



WAGENINGENUR

For quality of life

Inventarisatie naar en bestrijding van vegetatieve doorgroei in de bloemtakken van Hortensia

Martijn Schenk, Roel Hamelink & Filip van Noort





WAGENINGEN **UR**

For quality of life

Inventarisatie naar en bestrijding van vegetatieve doorgroei in de bloemtakken van Hortensia

Martijn Schenk, Roel Hamelink & Filip van Noort

© 2009 Wageningen, Wageningen UR Glastuinbouw

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 Wageningen UR Glastuinbouw

Dit project is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw



PT-nummer: 13422

Projectnummer: 3242056100

Wageningen UR Glastuinbouw

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

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
1 Inleiding	3
2 Onderzoeksmethode	5
2.1 Inventarisatie	5
2.2 Besmet materiaal	5
2.3 Moleculaire detectie	5
2.4 Achterhalen van de besmettingsroutes van fytoplasma in Hortensia	6
3 Resultaten	7
3.1 Symptomen in Hortensia	7
3.2 Inventarisatie binnen Nederland	8
3.3 Inventarisatie buiten Nederland	9
3.4 Moleculaire identificatie fytoplasma	10
4 Discussie en conclusies	15
5 Literatuur	17
Bijlage I. Enquête	3 pp.
Bijlage II. DNA sequentie 16S rRNA	1 p.

Samenvatting

Achtergrond

Binnen de Hortensiateelt worden planten aangetroffen met ziekteverschijnselen die wijzen op besmetting met een fytoplasma. Aangetaste Hortensia's hebben groene bloemen, er ontstaan vegetatieve scheuten vanuit de bloemdelen en de planten blijven achter in groei zodra de vegetatieve fase van de plant inzet. Fytoplasma's zijn ééncellige organismen zonder celwand die parasitair leven in het floëemweefsel van planten. Bestrijding van fytoplasma's in de planten is niet mogelijk en beheersing van de ziekte kan daarom alleen plaatsvinden door besmettingen te voorkomen. Doel van dit onderzoek was om vast te stellen op welke schaal besmetting met fytoplasma in Hortensia optreedt in Nederland en om aanknopingspunten te vinden om besmetting te voorkomen of in te perken.

Resultaten

Om de stand van zaken in Nederland in kaart te brengen is in overleg met de Landelijke commissie een enquête over fytoplasma's opgesteld. Daarnaast is besmet materiaal onder pothortensiatelers verzameld. Bij verschillende cultivars zijn verdachte planten aangetroffen, maar de besmettingsgraad was in 2009 in alle gevallen laag. Alle in de literatuur beschreven symptomen zijn in diverse gradaties aangetroffen op besmet Nederlands materiaal. De inventarisatie van de problemen in het buitenland is gebaseerd op een literatuurinventarisatie. Deze geeft duidelijk aan dat fytoplasma's in Hortensia ook in het buitenland een probleem vorm(d)en. Uit de inventarisatie blijkt dat in zowel Europa, Noord-Amerika als Azië besmette Hortensia's worden aangetroffen. Daarbij zijn er twee typen fytoplasma's gevonden, waarvan er één in Azië aanwezig is, terwijl de ander in Europa en Noord-Amerika voorkomt. Volgens de literatuur zijn de vectoren van beide fytoplasma's nog onbekend, wat inperking van de ziekte bemoeilijkt. Van alle cultivars waarvan planten met symptomen zijn verzameld, is minimaal één plant onderzocht op aanwezigheid van fytoplasma's met behulp van moleculaire technieken. Al deze cultivars bleken door hetzelfde fytoplasma besmet te zijn. Dit fytoplasma behoorde tot het type *Candidatus Phytoplasma asteris*, net als in alle eerder beschreven vondsten uit Europa. Één van de beide aangetroffen sequentievarianten bleek wat betreft zijn DNA sequentie identiek te zijn aan varianten die eerder gevonden zijn in citrus, ui, waterkers en valeriaan.

Conclusie

Bij verschillende Hortensia cultivars zijn er besmette planten aangetroffen. De besmettingsgraad was bij elk daarvan echter laag, ook in vergelijking met 2008. Mogelijk hebben de problemen van toen gezorgd voor extra alertheid. Ook hebben ze aanleiding gegeven voor het opschonen van het moederplantenbestand, wat een voorname besmettingsbron kan zijn geweest en dus de duidelijke vermindering van de vegetatieve doorgroei kan verklaren. Er zijn drie potentiële besmettingsroutes voor het fytoplasma: (I.) Besmetting via de moederplanten. Als het uitgangsmateriaal besmet is, zal het daarvan afkomstige stek ook besmet zijn. Dat besmetting via deze route optreedt, wordt zeer waarschijnlijk geacht. (II.) Besmetting via gewashandelingen. Als er zich onder het stek of het in bloei getrokken stek besmette planten bevinden, kan deze besmetting zich theoretisch uitbreiden doordat gezonde planten in aanraking komen met besmet plantensap tijdens gewashandelingen of als de planten beschadigd raken. Het optreden van deze besmettingsroute wordt onwaarschijnlijk geacht. (III.) Besmetting via een vector. Als zich onder het stek of het in bloei getrokken stek besmette planten bevinden, kan de besmetting zich uitbreiden via een vector. Het is aannemelijk dat besmetting via deze route optreedt. Gezien het feit dat het in Nederland aangetroffen fytoplasma van het type *Candidatus Phytoplasma asteris*, is de vector waarschijnlijk een zogeheten leafhopper. Het kan ook zijn dat de betreffende vector niet in Nederland voorkomt en dat besmettingen alleen in Zuid-Europa plaatsvinden. Verder geldt dat de aangetroffen fytoplasma's genetisch identiek zijn aan isolaten die eerder zijn aangetroffen in andere gewassen, wat aangeeft dat ook andere gewassen als besmettingsbron kunnen optreden na tussenkomst van een vector.

1 Inleiding

In 1996 werd in Japen 'Hydrangea phyllody' beschreven als een ernstige ziekte, die binnen Japan overal aanwezig was waar Hortensia's geteeld werden. Ook uit Europa en Nederland zijn besmettingen met fytoplasma's bekend. Hoe wijd verspreid deze ziekte is, is onbekend. Dit maakt het lastig om een inschatting te maken van de opbrengst-deriving. Besmetting met een fytoplasma zorgt ervoor dat aangetaste Hortensia's groene bloemen krijgen, er vegetatieve scheuten vanuit de bloemdelen groeien en er groeimisvorming kan ontstaan. Tijdens de vegetatieve fase van Hortensia zijn er geen duidelijke uiterlijke verschillen tussen gezonde en besmette planten. Zodra de bloei inzet, openbaren de ziekteverschijnselen zich en uiteindelijk zullen besmette planten verzwakken en sterk achterblijven in groei.

Fytoplasma's zijn ééncellige organismen zonder celwand die parasitair leven in het floëemweefsel van planten. Ze kunnen zich niet buiten een waardplant voortplanten. Vroeger werden ze ook wel aangeduid als mycoplasma-achtige organismen. Fytoplasma's zijn ziekteverwekkers in een aantal belangrijke gewassen, zoals in peer waar ze de oorzaak zijn van de perenaftakelingsziekte (Pear decline), in appel waar ze appelheksenbezemziekte (Apple proliferation) geven en in aster waar ze 'Aster yellows' veroorzaken.

Bestrijding van fytoplasma's in de planten is niet mogelijk en beheersing van de ziekte is daarom gericht op het voorkómen van een besmetting. In het algemeen geldt dat bepaalde insecten (Cidades, Auchenorrhyncha) de fytoplasma's overdragen naar gezonde planten en vanuit de fruit- en sierplantenteelt is bekend dat besmetting kan plaatsvinden door te enten met besmet materiaal of door besmette stekken te gebruiken.

De doelstellingen van dit onderzoek zijn:

- De huidige verspreiding van fytoplasma's in Nederland in kaart brengen
- Nagaan bij welke cultivars besmetting optreedt
- Onderzoeken hoe binnen Hortensia de besmetting met fytoplasma plaatsvindt
- Een protocol opstellen voor het voorkomen van besmetting met fytoplasma

Het onderzoek zal inzicht geven in de mate waarin het probleem van vegetatieve doorgroei in de bloemtakken van Hortensia binnen Nederland voorkomt. Daarnaast wordt onderzocht welke aanknopingspunten er zijn om besmetting te voorkomen of in te perken. Op basis hiervan kan gericht worden geadviseerd richting veredelaars, vermeerderders en telers. Uiteindelijk zou dit moeten leiden tot het beperken van de economische schade door vegetatieve doorgroei in de bloemtakken van Hortensia.

2 Onderzoeksmethode

Het oorspronkelijke onderzoek zou twee fases omvatten. De eerste fase is uitgevoerd, maar omdat uit deze inventarisatie naar voren kwam dat de problemen met fytoplasma's in Hortensia in 2009 op beperkte schaal voorkwamen, is besloten om de tweede fase niet uit te voeren.

2.1 Inventarisatie

Doel van de inventarisatie was om de grootte van het probleem binnen Nederland in kaart te brengen. De bedoeling was om daarvoor een enquête op te stellen en deze te verspreiden onder de Nederlandse pothortensiatelers en de veredelaars en vermeerderders die in Hortensia actief zijn. Uit de enquête moest informatie naar voren komen over:

- of telers bekend zijn met de door fytoplasma's veroorzaakte problematiek
- of telers zelf besmette planten hebben op hun bedrijf
- hoeveel besmette planten telers op hun bedrijf hebben
- bij welke cultivars besmetting optreedt
- de oorsprong van het (besmette) stekmateriaal van de telers

Naast deze binnenlandse inventarisatie is er met behulp van de beschikbare wetenschappelijke literatuur geïnventariseerd hoe groot de problemen rondom fytoplasma's in Hortensia momenteel zijn in het buitenland.

2.2 Besmet materiaal

Met behulp van contacten binnen de landelijke commissie Hortensia is besmet materiaal onder pothortensiatelers verzameld. De uiteindelijke herkomst van dit materiaal is wel bij de onderzoekers bekend, maar staat uit het oogpunt van vertrouwelijkheid niet in dit verslag vermeld.

2.3 Moleculaire detectie

Fytoplasma's kunnen niet in kweek worden gebracht en daarom is men voor de detectie van het fytoplasma in verdacht plantmateriaal aangewezen op moleculaire technieken. Uit vooronderzoek is gebleken dat er binnen Hortensia verschillende fytoplasma-typen te vinden zijn en dat deze types aan te tonen zijn met moleculaire detectietechnieken. Daarom is van een selectie van het verzamelde materiaal onderzocht door welk type fytoplasma het materiaal besmet is en of er tussen de gevonden fytoplasma's genetische variatie aanwezig is. De selectie van het materiaal waarop getoetst is, staat weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1. Plantmateriaal wat op basis van symptomen besmet leek te zijn met een fytoplasma en daarom is onderzocht met moleculaire technieken.

Nummer	Isolaatcode	Cultivar
1	MS09Ho001	Snowball
2	MS09Ho002	Rosita
3	MS09Ho003	Early Blue
4	MS09Ho004	Snowball
5	MS09Ho005a	Rosita
6	MS09Ho005b	Rosita
7	MS09Ho006a	Doris
8	MS09Ho006b	Doris
9	MS09Ho006c	Doris
10	MS09Ho006d	Doris
11	MS08Ho003	Yvonne
12	MS08Ho002	Leuchtfeuer

Om het fytoplasma aan te kunnen tonen is het noodzakelijk om erfelijk materiaal te isoleren. Dit is gedaan met de zogeheten Kingfisher methode met behulp van AGOWA reagentia. Vervolgens wordt een klein stuk van het erfelijk materiaal eruit gelicht en ettelijke keren gekopieerd door een PCR uit te voeren met de primers P1/P7, daarbij gebruik makend van de MasterMix van Promega. De P1/P7 primercombinatie kopieert en vermenigvuldigt een sequentie van circa 1700 base paren die deel uitmaakt van het 16S rRNA gen. Het product wat in deze PCR gevormd wordt, is op gel zichtbaar gemaakt. Vervolgens is er RFLP analyse toegepast door het PCR product te knippen met de enzymen KpnI en RsaI. Het product hiervan is wederom op gel zichtbaar gemaakt. Tenslotte zijn de PCR producten gezuiverd met Qiagen-kolommen, zodat vervolgens op het gezuiverde product een sequentiebepaling kon worden uitgevoerd.

2.4 Achterhalen van de besmettingsroutes van fytoplasma in Hortensia

In dit onderdeel was het oorspronkelijke doel om de besmettingsroutes van fytoplasma in Hortensia te onderzoeken door onderzoek naar besmetting via gewashandelingen, besmette moerplanten en via vectoren. Op basis van de verkregen informatie zou een hygiëneprotocol opgesteld worden. Dit onderdeel is uiteindelijk niet ten uitvoer gebracht. Daarom worden in dit verslag alleen de mogelijke besmettingsroutes besproken zonder gebruik te kunnen maken van experimentele data die het bestaan van deze routes onderbouwen of tegenspreken.

3 Resultaten

3.1 Symptomen in Hortensia

Besmetting met een fytoplasma kan in Hortensia diverse symptomen geven. Zo worden drie typen bloemsymptomen onderscheiden, die in het Engels aangeduid worden met *'virescence'*, *'phylloidy'* en *'proliferation'*. Al deze symptomen zijn in diverse gradaties aangetroffen op besmet Nederlands materiaal. Bij het optreden van *'virescence'* produceert de plant bloemen die wat hun bloemstructuur betreft normaal zijn, maar waarbij de kelkbladen groen verkleuren (Figuur 1). In Hortensia's met *'phylloidy'* symptomen zijn de kelkbladeren eveneens groen, maar zijn daarnaast de eigenlijke kroonbladen bladachtig (Figuur 2). Ook zijn de meeldraden en stamper misvormd. Tenslotte vormt de bloem bij *'proliferation'* symptomen een groeipunt, waarbij er een nieuwe scheut uit de bloem groeit (Figuur 3). Naast deze bloemsymptomen treedt in besmette planten groeiremming op (Figuur 4a) evenals roodverkleuring van de bladeren (Figuur 4b). Tijdens het onderzoek is getracht om de planten aan te houden, maar het merendeel was na enkele maanden zodanig verzwakt dat de planten stierven.



Figuur 1. *Hortensia cv. Doris besmet met een fytoplasma. (a.) Door de besmetting kleuren de kelkbladeren groen. Dit symptoom wordt aangeduid als virescence. (b.) Het komt ook voor dat de groenkleuring onvolledig is en de bloemen slechts gedeeltelijk verkleuren.*



Figuur 2. *In Hortensia's met 'phylloidy' symptomen kleuren de kelkbladeren groen, zijn de kroonbladen bladachtig en zijn de meeldraden en stamper misvormd. (a.) Hortensia cv. Snowball besmet met een fytoplasma. (b.) Hortensia cv. Rosita besmet met een fytoplasma.*



Figuur 3. Hortensia cv. Doris besmet met een fytoplasma. Bij deze plant groeien er nieuwe scheuten vanuit de bloemen.



Figuur 4. (a.) Een gezonde plant (links) en een met fytoplasma besmette plant (rechts) van de Hortensia cultivar Leuchtfeuer. Door de besmetting ontstaat sterke groeiremming zodra de plant in bloei geraakt. (b.) Roodverkleuring op de bladeren.

3.2 Inventarisatie binnen Nederland

Om de stand van zaken wat betreft fytoplasma's in Nederland in kaart te brengen is in overleg met de Landelijke commissie een enquête opgesteld (Bijlage I). Daarnaast is via diverse kanalen getracht om besmet materiaal onder pothortensiatelers te verzamelen. Bij verschillende cultivars zijn verdachte planten aangetroffen (Tabel 2), maar de besmettingsgraad was in 2009 in alle gevallen laag. De beperkte schaal waarop het probleem zich in 2009 voordeed, vormde ook de aanleiding om de bovenvermelde enquête uiteindelijk niet te versturen, hetgeen in overleg met de landelijke commissie besloten is.

Tabel 2. Bij verschillende cultivars zijn planten met symptomen aangetroffen die duiden op de aanwezigheid van een fytoplasma. De besmettingsgraad en het herkomstland van het stekmateriaal staan ook vermeld.

Cultivar	Besmettingsgraad	Herkomst stek
Snowball	0.01-0.04%	Portugal
Rosita	0.01-0.03%	Frankrijk
Early Blue	zeer laag	Portugal
Doris	~0.01%	onbekend
Yvonne ^{*1}	onbekend	onbekend
Leuchtfleur ^{*1}	onbekend	onbekend

^{*1} Verzameld in 2008

3.3 Inventarisatie buiten Nederland

De inventarisatie van de grootte van de problemen in het buitenland is gebaseerd op gegevens uit de literatuur.

De eerste beschrijving van de symptomen die fytoplasma's in Hortensia veroorzaken, dateert uit de zeventiger jaren (Welvaert *et al.*, 1975). Eind jaren '80 en begin jaren '90 wordt in diverse Europese landen deze ziekte beschreven. Zo is deze in Frankrijk en Italië als *hydrangea phyllody* beschreven (Cousin & Sharma, 1986; Bertaccini *et al.*, 1992) en wordt deze in België aangeduid als *hydrangea phyllody* of *hydrangea virescence* (Schneider *et al.*, 1993; Vibio *et al.*, 1996). Ook in Canada wordt rond deze tijd de ziekte beschreven (Hiruki *et al.*, 1994). Op basis van een zogenoemde RFLP-analyse - waarbij een specifiek stukje DNA van de ziekteverwekker (in dit geval het 16s rRNA) in stukjes wordt geknipt, zodat een bandenpatroon ontstaat - is vastgesteld dat bij al deze gevallen er een fytoplasma van de '*Aster yellows group*' betrokken was (Lee *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1993; Ceranic-Zagorac & Hiruki, 1996). Binnen de huidige classificatie van fytoplasma's vallen isolaten van dit type in de zogeheten subgroep Ia.

De oudste verwijzing uit Azië komt uit 1996 in Japan. Daar worden de ziekteverschijnselen die met de ziekte gepaard gaan, beschreven onder de naam '*Japanese Hydrangea phyllody*' (Kanehira *et al.*, 1996). Het fytoplasma wordt zowel in *Hydrangea macrophylla* als *Hydrangea serrata* aangetroffen. De beschreven symptomen zijn *phyllody*, scheuten uit de bloeiwijzen, groei-reductie en afsterving. De onderzoekers beschouwden vervolgens een fytoplasma als de meest waarschijnlijke veroorzaker van deze symptomen. Doordat fytoplasma's niet in kweek gebracht kunnen worden, komt de ondersteuning voor een relatie tussen ziekteverschijnselen en ziekteverwekker uit indirect bewijs. In dit geval zijn daardoor elektronenmicroscopie en moleculaire probes gebruikt. In 1999 wordt het bovengenoemde fytoplasma nader gekarakteriseerd en benoemd als '*Candidatus Phytoplasma japonicum*' (Sawayanagi *et al.*, 1999). Dit fytoplasma wekt duidelijk af van de eerder beschreven isolaten uit Europa en Canada en wordt dan ook ingedeeld in subgroep Id.

Eind jaren '90 testten Hortensia's met symptomen uit zuid-Italië positief voor een besmetting met fytoplasma (Marcone *et al.*, 1997). Ook deze fytoplasma's behoorden tot de zogeheten '*Aster yellows group*'. Ook in noord-Italië worden in Hortensia fytoplasma uit deze groep aangetoond (Marzachi *et al.*, 1999). De bijbehorende beschreven symptomen zijn groei-reductie, kleine bladeren, opgerolde bladranden en roodkleuring van de bladeren. In de bloemen worden *virescence* en *phyllody* (zie §3.1) gerapporteerd als symptomen. In diverse andere groenten- en siergewassen werden identieke fytoplasma's aangetroffen, zoals in spruitjes, cineraria, margriet, dahlia, lavendel, sla, olijven, pistache, primula, bezemstruik, strobloem en viool.

Tabel 3. In de literatuur vermelde onderzoeken over besmetting met fytoplasma's in *Hortensia*.

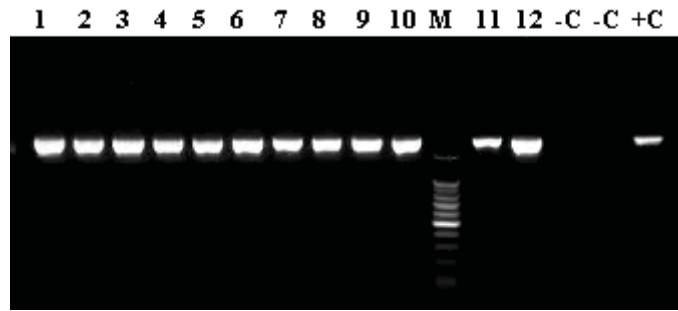
Land	Aanwezig type fytoplasma	Literatuurverwijzing(en)
Japan	<i>Candidatus Phytoplasma japonicum</i>	(Kanehira <i>et al.</i> , 1996); (Sawayanagi <i>et al.</i> , 1999) (Kesumawati <i>et al.</i> , 2006)
Italië	<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i>	(Bertaccini <i>et al.</i> , 1992) (Marcone <i>et al.</i> , 1997); (Marzachi <i>et al.</i> , 1999); (Marcone <i>et al.</i> , 2001)
België	<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i>	(Cousin & Sharma, 1986)
Frankrijk	<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i>	(Vibio <i>et al.</i> , 1996) (Schneider <i>et al.</i> , 1993)
Canada	<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i>	(Hiruki <i>et al.</i> , 1994)

Het lastige aan de vaststelling van de ziekte is dat er geen verschillen aanwezig zijn tussen gezonde en zieke planten tijdens het vegetatieve plantstadium en dat de karakteristieke symptomen zich pas openbaren als de planten gaan bloeien (Kanehira *et al.*, 1997). Vanuit andere gewassen is bekend dat de getoonde symptomen ontstaan doordat de hormoonhuishouding van de planten verstoort raakt (Chatterjee & Vidaver, 1986; Chen *et al.*, 1991). De aanwezigheid van groene bloemen hoeft overigens niet per se samen te hangen met de aanwezigheid van fytoplasma's. In een Japanse studie aan zijn drie groene cultivars onderzocht (Kesumawati *et al.*, 2006). Van deze cultivars bleek er slechts één besmet te zijn met *Candidatus Phytoplasma japonicum*. In deze cultivar, genaamd *Midori* kwamen planten met groene kelkbladen voor, maar waren niet alle kelkbladen groen. Deze variatie in kleur van blauw, via groenblauw naar groen hing sterk samen met de concentratie van het fytoplasma. De groene kelkbladeren leken ook wat betreft hun morfologie op gewone bladeren. Daarnaast is de intensiteit van het zonlicht van invloed op het tonen van de symptomen. In een Japans onderzoek gaven besmette planten die in de volle zon stonden aanzienlijk minder symptomen dan planten die in de (half)schaduw stonden (Kesumawati *et al.*, 2009). Dit varieerde echter per cultivar en bij sommige cultivars kregen ook planten die in de volle zon stonden symptomen. Het genoemde onderzoek is uitgevoerd aan *Candidatus Phytoplasma japonicum* en of deze resultaten ook gelden voor *Candidatus Phytoplasma asteris* - en dus de in Europa aanwezige fytoplasma's - is niet bekend. Waarschijnlijk kan het effect van lichtintensiteit op de aanwezigheid van symptomen verklaard worden door de invloed van lichtintensiteit op de concentratie van het fytoplasma.

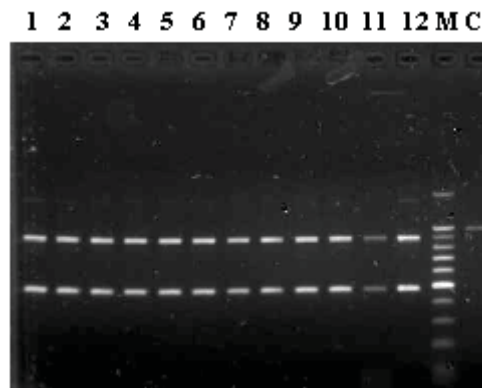
Volgens de literatuur zijn de vectoren van *Candidatus Phytoplasma japonicum* en het *hydrangea phyllody phytoplasma* nog onbekend, wat inperking van de ziektes bemoeilijkt. Van een aantal nauw verwante fytoplasma's zijn de vectoren echter wel bekend. De belangrijkste hiervan is de *aster leafhopper* (letterlijk: bladspringer; *Macrostelus* spp.) die als vector optreedt voor het Aster yellows phytoplasma in bijvoorbeeld waterkers en sla (Beanland *et al.*, 2005; Borth *et al.*, 2006). Diverse andere leafhoppers uit de geslachten *Uscelis*, *Scaphytopius* en *Aphrodes* treden echter ook op als vector voor dit type fytoplasma (Brcák, 1979; Tsai, 1979).

3.4 Moleculaire identificatie fytoplasma

Van alle cultivars waarvan planten zijn ontvangen met symptomen is minimaal één plant onderzocht op de daadwerkelijke aanwezigheid van een fytoplasma met behulp van een PCR. Al deze monsters testten positief (Figuur 5), waarbij de signalen zo sterk waren dat er geen geneste PCR nodig was om het fytoplasma aan te tonen (een geneste PCR houdt in dat er een tweede PCR uitgevoerd wordt met andere primers op het product uit de eerste PCR). Dit geeft aan dat de concentratie van de fytoplasma's in deze planten zeer hoog was. Het gevormde PCR-product is vervolgens geknipt met de enzymen KpnI en RsaI. De gevormde knippatronen van de verschillende monsters zijn identiek (Figuur 6), wat aangeeft dat alle cultivars mogelijk door hetzelfde fytoplasma besmet zijn. De gehanteerde methodiek om het fytoplasma aan te tonen werkte in ieder geval zeer goed en zou ook gebruikt kunnen worden om bijvoorbeeld besmettingen in moederplanten aan te tonen.



*Figuur 5. De PCR producten die met de P1/P7 primers geamplificeerd zijn. Alleen als er fytoplasma aanwezig is, wordt er een PCR-product gevormd dat op de onderstaande gel zichtbaar is als een bandje. Uit het plaatje wordt duidelijk dat alle onderzochte planten ook daadwerkelijk een fytoplasma bevatten. Geheel rechts op de gel is een positieve controle geplaatst, wat wil zeggen dat er een monster is onderzocht waarvan van tevoren vaststond dat het een fytoplasma bevatte. Daarnaast staan twee negatieve controles, wat wil zeggen dat er monsters onderzocht zijn waarvan van tevoren vaststond dat ze geen fytoplasma bevatten.
(1) Snowball; (2) Rosita; (3) Early blue; (4) Snowball; (5-6) Rosita; (7-10) Doris; (11) Yvonne; (12) Leuchtfeuer; (-C) negatieve controle; (+C) positieve controle.*



*Figuur 6. De PCR producten uit Figuur 1 zijn geknipt met het enzym KpnI. Uit het plaatje wordt duidelijk dat alle onderzochte planten mogelijk door hetzelfde fytoplasma besmet zijn. Geheel rechts op de gel is een positieve controle geplaatst. Dit uit gladiool afkomstige fytoplasma laat een afwijkend knippatroon zien.
(1) Snowball; (2) Rosita; (3) Early blue; (4) Snowball; (5-6) Rosita; (7-10) Doris; (11) Yvonne; (12) Leuchtfeuer; (C) positieve controle.*

Of alle cultivars ook daadwerkelijk door hetzelfde fytoplasma besmet zijn, is onderzocht door de DNA sequentie te bepalen. De sequentiereacties leverden goede resultaten op. Voor elk monster konden meer dan 1700 base paren bepaald worden. Alle monsters bleken besmet te zijn door hetzelfde type fytoplasma (Bijlage 2). Er was slechts één sequentievariatie aanwezig, maar deze bleek aanwezig te zijn binnen alle monsters. Er worden binnen de fytoplasma's diverse subgroepen onderscheiden. Duidelijk is dat het fytoplasma in de onderzochte Hortensia's behoort tot subgroep I. Het gevonden fytoplasma wijkt daarbinnen duidelijk af van de eerder beschreven fytoplasma *Candidatus Phytoplasma japonicum* (JHP). Daarentegen lijkt het zeer sterk op *Hydrangea phyllody phytoplasma*/*Candidatus Phytoplasma asteris* (HyPhI en HYDP), alhoewel het ook daar licht van afwijkt. De in dit onderzoek beschreven fytoplasma's behoren dus tot het type *Candidatus Phytoplasma asteris* (Figuur 7). Variant 1a is wat betreft dit deel van de DNA sequentie volledig identiek aan een fytoplasma dat eerder is geïsoleerd uit citrus, ui, waterkers en valeriaan (Tabel 4).



Figuur 7. Mate van gelijkheid tussen de sequentievarianten uit de zes Hortensiacultivars en de sequenties die al in de GenBank aanwezig zijn. De varianten uit de zes cultivars groeien duidelijk met de sequenties AY265207 en AY265219 en behoren dus tot het type Candidatus Phytoplasma asteris.

Tabel 4. *Fytoplasma-isolaten die een sterke gelijkenis vertonen met de in dit onderzoek aangetroffen isolaten komen in diverse gewassen voor. In de onderstaande tabel staan weergegeven welke isolaten volledig identiek zijn of maximaal twee basen (op de ca.1700) afwijken van de in dit onderzoek aangetroffen isolaten.*

Isolaatcode in GenBank	Aanduiding	Gewas/plant
<i>Identiek</i>		
EU544303	Chinese Huanglongbing disease-ass. phytoplasma	Citrus
AP006628	Onion yellows phytoplasma	Ui
AY665676	Aster yellows phytoplasma 'watercress'	Waterkers
AY102274	Valeriana yellows phytoplasma	Valeriaan
<i>1 base afwijkend</i>		
EU215426	Carrot phytoplasma sp.	Wortel
AY734453	Barley deformation phytoplasma	Gerst
AF222063	Aster yellows phytoplasma	Aster
FJ824597	Aster yellows phytoplasma	Druif
AY566302	Ash witches'-broom phytoplasma	Es
AY101386	Epilobium phyllody phytoplasma	Harig wilgeroosje
AF335107	'Rehmannia glutinosa var. purpurea' phytoplasma	<i>Rehmannia glutinosa</i>
AY744070	Silene virescence phytoplasma	Silene
<i>2 basen afwijkend</i>		
AY744071	Hyacinth virescence phytoplasma	Hyacinth
AM990989	Ranunculus phyllody phytoplasma	<i>Ranunculus asiaticus</i>
EU333399	Russian potato purple top phytoplasma	Aardappel
EU333397	Russian potato purple top phytoplasma	Aardappel
AY389820	Aster yellows phytoplasma	Sla
AF322644	Aster yellows phytoplasma	Aster?
AF268407	Aster yellows phytoplasma	Wortel
AM990990	Italian Empoasca phytoplasma	<i>Empoasca decipiens</i>
AY265219	Hydrangea phyllody phytoplasma	Hortensia
AY265207	Hydrangea phyllody phytoplasma	Hortensia
AY265209	Aster yellows phytoplasma	Aster?
FJ844439	Mulberry dwarf phytoplasma	Moerbei
FJ853161	Bamboo witches'-broom phytoplasma	Bamboe
FJ853155	Amblyomma variegatum' phytoplasma	Amarant
EF199937	Paulownia witches'-broom phytoplasma	Paulownia sp
EF990733	Chinaberry witches'-broom phytoplasma	<i>Melia azedarach</i>
EU215427	Broccoli phytoplasma	Broccoli
AY549311	Aster yellows phytoplasma	Smalle weegbree
EF570134	Silene nicaeensis virescence phytoplasma	Silene

4 Discussie en conclusies

Al enkele jaren zijn binnen de hortensiateelt problemen bekend door besmettingen met fytoplasma's. Fytoplasma's zijn ééncellige organismen zonder celwand die parasitair leven in het floëemweefsel van de planten. Besmetting met fytoplasma zorgt ervoor dat de aangetaste Hortensia's groene bloemen hebben of dat er vegetatieve scheuten vanuit bloemdelen groeien of dat er groeimisvorming kan ontstaan. In eerste instantie zijn deze problemen vooral in het buitenland gerapporteerd, maar inmiddels is duidelijk dat ze ook in Nederland voorkomen. Hoe wijd verspreid deze ziekte is, was echter onbekend. Bestrijding van fytoplasma's in de plant is niet mogelijk en zieke planten blijven dus altijd ziek. Beheersing van de ziekte is daarom alleen mogelijk door het voorkomen van besmettingen. Doel van het hier beschreven onderzoek was om vast te stellen op welke schaal besmettingen optreden en om te onderzoeken hoe binnen Hortensia de besmetting met fytoplasma's plaatsvindt.

Inventarisatie

De uitgevoerde inventarisatie heeft duidelijk gemaakt dat alle voor fytoplasma's typische symptomen aanwezig zijn in de in Nederland aangetroffen besmette planten. Tijdens de vegetatieve fase van Hortensia zijn er geen duidelijke uiterlijke verschillen tussen gezonde en besmette planten. Zodra de bloei inzet, openbaren de ziekteverschijnselen zich. Besmetting met fytoplasma zorgt ervoor dat aangetaste Hortensia's groene kelkbladen krijgen, de structuur van de kelkbladen verandert in die van normale bladeren of dat er vegetatieve scheuten vanuit de bloemdelen groeien. Wel zijn er tussen individuele planten grote onderlinge verschillen in de mate waarin de diverse symptomen tot expressie komen. Dit geldt ook voor besmette planten van dezelfde cultivar. Dit suggereert dat de verschillen in symptoomexpressie in deze gevallen niet afhangt van het genotype van de Hortensia, maar van de concentratie van het fytoplasma in de plant. Dit wordt ondersteund door de gegevens uit de literatuurinventarisatie.

Om de huidige verspreiding van fytoplasma's in Nederland in kaart brengen, is een enquête ontworpen. Omdat gaande het onderzoek bleek dat zich in 2009 slechts in beperkte mate problemen voordeden, is besloten om deze enquête uiteindelijk niet te versturen. De huidige verspreiding van fytoplasma's binnen de Nederlandse hortensiateelt is daarmee niet volledig in kaart gebracht, maar wel is duidelijk geworden dat de problemen in vergelijking met 2008 zeer beperkt waren. Mogelijk hebben de problemen in 2008 gezorgd voor extra alertheid en aanleiding gegeven voor het opschonen van het moederplantenbestand, wat een voorname besmettingsbron zou kunnen zijn geweest.

De literatuurinventarisatie geeft duidelijk aan dat fytoplasma's in Hortensia ook in het buitenland een probleem vormen. Vanuit Europa betreft dit vooral wetenschappelijk onderzoek uit de jaren '90, maar vanuit Japan komen wel de nodige recente onderzoeksresultaten naar voren. Daarbij is ook duidelijk dat er in feite twee fytoplasma's zijn die Hortensia's kunnen besmetten, namelijk *Candidatus Phytoplasma japonicum* die het zogeheten Japanese Hydrangea phyllody veroorzaakt en *Candidatus Phytoplasma asteris* die de veroorzaker is van Hydrangea phyllody. De eerstgenoemde is tot op heden alleen binnen Japan aangetroffen, terwijl de tweede binnen Europa en Noord-Amerika is aangetroffen. De in Nederland aangetroffen isolaten van het fytoplasma behoorden allemaal tot het type *Candidatus Phytoplasma asteris*, hetgeen in lijn is met de eerdere vondsten. Dit lijkt ook logisch in het opzicht dat het stekmateriaal van de in Nederland in bloei getrokken planten vooral uit Zuid-Europa afkomstig is.

Besmettingsroutes

Hoe de fytoplasma's zich weten te verspreiden binnen de hortensiateelt is nog onduidelijk. In het algemeen geldt dat fytoplasma's worden overgebracht door insecten (Cidada's, Auchenorrhyncha). Daarnaast is vanuit de fruit- en plantenteelt bekend dat besmetting kan plaatsvinden door te enten met besmet materiaal of door besmette stekken te gebruiken. Tenslotte lag er de vraag vanuit de praktijk of het ook mogelijk is dat het fytoplasma tijdens het gewaswerk overgebracht wordt door te snijden met mesjes. Is dat het geval, dan kan het noodzakelijk zijn om mesjes tussentijds te ontsmetten of om aparte mesjes te gaan gebruiken.

Samengevat zijn er drie potentiële besmettingsroutes:

- I.) Besmetting via de moederplanten. Als het uitgangsmateriaal besmet is, zal het daarvan afkomstige stek de besmetting ook bij zich dragen. Pas als het stek vervolgens in bloei wordt getrokken, worden de symptomen van de aantasting zichtbaar. Dat besmettingen via deze route optreden, is zeer waarschijnlijk. Met de hier gebruikte PCR-toets lukte zeer goed om fytoplasma aan te tonen en deze toets zou dus ook gebruikt kunnen worden om het moederplantenbestand te toetsen.
- II.) Besmetting via gewashandelingen. Als er zich onder het stek of het in bloei getrokken stek besmette planten bevinden, kan deze besmetting zich theoretisch uitbreiden doordat gezonde planten in aanraking komen met besmet plantensap tijdens gewashandelingen of als de planten beschadigd raken. In het algemeen lukt het niet om fytoplasma's over te brengen door mechanische inoculatie. Het optreden van deze besmettingsroute is daarmee ook onwaarschijnlijk.
- III.) Besmetting via een vector. Als zich onder het stek of in bloei getrokken stek besmette planten bevinden, kan deze besmetting zich uitbreiden via een vector. Gezien het feit dat het aangetroffen fytoplasma van het type *Candidatus Phytoplasma asteris* is, is het zeer aannemelijk dat besmetting via deze route optreedt. De vector is dan waarschijnlijk een zogeheten leafhopper. Het kan ook zijn dat de betreffende vector niet in Nederland voorkomt en dat besmettingen alleen in Zuid-Europa plaatsvinden. Verder geldt dat de aangetroffen fytoplasma's genetisch identiek zijn aan isolaten die eerder zijn aangetroffen in citrus, ui en waterkers. Dit geeft aan dat ook andere gewassen als besmettingsbron kunnen optreden na tussenkomst van een vector en besmettingen dus niet noodzakelijkerwijs van Hortensia op Hortensia plaatsvinden.

Bij verschillende cultivars zijn er besmette planten aangetroffen. De besmettingsgraad was bij elk van hen echter laag. Dit kan diverse oorzaken hebben, zoals een zeer beperkte besmetting onder de moederplanten van de betreffende cultivars. Een andere mogelijkheid is dat de vector slechts beperkt in staat is om het fytoplasma over te dragen of slechts op beperkte schaal aanwezig is. Tenslotte kan het ook zo zijn dat bij het stekken, de concentratie van het fytoplasma te laag is (of dat het fytoplasma zelfs afwezig is) in het gestekte plantdeel om altijd een nieuwe infectie te bewerkstelligen. Zo geeft de literatuur aan dat een hogere lichtintensiteit een negatieve invloed heeft op de fytoplasma-concentratie en als de moederplanten dus onder zulke omstandigheden groeien, kan het voorkomen dat de moederplanten wel besmet zijn, maar het gesneden stek niet.

5 Literatuur

- Beanland, L., L.V. Madden, C.W. Hoy, S.A. Miller & L.R. Nault, 2005.
Temporal distribution of aster leafhopper sex ratios and spatial pattern of Aster Yellows phytoplasma disease in lettuce. *Annals of the Entomological Society of America*, 98:756-762.
- Bertaccini, A., R.E. Davis, R.W. Hammond, M. Vibio, M.G. Bellardi & I.M. Lee, 1992.
Sensitive detection of mycoplasma-like organisms in field-collected and in vitro propagated plants of Brassica, Hydrangea and Chrysanthemum by polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology*, 121:593-599.
- Borth, W.B., S.K. Fukuda, R.T. Hamasaki, J.S. Hu & R.P.P. Almeida, 2006.
Detection, characterisation and transmission by *Macrostelus* leafhoppers of watercress yellows phytoplasma in Hawaii. *Annals of Applied Biology*, 149:357-363.
- Brcák, J., 1979.
Leafhopper and planthopper vectors of plant disease agents in central and southern Europe. *Leafhopper Vectors and Plant Disease Agents*:97-154.
- Ceranic-Zagorac, P. & C. Hiruki, 1996.
Comparative molecular studies on aster yellows phytoplasmas. *Acta Hort.*, 432:266-276.
- Chatterjee, A.K. & A.K. Vidaver, 1986.
Genetics of pathogenicity factors: Application to phytopathogenic bacteria. *Advances in Plant Pathology*, 4:1-224.
- Chen, Z.W., Y.X. Chen & T.A. Chen, 1991.
Advance in the study of Jujube witches' broom disease. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 14:49-55.
- Cousin, M.T. & A.K. Sharma, 1986.
Association of mycoplasma-like organisms (MLOs) with mild type of Hydrangea virescence. A study with 60-1000 nm thick sections. *J Phytopathol*, 115:274-282.
- Hiruki, C., X.D. Rong & S.J. Deng, 1994.
Hydrangea virescence, a disease associated with mycoplasma-like organisms in Canada. *Acta Hort.*, 377:325-333.
- Kanehira, T., N. Horikoshi, Y. Yamakita & M. Shinohara, 1996.
Occurrence of hydrangea phyllody in Japan and detection of the causal phytoplasma. *Ann Phytopathol Soc Jpn*, 62:537-540.
- Kanehira, T., N. Horikoshi, Y. Yamakita & M. Shinohara, 1997.
Occurrence of ranunculus phyllody in Japan and detection of its phytoplasma. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 63:26-28.
- Kesumawati, E., M. Hosokawa, T. Kimata, T. Uemachi & S. Yazawa, 2009.
Flower greening in phytoplasma-infected Hydrangea macrophylla grown under different shading conditions. *Scientia Horticulturae*, 121:199-205.
- Kesumawati, E., T. Kimata, T. Uemachi, M. Hosokawa & S. Yazawa, 2006.
Correlation of phytoplasma concentration in Hydrangea macrophylla with green-flowering stability. *Scientia Horticulturae*, 108:74-78.
- Lee, I.M., R.W. Hammond, R.E. Davis & D.E. Gundersen, 1993.
Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83:834-842.
- Marcone, C., A. Ragozzino, I. Camele, G.L. Rana & E. Seemüller, 2001.
Updating and extending genetic characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants in southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 83:133-138.
- Marcone, C., A. Ragozzino & E. Seemüller, 1997.
Detection and identification of phytoplasmas infecting vegetable, ornamental and forage crops in Southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 79:211-217.
- Marzachi, C., A. Alma, M. D'Aquilio, G. Minuto & G. Boccardo, 1999.
Detection and identification of phytoplasmas infecting cultivated and wild plants in Liguria (Italian Riviera). *Journal of Plant Pathology*, 81:127-136.

- Sawayanagi, T., N. Horikoshi, T. Kanehira, M. Shinohara, A. Bertaccini, M.T. Cousin, C. Hiruki & S. Namba, 1999.
'Candidatus Phytoplasma japonicum', a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49:1275-1285.
- Schneider, B., U. Ahrens, B.C. Kirkpatrick & E. Seemuller, 1993.
Classification of plant-aphogenic mycoplasma-like organism using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology*, 139:519-527.
- Tsai, J.H., 1979.
Vector transmission of mycoplasmal agents of plant diseases. *The Mycoplasmas*, 3:265-307.
- Vibio, M., A. Bertaccini, I.M. Lee, R.E. Davis & M.F. Clark, 1996.
Differentiation and classification of aster yellows and related European phytoplasmas. *Phytopathol. Mediterr.*, 35:33-42.
- Welvaert, W., G. Sakyn & A. Lagasse, 1975.
Recherches sur les symptomes de la virescence chez l'*Hydrangea macrophylla* Thumb. *Phytopathol Z*, 83:152-158.

Bijlage I.

Enquête

Vraag 1.

In welke gemeente staat uw bedrijf?

--

Vraag 2.

Hoe groot is uw bedrijf?

--

ha.

Vraag 3.

Welke plantdatum (warm zetten) heeft u gehanteerd?

--

De eerste planten zijn op de kas in gegaan

Vraag 4.

Was u voor het lezen van deze vragenlijst al bekend met het probleem van vegetatieve doorgroei/fytoplasma in Hortensia?

- Ja, ik heb er wel eens van deze problematiek gehoord
- Nee, deze problematiek was mij onbekend

Vraag 5.

Hebt u op uw bedrijf al eens te maken gehad met vegetatieve doorgroei/fytoplasma's?

- Ja, ik heb zelf te maken (gehad) met dergelijke aantasting en kende de oorzaak (ga verder bij vraag 6)
- Ja, ik herken de omschreven aantasting en heb dit op mijn bedrijf ook al eens gezien (ga verder bij vraag 6)
- Nee, deze problemen heb ik op mijn bedrijf nog nooit gezien (vul alleen vraag 7 in en dan bent u klaar)

Vraag 6.

In welke teeltjaren heeft u te maken gehad met vegetatieve doorgroei/fytoplasma's?

- Dit teeltjaar
- In 2008
- In 2007
- In 2006
- In 2005
- Al voor 2005

Vraag 9.

Wanneer hebt u de eerste besmette planten aangetroffen?

Dat was (ongeveer) op

Vraag 10.

Als er meerdere besmette planten gevonden worden, hoe staan deze dan ten opzichte van elkaar?

Binnen een partij vind ik altijd besmette planten in groepjes bij elkaar

Binnen een partij vind ik losse planten die willekeurig ten opzichte van elkaar staan

Anders, namelijk.....

Vraag 11.

Wat doet u over het algemeen met de aangetaste planten?

Direct verwijderen na het scouten

Laten staan tot het einde van de teelt en dan weggooien

Wekelijks verwijderen

Maandelijks verwijderen

Hieronder heeft u ruimte voor aanvullende opmerkingen of suggesties

Anonimiteit (optioneel)

U kunt de enquête anoniem invullen, maar mocht u er geen bezwaar tegen hebben om uw naam en adres achter te laten, dan kan dat hieronder. Uiteraard zullen alle gegevens uit deze enquête geheel vertrouwelijke behandeld worden.

Naam bedrijf:

Adres:

Plaats:

Bijlage II.

DNA sequentie 16S rRNA

Sequentie variant 1a

CGGAAGTTTAAGCAATTAACCTTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAAGCAATCTGCCCTAAGACGAGGATAACAGTTG
 GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAGGGCATCTTCTTGTTTTAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGG
 AGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCC
 ACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAG
 CAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTCGGTACGTAAGTTCCTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACG
 GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGG
 GCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCT
 AGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCATGTGTAGTGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCCGC
 TTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
 GATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAA
 ACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCT
 TGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGC
 TGAGATGTTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACT
 GCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGG
 CTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGA
 CTTTATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGTGTGACACACCGCCCGTC
 AAACCACGAAAGTTGGTAATACCCAAAGCCGGTGGCCTAACTTCGCAAGAAGAGGGAACCGTCTAAGGTAGGGTCGATGATT
 GGGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACCGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAACAATTATCATCTTCAGTTT
 TGAGAGACTTAAGAAAGTTTTTCATTGTAACCTTGCTTGCAAATTTGATTTGCAACATTTAATCTTTTTAAGATTAAGGGCTATA
 GCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCCTGATAAGCGTGAGGTCGGTGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCATAACCACAAATAGG
 CAAAATCTTAAAAAGCTCTTTGAAAAGTAGATAAACGAAGGT

Sequentie variant 1b

CGGAAGTTTAAGCAATTAACCTTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAAGCAATCTGCCCTAAGACGAGGATAACAGTTG
 GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAGGGCATCTTCTTGTTTTAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGG
 AGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCC
 ACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAG
 CAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTCGGTACGTAAGTTCCTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACG
 GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGG
 GCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCT
 AGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTCATGTGTAGTGGTAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCCGC
 TTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC
 GATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAA
 ACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCT
 TGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGC
 TGAGATGTTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACT
 GCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGG
 CTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGA
 CTTTATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGTGTGACACACCGCCCGTC
 AAACCACGAAAGTTGGCAATACCCAAAGCCGGTGGCCTAACTTCGCAAGAAGAGGGAACCGTCTAAGGTAGGGTCGATGATT
 GGGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACCGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAACAATTATCATCTTCAGT
 TTTGAGAGACTTAAGAAAGTTTTTCATTGTAACCTTGCTTGCAAATTTGATTTGCAACATTTAATCTTTTTAAGATTAAGGGCTA
 TAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCCTGATAAGCGTGAGGTCGGTGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCATAACCACAAATAG
 GCAAAATCTTAAAAAGCTCTTTGAAAAGTAGATAAACGAAGGT

