

# Ontwikkelen van detectiemethoden voor virussen in bloembolgewassen

Khanh Pham, Miriam Lemmers, Joop van Doorn en Toon Derks

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.  
Sector bollen  
mei 2006  
PPO nr. 320677

© 2006 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



PT Projectnummer: 36117 (PPO 320677)

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.**

Sector Bloembollen

Adres : Professor van Slogterenweg 2, Lisse

: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252 - 462121

Fax : 0252 - 462100

E-mail : [infobollen.ppo@wur.nl](mailto:infobollen.ppo@wur.nl)

Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1. INLEIDING.....	7
1.1 Probleemstelling.....	7
1.2 Doelstellingen en afbakening.....	7
1.3 Plan van aanpak .....	8
2. TULPENVIRUS X (TVX).....	9
2.1 Materialen en methoden .....	9
2.1.1 Isolatie van virus .....	9
2.1.2 Bereiding van antiserum .....	10
2.2 Resultaten.....	10
2.3 Conclusies en discussie .....	10
3. DAHLIAMOZAIKVIRUS (DMV) .....	11
3.1 Materialen en methoden .....	11
3.1.1 DNA-methoden .....	11
3.2 Resultaten.....	11
3.2.1 Antisera-ontwikkeling via recombinant-DNA methoden .....	11
3.2.2 PCR voor DMV .....	12
3.3 Conclusies en discussie .....	13
4. TULPENGRIJSVIRUS (TSMV) .....	15
4.1 Materialen en methoden .....	15
4.1.1 Plantmateriaal .....	15
4.1.2 Ontwerpen van PCR .....	15
4.2 Resultaten.....	15
4.3 Conclusies en discussie .....	18
5. TABAKSNECROSEVIRUS (TNV).....	19
5.1 Materialen en methoden .....	19
5.2 Resultaten.....	19
5.3 Conclusies en discussie .....	20
6. FYTOPLASMA' S.....	21
6.1 Materialen en methoden .....	22
6.2 Resultaten.....	22
6.3 Conclusies en discussie .....	23
7. ALGEMENE DISCUSSIE .....	25
8. OPGELEVERDE PRODUCTEN.....	27
8.1 Lezingen .....	27
8.2 Persberichten.....	27
8.3 Publicaties .....	27
8.4 Rapportages .....	27
8.5 Antisera .....	28
8.6 Primersets voor PCR-detectie .....	28

9.	LITERATUUR .....	29
9.1	TVX .....	29
9.2	DMV .....	29
9.3	TSMV.....	29
9.4	TNV .....	30
9.5	FYTOPLASMA'S .....	30

# Samenvatting

Doel van dit project was, om detectiemethoden te ontwikkelen om virussen (en fytoplasma's) in bloembolgewassen specifiek, snel en gevoelig aan te tonen. De resultaten van dit project zorgden voor betere toetsingsmogelijkheden.

Keuringsactiviteiten van de Bloembollenkeuringsdienst (BKD) worden ondersteund met laboratoriumtoetsen op grotere of kleinere schaal. De toetsingen op grotere schaal vinden plaats met ELISA, waarvoor antisera nodig zijn. Voor de virussen die specifiek in bloembolgewassen voorkomen, zijn deze antisera bij het voormalige LBO, nu PPO-bloembollen, gemaakt. Voor toetsingen op kleinere schaal worden PCR toetsen steeds meer ingezet, bijvoorbeeld omdat (nog) geen geschikte antisera beschikbaar zijn.

Voor tulpenvirus X (TVX) is een specifiek antiserum gemaakt en getest; zuivering van antigenen en antiserumbereiding voor TVX zijn uitgevoerd. Een kwalitatief goed serum (zowel specifiek als een hoge gevoeligheid) is opgeleverd en beschikbaar voor het bloembollenvak. Dit maakt dat de afhankelijkheid voor externe leverantie van dit serum tot het verleden behoort. Dit antiserum is uitgeleverd aan de BKD.

Voor dahliamozaiekvirus (DMV) zijn voor PCR-detectie specifieke primers gemaakt en getest. Deze primers zijn uitgeleverd aan de BKD. Er bleken in de praktijk meerdere typen (zg. grote en kleine)

Dahliamozaiekvirus (DMV)-isolaten aanwezig. De poging om via een bacterieel expressiesysteem viruseiwitten in overmaat te maken als voorbereiding op aanmaak van antiserum tegen DMV is niet gelukt.

In gladiool en hyacint zijn fytoplasma's (vergelingsheksenbezemziekte) nu goed aantoonbaar met behulp van een PCR toets. Deze toets gaat veel sneller en is gevoeliger dan de voormalige microscopische toets, gebaseerd op fluorescentie.

Verder is gewerkt aan het opzetten van een goede detectie voor Augustaziek (Tabaksnecrosevirus: TNV).

Groepsspecifieke primers om TNV aan te tonen zijn ontworpen en beschikbaar gesteld aan de BKD.

Voor Tulpengrijsvirus (TSMV) zijn, ten behoeve van een goede en betrouwbare toets zg. specifieke primers ontworpen, die geen kruisreactie vertoonden met andere Closterovirussen.

Als eindresultaat van dit project kan vastgesteld worden, dat nieuwe toetsingen op belangrijke bloembolvirussen en fytoplasma's zijn opgeleverd. Dit is van belang voor het bloembollenvak om de kwaliteit van het plantmateriaal te bewaken, daar vooral PCR toetsen ook symptoomloze aantastingen kunnen detecteren.



# 1. INLEIDING

## 1.1 Probleemstelling

Virussen vormen een van de belangrijkste bedreigingen voor de bloembollenteelt; de kwaliteit van de bloembollen staat en valt met een kwaliteitsborging op dit gebied. Hiervoor zijn betrouwbare, specifieke en gevoelige toetsen onontbeerlijk. Het doel van dit project was daarom om, in samenspraak met de BKD, toetsen te ontwikkelen om virussen aan te tonen in allerlei bolgewassen.

PPO heeft jarenlange ervaring met het ontwikkelen van diagnostische toetsen op virusziekten in bolgewassen. Dit betrof vroeger vooral elektronenmicroscopische toetsingen (ook middels “decoratie” van virusdeeltjes met antiserum) en ELISA. De eerste methode is, door de grote mate van arbeidsintensiviteit en niet-praktische toepasbaarheid, verlaten. De laatste jaren is het accent wat betreft type toetsen verschoven naar PCR. Deze methode vereist geen zuiveringen van virus, en heeft doorgaans een (veel) hogere gevoeligheid.

Keuringsactiviteiten van de Bloembollenkeuringsdienst (BKD) worden ondersteund met laboratoriumtoetsen op grotere of kleinere schaal. De toetsingen op grotere schaal vinden plaats met ELISA, waarvoor antisera nodig zijn. Voor de virussen die specifiek in bloembolgewassen voorkomen, zijn deze antisera gemaakt bij het voormalige LBO, nu PPO-bloembollen. Veel van de sera worden niet door derden ontwikkeld.

Om welke antisera gaat het nu? Het betreft o.a. antisera tegen tulpenvirus X. Dit is nog maar beperkt leverbaar vanuit Schotland; antiserum is vooral nodig voor de Japan-keuring. Wat betreft toetsing op hyacintenmozaïekvirus wordt de kwaliteit van het potyvirus-antiserum minder en de prijs is aanzienlijk verhoogd; dit antiserum is nodig bij de kwaliteitskeuring door de BKD.

Voor toetsingen op kleinere schaal worden PCR-toetsen steeds meer ingezet, bij voorbeeld omdat (nog) geen geschikte antisera beschikbaar zijn. PPO-bloembollen en BKD hebben overlappende en aanvullende kennis om deze PCR-toetsen voor virussen specifiek in bolgewassen te ontwikkelen en te valideren. Hierbij gaat het om een PCR-toets voor dahliamozaïekvirus (toetsen van weefselkweekmateriaal van dahlia; gewenst in verband met export naar Japan), voor tulpengrijsvirus (ter vervanging van een elektronenmicroscopische toets; ondersteuning van de veldkeuring) en voor vergelingsheksenbezemziekte in gladiolen. Voor deze, door een fytoplasma veroorzaakte aantasting, is een gevoeliger en specifiekere toets dan de huidige kleurmethode gewenst. Deze ziekte neemt de laatste jaren toe.

## 1.2 Doelstellingen en afbakening

Doelstellingen:

1. Bereiden en kwaliteitsbepaling van antisera voor gebruik in ELISA (TVX, hyacintengrijsvirus).
2. Ontwikkelen van primers voor PCR-toetsen en validering van deze toetsen (DMV, fytoplasma's, tulpengrijsvirus).

Afbakening:

De selectie van virusziek materiaal was een taak voor de BKD. Viruszuivering, bereiden en kwaliteitsbepaling van antisera werden uitgevoerd bij PPO. Uittesten van antisera voor diverse doeleinden (type materiaal, moment van toetsen, etc.) vond plaats bij de BKD. Toetsplantenonderzoek en selectie van ziek materiaal met tulpenvirus X vond grotendeels plaats in 2001 (project 320444). Viruszuivering, bereiding van TVX-antiserum en toetsing vond plaats in de eerste twee jaar van dit project. Voor de bereiding van andere antisera werd de volgorde bepaald in overleg met de BKD. Primers werden door zowel BKD als PPO ontwikkeld in overleg. Validering van PCR-toetsen door middel van toetsplanten, elektronenmicroscopie en fluorescentiemicroscopie werd uitgevoerd door PPO en serologisch door BKD. Een PCR-toets voor dahliamozaïekvirus had de eerste prioriteit.

## 1.3 Plan van aanpak

1. In de eerste 2 jaren staan zuivering en antiserumbereiding voor TVX op het programma.
2. Sequentiebepalingen en ontwerpen van primers voor dahliamozaïekvirus worden uitgevoerd in het eerste jaar en validatie van PCR-toets in het tweede jaar.
3. In de eerste twee jaar wordt ook gestart met het opzetten van een detectiesysteem voor tulpengrijsvirus en het fytoplasma vergelingsheksenbezemziekte.
4. Voor de twee jaar moet de volgorde van onderwerpen worden bepaald in overleg met BKD. Voor hyacintenmozaïekvirus (HyaMV) is de BKD zelf gestart met de zuivering van virus en de voorbereiding tot antiserumproductie.



## 2. TULPENVIRUS X (TVX)

TVX (Tulip Potexvirus X) is voornamelijk bekend in tulp, hoewel recent het ook in citroenmelisse (Amerika) is gevonden. De symptomen, grijsbruine (necrotische) strepen op het blad zijn vaak goed zichtbaar. Op de bloem laten de symptomen zich zien als fellere pigmentstrepen of ook necrotische strepen (Fig.1). De bol vertoont geen symptomen. De overdracht van TVX kan in de bewaring via tulpengalmijt plaatsvinden. Bestrijding vindt plaats door ziekzoeken op symptomen, en bestrijding van de tulpengalmijt. Het toetsen van partijen (middels ELISA) is van belang ondermeer om te kunnen vaststellen of de bestrijding van TVX effectief is.

Het probleem was, dat antisera tegen tulpenvirus X nog maar beperkt leverbaar is vanuit Schotland; antiserum is vooral nodig voor Japan-keuring. Toetsplantenonderzoek en selectie van ziek materiaal met tulpenvirus X heeft grotendeels plaats gevonden in 2001 (project 320444).

Binnen dit project is een polyclonaal antiserum gemaakt, gericht tegen TVX, om ervoor te zorgen dat er geen te kort zal ontstaan aan betrouwbaar, goedwerkend antiserum voor toetsing op TVX door de BKD.



Fig.1. TVX in tulp: blad- en bloemsymptomen

### 2.1 Materialen en methoden

De opzet was, om uit goed gezuiverd TVX-virusmateriaal (eiwit), konijnen van een bekend ras te immuniseren en, na toetsing van serum na de laatste immunisatie, er conjugaat (met een enzym gelabeld antiserum, direct te gebruiken voor toetsing in ELISA welke een kleurreactie kan geven) en gamma-globulinen voor gebruik in ELISA van te maken.

#### 2.1.1 Isolatie van virus

Zuivering van TVX is bekend uit Schotland. Uit het door de BKD geselecteerde tulpenbladmateriaal is TVX gezuiverd volgens de methode ontwikkeld voor symptoomloos lelievirus. Na een tweede controle van dit materiaal op afwezigheid van andere virussen dan TVX door de BKD, is gestart met de bereiding van een antiserum.

### 2.1.2 Bereiding van antiserum

Bereiden van antiserum vond plaats in konijnen volgens het standaardprotocol (PRI, Prime Diagnostics, Wageningen). De isolatie van  $\gamma$ -globulinen, bereiden van conjugaten en testen op bruikbaarheid in ELISA is uitgevoerd zoals eerder beschreven voor SLV en TBV (Derks, 1982).

## 2.2 Resultaten

Immunisatie van konijnen vond plaats met goed gezuiverde virussuspensies (TVX) met hoge virusopbrengst. Door de BKD werd een kruisreactie geconstateerd tegen komkommermozaïekvirus (CMV) in het uitgangsmateriaal, waaruit het virus geïsoleerd werd (tulp, cv Lustige Witwe). Dit werd later niet bevestigd met ELISA en inoculatie van toetsplanten door PPO.

De opbrengst aan antilichamen bleek erg hoog: 11.5 mg eiwit/ml in plaats van normaal 7 mg eiwit per ml. De  $\gamma$ -globulinen en conjugaten werden gemaakt van de bloedafnamen na een boosterinjectie; deze bleken goed te reageren in de ELISA-test. Om de kwaliteit te bepalen zijn diverse ELISA's opgezet. Na optimalisatie bleek het conjugaat te verdunnen naar 1: 20 als stockvoorraad, en werd opgeslagen bij  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  voor verder gebruik. Vanuit de stockoplossing is een optimumreactie in ELISA met te testen bladsap van 1: 500 mogelijk.

## 2.3 Conclusies en discussie

De productie van betrouwbare antisera met een hoge titer tegen virussen is afhankelijk van enerzijds ziek plantenmateriaal met slechts één virus, en dan wel met voldoende virusdeeltjes. Vervolgens is een goede zuiveringstechniek erg belangrijk, waarbij zo min mogelijk bladmateriaal meegezuiverd wordt (lage gezondwaarden!). Tot slot hangt de titer (hoeveelheid antistoffen/ml) af van het soort konijn.

Met TVX is dit goed gelukt; dit antiserum bleek in de praktijk goede diagnostiek van dit virus mogelijk te maken. Het TVX-antiserum is een specifiek antiserum: er bleek geen kruisreactie te zijn met komkommermozaïekvirus. Het antiserum is uitgeleverd aan de Bloembollenkeuringsdienst.

Tegenwoordig is het ook mogelijk via een bacteriesysteem antistoffen te maken; dit is uitgevoerd binnen een ander project, in samenwerking met PRI. Mogelijk biedt dit in de toekomst alternatieven voor het gebruik van proefdieren om antistoffen te maken.

Eventueel is het mogelijk om een PCR-toets op te zetten als validatie van ELISA's en voor grotere gevoeligheid (Yamaji, 2001). Dit kan ook van belang zijn om middels PCR de gevoeligheid van toetsing op TVX, indien noodzakelijk, te kunnen verhogen.

## 3. DAHLIAMOZAIKVIRUS (DMV)

Dahlia is een belangrijk gewas, o.a. in de USA. Vaak wordt de economische waarde aangetast door virusinfecties, waarvan DMV de belangrijkste is. DMV behoort tot de Caulimovirussen. Het bijzondere aan DMV is, dat dit een zg. DNA-virus is. De meeste plantenvirussen zijn RNA-virussen. Bladluizen verspreiden dit virus semi-persistent te velde. Goede toetsing op DMV is belangrijk, zeker om dahlia virusvrij te maken. Veel onderzoek is gedaan in Frankrijk aan dahliamozaïekvirus, maar de DNA-sequentieanalyses en gebruikte probes voor detectie zijn niet gepubliceerd en voorsnog niet te verkrijgen. Hierbij gaat het om een PCR-toets voor dahliamozaïekvirus voor het toetsen van weefselkweekmateriaal van dahlia. Dit is belangrijk in verband met export van dahlia naar Japan.

Doel van dit onderzoeksdeel was het opzetten van een betere toetsingsmethode. Omdat antisera, gericht tegen DMV niet goed werken, en vaak veel valspositieve uitslagen geven, werd gezocht naar enerzijds het maken van een beter antiserum en anderzijds naar het opzetten van een PCR-toets. Voor het maken van antisera werd gekozen voor het produceren van een manteleiwit van DMV via recombinant-DNA technieken. Voor het opzetten van een PCR werd gewerkt met DNA-gegevens, afkomstig van de verwante caulimovirussen (de Kocho, 1998; Nicolaisen, 2003; Petrizik, 1998).

### 3.1 Materialen en methoden

#### 3.1.1 DNA-methoden

Met algemene caulimovirusprimers zijn basensequenties bepaald van DMV. DMV werd geïsoleerd uit dahliabladeren. Op basis hiervan zijn specifieke primers ontwikkeld voor DMV.

Diverse virusspecifieke primers zijn in PCR-toetsen getest. De primers zijn ook geleverd aan de BKD om een breder sortiment van dahlia's te toetsen.

Basenbepaling van het manteleiwitgen van gezuiverde DMV-isolaten om manteleiwit aan te maken via bacterieel expressiesysteem (als voorbereiding op aanmaak van antiserum) is uitgevoerd zoals in de literatuur en in een DNA-kit beschreven. Twee PCR-fragmenten (een met complete Cp van het "grote type DMV-manteleiwit en een met incomplete Cp van het kleine manteleiwittype) zijn in een zg. expressievector gezet (afkomstig van pCR T7TOPO TA Expression Kits van Invitrogen) en gecontroleerd op oriëntatie. Deze vectoren zijn getransformeerd naar een expressiebacteriestam *E. coli* (BL21(DE3)pLysS). De bedoeling was, dat de manteleiwitten tot overexpressie gebracht zouden worden en, na zuivering, voor immunisatie van konijnen gebruikt zouden worden. Hier zijn in het verleden goede resultaten mee behaald voor productie van antisera tegen TSV.

### 3.2 Resultaten

#### 3.2.1 Antisera-ontwikkeling via recombinant-DNA methoden

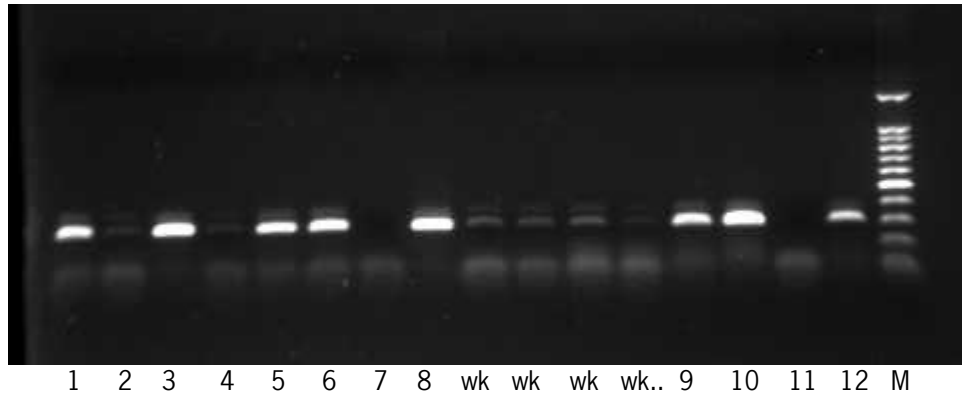
Enkele eiwitgels zijn uitgevoerd, maar de gewenste eiwitbandjes van de manteleiwitten werden niet of nauwelijks geproduceerd door de gebruikte recombinant- *E. coli*. Deze BL21(DE3)pLys cellen zijn via miniprep geanalyseerd; zij bevatten wel de gewenste plasmiden.

Expressie voor dahliamozaïekvirus (DMV) werd uitgevoerd door firma NTC (Nature Technology Corporation) met RapidPRO system, terwijl bij Tabaksstrepovirus (TSV) er gebruik werd gemaakt van een expressiesysteem van de firma Stratagene (Affinity Protein Expression and Purification System) voor het maken van recombinanteiwit. De poging om een PCR fragment van het complete manteleiwit-gen van het grote type te kloneren is mislukt, de oorzaak ligt waarschijnlijk aan de toxiciteit van het eiwit. Het meest waarschijnlijk is dat de productie van manteleiwitten voor de bacteriën dodelijk was en er daarom geen eiwitproductie mogelijk was. Deze benadering

is gestopt.

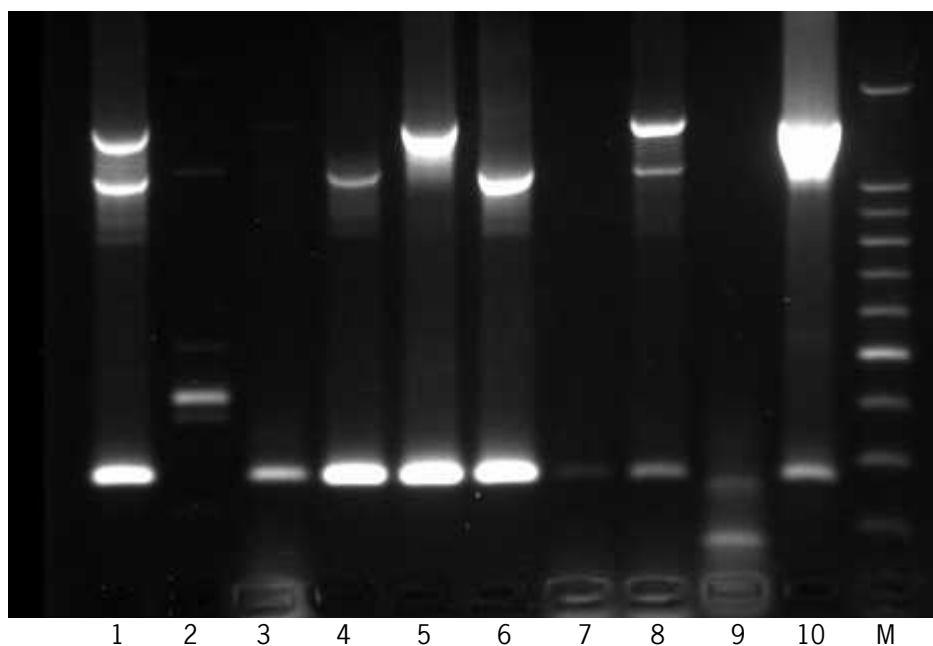
### 3.2.2 PCR voor DMV

Er zijn meerdere virusspecifieke primersets ontwikkeld voor gebruik in een PCR-toets (fig. 2 en fig. 3). Met de eerst ontwikkelde, gedegenererde primerset (gebaseerd op gen 5 van DMV) werden twee typen DMV aangetoond. Deze PCR-toets toonde ook DMV aan in weefselweekmateriaal dat tot nu toe in alle ELISA-toetsen negatief reageerde.



Figuur 2. PCR met detectieprimers (amplicon 310bp) voor dahliamozaiekvirus (DMV) op verschillende monsters (1-12). Nr.7 en 11 zijn negatieve controles; zwakke signalen (vage bandjes) zijn te zien bij weefselweekplantjes (wk); M: 100bp referentieladder om de DNA-fragmentgroottes te bepalen (Promega).

Op grond hiervan en andere gegevens is geconcludeerd, dat er verschillende typen DMV kunnen voorkomen. Om die reden zijn twee nieuwe primersets (gebaseerd op het manteleiwitgen van DMV) gemaakt die de twee DMV-typen kunnen onderscheiden. Bijna de volledige basenvolgorde van het DMV-manteleiwitgen is nu bekend en geïsoleerd voor gebruik in een bacterieel expressiesysteem (de eerste stap voor antiserumbereiding). Diverse dahliamonsters zijn getest met de specifieke primers: het kleine type komt het meest voor. De twee typen worden ook samen in een plant aangetroffen. Deze toetsuitslagen zijn niet vergeleken met testen via ELISA.



Figuur 3. Reamplificatie van DMV met primers, gebaseerd op manteleiwitgen (Cp). Het aantonen van twee typen (Klein en Groot) in eenzelfde monster is mogelijk (amplicons 1100 en 1300bp) bij monster 1 en 8. Het monster 2 is virusvrij.

### 3.3 Conclusies en discussie

Dahliamozaïekvirus (DMV) komt in dahlia algemeen voor: in de meeste cultivars in hoge percentages. De symptomen variëren van bleekgroene banden langs de bladnerven, een eikenbladpatroon en vlekkerigheid tot een donkergroen mozaïek. Bij ernstige aantasting ontstaan bladmisvormingen en dwerggroei.

Symptomen kunnen tijdelijk of geheel afwezig zijn. In de normale teelt wordt alleen een (visuele) veldkeuring uitgevoerd. Voor export naar Japan geldt naast een nultolerantie voor tabaksstrepenvirus, een visueel gezond gewas. Om die reden wordt virusvrij gemaakt weefselkweekmateriaal en de nateelt daarvan in Nederland ook op dahliamozaïekvirus getoetst vóór export naar Japan.

Er zijn diverse antisera tegen dahliamozaïekvirus gemaakt, maar alleen die van Agdia Inc. (U.S.A.) was praktisch bruikbaar. Omdat deze test op DMV er een is met haken en ogen (relatief hoge achtergrond, gevoelig voor storingen vooral bij bepaalde cultivars) is voor weefselkweekmateriaal gezocht naar een geschikte PCR-methode, temeer omdat het produceren van veel manteleiwit via recombinant DNA-technieken ( Helias, 2003; Li, 1998) niet is gelukt. Misschien was de expressie van het mantelwitstuk zo laag dat deze alleen aan te tonen is d.m.v een blotting, of is het induceren van de bacterie om meer eiwit aan te maken niet goed gegaan. Van het grote type DMV is de volledige basenvolgorde van het manteleiwitgen bepaald; van het kleine type (waarbij een stuk van het manteleiwit-gen afwezig is) grotendeels. De eerste poging om met deze basenvolgorde eiwitten te maken in een bacterie zijn dus mislukt.

Homologiepercentages voor caulimovirussen, waartoe DMV behoort, zijn het hoogst binnen gen 5. Op grond daarvan is een set gedegenereerde primers gemaakt. Hiermee zijn via RT-PCR twee amplicons verkregen, namelijk van 900 en 1000 bp. Voor een zo breed mogelijke detectie van DMV is een set primers ontwikkeld op grond van de sequentie van 900 bp. Deze primers set geeft bij de meeste dahliaplanten een positieve reactie, waaronder ook weefselkweekmateriaal dat meermalen negatief uit de serologische test kwam en geen symptomen laat zien. Door de BKD is gecontroleerd dat het amplicon van 310 bp een (deel van de) virussequentie is. De primers set, ontwikkeld door de BKD op basis van de Deense sequentie van DMV geeft minder vaak positieve reacties. Toont nu de bij PPO ontwikkelde PCR-toets meerdere DMV-isolaten aan (waaronder een symptoomloos type) of is er sprake van een ingebouwde sequentie van DMV? In vervolg hierop is bij PPO ook de sequentie bepaald van het manteleiwit-gen (gen 4) van diverse DMV-isolaten. Eén daarvan (voorlopig grote type genoemd) lijkt op die van AY291588 in USA (> 95%) en niet veel

op die van AJ515906 (Deense isolaat). Een ander DMV-isolaat laat een deletie en mutaties zien in de sequentie (kleine type). Dit wijst in de richting van meerdere DMV-isolaten (bevestigd door een onderzoekgroep van Washington State University; Pappu, 2005). Dit kan ook verklaren waarom in de ELISA-toets niet alle DMV-isolaten positief reageren. Voor zowel het grote als het kleine type is bij PPO een specifieke primersset ontwikkeld. Tot nu toe wordt het kleine type vaker aangetoond in de testen dan het grote. De twee typen kunnen ook samen in één plant voorkomen. Om het mogelijke probleem van inbouw van virussequenties in planten-DNA te onderzoeken (Harper, 2002) is fundamenteel onderzoek nodig. Hier heeft overleg over plaatsgevonden met de BKD en Virologie van Wageningen Universiteit.

## 4. TULPENGRIJSVIRUS (TSMV)

Over tulpengrijsvirus (behoort tot de Closterovirussen) is nog weinig bekend (Asjes, 1994). Het virus werd voor het eerst gevonden in 1974. Typische symptomen zijn mozaïekachtige patronen; planten kunnen dwergvorm vertonen en vroegtijdig afsterven. Vanwege zijn onbekendheid is het wenselijk voor de praktijk een betrouwbare toetsingsmethode beschikbaar te maken om toename van dit virus te kunnen waarnemen en maatregelen te kunnen nemen.

Hierbij gaat het om een PCR-toets voor tulpengrijsvirus ter vervanging van de elektronenmicroscopische toets en ondersteuning van de veldkeuring. Diagnoses met behulp van een elektronenmicroscopie zijn langdurig en daardoor te duur. Een uitgebreide voorstudie over moleculaire gegevens en toetsmogelijkheden bleek nodig. Gekeken is naar eigenschappen van Closterovirussen om deze te gebruiken voor toetsontwikkeling. De aanpak was, om via algemene primers DNA-fragmenten van dit virus in handen te krijgen, en via DNA-volgordebepalingen tot specifieke primerontwerp te komen.

### 4.1 Materialen en methoden

#### 4.1.1 Plantmateriaal

Tulpenbladeren met TSMV zijn gebruikt van verschillende cultivars en volgens standaard protocol verwerkt en bewaard als ziek controlemateriaal.

#### 4.1.2 Ontwerpen van PCR

Met algemene primers voor de diverse groepen binnen de closterovirussen zijn basensequenties bepaald van tulpengrijsvirus (tulip severe mosaic virus, TSMV).

Groepsspecifieke primers zijn ontworpen die op beperkte schaal zijn getest in een PCR-toets. De resultaten zijn vergeleken met die van de elektronenmicroscopische methode.

Selectie en uittesten van virusspecifieke primers op ziek en gezond materiaal heeft plaatsgevonden, en resulteerden in primers specifiek voor tulpengrijsvirus (Fig.5).

### 4.2 Resultaten

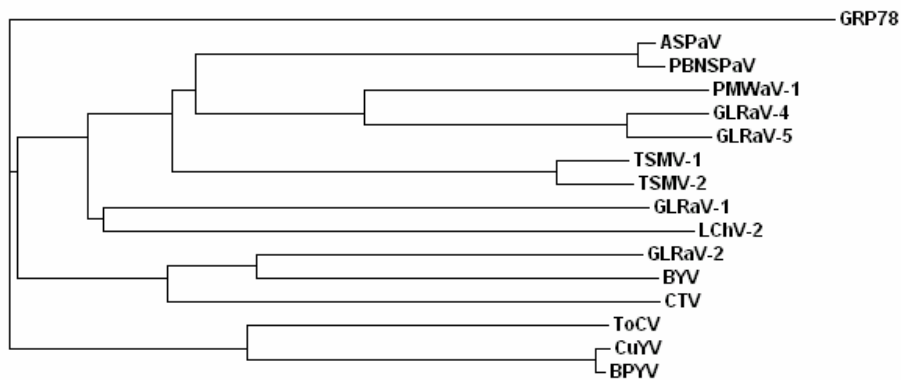
Op grond van basensequenties is vastgesteld dat TSMV de meeste verwantschap vertoonde met de vinivirusgroep binnen de familie van Closteroviridae (Fig.4). De naam van deze groep is inmiddels veranderd in ampellogroep (Saldarelli, 1998; Tian, 1996; Ghanem-Sabanadzovic, 2001).

Virusspecifieke primersets zijn op grond van DNA-sequentie gegevens ontworpen voor gebruik in een PCR-toets; bij eerste vergelijking van PCR en elektronenmicroscopie (oude, te arbeidsintensieve en te dure methode) kwamen de methoden goed met elkaar overeen.

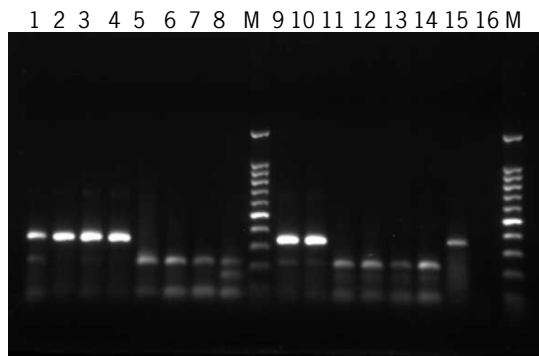
Met de groepsspecifieke primersets werden in de PCR-toets bij de BKD storende, aspecifieke bandjes waargenomen bij een deel van de getoetste tulpen. De later ontwikkelde virusspecifieke primers (die twee typen tulpengrijsvirus aantonen) gaven geen storende aspecifieke bandjes, zoals de eerder ontwikkelde groepsspecifieke primers bij het testen van tulpen (Fig.6). Er was geen kruisreacties met andere virussen, zoals TuMV, TBV, TRV en TNV.

In een aantal zieke tulpen uit de Hortus Bulborum te Limmen werd visueel de aanwezigheid van TSMV bepaald. M.b.v. PCR zou dit dan bevestigd worden. Er zijn redelijk veel tulpen in deze collectie ISMV positief met PCR (behalve nr. 2, 7, 8, en 12). Verschillen waren ook te vinden tussen visuele beoordeling en PCR. Enkele monsters bleken achteraf ook TRV-positief (ELISA-gegevens) te zijn. Alleen visueel beoordelen bleek dus minder betrouwbaar, zeker omdat de symptomen cultivarafhankelijk bleken te zijn.

## Phylogram



Figuur 4. Verwantschapsanalyse toont aan dat tulpengrijsvirus (TSMV: Tulip severe mosaic virus) in de ampellogroep zit samen met ASPaV, PBNSPaV, PMWaV-1, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-1, LChV-2.

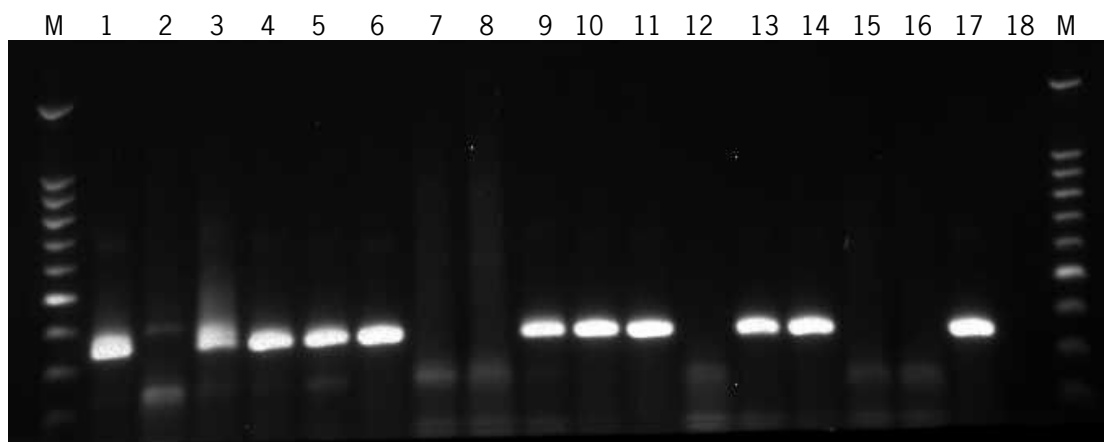


Figuur 5. RT-PCR producten (350bp) geamplificeerd met specifieke primers voor tulpengrijsvirus (TSMV). Laan 1-4 en 9, 10,15: TSMV zieke tulpen; laan 5-8: viruszieke tulpen met TuMV, TBV, TRV, TNV resp.; laan 11-14: gezonde tulpen en laan 16 water (negatieve controles); M: 100bp ladder (Promega)



**Tabel 1:** Viruszieke tulpen uit een tulpencollectie van Hortus Bulborum

Nr.	Cultivar	Visueel	PCR
		TSMV	TSMV
1	Harlequin	+	+
2	Orange Boy	+, gemengd	-
3	Scarlet Baby	+ mogelijk	+, afw.
4	Golden Sun	?	+
5	Early Dream	?	+
6	Brilliant Star	+	+
7	Dr. No	?	-
8	Dream Boat	+	-
9	Mooni Dance	Afw.bloem	+
10	Shogun	Afw.bloem	+
11	Wapen van Leiden	2+,2-	+
12	Rode Tulp (bij Red Sun)	Afw.bloem	-
13	Red Sun	Afw.bloem	+
14	Kees Nelis	Pos.contr	+
15	Show Winner 1	Neg.contr	-
16	Show Winner 2	Neg.contr	-
17	King Orange (020702)	Pos.contr	+
18	Water	Neg.contr	-



Figuur 6. RT-PCR producten (350bp) zoals geamplificeerd met specifieke primers voor tulpengrijsvirus (TSMV) uitgevoerd op verschillende zieke tulpen uit tulpencollectie van de Hortus Bulborum (Tabel 1). Laan-nummering komt overeen met de nummering uit Tabel 1.

## 4.3 Conclusies en discussie

Voor de toepassing van deze PCR-toets voor tulpengrijsvirus zijn de beoordeling op symptomen, ELISA-resultaten en PCR-gegevens vergeleken. De PCR is gevoeliger dan ELISA, en scoort positief in monsters die visueel de aandacht ontsnapten, of valspositief werden aangemerkt. Eventuele latente infecties zijn wel via PCR, maar niet visueel en niet in alle gevallen met ELISA detecteerbaar.

De nieuwe PCR-toets is vergeleken met de visuele waarnemingen en waarnemingen met de elektronenmicroscop. (Zie ook PPO-project virusbeheersing in bloembollen 320676). De aangepaste primers en het protocol zijn overgedragen aan de BKD. Levering van deze primers met testprotocol aan BKD heeft plaatsgevonden.

## 5. TABAKSNECROSEVIRUS (TNV)

Tabaksnecrosevirus behoort tot de necrovirussen (Saeki, 2001). Dit virus wordt verspreid via de schimmel *Oplidium*, en door mechanische oorzaken. TNV heeft een breed waardplantbereik; niet alleen tulp, maar ook lelie en andere bolgewassen worden aangetast. De ziekte in tulp wordt ook wel Augustaziek genoemd.

Augustaziek is een groot probleem binnen de tulpenteelt; goede detectie is noodzakelijk als onderdeel van de beheersing van deze virusziekte. Binnen het PT-project 36114 (beheersing van Augustaziek) is onderzocht of tabaksnecrosevirus uit een partij tulpen (grotendeels) verdwijnt bij teelt op ziektevrije zandgronden om daarmee een mogelijkheid te hebben om partijen op te knappen en verspreiding van Augusta naar gezonde gronden te voorkomen.

Ook de relatie tussen ziektebeelden in hyacint en lelie met tabaksnecrosevirus en/of andere necrosevirussen wordt hier onderzocht (Kanematsu, 2001). Dit kan belangrijk zijn voor vruchtwisselingsschema's.

Dit projectonderdeel hield zich bezig met het opzetten van betrouwbare detectiemethoden (PCR); tevens is bekeken of antisera nodig waren tegen tabaksnecrosevirus (bepaalde serotypes).

### 5.1 Materialen en methoden

Primers zijn ontwikkeld die specifiek serotype A of D kunnen aantonen; dit zijn de enige serotypes die voorkomen bij TNV (Zie ook project 320657). Serologische detectie leverde namelijk nogal eens problemen op. De sequenties van amplicons van Augusta-isolaten (geamplificeerd met deze primers) zijn bepaald en vergeleken met gegevens uit databanken (Cardoso, 2004; Cardoso, 2005).

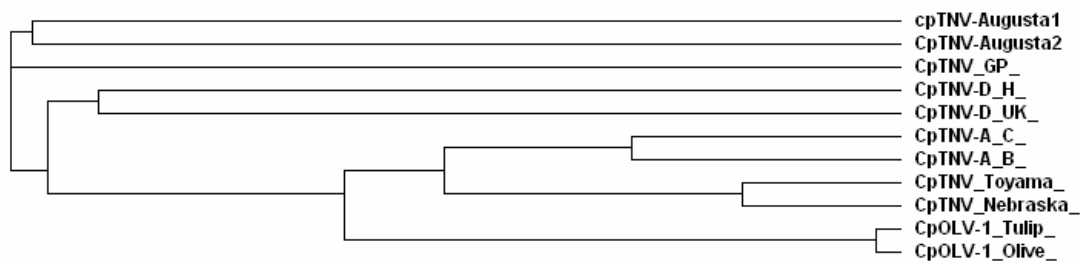
Het RNA-isolatieprotocol om TNV, een RNA-virus, goed uit het lastige hyacintenmateriaal te kunnen isoleren, is aangepast en geoptimaliseerd.

### 5.2 Resultaten

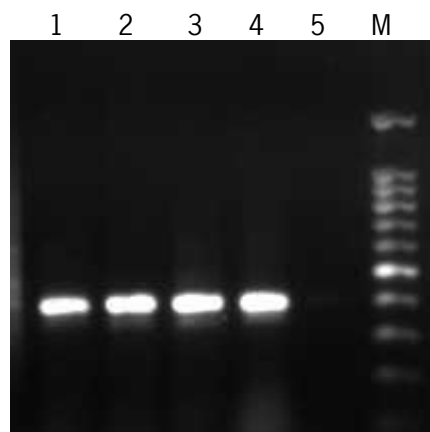
Op grond van basensequenties werd vastgesteld dat Augusta-isolaten de meeste verwantschap vertonen met TNV serotype D en TNV isolaat GP op grond van het manteleiwitgen (Fig. 7).

Primersets specifiek voor serotype A of D zijn ontworpen (Fig. 8) en ook gebruikt voor identificatie van TNV in hyacint en lelie (zie project 320657).

Het aantonen van TNV direct in hyacintenmateriaal leverde nog problemen op. Dezelfde isolaten zijn vanuit toetsplanten wel aan te tonen met PCR. Voor het aantonen van TNV met PCR direct in hyacintenmateriaal is de buffer/plantmateriaal-verhouding aangepast zonder positief resultaat. Waarschijnlijk vormt het hyacintenslijm het grootste probleem bij de isolatie.



Figuur 7. Verwantschapsanalyse van Augusta-isolaten (TNV-Augusta 1 en 2). Te zien is, dat kruisreactie door de geringe verwantschap met andere TNV-types niet waarschijnlijk is.



Figuur 8. PCR-producten (410bp) geamplificeerd met specifieke primers voor tabaksnecrosevirus (TNV). Laan 1-4: TNV monsters afkomstig van tulp, potgrond, hyacint en boon; laan 5: negatieve controle; M: 100bp ladder (Promega).

### 5.3 Conclusies en discussie

De problemen met Augusta zijn overkoepelend: niet alleen de beheersing maar ook een goede detectie is noodzakelijk. Vroegtijdig aantonen van de vector in plantenmonsters (wortels) kan erger voorkomen. Ook in hyacint is Augusta een probleem. De vector *Olpidium* is moeilijk aantoonbaar; vaak zijn de sporen van deze schimmel nauwelijks te vinden in wortels van de tulp. Door nu het virus breder te kunnen aantonen in tulp door de ontwikkelde primers, is de verspreiding beter waarneembaar, en kunnen maatregelen worden getroffen. Het probleem in hyacint moet nog in kaart gebracht worden. De groepsspecifieke primers voor TNV zijn geleverd aan de BKD.

## 6. FYTOPLASMA' S



Fig.9. Lelies met heksenbezemachtige symptomen.

Fytoplasma's zijn kleine (0.2-0.8  $\mu\text{m}$ ), 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.

In bloembolgewassen komt deze aantasting voor in hyacint ("Lissers"), lelie, en gladiool. Hoewel meestal geen groot probleem, duikt dit toch vaak weer op. Vanwege de aard van deze ziekte kan deze latent aanwezig zijn. Een goede, gevoelige detectie is noodzakelijk; met standaard technieken als ELISA is deze ziekte niet aantoonbaar.

Bestudering van fytoplasma's in het laboratorium wordt sterk bemoeilijkt doordat deze niet *in vitro* kweekbaar zijn buiten de plant.

De symptomen die fytoplasma's veroorzaken in hun waardplanten variëren van geen (vaak zijn deze micro-organismen latent aanwezig), tot groene bloemen, heksenbezemgroei (Fig. 9) (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 (Kaminska, 2003; groen, 1974). Ook menginfecties komen voor; er zijn gewassen die waardplant zijn voor meerdere soorten 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.

Momenteel berust de identificatie van fytoplasma's, welke taxonomische indeling nog gaande is, op verschillen in het 16 S rDNA. Een groep waar veel fytoplasma's toe behoren, is de Aster Yellows groep (16SI) die voornamelijk in Europa en Noord-Amerika wordt aangetroffen. 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 groepsspecifieke variabele deel van het 16 S rDNA gebied ligt (Smart, 1996) (Fig.10).

Een betrouwbare identificatie van fytoplasma's is noodzakelijk; er zijn bacteriesoorten zoals *Rhodococcus fascians* en *Pantoeae agglomerans* die fytoplasma-achtige symptomen (heksenbezemgroei) kunnen

veroorzaken (Skrzeczowsky, 2001).

Doel van dit projectonderdeel was om een betrouwbare en gevoelige detectie van fytoplasma's in bolgewassen, speciaal lelie, op te zetten middels PCR. Deze detectie moest ook latente infecties kunnen aantonen.

## 6.1 Materialen en methoden

Twee uit de literatuur bekende primersets zijn vergeleken voor de detectie van fytoplasma's in gladiolenmonsters (vergelingsheksenbezemziekte): die van Smart 1996 en van Chung 2003. De resultaten zijn vergeleken met de fluorescentiemicroscopische methode. PCR is uitgevoerd volgens deze referenties. Groepsspecifieke primers voor het aantonen van fytoplasma's in gladiool en lelie zijn vergeleken. Voor de toepassing van PCR op fytoplasma's is een aanpassing gemaakt aan de DNA-isolatiemethode uit plantmateriaal (zie resultaten).

## 6.2 Resultaten

Eén van de twee primersets voor gebruik in een PCR-toets gaf een goede overeenkomst met fluorescentiemicroscopie (oude, bewerkelijke methode).

Naast de twee eerder geselecteerde primersets zijn ook die in Korea beschreven zijn voor lelie meegenomen. Lelies met een duidelijke fasciatie gaven lichtpositieve reacties.

In lelies met een duidelijke stengelfasciatie zijn met diverse primercombinaties tot nu toe nog geen fytoplasma's aangetoond. De werking van de primersets is getest met ander fytoplasma bevattend materiaal (van gladiool en roos): fig. 10.

Het DNA-isolatieprotocol is verbeterd door overschakeling op een isolatiekit van Qiagen: ook met dit verbeterde protocol zijn er geen fytoplasma's aangetoond in lelie .

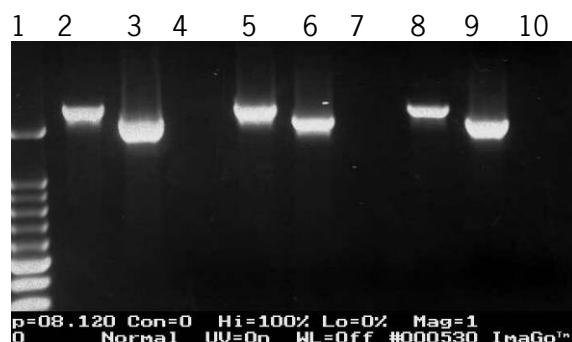


Fig. 10. Aantonen van fytoplasma's met twee verschillende primersets (Smart en Chung) in monsters van gladiool. Laan 1 = referentie DNA-ladder; 4, 7 en 10 gezonde gladiolen; 2, 5 en 8 met primers van Smart; 3, 6 en 9 met primers van Chung.

## 6.3 Conclusies en discussie

Fytoplasma's bleken met de ontwikkelde primersets goed aantoonbaar in gladiool en hyacint, en ook in roos (kroeskop). Hoewel er in lelie heksenbezemachtige symptomen zichtbaar waren, werd alleen een zeer lichte reactie waargenomen in PCR. Waarschijnlijk waren de onderzochte monsters niet ziek van fytoplasma's. De meest waarschijnlijke verklaring is dat de primersets wel goed werken, maar dat alleen in lelies met fasciatie in de bloem (gegevens uit Zuid-Korea; Bong Nam Chung, 2002) fytoplasma's aanwezig zijn en dus aantoonbaar zijn. In de toekomst kunnen monsters van lelies met dergelijke symptomen getoetst worden met de ontwikkelde primers.





## 7. ALGEMENE DISCUSSIE

Vooral binnen het toegepast moleculaire onderzoek (ontwikkelen van zg. primers voor identificatie of detectie van virussoorten of virusgroepen) liggen nog veel vragen. Juist in symptomloos materiaal kan door de (veel) hogere gevoeligheid van deze RNA-toetsen veel beter op virus gediagnosticeerd worden. Door de ontwikkeling van zg. groepsspecifieke primers kunnen in een of twee toetsen getoetst worden op grote verscheidenheid aan virussen. Met antisera is dit niet of nauwelijks mogelijk. Vooral deze groepsspecifieke primers zullen noodzakelijk zijn om het gewassortiment te bewaken t.a.v. virusincidentie. Niet alleen voor de grote gewassen tulp en lelie is dit noodzakelijk; het gewas *Zantedeschia* kent ook veel, nog niet allemaal bekende virusaantastingen die door een goede monitoring aangetoond kunnen worden. PPO zal zich hier ook de komende jaren op toelagen, in samenwerking met belanghebbende partijen en andere kennisinstellingen.



## 8. OPGELEVERDE PRODUCTEN

### 8.1 Lezingen

-T. Derks: Betrouwbaarheid van virustoetsen bij lelies. Voor keurmeesters BKD. 5, 7 en 8-2-2002, Lisse.

-A.F.L.M. Derks: Reliability of virus tests in lilies in relation to cultivation practices. Voor Nederlandse Kring voor Plantevirologie. 7-5-2002, Wageningen.

-T. Derks: Detection and control of virus diseases in flower bulb crops. Buitenlandse studenten Hogeschool Larenstein. 08-12-2003, Lisse.

-T. Derks: Richting virologisch onderzoek voor bloembollenteelt. Voor Stichting Bloembollenonderzoek. 02-11-2004, Lisse.

### 8.2 Persberichten

- Nieuwe toets op tulpengrijsvirus in Bloembollencultuur 113 (22): 5.
- Snelle detectiemethode tulpenvirus. Resource 7, maart 2003 (Magazine van Wageningen UR).
- Veelbelovende toets op tulpengrijsvirus. 2003. Gewasbescherming 34(1): 34.
- Augustaziek ook in hyacint en lelie. In: Bloembollen Visie, 6 maart 2003.

### 8.3 Publicaties

-Chen, J., Chen, J.P., Langeveld, S.A., Derks, A.F.L.M. and Adams, M.J. 2003. Molecular characterization of carla- and potyvirus from Narcissus in China. J. Phytopathology 151: 26-29.

### 8.4 Rapportages

- Rapport geleverd aan BKD met onderbouwing van certificeringssysteem in tulpen: voorkeur voor boltoets versus bladtoets op tulpenmozaïekvirus (TBV).

## 8.5 Antisera

- Antiserum tegen tulpenvirus X.

## 8.6 Primersets voor PCR-detectie

- Groepsspecifieke primers voor Caulimovirussen, gebaseerd op gen 5.
- Virusspecifieke primers voor dahliamozaiekvirus (DMV), gebaseerd op gen 5.
- Virusspecifieke primers voor dahliamozaiekvirus (DMV), gebaseerd op gen 4 (Cp gen); onderscheid maken tussen 2 typen.
- Groepsspecifieke primers voor Closterovirussen.
- Virusspecifieke primers voor tulpengrijsvirus (TSMV).
- Groepsspecifieke primers voor fytoplasma's.
- Groepsspecifieke primers voor TNV-A en TNV-D.
- Virusspecifieke primers voor TNV-A.

## 9. LITERATUUR

### 9.1 TVX

1. Yamaji Y, S Kagiwada, H Nakabayashi, M Ugaki, and S Namba. 2001. Complete nucleotide sequence of Tulip virus X (TVX-J): borderline between species and strains within the genus Potexvirus. Arch. Virol. 107: 833-837.
2. Derks AFLM, JL Vink-van Abeele, AR van Schadewijk 1982. Purification of TBV and production of antisera for use in ELISA. Netherlands J. Plant Pathol. 88: 87-98.

### 9.2 DMV

1. Petrzik K, V Benes, I Mraz, J Honetslegrova- Franova, W Ansoerge, and J Spak 1998. Strawberry vein bandingvirus- definitive member of the genus Caulimovirus. Virus Genes 16: 303-305.
2. de Kochko A, B. Verdaguer, N. Taylor, R. Carcamo, R.N. Beachy, C.Fauquet 1998. Cassava vein mosaic virus (CsVMV), type species for a new genus of plant double stranded DNA viruses? Arch Virol. 143: 945-962.
3. Nicolaisen M 2003. Partial molecular characterization of Dahlia mosaic virus and its detection by PCR. Plant disease: 945-948.
4. Pappu, HR, .D. Wyatt, and K.L.Druffel 2005. Dahlia mosaic virus: Molecular detection and distribution in dahlia in the United states. Hort Science 40: 697-699.
5. Harper G, R. Hull, B.Lockhart, N. Olszewski 2002. Viral sequences integrated into plant genomes. Ann. Res. Phytopathol 40: 119-136 (2002).
6. Helias V, E Jacquot, M Guillet, Y Le Hingrat, and D Giblot-Ducray 2003. Production of recombinant Potato mop-top virus coat protein in *Escherichia coli* and generation of antisera recognising native virus protein. Journal of Virological Methods 110: 91-97
7. Li RH, FW Zettler, DE Purcifull, and E Hiebert 1998. The nucleotide sequence of the 3'-terminal region of dasheen mosaic virus (Caladium isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. Arch Virol 143: 2461-2469

### 9.3 TSMV

1. Asjes C.J. 1994. Virus in tulips in the Netherlands. Acta Hort. (ISHS) 377: 289-300.
2. Vaira, A.M., Accotto, G.P., Costantini, A. and Milne, R.G. 2003. The partial sequence of RNA 1 of the ophiovirus Ranunculus white mottle virus indicates its relationship to rhabdoviruses and provides candidate primers for an ophiovirus-specific RT-PCR test. Arch. Virol. 148: 1037-1050.
3. Saldarelli, P, Rowhani, A., Routh, G., Minafra, A., Digiario, M. 1998. Use of degenerate primers in a RT-PCR assay for the identification and analysis of som filamentous viruses, with special reference to clostero- and vitiviruses of the grapevine. European Journal of plant pathology 104: 945-950.
4. Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M-J, Marais, A., Candresse, T. 2005. Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription-polymerase chain reaction: a polyvalent detection and characterization tool for trichoviruses, capilloviruses, and foveaviruses. Phytopathology 95: 617-625.
5. Tian, T., Klaassen, V. A., Soong, J., Wisler, G., Duffus, J. E. , Falk, B. W. 1996. Generation of cDNAs specific to lettuce infectious yellows closterovirus and other whitefly-transmitted viruses by RT-PCR and

degenerate oligonucleotide primers corresponding to the closterovirus gene encoding the heat shock protein 70 homolog. *Phytopathology* 86: 1167-1173.

6. Dovas, C. I., Katis, N. I. 2003. A spot multiplex nested RT-PCR for the simultaneous and generic detection of viruses involved in the aetiology of grapevine leafroll and rugose wood of grapevine. *Journal of Virological methodes* 109: 217-226.

7. Marini, D. B., Zhang, Y. -P., Rowhani, A., Uyemoto, J. K. 2002. Etiology and host range of a closterovirus associated with Plum bark necrosis stem pitting disease. *Plant disease* 86: 415-417.

8. Ghanem-Sabanadzovic, N. A., Mahboubi, M., Terlizzi, B. D., Sabanadzovic, S., Savino, V., Uyemoto, J. K., Martelli, G. P. 2001. Molecular detection of a closterovirus associated with Apricot stem pitting in southern Italy. *Journal of plant pathology* 83: 125-132.

## 9.4 TNV

1. Cardoso, J.M.S., Félix, M. R., Oliveira, S., Clara, M.I.E., 2004. A *Tobacco necrosis virus* D isolate from *Olea europaea* L.: viral characterization and coat protein sequence analysis. *Arch. Virol.* 149: 1129-1138.

2. Cardoso, J.M.S., Félix, M. R., Oliveira, S., Clara, M.I.E., 2005. The complete genome of a new necrovirus isolated from *Olea europaea* L. *Arch. Virol.* 150: 815-823.

3. Saeki, K., Takahashi, Y., Oh-oka, H., Umeoka, T., Oda, Y. and Kukuyama, K., 2001. Primary structure and phylogenetic analysis of the coat protein of Toyama isolate of *Tobacco necrosis virus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 719-724.

4. Kanematsu, S., Taga, Y., Morikawa, T., 2001. Isolation of *Olive latent virus 1* from Tulip in Toyama prefecture. *J. Gen. Plant Pathol.* 67: 333-334.

## 9.5 FYTOPLASMA'S

1. Smart CD, B Schneider, C L Blomquist, L J Guerra, N A Harrison, U Ahrens, K H Lorenz, E Seemüller, and B C Kirkpatrick. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol.* 62: 2988-2993.

2. L.J. Skrzeczkowsky, W. E. Howell, K.C. Eastwell, T.D. Cavileer. 2001. Bacterial sequences interfering in detection of phytoplasma by PCR using primers derived from the ribosomal RNA operon. *Acta Hort.* 550, ISHS.

3. Bong Nam Chung and Myeong Il Jeong 2002. Detection and molecular characterization of a stolbur phytoplasma in *Lilium* Oriental hybrids. *Plant Pathol J.* 19: 106-110.

4. M.E. Lee, C.R. Grau, L.A. Lukaesko, 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.

5. M. Kaminska, H. Sliwa, T. Malinowski, Cz. Skrzypczak, The association of aster yellows phytoplasma with rose dieback disease in Poland. *J. Phytopathology* 151: 469-476 (2003).

6. A. Bertaccini, J. Franova, S. Botti, D. Tabanelli, Molecular characterization of phytoplasmas in lilies with fasciation in the Czech republic. *FEMS Microbiology letters* 249: 79-85 (2005).

7. Groen NPA, en DHM van Slogteren. 1974. Symptomen en bestrijding van vergelingsheksenbezemziekte bij gladiolen. *Praktijkmededeling* 41: 1-17.