

Fytoplasma's in siergewassen: een groeiend probleem?

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

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

Inleiding

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

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

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

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

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

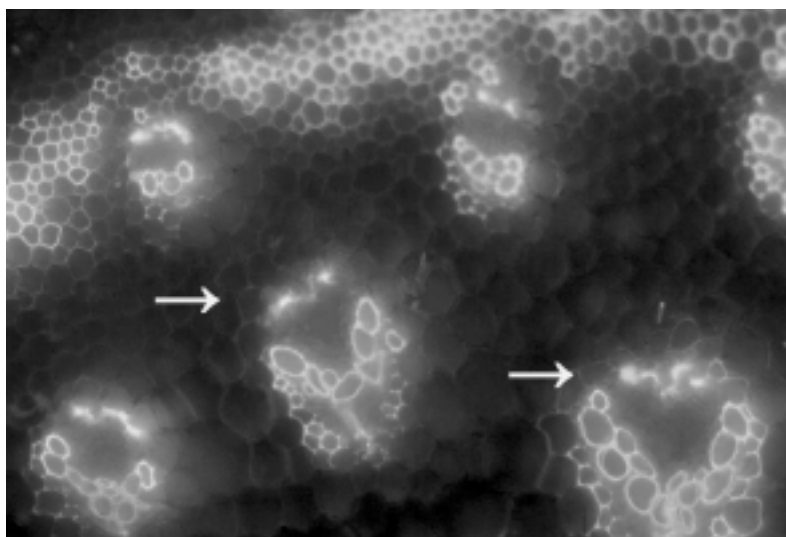
knolgewassen, fruit en andere houtige gewassen toe. Ook menginfecties komen voor; er zijn gewassen die waardplant zijn voor meerdere soorten fytoplasma's.

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

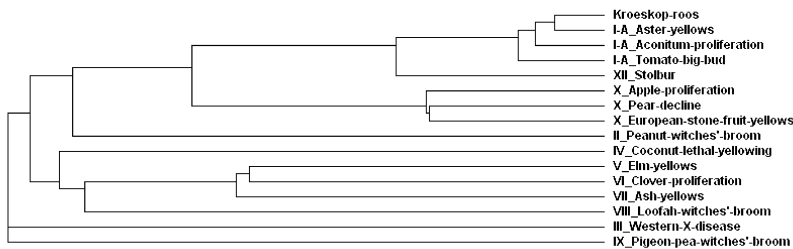
Identificatie en detectie van fytoplasma's

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

Momenteel berust de identificatie van fytoplasma's, welke



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



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

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

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

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

Bestrijding

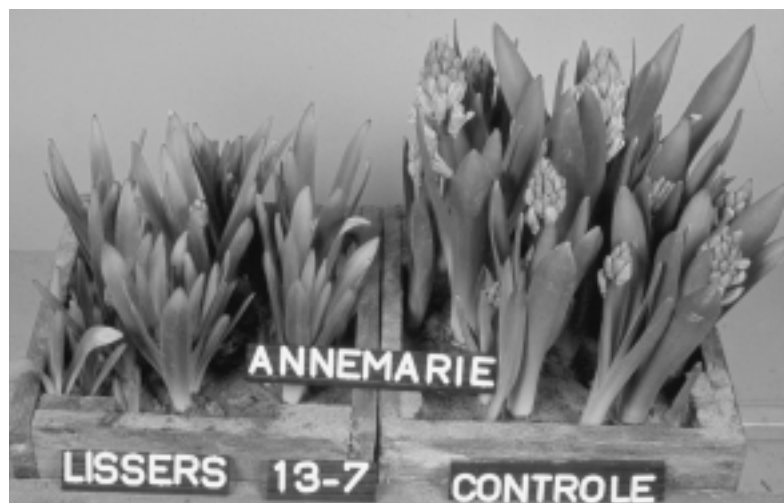
In de meeste gevallen betekent bestrijding van fytoplasma-aantasting en -verspreiding in gewassen het bestrijden van de vector; de cicaden. Om gewassen te 'genezen' van fytoplasma-aantastingen is toepassing van warmtebehandelingen een oplossing, indien de plant hier tegen kan. Bij gladiolen is het goed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

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

Problemen in bloembolgewassen

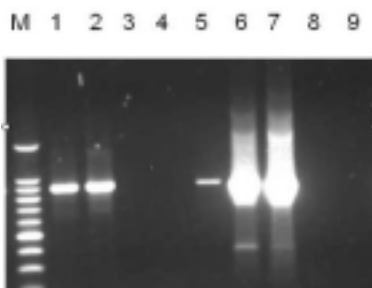
In de jaren zestig van de vorige eeuw werden afwijkingen gevonden in gladiool en ook hyacint ('Lissers', Fig. 3) die niet aan bacteriën konden worden toegeschreven (Asjes, 1983; Groen, 1974). Ook zijn er meldingen van 'mycoplasma-achtige' organismen in narcis, en recent ook in lelie (Bertacinni, 2005).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

Sequentieanalyse van het met



Figuur 3. "Lissers" in hyacint.

ARTIKEL



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

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

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

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

Roos

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

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

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

Bomen: peer en kastanje

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

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

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

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

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

Verder onderzoek

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

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

Referenties

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