

Komkommerbontvirus: Overleving tijdens het wassen en veranderingen in het virus

1. Wageningen UR Glastuinbouw
Violierenweg 1
2665 ZG Bleiswijk
Tel.: 0317 485606
E-mail: glastuinbouw@wur.nl
Internet: www.glastuinbouw.wur.nl

2. PPO Lisse
Prof. Van Slogterenweg 2
2161 DW Lisse

Projectnummer: 3242095000
PT nummer: 13834-04

INLEIDING

1.1 Achtergrondinformatie

In de teelt van komkommer kunnen een aantal virussen voor problemen zorgen, waarbij komkommerbontvirus de belangrijkste is. In 2009 kampte de komkommerteelt met grote problemen door besmetting met komkommerbontvirus (Fig. 1). Dit virus is mechanisch overdraagbaar en door een gebrek aan bestrijdingsmaatregelen vormt dit virus een toenemend probleem waartegen alleen hygiënemaatregelen afdoende zijn. Overdracht vindt plaats bij gewashandelingen als snoeien en oogsten. Ook via besmet materiaal zoals mesjes, scharen, kleding, sieraden en fust is verspreiding mogelijk.



Figuur 1. *Het grootste probleem rondom komkommerbontvirus zijn niet zozeer de virussymptomen (links), maar het feit dat het virus productie kost. Als de vruchten blijven hangen tot voorbij het normale oogstmoment, kunnen er wel virussymptomen ontstaan (rechts).*

1.2 Overleving van het virus

In het najaar van 2008 is door Wageningen UR Glastuinbouw een uitgebreid hygiëneprotocol komkommer geschreven voor de teelt van komkommer. Vooral wat betreft de overleving van het virus blijkt dat er nog informatie ontbreekt. Het protocol besteedt aandacht aan gebruik van kleding en handschoenen. Veel bedrijven werken met wegwerphandschoenen, maar soms gebruiken ze handschoenen van textiel. De overleving van komkommerbontvirus moet niet onderschat worden. Zo bleek virus dat achterbleef op textiele handschoenen die bij een teler gedragen zijn tijdens het gewaswerk, na twee maanden nog altijd in staat om gezonde planten te besmetten. Daarmee kan het virus de periode van de teeltwisseling ruimschoots overbruggen. Als men kleding hergebruikt, zal deze gewassen moeten worden. Wat is daarbij de minimale wastemperatuur die het virus effectief dood zodat er geen gevaar meer is voor verspreiding van het virus?

1.3 Verandering van het virus door de tijd

De teeltwisseling is een goede gelegenheid om van een virusprobleem af te komen. Het lukt echter niet in alle gevallen om van het virus af te komen, wat in 2009 al vroeg (februari) in het teeltseizoen bleek. Vooral in Zuidoost-Nederland valt op dat na de eerste meldingen het aantal bedrijven met een besmetting snel toenam. Ook de heftigheid van de symptomen viel op. De oorzaak hiervan was nog onduidelijk. Door telers werd aangegeven dat er veel aandacht besteed is aan het ontsmetten tijdens de teeltwisseling. Vraag daarbij blijft of alles goed is gedaan of dat er zaken per ongeluk of doordat ze onbekend zijn over het hoofd zijn gezien. Naast de hygiënemaatregelen leven de vragen of het virus in de loop de tijd agressiever is geworden of dat nieuwe rassen gevoelig zijn voor komkommerbontvirus.

Komkommerbontvirus komt al jaren in Nederland voor. Dat de laatste jaren de problemen in ernst lijken toe te nemen kan diverse oorzaken hebben:

- Door een verhoogde infectiedruk treden al eerder in de teelt besmettingen op.
- In de loop der tijd is men gevoeligere rassen gaan telen
- De teeltomstandigheden zijn veranderd.
- Mogelijk zijn er nieuwe isolaten/stammen van komkommerbontvirus in Nederland opgedoken die agressiever zijn in hun symptomen vergeleken met isolaten van jaren geleden.
- Er zijn recentelijk diverse andere virussen ontdekt die nauw aan komkommerbontvirus verwant zijn en waarvan momenteel niet bekend is of ze in Nederland voorkomen en zo ja, wat hun bijdrage is aan de ontstane problemen.

Om de laatste twee opties te kunnen onderzoeken zal het huidige geïnfecteerde plantmateriaal vergeleken moeten worden met de door de jaren heen verzamelde isolaten die bewaard zijn gebleven in de viruscollectie.

1.4 Doelstellingen

- Uitzoeken wat de minimale wastemperatuur is waarbij komkommerbontvirus effectief wordt afgedood, zodat er geen gevaar meer is voor verspreiding van het virus via kleding.
- Nagaan of er momenteel andere isolaten/stammen van het komkommerbontvirus voorkomen in Nederland in vergelijking met isolaten van enkele tot meerdere jaren geleden.

METHODE

2.1 Wastest

Voor de wastest zijn op drie verschillende manieren katoenen shirts en handschoenen "besmet" met komkommerbontvirus:

- Bij een teelt waarbij komkommerbontvirus in het gewas zat, zijn kledingstukken verzameld die gedragen zijn tijdens de reguliere gewaswerkzaamheden.
- Kledingstukken zijn besmet door ze in te wrijven met bladeren van besmette planten uit de bovengenoemde teelt (dit is uitgevoerd in duplo)
- Kledingstukken zijn besmet door ze te dompelen in een virussuspensie die gemaakt is door bladeren van besmette planten uit de bovengenoemde teelt fijn te malen.

Bij alle drie de besmettingswijze is dus sprake van een besmetting met hetzelfde virusisolaat. Dat er daadwerkelijk virus in de betreffende teelt aanwezig was - hetgeen al vermoed werd vanwege de aanwezigheid van symptomen door de hele kas - is met een ELISA gecontroleerd door tien individuele planten te testen die verspreid over de kas stonden. Al deze planten testten positief voor komkommerbontvirus.

Vervolgens zijn deze kledingstukken gewassen met een wasprogramma onder toevoeging van wasmiddel. Daarbij is gewassen bij een gelijkblijvende tijdsduur bij drie verschillende wastemperaturen:

- 40°C
- 60°C
- 90°C

Daarnaast bleef één set kledingstukken ongewassen. Dit geeft aan of het virus überhaupt kon overleven op de kleding. Ook zijn er ter controle onbesmette kledingstukken meegedraaid in het wasprogramma van 40°C. Dit geeft aan of er overdracht van virus kan plaatsvinden van besmette naar onbesmette kledingstukken tijdens het verblijf in de wasmachine.

In totaal zijn dus 2 (shirts; handschoen) x 4 (gewaswerkzaamheden; wrijven; wrijven; dompelen) x 4 (40 °C; 60°C; 90°C; ongewassen) = 32 behandelingen uitgevoerd. Daarbij kwamen nog 3 controle behandelingen (meegewassen, schone shirts, besmet plantensap).

De dag na het wassen zijn veegmonsters genomen van kledingstukken die vervolgens zijn uitgesmeerd op toetsplanten. Per behandeling zijn telkens 4 toetsplanten ingesmeerd. Besmetting van deze toetsplanten is bepaald door het ontstaan van symptomen te monitoren en door individuele planten met een ELISA te toetsen voor de aanwezigheid van komkommerbontvirus.

2.2 Genetische variatie

Voor dit onderdeel zijn diverse isolaten verzameld die uiteenvallen in drie groepen:

- Oude praktijkmonsters (1979-1999). Deze monsters waren afkomstig uit de collectie van Wageningen UR Glastuinbouw en zijn in het verleden in Nederland verzameld.
- Recente praktijkmonsters (2008-2009). Deze monsters zijn in 2008 of 2009 in Nederland verzameld door de onderzoekers of via contacten in de praktijk. Deze monsters zijn opgeslagen in de collectie van Wageningen UR Glastuinbouw.
- Buitenlandse monsters. Via de Plantenziektenkundige Dienst zijn monsters verkregen van een isolaat van komkommerbontvirus uit het buitenland en van twee aan komkommerbont verwante virussen. Deze monsters zijn niet opgeslagen in de collectie.

Tabel 1 geeft een overzicht van de herkomst van de diverse isolaten. Daarbij wordt alleen aangegeven uit welke regio de monsters komen zodat deze door derden niet herleidbaar zijn naar individuele bedrijven.

Het erfelijk materiaal van komkommerbontvirus omvat maar beperkt aantal genen. Van het erfelijk (RNA) materiaal zijn twee regio's onderzocht door de sequentie ervan te bepalen:

- een stuk RNA met het volledige manteleiwit en een deel van het "mouvement"-eiwit.
- een stuk RNA met een deel van het replicase-eiwit.

Tabel 1. Herkomst van de 22 onderzochte isolaten.

Isolaatcode	Gewas	Jaartal bemonstering	Land	Regio
CGMMV_2008_01	Komkommer	2008	Nederland	Limburg
CGMMV_2008_02	Komkommer	2008	Nederland	Limburg
CGMMV_1979_03	Komkommer	1979	Nederland	onbekend
CGMMV_1984_04	Komkommer	1984	Nederland	Limburg
CGMMV_1985_05	Komkommer	1985	Nederland	Zuid-Holland
CGMMV_1987_06	Komkommer	1987	Nederland	UT
CGMMV_1987_07	Komkommer	1987	Nederland	Zuid-Holland
CGMMV_1989_08	Komkommer	1989	Nederland	onbekend
CGMMV_1999_09	Komkommer	1999	Nederland	Zuid-Holland
CGMMV_2009_10	Komkommer	2009	Nederland	Zuid-Holland
CGMMV_2009_11	Komkommer	2009	Nederland	Zuid-Holland
CGMMV_2009_12	Komkommer	2009	Nederland	Noord-Brabant
CGMMV_2009_13	Komkommer	2009	Nederland	Noord-Brabant
CGMMV_2009_14	Komkommer	2009	Nederland	Limburg
CGMMV_2009_15	Komkommer	2009	Nederland	Limburg
CGMMV_2009_16	Komkommer	2009	Nederland	Noord-Brabant
CGMMV_2009_17	Komkommer	2009	Nederland	Zuid-Holland
CGMMV_2009_18	Komkommer	2009	Nederland	Limburg
KGMMV_19	Courgette	????	Zuid-Korea	-
CGMMV_2009_20	Komkommer	2009	Nederland	onbekend
CGMMV_2009_21	Komkommer	2009	Nederland	onbekend
CFMMV_22	Komkommer	????	Israel	-

RESULTATEN

3.1 Wastest

Het wassen van kleding blijkt niet onder alle omstandigheden afdoende te zijn. Er is bij 40, 60 en 90 graden gewassen en ook ongewassen kleding is getoetst. Uiteraard bleek dat het virus op alle ongewassen kledingstukken overleeft, maar bij zowel een wastemperatuur van 40 als bij 60 graden bleef op meer dan de helft van de kledingstukken infectieus virus achter. Alleen een temperatuur van 90 bleek afdoende om al het virus te doden (Tabel 2).

Tabel 2. Invloed wastemperatuur op overleving van komkommerbontvirus

Wastemperatuur	Aantal planten met symptomen
Ongewassen ($n=32$)	32
40 °C ($n=32$)	8
60 °C ($n=32$)	11
90 °C ($n=32$)	0

Tabel 3. Invloed type kledingstuk op overleving van komkommerbontvirus

Wastemperatuur	Aantal planten met symptomen
Handschoenen ($n=32$ ¹)	9
T-shirts ($n=32$)	10

¹ De planten in de behandelingen "ongewassen" en "90 °C" zijn weggelaten uit deze vergelijking omdat in deze behandelingen respectievelijk alle en geen planten symptomen kregen.

Tabel 4. Invloed besmettingswijze op overleving van komkommerbontvirus

Besmettingswijze	Aantal planten met symptomen
Inwrijven ($n=16$)	6
Inwrijven, herhaling ($n=16$)	7
Dompelen ($n=16$)	4
Gewaswerk ($n=16$)	2

¹ De planten in de behandelingen "ongewassen" en "90 °C" zijn weggelaten uit deze vergelijking omdat in deze behandelingen respectievelijk alle en geen planten symptomen kregen.

Er zijn geen verschillen gevonden tussen de overdracht via besmette handschoenen of shirts (Tabel 3). Omdat beide kledingstukken van hetzelfde materiaal gemaakt zijn, verwachten we hier ook geen verschillen. De besmettingswijze leverde wel een verschil op wat betreft de overleving en overdracht van het virus (Tabel 4). Bij het inwrijven van de kledingstukken met virusbesmette bladeren vond de meeste overdracht plaats, terwijl dit bij kledingstukken die gedragen zijn tijdens het reguliere gewaswerk lager ligt. Dit lag in de lijn der verwachting en wordt waarschijnlijk verklaard door een kleinere hoeveelheid virus op de laatstgenoemde kledingstukken.

Echter, de verwachting was ook dat bij dompelen de meeste overdracht zou plaatsvinden. Dit bleek niet het geval te zijn.

2.2 Biologische en genetische variatie

Van de diverse monsters die in 2008/2009 in de Nederlandse praktijk verzameld zijn is allereerst onderzocht of er ook aanwijzingen zijn dat er naast komkommerbontvirus ook andere virussen voorkwamen. Daarnaast is bekeken of er verschillen waren in de ernst van de reactie op komkommerplanten. In één van de praktijkmonsters vonden we duidelijke aanwijzingen op de aanwezigheid van een ander mechanisch overdraagbaar virus naast de aanwezigheid van komkommerbontvirus (Tabel 5). Dit monster gaf namelijk een reactie op *N. benthamiana*, terwijl de andere monsters dit niet deden. Helaas zijn de symptomen die dit isolaat in de praktijk gaf, niet systematisch gedocumenteerd en is daarom nog onduidelijk wat de invloed is van een mogelijk tweede virus op de symptomen in komkommer. De identiteit van dit virus is onbekend. Ook was er een tweedeling in de ernst van de reactie op komkommer. Deze kan veroorzaakt zijn door een verschuiving in de agressiviteit van het virus, maar zou ook herleid kunnen worden op opslag van de isolaten. De oude monsters waren afkomstig uit de vriezer, terwijl de recentere monsters direct uit de praktijk kwamen.

Tabel 5. Reactie op toetsplanten

Isolaatcode	Komkommer	<i>Datura</i>	<i>N. benthamiana</i>
CGMMV_2008_01	sys	n.b.	n.b.
CGMMV_2008_02	sys	n.b.	n.b.
CGMMV_1979_03	sys	n.b.	n.b.
CGMMV_1984_04	-	n.b.	n.b.
CGMMV_1985_05	sys	n.b.	n.b.
CGMMV_1987_06	sys	n.b.	n.b.
CGMMV_1987_07	-	n.b.	n.b.
CGMMV_1989_08	sys	n.b.	n.b.
CGMMV_1999_09	sys	-	-
CGMMV_2009_10	sys	-	-
CGMMV_2009_11	sys	-	-
CGMMV_2009_12	sys	-	-
CGMMV_2009_13	sys	-	-
CGMMV_2009_14	sys	-	lokaal
CGMMV_2009_15	sys	-	-
CGMMV_2009_16	sys	-	-
CGMMV_2009_17	sys	-	-
CGMMV_2009_18	sys	-	-
KGMMV_19 ¹	sys	lokaal	lokaal
CGMMV_2009_20 ²	sys	-	-
CGMMV_2009_21 ³	sys	-	-
CFMMV_22 ⁴	sys	-	lokaal

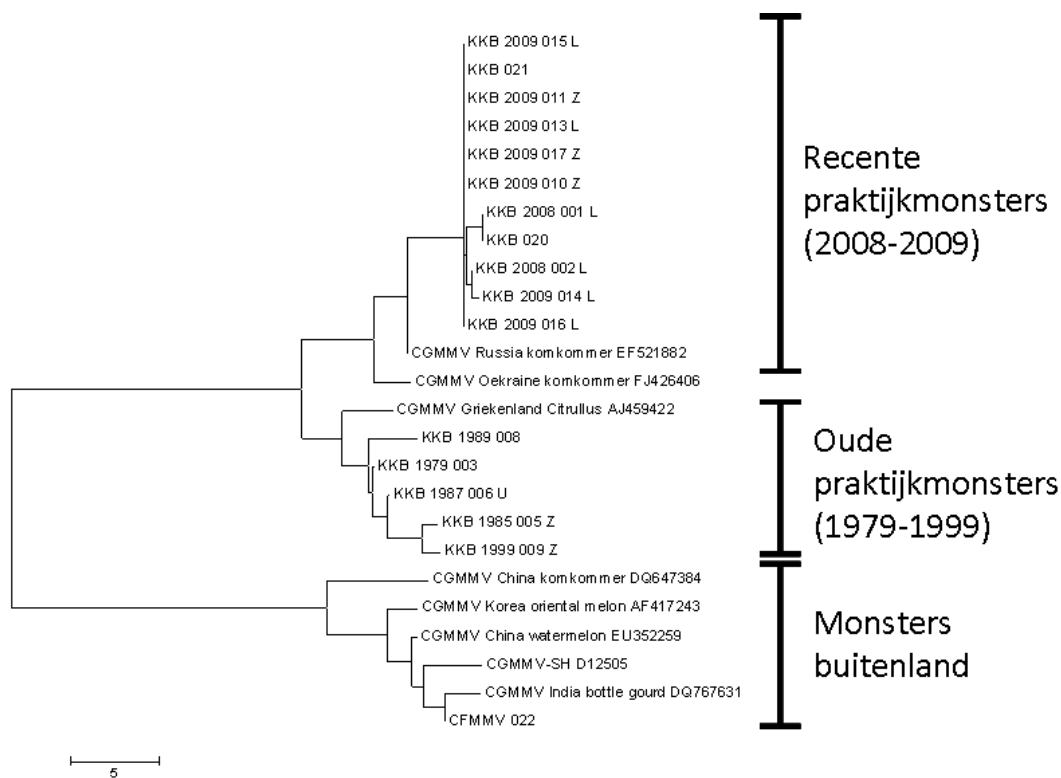
¹ Toetsplantonderzoek gedaan door de PD

² Toetsplantonderzoek gedaan door de PD

³ Toetsplantonderzoek gedaan door de PD

⁴ Toetsplantonderzoek gedaan door de PD

Om te onderzoeken of er genetische verschillen zijn tussen de oude en recente virusisolaten van komkommerbontvirus hebben we oriënterend een aantal virusisolaten die in het verleden in Nederland verzameld zijn, vergeleken met recente praktijkmonsters. Daarbij bleken er genetische verschillen te bestaan tussen deze groepen voor wat betreft een tweetal regio's in het erfelijk materiaal van het virus. Van de verkregen sequenties is een zogeheten fylogenetische boom gemaakt. Deze geeft grafisch weer wat de verwantschap is tussen de diverse sequenties. Monsters die bij elkaar groeperen zijn nauwer aan elkaar verwant dan aan de andere monsters (Fig. 2). In de boom zijn drie hoofdgroepen te ontdekken, die bestaan uit de recente praktijkmonsters, de oude praktijkmonsters en de buitenlandse monsters. Daarbij moet aangetekend worden dat in de gendatabase ook voor wat betreft de recente en oude praktijkmonsters enkele buitenlandse monsters te vinden zijn die afkomstig zijn uit Zuid en Oost-Europa. In de groep "buitenlandse monsters" bevinden zich isolaten uit Azië.



Figuur 2. *Vergelijking tussen recente en oude praktijkmonsters. De virusisolaten die momenteel in de praktijk voorkomen wijken genetisch duidelijk af van hetgeen er voor 2000 in de praktijk voorkwam.*

De beide regio's van het erfelijk materiaal van het virus geven een vergelijkbaar beeld met één uitzondering. Monster "CGMMV_2009_12" blijkt een recombinatie te zijn tussen de groep met oude en recente praktijkmonsters. Het voorste deel van de sequentie lijkt sterk op de sequenties in de ene groep, terwijl het achterste deel identiek is aan de sequenties in de andere groep (Tabel 6). De genetische variatie binnen de groep "oude praktijkmonsters" is groter dan binnen de groep van "recente praktijkmonsters", maar daarbij moeten worden aangetekend dat de eerste groep verspreid over een periode van 20 jaar is verzameld, terwijl de tweede groep

verzameld is binnen een periode van 2 jaar. Omdat het slechts een oriënterend onderzoek betreft is niet duidelijk in hoeverre het ontstane beeld representatief is voor de huidige praktijk. Daarvoor zou een groter aantal monsters bekeken moeten worden en zouden ook de in de praktijk waargenomen symptomen goed gedocumenteerd moeten worden.

Tabel 4. Aanwezige varianten van de diverse genen. De kleurtjes in de tabel geven aan of er ook daadwerkelijk sprake is van een andere eiwitvariant.

Isolaatcode	Monsterdatum	Land	Regio	REP (deels)	MP (deels)	CP	3'
CGMMV_2008_01	19-09-2008	NL	LB	-	01a	01a	01a
CGMMV_2008_02	05-11-2008	NL	LB	01a	01a	01b	01a
CGMMV_1979_03	??-??-1979	NL	-	02a	02a	02a	02a
CGMMV_1985_05	??-05-1985	NL	ZH	02b	02b	02b	02b
CGMMV_1987_06	??-??-1987	NL	UT	02c	02a	02c	02a
CGMMV_1989_08	??-03-1989	NL	-	02d	02a	02a	02a
CGMMV_1999_09	??-05-1999	NL	ZH	02e	02a	02d	02a
CGMMV_2009_10	05-10-2009	NL	ZH	01b	01a	01b	01a
CGMMV_2009_11	03-11-2009	NL	ZH	01b	01a	01b	01a
CGMMV_2009_12	26-10-2009	NL	NB	02f	01a	01b*	-
CGMMV_2009_13	26-10-2009	NL	NB	01b*	01a	01b	01a
CGMMV_2009_14	26-10-2009	NL	LM	01b	01a	01a	01b
CGMMV_2009_15	26-10-2009	NL	LM	01b	01a	01b	01a
CGMMV_2009_16	26-10-2009	NL	NB	01b	01a	01b	01a
CGMMV_2009_17	??-??-2009	NL	ZH	01c	01a	01b	01a
CGMMV_2009_20	??-??-????	NL	?	01b	01a	01a	01a
CGMMV_2009_21	??-??-????	NL	?	01b	01a	01b	01a
CFMMV_22	??-??-????	Israël	?	03a	03a	03a	03a

* Incompleet

CONCLUSIE

4.1 Wastest

In het najaar van 2008 is door Wageningen UR Glastuinbouw een kleinschalige proef uitgevoerd met handschoenen (textiel) die gebruikt waren in een komkommerteelt die door komkommerbontvirus besmet was. Op deze handschoenen kon twee maanden na afloop van de teelt (waarbij de handschoenen dus in opslag lagen), nog infectieus virus worden aangetoond. Komkommerbontvirus kan dus lang overleven op kledingstukken. Ook na het wassen van de kledingstukken kan infectieus virus achterblijven. Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat wassen op gangbare wastemperaturen (40 en 60 °C) beslist onvoldoende is voor afdoding van het virus.

Dit heeft gevolgen voor de kleding van medewerkers en bezoekers. Ook al hebben bezoekers die dag nog geen andere bedrijven bezocht, dan kunnen zij dus virus meenemen van bezoeken op eerdere dagen, ongeacht of deze kleding nou wel of niet gewassen is. Dit onderstreept de noodzaak van het gebruik van bedrijfskleding of beschermende pakken. Voor handschoenen kan beter gekozen worden voor wegwerp (kunststof)handschoenen in plaats van textiel. Aangezien schoenen helemaal niet gewassen worden, kleeft hieraan een nog groter risico, dus ontsmettingsmatten zijn noodzakelijk. Als besmette kleding gewassen wordt bij te lage temperaturen, kan deze kleding komkommerbontvirus van zieke naar gezonde planten overbrengen. Bij de teeltwisseling verdient het daarom de aanbeveling om de nieuwe teelt met nieuwe kleding te beginnen.

2.2 Biologische en genetische variatie

In dit oriënterende onderzoek zijn we nagegaan of er momenteel andere isolaten/stammen van het komkommerbontvirus voorkomen in Nederland in vergelijking met isolaten uit het verleden. Dit zou een mogelijke verklaring zijn voor de toename van ernstigere besmettingen met komkommerbontvirus. We hebben vastgesteld dat:

- Er naast komkommerbontvirus ook een ander mechanische overdraagbaar virus te vinden was in één van de monsters
- Dat de recente praktijkmonsters genetisch duidelijk te onderscheiden zijn van de monsters uit de periode 1979-1999.
- Opvallend daarbij is dat de oude varianten verdwenen lijken te zijn. Hierop is één uitzondering, namelijk een isolaat dat gevormd is door recombinatie tussen beide groepen van monsters

Het komt er dus op neer dat er inderdaad genetische verschillen zijn tussen de virusvarianten in de huidige praktijkmonsters en de virusvarianten die in het verleden rondwaarden. Of deze verschillen zich ook vertalen in biologische verschillen tussen de varianten en daarmee de toename in problemen kunnen verklaren, zou nader onderzocht moeten worden.