

Consultancy verslag Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV).

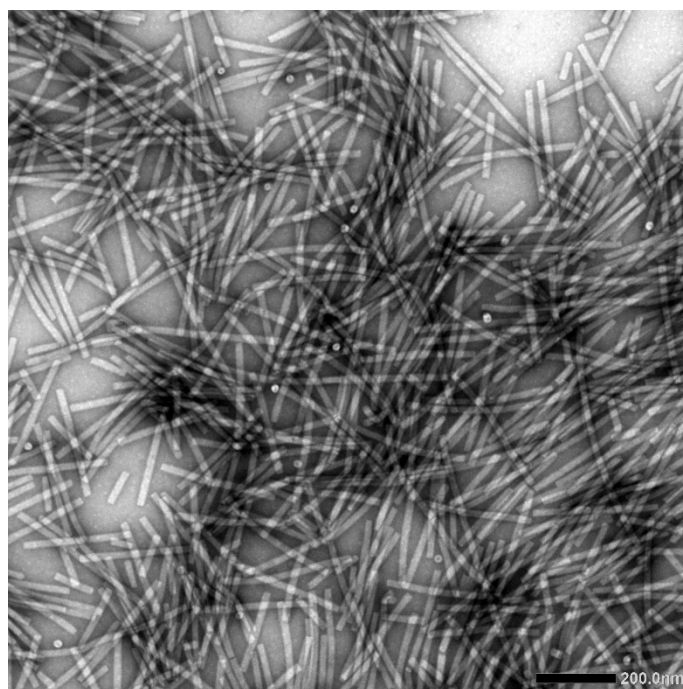
René A.A. van der Vlugt¹, Martin Verbeek¹ en Ineke Stijger²

¹ Wageningen University & Research, Biointeracties en plantgezondheid

² Wageningen University & Research, Glastuinbouw en Bloembollen

maart 2019

Deze studie werd uitgevoerd in opdracht van Glastuinbouw Nederland



Consultancy verslag Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)

René A.A. van der Vlugt¹, Martin Verbeek¹ & Ineke Stijger²

1 Wageningen University & Research, Wageningen Plant Research, Biointeracties en Plantgezondheid

2 Wageningen University & Research, Wageningen Plant Research, Glastuinbouw en Bloembollen

Dit onderzoek is in opdracht van Glastuinbouw Nederland uitgevoerd door de Stichting Wageningen Research (WR), business units Biointeracties en Plantgezondheid & Glastuinbouw en Bloembollen, onder PT Projectnummer PT 15138.32.

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

Wageningen, maart 2019

Rapport WPR-3740053500-ToBRFV

Samenvatting

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) is een relatief nieuw virus in de tomatenteelt. Het werd voor het eerst gesignaleerd in 2104 in Israël en kort daarna in 2016 in Jordanië. Eind 2018 werd het virus ook in Straelen (Duitsland) in enkel tomatenkassen aangetroffen. Inmiddels zijn er ook meldingen uit Italië en Mexico en de USA bekend.

Het virus veroorzaakt naast bladsymptomen ook relatief sterke vruchtsymptomen en vormt een groot gevaar voor de tomatenteelt wereldwijd omdat het de bestaande Tm2² resistentie tegen tomatenmozaïekvirus (ToMV) en tabaksmozaïekvirus (TMV) doorbreekt. ToBRFV behoort tot de groep van de tobamovirussen. Deze groep wordt gekenmerkt door een zeer hoge persistentie en infectiositeit. Omdat de belangrijkste vorm van verspreiding via contact is en het zeer lang infectieus blijft op oppervlaktes, is er een zeer groot risico op ongemerkte verspreiding.

Dit verslag geeft achtergrondinformatie over het virus en beschrijft de huidige kennis met betrekking tot voorkomen, mogelijke waardplanten, wijze van verspreiding, methoden voor virusdetectie en mogelijkheden tot beheersing van het virus.

Trefwoorden: tomaat, tomatenvirus, tobamovirus, virusdetectie, verspreiding, beheersing

© 2019 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Biointeracties en Plantgezondheid, Postbus 16, 6700 AA Wageningen; T 0317 48 07 00; www.wur.nl/plant-research

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

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

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

Rapport WPR-3740053500-ToBRFV

Foto omslag: Elektronenmicroscopische opname van tobamovirusdeeltjes (Foto M. Verbeek)

Inhoud

1	Eerste vondsten van Tomato brown rugose fruit virus	4
2	Verdere meldingen van ToBRFV	6
	2.1 Amerika	7
	2.2 Europa	7
3	Potentiële waardplanten van ToBRFV	9
4	Detectie van ToBRFV	11
5	Verspreiding van ToBRFV	12
	5.1 Mechanische verspreiding	12
	5.2 Verspreiding via zaad	12
	5.3 Verspreiding via insecten	12
	5.3.1 Hommels	12
	5.3.2 Andere insecten	13
6	Beheersing van ToBRFV	14
7	Potentieel gevaar van ToBRFV	15
8	Literatuur	16

1 Eerste vondsten van Tomato brown rugose fruit virus

Tomato brown rugose fruit virus, afgekort ToBRFV, is een virus dat pas sinds enkele jaren bekend is. Het werd voor het eerst beschreven in een wetenschappelijk artikel uit 2016 (Salem *et al.*, 2016) naar aanleiding van een vondst in 2016 van planten met verdachte (virus)symptomen in een bedekte tomatenteelt in Jordanië. Deze planten vertoonden milde bladsymptomen aan het eind van het teeltseizoen, maar de vruchten vertoonden sterke bruine 'rugose' symptomen die hun marktwaarde sterk verlaagden. 'Rugose' betekent zoveel als gerimpeld. Testen op de aangetaste planten voor pepinomozaïek virus (PepMV), tomatentorradovirus (ToTV), aardappelvirus Y (PVY), alfalfamozaïekvirus (AMV) en tomatenbronsvlekkenvirus (TSWV) waren allemaal negatief. Een moleculaire toets op tobamovirussen bleek positief. Een verdere analyse van het genetische materiaal van het virus bevestigde de aanwezigheid van een tot dusver onbekend tobamovirus. Dit virus bleek het meest verwant met tabaksmozaïekvirus (TMV) en *Rehmannia* mosaic virus (RehMV). Op basis van de virussymptomen op de vruchten stelden de auteurs de naam 'tomato brown rugose fruit virus' (ToBRFV) voor.

In 2017 verscheen er een wetenschappelijk artikel dat de vondst van ToBRFV in oktober van 2014 in de bedekte tomatenteelt in Ohad in het zuidwesten van Israël beschreef (Luria *et al.*, 2017). De symptomen werden beschreven als milde tot ernstige mozaïek op bladeren met soms wat bladversmalling. Per plant vertoonden 10-15% van de vruchten gele vlekken ('yellow spots'). Voor foto's van de symptomen zie figuur 1 (Luria *et al.*, 2017).

Na viruszuivering konden m.b.v. de elektronenmicroscopie duidelijke staafvormige deeltjes van ong. 300 nanometer (nm) worden waargenomen. Deze deeltjes zijn typisch voor tobamovirussen.

Uit het onderzoek uit Israël bleek dat ToBRFV zich na de eerste vondst in 2014 zeer snel verspreidde. In februari 2015 had het virus zich al over een beduidend groter gebied in het zuidwesten van Israël verspreid. In November 2016 werd het virus al verspreid over het hele land aangetroffen. Deze verspreiding maakt het ook aannemelijk dat het ToBRFV dat in 2016 in Jordanië werd aangetroffen afkomstig was uit Israël.

Twee planten met typische symptomen, verzameld in oktober 2014 en mei 2016 van twee verschillende locaties in het zuiden van Israël, werden gebruikt voor een genetische analyse. Deze analyse van het virus RNA werd middels High Throughput Sequencing (HTS) van de zgn. small-interfering-RNA fractie (siRNA) uitgevoerd m.b.v. het Illumina MiSeq platform. Analyse van deze sequentiedata bevestigde de identiteit van het virus als ToBRFV.

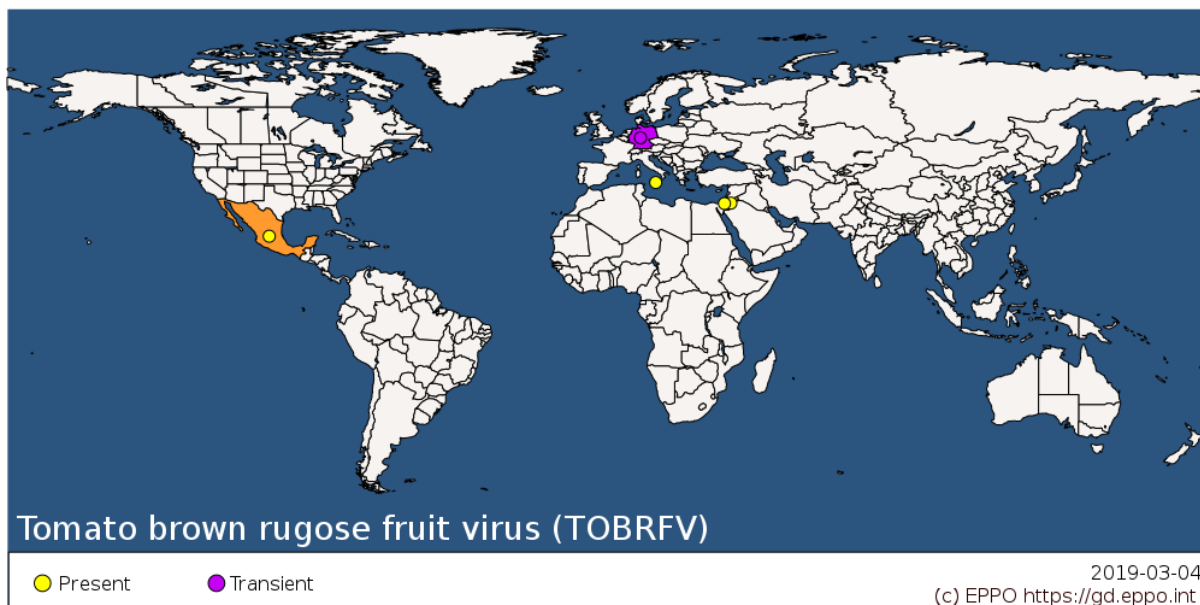


Figuur 1. Symptomen van Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) op tomatenplanten en -vruchten. Figuur overgenomen uit Luria et al (2017) A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. PLOS ONE, January 20, 2017, 19S. DOI:10.1371/journal.pone.0170429.

De RNA-sequenties van beide virusisolaten uit Israël kwamen 100% overeen en hadden 99% overeenkomst met het ToBRFV isolaat uit Jordanië (ToBRFV-Tom1-Jo; NC_048478). De auteurs beschrijven ook dat in de HTS-data geen aanwijzingen voor andere potentiële virussen konden worden gevonden.

2 Verdere meldingen van ToBRFV

In de Global database van de European Plant Protection Organisation (EPPO) is een overzicht te vinden van de meldingen van verspreiding van ToBRFV (d.d. 04-03-2019); (<https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/distribution>).



Figuur 1: EPPO verspreidingskaart met de gemelde vondsten van tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV).

Onderstaande tabel geeft een overzicht van de officiële meldingen van ToBRFV zoals te vinden bij EPPO (<https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV>).

Tabel 1. Overzicht van de officiële meldingen van ToBRFV via de EPPO Reporting service.

continent	country	state	country code	state code	Status
America	Mexico		MX		Present, few occurrences
America	United States of America		US		Absent, pest eradicated
America	United States of America	California	US	Ca	Absent, pest eradicated
Asia	Israel		IL		Present, no details
Asia	Jordan		JO		Present, no details
Europe	Germany		DE		Transient, under eradication
Europe	Italy		IT		Present, few occurrences
Europe	Italy	Sicilia	IT	Sc	Present, few occurrences

2.1 Amerika

In 2018 rapporteerden boeren in Yurecuaro en Tanhuato, Michoacan, Mexico typische symptomen op vruchten en bladeren van tomatenplanten. Onderzoek wees uit dat zeven bemonsterde tomatenplanten en een bemonsterde chili plant, besmet waren met ToBRFV (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2019; official pest reports 2018). Toetsing van de plantmonsters (TAN1-6 en YUR1-2) vond plaats m.b.v. een RT-PCR waarbij gebruik gemaakt werd van primers die door Luria *et al.* (2017) al beschreven waren voor ToBRFV (F-3666 en R-4718). De sequenties van de geamplificeerde RT-PCR fragmenten van deze acht isolaten kwamen 99-100% overeen met de virussen zoals beschreven uit Israël en Jordanië. Ook het isolaat uit chili peper (TAN6) had 99% overeenkomst met de isolaten uit Israël en Jordanië. De sequenties van de in deze publicatie beschreven isolaten staan in de NCBI database onder accessie nummers MK273183 –MK273190).

Ook begin 2019 verscheen er een tweede wetenschappelijke publicatie over een andere vondst van ToBRFV in Mexico (Camacho-Beltrán *et al.*, 2019). Dit betrof een vondst in 2018 in bedekte tomatenteelt in Ensenada in de regio Baja California. Ook dit isolaat werd aangetoond m.b.v. een RT-PCR waarbij van dezelfde primers set gebruik gemaakt werd als hierboven beschreven (F-3666 en R-4718). De sequentie van dit isolaat (ToBRFV-Mx) is bij NCBI gedeponeerd onder accessie nummer MK319944 maar bleek nog niet opvraagbaar. De auteurs beschrijven wel dat dit isolaat 99,8 tot 99,9 % genetisch overeen te komen met respectievelijk de eerder uit Israël en Jordanië beschreven isolaten.

De huidige status van ToBRFV in Mexico volgens EPPO is dat het aanwezig is, met enkele vondsten (*'present, few occurrences'*). De huidige status wordt omschreven als voorbijgaand, handelbaar en onder uitroeiing (*'Transitory pest, actionable and under eradication'*).

In 2018 zijn er ook meldingen van ToBRFV uit de Verenigde Staten geweest. Deze (Chitambar J., 2018) zijn terug te vinden op de website van de CDFA; <https://blogs.cdfa.ca.gov/Section3162/?p=5843>.

De eerste betreft een vondst van ToBRFV door een Amerikaanse onderzoeker (K.S. Ling), in september 2018 gemeld aan de California Department of Food and Agriculture (CDFA). Het virus was aangetroffen in tomatenplanten op een bedrijf in Santa Barbara County, Californië. Door de CDFA is in november 2018 in plantmateriaal van datzelfde bedrijf (verzameld in september 2018) ook ToBRFV aangetroffen. Deze vondsten konden niet verder officieel worden bevestigd omdat in november 2018 alle planten van het betreffende bedrijf al geruimd bleken. De officiële status van ToBRFV in Californië is op dit moment; *'absent, eradicated'*.

In een recent verschenen internet artikel (<https://www.hortidaily.com/article/9067010/tomato-brown-rugose-fruit-virus-bothers-growers-all-over-the-world/>) wordt melding gemaakt van nog een andere vondst van ToBRFV in Californië (USA). Deze melding zou een vondst in tomaten in 'Baja California Sur' betreffen. Dit is echter dezelfde vondst als de in het hierboven genoemde artikel van Camacho-Beltrán *et al.* (2019). Het betreft hier dus een vondst in Mexico en niet in Californië (USA). Daarmee is er slechts één bevestigde vondst van ToBRFV in Californië maar het virus lijkt daar inmiddels uitgeroeid.

2.2 Europa

In de tweede helft van 2018 werd ToBRFV vastgesteld op een aantal tomatenbedrijven in Duitsland nabij Straelen, vlak over de grens bij Venlo. De aanwezigheid van dit virus werd daarna officieel bevestigd door het Julius Kühn Instituut. Naast ToBRFV werd ook PepMV in deze planten aangetroffen. Door de Duitse instanties is in oktober 2018 een express-pest risico analyse (PRA) opgesteld; https://pflanzen-gesundheit.julius-kuehn.de/dokumente/upload/ToBRFV_express-pra.pdf. Inmiddels zijn de getroffen bedrijven geruimd.

Begin 2019 verscheen een wetenschappelijk artikel met de melding van deze eerste vondst van ToBRFV in Duitsland (Menzel *et al.*, 2019). Analyse van de volledige RNA sequenties van twee in Duitsland gevonden isolaten (ToBRFV-P12-G3 en ToBRFV-P12-3H, NCBI acc. nummers MK133093 en MK133095 respectievelijk), liet zien dat deze 99,6% gelijk zijn de isolaten beschreven uit Israël en Jordanië. De auteurs concluderen hieruit dat dit wijst op een gemeenschappelijke oorsprong van deze isolaten. Dat is echter geen bewijs dat het in Duitsland gevonden virus ook rechtstreeks uit Israël of Jordanië in Duitsland terecht is gekomen.

In 2018 is het ToBRFV ook gevonden op Sicilië in Italië (melding Italiaanse plantenziektenkundige dienst) in een tomatenkas (2000 m²) in Ispica (provincie Ragusa). Ongeveer 10% van de planten was aangetast maar vertoonden geen ernstige symptomen. De huidige situatie volgens EPPO is dat het aanwezig is maar slechts op enkele plaatsen voorkomt; *'Present, at low prevalence, in specific parts of the area where host plants are grown'*.

3 Potentiële waardplanten van ToBRFV

Luria *et al.* (2017) beschrijven onderzoek naar de reacties van ToBRFV op diverse tomatencultivars en andere mogelijk alternatieve waardplanten.

Een vergelijking van de infectiositeit van tomatenmozaïekvirus (ToMV) en ToBRFV op tomatencultivars met verschillende resistentiegenen tegen ToMV, liet zien dat ToMV niet de Tm2² resistentie kan doorbreken maar ToBRFV wel. Dat bleek zowel uit de duidelijke symptomen als uit positieve ELISA waarden van systemisch geïnfecteerde bladeren van tomatencultivars met het Tm2² resistentiegen.

Luria *et al.* onderzochten ook mogelijke infecties van verschillende planten uit de familie van de Nachtschadeachtigen waaronder diverse paprikacultivars met verschillende resistentiegenen (L¹, L³ en L⁴), diverse tabaksoorten, Petunia, zwarte nachtschade, aubergine en aardappel.

Uit de inoculatieproeven van Luria *et al.* bleek dat ToBRFV in staat was om de geteste *Capsicum*-cultivars (met verschillende resistentiegenen) te infecteren. Er waren 4-7 dagen na inoculatie duidelijke necrotische vlekken op de geïnoculeerde bladeren zichtbaar. Er waren echter 14 dagen na inoculatie geen systemische symptomen zichtbaar terwijl daarin met ELISA wel goed het virus kon worden aangetoond. Paprika lijkt daarmee een goede, vrijwel symptoomloze waardplant voor ToBRFV te zijn. Opmerkelijk is dat Luria *et al.* melden dat als infectie van paprika via wortelinoculatie plaatsvond, de planten bij 30°C necrose op zowel de wortels als de stam ontwikkelden. Het is echter niet duidelijk of de manier van inoculatie of de temperatuur hierbij een rol spelen of dat er mogelijk een ander virus bij de symptoomontwikkeling betrokken is.

Tabel 2. Overzicht van de reacties van alternatieve waardplanten op mechanische infectie met ToBRFV. Dpi = dagen na inoculatie, HR= hypersensitive respons; necrose), NL = necrotische lesies, NS= geen symptomen; + = positieve reactie, - = negatieve reactie.

Waardplant	Vroege symptomen 4-7 dpi	Systemische symptomen 7-14 dpi	ELISA
Capsicum annuum (pepper) *Cv's Maor, (L¹), Fiona (L³, Sw-5), Romans and Lyri (L⁴, Sw-5)	HR	NS	+
Petunia hybrida	NL	NS	+
S. nigrum (zwarte nachtschade)	-	MM/NS	+
S. melongena (aubergine) cv's. Classic, 206	-	NS	-
Solanum tuberosum (aardappel) cv. Nicola	-	NS	-

De vatbaarheid van *Capsicum* spp voor ToBRFV wordt bevestigd door de vondst van ToBRFV in chili pepper in Mexico (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2019). De tekst van deze publicatie suggereert dat de tomatenplanten en chili pepper planten dezelfde symptomen vertoonden; '*fruits showing yellowing, spots and green grooves, irregular brown spots and deformation, while the foliage presented chlorotic spots and mosaic*'. Er is hier echter geen nadere info beschikbaar. Ook is het niet duidelijk welke tomaten cultivars en chili pepper cultivar het hier betreft.

Luria *et al.* beschrijven dat ook *Petunia hybrida* en zwarte nachtschade geïnfecteerd te worden door ToBRFV, maar dan zonder dat dat symptomen veroorzaakt. *Chenopodium murale*, dat ook als onkruid in West-Europa voorkomt, kan ook geïnfecteerd worden door ToBRFV waarbij Luria *et al.* (bruine) lesies en bladvlekken als symptomen omschrijft.

In aardappelen en aubergine kon geen infectie worden vastgesteld. De getoetste cultivars lijken daarmee geen waardplant voor het getoetste isolaat van ToBRFV.

4 Detectie van ToBRFV

Luria *et al.* (2017) beschrijven een antiserum, gemaakt tegen het Israëlisch isolaat van ToBRFV dat een duidelijke reactie gaf met geïnfecteerd plantmateriaal in DAS-ELISA. Op westernblot gaf dit antiserum een zwakke kruisreactie met TMV, pepper mild mottle virus (PMMoV) en tomato mild green mosaic virus (TMGMV). Dit zijn verwante tobamovirussen die ook in staat zijn *Solanaceae* te infecteren.

Uit onderzoek van WPR blijkt dat ToBRFV goed gedetecteerd kan worden in DAS-ELISA met een antiserum van Prime Diagnostics (www.primediagnostics.com) gericht tegen ToMV. Dit antiserum wordt door Naktuinbouw toegepast in hun toetsingen. Ook DSMZ (www.dsmz.de/catalogues/catalogue-plant-viruses-and-antisera.html) heeft een ELISA antiserum beschikbaar dat een positieve reactie met ToBRFV geeft. Gegeven de hoge virusconcentraties in geïnfecteerde planten zal detectie van dit virus m.b.v. de nu beschikbare antisera geen probleem zijn. Bij vermoeden van een infectie kan een eerste screening snel en goedkoop met een DAS-ELISA worden uitgevoerd .

Omdat de antisera tegen ToBRFV en ToMV kruis-reageren met verschillende andere tobamovirussen, zal een vermoedelijke besmetting met ToBRFV wel met een moleculaire test bevestigd moeten worden. Er zijn inmiddels al diverse volledige, en gedeeltelijke sequenties van verschillende ToBRFV isolaten uit verschillende landen gepubliceerd. Deze zijn vrijwel allemaal identiek aan elkaar. In diverse artikelen worden hiervoor RT-PCRs met bijbehorende primersets beschreven. Er zijn over deze RT-PCR testen geen verdere gegevens bekend dus er kan hier geen inschatting gemaakt worden van hun gevoeligheid of betrouwbaarheid. Uit vergelijkingen van de RNA sequenties van verschillende tobamovirussen uit tomaat komt wel duidelijk naar voren dat deze groep van virussen redelijk veel overeenkomsten in hun (RNA) genoomsequenties hebben. Net als bij de ELISA testen moet daarom rekening worden gehouden met mogelijke kruisreacties in de RT-PCR reacties. Het verdient daarom aanbeveling om de identiteit van de verkregen RT-PCR-producten met sequentieanalyse te bevestigen.

5 Verspreiding van ToBRFV

De belangrijkste manieren van overdracht van tobamovirussen zijn contact (mechanische verspreiding) en virus-besmet zaad.

5.1 Mechanische verspreiding

Het virus wordt makkelijk tijdens werkzaamheden van plant naar plant verspreid, maar ook van oppervlakte op oppervlakte overgedragen en komt snel op handen, kleding, gereedschap, deurknoppen etc. terecht. Deze worden daarmee ook weer een bron van besmetting, juist omdat het virus zo stabiel is en maar langzaam zijn infectiositeit verliest.

Vruchten van tomatenplanten geïnfecteerd met TMV of tomatenmozaïekvirus (ToMV) bevatten hoge (tot zeer hoge) concentraties virus. Dit zal voor ToBRFV niet anders zijn. Geogste vruchten van met ToBRFV geïnfecteerde planten kunnen dan ook een belangrijke manier van verspreiding van het virus zijn. Met name bij beschadiging van vruchten zal fust besmet worden. Omdat het virus zo stabiel is, kunnen virus-besmet fust en geogste geïnfecteerde tomaten het virus dus over grote afstanden verspreiden.

Het is op dit moment onbekend hoe effectief de ruimingsacties na de gevonden besmettingen in Duitsland en Californië zijn geweest. De vondsten in deze landen en Italië, relatief kort na de vondsten in Israël, wijzen op een onopgemerkte verspreiding. Gezien de infectiositeit en stabiliteit van het virus is het zeker te verwachten dat in de loop van 2019 meer besmettingen met ToBRFV gemeld gaan worden.

5.2 Verspreiding via zaad

Van tobamovirussen is niet bekend dat ze via het embryo verspreid worden. Maar omdat vruchten hoge concentraties virus kunnen bevatten, zal zaad geogst van besmette planten dan ook aan de buitenkant besmet zijn met het virus. Voor diverse tobamovirussen zijn protocollen voor de ontsmetting van zaad ontwikkeld. Onbekend is in hoeverre die effectief zijn tegen ToBRFV. Gezien echter de hoge infectiositeit van het virus, (het wordt gemakkelijk van plant op plant overgedragen) zal een zeer laag percentage van zaadoverdracht, en dus een zeer gering aantal zieke planten in de opkweek (slecht een of enkelen per tienduizenden zaailingen) al een groot risico op verspreiding van het virus vormen. Zeker als er sprake is van entingen op onderstammen.

Veredelingsbedrijven zijn al enige tijd bekend met ToBRFV en screenen op de mogelijke aanwezigheid van ToBRFV in hun zaadpartijen (zie ook hierboven bij aantonen van ToBRFV).

5.3 Verspreiding via insecten

5.3.1 Hommels

Zeer recent verscheen een Israëlische studie (Levitzky *et al.*, 2019) waarin wordt aangetoond dat ToBRFV ook overgedragen kan worden door hommels. De onderzoekers toonden aan dat het plaatsen van hommelmasten afkomstig uit besmette kassen, leidde tot de introductie van ToBRFV in kassen met

gezonde planten. Ook kon met behulp van ELISA en RT-PCR, ToBRFV aangetoond worden in materiaal uit de hommelmasten uit besmette kassen. Het virus bleek ook vooral aanwezig op de achterlijven van hommels. Dit suggereert volgens de onderzoekers overdracht van het virus via pollen aan het achterlijf van de hommels.

De onderzoekers bepleiten het gebruik van 'schone' hommelmasten bij het begin van de teelt.

5.3.2 Andere insecten

ToBRFV is een mechanisch overgedragen virus. Dat betekent dat in overdracht plaats vindt door middel van mechanische beschadiging van plantendelen, met name bladeren en bladharen. Insecten die bladeren, geïnfecteerd met ToBRFV, beschadigen door vraat, prikken, steken, zuigen etc., kunnen hiermee het virus op hun monddelen en andere delen van hun lichaam krijgen. Als ze daarna niet geïnfecteerde planten bezoeken, en beschadigen, bestaat de kans dat ze ToBRFV overdragen op die planten. Dit is geen specifieke interactie tussen insect en virus. Daarom worden deze insecten niet als virusvector aangeduid.

Van andere virussen is overdracht door bijtende insecten aangetoond, bijvoorbeeld de overdracht van *Rice yellow mottle virus* (RYMV) door kevers en andere bijtende insecten (Koudamilo et al., 2015). RYMV is een Sobemovirus en van deze virusgroep is bekend dat ze, evenals tobamovirussen, vaak hoge virusconcentraties in geïnfecteerde planten bereiken. Hoe groot echter de kans is dat ToBRFV op deze manier wordt overgedragen is niet te zeggen, maar mechanische overdracht door insecten kan niet worden uitgesloten.

6 Beheersing van ToBRFV

Tobamovirussen zijn genoemd naar het tabaksmozaïekvirus (TMV). Deze groep van virussen kenmerkt zich door hun zeer grote stevigheid en stabiliteit. Virusdeeltjes kunnen zeer lange tijd infectieus blijven (tientallen jaren) en zijn bestand tegen zeer hoge temperaturen. Het Thermal Inactivation Point (TIP), de temperatuur waarbij infectiositeit verloren gaat, ligt voor tobamovirussen gemiddeld tussen de 85 en 90°C. gedurende 10 minuten. Zeer lage virusconcentraties kunnen al een infectie veroorzaken. Van TMV bleken verdunningen van sap van geïnfecteerde planten van 1 miljoen maal (10^{-6}) nog infectieus (Zaitlin en Israel, 1975).

Het kan zeer lastig zijn om dit virus 'af te doden'. Alle besmette oppervlakten en gebruikte spullen kunnen zeer lang infectieus blijven en dus zal na het vaststellen van de aanwezigheid van dit virus alles uit de kast gehaald moeten worden om van dit virus af te komen.

Hygiënemaatregelen zijn de enige manier om het virus tijdens de teelt en teeltwisseling te beheersen. Belangrijk is om te voorkomen dat het virus op het bedrijf komt. Bezoekers zijn uit den boze en moeten er zeer strikte hygiënemaatregelen worden gehanteerd. Daarbij kan het Hygiëneprotocol Tomaat dat destijds is geschreven voor pepinomozaïekvirus (PepMV) een goed begin zijn. Tobamovirussen zijn wellicht nog stabielere dan PepMV dus het is (nog) niet bekend of de in dit protocol beschreven maatregelen effectief genoeg zijn voor het zeer persistente ToBRFV.

Zoals hierboven al aangegeven zijn zeer hoge temperaturen nodig om ToBRFV te elimineren. Die zijn duidelijk hoger dan bij bijvoorbeeld PepMV. Voor PepMV ligt de inactiveringstemperatuur tussen de 60° en 65°C (Jones et al., 1980). Uit Israëliisch onderzoek is ook naar voren gekomen dat composteren bij 65°C niet voldoende is om het virus af te doden. In Israël wordt een chlooroplossing (zoals in zwembaden gebruikt) in een concentratie van 1000 ppm (chloor) gebruikt voor ontsmetting van kassen en een grondontsmetting van 2000 ppm één dag voor planten (A. Dombrovsky, persoonlijke mededeling).

In Duitsland heeft men goede ervaringen opgedaan met benzoëzuur (Menno florades, Enno rapid) en natriumhypochloriet (NaOCl), beide in hoge concentratie (Boonekamp G, 2019). De infolyer van Belgische onderzoeksinstituten melden dat uit Israëliisch onderzoek is gebleken dat vooral Javel (natriumhypochloriet) voldoende effectief is om het virus af te doden (Reybroeck et al., 2019).

Wat ontsmettingsmiddelen betreft is in Nederland chloor niet toegelaten maar het middel Menno Florades wel. Daar zijn eerder in onderzoek met komkommervirus (ook een virus uit de tobamovirusgroep) goede resultaten mee behaald (1%-4% en een minimale inwerktijd van 1 uur).

Afdoende ontsmetting van gereedschap en fust zal een uitdaging zijn. Wat betreft gereedschap en mesjes e.d. kan het dompelen hiervan in een oplossing van magere melkpoeder tussen gewashandelingen aan verschillende planten, helpen virusverspreiding af te remmen. Dit advies wordt ook gegeven in de door het JKI uitgebrachte PRA. M.b.t. fust zal het gebruik van eenmalig fust en het introduceren van eenrichtingsverkeer helpen om virusverspreiding zo veel mogelijk te voorkomen.

7 Potentieel gevaar van ToBRFV

Tobamovirussen zijn zeer stabiel en infectieus en het is meer dan aannemelijk dat ToBRFV hierop geen uitzondering is. Ongemerkte mechanische verspreiding van dit virus via handen, gewashandelingen, gereedschap, geïnfecteerd fust of andere oppervlaktes treedt snel en gemakkelijk op. Ook verspreiding via grond en (recirculatie)water vormt een duidelijk risico. Of en welke ontsmettingsstrategieën effectief zijn, is nog onbekend.

ToBRFV doorbreekt de huidige Tm-2² resistentie tegen TMV/ToMV en de L-resistentiegenen in *Capsicum annuum* waarin het tot symptoomloze infecties leidt. Ook kan het virus diverse onkruiden zoals *Chenopodium murale* (muurganzenvoet) en *Solanum nigrum* (zwarte nachtschade) infecteren. Dit alles maakt dat, als er eenmaal ergens een besmetting met het virus optreedt, er een zeer groot risico is op verdere verspreiding van het virus. Zeker gezien de hoge dichtheid van tuinbouwbedrijven in verschillende delen van Nederland moet de dreiging van dit virus zeer serieus genomen worden. Elke verdachte plant moet zo snel mogelijk geïsoleerd en vernietigd worden. Dat moet omzichtig gebeuren om verdere besmetting te voorkomen. Verdacht materiaal moet zo snel mogelijk getoetst worden op het virus.

Zowel door de CDFA als door het JKI wordt het fytosanitair risico van ToBRFV als hoog ingeschat. De Duitse PRA meldt dat ToBRFV als potentieel Q-organisme dient te worden beschouwd en dat elke besmetting direct officieel gemeld dient te worden.

Afsluitend kan worden gesteld dat het risico van ToBRFV voor de Nederlandse kasteelt als hoog moet worden ingeschat en zeer serieus moet worden genomen. In het belang van de hele sector is het noodzakelijk dat elke vondst van het virus zo spoedig mogelijk gemeld wordt, zodat er snel inperkende maatregelen genomen kunnen worden. Als ToBRFV eenmaal voet aan de grond krijgt in de Nederlandse kasteelt, zal het nauwelijks mogelijk zijn om het onder controle te houden, laat staan het te elimineren.

8 Literatuur

- Boonekamp G (2019) Q-status sleutel tot uitroeiing ToBRFV.
<https://www.gfactueel.nl/Glas/Achtergrond/2019/2/Q-status-sleutel-tot-uitroeiing-ToBRFV-398663E/>
- Cambrón-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Alcasio-Rangel S, García-Ávila CJ, López-Buenfil JA and Ochoa-Martínez DL (2019) First report of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1). DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-5
- Camacho-Beltrán E, Pérez-Villarreal A, Leyva-López NA (2019). Occurrence of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato crops in Mexico. *Plant Disease*. DOI 10.1094/pdis-11-18-1974-pdn.
- Chitambar J (2018) California pest rating for Tomato brown rugose fruit virus.
<https://blogs.cdfa.ca.gov/Section3162/?p=5843>
- JKI (2018). Express – PRA zum Tomato brown rugose fruit virus https://pflanzengesundheit.julius-kuehn.de/dokumente/upload/ToBRFV_express-pra.pdf. (agerufen am: 16.10.2018)
- Jones, Koenig & Lesemann (1980) Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Annals of Applied Biology* 94: 61, 1980.
- Koudamilo A, Eegbara FN, Togola A3 and Akogbeto M. (2015) Insect vectors of Rice yellow mottle virus, *Journal of Insects* Volume 2015, Article ID 721751, 12 pages.
<http://dx.doi.org/10.1155/2015/721751>
- Levitzky N, Smith E, Lachman O, Luria N, Mizrahi Y, Bakelman H, Sela N, Laskar O, Milrot E and Dombrovsky A (2019) The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of Tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes. *PLoS ONE* 14(1): e0210871.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210871>
- LURIA, N., E. SMITH, V. REINGOLD, I. BEKELMANN, M. LAPIDOT, I. LEVIN, N. ELAD, Y. TAM, N. SELA, A. ABU-RAS, N. EZRA, A. HABERMAN, L. YITZHAK, O. LACHMAN, A. DOMBROVSKY, 2017: A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. *PLOS ONE*, January 20, 2017, 19S. DOI:10.1371/journal.pone.0170429.
- Menzel W, Knierim D, Winter S, Hamacher J, Heupel M (2019) First report of tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. *New Disease Reports* 39, 1. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2019.039.001>
- NAPPO. 2018. Tomato Brown Rugose Fruit Virus: detected in the municipality of Yurecuaro, Michoacan. North American Plant Protection Organization (NAPPO) Phytosanitary Alert System. September 17, 2018. <https://www.pestalerts.org/oprDetail.cfm?oprID=765>.
- Official Pest Reports: Tomato Brown Rugose Fruit Virus: detected in the municipality of Yurecuaro, Michoacan. <https://www.pestalerts.org/oprDetail.cfm?oprID=765>.
- Reybroeck E, Bosmans L, Mertens R (2019) Info flyer Tomato Brown Rugose Fruit Virus.
<http://www.proefcentrum.be/download/fid/3467>
- SALEM, N., A. MANSOUR, M. CIUFFO, B. W. FALK, M. TURINA, 2016: A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Arch Virol* 161, 503-506. DOI 10.1007/s00705-015-2677-7
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-015-2677-7>
- Zaitlin M and Israel HW (1975). Tobacco mosaic virus (type strain). C.M.I./A.A.B. Description of Plant viruses. N



Correspondentie adres voor dit rapport:

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

Rapport WPR-3740053500-ToBRFV

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 5.000 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

