



**WAGENINGEN UR**  
*For quality of life*

# Komkommerbontvirus-isolaten en rasgevoeligheid

Ineke Stijger<sup>1</sup>, Roel Hamelink<sup>1</sup>, Khanh Pham<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Wageningen UR Glastuinbouw, Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk, <sup>2</sup> PPO Bloembollen, Bomen & Fruit, Prof. van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse



## **Referaat**

Op basis van de resultaten van de genetische verwantschappen is duidelijk geworden dat er groepen van oude en nieuwe isolaten te onderscheiden zijn. Dat de virusisolaten die momenteel in de praktijk voorkomen duidelijk genetisch afwijken van hetgeen er voor 2000 voorkwam en ook t.o.v. van buitenlandse isolaten. Er kon echter geen relatie worden gelegd tussen de symptomen en de diverse isolaten.

Wel is er een effect gezien van een isolaat uit 1979 en een isolaat uit 2011 op gangbare rassen en rassen waarbij minder symptomen van het virus worden waargenomen. Het isolaat uit 1979 leverde meer symptomen op dan die uit 2011 en dat was onverwachts. Ook de opbrengst was bij de gevoelige rassen lager bij infectie met het oude isolaat.

## **Abstract**

Based on the results of the genetic affinities, it has become clear that there are groups of old and new isolates. Virus-isolates which are currently found in cucumber crops, differs clearly genetic from isolates which were found before 2000 en also from foreign isolates.

However, no relationship could be established between the symptoms and the various isolates.

An effect was determined for an isolate originated from 1979 en one recent isolate from 2011 on common cucumber varieties en varieties which are less susceptible. The isolate from 1979 showed more symptoms than those from 2011 and that was unexpected. Also yield was lower at the sensitive varieties after an infection with the old isolate.

© 2011 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Wageningen UR Glastuinbouw.

## **Wageningen UR Glastuinbouw**

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

# Inhoudsopgave

	Samenvatting	5
1	Inleiding	7
	1.1 Doel van het onderzoek	7
2	Materiaal en Methoden	9
	2.1 Verzamelen van komkommerbontvirus-isolaten	9
	2.2 Vergelijken van komkommerrassen	9
	2.3 Genetische verwantschappen tussen virus-isolaten	10
	2.4 Vergelijking van virus-isolaten	12
3	Resultaten	13
	3.1 Verzamelen van komkommerbontvirus-isolaten	13
	3.2 Vergelijken van komkommerrassen	13
	3.3 Genetische verwantschappen tussen virus-isolaten	18
	3.4 Vergelijking van virus-isolaten	21
4	Discussie en conclusie	25
5	Literatuur	27
Bijlage I	Kasplattegronden	29



# Samenvatting

Komkommerbontvirus is een virus dat via mechanische overdracht en zaad kan worden verspreid. Via sap van geïnfecteerde planten kan bij alle gewashandelingen zoals indraaien, snoeien en oogsten het virus worden overgedragen op gezonde planten. Ondanks vele inspanningen van telers bij de teeltwisseling om schoon te worden en ook schoon te starten blijven is komkommerbontvirus een jaarlijks terugkerend probleem in de teelt.

Mogelijk zijn er in de loop der tijd nieuwe isolaten/stammen van komkommerbontvirus in Nederland opgedoken die agressiever zijn in hun symptomen vergeleken met isolaten van enkele jaren geleden. Daarnaast zijn er signalen dat er verschillen bestaan in de snelheid waarmee virusvarianten door het gewas verspreiden. Deze constatering uit de praktijk is te vergelijken met de situatie bij pepinomozaïekvirus in tomaat. De eerste jaren was hier sprake van één isolaat met relatief zwakke symptomen, maar door de jaren heen zijn nieuwe isolaten/stammen ontstaan en ook Nederland binnengekomen. De vraag rijst of dit ook het geval is met komkommerbontvirus.

Eerder is door Wageningen UR Glastuinbouw een oriënterend onderzoek uitgevoerd naar de mogelijke verschillen van oude en nieuwe komkommerbontvirus-isolaten. De resultaten van dit onderzoek lieten verschillen zien, maar om een echt goed beeld te krijgen van de situatie van komkommerbontvirus in Nederland was het raadzaam om in verschillende teeltregio's materiaal te verzamelen. Met behulp van moleculaire toetsen zijn de mogelijk verschillen goed aan te tonen.

Om antwoorden op de vele vragen te krijgen is dit project uitgevoerd en onderverdeeld in een viertal onderwerpen te weten:

1. Verzamelen van komkommerbontvirus-isolaten.
2. Vergelijken van komkommerrassen.
3. Genetische verwantschappen tussen virus-isolaten.
4. Vergelijking van virus-isolaten.

## Resultaten

1. Verzamelen van komkommerbontvirus-isolaten.

In dit onderdeel is in verschillende teeltregio's bladmateriaal verzameld van een komkommerteelt waarin met zekerheid komkommerbontvirus is vastgesteld. Dit materiaal is gebruikt voor het bepalen van de genetische verwantschap en voor het onderdeel waarin de virus-isolaten op jonge komkommerplanten zijn vergeleken.

2. Vergelijken van komkommerrassen

### *Symptomen*

In een kasproef zijn een oud komkommerbontvirus-isolaat (uit 1979) en een isolaat uit 2011 met elkaar vergeleken op vier komkommerrassen. Het betreft twee gangbare rassen (Ras R en S) en twee rassen waarbij een minder snelle virusvermeerdering plaatsvindt en minder virussymptomen worden waargenomen (Ras B en J).

Ras B gaf duidelijk minder virussymptomen dan de andere drie rassen en daarbij was nauwelijks een verschil waar te nemen tussen de twee komkommerbontvirus isolaten. Bij ras J verschenen minder symptomen dan bij de rassen R en S voor zowel het oude als het nieuwe isolaat, maar gaf meer symptomen dan ras B.

Ras B laat geleidelijk in de teelt een toename van de symptomen zien terwijl er bij de andere rassen meer pieken en dalen te zien zijn. Opvallend is ook dat de rassen R en S veel symptomen laten zien in de eerste weken na de inoculatie met het oude isolaat. Later in de teelt is het precies omgekeerd en laat het isolaat uit 2011 meer symptomen zien.

### *Opbrengst*

Opvallend is dat de totale opbrengst van de rassen R, S en J het laagst was bij de planten die geïnfecteerd zijn met het oude isolaat van komkommerbontvirus van 1979. Waarbij de verschillen bij de rassen R en S groter zijn dan bij ras J. Bij ras B waren er geen grote verschillen in opbrengst te zien tussen de gezonde en besmette planten. Ras J weet uiteindelijk van alle rassen de hoogste opbrengst te genereren.

Bij de rassen R en S werden de minste vruchten geoogst van de planten die geïnfecteerd zijn met het oude isolaat. Dit kwam tot uiting in de totale opbrengst. Ras B heeft de meeste geoogste vruchten bij de virus besmette planten (oud isolaat) en ras J heeft de meeste vruchten bij de met het nieuwe isolaat besmette planten.

Bij het totaal aantal geoogste vruchten van de gezonde planten zijn de verschillen tussen de rassen minder groot dan bij de virus besmette planten.

### 3. Genetische verwantschappen tussen virus-isolaten

Groepen van oude en nieuwe monsters zijn duidelijk te onderscheiden en er is meer variatie binnen oude monsters dan binnen de nieuwe. De virus-isolaten die momenteel in de praktijk voorkomen wijken genetisch duidelijk af van hetgeen er voor 2000 in de praktijk voorkwam en zijn ook anders t.o.v. buitenlandse isolaten.

Genetische verschillen bestaan tussen de geanalyseerde isolaten uit 2010, 2011 en 2012. Uit de analyse van CP sequentie is te zien dat deze isolaten in 2 subgroepen verdeeld kunnen worden en vergelijkbare resultaten (2 subgroepen) zijn ook te vinden bij het analyseren van Polymerase sequentie.

### 4. Vergelijking van virus-isolaten

Aan de hand van de resultaten van de genetische verwantschappen die in 2 subgroepen verdeeld kunnen worden, is gekeken naar de symptoomontwikkeling van de verschillende isolaten op de toetsplanten. Er kan geen duidelijke relatie worden gelegd tussen de symptomen en de diverse isolaten.

Op basis van de resultaten van de genetische verwantschappen is duidelijk geworden dat er groepen van oude en nieuwe isolaten te onderscheiden zijn. Dat de virusisolaten die momenteel in de praktijk voorkomen duidelijk genetisch afwijken van hetgeen er voor 2000 voorkwam en ook t.o.v. van buitenlandse isolaten. Er kon echter geen relatie worden gelegd tussen de symptomen en de diverse isolaten.

Wel is er een effect gezien van een isolaat uit 1979 en een isolaat uit 2011 op gangbare rassen en rassen waarbij minder symptomen van het virus worden waargenomen. Het isolaat uit 1979 leverde meer symptomen op dan die uit 2011 en dat was onverwachts. Ook de opbrengst was bij de gevoelige rassen lager bij infectie met het oude isolaat.

# 1 Inleiding

Komkommerbontvirus is een virus dat via mechanische overdracht en zaad kan worden verspreid. Via sap van geïnfecteerde planten kan bij alle gewashandelingen zoals indraaien, snoeien en oogsten het virus worden overgedragen op gezonde planten. De laatste jaren is er een toename in virusdruk en problemen in de komkommerteelt van komkommerbontvirus. Mogelijk zijn er in de loop der tijd nieuwe isolaten/stammen van komkommerbontvirus in Nederland opgedoken die agressiever zijn in hun symptomen vergeleken met isolaten van enkele jaren geleden. Daarnaast zijn er signalen dat er verschillen bestaan in de snelheid waarmee virusvarianten door het gewas verspreiden. Deze constatering uit de praktijk is te vergelijken met de situatie bij pepinomozaïekvirus in tomaat. De eerste jaren was hier sprake van één isolaat met relatief zwakke symptomen, maar door de jaren heen zijn nieuwe isolaten/stammen ontstaan en ook Nederland binnengekomen. De vraag rijst of dit ook het geval is met komkommerbontvirus.

Eerder is door Wageningen UR Glastuinbouw een oriënterend onderzoek uitgevoerd naar de mogelijke verschillen van oude en nieuwe komkommerbontvirus-isolaten. De resultaten van dit onderzoek lieten verschillen zien, maar om een echt goed beeld te krijgen van de situatie van komkommerbontvirus in Nederland moest er in de praktijk gemonitord worden. Met behulp van moleculaire toetsen zijn de mogelijk verschillen goed aan te tonen.

Naast het voorkomen van mogelijke nieuwe isolaten/stammen van komkommerbontvirus, zou ook het gebruik van andere komkommerrassen voor een verandering van virusproblemen kunnen zorgen. Om hier uitsluitel over te kunnen geven zijn de verzamelde praktijk-isolaten en isolaten uit de viruscollectie van Wageningen UR Glastuinbouw getoetst op gangbare (vatbare) rassen en rassen waarbij minder symptomen worden ontwikkeld en de virusvermeerdering langzamer gaat. Door deze rassen te vergelijken wordt een beeld verkregen van de agressiviteit van de verschillende isolaten. De rassen worden vergeleken op basis van virussymptomen en worden qua productie vergeleken met een niet geïnoculeerd en dus virusvrij gewas.

## 1.1 Doel van het onderzoek

Doel van dit onderzoek is:

- Nagaan of er momenteel andere isolaten/stammen van komkommerbontvirus voorkomen in vergelijking met isolaten van jaren geleden.
- Nagaan wat het effect is van een oud en nieuw komkommerbontvirus-isolaat op gangbare rassen en rassen waarbij minder symptomen van het virus worden waargenomen.
- Inzichtelijk maken wat het effect is van een komkommerbontvirusinfectie en de verschillende komkommerbontvirus-isolaten op de productie (aantallen en gewicht).
- Vergelijking van diverse komkommerbontvirus-isolaten op hun genetische verwantschappen en het verschil in virulentie op komkommerplanten.





## 2 Materiaal en Methoden

### 2.1 Verzamelen van komkommerbontvirus-isolaten

In dit project is gestart met het verzamelen van bladmonsters van komkommers. Deze monsters zijn verzameld in de belangrijkste teeltgebieden te weten: Limburg, Brabant, Westland, Oostland en Drenthe. Alleen op bedrijven waar komkommerbontvirus is vastgesteld zijn de monsters zijn verzameld. Deze monsters zijn in dit project gebruikt voor twee onderdelen namelijk voor: Genetische verwantschappen tussen virus-isolaten en voor de Vergelijking van virus-isolaten.

### 2.2 Vergelijken van komkommerrassen

In een kasproef zijn een oud komkommerbontvirus-isolaat (uit 1979) en een isolaat uit 2011 met elkaar vergeleken op vier komkommerrassen. Het betreft twee gangbare rassen (Ras R en S) en twee rassen waarbij een minder snelle virusvermeerdering plaatsvindt en minder virussymptomen worden waargenomen (Ras B en J). De twee gangbare rassen zijn door de BCO commissie gekozen en deze komen voor rekening van dit PT project. De twee andere rassen zijn beschikbaar gesteld door Rijk Zwaan en Nunhem's Zaden. De inoculatie van de planten met komkommerbontvirus (Figuur 1.) is uitgevoerd ongeveer drie weken na zaaien.

Gedurende vier weken is de symptoomontwikkeling op de planten gevolgd. De infectie is gecontroleerd met een ELISA test. De geïnfecteerde komkommerplanten zijn vergeleken met virusvrije planten. Alle geïnoculeerde planten stonden in één kasafdeling. In een tweede kasafdeling zijn dezelfde rassen geplant en deze zijn niet besmet met virus en dienden als gezonde controle. Zie Bijlage 1 voor de kasplattegronden.

Zowel van het virusvrije gewas als van het gewas dat is geïnfecteerd met de verschillende isolaten van komkommerbontvirus is de oogst geregistreerd in aantal en gewicht.

De totale looptijd van deze proef was 12 weken.



*Figuur 1. Inoculatie van jonge komkommerplanten.*

## 2.3 Genetische verwantschappen tussen virus-isolaten

Om de veranderingen in het virus te onderzoeken zijn een aantal virus-isolaten die in het verleden in Nederland verzameld zijn, vergeleken met recente praktijkmonsters uit diverse regio's. In een eerder onderzoek dat uitgevoerd is in 2009 werden de monsters van het jaar 2008 en 2009 geanalyseerd (Tabel 2.). De monsters die verzameld zijn in de jaren 2010, 2011 en 2012 zijn in 2013 op de zelfde wijze geanalyseerd (Tabel 3.).

### RNA isolatie, RT-PCR en sequentie analyses

RNA extractie van bladmonsters die geïnfecteerd waren met CGMMV vond plaats m.b.v. de QIAGEN RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Duitsland).

RT-PCR: cDNA synthese vond plaats met behulp van M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA) volgens aanwijzingen van de fabrikant. PCR amplificatie werd uitgevoerd met PCR Mastermix van Promega (Promega, Madison, USA) volgens de aanwijzingen van de fabrikant.

Primers die gebruikt zijn voor amplificatie van (partiële) Coat Proteïne gen en (partiële) Polymerase gen van CGMMV zijn vermeld in Tabel 1. PCR producten zijn gezuiverd en opgestuurd voor sequentie bepaling. De verkregen sequenties zijn verwerkt met CLUSTALW programma (Multiple Sequence Alignment) van GenoomNet voor het maken van fylogenetische boom (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

Tabel 1. Primer gegevens voor de moleculaire karakterisatie van de verschillende CGMMV isolaten.

Nr.	Name	Sequence (5'-3')	Taget	PCR product (bp)	Referentie
1	CGMMVF8	GGCTGTAATGGCAAGAGACC	Cp	Ca. 800 bp	(1)
2	CGMMVR8	CGAACCCCTTGCAATTAC	Cp		
3	prCG3-F	GGGTGCTTCTGTTGCGTTATCC	Pol/RNA replicase	Ca. 1200 bp	(2)
4	prCG3-R	GCCTTCACAGAATGTACAACCGG	Pol		

Tabel 2. Gebruikte CGMMV isolaten voor moleculaire karakterisatie, naast de monsters die verzameld zijn in het jaar 2008 en 2009 werden ook de oudere isolaten uit de collectie gebruikt.

Nr.	Isolate	Code in de fylogenetische boom	Herkomst
1	1979	KKB 1979 003	Onbekend
2	1985	KKB 1985 005	Westland
3	1987	KKB 1987 006	Mijdrecht
4	1989	KKB 1989 008	Onbekend
5	1999	KKB 1999 009	Pijnacker
6	MZ (2009)	KKB 2009 010	Delfgauw
7	RZ (2009)	KKB 2009 017	Westland
8	FV (2009)	KKB 2009 014	America
9	MvO (2009)	KKB 2009 013	Asten
10	NG (2009)	KKB 2009 016	Neerkant
11	MP (2009)	KKB 2009 011	Nootdorp
12	RV (2009)	KKB 2009 015	Beringer
13	PS (2009)	KKB 2009 012	Someren
14	2008	KKB 2008 001	Bleiswijk
15	2008	KKB 2008 002	Bleiswijk

Tabel 3. Gebruikte CGMMV isolaten voor moleculaire karakterisatie, deze monsters zijn verzameld in het jaar 2010, 2011 en 2012.

Nr.	Code WUR-Glastuinbouw	Herkomst
1	1VY	IJsselmuiden, 2011
2	2DVE	Erica, 2011
3	3AAH	Asten Heusden, 2011
4	GM1	Regio Pijnacker, 2010
5	GM2	Regio Pijnacker, 2010
6	GM4	Regio Pijnacker, 2010
7	GM5	Regio Pijnacker, 2010
8	7ME	Elshout, 2011
9	9MSC	Sprang Capelle, 2011
10	8KS	Sirjansland, 2011
11	10WL	De Lier, 2011
12	KKRZ	Kasproef Bleiswijk, 2012
13	VBK	Velden, 2012
14	NIS (Nieuwe Isolaat)	Kasproef Bleiswijk, 2011
15	RNA29 (2009)	Pos. controle (Pijnacker)
16	RNA30 (2009)	Pos. controle (Bleiswijk)

## 2.4 Vergelijking van virus-isolaten

De verzamelde isolaten die in Tabel 3 staan vermeld zijn voor de moleculaire karakterisatie gebruikt maar deze isolaten zijn ook op jonge komkommerplanten geïnoculeerd om het verschil in virulentie te bepalen. Bij deze geïnoculeerde planten is gedurende vier weken de symptoomontwikkeling gevolgd. Hierbij is de snelheid van ontwikkeling van de symptomen genoteerd en ook omschreven welke symptomen zich ontwikkelden. Daarbij is onderscheid gemaakt in symptomen op het jonge (Figuur 2.) en het oudere blad.



*Figuur 2. Symptomen van komkommerbontvirus in de kop van een jonge komkommerplant.*

## 3 Resultaten

### 3.1 Verzamelen van komkommerbontvirus-isolaten

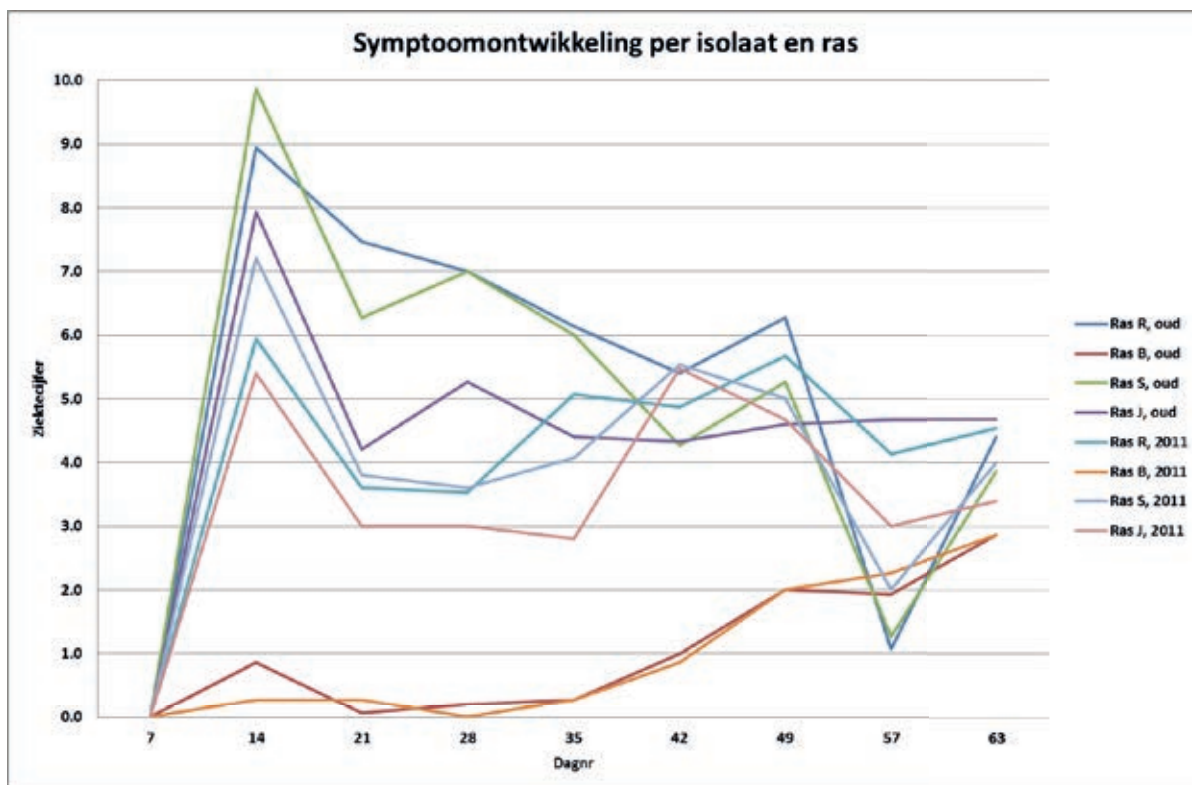
Bij diverse komkommertelers is plantmateriaal verzameld en in dit materiaal is komkommerbontvirus vastgesteld. Dit zijn dezelfde isolaten die in Tabel 3 staan vermeld onder materiaal en methoden bij het onderdeel: genetische verwantschappen tussen virus-isolaten. Deze virus-isolaten zijn voor twee onderdelen in dit project gebruikt te weten de genetische verwantschappen en vergelijking van virus-isolaten.

### 3.2 Vergelijken van komkommerrassen

#### *Symptomen*

Eenmaal per week zijn waarnemingen gedaan aan de planten. Daarbij is gekeken in welke mate er sprake was van mozaïek en bobbeling in de kop van de planten. Beide symptomen zijn op een schaal van 0 tot 5 gescoord. De beide scores zijn bij elkaar opgeteld om te komen tot een totaalscore van de ernst van de symptomen. In Figuur 3. is de symptoomontwikkeling van de twee komkommerbontvirus isolaten op vier komkommerrassen weergegeven. Hieruit blijkt dat:

- Ras B (Figuur 6.) duidelijk minder virussymptomen gaf dan de andere drie rassen en daarbij nauwelijks een verschil is waar te nemen tussen de twee komkommerbontvirus-isolaten.
- Bij ras J verschijnen minder symptomen dan bij de rassen R en S (Figuur 4. en 5.) voor zowel het oude als het nieuwe isolaat, maar geeft meer symptomen dan ras B.
- Ras B laat geleidelijk in de teelt een toename van de symptomen zien terwijl er bij de andere rassen meer pieken en dalen te zien zijn.
- De rassen R en S vooral veel symptomen laten zien in de eerste weken na inoculatie met het oude komkommerbontvirus isolaat. Bij de waarneming 57 dagen na inoculatie laten deze rassen minder symptomen zien dan de planten die met het isolaat uit 2011 zijn besmet.



Figuur 3. Symptoomontwikkeling van twee komkommerbontvirus isolaten op vier komkommerrassen.



Figuur 4. Symptomen van komkommerbontvirus op ras R. Op de bovenste foto's zijn de symptomen veroorzaakt door het oude isolaat van komkommerbontvirus en op de onderste foto's door het isolaat uit 2011.



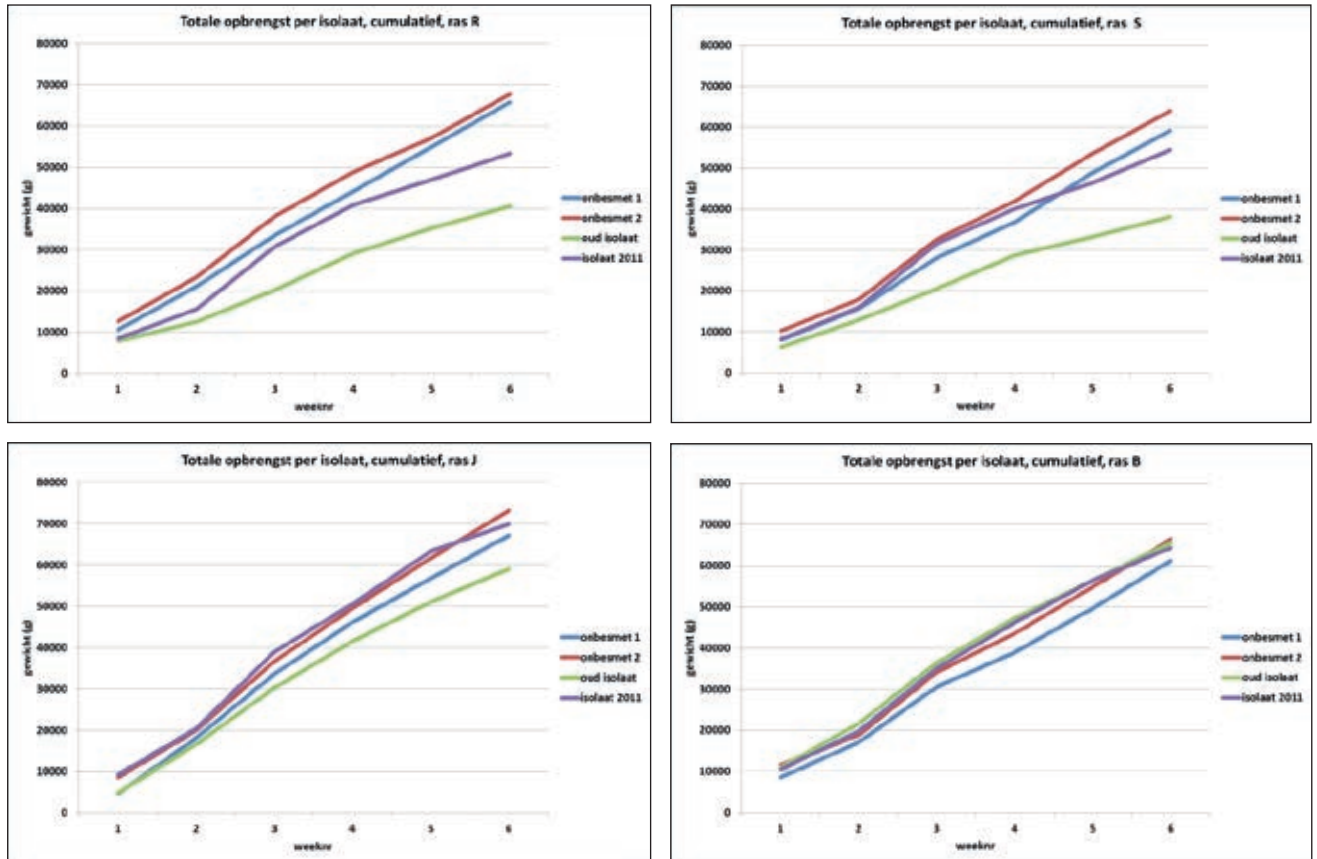
*Figuur 5. Symptomen van komkommerbontvirus op ras S. Op de bovenste foto's zijn de symptomen veroorzaakt door het oude isolaat van komkommerbontvirus en op de onderste foto's door het isolaat uit 2011.*



*Figuur 6. Symptomen van komkommerbontvirus op ras B. Op de bovenste foto's zijn de symptomen veroorzaakt door het oude isolaat van komkommerbontvirus en op de onderste foto's door het isolaat uit 2011.*

## Opbrengst

In totaal is gedurende zes weken de opbrengst van de rassen en isolaten bepaald (Figuur 7.). De geogste vruchten zijn geteld en de opbrengst per rij gewogen.

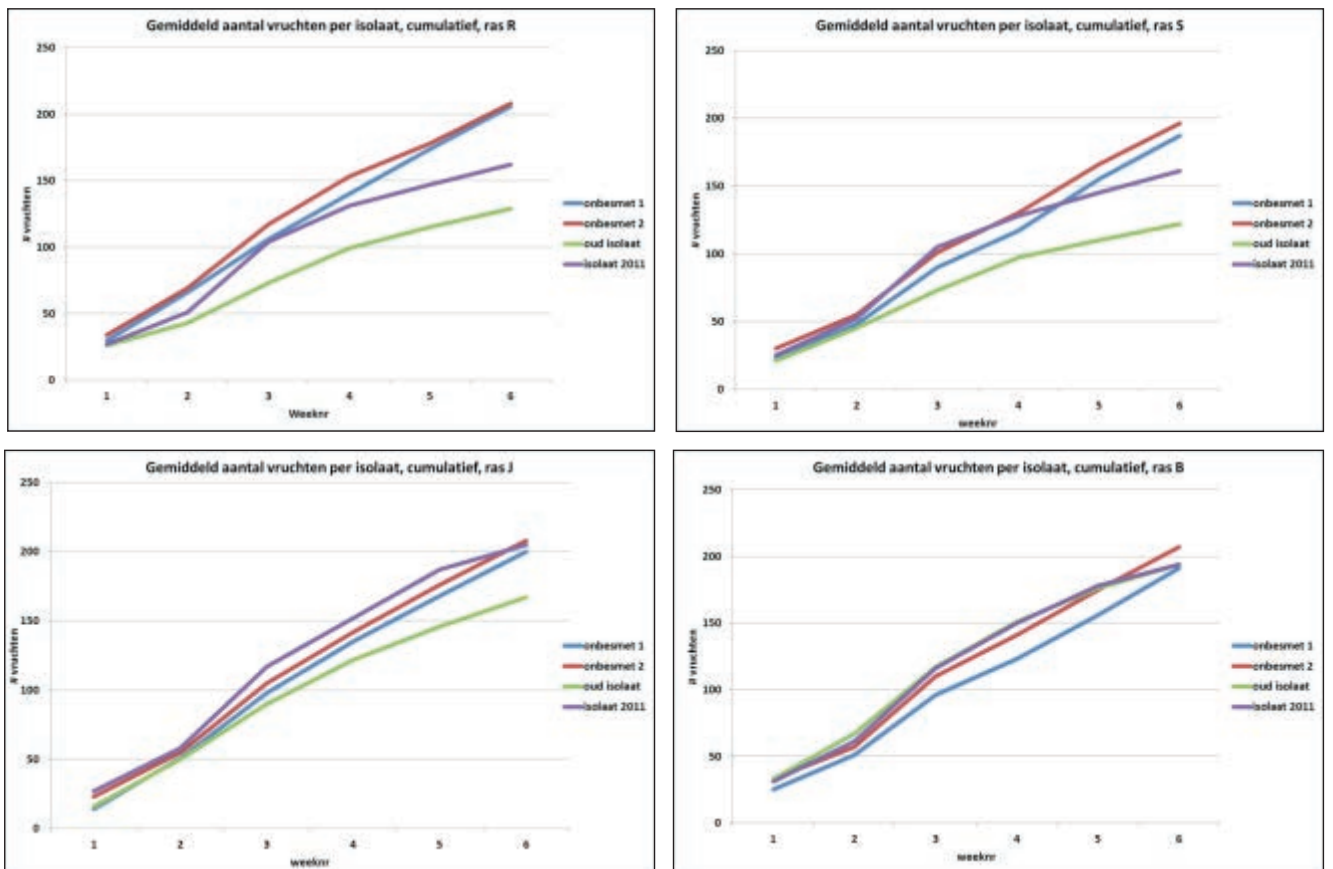


Figuur 7. Totale opbrengst per isolaat en per ras.

Totale opbrengst:

- o Bij de onbehandelde planten loopt het totaal geogst gewicht uiteen van 59.14 kg voor ras S tot 73.20 kg voor ras J.
- o De opbrengst van de rassen R, S en J is vooral het laagst bij de planten die geïnfecteerd zijn met het oude isolaat van komkommerbontvirus van 1979. Waarbij de verschillen bij de rassen R en S groter zijn dan bij ras J.
- o Bij ras B zijn er geen grote verschillen in opbrengst te zien tussen de gezonde en besmette planten.
- o Ras J weet van alle rassen de hoogste opbrengst te generen.

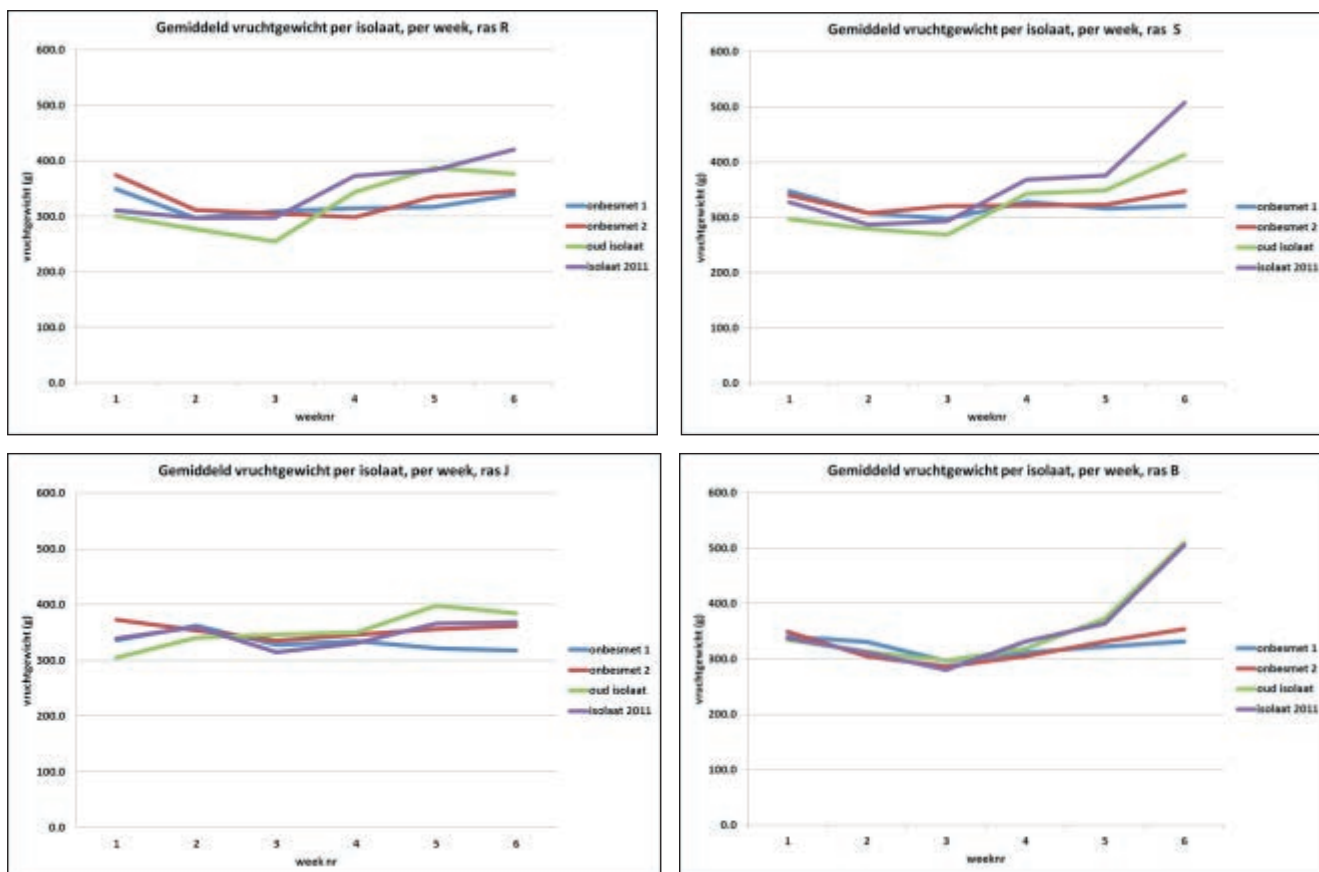




Figuur 8. Gemiddeld aantal vruchten per isolaat en per ras.

Gemiddeld aantal vruchten (Figuur 8.):

- o Het aantal geogoste vruchten varieert van 122 voor ras S tot 208 voor de rassen R en J. De 122 vruchten zijn geogost van planten die geïnfecteerd zijn met het oude virus isolaat en de 208 zijn afkomstig van gezonde planten in vak 1.2.
- o Bij de rassen R en S zijn de minste vruchten geogost van de planten die geïnfecteerd zijn met het oude isolaat.
- o Ras B heeft de meeste geogoste vruchten bij de virus besmette planten met het oude isolaat en ras J heeft de meeste vruchten bij de virus besmette planten met het nieuwe isolaat.
- o Bij de geogoste vruchten van de gezonde planten zijn de verschillen tussen de rassen minder groot dan bij virus besmette planten.



Figuur 9. Gemiddeld vruchtgewicht aan gegeven per week en per isolaat en per ras.

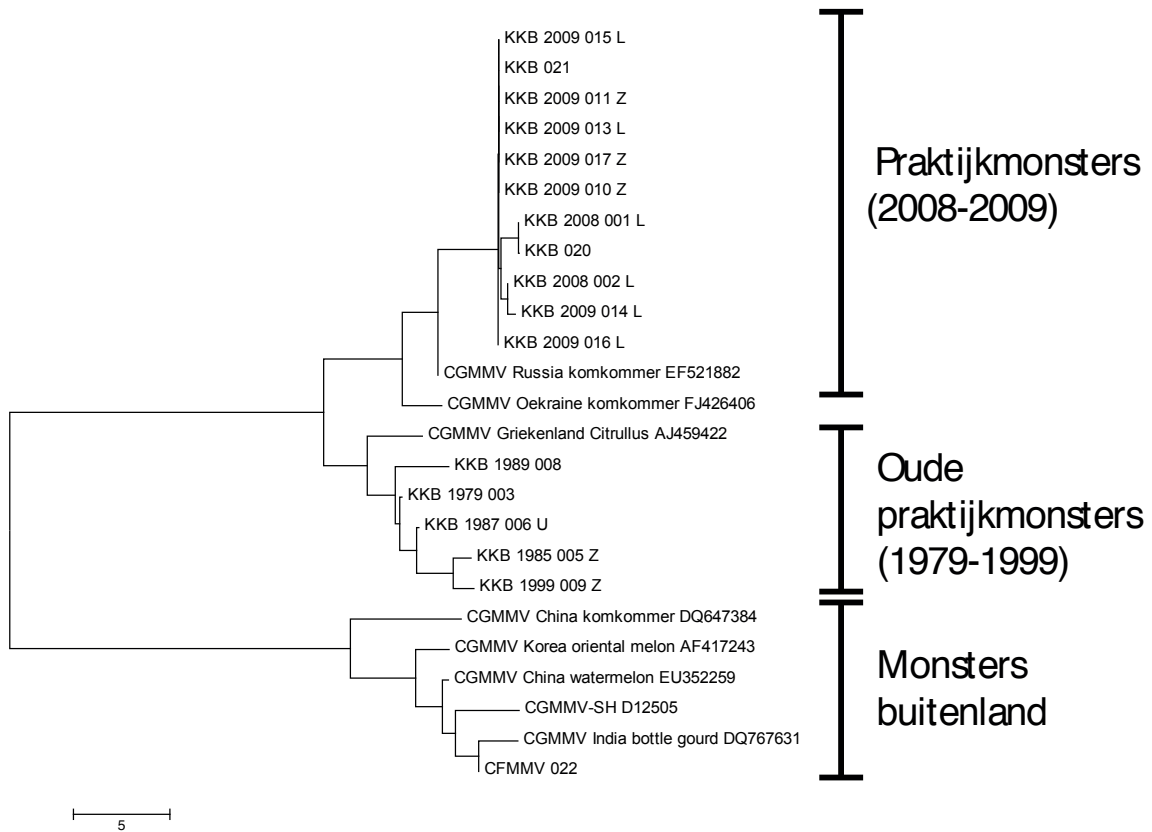
Gemiddeld gewicht per vrucht (per week): Bij alle rassen ligt vanaf de 4<sup>e</sup> week het gemiddeld vruchtgewicht hoger bij de vruchten afkomstig van de virus besmette planten dan bij de gezonde planten (Figuur 9.).

- o Vooral bij ras B is bij de laatste oogstweek het verschil groter, wat betreft het gemiddelde vruchtgewicht, tussen de behandelde en onbehandelde planten.
- o Bij ras J is dit verschil in gemiddeld vruchtgewicht tussen de behandelde en onbehandelde planten gedurende de gehele oogst wat minder groot.

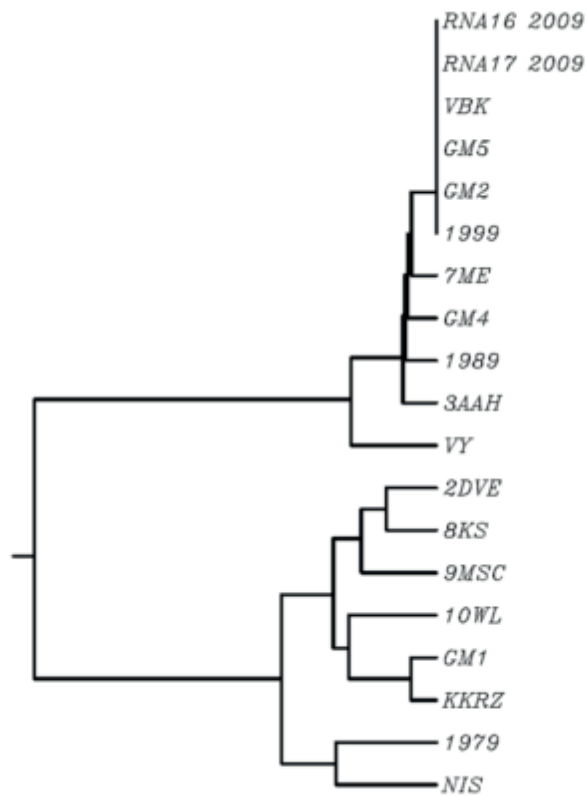
### 3.3 Genetische verwantschappen tussen virus-isolaten

PCR producten die geamplificeerd zijn met primers prCG3-F/prCG3-R geven vaak sequenties met matige kwaliteit (achtergrondbandjes). Sequenties van producten die geamplificeerd zijn met primers CGMMVF8/CGMMVR8 zijn goed en bruikbaar voor de fylogenetische analyse.

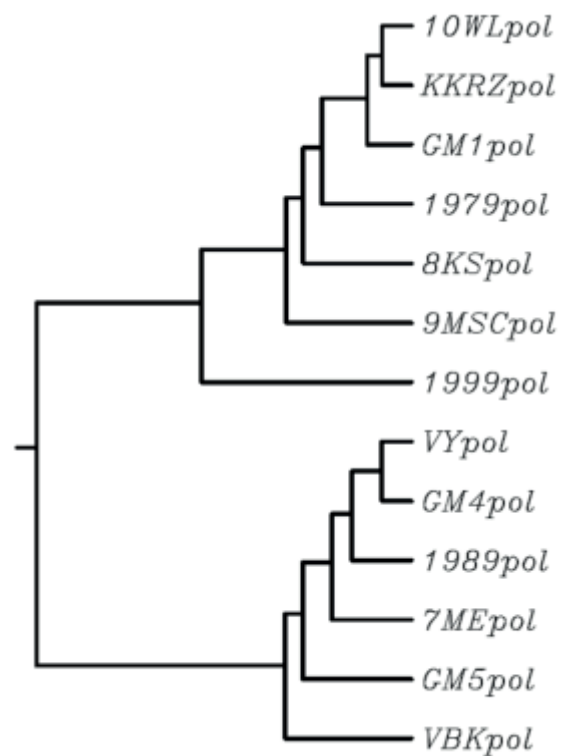
In Figuur 10. is de vergelijking van CP sequenties weergegeven van de monsters verzameld in 2008 en 2009 vergeleken met oude praktijkmonsters en monsters uit het buitenland. In Figuur 11. is dit gedaan voor monsters van 2010, 2011 en 2012. In Figuur 12. staat de analyse voor monsters van 2010, 2011 en 2012 op polymerase. Dit is niet gedaan voor alle monsters (was in een aantal gevallen niet mogelijk).



Figuur 10. Vergelijking van CP sequenties tussen CGMMV monsters van 2008-2009; oude praktijkmonsters (1979-1999) en sequenties van diverse isolaten uit GenBank.



Figuur 11. Vergelijking CP sequenties tussen diverse CGMMV praktijkmonsters (2010-2012) en isolaten uit 1979, 1989, 1999.



Figuur 12. Vergelijking polymerase sequenties tussen diverse CGMMV praktijkmonsters (2010-2012) en isolaten uit 1979, 1989, 1999.

### 3.4 Vergelijking van virus-isolaten

In Tabel 4 staan de resultaten vermeld van de vergelijking van virus-isolaten op komkommerplanten. Dit zijn de isolaten met de codes: GM1, GM 2, GM 4, 1 VY, 2DVE, 3AAH, VBK. In Tabel 5 staan de resultaten vermeld van de volgende isolaten met de codes: 7ME, 8KS, 9MSC, 10WL, CGMMV 1979, CGMMV 2008.

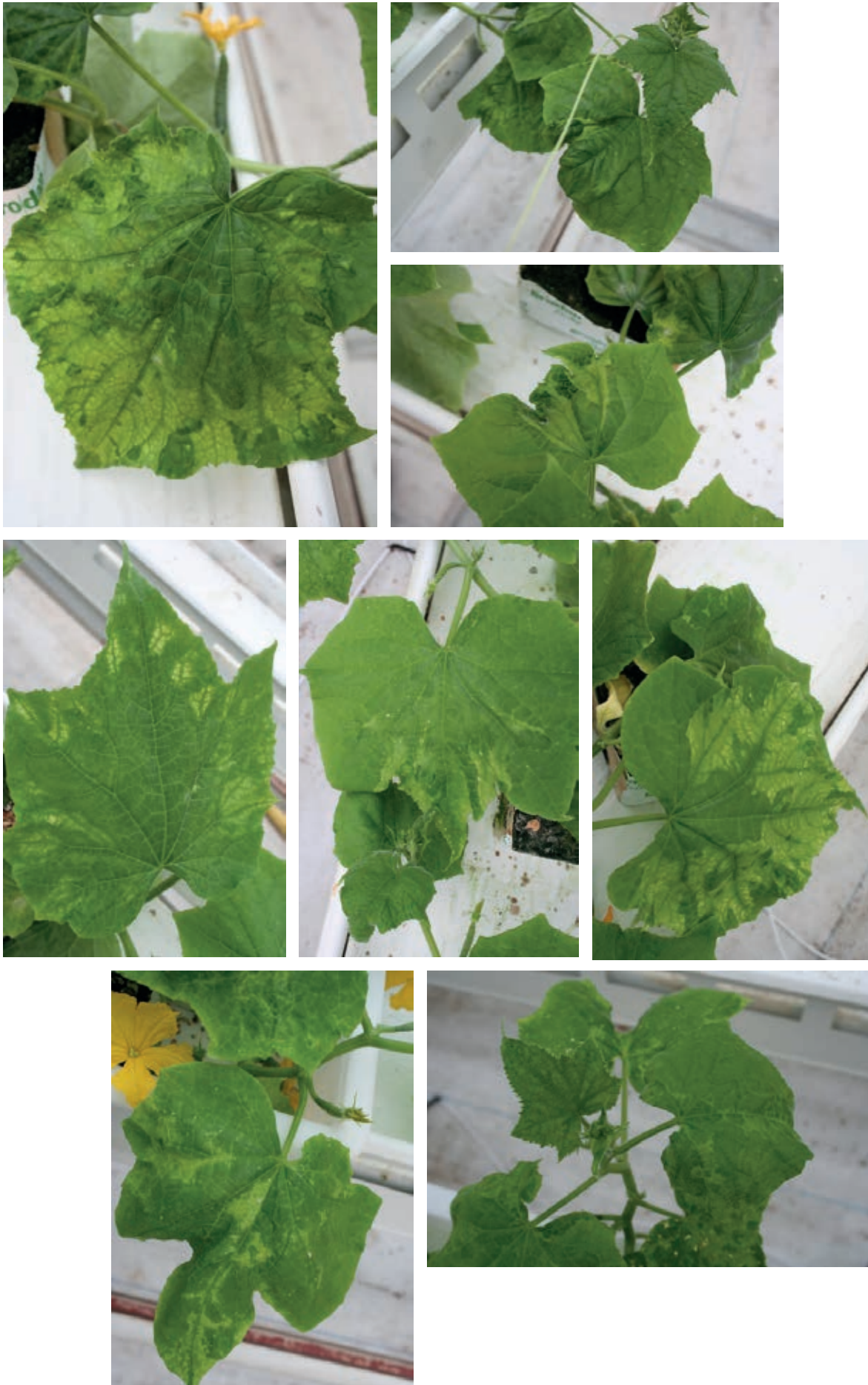
Over het algemeen zijn de symptomen in de kop van de plant pas 16 dagen na inoculatie zichtbaar. In Figuur 13. staat een selectie van de verschillende symptomen van komkommerbontvirus van de diverse isolaten op jonge komkommerplanten.

Tabel 4. Symptoomontwikkeling op komkommerplanten van de diverse CGMMV isolaten.

Isolaat	Datum	Dagnr.	Oud blad				Jong blad/kop				Opmerkingen
			Groeiremming	Vergeling	Misvorming	Mozaïek	Misvorming	Mozaïek	Bobbeling	Vergeling	
GM1	16-jan	14	-	-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	-	+/-	-	-	-	-	-	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	-	-	+/-	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	
	2-feb	31	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	
	6-feb	35	-	+/-	-	-	-	-	-	-	
	15-feb	44	-	+	-	-	-	-	-	-	streperige vlekken op oud blad
GM2	16-jan	14	-	-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	+/-	-	-	-	-	-	+	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	+	-	+	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	+	+	-	
	2-feb	31	+	-	-	-	-	+	+	-	
	6-feb	35	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	
	15-feb	44	-	+	+/-	-	-	+/-	-	-	
GM4	16-jan	14	+/-	-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	+/-	-	-	-	-	-	+	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	+	-	+	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	
	2-feb	31	+/-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	lichte tekening nerven
	6-feb	35	-	-	-	-	-	+/-	-	-	
	15-feb	44	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	
1VY	16-jan	14	+/-	-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	+/-	-	-	-	-	-	+	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	+	-	+	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	+	++	-	
	2-feb	31	+	-	-	-	-	-	++	-	
	6-feb	35	-	-	-	-	-	-	+/-	-	
	13-feb	42	-	+	-	-	+	-	-	-	
2dVE	16-jan	14	-	-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	-	-	-	-	-	-	-	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	-	-	+	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	-	+	-	
	2-feb	31	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6-feb	35	-	-	-	-	-	-	-	-	
	15-feb	44	-	+/-	-	-	-	-	-	-	
3AAH	16-jan	14	-	-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	-	-	-	-	-	-	-	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	-	-	-	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2-feb	31	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6-feb	35	-	-	-	-	-	-	-	-	
	15-feb	44	-	-	-	-	-	-	-	-	
VBK	16-jan	14	-	+/-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	-	+/-	-	-	-	-	+	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	+	-	+	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	++	++	-	
	2-feb	31	-	-	-	-	-	+	+	-	
	6-feb	35	-	-	-	-	-	+/-	-	-	
	13-feb	42	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	

Tabel 5. Symptoomontwikkeling op komkommerplanten van de diverse CGMMV isolaten.

Isolaat	Datum	Dagnr.	Oud blad				Jong blad/kop				Opmerkingen
			Groeiremming	Vergeling	Misvorming	Mozaïek	Misvorming	Mozaïek	Bobbeling	Vergeling	
7ME	16-jan	14	-	+/-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	-	+/-	-	-	-	-	+	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	+	-	+	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	++	++	-	
	2-feb	31	-	-	-	-	-	-	++	-	
	6-feb	35	-	-	-	-	-	-	+/-	-	
	15-feb	44	-	+	+	-	+/-	-	-	-	
8KS	16-jan	14	-	-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	-	-	-	-	-	-	-	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	-	-	+	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	-	+/-	-	
	2-feb	31	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6-feb	35	-	-	-	-	-	-	-	-	
	13-feb	42	-	-	-	-	-	-	-	-	
9MSC	16-jan	14	-	-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	-	-	-	-	-	-	+	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	+/-	-	+	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	++	++	-	
	2-feb	31	-	-	-	-	-	+/-	+	-	
	6-feb	35	-	-	-	-	-	-	-	-	
	15-feb	44	-	+	+/-	-	-	-	-	-	
10WL	16-jan	14	-	-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	-	-	-	-	-	-	-	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	+	-	+	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	+	+	-	
	2-feb	31	-	-	-	-	-	+	+/-	-	
	6-feb	35	-	-	-	-	-	-	+/-	-	
	13-feb	42	-	+	-	-	+/-	-	-	-	
CGMMV 1979	16-jan	14	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	+/-	+/-	-	-	-	-	+	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	+	-	+	-	
	30-jan	28	-	-	-	-	-	+	+	-	
	2-feb	31	-	+	-	-	-	-	++	-	
	6-feb	35	-	-	-	-	-	-	+	+	
	15-feb	44	-	+	+	-	+	+	-	-	
CGMMV 2008	16-jan	14	-	+/-	-	-	-	-	-	-	
	18-jan	16	-	+/-	-	-	-	-	-	-	
	23-jan	21	-	-	-	-	+	-	+	-	
	30-jan	28	+	-	-	-	-	+	+	-	
	2-feb	31	-	-	-	-	-	-	++	-	oplichtende nerven
	6-feb	35	-	-	-	-	-	+	+/-	-	
	13-feb	42	+	-	+/-	-	-	-	-	-	



*Figuur 13. Diverse symptomen van komkommerbontvirus op jonge komkommerplanten.*





## 4 Discussie en conclusie

### *Verzamelen van komkommerbontvirus-isolaten*

- o Voor het onderzoek was het van belang om uit diverse teeltregio's van Nederland bladmateriaal te verzamelen van komkommerplanten die geïnfecteerd waren met komkommerbontvirus. Dit is gelukt en het materiaal is ingezet voor het bepalen van de genetische verwantschappen en te vergelijken op planten.

### *Vergelijken van komkommerrassen*

#### Symptomen

- o In een kasproef zijn een oud komkommerbontvirus-isolaat (uit 1979) en een isolaat uit 2011 met elkaar vergeleken op vier komkommerrassen. Het betreft twee gangbare rassen (Ras R en S) en twee rassen waarbij een minder snelle virusvermeerdering plaatsvindt en minder virussymptomen worden waargenomen (Ras B en J).
- o Ras B gaf duidelijk minder virussymptomen dan de andere drie rassen en daarbij was nauwelijks een verschil waar te nemen tussen de twee komkommerbontvirus isolaten.
- o Bij ras J verschenen minder symptomen dan bij de rassen R en S voor zowel het oude als het nieuwe isolaat, maar gaf meer symptomen dan ras B.
- o Ras B laat geleidelijk in de teelt een toename van de symptomen zien terwijl er bij de andere rassen meer pieken en dalen te zien zijn.
- o De rassen R en S lieten vooral veel symptomen zien in de eerste weken na inoculatie met het oude komkommerbontvirus isolaat. Bij de waarneming 57 dagen na inoculatie laten deze rassen minder symptomen zien dan de planten die met het isolaat uit 2011 zijn besmet.

#### Opbrengst

- o Opvallend is dat de totale opbrengst van de rassen R, S en J het laagst was bij de planten die geïnfecteerd zijn met het oude isolaat van komkommerbontvirus van 1979. Waarbij de verschillen bij de rassen R en S groter zijn dan bij ras J.
- o Bij ras B waren er geen grote verschillen in opbrengst te zien tussen de gezonde en besmette planten.
- o Ras J weet uiteindelijk van alle rassen de hoogste opbrengst te genereren.
- o Bij de rassen R en S werden de minste vruchten geoogst van de planten die geïnfecteerd zijn met het oude isolaat. Dit kwam tot uiting in de totale opbrengst.
- o Ras B heeft de meeste geoogste vruchten bij de virus besmette planten (oud isolaat) en ras J heeft de meeste vruchten bij de met het nieuwe isolaat besmette planten.
- o Bij het totaal aantal geoogste vruchten van de gezonde planten zijn de verschillen tussen de rassen minder groot dan bij de virus besmette planten.
- o Opvallend bij het gemiddelde vruchtgewicht is de toename hiervan vanaf de 4<sup>e</sup> oogstweek bij de vruchten afkomstig van de besmette planten. Al is dat bij ras J minder sterk dan bij de andere rassen. Ras B laat de meeste toename zien.

### *Genetische verwantschappen tussen virus-isolaten*

- o Groepen van oude en nieuwe monsters zijn duidelijk te onderscheiden.
- o Meer variatie binnen oude monsters dan binnen de nieuwe.
- o De virusisolaten die momenteel in de praktijk voorkomen wijken genetisch duidelijk af van hetgeen er voor 2000 in de praktijk voorkwam en zijn ook anders t.o.v. buitenlandse isolaten.
- o Genetische verschillen bestaan tussen de geanalyseerde isolaten uit 2010, 2011 en 2012. Uit de analyse van CP sequentie is te zien dat deze isolaten in 2 subgroepen verdeeld kunnen worden;
  - o groep 1: VY, 3AAH, GM2, GM4, GM5, 7ME, VKB met isolaten uit 1989, 1999 en 2009.
  - o groep 2: 2DVE, 8KS, 9MSC, 10WL, GM1, KKRZ en NIS met isolaat uit 1979 (!).
- o Vergelijkbaar resultaat (2 subgroepen) zijn ook te vinden bij het analyseren van Polymerase sequentie.

### *Vergelijking van virus-isolaten*

- o Aan de hand van de resultaten van de genetische verwantschappen die in 2 subgroepen verdeeld kunnen worden, is gekeken naar de symptoomontwikkeling van de verschillende isolaten op de toetsplanten.
- o Er kan geen duidelijke relatie worden gelegd tussen de symptomen en de diverse isolaten.

Op basis van de resultaten van de genetische verwantschappen is duidelijk geworden dat er groepen van oude en nieuwe isolaten te onderscheiden zijn. Dat de virus-isolaten die momenteel in de praktijk voorkomen duidelijk genetisch afwijken van hetgeen er voor 2000 voorkwam en ook t.o.v. van buitenlandse isolaten. Er kon echter geen relatie worden gelegd tussen de symptomen en de diverse isolaten.

Wel is er een effect gezien van een isolaat uit 1979 en een isolaat uit 2011 op gangbare rassen en rassen waarbij minder symptomen van het virus worden waargenomen. Het isolaat uit 1979 leverde meer symptomen op dan die uit 2011 en dat was onverwachts. Ook de opbrengst was bij de gevoelige rassen lager bij infectie met het oude isolaat.

## 5      **Literatuur**

- J. Y. Yoon, G. S. Choi, S. K. Choi, J. S. Hong, J. K. Choi, W. Kim, G. P. Lee and K. H. Ryu. Molecular and Biological Diversities of Cucumber green mottle mosaic virus from Cucurbitaceous Crops in Korea. *J. Phytopathology* 156, 408-412 (2008).
- A. J. Gibbs, J. S. Armstrong, and M. J. Gibbs. A type of nucleotide motif that distinguishes tobamovirus species more efficiently than nucleotide signatures. *Arch Virol* 149: 1941-1954 (2004).









