Bestrijding van fytoplasma's en kroeskoppen in rozen.

Eindrapportage 2006-2009

Auteurs:
A.P. Smits M.Sc., Dr. Ir. MJD de Kock, Ing. H. Meijer, Ing. KTK Pham

Praktijkonderzoek Plant en Omgeving,
Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit
PPO-projectnummer 32 360147 00

Lisse, juni 2010

© 2010 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)
Alle intellectuele eigendomsrechten en auteursrechten op de inhoud van dit document behoren uitsluitend toe aan de Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO). Elke openbaarmaking, reproductie, verspreiding en/of ongeoorloofd gebruik van de informatie beschreven in dit document is niet toegestaan zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.
Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving / Plant Research International, Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit.

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

Dit onderzoek is gefinancierd door het Productschap Tuinbouw



Postbus 280
2700 AG Zoetermeer

Louis Pasteurlaan 6
2719 EE Zoetermeer

Tel.: 079 3470707
Fax: 079 3470404

Email: info@tuinbouw.nl

PPO-Projectnummer 32 360147 00
PT-nummer 12452

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit
Adres : Prof. Van Slogterenweg 2
: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 - 46 21 21
Fax : 0252 - 46 21 00
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING 5

1 INLEIDING 7
1.1 Doelstelling 8

2 MATERIAAL EN METHODE 11
2.1 Het onderbouwen van de relatie tussen fytoplasma's en kroeskop. 11
2.1.1 Determinatie van fytoplasma 11
2.1.2 Overdracht fytoplasma's via cicaden 11
2.1.3 Overdracht fytoplasma's via oculeren 12
2.2 Verspreiding van het fytoplasma 12
2.3 Verbetering van de detectiemethode 13
2.3.1 DNA extractie en PCR-analyse 13
2.3.2 Microscopie 13
2.4 Ontwikkeling beheersstrategie voor fytoplasma's 14
2.4.1 Elimineren van fytoplasma's in rozenzaad 14
2.4.2 Ontsmetting rozenzaailingen en oculatiehout door warmwaterbehandeling 15
2.4.3 Ontsmetten van oculatiehout met Tetracycline 16
2.5 Bestrijding van de overdracht van fytoplasma's 16
2.6 Verbreding van onderzoek 17
2.6.1 Ziekteverwekkers anders dan fytoplasma 17
2.6.2 Bodemgebonden ziekteverwekkers 17
2.6.3 Resistentie en herkomstonderzoek 17

3 RESULTATEN 19
3.1 Het onderbouwen van de relatie tussen fytoplasma's en kroeskop. 19
3.1.1 Determinatie van fytoplasma 19
3.1.2 Overdracht fytoplasma's via cicaden 20
3.1.3 Overdracht fytoplasma's via oculeren 23
3.2 Verspreiding van het fytoplasma 23
3.3 Verbetering van de detectiemethode 28
3.3.1 DNA extractie en PCR-analyse 28
3.3.2 Microscopie 30
3.4 Ontwikkeling beheersstrategie voor fytoplasma's 31
3.4.1 Elimineren van fytoplasma's in rozenzaad 31
3.4.2 Ontsmetting rozenzaailingen en oculatiehout door warmwaterbehandeling 32
3.4.3 Ontsmetten van oculatiehout met Tetracycline 33
3.5 Bestrijding van de overdracht van fytoplasma's 33
3.6 Verbreding van onderzoek 33
3.6.1 Andere ziekteverwekkers dan fytoplasma 33
3.6.2 Bodemgebonden ziekteverwekkers 35
3.6.3 Resistentie en herkomstonderzoek 37

4 OVERZICHT ONDERZOEK 41
4.1 Onderzoek voor 2001 41
4.2 Onderzoek naar Kroeskop door PPO 2001 tot 2005 42
4.3 Onderzoek naar Fytoplasma's door PPO 42
4.4 Onderzoek buiten Nederland 43
4.4.1 Termen voor kroeskop 43
4.4.2 Fytoplasma's 43
4.4.3 Rose Spring Dwarf associated Virus 44

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

4.4.4 Rose Rosette Disease 44

5 DISCUSSIE 47
5.1 Conclusies en aanbevelingen 48

6 KENNISOVERDRACHT 49

7 VERKLARENDE WOORDENLIJST 51

8 LITERATUUR 53

BIJLAGE: DNA-SEQUENTIE VAN FYTOPLASMA IN ROOS 57

BIJLAGE: DETECTIEPROTOCOL 59

BIJLAGE: SEQUENTIES VAN GEBRUIKTE PRIMERS IN PROJECT 61

BIJLAGE: STAMBOOM MET KROESKOP-GEVOELIGE RASSEN. 63

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Samenvatting

Kroeskop is een al lang bekend verschijnsel in de rozenteelt waarbij geoculeerde rozen na ontspruiten van de oculatie dwerggroei en heksenbezemachtige groeiproblemen vertonen en een groot deel van de aangetaste planten sterft. Het pathogeen dat de aantasting veroorzaakt is een mysterie.
Nieuwe detectietechnieken zoals de PCR-methode, DNA-sequentieanalyse en elektronmicroscopie hebben de laatste jaren een voor de wetenschap relatief nieuw organisme onthuld: het fytoplasma. Het fytoplasma is een celwandloze bacterie die in verband gebracht wordt met vele tot destijds onverklaarbare ziekten met vergelijkbare symptomen als kroeskop.

Vanaf 2004 heeft PPO onderzoek uitgevoerd naar fytoplasma's in rozen als mogelijke oorzaak van kroeskop. Hierbij werden al snel fytoplasma's gevonden en gedetermineerd als een Aster Yellows fytoplasma. Aster Yellows is een groep van fytoplasma's die bekend staan dat ze bij gewassen als aster en peen kroeskopachtige verschijnselen veroorzaken. Hoewel de fytoplasma's als waarschijnlijke veroorzakers van kroeskoppen werden gezien, was het ultieme bewijs daarvoor nog niet geleverd. Binnen dit project is gekeken of de relatie tussen zieke planten en fytoplasma's beter in beeld kon worden gebracht door te kijken naar: hoe de detectie van fytoplasma's kan worden verbeterd, hoe de overdracht van fytoplasma's plaatsvindt, hoe verspreid fytoplasma's voorkomen in de Nederlandse rozenteelt, en wat de mogelijkheden zijn van bestrijding.

Bij de uitgevoerde tests werden fytoplasma's niet alleen gevonden bij rozen met kroeskop maar ook bij gezond ogende planten, hoewel met een lagere frequentie. Tijdens het verloop van het project zijn positieve reacties voor de aanwezigheid van fytoplasma's gevonden in vrijwel alle teelten van roos inclusief zaadgaarden, zaad, struikrozen, klimrozen, stamrozen en een potroos uit stek. Fytoplasma's van de Aster Yellows groep werden ook in rozen uit Engeland, Polen en Italië gevonden, de kans dat dit de handel in de weg zou staan is dus klein.

Cicaden staan bekend fytoplasma's over te kunnen dragen van de ene plant op de andere. Proeven met overdracht en tests op de aanwezigheid van fytoplasma's in rozencicaden (*Edwardsiana rosae*) gaven geen eenduidig resultaat. Kroeskopverschijnselen konden niet worden overgebracht van zieke op gezond ogende rozen.

In 2007 werd het steeds lastiger fytoplasma's aan te tonen in ziek dan wel gezond ogend plantmateriaal. Gevolgde testmethode, tijdstip van monsterverzameling en plantonderdeel dat werd bemonsterd maakten geen verschil. Ook met methoden die bij fytoplasma-onderzoek in andere gewassen als peer en bij internationaal onderzoek wel resultaat gaven, leverden niets op. Andere onderzochte ziekteverwekkers als de bacteriën die bekend staan net als fytoplasma's hormoonspiegels van de plant te kunnen manipuleren: *Agrobacterium tumefaciens, Candidatus liberibacter, Rhodococcus fascians* zijn niet gevonden. Ook vruchtwisseling, bodemgebruik en bodemgebonden ziekten als aaltjes toonden geen relatie met kroeskop.

Het feit dat er geen fytoplasma's konden worden aangetoond kan het volgende betekenen:
- De fytoplasma's die de kroeskopsymptomen veroorzaakten waren aanwezig maar zijn op het moment van monstername verdwenen, ondanks dat blijven de fysiologische kenmerken van kroeskop in de plant gehandhaafd;
- De kroeskopsymptomen in roos hebben een andere dan wel meerdere oorzaken dan alleen de eerder aangetoonde fytoplasma's.

Het effect van plantbehandelingen om fytoplasma's te bestrijden kon niet worden bevestigd, omdat fytoplasma's dan wel kroeskopvorming bij zowel behandeld als onbehandeld niet meer werden gevonden,.

Verbreding van onderzoek naar andere ziekteverwekkers toonde voor het eerst in Nederland het virus Rose Spring Dwarf associated Virus (RSDaV) aan in rozen met kroeskop. Het aantal planten dat dit vertoonde was echter te laag om kroeskop te kunnen verklaren.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Zowel fytoplasma's als RSDaV komen dus in de rozenteelt voor; dit kan echter niet het fenomeen kroeskop verklaren. Mogelijk kunnen deze micro-organismen zich makkelijker vestigen in rozen die door een andere of combinatie van factoren zijn verzwakt en kroeskopsymptomen tonen.

Literatuuronderzoek naar herkomst van rassen en onderstam-cultivar combinaties gaf aan dat er wel mogelijkheden voor kwekers bestaan om het risico voor kroeskop te verminderen. Zo is uit eerder onderzoek bekend dat oculeren van gevoelige cultivars op een onderstam van *R. canina* ' Schmid's Ideal' tot minder vorming van kroeskop leidt in vergelijking tot de standaard gebruikte 'Laxa'-onderstam. Mogelijk biedt het stamboomonderzoek naar kroeskopgevoelige cultivars tevens een basis voor veredelaars om meer te gaan werken met kroeskopongevoelige rassen.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

1 Inleiding

In de teelt van struikrozen doet zich vanaf 1954 met regelmaat het verschijnsel “kroeskoppen” voor. Kroeskoppen zijn misvormde groeischeuten met misvormde bladeren, die ontstaan direct bij of direct na het uitlopen van de oculaties (Bos, 1975). Vervolgens sterft een groot deel van de planten met kroeskopverschijnselen, een klein deel van de planten kan hier ook doorheen groeien echter met serieuze groeiachterstand.

Schade door kroeskop is gerapporteerd in verschillende landen, waaronder Frankrijk, Engeland, Polen, Australië en Noord-Amerika. In Nederland is de schade over de jaren heen sterk verschillend. Zowel in het voorjaar van 2000, als in het voorjaar van 2002 was de geschatte schade tussen de drie en vijf miljoen dode of onvoldoende groeiende planten (Meijer, 2005). Ook in 2009 is bij veel kwekers een deel van de teelt door aantasting met kroeskop uitgevallen.



Figuur 1: Enkele voorbeelden van rozen met kroeskop.

In 1965 werden voor het eerst kroeskopproblemen in de rozenteelt door de Plantenziektekundige Dienst beschreven bij het ras ‘Alain’. Vervolgens werd de ziekte bekend onder de naam ‘Alains disease’. Sinds die tijd doet de internationale rozensector verwoede pogingen om het probleem met deze groeistoornis te doorgronden. Ook in het praktijkonderzoek is er in het verleden regelmatig aan gewerkt. PPO is sinds 2001 weer betrokken bij onderzoek naar kroeskopverschijnselen in roos. Na een inventarisatie in 2001 en 2002 is van januari 2004 tot september 2005 onderzoek gedaan naar de oorzaak van “kroeskoppen“. In eerste instantie zijn proeven uitgevoerd met chemische- en mechanische middelen om kroeskop te forceren, met

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

het doel beter inzicht in het probleem te krijgen. In verschillende gesprekken met onderzoekers en uit literatuuronderzoek bleek dat bij een aantal ziekteverschijnselen bij planten, die tot voor kort niet konden worden opgelost, fytoplasma's (zie voor verklarende woordenlijst: hoofdstuk 7) betrokken waren.

Materiaal van aangetaste rozen is vanaf 2004 getoetst op de aanwezigheid van fytoplasma's. Een probleem hierbij was dat er nog weinig informatie bekend was over het toetsen van houtige gewassen op aanwezigheid van fytoplasma's en dat niet bekend was naar welk soort gezocht moest worden. In juni 2004 werden de eerste fytoplasma's in rozen aangetoond. De resultaten werden echter maar ten dele bevestigd in een herhaling. De gevonden fytoplasma's zijn vervolgens gedetermineerd als Aster Yellows. Aster Yellows is een groep van fytoplasma's die bekend staat de hormoonbalans van een reeks van planten waaronder aster, peen, tomaat, etc. te kunnen verstoren met als resultaat dat de plant vele groeischeuten maakt die niet volkomen uitgroeien. Het gevolg is de vorming van heksenbezems en dwerggroeivormen die zeer sterk overeenkomen met het beeld van kroeskopvorming in roos.

Hoewel de fytoplasma's als waarschijnlijke veroorzakers van kroeskoppen werden gezien, is het ultieme bewijs daarvoor nog niet geleverd. Binnen dit project is gekeken of de relatie tussen zieke planten en fytoplasma's beter in beeld kon worden gebracht, hoe de overdracht van fytoplasma's plaatsvindt en naar de mogelijkheden van bestrijding.

Na verduidelijking van de doelstelling in dit hoofdstuk wordt in hoofdstuk 2 de gevolgde methoden en gebruikte materiaal behandeld. In hoofdstuk 3 worden de resultaten weergegeven. Na bespreking van de resultaten met de cultuurgroep rozen is besloten een beschrijving aan dit rapport toe te voegen met een overzicht van aan dit onderwerp gerelateerd en voor dit project gevolgd onderzoek in binnen- en buitenland, dit wordt behandeld in hoofdstuk 4. Een discussie en de conclusies en aanbevelingen van dit onderzoek worden behandeld in hoofdstuk 5. In hoofdstuk 6 staat een opsomming van de activiteiten die hebben plaatsgevonden in verband met kennisoverdracht richting de rozensector. In hoofdstuk 7 is een verklarende woordenlijst opgenomen.

1.1 Doelstelling

Dit project heeft zich gericht op de volgende aspecten van kroeskop in roos:

A. Het onderbouwen van de relatie tussen fytoplasma's en kroeskop.
Voor de analyse is het noodzakelijk dat onomstotelijk vast komt te staan dat kroeskopziekte veroorzaakt wordt door fytoplasma's. Met gebruikmaking van in Nederland voorkomende potentiële vectoren (cicaden) is getracht deze fytoplasma's van zieke planten over te dragen op gezonde toetsplanten en fytoplasma-vrij gemaakte rozen. Symptoomontwikkeling in deze planten is het definitieve bewijs voor overdracht van fytoplasma's door die vector.

B. Verspreiding van het fytoplasma
Er is in het voorgaande project een begin gemaakt met de analyse van de verbreiding van fytoplasma's in de Nederlandse rozenteelt. Een compleet beeld over het voorkomen in diverse typen plantmateriaal, regio's en vector(en) is noodzakelijk om verspreiding te kunnen voorkomen of te beperken.

C. Verbetering van de detectiemethode
Er is een relatief kostbare analysemethode (PCR-methode) beschikbaar. Bij toetsing uitgevoerd in het voorgaande project werd bij het begin van het groeiseizoen het risico op een vals negatieve uitslag geschat op vijftig procent. Voor het verdere onderzoek en voor toekomstige vragen is getracht de betrouwbaarheid van het toetsprotocol (toetsmethode, toetsmoment en type materiaal) te verbeteren.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

D. Ontwikkeling beheersstrategie voor fytoplasma's
Door het combineren van kennis uit de literatuur met de kennis uit het verleden over de invloed van stressfactoren is getracht een technieken te vinden voor het elimineren of het sterk terugdringen van fytoplasma's in planten dan wel van de hormonale effecten van deze fytoplasma's.

E. Bestrijding van de overdracht van fytoplasma's
Het bepalen van de mogelijkheden van bestrijdingsmethode voor de vector(en) van fytoplasma's in de Nederlandse rozenteelt en van andere wijze(n) om infecties van plantmateriaal (vooral uitgangsmateriaal) te voorkomen.

F. Verbreding van onderzoek
In de loop van het project is het steeds lastiger geworden fytoplasma's aan te tonen en de relatie met kroeskop te bevestigen. Hierdoor is naast fytoplasma's gezocht naar andere micro-organismen die een verklaring kunnen geven voor het fenomeen kroeskop.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

2 Materiaal en Methode

2.1 Het onderbouwen van de relatie tussen fytoplasma's en kroeskop.

Tot voor kort werden plantenziekten internationaal bekend als 'Yellows disease', toegeschreven aan een virusinfectie. De reden hiervoor is dat de ziekteveroorzaker van 'Yellows disease' bepaalde karakteristieken heeft die overeenkomen met virussen. Zo bleek het niet mogelijk de ziekteverwekker op een voedingsbodem te kweken zoals wel mogelijk is bij de meeste schimmels en bacteriën. Verder was het niet mogelijk duidelijke organismen op geïnfecteerde planten waar te nemen ,hoewel de plant karakteristieke symptomen vertoonde. Vervolgens zijn door onderzoekers in Japan in 1967 met het gebruik van een elektronenmicroscoop organismen zonder celwand gevonden in planten met yellows disease symptomen. Deze nieuwe klasse van ziekteverwekkers in planten werden 'mycoplasma-like organism (MLO)' genoemd, vanwege de gelijkenis met mycoplasma's die bekend staan ziekte bij mensen en dieren te kunnen veroorzaken. In 1994 werd door de karakterisering van het organisme dat in verband werd gebracht met yellows disease duidelijk dat men hier te maken had met een uniek organisme dat een eigen naam zou moeten krijgen. De naam die werd gekozen voor deze taxonomische groep was *Candidatus* Phytoplasma (Welliver, 1999) in het Nederlands: fytoplasma. De laatste jaren zijn berichten over gewassen met een fytoplasma in toenemende mate in het nieuws, vooral in houtige gewassen (Van Doorn, 2006). Vandaag de dag zijn er zelfs honderden plantenziekten die in verband zijn gebracht met fytoplasma's (Weintraub, 2010). Door de gelijkenis tussen de ziekteverschijnselen van planten met 'Yellows disease' en kroeskoppen is onderzoek gestart om te zien of hier inderdaad een verband bestaat.

2.1.1 Determinatie van fytoplasma

De ribosomale DNA-sequentieverschillen tussen de nu te onderscheiden fytoplasmasoorten of groepen zijn zeer klein (minder dan drie procent), toch worden hiermee veertien groepen onderscheiden (Lee, 2000). In het voorgaande project in 2004 is door PPO materiaal van aangetaste rozen getoetst op de aanwezigheid van fytoplasma's. Een probleem hierbij was dat er nog weinig informatie bekend was over het toetsen van houtige gewassen op aanwezigheid van fytoplasma's en dat niet bekend was naar welk soort gezocht moest worden. In juni 2004 werden de eerste fytoplasma's in rozen aangetoond. De resultaten werden echter maar ten dele bevestigd in een herhalingsexperiment. Van de gevonden fytoplasma's is vervolgens van twee bronnen een stukje DNA gesequenced en gedetermineerd.

2.1.2 Overdracht fytoplasma's via cicaden

Fytoplasma's verspreiden zich op vergelijkbare wijze als virussen via zuigende insecten, meestal cicaden. Vermeerdering van fytoplasma's kan ook plaatsvinden in deze vectoren (Welliver, 1999). Uit literatuur is duidelijk geworden dat de groep van fytoplasma's die is gevonden voor zover bekend alleen wordt overgedragen door cicaden (Familie: Cicadellidae).

Om inzicht te krijgen in het belang van cicaden in de overdracht van fytoplasma's is een kweek opgezet van op rozen gevangen cicaden. De vectoren zijn in een insectendichte kooi geplaatst op zieke planten en vervolgens op gezonde (met warmwater-techniek fytoplasmavrij gemaakte-) toetsplanten overgezet. Een succesvolle overdracht van fytoplasma's van zieke planten op de toetsplanten met kroeskopvorming tot gevolg zou het bewijs zijn dat kroeskoppen worden veroorzaakt door fytoplasma's in de rozenteelt en een invalshoek geven voor beheersing van dit probleem.

Op twee manieren is getracht de overdracht van fytoplasma's met de cicaden als vector te onderzoeken. De eerste methode is het plaatsen van cicaden op een roos met kroeskop symptomen en vervolgens een aantal onderstammen in de insectenkooi te plaatsen. De periode die hierbij overbrugd werd is 6 weken dit is namelijk in de literatuur aangegeven als de incubatietijd die nodig is voordat een met fytoplasma's geïnfecteerde cicade nieuwe planten kan infecteren. De tweede wijze is het uitzetten van cicaden op

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

fytoplasma-vrij gemaakte onderstammen en hier direct een roos met kroeskopsymptomen bij te plaatsen. Hierbij wordt dus geen rekening gehouden met de incubatietijd en kan niet worden gecontroleerd of cicaden zowel de kroeskopplant als de gezonde planten hebben geprikt. Vervolgens zijn de onderstammen geoculeerd met een voor kroeskopgevoelige variëteit (var. New Dawn). Om het risico van het mislukken van een kweek te verkleinen is de proef op vier locaties herhaald nl. in Randwijk onder afdak beschermd tegen de elementen, tevens in Randwijk maar dan op het containerveld, op het containerveld van Lisse en een containerveld in Naaldwijk.



Figuur 2: Cicade-kweek op zaailingen en roos met kroeskopsymptomen voor overdrachtsproeven.

Een deel van de cicaden gevangen op kwekerijen waar ook kroeskopplanten zijn waargenomen is getoetst op de aanwezigheid van fytoplasma's. Na een DNA isolatie (volgens de Kingfischer methode) is met Nested-PCR met twee primerparen de aanwezigheid van fytoplasma's getest. Nested-PCR werd toegepast, eerst met primerpaar P1/P7 dan nested-PCR met Fu5/Ru3 en NPAF/NPAR (zie bijlage Sequentie van primers).

Als controle werd ook een PCR op COI (Cytochrome Oxydase subunit 1) van cicaden toegepast. Hiermee werd gecontroleerd of het DNA van voldoende kwaliteit was en werd gelijk gecontroleerd of men hier inderdaad met cicaden te maken had.

2.1.3 Overdracht fytoplasma's via oculeren

Tevens zijn onderstammen, die zijn behandeld met een warmwaterbehandeling tegen fytoplasma's, geoculeerd met oculatiehout waarvan bekend is dat ze waarschijnlijk fytoplasma's bevatten. De vorming van kroeskop na het uitlopen van de ogen zou na testen kunnen aantonen dat fytoplasma's dit kunnen veroorzaken.
Voor de overdracht via entmateriaal zijn 36 onderstammen (als zaad via de warmwaterbehandeling fytoplasma-vrij opgekweekt, zie paragraaf 2.4) 15 juli 2009 geoculeerd met mogelijk geïnfecteerd oculatiehout. Het oculatiehout is verzameld van 11 rozenstruiken die eerder in 2009 met kroeskopsymptomen zijn verzameld, maar hier doorheen zijn gegroeid.

2.2 Verspreiding van het fytoplasma

Er is op systematische wijze plantmateriaal verzameld van een verscheidenheid aan kwekers, regio's en teelten zowel met als zonder kroeskopverschijnselen . Dit is geanalyseerd op de aanwezigheid van fytoplasma's.
De gebruikte methode om rozen te testen op de aanwezigheid van fytoplasma's was echter nog niet uitontwikkeld. Vanaf 2005 is alle aandacht gericht op het verbeteren van de toetsmethode (paragraag 2.3) en het bemonsteren van plantmateriaal van diverse herkomsten om een beeld te krijgen van de verspreiding van fytoplasma's. Naast aangetaste oculaties werd gezocht naar plantmateriaal van meerdere jaren oud, zoals rozen van rosaria en materiaal van bottelhagen. Als laatste belangrijk onderdeel is veel

uitgangsmateriaal getoetst, waaronder zaailingen en oculatiehout. Planten met kroeskopverschijnselen zijn verzameld en opgepot om de ontwikkeling van zowel de kroeskopverschijnselen als de aanwezigheid van fytoplasma's in de tijd te volgen. De verzamelde gegevens zijn van belang voor het ontwikkelen van een complete beheersstrategie.

2.3 Verbetering van de detectiemethode

2.3.1 DNA extractie en PCR-analyse

Verschillende bekende DNA-zuiveringstechnieken zijn getest om de meest betrouwbare en eenvoudige toetsmethode te kunnen kiezen. De PCR-toetsmethode is tevens geschikt gemaakt voor de analyse van vectoren (cicaden).

Er is veel aandacht besteed aan de volgende punten:
1. Verscheidene typen materiaal (wortels, bast, scheuten) werden onderzocht op verschillende toetsmomenten (voorjaar, zomer, najaar). Daarnaast is getest of de ontwikkeling van fytoplasma's kon worden bevorderd door kroeskopplanten in de winter en voorjaar te plaatsen van in een kas.
2. Verschillende DNA isolatietechnieken werden vergeleken. Hiervoor werd gebruik gemaakt van de commerciële zuiveringskits, van eenvoudige PureGene genomic DNA purification kit (Gentra Systems) tot iets meer bewerkelijke methode van DNeasy Plant mini kit (Qiagen). Het isoleren van DNA geschiedt volgens standaard protocollen geleverd door de producenten.
Een aanpassing is ook toegepast om de trefkans van fytoplasma te verhogen: meer materiaal, meer lysisbuffer (M.J. Green, 1999). In 2009 is nog een nieuwe strategie toegepast: het gebruik van de AGOWA magnetic Plant DNA isolation kit in het Kingfisher systeem.
3. Verschillende DNA concentraties werden toegepast door verdunningen (tot 1:40) te gebruiken. Dit is om te voorkomen dat mogelijk remmende factoren invloed op PCR reacties konden hebben. Deze verdunningen zijn getest met drie verschillende primercombinaties, 5 verschillende PCR programma's en bast-, blad- en scheutmateriaal. De DNA opbrengst is zo nodig gecontroleerd door een kleine hoeveelheid (5ul) op agarose gel te brengen en zichtbaar maken met UV-licht.
4. Verschillende PCR primers combinaties werden gebruikt. In de literatuur werden verschillende universele fytoplasma primers beschreven en gebruikt. Bij het aantonen van de mogelijke aanwezigheid van fytoplasma in roos zijn volgende primers combinaties gebruikt: P1/P7 (Schneider, 1995), R16F1/R0 (Lee, 1995), R16F2n/R2 (Lee, 1995), fU5/rU3 (Lorenz, 1995) en NPA2F/R (Heinrich , 2001). Ook nested PCR werden (bijna) altijd toegepast vanwege lage concentratie van fytoplasma in plant materiaal. Alle PCR's werden uitgevoerd volgens standaard procedures met PCR Mastermix (Promega, Madison, USA). De primers zijn gemaakt door Biolegio in Nijmegen.
5. Toepassing van intern PCR controle. Er is een PCR toets ontwikkeld die zich richt op het DNA van de roos zelf. Deze PCR dient als positieve controle op de kwaliteit van het DNA na het uitvoeren van behandelingen die nodig zijn voor de PCR-methode. Er is ook een PCR toets ontwikkeld die richt op het DNA van de cicaden (de meest waarschijnlijke overbrenger van het fytoplasma). Deze PCR dient ook als controle op het DNA. Als het DNA van voldoende kwaliteit is geeft de PCR een positief resultaat.

2.3.2 Microscopie

Als gevolg van wisselende resultaten met het aantonen van fytoplasma's via de PCR methode is gezocht naar andere methoden om de aanwezigheid van fytoplasma's maar mogelijk ook andere micro-organismen die kroeskop kunnen verklaren, in symptoomplanten te achterhalen. In 2008 zijn kroeskopscheutjes van een plant met duidelijke kroeskopsymptomen mat DAPI gekleurd om fytoplasma's onder de microscoop visueel waar te kunnen nemen. Als positieve controle werd een gladiool met fytoplasma symptomen gebruikt.

DAPI en fytoplasma's
DAPI is de afkorting van 4',6-diamidino-2-phenylindole, is een fluorescerende kleurstof die vooral aan chromatine (het complex van DNA en eiwitten in de celkern) vastbindt. DAPI zendt een cyaanblauw licht uit, dus wanneer genoeg DAPI aan chromatine gebonden is wordt, in een celcultuur, het chromatine zichtbaar als blauw lichtgevende slierten. Vanwege deze eigenschap wordt er in de fluorescentiemicroscopie veel gebruikgemaakt van DAPI.
Bestudering van fytoplasma's in het laboratorium wordt sterk bemoeilijkt doordat deze niet in-vitro kweekbaar zijn buiten de plant. 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 DAPI zijn fytoplasma's goed zichtbaar te maken met behulp van fluorescentiemicroscopie (Hollinger 1984). Fytoplasma's lichten dan blauw-wit op.

In juli 2009 is van 7 planten materiaal verzameld en met behulp van electronenmicroscopie geanalyseerd op de aanwezigheid van micro-organismen in het plantmateriaal.

Elektronenmicroscopie
Dit is een techniek die gebruik maakt van elektronen om het oppervlak of de inhoud van objecten af te beelden. Doordat versnelde elektronen een veel kleinere golflengte hebben dan fotonen kan de resolutie van een elektronenmicroscoop veel hoger zijn (beter dan 0,1 nm) dan die van een lichtmicroscoop (ongeveer 0,2 µm). Daarnaast hebben elektronen een andere wisselwerking met de materie zodat er een ander contrast verkregen kan worden. Bij lichtmicroscopie wordt de resolutie beperkt door de golflengte van het licht, bij elektronenmicroscopen wordt de resolutie beperkt door de afwijkingen van de optiek. Via deze techniek kunnen een reeks aan bacteriën en virussen zichtbaar worden gemaakt die niet via andere microscopie zichtbaar worden.

2.4 Ontwikkeling beheersstrategie voor fytoplasma's

Nadat de oorzaak van kroeskop is aangetoond dient ook een oplossing te worden gevonden om kroeskop te beheersen. Voor het bestrijden van kroeskopsymptomen in ziek of geïnfecteerd plantmateriaal is een aantal methoden onderzocht waarbij fytoplasma's kunnen worden gedood, of het effect van fytoplasma's kan worden onderdrukt. Deze methodes staan bekend om hun vermogen ook andere micro-organismen te kunnen doden (Hoof, 1978). Dus: indien fytoplasma's niet definitief als belangrijkste oorzaak van kroeskoppen kon worden aangetoond, kunnen deze methodes mogelijk helpen ook andere oorzaken te bestrijden en verspreiding te voorkomen.

In de meeste gevallen betekent bestrijding van fytoplasma-aantasting en –verspreiding in gewassen het bestrijden van de vector (de cicaden), dan wel voor fytoplasma's ongevoelige rassen te kweken (Weintraub, 2010). Om gewassen te 'genezen' van fytoplasma-aantastingen is echter 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- vergelingziekte. Ook zijn in het verleden antibiotica toegepast om de ziekteontwikkeling van dit bacterieachtige organisme te onderdrukken (Van Doorn, 2006).

In het eerste jaar is op basis van literatuurgegevens en inschattingen van de projectgroep gekozen voor vier verschillende methoden om de fytoplasma-concentratie terug te brengen in uitgangsmateriaal. Deze methoden zijn: warmwaterbehandeling van het rozenzaad voor stratificatie, warmwaterbehandeling van de onderstam, warmwaterbehandeling oculatiehout, Tetracycline behandeling (een antibioticum) van het oculatiehout.

2.4.1 Elimineren van fytoplasma's in rozenzaad

Uit diverse onderzoeken blijkt dat veel fytoplasma's gevoelig zijn voor hoge temperatuur. Toetsingsresultaten uit 2005 (zie tabel 3) gaven een sterke indicatie dat fytoplasma's via rozenzaad overgedragen kunnen worden, dit in tegenstelling tot de algemeen geldende gedachte dat overdracht van fytoplasma's niet via zaad plaatsvindt. Door zaadbehandeling is er getracht een fytoplasma-vrije teelt van onderstammen te maken om vervolgens de overdracht van fytoplasma's mee te testen (via cicaden en oculatiehout afkomstig van rozen met kroeskopsymptomen).

Om deze reden is in 2006 een partij zaad waarin naar verwachting fytoplasma's aanwezig waren behandeld met verschillende temperatuurtrajecten. In de literatuur komen zeer verschillende temperatuurregimes voor om plantmateriaal te behandelen tegen phytoplasma's. Volgens de literatuur sterven fytoplasma's af bij temperaturen boven de 40˚C (Tassart, 2003). De behandelingen toegepast in de beschikbare literatuur variëren echter van enkele maanden bij 30˚C tot behandelingen van 55˚C met onbekende duur.

Het zaad is vervolgens gestratificeerd en in het voorjaar van 2007 uitgezaaid. Er is vervolgens een strak spuitschema gehanteerd d.m.v. toetsen is getracht aan te tonen of deze planten inderdaad fytoplasma-vrij zijn gebleven.

Om in 2009 proeven te doen met behandeld zaad (dat na behandeling 11 maanden in stratificatie ligt) diende de behandeling van rozenzaad via een warmwaterbehandelingen uiterlijk in 2007 te worden uitgevoerd. In 2007 zijn de behandelingen aangepast in temperatuur en/of tijdsduur met dertien behandelingen, elk 80 gram rozenzaad. De zaailingen zijn vervolgens door een strak spuitschema in combinatie met afdekking van insectenvrij-gaas opgekweekt.

In 2009 zijn de zaailingen geoculeerd, deels met oculatiehout verzameld van door kroeskop heen gegroeide rozen, deels met een voor kroeskop gevoelig ras (New Dawn). Een deel van het enthout werd via een warmwaterbehandeling (1 uur 45°C) fytoplasma vrij gemaakt.

2.4.2 Ontsmetting rozenzaailingen en oculatiehout door warmwaterbehandeling

Binnen het project 'bestrijding kroeskoppen in roos' is gezocht naar methoden om plantmateriaal vrij te maken van fytoplasma's. Planten die vrij zijn van fytoplasma's zouden geen kroeskopziekte meer vertonen. Binnen de literatuur wordt een warmwaterbehandeling als belangrijkste methode gegeven om fytoplasma's in besmet plantmateriaal te doden. Exacte gegevens over temperatuur en behandelduur waren nog niet bekend, en verschillen per plantensoort. Gegevens uit eerdere proeven om aaltjes te bestrijden in rozenonderstammen dienden als basis voor dit experiment (Elberse, 2004). In een pilot waarbij 1 uur op 46 graden is behandeld werd de hergroei van onderstammen vastgesteld op ruim 70%. Hoewel dit regime voor de praktijk te veel schade zal geven moet in eerste instantie het grootste belang bij doden van fytoplasma's worden gelegd.

Van twee herkomsten zijn 600 onderstammen Rosa corymbifera 'Laxa' behandeld in warm water (46˚C, 1 uur). Nog eens 600 onderstammen zijn geplant zonder behandeling als controle.

5 mei 2008 werden 300 'Laxa' onderstammen van twee herkomsten (een kweker in Groningen en een kweker in Limburg), behandeld in een warmwaterbad (1 uur 46 ^{0}C). Op 6 en 7 mei zijn 600 onderstammen (300 met behandeling en 300 zonder warmwaterbehandeling als controle) door twee telers in de regio Lottum met een plantmachine uitgeplant in vier rijen. Op 4 juni werd een eerste beoordeling gedaan van de uitgroei. Van de met warmwater behandelde onderstammen groeide ongeveer 50-60% van de planten onvoldoende of niet uit.

Op 14 juli 2008 is vers geknipt oculatiehout opgehaald bij de twee kwekers waar de proef is neergelegd. Op 15 juli heeft een gedeelte van dit hout een warmwaterbehandeling gehad. Een deel heeft ook een behandeling met Tetracycline gekregen door het hout in een oplossing met dit antibiotica te zetten. Tetracycline staat bekend kroeskopverschijnselen tijdelijk te kunnen verminderen (zie paragraaf 3.4.3).

Behandelingen oculatiehout kweker 1.
1. R. 'Paul's Scarlet', controle
2. R. 'Paul's Scarlet', warmwaterbehandeling 1 u 45 ^{0}C
3. R. 'Paul's Scarlet', 8 u op een oplossing 0,1 g/l Tetracycline (zie paragraaf 2.4.3.)

Behandelingen oculatiehout kweker 2.
1. R. 'Paul's Scarlet', R. 'Bonica' en R. 'Duftzauber', controle
2. R. 'Paul's Scarlet', R. 'Bonica' en R. 'Duftzauber', warmwaterbehandeling 1 u 45 ^{0}C

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Op 16 juli is dit hout bij de telers gebracht en bij kweker 1 dezelfde dag geoculeerd. Bij kweker 2 is door omstandigheden pas later geoculeerd met onbehandeld oculatiehout van de variëteit 'Frau Karl Druschki', een voor zover bekend voor kroeskop ongevoelig ras.



Figuur 3: Warmwaterbehandeling van oculatiehout.

2.4.3 Ontsmetten van oculatiehout met Tetracycline

In de literatuur is naast de warmwaterbehandeling van geïnfecteerd plantmateriaal om fytoplasma's te doden ook op beperkte schaal ervaring met Tetracycline (een antibioticum) opgedaan. Uit literatuur blijkt dat Tetracycline het enige middel is dat planten die geïnfecteerd zijn met fytoplasma's door kan laten groeien (Nyland 1973; Davis, 1968). De Tetracycline moet dan rechtstreeks in de vaten worden gebracht. De werking van Tetracycline in het verdwijnen van kroeskopsymptomen is vaak van tijdelijke duur (McCoy, 1982) De Tetracycline stopt de eiwitsynthese van fytoplasma's maar doodt niet alle fytoplasma's (Weinstraub, 2010). In 2005 zijn reeds proeven uitgevoerd met het toedienen van Tetracycline bij rozen met kroeskopverschijnselen (zie paragraaf 4.2). Hoewel de resultaten hierbij niet hoopgevend waren zou de gevolgde behandeling van oculatiehout mogelijk een aantasting kunnen voorkomen.

Oculatiehout van een zeer kroeskopgevoelige ras is 8 uur in een oplossing van (0,1 g/l) Tetracycline geplaatst voor het oculeren. Deze proef is uitgevoerd op dezelfde locatie als de vorige beschreven in paragraaf 2.4.1., met het ras Paul's Scarlet.

2.5 Bestrijding van de overdracht van fytoplasma's

Om verspreiding van fytoplasma's te voorkomen was een plan gemaakt de vector bij een aantal praktijkpercelen te bestrijden. De aanwezigheid van de vector is gemonitord m.b.v. een zuigval in de periode mei t/m begin oktober. De aanwezigheid c.q. afname van de vectoren na de bespuiting zou worden gerelateerd aan het gewasbeschermingregime en het vinden van fytoplasma in het gewas en het al dan niet optreden van kroeskoppen.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

2.6 Verbreding van onderzoek

In 2009 is in overleg met de begeleidingscommissie besloten, naast de lopende veldproeven, de doelstelling uit te breiden met het analyseren van ziek materiaal niet alleen op de aanwezigheid van fytoplasma's maar ook andere micro-organismen die een dergelijk schadebeeld zouden kunnen verklaren. Dit is gedaan vanwege afwijkende resultaten in de loop van het onderzoek. Deze analyses werden tevens via de PCR- methode uitgevoerd met primerparen voor de verschillende micro-organismen die bekend staan kroeskopachtige schade bij planten te kunnen veroorzaken. De beschikbare planten toonden voor een deel geen kroeskopverschijnselen meer waardoor zeer de vraag is of de mogelijke ziekteverwekker van de eerdere symptomen nog in de plant aanwezig is. Daarom is in 2008 tevens besloten zo veel mogelijk nieuw ziek en ter controle gezond plantmateriaal van verschillende herkomsten te verzamelen en te testen op de reeks van ziekteverwekkers.

2.6.1 Ziekteverwekkers anders dan fytoplasma

Onderzoek in Amerika naar een ziekte in roos (RSDaV) gaf een vergelijkbaar schadebeeld als kroeskop (zie paragraaf 4.4.3.). Er zijn primers besteld om het zieke materiaal ook op de aanwezigheid van dit virus te onderzoeken. Eind 2008 is voor het eerst de zoektocht naar een ziekteverwekker verbreed met analyse van ziek plantmateriaal op de aanwezigheid van RNA van het: Rose Spring Dwarf associated Virus (RSDaV). Deze tests zijn verder uitgebreid in 2009.

Uit literatuur is bekend dat fytoplasma's cytokinine kunnen verhogen (Chung, 1998; Sun 2008). Verhoging van cytokinine stimuleert de groei van zijknoppen die normaliter onder invloed van apicale dominantie inactief blijven (Galton, 1997). De bacteriën: *Agrobacterium tumefaciens, Candidatus liberibacter, Rhodococcus fascians* (voorheen genaamd *Corynebacterium fascians*), staan bekend ' heksenbezems' in planten als tabak en bomen als berk te kunnen veroorzaken doordat ze net als fytoplasma's cytokinine synthetiseren (Murai, 1980; Teixeira, 2005). In 2009 is een aantal monsters afkomstig van planten die duidelijke kroeskopsymptomen lieten zien (en van een aantal controle planten zonder symptomen) via de PCR methode gecontroleerd op de aanwezigheid van deze bacteriën. De primerparen die zijn gebruikt voor de PCR-methode om de aanwezigheid van deze bacteriën te testen staan weergegeven in de bijlage.

2.6.2 Bodemgebonden ziekteverwekkers

Bos (1975) gaf al aan dat kroeskop mogelijk bodemgebonden zou kunnen zijn. Ook in 2009 is op de meeste percelen met kroeskop groepsvorming waargenomen dat doet denken aan bodemgebonden oorzaken. Hierop is bij de kwekers achterhaald wat de vruchtwisseling en bestrijdingsgeschiedenis van deze percelen is geweest.

Bos gaf aan geen relatie te kunnen vinden tijdens onderzoek naar *Trichodorus*-aaltjes we konden echter niet achterhalen hoe dit in 1975 is bepaald. Aangezien standaard controle op de aanwezigheid van aaltjes gebeurt door het steken van 40 grondmonsters per hectare en dit te analyseren is er voor gekozen dit pathogeen toch te onderzoeken maar dan door het steken van monsters tussen de wortels van rozen met kroeskopverschijnselen en dit te vergelijken met grondmonsters gestoken op hetzelfde perceel onder rozen van de dezelfde variëteit zonder kroeskopverschijnselen.

Deze monsters zijn geanalyseerd door de ervaringsdeskundige bij PPO (mevr. F.A. de Boer) door grove en fijne fractie op 9 soorten aaltjes te controleren. Aaltjes als *Trychodorus* sp. staan bekend virussen over te kunnen dragen (Bos, 1975).

2.6.3 Resistentie en herkomstonderzoek

Kroeskopproblemen worden al vanaf de eerste beschrijving (als Alain's disease) geassocieerd met bepaalde variëteiten van roos. Als verbreding van het onderzoek naar kroeskop buiten de relatie met fytoplasma's is gekeken naar de erfelijke verwantschap van kroeskopgevoelige rozen variëteiten. Daarnaast is gekeken naar wat bekend is over onderstam-oculatie combinaties in relatie tot gevoeligheid voor kroeskop.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

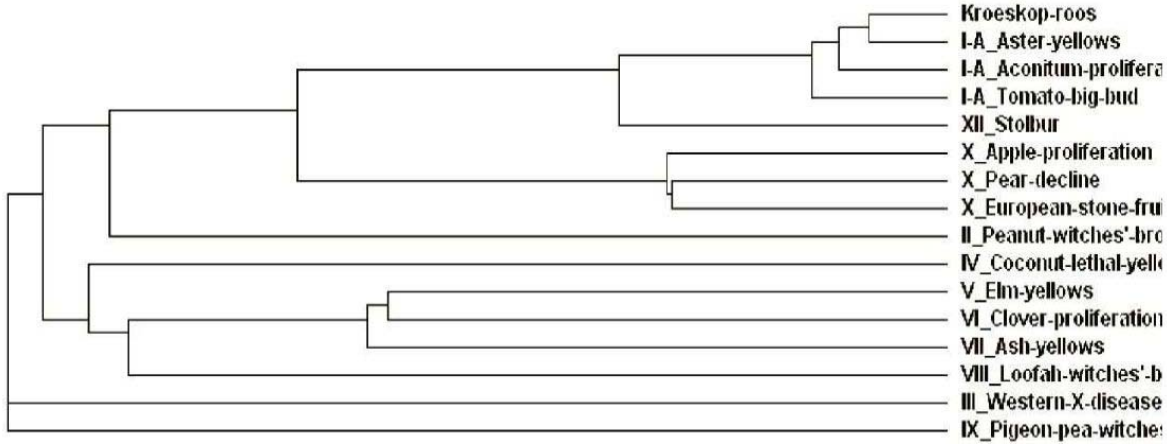
3 Resultaten

3.1 Het onderbouwen van de relatie tussen fytoplasma's en kroeskop.

3.1.1 Determinatie van fytoplasma

Van de eerste fytoplasma's in rozen die werden aangetoond in juni 2004 is van twee bronnen een stukje DNA gedetermineerd als een Aster Yellows fytoplasma. De DNA-sequentie die is verkregen staat weergegeven in Bijlage: DNA-sequentie van fytoplasma in roos.

De Aster Yellows (16SI) is een groep waar een aantal fytoplasma's toe behoren die voornamelijk in Europa en Noord-Amerika wordt aangetroffen. De verwantschap tussen een aantal fytoplasmagroepen is weergegeven in een zg. dendrogram waarbij de afstand staat voor de mate van verwantschap (Fig. 4)



Figuur 4: Verwantschap van een aantal fytoplasmagroepen.

Aster Yellows en verwante fytoplasma's staan bekend de hormoonbalans van een reeks van planten waaronder aster, peer, peen, tomaat, etc. te kunnen verstoren zodanig dat de plant vele groeischeuten maakt die niet volkomen uitgroeien. Het gevolg is de vorming van heksenbezems en dwerggroei die zeer overeenkomen met het beeld van kroeskopvorming in roos.



Figuur 5: Aster Yellows fytoplasma-aantasting in peen (links) en rode zonnehoed *Echinacea purpurea* rechts.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Een betrouwbare identificatie blijft echter noodzakelijk aangezien er bacteriesoorten zijn zoals *Rhodococcus fascians* die fytoplasma-achtige symptomen (heksenbezemgroei) kunnen veroorzaken (Doorn, 2006).

3.1.2 Overdracht fytoplasma's via cicaden

Rozencicaden zijn geregeld aangetroffen op en rond percelen met rozen, alsook bij percelen met kroeskopaantasting zowel bij kwekers als in rozenperken van gemeentelijk groen. Deze cicade is een algemeen in Europa voorkomende soort en inheems voor Nederland (Hoorn, 2010; Manfred, 2010). Bovendien is dit de enige cicadesoort waarvoor in de rozenteelt geregeld chemisch wordt betreden.

De rozencicade (*Edwardsiana rosae*)
Het volwassen insect is 3,4 -4 mm lang en heeft een geel achterlijf en witte vleugels. De larven zijn doorzichtig tot wit. In het najaar legt de cicade eitjes in het bladweefsel op jonge scheuten van de roos. In het voorjaar komen larven tevoorschijn die zuigen aan de onderkant van het blad. De eerste volwassen exemplaren kunnen eind mei of begin juni waargenomen worden. De volwassen cicaden kunnen migreren naar andere Rosaseae waardplanten, zoals lijsterbes (*Sorbus aucuparia*), meidoorn (*Crataegus monogyna*) en braam (*Rubus fruticosus*), eieren worden echter alleen op roos gelegd. De tweede generatie komt uit in eind juni tot begin juli, gevolgd door nog een generatie vanaf half augustus. Deze laatste generatie alsook larven en volwassen insecten zuigen aan de onderzijde van de bladeren. Hierdoor vertonen de bladeren kleine witte plekjes op de bovenzijde. Rozencicaden vormen een algemeen voorkomend schadelijk insect op roos. Een flinke regenbui kan de aantasting aanzienlijk verminderen (Van der Horst, 1998; Alfords; 1984).

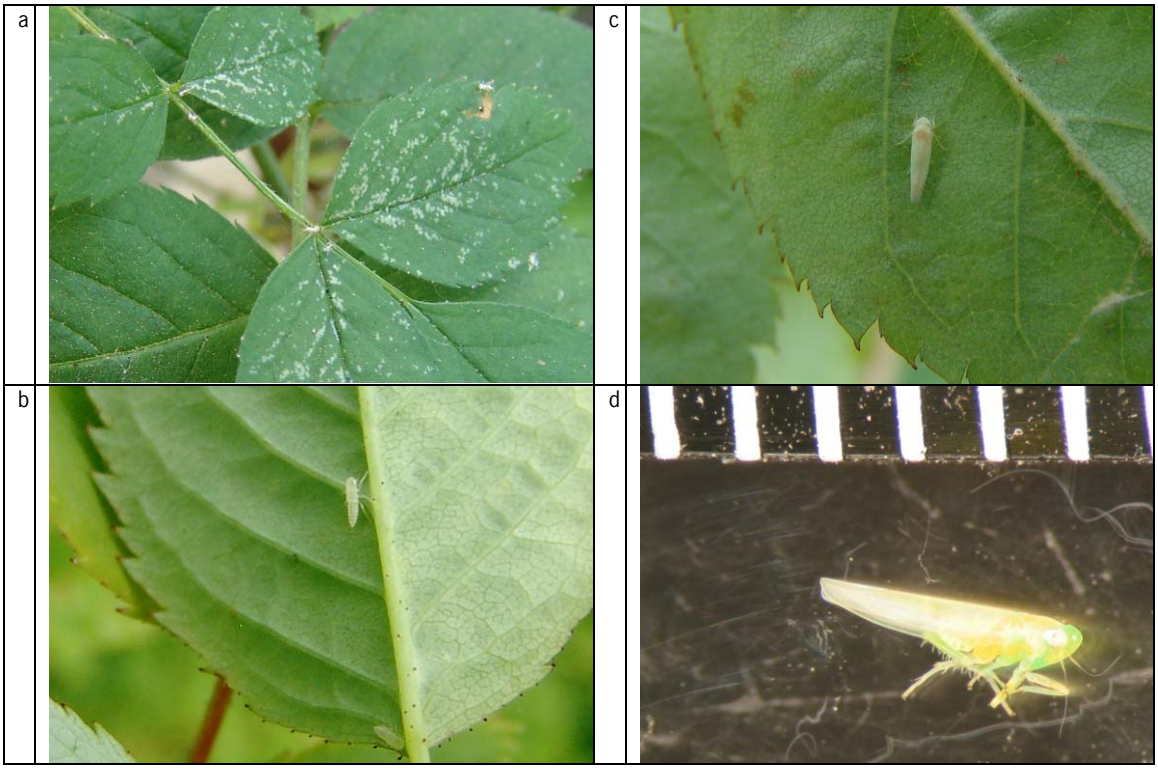
Naast de rozencicade is op enkele gevallen ook de cicade *Philaenus spumarius* beter bekend als het spuugbeestje aangetroffen. Het voorkomen van dit insect is echter zo beperkt dat de kans dat deze een rol speelt bij de verspreiding van fytoplasma's met kroeskop tot gevolg klein wordt geacht.

In september 2006 is een eerste kweek van de rozencicaden opgezet waarbij op een rozenkwekerij-gevangen cicaden werden gekweekt op in insectenkooi bewaarde rozenstruiken. Doordat in september de kweek werd gestart met een beperkt aantal cicaden van de laatste generatie van dat jaar zijn verdere mogelijkheden om overdrachtproeven dat jaar te doen uitgebleven. Een aantal verzamelde cicaden werden bewaard en in maart 2007 getoetst op aanwezigheid van het fytoplasma. Bij deze toets is voor het eerst het fytoplasma in cicaden aangetoond. Deze toets was echter klein van opzet (5 cicaden) en moest worden herhaald omdat de negatieve controles (PCR van water) ook positief was, wat inhoudt dat een vervuiling van het materiaal heeft plaatsgevonden. Tussen de herhalingen in werden de monsters bewaard bij -80 graden, hierbij blijft het DNA-profiel intact. Ondanks de bewaring werd in de tijd het aantonen van fytoplasma's steeds lastiger. In de laatste herhaling was de controle in orde maar was geen fytoplasma meer aantoonbaar.

Tabel 1: Cicadentest 2007 op aanwezigheid fytoplasma met 3 herhalingen in de tijd.
+ sterk signaal ; +/- zwak signaal; - geen signaal

Nr.	Opmerking	6 mrt. 2007	26 mrt. 2007	18 okt. 2007
1	Cicade adult	+	+	-
2	Cicade adult	+	+	-
3	Cicade adult	+	-	-
4	Cicade 2 x juveniel	+	+/-	-
5	gez . Controle roos	+	+	-
6	zieke controle roos	+	+	+
7	controle water voor PCR + N-PCR	+	+	-

In het voorjaar van 2007 is een nieuwe kweek opgezet met in het veld gevangen rozencicaden. Het kweken van een nieuwe generatie cicaden bleek in het voorjaar van 2007 mogelijk. Door onbekende reden is deze kweek echter in de zomer verloren gegaan. In 2008 is onder begeleiding van een ervaren entomoloog een nieuwe cicadekweek opgezet en de determinatie van de rozencicade nogmaals gecontroleerd en bevestigd als de rozencicade. In juni 2008 zijn nieuwe cicaden in Limburg verzameld en in een insectenkooi met potrozen op kweek gezet. Ook dit maal ging de kweek verloren mogelijk als gevolg van een nawerking van een bespuiting op de planten die echter meer dan twee weken hiervoor had plaatsgevonden. Door te weinig cicaden in het veld (mogelijk door de natuurlijke levenscyclus van dit insect) kon een tweede kweek pas in augustus worden opgezet. Deze kweek is gezet op opgepotte onderstammen die met een warmwaterbehandeling zijn getracht fytoplasma-vrij te maken (zie paragraaf 2.4). Deze tweede kweek was daardoor echter te laat in het jaar om nog voor de winterrust van zowel roos als cicaden de proeven verder uit te voeren. De kweek had echter wel succes waardoor de cicaden wintereieren konden afzetten. April 2009 werden namelijk nieuwe larven van de rozencicaden op de zaailingen gevonden.



Figuur 6: De Rozencicade: a: schadebeeld, b: larve (nog zonder vleugels), c: adult, d: adult met millimeter aanduiding.

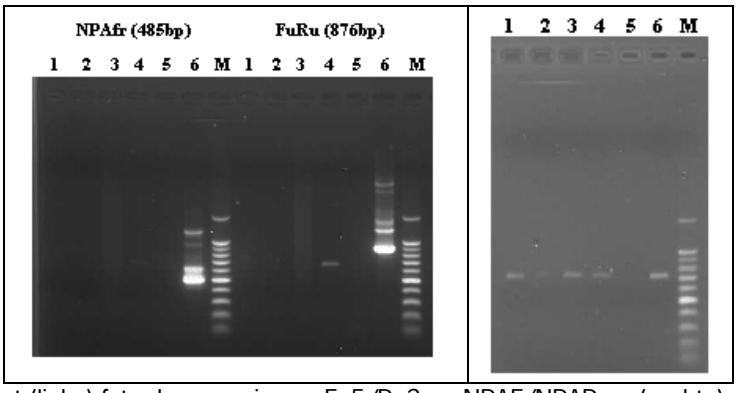
Hoewel alle behandelingen zijn uitgevoerd was het erg lastig om cicaden die waren geplaatst op symptoomplanten na 6 weken terug te vinden. De cicaden geplaatst op de onderstammen zonder symptomen waren echter wel eenvoudig te vinden. Half juni zijn alle onderstammen geoculeerd. Begin augustus is vervolgens nageoculeerd in het geval de oculatie was mislukt. Door het feit dat in 2009 en 2008 het niet mogelijk is gebleken fytoplasma's aan te tonen in plantmateriaal van rozen met kroeskopsymptomen is er voor gekozen geen plantmateriaal uit deze proef te testen op de aanwezigheid van fytoplasma's aangezien de kans van het kunnen aantonen te klein was. Daarom is er voor gekozen de oculaties te laten uitgroeien met de verwachting dat indien fytoplasma's succesvol zijn overgedragen en fytoplasma's de oorzaak zijn van het fenomeen kroeskop de planten met fytoplasma's dit zullen tonen. Bij de 52 planten waar de oculaties uiteindelijk zijn aangeslagen is in september de groei beoordeeld. Hierbij werd geen abnormale groei gevonden.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

In 2009 zijn zes cicaden afkomstig van een rozenveld waar ook rozen met kroeskopsymptomen stonden via de voor de vector toegespitste PCR-methode (zie paragraaf 2.1.2) getoetst op de aanwezigheid van fytoplasma. Het doel hiervan was op een tweede wijze aan te tonen dat rozencicaden fytoplasma's kunnen overdragen. Bij het verzamelen van de cicaden werd duidelijk dat cicaden bij voorkeur gezonde planten kiezen om te verblijven. Hoewel cicaden konden worden gevonden op rozen naast kroeskop-symptoomplanten kon in het veld geen cicade op de symptoomplanten zelf worden gevonden. Dit en de ervaring van het kweken van cicaden op symptoomplanten geeft het sterke vermoeden dat, indien de mogelijkheid hiervoor is, de cicaden niet zullen kiezen voor kroeskop-symptoomplanten om zich te voeden. Indien dit gegrond is kan dit echter nog steeds betekenen dat fytoplasma's door cicaden worden overgebracht van geïnfecteerde (maar nog niet symptomen vertonende) planten naar gezonde planten.

Tabel 2: PCR resultaten met fytoplasma primers Fu5/Ru3, NPAF/NPAR en cicade primers COIF/R.
+ sterk signaal ; +/- zwak signaal; - geen signaal

Nr.	Beschrijving	Fu5/Ru3	NPAF/NPAR	COIF/R
1	Cicade 1	-	-	+
2	Cicade 2	-	-	+
3	Cicade 3	-	-	+
4	Cicade 4, 5, 6	+/- -	+/- -	+
5	Neg. controle	-	-	-
6	Pos. controle	+	+	+



Figuur 7: Resultaten met (links) fytoplasma primers Fu5/Ru3 en NPAF/NPAR en (rechts) cicade-primers op foto weergegeven.

In bovenstaande foto's is een zeer zwak signaal voor fytoplasma's in het mengsel van drie cicaden te zien (nummer 4).

Fytoplasma is dus zwak aangetoond in de rozencicaden door nested PCR, zowel met Primercombinatie Fu5/Ru3, als met Primercombinatie NPAF/NPAR. De kwaliteit van het DNA van de cicaden was goed, dit kan dus geen reden zijn voor deze resultaten. Bij deze tests werd de positieve controle voor het fytoplasma uitgevoerd met fytoplasma's van Pear Decline en voor de cicaden werd *Macrosteles quadrilineatus* gebruikt.

Conclusie: Via deze methodes kon geen overdracht van kroeskopverschijnselen worden verkregen, de overdracht van fytoplasma door cicaden kon niet met zekerheid worden aangetoond.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

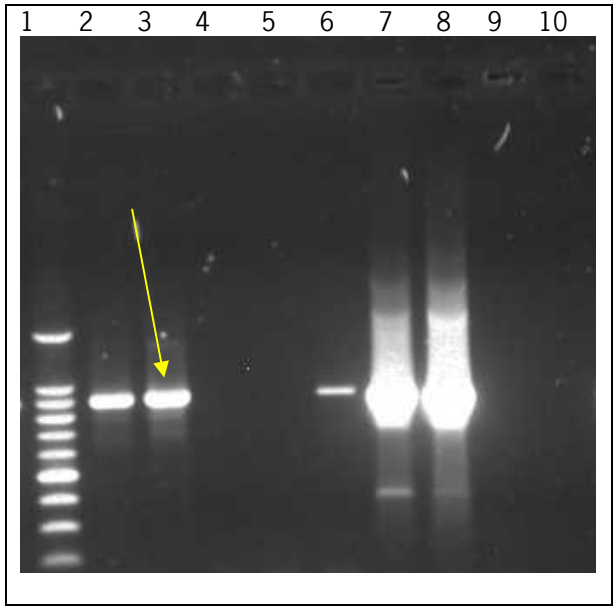
3.1.3 Overdracht fytoplasma's via oculeren

Zoals aangegeven kunnen fytoplasma's niet in het laboratorium gekweekt worden. Daarom kan onderzoek naar de verspreidingswijze alleen gedaan worden door directe overdracht van zieke planten naar gezonde planten door dan wel zuigende insecten dan wel het gebruik van geïnfecteerd entmateriaal.

Aangezien bij geen van de verzamelde planten in 2009 fytoplasma's konden worden aangetoond is hiervan dus ook niet met zekerheid te zeggen of fytoplasma's aanwezig waren. Hoewel geprobeerd, bleek het niet mogelijk oculaties te plaatsen van planten met nog tonende kroeskopsymptomen doordat het plantmateriaal te zacht was. Na oculeren in juli zijn in augustus de onderstammen gekopt en in september zijn de uitgelopen ogen beoordeeld op kroeskopverschijnselen. Alle planten groeiden normaal uit, zelfs sneller dan verwacht.
Conclusie: Via deze methode kon geen overdracht van kroeskopverschijnselen worden verkregen.

3.2 Verspreiding van het fytoplasma

In 2004 werd plantmateriaal verzameld van een aantal rozen met kroeskopsymptomen en met behulp van de PCR methode werd voor het eerst de aanwezigheid van fytoplasma's vastgesteld (figuur 8).



Figuur 8: PCR toetsresultaat (2005) van kroeskopplanten roos.

Deze PCR-methode is uitgevoerd aan monsters van roos. Wanneer de monsters fytoplasma's bevatten, dan zal een DNA bandje op de foto te zien zijn (pijltje) en is het monster positief. Nr. 1 is een merker 2 , 3 en 6 zijn rozemonsters met fytoplasma's; nr's 4 en 5 bevatten geen fytoplasma! Nr's 7 en 8 zijn positieve controles van een eerder geteste roos en fytoplasma's in hyacint. Nr's 9 en 10 zijn negatieve controles.

Bij het vervolgens testen van plantmateriaal van een verscheidenheid aan herkomsten werden positieve signalen gevonden (middels PCR) voor de aanwezigheid van fytoplasma's zowel bij symptoomplanten als bij planten zonder kroeskopsymptomen en bij plantmateriaal van meerdere jaren oud en bij zaailingen (zie onderstaande tabel 3).

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Tabel 3: toetsresultaten van verschillende plantmaterialen in 2005

Materiaal	Herkomst/cultivar	Percentage planten met positief signaal voor fytopl.	
		+sympto	symptoomloos
Drieweeks zailingen	Mengmonsters van insectenvrij geteelde planten	Niet	9
Overjarige planten	Rosarium 1 Verschillende rassen	Niet	13
Overjarige planten	Rosarium 2 Verschillende rassen	50	19
Kwekerij 2-	'Abraham Darby'	20	10

jarig			
Kwekerij 2-jarig	‘Penny Lane’	60	10
Kwekerij 2-jarig	‘Alain’	17	0

In kroeskopplanten werden dus in minimaal twee keer zo veel monsters fytoplasma’s aangetoond dan in planten zonder kroeskopsymptomen. Dit was een belangrijke stap in het verklaren van de relatie tussen de ziekteverwekker en de ziekteverschijnselen. Zo was de veronderstelling dat alleen planten met een fytoplasma infectie die door andere oorzaken verzwakt waren en geoculeerd waren de symptomen laten zien terwijl planten met fytoplasma’s zonder deze specifieke samenloop van omstandigheden (nog) geen symptomen ontwikkelden. Met deze gegevens is het echter ook mogelijk dat het fytoplasma zich kan ontwikkelen in planten die door een andere oorzaak zijn verzwakt.

Dat fytoplasma’s overgedragen konden worden van geïnfecteerde planten via zaad naar hun nakomelingen was niet eerder beschreven. Aangezien de tests die wij uitvoerden fytoplasma’s aantoonde in insectenvrij geteelde zaailingen moest geconcludeerd worden dat ook via deze weg overdracht plaatsvond. Sinds 2005 is slecht een enkele vermelding gemaakt van fytoplasma’s in zaad namelijk in embryo’s van de kokosnoot (Nipah, 2007) Ook nu nog wordt deze vorm van overdracht niet beschreven als methode van overdracht van deze micro-organismen (Weintraub, 2010). De lage aantallen positieven (9%) bij kiemplanten geven aan dat er waarschijnlijk ook andere voor een groter aandeel verantwoordelijke overdracht van fytoplasma’s plaatsvindt zoals via de onderzochte cicaden.

Naast getoetst plantmateriaal geteeld in Nederland werden ook in uit Engeland afkomstig materiaal fytoplasma’s aangetoond. Onderzoekers in Polen vonden fytoplasma’s in rozenmateriaal uit Italië (Kamińska, 2004). Hierdoor lag het voor de hand om te veronderstellen dat het gevonden fytoplasma een zeer breed verspreidingsgebied heeft. Specifieke gevolgen voor de invoer of uitvoer lagen dan ook niet in de verwachting.

In 2006 werd rozen verzameld van verschillende herkomsten, voornamelijk in Oost Brabant en Limburg. Dit jaar werden ook verschillende stamrozen met kroeskopsymptomen verzameld en getest op fytoplasma’s. Hoewel kroeskop in verhouding weinig voorkomt in stamrozen kan dit wel belangrijk zijn om de verspreiding beter te begrijpen. Voor testresultaten zie tabel 5.

In 2007 zijn wederom planten getoetst van verschillende herkomsten. Naast struik, klim en stamrozen zijn zaad, zaailingen, oculatiehout en door stek vermeerderde rozenplanten getest. Voor testresultaten zie tabel 5. Dit jaar werden voor het eerst in dit project ook zaailingen gevonden met kroeskopsymptomen (figuur 9). Bij toetsing van dit plantmateriaal kon echter geen aanwezigheid van fytoplasma’s worden vastgesteld (tabel 4). De collectie zieke planten is uitgebreid tot in de veertig rozen van zeer diverse herkomst. Nieuwe planten met kroesverschijnselen werden verzameld bij zowel kwekerijen als in particuliere tuinen, met het doel het verloop van fytoplasma-aantasting in zieke planten te kunnen monitoren via (in de tijd herhaalde) toetsing met PCR. Het aantal planten dat werkelijk gevolgd kon worden is echter lager doordat voordurend planten als gevolg van kroeskop uitvielen.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)



Figuur 9: zaailing (Laxa) en stamrozen met kroeskopsymptomen

Tabel 4: Resultaten toets van rozenzaad en zaailingen (-met kroeskopsymptomen) op aanwezigheid van fytoplasma.

		N-PCR	PCR	N-PCR
	Datum PCR	**3-4-'07**	**28-07-'07**	**18-10-'07**
	Monsterdatum	**mrt-'07**	**jul-'07**	**mrt-'07/ sept-'07**
Code	Materiaal			
200710	5 zaden	+		-
200711	5 zaden	-		-
200712	5 zaden	-		-
200713	5 zaden	+/-		-
200714	5 zaden	+		-
200715	5 zaden	+		-
200716	5 zaden	+/-		-
200717	5 zaden	+/-		+
200718	5 zaden	+		-
200721	zaailingen Laxa		-	-
200722	zaailingen Laxa		-	-
200723	zaailingen Laxa		-	
gez . Controle roos	Scheut	+	-	-
zieke controle roos	Scheut	+	+	+
controle MQ PCR`+ N-PCR		-	-	-
controle MQ N-PCR		+		

Zoals in bovenstaande tabel is weergegeven werden bij een partij zaad met tests in april bij verschillende monsters fytoplasma's aangetoond (hoewel in drie gevallen een zwak signaal: +/-). Bij een herhaling in september met dezelfde monsters kon dit echter nog slechts bij 1 monster worden aangetoond. Bij de PCR van 3 april wordt echter ook een positieve reactie waargenomen bij de controle MQ (dit is een analyse met water waarbij dus geen fytoplasma's aanwezig kunnen zijn). Dit tast de betrouwbaarheid van de uitslag aan.

Als gevolg van het verminderd aan kunnen tonen van fytoplasma's vanaf eind maart 2007 is de collectie planten in 2008 beperkt aangevuld met een zestal symptoomplanten. Verder is vooral aandacht besteed aan het verbeteren van de detectiemethode door te kijken naar het juiste moment om monsters te verzamelen en welk deel van de plant hier het beste voor geschikt is (paragraaf 3.3.1).

In 2009 zijn 28 nieuwe kroeskopplanten verzameld in de regio Noord Limburg.
De eerste planten met kroeskopsymptomen werden eind april gevonden. Dit waren in 2009 in container opgekweekte struikrozen die tot eind 2008 in de volle grond waren geteeld van de variëteiten Bonica '82, 'Leonardo Da Vinci' en 'Paul's Scarlet'. Deze planten zijn getest en verder opgekweekt en er is getracht schoon opgekweekte zaailingen te oculeren met entmateriaal geknipt van deze planten. Via deze weg is getracht overdracht van kroeskop van symptoomplanten naar fytoplasma-vrij geteelde planten te bewerkstelligen (zie paragraaf 3.1.3).
Vanaf begin juni zijn de eerste planten met kroeskopsymptomen uit de volle grond verzameld, de laatste in augustus. Daarnaast zijn ook verschillende mengmonsters van scheuten en wortels van symptoom en gezond ogende planten getest op de aanwezigheid van fytoplasma's. Ook is plantmateriaal van struikrozen uit gemeenteplantsoen verzameld en geanalyseerd. Dit jaar waren er geen meldingen van kroeskop in andere rozen dan stam of klimrozen. Plantmateriaal van scheuten en wortels van deze planten zijn op verschillende tijdstippen getest. Tot slot is plantmateriaal van wilde braam (Rosaceae: *Rubus fruticosus*) verzameld in groen naast een perceel met kroeskopplanten. Rozencicaden staan bekend ook andere waardplanten uit de familie Rosaseae te bezoeken. Er is nagegaan of hierbij fytoplasma kon worden aangetroffen. Dit jaar is in geen van de geanalyseerde plantenmonsters een positief resultaat voor fytoplasma's gevonden. Bij verbreding van het onderzoek is bij een deel van het plantmateriaal wel het virus RSDaV vastgesteld (zie paragraaf 2.6).
Conclusie: via de uitgevoerde tests van plantmateriaal met kroeskop symptoom en zonder symptoom is het niet mogelijk gebleken de relatie tussen de aanwezigheid van fytoplasma's en kroeskop te bevestigen.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

3.3 Verbetering van de detectiemethode

3.3.1 DNA extractie en PCR-analyse

1) In 2005 werden bij toetsing van plantmateriaal de meest positieve reacties voor de aanwezigheid van fytoplasma's in het einde van het groeiseizoen gevonden (juli/augustus). Het aantal planten waarin het fytoplasma kan worden aangetoond zou daarom naar verwachting in die periode hoger zijn als in het voorjaar. In 2006 is materiaal van verschillende plantendelen op een aantal momenten over de periode mei tot eind september verzameld en getoetst om te achterhalen of er een ontwikkeling is van aantallen waar te nemen fytoplasma's en locatie van voorkomen in de plant. Bij het geteste plantmateriaal werd echter duidelijk dat de beste periode om plantmateriaal te verzamelen met een positieve uitslag voor fytoplasma's in de periode mei-juni is. In 2007 werden zelfs de meeste positieve uitslagen gevonden bij topjes die in maart werden verzameld (tabel 5).

Tabel 5: Resultaten 2007 herhaling van toetsing plantmateriaal.

		N-PCR	N-PCR	N-PCR	N-PCR	N-PCR	N-PCR
	Datum PCR	**6-3-'07**	**26-3-'07**	**6-7-'07**	**20.9.07**	**18-10-'07**	**18-10-'07**
Code	Datum monstername	**mrt-07**	**mrt-07**	**jun-07**	**aug-07**	**aug-07**	**sep-07**
	materiaal						
2006-01 oude stamroos I ent	topjes	+	+		-	-	-
2006-02 oude stamroos III ent	topjes	+	+		-	-	-
2006-03 oude stamroos II wild	topjes	+	+		-	-	-
2006-04 oude stamroos bak wild	topjes	+	+		-	-	-
2006-05 oude stamroos II ent Bonica	topjes	+	+/-			-	-
2006-06 oude stamroos II wild	topjes	+	+			-	
2006-07 oude stamroos II wild	topjes	+	+			-	-
2006-08	topjes	+	+			-	-
2006-09	blad	+	+			-	+
2006-10		+	+			-	-
2007-11 Paul's Scarlet Cl.	scheut			-			-
2007-16 Climbing Bonica				-			-
2007-17 gestekte potroos	scheut			+			
2005-1	blad			-			
2005-2	scheut			-	-	-	
2005-2	blad			-			
2005-3	scheut			-	-	-	
2005-3	blad			-			
2005-6	scheut			-	-	-	
2005-6	blad			-			
2005-11	scheut			-	-	-	
2005-11	blad			-			
2005-20	scheut			-		-	
2005-20	blad			-	-		
2005-22	schet			-			
2005-22	blad			-	-		
Gezonde controle roos	scheut	-	+!	-	-	-	-
Zieke controle roos	scheut	+	+	+	+	+	+
Controle met water		-	+!	-	-	-	-

Uit de bovenstaande gegevens is duidelijk te zien dat analyses genomen van plantmateriaal tijdens in het voorjaar net na het uitlopen van de scheuten bij symptoomplanten van stam en struikrozen (3e & 4e Kolom) de meest positieve resultaten geven voor de aanwezigheid van fytoplasma's. Wel werd in augustus voor het eerst in bemonsterd materiaal van een gestekte potroos een positieve reactie gevonden voor fytoplasma's.

Dit geeft het idee dat het voorjaar de beste periode in het jaar is om plantmateriaal voor monstername te verzamelen. Door het scheiden van monsters van symptoomplanten in blad en stengelmateriaal kon geen verschil worden gevonden in de aanwezigheid van fytoplasma's, in geen van de monsters en herhalingen konden fytoplasma's worden vastgesteld. Het waarnemen van rozen met kroeskop in de volle grond is pas mogelijk na het uitlopen van de scheuten in mei. Praktisch gezien is het dus in maart alleen mogelijk plantmateriaal met kroeskop te verzamelen van planten die het jaar ervoor symptomen hebben getoond.

In 2008 is voornamelijk aandacht besteed aan het verbeteren van de detectiemethode. In eerste instantie zijn alle beschikbare planten uit de collectie in maart opnieuw getest op de aanwezigheid van fytoplasma's De planten met een positieve uitslag zijn gebruikt om de verdeling van fytoplasma's in de plant door de tijd te achterhalen. Monsters verzameld in het voorjaar geven wederom de meeste (hoewel zwak) positieve resultaten voor fytoplasma's. De resultaten bleken geen uitsluitsel te kunnen geven over welk onderdeel van de plant het beste getoetst kan worden (Tabel 6).

Tabel 6: tests voor de aanwezigheid van fytoplasma in verschillende delen van planten met kroeskop.

Plant Code:	deel van de plant:	PCR: 15-4-'08 monster 14-4-'08	PCR: 21-7-'08 monster 8-7-'08
2006-05	scheut	-	-
	bast	+/-	-
	wortel	+/-	-
2006-06	scheut	-	
	bast	-	
	wortel	-	
2006-09	scheut	+/-	-
	bast	-	-
	wortel	-	-
2006-10	scheut	-	
	bast	-	
	wortel	-	
2007-16	scheut	-	-
	bast	-	-
	wortel	+	-

In november 2008 is materiaal verzameld van planten die vanaf augustus in de kas hebben gestaan om de groei van eventueel aanwezige fytoplasma's te stimuleren. Bij dit materiaal konden geen fytoplasma's worden aangetoond. Bij 4 planten kon wel het Rose Spring Dwarf associated Virus worden aangetoond (zie paragraaf 3.6.1)

Volgens Weintraub (2010) is over het algemeen het aantal fytoplasma's gevonden in plantenweefsel, gerelateerd aan de symptomen van de plant, dus indien fytoplasma's de belangrijkste oorzaak zijn dan zouden de hoogste concentraties gevonden moeten worden in het zieke plantmateriaal. Verder is bekend dat in de winter fytoplasma's zich over het algemeen in de wortels ophouden en zich in het voorjaar naar de bovengrondse delen verplaatsen. Het testen van wortels zorgt echter voor praktische problemen aangezien dit erg gevoelig is voor vervuiling met bodembacteriën die een ongegrond positieve uitslag kunnen geven.

2) De verschillende geteste DNA-isolatiemethoden gaven geen eenduidig beeld, waarop is teruggegrepen op de tot nu meest gebruiksvriendelijke DNeasy Plant mini kit. De positieve controles voor fytoplasma's uit Gladiool en van Pear Decline gaven met dezelfde gevolgde procedures steeds positieve reacties.

3) Door uitgebreid literatuuronderzoek, aansluiting bij een internationale werkgroep op het gebied van fytoplasma's, een symposium over fytoplasma's in Spanje bij te wonen en overleg met fytoplasma onderzoekers als Ellis Meekes (NAKT, Nederland) Assunta Bertaccini (DiSTA, Universiteit van Bolognaltalië)

en Maria Kamińska (Research Institute of Pomology and Floriculture, Polen) zijn verschillende DNA verdunningen, primers, PCR-programma's en tevens een 5-voud aan DNA-input t.o.v. het standaard protocol getest. Alle monsters bleven negatief voor fytoplasma. Deze aanpassingen hadden dus geen gewenst effect.

4) De geteste primers zijn allen fytoplasma specifiek. Geen van de gebruikte primers kon echter in 2008 en 2009 fytoplasma's meer aantonen. Voor een overzicht van de gebruikte primers zie bijlage.

5) De DNA opbrengst na DNA extractie is gecontroleerd. Interne PCR controles van DNA kwaliteit werden toegepast ter inspectie of na toepassing van verdunning/ verwerking van het monster de kwaliteit van het DNA nog voldoende was. Zowel bij tests voor roos als voor cicaden was het DNA van geschikte kwaliteit en gaf de PCR positieve resultaten voor DNA kwaliteit. Voor een overzicht van de gebruikte primers zie bijlage.

Conclusie: De gebruikte methoden zijn betrouwbaar. Fytoplasma's van het type Aster Yellows kunnen in bepaalde gevallen voorkomen in roos. De relatie van fytoplasma's met het voorkomen van kroeskop is niet bevestigd.

3.3.2 Microscopie

Bij de met DAPI gekleurde kroeskopscheutjes bleek onder de microscoop geen fytoplasma zichtbaar te worden. Als positieve controle werd een gladiool met fytoplasma symptomen gebuikt, hierbij werden de fytoplasma's onder de microscoop duidelijk zichtbaar.

In juli 2009 is van 7 planten materiaal verzameld en met behulp van electronenmicroscopie geanalyseerd op de aanwezigheid van micro-organismen in het plantmateriaal.

Tabel 7: Resultaat Electronenmicroscopie van zowel plantenmateriaal met als zonder kroeskopsymptomen.

Plantnr	Variëteit	Kroeskopsymptomen	Niet-identificeerbare Micro-organismen
0915	Leonardo Da Vinci	+	-
0925	Onbekend (uit gemeente plantsoen)	+	-
0926	Clair Renaissance	+	+
0927	Peach Clementine	+	+
0928	Peach Clementine	-	-
0929	New Dawn	+	+
0930	New Dawn	-	+

Bij een aantal monsters werden wat bolletjes waargenomen van ongeveer 40 nanometer in diameter. Volgens de analist werd de hoogste concentratie gevonden bij monster 0929 dus materiaal van een kroeskopplant. Hoewel niet met zekerheid kon worden vastgesteld wat deze bolletjes waren kwam het overeen met de structuur van cryptovirussen (pers. comm M. Verbeek, viroloog Wageningen UR). Echter deze virussen staan niet bekend als oorzaak van dit soort symptomen. Bovendien werden de structuren zowel bij symptoom als niet-symptoomplanten gevonden. De kans dat dit dus een rol speelt bij het kroeskopprobleem is klein.

3.4 Ontwikkeling beheersstrategie voor fytoplasma's

3.4.1 Elimineren van fytoplasma's in rozenzaad

In 2006 is een proef opgezet om de warmtetoleratie van ongestratificeerd rozenzaad te achterhalen. De hoogste temperatuur waarmee werd gewerkt was 50˚C. Hierbij bleek het behandelde zaad niet alleen tolerant maar lagen de kiemingspercentages van behandeld zaad hoger dan van onbehandeld zaad (zie onderstaande tabel). Verder gaven de behandelingen met een tijdsduur van 120 minuten bij 50˚C het beste resultaat.

Tabel 8: Resultaten van de kieming na verschillende warmwaterbehandelingen.

code	T/minuten	% kiem
1	onbehandeld	25
2	43/20	35
3	43/120	44
verloren	43/480	X
5	45/20	39
6	45/120	54
7	45/480	33
8	50/20	31
9	**50/120**	**61**
10	50/480	40

In 2008 waren de kiemingspercentages van het behandelde zaad over het geheel erg laag (tabel 9). Tegen de verwachting in werd vrijwel alleen kieming gevonden bij de behandeling 45 graden of onbehandeld.

Tabel 9: Overzicht van warmwaterbehandelingen rozenzaad met resultaat van aantal zaailingen .

Tijd: 60 min			Tijd: 120 min			Tijd: 180 min		
Code	Temp (˚C)	Aantal zaailingen	Code	Temp (˚C)	Aantal zaailingen	Code	Temp (˚C)	Aantal zaailingen
2	45	8	3	45	2	4	45	0
5	50	1	6	50	1	7	50	1
8	55	3	9	55	1	10	55	-
11	60	-	12	60	-	13	60	-

Onbehandeld = koud water code 1 aantal zaailingen: 12

Vanwege deze slechte kieming zijn ook 30 zaailingen (10 onbehandeld en 20 met behandeling 50˚C voor 120 minuten) uit de proef van 2006 meegenomen. September 2007 zijn de zaailingen vanuit de proef in 2006 getoetst op de aanwezigheid van fytoplasma's, hierbij werden zowel bij de behandelde als bij de onbehandelde zaailingen geen fytoplasma's aangetoond.

De zaailingen zijn 15 juli 2009 geoculeerd. Van de oculaties viel 25% van de behandelde ogen uit tegenover 4% van de onbehandelde, hierdoor is besloten na twee weken na te oculeren. Dit zorgde voor de verdeling van behandeld oculatiehout als weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 10: Slaging van oculatiehout behandeling over de 'fytoplasma-vrij' geteelde onderstammen.

Variëteit	warmwater behandeling	Onbehandeld	Totaal
Da Vinci	10	12	
New Dawn	17	7	
Bonica	4	6	
Totaal	31	56	72

Zoals in paragraaf 2.2 uiteengezet is het vanaf 2007 zeer lastig fytoplasma's aan te tonen. Ook bij de geteste door kroeskop heen gegroeide struikrozen is dit niet gelukt en werd dus het wel of niet vormen van kroeskopverschijnselen de enige wijze om overdracht van ziekte te controleren. Dit is de reden dat er niet gekeken is naar onbehandeld oculatiehout op behandelde onderstammen of omgekeerd. Ondanks dat er onder de omstandigheden de grootst mogelijke kans op kroeskopvorming aanwezig was, ontwikkelde zich in geen van de behandelde of onbehandelde planten kroeskop.



Figuur 10: Uitgegroeide struikroosjes uit de 'fytoplasma-vrije' teelt tijdens beoordeling september 2009.

Conclusies:
- Deze proef heeft de werking van de warmwaterbehandeling op bestrijding van fytoplasma's niet kunnen bevestigen of weerleggen.
- Het positieve effect van de warmwaterbehandeling op kieming uit de eerste proef werd in de tweede proef niet meer gevonden.
- De uitgevoerde warmwaterbehandeling zorgde voor de praktijk ontoelaatbaar deel aan mislukte oculaties van 25%.

3.4.2 Ontsmetting rozenzaailingen en oculatiehout door warmwaterbehandeling

Mei 2009 is de groei van de oculaties bij de beide proeven gecontroleerd. Hierbij werden geen afwijkende groeivormen gevonden. 7 juli 2009 is een eindbeoordeling van de proeven uitgevoerd. Hierbij werd de slaging van het oculeren vastgesteld voor de warmwaterbehandeling op 27% de slaging van het onbehandelde oculatiehout was 97%. Onder geen van de uitgegroeide rozen konden groeimisvormingen als kroeskop worden vastgesteld. Door het vanaf 2007 niet meer kunnen aantonen van fytoplasma's in ziek dan wel gezond materiaal is besloten de proef niet te testen via de PCR-methode.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Conclusies:

- Warmwaterbehandeling van onderstammen en oculatiehout geeft een in de praktijk niet haalbare uitval van 30 tot 70%.
- Het effect van de warmwaterbehandeling of het doden van fytoplasma's en het voorkomen van kroeskop kon niet worden vastgesteld.

3.4.3 Ontsmetten van oculatiehout met Tetracycline

Hoewel dit voor deze proef zeer wenselijk was geweest werden in plantmateriaal dat voor deze proef is gebruikt voor en na de behandeling via de PCR methode geen fytoplasma's aangetoond. De in 2008 geoculeerde rozen groeiden voor zowel de behandelde als de onbehandelde oculaties in 2009 normaal uit. De Tetracycline gaf geen positief dan wel negatief effect op de slaging, de ogen ontwikkelden net zo goed als de controle met niet behandelde ogen.

Conclusies:

- Een tetracycline behandeling heeft geen negatief effect op de slaging van de oculaties
- De werking van de tetracycline op het voorkomen van kroeskop kon niet worden bevestigd.

3.5 Bestrijding van de overdracht van fytoplasma's

Indien het project naar redelijkheid een vector had kunnen vinden (een insect die verantwoordelijk wordt geacht voor de overdracht van fytoplasma's dan wel een andere ziekteverwekker van kroeskop) dan was een bestrijding van deze vector in een praktijksituatie gepland. Het effect van de bestrijding op de vector was dan gevolgd alsook het effect op het voorkomen van kroeskop op gevoelige rozen. Doordat het verband tussen een ziekteverwekker en kroeskop niet is vastgesteld heeft een bestrijdingsproef van mogelijke vectoren ook niet plaats kunnen vinden.

3.6 Verbreding van onderzoek

3.6.1 Andere ziekteverwekkers dan fytoplasma

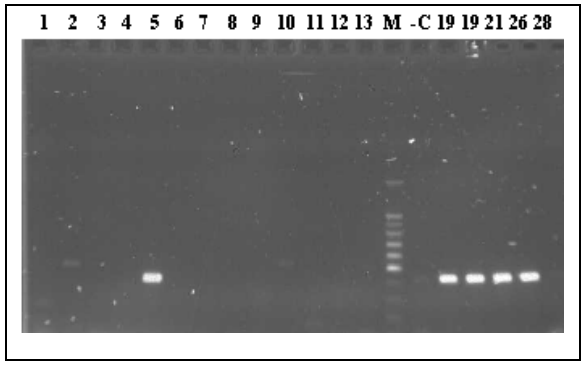
In de planten uit de opgebouwde collectie die in augustus 2008 in de kas waren geplaatst, met het doel eventueel aanwezige fytoplasma's tot activiteit en vermeerdering te stimuleren, konden met PCR wederom geen fytoplasma's worden aangetoond. In 4 van de 36 geteste planten werd wel het RSDaV aangetroffen. De identiteit van dit Luteovirus is ook via sequentie analyse bevestigd. Van deze 4 planten toonde echter maar 1 plant lichte kroeskopsymptomen en een andere meer roodkleuring, wat soms wordt waargenomen bij kroeskop.

Tabel 11: Monsters met positieve PCR resultaten voor RSDaV van de 36 in 2008 (op fytoplasma en RSDaV) geteste planten.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

In april 2009 zijn 13 nieuwe rozenplanten met kroeskop verzameld. Deze rozen in pot zijn najaar 2008 uit de volle grond gerooid en voorjaar 2009 in pot geplaatst. RSDaV werd alleen gevonden in monster nr.5 van de in 2009 uitgebreide collectie kroeskopplanten. Het symptoom van plant 5 is niet anders dan de rest. Ook planten uit de collectie verzameld vóór 2009 met nr. 19, 21, 26 geven wederom een RSDaV positief signaal en nummer 28 niet meer.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)



Figuur 11: PCR resultaten voor RSDaV van zowel nieuw verzamelde kroeskopplanten (1-13) en planten uit de collectie 2008 (19-28).

De bacteriën die bekend staan net als fytoplasma het plantenhormoon cytokinine te kunnen verhogen: *Agrobacterium tumefaciens, Candidatus liberibacter, Rhodococcus fascians* waren echter in deze monsters niet aantoonbaar.

In juni is plantmateriaal (een mengmonster per cultivar en herkomst) verzameld van rozen met kroeskopsymptomen uit de volle grond. Ook hierbij kon in geen van de monsters fytoplasma worden aangetoond. Van de 7 monsters die zijn getest op RSDaV gaven 2 een positieve reactie.

Conclusie: Rose Spring Dwarf associated Virus is in een deel van de onderzochte monsters aangetroffen. Geregeld is dit ook bij rozen die geen kroeskop verschijnselen (meer) vertonen. De relatie van RSDaV met kroeskop is dus niet duidelijk.

3.6.2 Bodemgebonden ziekteverwekkers

Aangezien de planten met kroeskopverschijnselen in de volle grond meestal groepsgewijs werden waargenomen (zoals weergegeven in figuur 12) is tevens de mogelijkheid van een grondgebonden oorzaak onderzocht.

Een aantal kwekers had bodemontsmetting met Monam (werkzame stof metam-natrium) uitgevoerd. Tevens waren verschillende gewasbeschermende maatregelen tegen onkruid, schimmels en plagen uitgevoerd. Geen van deze behandelingen kon een relatie met kroeskop verklaren. De voorvrucht die werd opgegeven door de kwekers bestond uit aardappel, mais, lelie, graan, suikerbiet, afrikaantjes, ui en peen.

Het achterhalen van bodemgebruik en voorvrucht kon geen relatie met kroeskop aantonen. Een aantal gewassen dat voor de roos op het perceel heeft gestaan kunnen de concentratie van aaltjes vergrooten. Een uitzondering hierbij is de teelt van Tagetes (afrikaantjes) dat wordt geteeld om (net als een grondontsmetting met Monam) de druk van aaltjes te doen verlagen. Tagetes staat echter bekend aaltjes anders dan *Pratylenchus penetrans* niet te doen verminderen.

Met deze gegevens en veldwaarnemingen als weergegeven in figuur 12 is besloten in eerste instantie grondmonsters van 2 kwekers te laten onderzoeken op de aanwezigheid van aaltjes. De resultaten hiervan weergegeven in tabel 12.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)



Figuur 12: een duidelijk pleksgewijze uitval van de klimroos 'New Dawn'

Tabel 12: Resultaten aaltjes onderzoek van 2 kwekers

Grondmonster gestoken juni '09, opgespoeld 18 aug. '09: 300 gram per monster. Methode: 'grote-alen-protocol': fijne fractie, grove fractie, XL-fractie.

		fijne fractie					grove fractie					Totaal
kweker	Opmerking	Pra.	Melo	Roty	Tricho	Het	Paratyl	Tyl	Pra	Melo	Het	
A Cultivar: Heidesommer	met Kroeskop	**126**	**46**	3	3	**13**	1	0	35	7	3	**237**
	zonder kroeskop	**0**	**0**	2	1	**0**	0	0	1	0	0	**4**
B Cultivar: Sympathy	met Kroeskop	**236**	**9**	9	1	**2**	4	1	13	0	0	**275**
	zonder kroeskop	**62**	**2**	3	12	**0**	3	0	12	0	0	**94**

Bij de XL-fractie werden geen Xiphinema sp. of Longidorus sp. gevonden.
Hierbij is:

Pra. Pratylenchus sp.
Melo Meloidogyne sp.
Roty Rotylenchus sp. allen juvenielen
Tricho Paratrichodorus sp. allen juvenielen (geen determinatie op soort mogelijk)
Het Heterodera sp. waarschijnlijk Bietencysten-aaltje
Paratyl Paratylenchus sp.
Tyl Tylenchorenchus sp.

Deze resultaten lieten duidelijk zien dat in de monsters gestoken onder rozen met kroeskopverschijnselen aanzienlijk meer aaltjes van het type *Pratylenchus*, *Meloidogyne* en *Heterodera* voorkwamen.
Deze resultaten zorgden voor de beslissing om van nog 3 kwekers grondmonsters op dezelfde wijze te verzamelen met twee herhalingen en deze te analyseren op aaltjes, in dit geval alleen de fijne fractie omdat dit eerder de meeste resultaten gaf.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Tabel 13: Resultaten aaltjes onderzoek van 3 kwekers met 2 herhalingen
Grondmonster gestoken 7 sept. '09, opgespoeld 16 sept. '09: 300 gram per monster. Methode: 'grote-alen-protocol': fijne fractie.

kweker	Kroeskop	Herh.	Cultivar	**Pra**	**Melo**	Roty	Tricho	**Het**	Paratyl	Tyl
C	met	1	Peach Clementine	**138**	**0**	2	0	**0**	1	22
C	zonder	1	Peach Clementine	**122**	**0**	4	1	**0**	0	3
C	met	2	Peach Clementine	**114**	**0**	2	0	**0**	2	6
C	zonder	2	Peach Clementine	**186**	**0**	1	8	**0**	0	32
D	met	1	Clair Renaissance	**171**	**0**	0	0	**0**	0	50
D	zonder	1	Clair Renaissance	**270**	**0**	0	0	**0**	0	55
D	met	2	Clair Renaissance	**181**	**0**	0	0	**0**	0	28
D	zonder	2	Clair Renaissance	**37**	**0**	0	0	**0**	0	102
E	met	1	New Dawn	**89**	**22**	0	0	**8**	6	37
E	zonder	1	New Dawn	**152**	**3261**	0	0	**45**	0	158
E	met	2	New Dawn	**77**	**14**	0	0	**10**	0	9
E	zonder	2	New Dawn	**1**	**45**	0	0	**1**	0	1
E	met	3	New Dawn	**973**	**18**	0	0	**13**	0	25

Conclusie: De relatie die in eerste instantie werd verondersteld tussen het voorkomen van kroeskop met 3 soorten aaltjes kon niet worden bevestigd bij een uitbreiding van de proef. Wel is duidelijk geworden dat op de velden waar rozen worden geteeld over het algemeen een hoge concentratie van aaltjes wordt gevonden wat verscheidene plantengezondheidsproblemen tot gevolg kan hebben.

3.6.3 Resistentie en herkomstonderzoek.

In het voorgaande project werd reeds duidelijk dat bepaalde variëteiten van roos gevoeliger zijn voor een kroeskopaantasting dan andere. Zo wordt de meeste schade ondervonden in de teelt van struik- en klimrozen en veel minder in de teelt van stam- en stekrozen. In dit onderzoek hebben we de herkomst van een aantal voor kroeskop gevoelige variëteiten achterhaald om te zien of hier een verband bestaat. Tijdens dit literatuuronderzoek werd duidelijk dat de kroeskopgevoelige rozen (voor zover gegevens bekend waren) zonder uitzondering gemeenschappelijke voorouders hebben (zie bijlage: Stamboom met kroeskopgevoelige rassen). Twee cultivars werden als gezamenlijke voorouder van deze kroeskopgevoelige cultivars gevonden dit zijn variëteit 'Eva' en variëteit 'New Dawn'. Van Eva is niet duidelijk of deze gevoelig is voor kroeskop, 'New Dawn' is dit zeker wel.
De volledige stamboom van de roos was echter niet te achterhalen. Volgens Huxley (1992) zijn problemen met classificatie en benaming binnen het genus Rosa aan de orde van de dag. Voor vele rassen vindt al eeuwen kweek en hybridisatie plaats waardoor verschillende variëteiten zeer polymorfisch zijn. De laatst volledige beschrijving van het genus is uitgevoerd door Lindley (Rosarum Monographia) uit 1820. Een herziening van deze stamboom zou zeer waardevol kunnen zijn waarbij de complexe cytology en problemen als gevolg van hybridisatie worden onderzocht. Voor veredelaars die nieuwe rassen ontwikkelen is het raadzaam rekening te houden met gevoeligheid voor kroeskop en herkomst van de ouderplanten.

In 1975 heeft Bos de relatie tussen onderstammen en variëteiten van geënte rozen en de gevoeligheid voor kroeskop onderzocht.

Tabel 14. Resultaten van de proeven tot overdracht door middel van oculeren met R. 'Alain'. (Bos, 1975)

Onderstam	Enkelvoudige oculatie met gezonde ogen		Dubbele oculaties met zieke ogen	
	Aantal abnormale planten over het aantal geoculeerde planten	Percentage abnormale planten	Aantal abnormale hoge en lage ogen over het aantal geoculeerde ogen	Percentage planten met abnormale hoge ogen
R. canina 'Schmid's Ideal'	0/6	0	0 +0/3	0
R. canina 'Superbe'	2/40	5	1 +1/16	6
Rosa corymbifera 'Laxa'	1/14	7	14+8/38	37
R. multiflora	0/20	0	0 +2/28	0
R. rubiginosa	4/12	33	3 +2/7	43
Totaal	7/92	8	18 + 13/92	20 + 14

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Tabel 15. Invloed van onderstam-oculatie combinaties op de mate van voorkomen van de ziekte (aangegeven in procenten aangetaste planten) na natuurlijke ' infectie' (Bos, 1975).

Rozen cultivar	Onderstam					
	R. canina 'Heinsohn's Rekord'	R. canina 'Inermis'	R. canina 'Pollmer'	R. canina 'Schmid's Ideal'	Rosa corymbifera 'Laxa'	R. rubiginosa
Alain	3	1	16	4	21	6
Fanal	6	16	23	7	6	2
Garnette	9	12	37	6	7	4
Morsdag	28	18	32	11	15	54
New Dawn	4	20	32	10	64	1
Orange Morsdag	21	20	36	15	19	59
Orange Triumph	2	2	16	6	8	5
Paul's Scarlet Cl.	1	2	13	0	32	0
White Dick Koster	22	33	27	26	38	64
Gem. %	11	14	26	9	23	22

Conclusie: Bij het kiezen van de variëteiten is het verstandig rekening te houden met de cultivar en met de onderstam van de roos. Uit de bovenstaande tabellen komt duidelijk naar voren dat de onderstammen *R. canina* 'Schmid's Ideal' en *R. multiflora* minder gevoelig zijn voor een aantasting met kroeskop. Door ervaring met *R. multiflora* met een kroeskopachtige ziekte uit Amerika (zie paragraaf 4.4.4) is wel enige voorzichtigheid geboden.

Verschillende kwekers hebben aangegeven dat de wens van de handel en handelaars doorslaggevend is of een bepaalde rozenvariëteit wordt gekozen of niet. Indien wordt gekozen voor een kroeskopgevoelige variëteit is het dus aan te raden deze variëteit te oculeren op een onderstam waarbij de kans op uiting van kroeskop laag is. Hoewel *Rosa corymbifera* 'Laxa' de meest gebruikte onderstam is vanwege een aantal teelttechnische voordelen kan er worden gekozen om een hoek van het veld te reserveren voor de kroeskopgevoelige variëteiten en deze te oculeren op een minder gevoelige onderstam als *Rosa canina* 'Schmid's Ideal'.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

4 Overzicht onderzoek

Na de beoordeling van de veldproeven en de plant, cicaden en bodemanalyses is in overleg met het bestuur van de Cultuurgroep Rozen en Rozenonderstammen en de begeleidingscommissie van het project besloten om in dit rapport ook een beschrijving van geraadpleegde literatuur uit binnen en buitenland op te nemen en daarmee te zorgen dat het huidige beeld op de kroeskopproblematiek compleet is.

4.1 Onderzoek voor 2001

Het fenomeen kroeskop werd in de Nederlandse rozenteelt voor het eerst waargenomen in 1954. Vervolgens is in 1965 door de Plantenziektekundige Dienst een inventarisatie gedaan naar de rol van verschillende milieufactoren op het voorkomen van kroeskop. Gedetailleerde informatie werd verzameld op het gebied van aangetaste cultivars, grote van de aantasting, herkomst en voorbehandeling van de onderstammen, herkomst kwaliteit en voorbehandeling van het oculatiehout, periode en methode van oculeren, weers- en bodemomstandigheden, gewasrotatie voor de rozenteelt, teeltwijze als grondbewerking, bemesting, onkruidbestrijding en bestrijding van ziekten en plagen. Deze inventarisatie gaf geen uitsluitsel over wat de oorzaak kon zijn dan wel hoe de kans op aantasting kan worden beperkt. Wel werd het onder veldcondities soms pleksgewijs voorkomen van kroeskop toegeschreven aan ongunstig lokale omstandigheden als vorst, wind en watertekort. In 1965 is vergeefs gezocht naar de relatie van kroeskop met bodemgebonden virussen en het aaltje *Trichodorus spp.*. Hoewel net als in het huidige onderzoek het aaltje kon worden aangetroffen in de onderzochte bodems was er geen correlatie tussen het voorkomen en kroeskop. Vervolgens waren er berichten dat het voorkomen van kroeskop kon worden toegeschreven aan de oculatiegalmug (*Resseliella oculiperda* (Rubsaamen 1893) syn. *Thomasiniana oculiperda*). Nijveldt (1966) kon echter geen oculatiegalmuggen vinden in onderzochte kroeskopplanten, onderzochte velden met kroeskop, of in de bodem. Onderzoek naar pathogene bacteriën als oorzaak van kroeskop gaf ook geen uitsluitsel. Vanaf 1966 werd een groots opgezet praktijkonderzoek uitgevoerd waarbij de overdracht via oculeren werd onderzocht. In entproeven in de kas kon het verschijnsel niet worden opgewekt, of van zieke op gezonde planten worden overgebracht. In dubbel-oculatieproeven werden in de volle grond twee oculaties boven elkaar geplaatst. In deze proef leek de ziekte van ogen van zieke herkomst over te gaan op er boven geoculeerde gezonde ogen. Vele ogen van zieke herkomst groeide echter normaal door en werden ogen van gezonde herkomst ziek. Hierbij kon niet worden uitgesloten dat de ontwikkeling van het tweede oog zorgde voor obstructie in de ontwikkeling van het eerste oog. Wel gaf dit onderzoek inzicht in de verschillende gevoeligheden voor onderstam-ent combinaties waarbij zoals eerder besproken R. canina Schmid's Ideal en R. multiflora als minst gevoelig werden gevonden (Bos, 1975). In 1969 heeft een fysiologische onderzoek plaatsgevonden waarbij duidelijk werd dat bij de hechting van het oog bij kroeskop meer necrotisch weefsel wordt gevormd. Een suggestie dat er een verband zou zijn tussen onzorgvuldig oculeren en het ontstaan van kroeskop kon echter niet worden gelegd. Eind jaren '70 is er op het proefstation gekeken naar een evt. relatie met herbicidengebruik. Dit kon niet worden aangetoond.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

4.2 Onderzoek naar Kroeskop door PPO 2001 tot 2005

In het voorjaar van 2000 werd bij veel rozentelers weer een grote mate van aantasting door kroeskop geconstateerd. Na een voorstudie in 2001 en 2002 naar de grootte van het probleem kroeskop werd de schade voor de Nederlandse rozensector geschat op 1,5 miljoen euro per jaar. In deze voorstudie is in 2002 tevens het effect van het toedienen van Mycorrhiza-preparaten (Biovin ® & Mycor ® Tree Saver ®) bij kroeskopplanten getest. Het idee was om op deze wijze mogelijke stress in de plant te verlagen waardoor herstel beter mogelijk was. Deze behandeling gaf echter geen effect op herstel. In 2003 is een proef opgezet om het mogelijk effect van weekmakers in de gebruikte afbindmaterialen (de Fleischhouwer) op kroeskop te onderzoeken. Bij het voor kroeskopgevoelige ras 'New Dawn' is tijdens het oculeren een verhoogde concentratie weekmakers toegediend die door de firma Fleischhouwer beschikbaar was gesteld. Geen van de planten ontwikkelde echter kroeskop dus dit kan niet de oorzaak van het probleem zijn.
In 2004 is door Praktijkonderzoek Plant & Omgeving gestart met een tweejarig onderzoek. In een poging om 'kroeskoppen te induceren is een aantal proeven bedacht. Er werd gebruik werd gemaakt van één cultivar, Rosa 'Pauls Scarlet', en drie verschillende onderstammen; 'Laxa', 'Schmids Ideal' en 'Heinsons Record'. Vanaf februari 2004 zijn deze proeven ingezet:
- Koppen van de planten;
- Rondsteken op 10 cm van de plant;
- Ingraven van buisjes met plantenhormonen, waarin enkele wortels worden gehangen in oplossing van BAP, salicylzuur, kinetine, NAA en IAA.
- Bespuitingen met enkele plantenhormonen en enkele onkruidmiddelen: Butisan-S , BAP, 2,4 D en NAA.
- Bepaling van mogelijke ziekteverwekkers in kroesplanten m.b.v. PCR in blad, steel en wortel.
- Behandeling van rozen met kroeskop door:
    1. tetracycline bij kroeskopplanten te smeren rond de oculatie, druppelen in snede, plant bespuiten met tetracycline.
    2. Kroeskopplanten insmeren met BAP, NAA, 2,4D , IAA planten hormonen.

Er traden duidelijke verschillen op in ontwikkeling van de planten, er traden echter door de behandelingen niet of nauwelijks kroesverschijnselen op en na verloop van tijd groeiden de planten uit de verschillende behandelingen weer meer gelijkmatig.
Bepaling van mogelijke ziekteverwekkers in kroesplanten m.b.v. PCR in blad, steel en wortel gaf wel resultaat. Getoetst werd met een primer voor een fytoplasma dat voorkomt in bloembollen. Een eerste test was positief. In nieuwe bepalingen werden opnieuw bladmonsters getoetst. De resultaten waren van dien aard dat vervolgonderzoek wenselijk was, dit heeft uiteindelijk geleid tot het huidige project.

4.3 Onderzoek naar Fytoplasma's door PPO

In 1984 werd door PPO een vergelings-heksenbezemziekte bij gladiolen in verband gebracht met de aanwezigheid van fytoplasma's door gebruikmaking van microscopie en DAPI kleuring (Hollinger, 1984). Met behulp van deze techniek, aangevuld met de voor dit onderzoek tevens gebruikte PCR-methode, zijn fytoplasma's aangetoond als oorzaak van ziekten in Gladiool, Hyacint, Lelie en Hortensia. In 2007 is een onderzoek gestart naar Pear Decline een groeiverstoring in relatie gebracht met fytoplasma's die echter niet alleen voorkomt bij peer maar ook bij vruchtbomen en in mindere mate in laanbomen en Apple proliferation (appel). Bij Pear Decline wordt het fytoplasma overgedragen de perenbladvlo (Psylla pyri). De projectleider van het project Pear Decline (De Kock) is tevens verantwoordelijk geweest in dit project kroeskop voor de bepaling van het wel of niet voorkomen van fytoplasma's in het te testen plantmateriaal.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

4.4 Onderzoek buiten Nederland

Voor het project kroeskop zijn contacten gelegd en onderhouden met onderzoekers van fytoplasma's in Italië, Polen en een EU-project, tevens zijn verscheidene symposia bijgewoond over fytoplasma's om de laatste ontwikkelingen te kunnen volgen en toepassen.

4.4.1 Termen voor kroeskop

Kroeskop is vanzelfsprekend een Nederlandse naam, benamingen voor deze ziekte en op deze termen gevolgd onderzoek zijn: Yellows disease, Rose bud proliferation, Rose stunt disease, witches' brooms in Rose. Oudere termen voor deze ziekte zijn Curly heads (Bos, 1975) en Pinch off (Roberts 1962). In de meest recente literatuur worden deze termen echter niet meer gebruikt.

4.4.2 Fytoplasma's

De laatste jaren is er heel veel onderzoek gedaan naar fytoplasma's in een groot aantal gewassen. De wetenschappelijke literatuur staat de laatste jaren vol meldingen van nieuwe vondsten en meldingen van fytoplasma's in een reeks van nieuwe waardplanten. Vooral in fruitbomen in Europa is het probleem aanzienlijk (Bertaccini, 1998, Jarausch, 2001, Hiemstra, 2007). Door de verbeterde aantoonbaarheid door moleculaire technieken blijkt deze ziekte alom aanwezig. De ontwikkelingen op dat gebied werden niet alleen via meldingen in de vakliteratuur gevolgd maar ook door deelname aan een internationaal fytoplasma werkgroep (IPWG). Via deze werkgroep is deelgenomen aan een symposium over fytoplasma's in Spanje en zijn de ontwikkelingen op het gebied van fytoplasma's door de deelnemende experts gedeeld. Het wordt te omvangrijk om al het onderzoek dat plaatsvindt op het gebied van fytoplasma's hier te vermelden De belangrijkste onderzoeken die zijn gevolgd voor dit project op het gebied van fytoplasma's zijn hier op een rijtje gezet.
Onderzoek in Duitsland zorgde voor de ontwikkeling van de eerste PCR- primers die gebruikt konden worden om fytoplasma's aan te tonen die in relatie zijn gebracht met 'Apple proliferation' en 'Pear Decline'. Deze primers zijn echter ook geschikt om andere fytoplasma's aan te tonen en zijn naast de primers voor fytoplasma's van Gladiool gebruikt (Lorenz, 1995). Vanaf 1995 is de ontwikkeling van nieuwe primers die gebruikt kunnen worden voor het aantonen van fytoplasma's snel gegaan. Een reeks van deze primers is gebruikt voor dit project. Een overzicht hiervan staan weergegeven in de bijlage.

In 2001 werden door onderzoekers in Polen voor het eerst fytoplasma's in rozen met kroeskopverschijnselen gevonden via zowel electronenmicroscopie als via PCR-methodes waarbij dezelfde PCR-primers als gebruikt in dit onderzoek werden toegepast. Na sequentie werd net als in ons onderzoek een fytoplasma van de groep Aster Yellows gevonden. Via oculeren kon bovendien het fytoplasma worden overgedragen op planten van de roze maagdenpalm (*Catharanthus roseus*) (Kamińska, 2001a,b, 2003). In 2004 werd naast het Aster Yellows ook fytoplasma van de Apple Proliferation-groep gevonden in roos. In 2005 werden proeven uitgevoerd met Invitro-kweek van geïnfecteerd plantenmateriaal waarbij het mogelijk leek fytoplasma's voor langere tijd te behouden. En werd de invloed van bewaartemperatuur en licht van planten op de ontwikkeling van fytoplasma's onderzocht. In 4 weken werden hier geen verschillen waargenomen. Tetracycline behandeling van geïnfecteerd materiaal had geen effect op aantallen fytoplasma's (Kamińska, 2005). Door het onderzoek in Polen is verschillende malen contact geweest met de onderzoeker Maria Kamińska om protocollen van PCR-methode te vergelijken. Hierbij werden geen andere methodes toegepast als toegepast voor dit project. Wel zijn een aantal andere toepassingen geadviseerd die door andere onderzoekers zijn getest. Tijdens de laatste fytoplasma conferentie van het IPWG is wederom met deze onderzoekster gesproken en werd aangegeven dat ook bij hun onderzoek door onbekende reden het steeds lastiger is geworden fytoplasma's in rozen met kroeskop aan te tonen (pers. comm. M. Kamińska, jan. 2010).

In 2007 werd onderzoek gepubliceerd van onderzoekers in China die fytoplasma's hadden aangetoond in Rosa rugosa van cultivar 'Plena' met kroeskopachtige symptomen. Ook bij deze tests werden algemene primers voor het aantonen van fytoplasma's als gebruikt voor dit onderzoek voor de PCR-methode toegepast. In dit onderzoek werd door determinatie van het fytoplasma (van de Aster Yellows-groep) een zelfde soort fytoplasma in Paulownia met kroeskopachtige symptomen gevonden (Gao, 2007).

4.4.3 Rose Spring Dwarf associated Virus

De uiterlijke kenmerken beschreven in de literatuur komen erg overeen met het beeld van kroeskop. De vorming van kroeskopachtige scheuten vindt plaats in het voorjaar terwijl gedurende de zomer veelal de nieuwe scheuten normaal ontwikkelen. Net als bij kroeskop was de oorzaak van de ziekteverschijnselen tot voor kort onbekend (Salem, 2008b). Het enige verschil met kroeskopsymptomen zoals gevonden in Nederland is een soort zig-zag vorm van groei bij nieuwe scheuten en bladeren. Verder is bekend dat een warmwater-behandeling zoals toegepast ter bestrijding van fytoplasma's geen effect heeft op dit virus. (Pataky, 1988). Het virus heeft als vector de bladluis. In onderzoek van Salem (2008a) uitgevoerd in Californië werd veelal de voor het RSDaV erg gevoelige *R. multiflora* gebruikt terwijl deze cultivar juist uit Nederlands onderzoek bekend staat als minder gevoelig voor kroeskop (Bos, 1975). Onderzoek in 2008 heeft de gehele sequentie van dit Luteovirus vastgelegd (Salem, 2008a). Hierdoor konden in het kroeskopproject primers besteld worden die zijn gebruikt om plantmateriaal te testen op de aanwezigheid van dit virus. Hierbij werd dus in 7 gevallen het virus aangetroffen. De relatie tussen kroeskop en dit virus was niet voldoende aantoonbaar om een verklaring te kunnen geven als belangrijkste oorzaak van deze ziekte (paragraaf: 2.6.1.).



Figuur 13: Schadebeeld van Rose Spring Dwarf associated Virus. Bron: Horst, 2007.

4.4.4 Rose Rosette Disease

Rose Rosette Disease (RRD) wordt net als kroeskop veroorzaakt door een nog onbekend pathogeen. De ziekte is alleen beschreven in Amerika en komt daar veel voor op *Rosa multiflora* die daar wordt gezien als een onkruid en exoot (ingevoerd uit Japan voor de aanleg van hagen). RRD wordt derhalve zelfs gezien als vorm van biologische bestrijding (Epstein, 1997). De ziekte wordt echter ook waargenomen in gecultiveerde rozen. In Amerika staat de ziekte net als kroeskop in Engeland bekend als witches' broom of rose. De eerste beschrijvingen van de ziekte komen uit 1941, maar ze komt nu wijd verspreid in Amerika voor. De ziekte doet qua uiterlijk erg denken aan kroeskop. De ziekte kan via enten worden overgedragen. Via ent-proeven is vastgesteld dat de veroorzaker van de ziekte in alle delen van de plant voor kan komen. Kamińska (2003) stelt dat fytoplasma's de oorzaak van de ziekte zijn. In tegenstelling tot het algemene beeld van kroeskop in Nederland komt RRD in Amerika voornamelijk voor bij de onderstam (R. multiflora) en bij volgroeide planten i.p.v. uitlopende oculaties. De voor kroeskop gevoelige variëteiten Bonica en New Dawn zijn ook gevoelig voor RRD (Epstein, 1999; Silvestro, 2004). Een belangrijk symptoom van RRD is een rode pigmentatie van de scheuten en vorming van 'heksenbezem' symptomen die ook bij kroeskop voor (kunnen) komen. Bij RRD wordt echter ook geregeld versnelde lengtegroei met een groter aantal doornen gevonden (Hong, 2002). Van de geïnfecteerde planten kan 10-15% tijdelijk door de ziektesymptomen heen groeien echter binnen een periode van 3 jaar sterven alle geïnfecteerde planten. Zoals begrijpelijk is ook hier gespeculeerd dat de ziekteverwekker een virus of een fytoplasma is. De berichten hierover zijn echter tegenstrijdig. Epstein (1999) gaf aan geen verkleuring bij een DAPI behandeling en geen reactie bij PCR tests voor het aantonen van fytoplasma's te krijgen. Wel konden deeltjes met een dubbel membraan worden gevonden. Silvestro (2004) gaf echter aan via elektronenmicroscopie wel virusachtige organismen alsook deeltjes met een dubbele membraan te vinden. Kaminska (2004) stelt in haar artikel dat het bij RRD om

dezelfde ziekte gaat als kroeskop in Europa. Noch een infuusbehandeling met Tetracycline of een warmwaterbehandeling zorgde voor een remissie van de ziekteverschijnselen (Epstein, 1995). De ziekte wordt in Amerika overgedragen door een zeer kleine mijt (*Phyllocoptes fructiplilus*). De mijt heeft 4 poten en is ongeveer 220 micron lang en 50 micron breed. Verspreiding van de mijt gaat via de wind. Om ongewenste verspreiding van de ziekte te voorkomen worden geïnfecteerde planten verwijderd. Beheersing van de mijten lijkt alleen chemisch mogelijk en is zeer lastig (Epstein, 1995). Tot op heden is alleen van cicaden bekend dat zij fytoplasma's kunnen overdragen en niet van mijten (Horst, 2007; Weintraub, 2010)

Onder de microscoop dan wel electronenmicroscoop zijn geen mijten waargenomen op planten met kroeskopverschijnselen. Ook in het veld is geregeld zonder resultaat met een loepje ziek plantmateriaal gecontroleerd op de aanwezigheid van mijten. Indien RRD gelijk is aan Kroeskop dan is het vreemd dat deze ziekte in Amerika voornamelijk *R. multiflora* aantast terwijl proeven in Nederland juist hebben aangetoond dat deze onderstam minder gevoelig is voor kroeskop.



Figuur 14: Schadebeeld van RRD in *Rosa multiflora* met de mijt als enig bekende vector van de ziekte (Bron: American Rose Society).

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

5 Discussie

De reeks van technieken die is gebruikt voor bemonstering, DNA extractie en toetsing behoort tot de modernste technieken die worden gebruikt door de meest vooraanstaande fytoplasma-onderzoekers. Overleg en samenwerking heeft plaatsgevonden met fytoplasma onderzoekers als Ellis Meekes (NAKT, Nederland) Assunta Bertaccini (DiSTA, Universiteit van Bologna, Italië) en Maria Kamińska (Research Institute of Pomology and Floriculture, Polen), tevens is PPO aangesloten bij een internationale werkgroep (COST) op het gebied van fytoplasma's en is een symposium over fytoplasma's in Spanje bijgewoond om de laatste ontwikkelingen te volgen.
Deze methoden (met een vastgesteld protocol als weergegeven in bijlage: Detectie Protocol) hebben bij onderzoek door PPO aangetoond te werken voor detectie van fytoplasma's bij peer (Pear Decline), appel (Apple Proliferation), perzik (Peach Yellows), amandel, hyacint, gladiool, muscari/ blauw druifje, hortensia, primula. Deze technieken hebben ook gewerkt bij het testen van de onderzochte monsters op de aanwezigheid van Rose Spring Dwarf associated Virus (RSDaV) en van de kwaliteit van het DNA voor roos en cicaden.

Via dit project hebben we met de gebruikte detectiemethoden met zekerheid vast kunnen stellen dat zowel fytoplasma's als het virus RSDaV voor kunnen komen in roos. De relatie van deze pathogenen met kroeskop is echter niet duidelijk geworden doordat vanaf 2007 steeds minder fytoplasma's konden worden aangetoond bij monsters met duidelijke kroeskopsymptomen.
Deze methoden hebben in het begin van het project fytoplasma aan kunnen tonen. Via sequentie en determinatie is vastgesteld dat het in deze monsters ging om het fytoplasma behorend tot de fytoplasma-groep van Aster Yellows. Vanaf 2007 is het steeds lastiger geworden fytoplasma's aan te tonen. Verschillende technieken en primers zijn afgewisseld maar zonder resultaat.

Door deze resultaten is het niet mogelijk gebleken de relatie tussen kroeskop en het voorkomen van fytoplasma's te kunnen verduidelijken. In het begin van het project werden meer fytoplasma's gevonden in planten met kroeskopsymptomen. Dit zou kunnen betekenen dat fytoplasma's zich beter kunnen ontwikkelen in door een andere oorzaak verzwakte planten; ditzelfde geldt voor het RSDaV. De aanname dat deze micro-organismen de oorzaak zijn van de problemen met kroeskop kon niet worden bevestigd.

Het feit dat er geen fytoplasma's konden worden aangetoond kan het volgende betekenen:
- De fytoplasma's die de kroeskopsymptomen veroorzaakten zijn verdwenen, ondanks dat blijven de fysiologische kenmerken van kroeskop in de plant gehandhaafd (d.w.z. fytoplasma's waren wel aanwezig maar zijn verdwenen);
- De kroeskopsymptomen in roos hebben een andere dan wel meerdere oorzaken dan alleen de eerder aangetoonde fytoplasma's.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

5.1 Conclusies en aanbevelingen

- De gebruikte sequentie technieken hebben aangetoond dat in de Nederlandse rozenteelt zowel fytoplasma's van het type Aster Yellows als het virus Rose Spring Awarf associated Virus (RSDaV) kunnen voorkomen.

- Door onverklaarbare redenen wordt het binnen dit project vanaf 2007 steeds lastiger de aanwezigheid van fytoplasma's in rozen aan te tonen, ook nieuwe zuiveringstechnieken, primercombinaties voor PCR-analyses en toegepaste technieken van microscopie kunnen daar geen verandering in brengen.

- Fytoplasma's komen wel voor in roos maar de relatie tot kroeskopvorming kon niet worden bevestigd.

- Mogelijk kunnen fytoplasma zich in rozen ontwikkelen die door een andere oorzaak zijn verzwakt, maar zijn de fytoplasma's dus niet de oorzaak van de kroeskopvorming.

- Mogelijk zijn fytoplasma's wel de oorzaak van kroeskop maar zijn de fytoplasma's verdwenen terwijl de fysiologische gevolgen voor de plant gehandhaafd blijven.

- Het RSDaV is een virus dat ook kroeskopvorming kan geven . In één van de planten met kroeskopvorming is het virus aangetoond. Bij de overige planten kon dit niet worden aangetoond en is dus ook hiervoor de relatie tot kroeskopvorming niet gelegd.

- Onderzoek naar andere bacteriën en virussen (en hun vectoren) kon geen verband aantonen met kroeskop in roos.

- Cicaden die bekend staan als vector van fytoplasma's zijn ingezet om kroeskopvorming over te dragen van zieke naar gezonde planten. Hoewel de kweek en de proef is gelukt, kon in de testplanten geen overdracht worden bevestigd.

- Door toedoen van fytoplasma's kunnen in planten de hormonen endogene cytokinine en auxine toenemen, mogelijk speelt dit hormoon toch een rol maar wordt deze door een andere dan de onderzochte ziekteverwekkers geïnduceerd.

- Voor de rozenkweker rest er op dit moment de enige keuze om schade door kroeskop te beperken door te kiezen voor minder gevoelige . Als toch voor gevoelige variëteiten wordt gekozen kan de schade worden beperkt door deze te oculeren op minder gevoelige onderstammen als *R. canina* ' Schmid's Ideal' i.p.v. Rosa corymbifera 'Laxa'.

- Mogelijk kan het risico op schade door kroeskop worden beperkt door gevoelige soorten op verschillende locaties te telen. De in het veld waargenomen schade was namelijk vooral pleksgewijs.

- Stamboomonderzoek heeft laten zien dat veel kroeskopgevoelige rozencultivars dezelfde 'voorouders' hebben. Veredelaars zouden hier gebruik van kunnen maken door alleen nog te kruisen met kroeskopongevoelige cultivars.

- Vervolgonderzoek naar planthormoonspiegels in gezonde en kroeskopplanten en plantfysiologisch onderzoek met de nieuwste technieken kan mogelijk nog ideeën aandragen voor verklaring van het fenomeen kroeskop.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

6 Kennisoverdracht

Lezingen/presentaties

- Tijdens bestuursvergadering van de cultuurgroep Rozen- en Rozenonderstammen, 21 september 2009.
- Tijdens een studieclub bijeenkomst Horst a/d Maas 10 augustus 2009 korte toelichting gegeven over stand van zaken.
- Tijdens een studieclub bijeenkomst Horst a/d Maas 14 mei 2009 korte toelichting gegeven over stand van zaken en advies.
- Tijdens fytoplasma-symposium in Spanje presentatie over fytoplasma onderzoek in Nederland door Khanh Pham 31 jan- 2 febr 2009 Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems Meeting: Sitges, Spanje.
- Tijdens een lezing over onderzoek aan rozen voor het bestuur van de cultuurgroep rozen en Rozenonderstammen in 2007 is aandacht geschonken aan dit project
- Er is een hand-out over het onderzoek geschreven. Deze is winter/voorjaar 2007 gebruikt voor kennisoverdracht op diverse telersbijeenkomsten.
- Tijdens een studieclub bijeenkomst Horst a/d Maas op 10 maart 2006.

Artikelen verschenen in relatie tot kroeskop:

Nieuwsbrief De Roos. Januari 2009
Teeltechnisch onderzoek (waaronder stand van zaken met het project Kroeskop).

Mededelingenblad van de Koninklijke Nederlandse Plantenziektekundige Vereniging 37(5) september 2006
Fytoplasma's in siergewassen: een groeiend probleem?

De Boomkwekerij 40 (7 oktober 2005)
Kroeskop-mysterie stap verder ontrafelt.

De Boomkwekerij 38 (17 september 2004)
Kroeskop in roos laat zich moeilijk verklaren.

Nieuwsbrief De Roos. Juli 2004
Kroeskoppen roos uitgebreid in onderzoek

De eindresultaten van dit project zullen nog worden verwerkt in een artikel voor Vakblad De Boomkwekerij, dit zal waarschijnlijk juni 2010 uitkomen.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

7 Verklarende woordenlijst

DNA-sequentie
Met de sequentie wordt de volgorde van nucleotiden in een DNA- of RNA-molecuul bepaald; of de volgorde van aminozuren in een eiwit. Evolutionaire verwantschap wordt bepaald door sequenties van verschillende organismen te vergelijken.

Fytoplasma
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.
Het fytoplasma is in relatie gebracht met de veroorzaker van heksenbezems in verschillende gewassen. Er zijn verschillende soorten fytoplasma's, sommigen komen voor in de mens of in varkens, anderen komen voor in planten. De symptomen die fytoplasma's veroorzaken in hun waardplanten variëren van geen (vaak zijn deze micro-organismen latent aanwezig), groeiremming, groene bloemen, heksenbezemgroei (proliferatie van scheuten), tot verkleuring van bladeren en verkorting van internodiën. Kennis over en onderzoek naar fytoplasma's staat nog relatief in de kinderschoenen. De meeste fytoplasma's zijn pas beschreven na 1990 (Welliver, 1999).

Nested-PCR
Nested PCR is een aangepaste PCR waarbij twee sets van primers worden gecombineerd met doel de kans van een reactie door ongewenste producten (vervuilingen zoals bacteriën) te verkleinen.

PCR-methode
De toets waarmee fytoplasma's in planten worden aangetoond is de zogenaamde Polymerase Chain Reaction (PCR)-methode. Bij deze methode wordt het DNA van een plantenmonster geïsoleerd. Hierin zit naast het DNA van de plant ook het DNA van de eventueel aanwezige ziekteverwekkers.

PCR primers
In de PCR-reactie wordt m.b.v. twee zeer specifieke stukjes DNA (primers) een analoog stukje DNA van de ziekteverwekker in het monster vermeerderd en aangetoond. Voor zeer veel organismen zijn inmiddels deze primers voorhanden of kunnen worden aangemaakt.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

8 Literatuur

Bos L. & F.W. Perquin; 1975.
Rose bud proliferation, a disorder of still unknown etiology. Neth. J. Pl. Path. 81

Bertaccini, A. M. Vibio, J. Franova-Honetslegrova, M. Janeckova; 1998.
Molecular detection of phytoplasmas in apple with rubbery wood symptoms. Acta Horticulture. 472: 693-700

Chung; J.C.; 1998.
Pathogenicity of Aster Yellows Phytoplasma and Spiroplasma citri on Periwinkle. Phytopathology Vol. 88, No. 12 P.1347-1350.

Doorn, J. van; Lemmers, M.E.C.; Pham K.T.K.; Meijer, H.; Hiemstra, J.A. 2006.
Fytoplasma's in siergewassen: een groeiend probleem? Gewasbescherming 37(5) 212-215

Elberse, I.A.M.; 2004.
Wortelknobbelaaltjes in de boomkwekerij. Gewasbescherming 35 (5). - p. 263 - 264.

Epstein, A.H., J.H. Hill; 1999.
Status of rose rosette disease as a biological control for multiflora rose. Plant Disease 83 (2): 92 -101.

Epstein, A.H., J.H. Hill, F.W. Nutter, 1997.
Augmentation of rose rosette disease for biocontrol of multiflora rose. Weed Science, 45:172-178

Epstein, A.H., J.H. Hill; 1995.
The biology of rose rosette disease: a mite-associated disease of uncertain aetiology.
J. Phytopathology 143:353-360

Galton, A.W. 1997.
Levensprocessen van planten, Natuur & Techniek, Beek

Gao, R. G.M. Zhang, YF Lan, T.S. Zhu, X.Q. Yu, X.P. Zhu and X.D. Li (2007).
Molecular Characterization of Phytoplasma Associated with Rose Witches' -Broom in China.
J. Phytopathology 156, 93–98

Hiemstra, J.A., F. M. Maas, J. van Doorn, H. Helsen, H. kemp, KTK. Pham, B.J. van de Sluis, 2007.
Pear Decline in Pyrus en peer in Nederland; Verslag van een oriënterend onderzoek. PPO, Lisse.

Hollinger Th en A.F.L.M. Derks 1984.
Het aantonen van mycoplasma's in gladiolen. Gewasbescherming 15(6): 179-183

Hong, C., M.A. Hansen, S. DeBolt; 2002.
Rose Rosette Disease. Plant Disease Fact Sheets Publication: 450-620W

Horst, M. van der; 1998.
Plagen in de boomkwekerij, verantwoord bestrijden en beheersen, Boomteelt Praktijkonderzoek, Boskoop.

Hoorn, B. van der; 2010.
Nederlandssoortenregister. Naturalis. online beschikbaar: www.nederlandsesoorten.nl

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Hoof, H.A. van, H. Huttinga, A. Knaap, H.P. Maas Geesteranus, W.H.M. Mosch, D.G.J. De Raay; 1979.
Tumours of Begonia and some other ornamentals, induced by Corynebacterium fascians.
Neth. J. Pl. Path. 85

Horst, R.K., R.A. Cloyd; 2007.
Compendium of Rose Diseases and Pests –Second Edition. The American Phytopathological Society. Minnesota.

Huxley, A.; M. Griffiths; M. Levy (Eds.) 1992.
Dictionary of Gardening. The New Royal Horticultural Society. London. 106.

Jarausch, W., B. Jarausch, J.L. Danet, J.M. Broquaire, F. Dosba, C. Saillard, and M. Garnier (2001).
Detection and indentification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France.
European Journal of Plant Pathology 107: 209–217.

Kamińska, M., M. Podwyszyńska H. Sliwa; 2005.
Phytoplasma detection in rose shoots propagated in vitro. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 74(3): 181-186

Kamińska, M., H. Sliwa; 2004.
First report of phytoplasma belonging to Apple Proliferation group in roses in Poland.
Plant Dis. 88: 1283

Kamińska, M., H. Sliwa, T. Malinowski, Cz. Skrzypczak; 2003.
The Association of Aster Yellows Phytoplasma with Rose Dieback Disease in Poland.
J. Phytopathology 151, 469–476

Kamińska, M., D. Dziekanowska, A.Rudzińska-Langwald; 2001a.
Detection of Phytoplasma Infection in Rose, with Degeneration Symptoms. J. Phytop. 149: 3-10

Kamińska, M., D. Dziekanowska, M. Wiśniewska-Grzeszkiewicz; 2001b.
Molecular evidence for the presence of aster yellows related phytoplasma in rose plants.
Acta Hort. 547: 365-370

Lee, I-M., R. E. Davis, and D. E. Gundersen-Rindal. 2000.
Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. Annu. Rev. Microbiol. 54: 221-255.

Lorenz, K.H., B. Schneider, U. Ahrens, E. Seemüller; 1995.
Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasma's by PCR Amplification of Ribosomal and Nonribosomal DNA. The American Phytoplathological Society 85 (7): 771-776

McCoy, R.E.; 1982.
Use of Tetracycline Antibiotics to Control Yellows Diseases. Plant Disease. Vol. 66 No. 7 539-542

Manfred, J. 2010.
Fauna Europaea: Cicadellidae. Fauna Europaea version 1.1. online beschikbaar: www.faunaeur.org

Martin, P. (eds.); 1998.
Botanica's Roses. The Encyclopedia of Roses. Random House Australia Pty Ltd.

Meijer H; 2005.
Kroeskop-mysterie stap verder ontrafeld. De Boomkwekerij 40: 12-13

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Meijer, H. 2006.
Bestrijding van fytoplasma's en kroeskoppen in rozen. (Hand-out)

Murai, N., f. Skoog, M.E. Doyle, R.S. Hanson; 1980.
Relationships between cytokinin production, presence of plasmids, and fasciation caused by strains of *Corynebacterium fascians*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA- Microbiolgy 77(1) 619-623.

Nipah, J.O., P. Jones and M. J. Dickinson; 2007.
Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut palms infected with Cape St Paul wilt disease in Ghana. Plant Pathology 56, 777–784

Nyland, G.; W.J. Moller; 1973.
Controle of Pear Decline with a Tetracycline. Plant Disease Reporter. Vol. 57, No. 8: 634-637

Nijveldt, W.; 1966.
De Alainziekte van de roos en de oculatiegalmug. IPO, Mimeographed Rep. R400: 4pp.

Pataky, N.R. 1988.
Virus and virus-like diseases of roses. University of Illinois. Report on Plant Diseases: 632: 4-5

Salem, N.M., D.A. Golino, B.W. Falk, A. Rowhani: 2008a.
Complete nucleotide sequences and genome characterization of a novel double-stranded RNA virus infecting Rosa multiflora. Arch Virol 153: 455–462

Salem N.M., W.A. Miller, A. Rowhani, D.A. Golino, A.L. Moyne, B.W. Falk; 2008b.
Rose spring dwarf-associated virus has RNA structural and gene-expression features like those of Barley yellow dwarf virus. Elsevier Virology 375: 354-360

Silvestro, S.R., G.B. Chapman; 2004.
A transmission electron microscope study of "New Dawn" climber rose (Rosa wichuraiana safrano) exhibiting rose rosette disease. Plant Cell Report 23: 345–351

Davis, R.E., R.F. Whitcomb, R.L. Steere; 1968.
Remission of Aster Yellows Disease by Antibiotics. Science, New Series, 161(3843): 793-795

Sun, Q.; G Zhou, H. Sun; G. Giang; 2008.
Effect of auxins on in vitro propagation of sour jujube infected by witches' broom phytoplasma, International Jujube Symposium , International Society for Horticultural Science

Tassart-Subirats, V.; Clair, D., Grenan; S., Boudon-Padieu; E., Larrue, J.; 2003.
Hot water treatment: Curing efficiency for phytoplasma infection and effect on plant multiplication material. Extended Abstracts 14th Meeting of the ICVG, September 12-17, 2003 Locorotondo (Bari), Italy, 69-70.

Teixeira, D.D.C., C. Saillard, S. Eveillard; 2005.
'Candidatus Liberibacter americanus', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 1857–1862

Welliver, R.; 1999.
Diseases caused by phytoplasmas. Plant Pathology Circular Vol. 25 No.1 17-22

Weintraub, P.G.; P. Jones (eds.); 2010.
Phytoplasmas, Genomes, Plant Hosts and Vectors. CAB International. Oxfordshire.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Bijlage: DNA-sequentie van fytoplasma in Roos

In 2004 zijn van twee rozen een stukje DNA van de gevonden fytoplasma's gesequenced (gedetermineerd) als een Aster Yellows fytoplasma. De DNA-sequentie die destijds is verkregen staat hier weergegeven.

>Rose 1, fU5
TGACAGAGTATTCGGTCGTAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATG
GAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGGGTGCGTAGGCTGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATG
CTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGC
AAGTGGAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACA
CCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAA
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGT
ACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACG
GGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGG

>Rose 1, rU5
CGACAGTCTAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCAATT
TATCACTGGCAGTCTTGCTAAAGTCCCCACCATTACGTGCTGGCAACTAA
CAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG
AGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTGCAACTGATAACCTCCACTGTGT
TTCTACAGCTTTGCAGAAGCATGTCAAGACCTGGTGAGGTTTTTCGGGTA
CCTTCGAATTAAACAACATGATCCACCGCTTGTGCGGAGTCCCGTCAATT
CCTTTAAGTTTCATACTTGCGTACGTACTACTCAGGCGGAGTACTTAATG
TGTTAACTTCAACACTGGTTTTACCCAACGTTTAGTACTCATCGTTTACG
GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGC
CTCAGCGTCAGTAAAGACCCAGCAAGCCGCCTTCGCTACTGGTGTTCCTC
CATATATTTACGCATTTTACCACTACACATGGAATTCC

>Rose 2, fU5
TCGGTCGTAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATT
CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGT
GCGTAGGCTGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGT
GATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATTC
CACGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAA
GGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAA
ACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGA
GTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCAC
AAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGT

>Rose 2, rU5
GGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCAATTTATCACTGG
CAGTCTTGCTAAAGTCCCCACCATTACGTGCTGGCAACTAACAATAAGGG
TTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA
CAACCATGCACCACCTGTGCAACTGATAACCTCCACTGTGTTTCTACAGC
TTTGCAGAAGCATGTCAAGACCTGGTGAGGTTTTTCGGGTACCTTCGAAT
TAAACAACATGATCCACCGCTTGTGCGGAGTCCCGTCAATTCCTTTAAGT
TTCATACTTGCGTACGTACTGCTCAGGCGGAGTACTTAATGTGTTAACTT
CAACACTGGTTTTACCCAACGTTTAGTACTCATCGTTTACGGCGTGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTCAGCGTC
AGTAAAGACCCAGCAAGCCGCCTTCGCTACTGGTGTTCCTCCATATATTT
ACGCATTTTACCACTACACATGGAATTC

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Bijlage: Detectieprotocol

Protocol isolatie DNA van fytoplasma-verdacht materiaal
(gebaseerd op isolatieprotocol van Qiagen)

- □ Neem van de te onderzoeken takken bladnerven en bast (zeefvaten)
- □ Maal dit fijn in buffer met behulp van een hamer en sterke plastic zak (Agdia)
- □ Voeg aan maximaal 100mg plantmateriaal 400µl *Buffer AP1* toe en maal het materiaal fijn.
  Voeg hierna 4µl *RNase A stock solution* toe.
- □ Incubeer 10 minuten bij 65°C, mix tussendoor 2-3 keer.
- □ Voeg 130µl *Buffer AP2* toe, mix en incubeer 5 minuten op ijs.
  Eventueel bij veel precipitatie afdraaien en supernatant in volgende stap gebruiken.
- □ Doe het lysaat in de QIAshredder Mini Spin kolom (lila) en centrifugeer 2 minuten bij 14.000 rpm.
- □ Pipetteer het supernatant in een nieuw vaatje zonder de pellet te verstoren.
- □ Voeg 1.5 volumedeel *Buffer AP3/E* toe en mix met de pipet.
- □ Doe 650µl van de mix met de eventueel gevormde neerslag in een DNeasy Mini Spin kolom (wit) en centrifugeer 1 minuut bij 8000 rpm.
- □ Herhaal de vorige stap met de rest van het monster.
- □ Plaats de DNeasy Mini Spin kolom in een nieuw 2 ml vaatje (bijgeleverd) en voeg 500µl *Buffer AW* toe.
  Centrifugeer 1 minuut bij 8000 rpm.
- □ Giet de vloeistof af en herhaal de vorige stap, maar centrifugeer 2 minuten hoogste stand.
- □ Doe de DNeasy Mini Spin kolom in een 1,5 ml vaatje en pipetteer 50-100µl *Buffer AE* ***65°C*** op het membraan.
  Incubeer 5 minuten op kamertemperatuur en centrifugeer vervolgens 1 minuut bij 8000 rpm.
- □ In reactie van PCR volgens standaard procedures PPO BBF: 2.5 microliter gezuiverd DNA in totaalvolume van 25 microliter
- □ Resultaten zichtbaar als band onder UV-licht

Protocol voor PCR:

PCR-mix	1 reactie
□ Master-mix	12,5 µl
□ Milli Q	8 µl
□ Primer for.	1 µl
□ Primer rev.	1 µl
Mix per vaatje	22,5 µl
Monster (DNA)	2,5 µl
Totaal	25 µl

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Bijlage: Sequenties van gebruikte primers in project

Primers	Sequentie (5'-3')	Grootte DNA-fragment (Ca.)	Specificiteit	Referentie
P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T			
P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT	1800 bp	Fytoplasma universeel	Schneider, 1995
R16F1	AAG ACG AGG ATA ACA GTT GG			
R16R0	GGA TAC CTT GTT ACG ACT TAA CCC C	1300 bp	Fytoplasma universeel	Lee, 1995
R16F2n	GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG			
R16R2	TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G	1200 bp	Fytoplasma universeel	Lee, 1995
Fu5	CGG CAA TGG AGG AAA CT			
Ru3	TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA	880 bp	Fytoplasma universeel	Lorenz, 1995
NPA2F	ATG ACC TGG GCT ACA AAC GTG A			
NPA2R	GGT GGG CCT AAA TGG ACT CG	485 bp	Fytoplasma universeel	Heinrich, 2001
Rm-rRNAFor	GTG CGG GTG GTT TCG TCG TCT T			
Rm-rRNARev	GAT TGT CGT GGC GTT GGT CG	350 bp	roos	Dit project
LCO	GCT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G			
HCO	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	700 bp	cicade	Folmer, 1994
VCF	ATC ATT TGT AGC GAC T		*Agrobacterium*	Sawada, 1995
VCR	AGC TCA AAC CTG CTT C	730 bp	*tumefaciens*	
CLi.po.F	TAC GCC CTG AGA AGG GGA AAG ATT		*Candidatus*	Secor, 2009
O12c	GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T	1070 bp	Liberibacter	Ahmad, 2008
JRE left	GGG AAT TCC GAC CGT ATC CAG TGT		*Rhodococcus*	
JRE right	CGG GAT CCA TAT CGA ACC GCC CTC	225 bp	*fascians*	
LutFor	TGG CGC CAC CTG GAA TGT AGG			
LutRev	GGG ACG TCG CTA CCT GCT GGA AAT	418 bp	RSDaV	Salem, 2008

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)

Bijlage: Stamboom met kroeskop-gevoelige rassen.

© Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)