweer van een plant in de luren

Spintmijten zijn niet voor een gat te vangen. Binnen een soort zijn er altijd wel mijten die de verdediging van planten



weten te omzeilen, blijkt uit het onderzoek van Merijn Kant. 'Het zijn niet voor niets notoire plaaggeesten.' Kas- en fruittelers hebben de pest aan het beestje. Dat geldt ook voor bezitters van kamerplanten en mensen die wiet kweken. Niet meer dan een halve millimeter lang vreet de spintmijt de boel helemaal kaal. Met zijn naaldvormige snuit prikt hij door de wand van plantencellen en zuigt de inhoud leeg. 'Alleen van bepaalde tabaksplanten die heel veel nicotine produceren, moeten ze niets hebben', aldus de Amsterdamse promovendus Merijn Kant. Met zijn spinseldraden legt hij bovendien een web rond de bladeren. Onder dat web verstopt hij zijn eieren ter bescherming tegen roofdieren. Planten laten zich echter niet willoos door de spintmijt naar de slachtbank voeren. De vraat aan hun bladeren wekt een tegenreactie op. Die reactie is tweeledig. De meest directe is de productie van gifstoffen. Enkele dagen later volgt de afgifte van geurstoffen. Door die geurstoffen worden blinde roofmijten aangetrokken om zich aan de schadelijke spintmijten te goed te doen. Op hun beurt laten de spintmijten zich ook niet kisten. 'Het is bekend dat kasspintmijten resistentie tegen de gifstoffen van planten ontwikkelen', aldus promovendus Kant. 'Die resistentie verspreidt zich snel aangezien spintmijten zich razendsnel voortplanten.' In zijn onderzoek heeft de Amsterdamse bioloog kunnen aantonen, dat spintmijten van een en dezelfde soort (*Tetranychus urticae* of kasspintmijt) de afweer van de plant ook op een andere manier weten te omzeilen. 'Dat doen ze door de aanmaak van gifstoffen en geurstoffen sterk af te remmen.' Hoe de spintmijt dat voor elkaar krijgt, weet Kant niet. Dat

weet nog niemand. Wat hij wel weet, is dat in elk geval de aanmaak van het plantenhormoon jasmonzuur door de spintmijt wordt gedwarsboemd. Kant is de eerste geweest die onomstotelijk heeft aangetoond dat dit hormoon essentieel is voor de productie van zowel gifstoffen als geurstoffen. 'Zonder jasmonzuur is een plant tegen de spintmijt reddeloos verloren.'

Bron: Dagblad Tubantia/Twentsche Courant, 16 juli 2006

Onkruidbestrijder mag in meer teelten

Het onkruidbestrijdingsmiddel Gallant 2000 mag in meer teelten worden toegepast. De uitbreiding geldt voor onder meer peulvruchten, peen, uien en digitalis.

Dat heeft het College voor de Toelating van Bestrijdingsmiddelen (CTB) besloten.

Ook het gebruik van Signum, een schimmelbestrijder, is verruimd. Deze voorlopige toelating van maximaal 3 jaar geldt onder meer voor aardappelen, kool- en fruitsoorten.

Bron: Agrarisch Dagblad, 15 juli 2006

Vliegend hert prooi voor vogels

Door nog onbekende oorzaak zijn de afgelopen weken veel vliegende herten ten prooi gevallen aan vogels. Wat de gevolgen precies zijn is nog niet bekend. Verwacht mag worden dat de populatie hierdoor wel dramatisch zal dalen.

Het vliegend hert komt nog maar voor op drie tot vier locaties in Nederland. Het grootste aantal is te vinden op de Veluwe en dan met name in de bossen rond Vierhouten.

Toen de vliegende herten uit hun schuilplaatsen tevoorschijn kwamen voor hun paringsritueel werden ze opgewacht door hongerige vogels. Natuurgids Gerrit Rekers uit Vierhouten vermoedt dat deze vogels door het koude en natte voorseizoen een tekort aan eiwitten hebben opgelopen. Het vliegend hert is eiwitrijk. Normaal vliegt het vliegend hert alleen tegen de schemer, zodat ze niet door vogels worden aangevallen maar ook niet door vleermuizen. Om onverklaarbare redenen weken de dieren dit jaar van hun patroon af en vlogen ze op klaarlichte dag door de bossen.

Bron: Dagblad Flevoland, 14 juli 2006

Bacterie boosdoener bloedende kastanjes

De bloedingsziekte die veel paardekastanjabomen treft, wordt veroorzaakt door een bacterie. Dat is nu definitief vastgesteld door de werkgroep Aesculaap, die in opdracht van landbouwminister Cees Veerman onderzoek doet naar de ziekte.

De boosdoener is een bacterie uit de groep van de *Pseudomonas syringae*. Duidelijk is inmiddels dat bomen die gewond of beschadigd zijn een groter risico lopen op besmetting. Hoe de bacteriën de boom binnendringen is nog niet vastgesteld.

Een vervolgonderzoek moet duidelijk maken of de ziektekiemen binnenkomen via bijvoorbeeld spatwater of insecten. Ook zal worden nagegaan of vorstschade, droogte of wateroverlast een rol spelen en of er een verband is tussen de plaats waar een boom groeit en de mate waarin deze is aangetast. Een goed bestrijdingsmiddel tegen de bacterie is nog niet be-

schikbaar, stelt de werkgroep. Het bedrijf Pireco in Ede biedt wel een natuurlijk middel aan, maar de werking daarvan is nog niet bewezen. Zeker een op de drie Nederlandse paardekastanjes is aangetast door de ziekte. Het aantal zieken bomen is het afgelopen jaar gegroeid. Bovendien blijkt de aantasting vaak verder voortgeschreden dan het op het eerste gezicht lijkt. Vorige maand is een nieuw inventarisatieonderzoek begonnen, waaraan vijftien Friese gemeenten meedoen. Bij eenzelfde inventarisatie in 2005 bleek dat in Ferwerderadiel en op Schiermonnikoog meer dan de helft van de paardekastanjes besmet was.

Bron: Leeuwarder Courant, 13 juli 2006 en ook:

Bron: Persbericht Wageningen UR, 12 juli 2006

Dimas bestrijdt pesticiden: Verzet van industrie tegen strengere regels verwacht

Om mensen, grond en water beter te beschermen moet er volgens eurocommissaris voor milieu Stavros Dimas in de Europese Unie zo veel mogelijk een verbod komen op het spuiten van bestrijdingsmiddelen. Dat zei hij gisteren bij de presentatie van een serie wetgevingsvoorstellen.

Het blootstaan aan bestrijdingsmiddelen die worden gebruikt om onkruid en insecten te verdelgen, is volgens hem uitermate gevaarlijk. De producten veroorzaken onder meer kanker, seksuele en zenuwstoringsen en vogelsterfte. Het pakket wetgevingsvoorstellen van Dimas voorziet onder meer in regels om het gebruik van pesticiden en herbiciden

in bepaalde toepassingsgebieden te verbieden. Ook worden regels voorgesteld voor training van boeren en andere gebruikers, alsmede certificering van apparaten die worden gebruikt om de middelen te spuiten.

Dimas presenteerde gisteren een zogeheten Europese raamwerkrichtlijn. Hij wil tot algemene doelstellingen voor risicobeoordeling komen en algemene afspraken maken waar pesticiden nog zijn toegestaan. Hij komt met opzet niet met gekwantificeerde doelstellingen om lidstaten voldoende flexibiliteit te bieden inzake geografische, agrarische en klimatologische verschillen.

Lidstaten worden geacht actieplannen op te stellen. Daarbij moet wat Dimas betreft als uitgangspunt gelden dat gebruik van bestrijdingsmiddelen alleen nog wordt toegestaan als er absoluut geen andere mogelijkheden zijn. Dit stuit vermoedelijk op grote weerstand van de industrie die jaarlijks in Europa een omzet van zes miljard euro behaalt.

De voorstellen behoeven goedkeuring van Europees Parlement en lidstaten. Aan de zijde van de lidstaten neemt eerst fungerend EU-voorzitter Finland de leiding bij bespreking van het voorstel. Op 1 januari neemt Duitsland het stokje over. Voor de voortgang van het wetgevingsproces is dat waarschijnlijk ongunstig, omdat de Duitse regering mogelijk gevoelig zal zijn voor de bezwaren van een aantal grote Duitse fabrikanten van bestrijdingsmiddelen.

Volgens een woordvoester van Dimas bestaan er op het vlak van de producten grote verschillen in regelgeving tussen lidstaten. Zo wordt er volgens haar in Spanje uitbundig gebruik van gemaakt, terwijl ze in Italië bijna volledig verboden zijn.

Milieuc commissaris Dimas zet ook in op het instellen van pe-

sticidevrije zones rondom parken, scholen en ziekenhuizen. In de Europese Unie wordt jaarlijks voor zes miljard euro aan pesticiden gebruikt, hoofdzakelijk in de landbouw. De Europese Commissie wil dit om reden van publieke gezondheid aanzienlijk terugdringen. Uitgangspunt zou moeten zijn dat pesticiden alleen nog mogen worden gebruikt als er absoluut geen milieuvriendelijker alternatieven zijn.

Bron: Het Financieele Dagblad, 13 juli 2006

EU krijgt zones voor gewasbeschermingsmiddelen

Binnen de Europese Unie komen drie verschillende zones voor toelating van bestrijdingsmiddelen. Dat stelt de Europese Commissie voor in nieuwe regels voor gewasbeschermingsmiddelen.

De Europese Commissie beoogt de toelating van bestrijdingsmiddelen te vereenvoudigen. Een van de nieuwe regels is de indeling van Europa in drie zones met ongeveer gelijke klimatologische en ecologische omstandigheden.

Als een lidstaat in een van die zones een middel toelaat, is het middel ook toegelaten in andere landen in die zone. Toch houden lidstaten het recht om eigen strengere regels in te stellen. Dan kan als dat vanwege een specifieke nationale omstandigheid nodig wordt gevonden.

Bron: Agrarisch Dagblad, 13 juli 2006

Magnetron bestrijdt onkruid

Maasdijs Onkruid bestrijden kan nu ook met de magnetron.

Twee ondernemers uit Maas-dijk hebben een mobiele supermagnetron ontwikkeld waarmee insecten, schimmels en onkruidkiemen in tuinbouwgrond worden verdelgd. Leen van der Hoek en Aad Middelburg bouwden een machine met honderdvijftig magnetronbuizen, die samen goed zijn voor 150.000 watt. Een rupstrekker sleept de bak van de 'Agritron' rakelings over de grond die ontsmet moet worden. De elektromagnetische golven vormen geen gevaar voor mensen, benadrukken de bedenkers. „De golven gaan rechtstreeks de grond in en komen niet onder de machine vandaan. TNO heeft de machine veilig verklaard.”

De supermagnetron is genomineerd voor de Herman Wijffels Innovatieprijs.

Bron: AD/Haagsche Courant, 11 juli 2006

Praktijktest: minder middel nodig bij gebruik compost

Het gebruik van compost verbetert het bodemleven waardoor de gewasgroei toeneemt en waarschijnlijk minder gespoten hoeft te worden. Dat blijkt uit een praktijktest van het onderzoeksinstituut HLB bij zestien akkerbouwbedrijven rond de Hunze en het Oude Diep in Drenthe.

Als maatstaf voor het bodemleven nam HLB de hoeveelheid saprofage **aaltjes**. Zij eten bacteriën en schimmels, maar laten het gewas ongemoeid. Bij ongeveer tweederde van de met compost bemeste percelen nam hun aantal toe, waaruit HLB concludeert dat het bodemleven is toegenomen. “Dat is gunstig voor de gewassen”, zegt Albert Wolfs van het onderzoeksinstituut. “Een rijk

bodemleven zorgt voor goede groei en op de lange termijn, hoewel we dat niet hebben onderzocht, tot een betere gezondheid. Dat heeft tot gevolg dat er minder bestrijdingsmiddelen gebruikt hoeven te worden.” Die conclusie verraste het HLB niet. Vorig jaar deed het al onderzoek naar het bodemleven op een proefveld. Deze praktijktest is daar een bevestiging van. Wolfs hoopt dat de uitslag boeren bewuster maakt van het feit dat compost en ook groenbemesters onterecht weinig worden toegepast.

Bron: Agrarisch Dagblad, 11 juli 2006

Minder invloed EU-landen op pesticiden

EU-landen krijgen minder te zeggen over toelating van bestrijdingsmiddelen. Als één EU-land een product toelaat, moet een hele groep landen in dezelfde klimaatzone het in principe toelaten

De Europese Commissie neemt daartoe woensdag een voorstel over van Europees Commissaris Markos Kyprianou (Gezondheid). Die laatste heeft dat vandaag gezegd.

Het Europees Parlement en de 25 EU-landen moeten daarna nog akkoord gaan. Doel van het plan is om producenten minder rompslomp te bezorgen. Ingrediënten en producten krijgen daarom ook toelating voor onbepaalde tijd. Nu is dat maximaal tien jaar. Wel kan Brussel steeds een product opnieuw beoordelen bij twijfel of nieuwe gegevens.

De Cypriotische EU-commissaris Kyprianou kondigde tegelijk iets strengere criteria aan voor de ingrediënten van bestrijdingsmiddelen. Naar verwachting zes à acht van de honderden stoffen gaan verdwijnen.

Bron: Persbericht ANP, 11 juli 2006

WUR krijgt centrum voor gewasbescherming

Wageningen Universiteit en Research (WUR) gaat vanaf 2007 een digitaal informatiecentrum voor gewasbescherming in Europa opzetten. Dat meldt het landbouwkennisinstituut. Het centrum krijgt de naam European Pest Competence Center (EPC). Het EPC wordt een centraal referentiepunt voor gewasbeschermingskennis. Die kennis is nu verdeeld onder diverse instituten in Europa. Het nieuwe kenniscentrum maakt deel uit van het Network of Excellence Endure. Het EPC is geen vervanger van bestaande Europese en nationale instituten voor gewasbescherming. Het wordt een verzamelpunt van informatie over actuele ziekten en verwachte bedreigingen voor de Europese landen en tuinbouw.

Bron: Agrarisch Dagblad, 30 juni 2006

Phytophthoragen ontdekt

Het Wageningse onderzoeksteam dat zich richt op de ziekteverwekker in de phytophthoraschimmel heeft het gen pi3.4 ontdekt. Het maakt een groot regeleiwit aan dat andere genen aanstuurt.

De ontdekking van het pi3.4-gen betekent dat het team een stapje dichterbij de juiste omgang met resistentiegenen is. Een langdurige klus, want phytophthora is superslim. “We weten allemaal dat de ziekte onvoorspelbaar is en in staat om resistentie te doorbreken. Hoe

NI E U W S

de schimmel dat doet, proberen wij te achterhalen. Als je dat weet, kun je de bestrijding van de ziekte precies afstemmen op die kennis”, aldus de onderzoekers.

Het nu ontdekte gen maakt duidelijk dat het regelmechanisme in phytophthora veel complexer is dan altijd werd gedacht. Zo wordt de kennis rond de aardappelziekte steeds groter. “Wij hebben niet direct de oplossing voor het phytophthoraprobleem voorhanden, maar we leveren wel informatie om tot de oplossing te komen, waarmee phytophthora beter beheersbaar wordt.”

Bron: Agrarisch Dagblad, 30 juni 2006

Alles profiteert van mestvrije akkerrand

In navolging van Noord-Brabant en andere provincies komt er ook in Zeeland een groot project ‘actief randenbeheer’. Boeren zullen zo’n 1000 kilometer aan slootranden niet langer bespuiten en bemesten, zodat de kwaliteit van het slootwater verbetert.

In alle provincies blijken boeren bereid een klein deel van hun broodwinning op te geven, al gaat het in Limburg en Zuid-Holland om maar vijftig kilometer. Op de randen van hun akkers verbouwen ze buffergewassen als grassen of graan. Die moeten gemaaid worden, maar brengen geen geld op. De agrariërs krijgen een vergoeding voor het beheer (..). In Zeeland is al veel animo voor randenbeheer. Tot nu toe werd dat echter betaald uit een potje van LNV en ging het vooral om biodiversiteit en bestjes. Brede stroken, van minstens zes meter breed en 75 meter lang, worden ingezaaid met bloemenmengsels en hoeven niet per se aan slootkanten te lig-

gen. Insecten en kleine zoogdieren kunnen er schuilen, ook als de akkers in de winter kaal zijn.

(..)En behalve nuttig, zijn de akkerranden ook nog eens mooi. Dieleman: “In Noord-Beveland zijn ze bezig met het aanleggen van wandelpaden. Lopen in zo’n akkerrand is niet bevorderlijk voor de natuur, maar eraan mag natuurlijk wel.” In Noord-Brabant onderhouden zevenhonderd boeren en tuinders 1250 km slootrand. Daarmee blijft vijftien procent van alle belangrijke watervoerende sloten vrij van mest en bestrijdingsmiddelen. “We zouden het kunnen verdubbelen, maar er is niet meer geld,” zegt Rob Schrauwen van de Zuidelijke land- en tuinbouworganisatie. De financiering voor de komende jaren is sowieso nog niet rond. Dit jaar brengen het ministerie van landbouw, de provincies en de waterschappen het geld nog op. Daarna moet subsidie komen uit het Plattelandsontwikkelingsprogramma van de Europese Unie. Wil Noord-Brabant de helft van alle watervoerende sloten schoner maken, dan kost dat jaarlijks 1,2 miljoen euro. Omgerekend naar het hele land zou dat neerkomen op twintig tot 25 miljoen. Rob Schrauwen: “Dat is op zich niet heel veel op de Europese begroting.”

Ook bloemrijke akkerranden maken deel uit van het beheer in Zeeland (hier in Colijnsplaat) en Brabant.

Bron: Trouw, 22 juni 2006

Nieuwe labtoets toont vier appelvirusen tegelijk aan

Naktuinbouw kan voortaan in een nieuwe laboratoriumtoets vier verschillende virussen in

appel aantonen. Daarmee kan sneller de virusstatus van appelplassen en –onderstammen bepaald worden dan met de tot dusver gebruikte indicator testen.

Door tegelijkertijd te testen op vier virussen, vallen de kosten per bepaling lager uit. Het vier-tal betreft het chlorotische-bladvlekkenvirus (ACLSV), het appelhoutgroefvirus (ASGV), het appelhoutputjesvirus (ASPV) en het appelmozaïekvirus (ApMV). Deze komen, behalve bij appel, ook deels bij peer en kweeper voor.

Sinds januari beschikt Naktuinbouw over de nieuwe toetsingsmethode, de zogeheten multiplex-PCR. Dit jaar wordt de methode nog verder onderzocht op onder andere gevoeligheid, en vergeleken met de indicator testen. Naktuinbouw verwacht dat de multiplex-PCR een belangrijke rol gaat spelen bij diagnostisch onderzoek in appel en peer.

Bron: De Boomkwekerij, 20 juni 2006

Eerste vondst pseudoschimmel Phytophthora ramorum in beuk

Begin juni 2006 heeft de Plantenziektenkundige Dienst (PD) van het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) in de gemeenten Ede en Nijmegen, aantastingen gevonden van *Phytophthora ramorum* in beuken. De beuken vertoonden bloedingverschijnselen op de stam. Na diagnose is vast komen te staan dat deze veroorzaakt zijn door deze pseudoschimmel. Het gaat om de eerste besmettingen in Nederland van een inheemse plant met *P. ramorum*. De aangetaste beuken werden op beide locaties

omringd door zwaar aangetaste rododendrons. Via veldonderzoek wordt de verdere verspreiding van *P. ramorum* in de gaten gehouden. Daarnaast voert de PD, ook in internationaal verband, onderzoek uit naar de risico's voor inheemse planten. Het ministerie van LNV dringt er bij eigenaren en beheerders van rododendronplanten op aan dat ze alert zijn op besmettingen.

Sinds enkele jaren komt de pseudoschimmel *Phytophthora ramorum* in Nederland voor, met name op rododendron. Een groot aantal inheemse én uitheemse plantensoorten is vatbaar. *P. ramorum* is daarom een bedreiging voor inheemse bomen en struiken, zoals bosbes, kastanje, beuk en mogelijk zomer- en wintereik. In Nederland en de omliggende landen is alleen van rododendron aangetoond dat de schimmel zich van daaruit kan verspreiden. Veel (inheemse) soorten kunnen wel aangetast worden en afsterven, maar zijn zelf geen bron van verdere verspreiding. De aangetaste beuken vormen zelf ook geen directe bron van verspreiding.

P. ramorum komt in diverse andere Europese landen en in de Verenigde Staten voor. De ziekte veroorzaakt in Californië (Verenigde Staten) op grote schaal sterfte onder de daar inheemse eiken en enkele andere soorten loofbomen. *P. ramorum* is in Nederland in de groene ruimte tot nu toe alleen aangetroffen op de uitheemse soorten rododendron en Amerikaanse eik (*Quercus rubra*). Aantastingen concentreren zich op de Utrechtse heuvelrug, de Veluwezoom en in het Rijk van Nijmegen, maar komen in heel Nederland voor. In Groot-Brittannië is de *P. ramorum* naast op rododendron aangetroffen op onder andere *Quercus falcata* (nauw verwant aan de Amerikaanse eik), *Fagus*

sylvatica (beuk) en *Castanea sativa* (tamme kastanje).

De aanpak van *P. ramorum* in de groene ruimte richt zich, op basis van EU regelgeving, op het verwijderen van de aantasting en op het voorkomen van verdere verspreiding. De PD voert sinds 2002 jaarlijks veldonderzoek uit om de verspreiding van *P. ramorum* in Nederland in kaart te brengen. *P. ramorum* heeft ook gevolgen voor de boomkwekerij. In 2002 zijn al extra maatregelen genomen om zeker te stellen dat alleen planten verkocht worden die vrij zijn van deze ziekte.

Bij de aanpak van *P. ramorum* worden boomkwekers, hoveniers, beheerders van natuurterreinen, gemeenten en particuliere land- en tuineigenaren betrokken. Bij aantastingen verwacht het ministerie dat eigenaren maatregelen nemen om verdere verspreiding te voorkomen. Behalve goed onderhoud van rododendron, voorkomen eigenaren problemen door extra alert te zijn op het voorkomen van deze ziekte en bij besmettingen snel en adequaat te handelen.

Meer informatie is beschikbaar op de pagina *Schadelijke organismen*.

Persbericht Plantenziektenkundige Dienst, nummer 5, 16 juni 2006

Silicium versterkt werking gewasbeschermingsmiddelen

Silicium kan de werking van gewasbeschermingsmiddelen verbeteren, zo schrijft wetenschapsjournalist Gert van den Berg in de jongste uitgave van het tijdschrift *Beneficial Nutrients News*. Diverse onderzoeken in het buitenland hebben dit aangetoond. Eerder

was al bewezen dat silicium als voedingsstof bijdraagt aan de bescherming tegen schimmels, insecten en stress in onder meer (sier)grassen.

Volgens Van den Berg bestaan er twee siliciumhoudende fungiciden: het in Japan geproduceerde simeconazool en het door Dupont de Nemours ontwikkelde flusilazool. Het gebruik van deze twee middelen is in Nederland echter niet toegelaten. Aan de Universiteit Würzburg in Duitsland wordt momenteel een nieuwe vorm van silicium ontwikkeld. De kennis die daarmee wordt opgedaan, is bruikbaar voor het ontwikkelen van beter opneembare siliciummeststoffen, aldus Van den Berg.

Informatie over silicium:

[http://www.silicon-nutrition.info./](http://www.silicon-nutrition.info/)

Bron: De Boomkwekerij, 12 juni 2006

Kever bedreigt Spaanse palmentuin

De Zuid-Spaanse stad Elche gaat gebukt onder een invasie van rode kevers.

De vraatzuchtige insecten richten grote schade aan in de historische palmentuin El Palmoral, die zes jaar geleden door de VN-cultuurorganisatie Unesco op de werelderfgoedlijst is geplaatst.

Sinds het begin van de invasie, een jaar geleden, hebben de kevers al 3300 palmen onherstelbaar beschadigd, meldde de krant *El País*. Deskundigen zeiden dat de rode kevers vermoedelijk met illegaal geïmporteerde palmen uit Egypte Spanje zijn binnengekomen.

De picudo rojo is moeilijk te bestrijden. Door de inzet van chemische middelen is het hooguit mogelijk de opmars van de **insecten** tot staan te

NI E U W S

brenge. Maar de kevers kunnen met die middelen niet worden uitgeroeid.

In de palmentuin van Elche staan ongeveer 200.000 palm-bomen. Elche ligt in de buurt van Alicante in het zuidoosten van Spanje. (ANP)

Bron: AD/Amersfoortse Courant, 2 juni 2006

Assortiment gewasbeschermingsmiddelen stijgt licht

Het CTB ontving afgelopen jaar 73 aanvragen voor gewasbeschermingsmiddelen, waarvan zeven leidden tot een toelating. Het totaal aantal in Nederland toegelaten gewasbeschermingsmiddelen komt daarmee uit op 705. Daarmee zette de beperkte stijging van de laatste jaren door. In 2002 kwam het aantal toelatingen nog uit op 656. Dat jaar nam het aantal toegelaten gewasbeschermingsmiddelen nog af met 36.

Gewasbeschermingsmiddelen vormen niet de grootste groep toegelaten middelen. De grootste groep zijn de zogenoemde biociden. Daaronder verstaat het CBL houtconserverings-, huishoudelijke-, veterinaire- en desinfectiemiddelen. Het aantal toegelaten biociden bedroeg 790, dat is een stijging van 42.

Ondanks de drukte heeft het CTB de aanvragen het afgelopen jaar binnen de wettelijke termijnen afgehandeld. Het aantal bezwaar- en beroepschriften tegen besluiten van het CTB is in 2005 gestabiliseerd. Nieuw is dat het CTB in 2005 voor het eerst bezwaren tegen ontheffingen voor proefdoeleinden ontving.

Bron: Weekblad Groenten en Fruit, 18 mei 2006

PT blijft geld steken in beleid bacterievuur

De sectorcommissie Boomkwekerij van het Productschap Tuinbouw (PT) stelt voor de uitvoering van de Regeling Bufferzones Bacterievuur in 2006 een subsidie van 225.000 euro beschikbaar. Vorig jaar trok het PT voor dit doel eenzelfde bedrag uit. Met het geld worden de inspecties betaald die de Plantenziektenkundige Dienst (PD) uitvoert in de

bacterievuurbufferzones. De inspecties zijn noodzakelijk om export van bacterievuurwaardplanten naar andere beschermde gebieden in de EU mogelijk te maken. De bedrijven waarvoor de inspecties worden uitgevoerd, betalen een aparte bijdrage voor de PD-controles.

Het PT vindt het gerechtvaardigd dat de regeling deels collectief wordt gefinancierd. Nederland moet volgens het Productschap een betrouwbaar imago blijven hebben als het gaat om de bestrijding van besmettelijke plantenziekten.

De Raad voor de Boomkwekerij, die verantwoordelijk is voor de uitvoering van de Regeling Bufferzones Bacterievuur, verwacht in 2006 geen beroep te hoeven doen op het volledige subsidiebedrag van 225.000 euro. Dit is echter wel afhankelijk van het aantal aantastingen met bacterievuur in de bufferzones.

Bron: De Boomkwekerij, 16 mei 2006

Nieuw anti-spintmiddel voor boomkwekerij

Het bestrijdingsmiddel Milbeknock, bekend als middel tegen spint en mineervliegen in snijbloemen en potplanten, heeft onlangs een uitbreidingstoelating gekregen voor toepassing in de buitenteelt van boomkwekerijgewassen en vasteplanten.

Milbeknock, werkzame stof: milbemectin, is een middel van natuurlijke oorsprong en bestrijdt alle stadia van spint en mineervlieg. Volgens fabrikant BayerCropScience werkt het ook tegen resistente spint.

De werking van het middel vindt plaats doordat het in het blad doordringt. Via vraat (larven van de mineervlieg) of zuigen (mijten) neemt het beest het middel op, waarna een verlamme werking optreedt. Zodra de eerste mijten worden waargenomen, dient het middel door middel van een gewasbespuiting te worden toegepast. De behandeling na zeven tot tien dagen herhalen. Dosering: vijftig milliliter middel op honderd liter water. Milbeknock is gevaarlijk voor bijen, hommels en roofmijten. Om drift te beperken, moet bij de bespuiting aan een aantal eisen worden voldaan.

Meer informatie: <http://www.bayercropscience.nl/>

Bron: De Boomkwekerij, 15 mei 2006

De redactie van Gewasbescherming besteedt bij het verzamelen van de informatie voor de rubriek Nieuws aandacht en zorg aan de juistheid van deze informatie, maar kan deze niet garanderen. De items in de rubriek Nieuws geven de zienswijze van de betreffende bron weer en uitdrukkelijk niet die van de redactie of van de KNPV. De redactie is niet verantwoordelijk en/of aansprakelijk voor eventuele fouten en onvolkomenheden in de verstrekte informatie.