

Waardplantonderzoek *Prunus laurocerasus* voor *Xanthomonas*.

Consultancy-onderzoek

Fons van Kuik en Trees Hollinger

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van
Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit
Maart 2010
PPO nr. 32 341081 00/PT nr. 13556-19

© 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, Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit.

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

De bomen- en vaste plantensector investeert in dit project via het  Productschap **Tuinbouw**

Projectnummer: PPO nr. 32 341081 00
PT nr. 13556-19

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit

Adres : Postbus 85, 2160 AB Lisse
: Prof. van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse
Tel. : +31 252 462 121
Fax : +31 252 462 100
E-mail : info.bomen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Samenvatting

In de teelt van *Prunus laurocerasus* komt de laatste jaren een nieuwe ziekte voor, veroorzaakt door de Q-bacterie *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* (Xap).

Op 9 oktober 2009 is een door de NBvB georganiseerde Xanthomonas-bijeenkomst geweest. Gezien de ernst van de situatie voor de boomkwekerijsector is geadviseerd om snel onderzoek te doen naar de verspreiding van Xap in *Prunus*. Deze consultancy is direct daarna gestart.

Het doel was om een protocol te ontwikkelen om *Prunus*soorten snel en betrouwbaar te toetsen op kwetsbaarheid voor Xap. De consultancy heeft zich beperkt tot de bladhoudende *Prunus laurocerasus*. Het gehele *Prunus* sortiment inclusief de bladverliezende soorten, o.a. *P. avium* wordt getest in het grote *Prunus*project (PT nr. 13934) dat in 2010 van start is gegaan en loopt tot en met 2013.

Uit dit consultancyonderzoek kunnen de volgende voorlopige conclusies worden getrokken:

- Een Xap-isolaat dat afkomstig was van een bladverliezende *Prunus*soort gaf geen ziekteverschijnselen in *P. laurocerasus*. Een Xap-isolaat afkomstig van *P. laurocerasus* gaf wel ziekteverschijnselen in *Prunus laurocerasus*. Vervolgonderzoek moet aantonen of de virulentie van Xap soortspecifiek is.
- Voordat proeven worden gedaan met een Xap-isolaat is het eerst nodig om de virulentie te testen.
- Een protocol is ontwikkeld voor waardplantonderzoek voor *P. laurocerasus*. Het protocol kan worden gebruikt in vervolgonderzoek, waar het eventueel verder kan worden aangepast.

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	3
1 AANLEIDING EN PROBLEEMSTELLING.....	7
2 DOELSTELLING	7
3 WERKWIJZE.....	9
4 RESULTATEN EN DISCUSSIE	11
4.1 Protocol uittesten.	11
4.2 Ontwikkeling protocol.....	12
4.3 Detectie van Xap mbv PCR	13
4.4 Infectieprotocol	14
5 VOORLOPIGE CONCLUSIES	19
6 AANBEVELINGEN.....	21
BIJLAGE 1 FACTSHEET <i>XANTHOMONAS ARBORICOLA</i> PV. <i>PRUNI</i>	23
BIJLAGE 2 DATA SHEET <i>XANTHOMONAS ARBORICOLA</i> PV. <i>PRUNI</i>	25
BIJLAGE 3. DISTRIBUTION MAP <i>XANTHOMONAS ARBORICOLA</i> PV. <i>PRUNI</i>	31
BIJLAGE 4 DIAGNOSTICS <i>XANTHOMONAS ARBORICOLA</i> PV. <i>PRUNI</i>	33

1 Aanleiding en probleemstelling

In de teelt van *Prunus laurocerasus* komt de laatste jaren een nieuwe ziekte voor. Op bladeren verschijnen bladplekken, die snel kunnen samensmelten en uitgroeien tot grote vlekken. Tevens kan bladval optreden. Uit eerder onderzoek in 2009 is door PPO Diagnostiek door middel van PCR-detectie in bladplekken van bladhoudende *Prunus laurocerasus* cultivars 2 bacteriesoorten: *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* en *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* aangetroffen. De diagnose werd bevestigd door de Plantenziektkundige Dienst. Aangezien *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* (Xap) op de EPPO-lijst* staat van quarantaine (Q) –organismen is duidelijk dat de bladhoudende Prunusteelt grote risico's loopt.

Op 9 oktober 2009 is een door de NBvB georganiseerde Xanthomonas-bijeenkomst geweest, waarin de ernst van de situatie is besproken. Tijdens de bijeenkomst werd gemeld dat Xap tot dan toe in 2 Prunussoorten (*P. laurocerasus* en *P. lusitanica*) was aangetroffen. Gezien de ernst van de situatie en de wens om snel een indruk te krijgen van de gevoeligheid van het Prunus-sortiment voor deze nieuwe bladplekkenziekte is de wens uitgesproken om een screeningsonderzoek te starten. Deze consultancy is direct daarna gestart en heeft zich beperkt tot de bladhoudende Prunus-soorten. Het gehele Prunus sortiment inclusief de bladverliezende soorten, o.a. *P. avium* wordt getest in het grote Prunusproject (PT nr. 13934) dat in 2010 van start is gegaan en loopt tot en met 2013.

Door middel van infectieproef wordt een aantal bladhoudende Prunus-soorten gescreend op hun vatbaarheid voor de bacterie *Xanthomonas arboricola* pv *Pruni*, de veroorzaker van de 'nieuwe' bladplekkenziekte in *Prunus laurocerasus*.

*European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)

[http://archives.eppo.org/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02\(19\)_A1A2_2010.pdf](http://archives.eppo.org/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02(19)_A1A2_2010.pdf)

2 Doelstelling

In deze consultancy wordt in het laboratorium waardplantenonderzoek gedaan met verschillende bladhoudende Prunussoorten en cultivars voor de bacterie *Xanthomonas arboricola* pathovar *pruni*.

3 Werkwijze

Voor de screeningsproef met diverse cultivars is een protocol ontwikkeld. De uitgangsprotocolen waren: protocol EPPO 7/64 (1) zie bijlage 4, en PD vergunning TRCPD/2008/4728.

Pathogeniteitstest *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* volgens EPPO 7/64 (1) (op blad van *Prunus* c.v. Sunhigh)

- Jong volwassen bladeren (3^e- 6^e blad van de top van de plant) worden geplukt van in de kas gekweekte planten.
 - De bladeren voorzichtig wassen onder kraanwater.
 - Desinfecteren met 70% ethanol 40-60 sec.
 - Meerdere keren spoelen met steriel water.
 - Bacteriesuspensie in concentratie 10⁷ cfu per ml klaarmaken
 - Hele bladeren op steriel filtreerpapier leggen, onderzijde boven.
 - Inoculum aanbrengen met plastic wegwerp injectiespuit zonder naald; open einde van de injectiespuit op het blad drukken en weinig druk geven, totdat 2-4 mm Ø bladweefsel waterig is gekleurd. 8-10 spots aanbrengen per blad. ca. 1 cm ruimte laten tussen de spots. Overtollig inoculum afdeppen.
 - Negatieve controle met water opbrengen i.p.v. inoculum
-
- Alle bladeren worden bewaard in een petrischaal met 0.5% wateragar en 2 weken geïncubeerd bij 25° met 16 uur laag UV licht.
 - Na 6-9 dagen moet uitbreiding te zien zijn van de waterige plekken, die daarna donkerbruin en deels necrotisch worden met een grijs-witte of paarskleurige rand.

Er is gewerkt met het door EPPO voorgeschreven Xap-isolaat LMG 852. In de laatste proef is gewerkt met Xap-isolaat PD 5659.

Met deze isolaten zijn de proeven uitgevoerd. Het opschonen/screenen van nieuwe isolaten uit vers bladmateriaal neemt veel tijd in beslag. Dit wordt uitgevoerd in het grote *Prunus* project.

4 Resultaten en discussie

4.1 Protocol uittesten.

Van 3 dagen oude schalen Nutrient Yeast Agar (NYA) met Xap (LMG 852) bacteriën werd het inoculum gemaakt, bestaande uit een bacteriesuspensie van ongeveer 10^7 cfu/ml. De dichtheidsbepaling is gebeurd door middel van de voor het PPO-lab gebruikelijke lichtdoorlaatbaarheidmethode met behulp van een spectrofotometer.

Ter controle werd op 3 NYA schalen 100 µl van het inoculum gepipetteerd en met steriele glasparsels over de plaat verdeeld. Glasparsels weggenomen en schalen in 25°C stoof gezet. Na 4 dagen bleek dat er maar 1 à 2 kolonies per plaat uitgroeiden, terwijl er 10-50 kolonies per plaat werden verwacht. De bacteriesuspensie was 1x te ver doorverdund en het inoculum had dus een te lage dichtheid bacteriën.

Deze eerste proef d.d. 19 november 2009 werd uitgevoerd op bladeren van cultivar Otto Luyken. Deze bladeren waren afkomstig van planten uit de sortimentstuin, Rijnveld, Boskoop. Deze zijn volgens protocol ontsmet. Onderzijde van het blad werd droog gedept met steriel filtreerpapier.

Eerst is de controle met waterbehandeling uitgevoerd. Een 5 ml Injectiespuit zonder naald, gevuld met water werd met lichte druk in het blad gedrukt, zie foto 1. Drie blaadjes werden in een petrischaal met 0.5% wateragar gelegd.



Foto 1. Methode van inoculum aanbrengen.



Foto 2. Bewaring van geïnoculeerde bladeren in een broedstoof.



Daarna is een nieuwe injectiespuit gevuld met het inoculum (bacteriesuspensie van ongeveer 10^6 cfu/ml en een nieuwe serie van 6 blaadjes werd geïnoculeerd. Bladeren werden ook in een petrischaal met wateragar gelegd. 2 schalen met 3 bladeren. Alle schalen werden met parafilm afgesloten om vochtverlies tegen te gaan, en weggezet in een broedstof bij 25° (foto 2).

De platen werden dagelijks bekeken op infectieverschijnselen. Na 7 dagen waren er nog steeds geen infectieverschijnselen te zien.

De inoculatieplekken zagen er droog uit. Op foto 3 is te zien dat de geïnoculeerde bladeren, met de bovenzijde van het blad op wateragar, ook na 7 dagen nog geen aantasting was te zien.

Foto 3. Na 7 dagen waren nog geen ziekteverschijnselen te zien.

Deze proef laat zien dat de infectie niet was gelukt met de beschreven methode. Mogelijke verklaringen voor het ontbreken van infectieus vermogen zijn:

1. Ouderdomsresistentie, de bladeren waren te oud waardoor de bladeren minder vatbaar waren voor infectie. In de proefperiode waren geen groeiende Prunusscheuten aanwezig.
2. Het gebruikte Xanthomonas-isolaat was in deze proef niet of minder virulent, mogelijk dat een plasmide ontbrak.
3. Na controle van het inoculum bleek dat de bacteriedichtheid lager was dan was gepland. Misschien dat in combinatie met bovenstaande verklaringen deze lagere bacteriedichtheid onvoldoende was voor een succesvolle infectie.

4.2 Ontwikkeling protocol

De proef is herhaald d.d. 3 december 2009 met bladeren van cultivar Rotundifolia. De planten waren in de kas opgekweekt. De gebruikte bladeren waren zachter dan die de vorige proef (zie 4.1)

Bladeren werden ontsmet volgens protocol, droog gedept en met injectiespuit zonder naald 10 spots per blad aangeduwd. Daarna werd 20 μ l water of bacterie-suspensie van Xap (LMG 852) op de spots aangebracht en na 5 minuten werd de overtollige suspensie afgedept. Per petrischaal met 0.5% wateragar werden 3 bladeren gelegd en de schaal werd met parafilm afgesloten. 1 schaal was de controle met water behandeling en 3 schalen met Xap. De schalen werd weggezet in een broedstof bij 25°C .

De bacteriesuspensie had een dichtheid van meer dan 10^7 cfu/ml. Dit bleek uit de controle die is uitgevoerd met uitplantingen op NYA-platen en het tellen van kolonies die na 4 dagen waren verschenen.

Na 12 dagen waren op de bladeren nog steeds geen symptomen te zien. Wel wat glazige randjes, maar die werden ook gezien in een aantal spots van de controle (foto 4 en 5).



Foto 4. 12 dagen na besmetting met Xap is geen aantasting te zien.



Foto 5. Controlebehandeling met water

Deze tweede proef laat zien dat de infectie niet was gelukt met de beschreven methode. Aangenomen mag worden dat ouderdomsresistentie nu geen rol speelde in het uitblijven van ziekteverschijnselen. De gebruikte bladeren waren afkomstig van groeiende scheuten van *Prunus* en waren nog niet volledig afgehard. Ook was het inoculum nu op de juiste bacteriedichtheid, meer dan 10^7 cfu/ml.

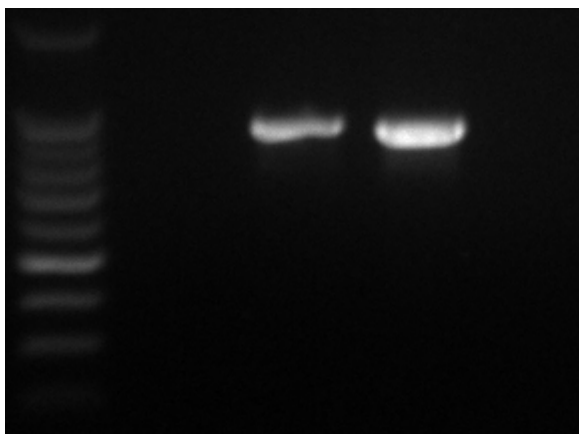
Waarschijnlijk was het gebruikte Xap-isolaat in deze proef niet of minder virulent, mogelijk dat een plasmide ontbrak. Ook kan de herkomst van Xap (LMG 852) een rol spelen. Xap LMG 852 is afkomstig van een bladverliezende *Prunus*soort. Mogelijk dat de fysiologie van bladeren van *P. laurocerasus* zodanig anders is dan die van bladverliezende *Prunus*soorten dat Xap niet virulent is bij *P. laurocerasus*.

Gezien het grote praktische belang voor de boomkwekerijsector en -handel is het belangrijk dat dit nader onderzocht wordt in het grote *Prunus* vervolgonderzoek.

Ter controle is onderzocht of Xap kon worden aangetoond in geïnoculeerde plekken, waaruit geen ziekteuitbreiding zichtbaar was. Dit is gebeurd met een PCR-toets.

4.3 Detectie van Xap mbv PCR

Van bladmateriaal zijn 3 monsters (uit 4.3) genomen voor PCR analyse. 1 monster van de controle behandeling en 2 direct vanuit de inoculumplek. Er was geen uitbreiding van de infectie zichtbaar. Per monster werd ongeveer 100 mg bladweefsel fijn gemalen om het DNA te isoleren met behulp van agowa Kit. Er is een verdunning gemaakt van 1:20 voor DNA-analyse. De resultaten zijn in foto 11 weergegeven.



Marker controle inoculum 1 inoculum 2 water

Foto 11. 2 streepjes (Xap) zijn zichtbaar in de monsters die genomen zijn van de inoculumplekken.

Bladmonster van de onbehandelde controle gaf zoals verwacht geen reactie. De monsters van de geïnoculeerde bladeren gaven een positieve reactie op aanwezigheid van Xap. Uit deze analyse bleek dat ofschoon de planten geen infectieverschijnselen lieten zien, dat er wel inoculum of DNA van Xap aanwezig was. Echter, een PCR-toets maakt geen onderscheid tussen dode of levende bacteriën.

4.4 Infectieprotocol

In deze proef is gewerkt met een van de Plantenziektenkundige Dienst verkregen nieuw Xap isolaat PD 5659, nu afkomstig van *P. laurocerasus*.

Er zijn 4 behandelingen:

- 1 petrischaal met controle water
- 2 petrischalen met *X.a.pruni*, 5 min*, 20 µl/ spot
- 1 petrischaal met *X.a.pruni*, 10 min*, 20 µl/ spot
- 1 petrischaal met *X.a.pruni*, 30 min*, 20 µl/ spot

* het aantal minuten is de tijd dat het druppeltje inoculum op het prunusblad bleef liggen. Daarna werd het druppeltje inoculum weggedept met een filtreerpapiertje.

Schalen zijn weggezet in een 25°C broedstoof.

Deze keer zijn de bladeren aan bovenzijde geïnoculeerd en werden de bladeren met de onderzijde op de agar gelegd. Verder is dezelfde werkwijze gevolgd als bij de eerder infectieproeven.

Na controle door middel van uitplatingen bleek dat de bacteriedichtheid van het inoculum 4.5×10^8 cfu/ml te zijn geweest. Per spot werd 20 µl inoculum aangebracht, dat waren dus ongeveer 9000 bacteriën per spot.

Na 11 dagen zijn de bladeren in de schalen beoordeeld. Opvallend was dat de spots van de bladeren die goed contact hebben gehad met de agar meer ziekteverschijnselen lieten zien dan spots die niet direct in contact waren met de agar. Infecties zijn te zien als waterige ring rondom het inoculatiepunt.

Bij de controlebehandeling waren buiten de inoculatiepunten geen waterige randen te zien. (foto 7)



Foto 7. Controlebehandeling met water. Er is geen uitbreiding van een waterige vlek zichtbaar. Op de foto is de plaat van onder, door de agar heen gefotografeerd
Behandeling 5 minuten met Xap.



Foto 8. Behandeling, 5 minuten met Xap. Bij ongeveer 1 van de 3 spots is uitbreiding van een waterige vlek zichtbaar. Op de foto is de plaat van onder, door de agar heen gefotografeerd

Behandeling 10 minuten met Xap.



Foto 9. Behandeling, 10 minuten met Xap. Bij ongeveer de helft van het aantal spots is uitbreiding van een waterige vlek zichtbaar. Op de foto is de plaat van bovenaf gefotografeerd

Behandeling 30 minuten met Xap.



Foto 10. Behandeling, 30 minuten met Xap. In dit blad waren bij alle spots uitbreiding van een waterige vlek zichtbaar.

Op de foto is de plaat van bovenaf gefotografeerd. Deze behandeling bestond uit 2 bladeren, 10 spots per blad. Het andere blad liet niet zo een duidelijk zichtbare waterige uitbreiding van de vlekken zien (niet op de foto weergegeven).

De resultaten van de infectieproef zijn in tabel 1 weergegeven. Weergegeven is het gemiddeld aantal mm uitgroei van de waterige vlek, gemeten vanaf de rand van de drukplek.

Tabel 1. Uitbreiding van infectie, gemeten 14 dagen na opbrengen van ongeveer 9000 bacteriën Xap per spot.

nr	Beh.	Totaal spots	Infectie			
			0-1 mm**	1-2 mm	2-3 mm	3-4 mm
1	controle	31	7			
2	5 min a	30	0	11		
3*	5 min b	32	2	10		
4	10 min	20	9	6	5	
5	30 min	20	10	2		8

* nr 2 en 3 zijn herhalingen met dezelfde behandeling.

**geen duidelijke infectie

De controle bladeren lieten een reactie zien van de methode. De injectiespuit gaf een verwonding die zorgde dat het inoculatierondje werd afgestoten door het blad. Bij de controle was soms heel weinig reactie te zien van de randjes van de verwonding, zie kolom 0-1 mm. Bij de behandelingen met Xap waren wel infectiereacties te zien, de uitbreiding was groter dan 1 mm. Bij 5 minuten was bij ongeveer een derde van het aantal spots een reactie te zien. Alle reacties bleven in de categorie 1-2 mm. Bij 10 minuten was iets meer dan de helft van het aantal spots infectie te zien. Een aantal viel in de categorie 2-3 mm. Bij 30 minuten gaf de helft van het aantal spots infectie te zien. De meeste infecties vielen in categorie 3-4 mm. Het lijkt erop dat de tijdsduur dat het inoculum dat op het blad blijft liggen van invloed is op de snelheid van symptoomontwikkeling. Deze proef laat zien dat 30 minuten de duidelijkste symptomen laat zien na 14 dagen incubatie. Misschien is het zelfs beter om het inoculum helemaal niet af te deppen. Het afdeppen verlaagt waarschijnlijk het inoculum zodanig dat de ziekteontwikkeling wordt vertraagd. Voor het waardplantonderzoek is de snelheid van ontwikkeling van symptomen een pluspunt.

Deze resultaten lieten zien dat het aanbrengen van 20 µl inoculum met een bacteriedichtheid van 4.5×10^8 cfu/ml na 14 dagen duidelijk symptomen gaf bij het gebruik van een virulent Xap-isolaat. Het uiteindelijke aantal bacteriën dat nodig is voor een succesvolle infectie is moeilijk in te schatten. Het inoculumdruppeltje is namelijk na maximaal 30 minuten afgedept. Onbekend is hoeveel bacteriën hiermee zijn verwijderd. Bacteriën hebben even tijd nodig om te hechten. Bij voldoende tijd speelt een verschil van 1000 of 10.000 bacteriën per spot waarschijnlijk niet zo een grote rol meer. Als Xap bacteriën zich eenmaal hebben gevestigd dan vermenigvuldigen ze zich snel.

Uit deze proef kan worden geconcludeerd dat een inoculumdichtheid van ongeveer 10^8 cfu/ml nodig is voor het protocol voor waardplantonderzoek.

Gedurende deze consultancy werd duidelijk dat het ontwikkelen van een protocol voor waardplantonderzoek meer tijd nodig had dan gedacht.

Tevens namen in het najaar van 2009 de problemen van Xap in de teelt van Prunus flink toe. Daarom is eind 2009 een groot project: *Beheersing bacterieziekte in Prunus* geschreven en van start gegaan. Het waardplantonderzoek is vanaf begin 2010 overgenomen door dit grote Prunusproject en maakt een belangrijk deel uit van het project. Dit consultancy-onderzoek heeft een basis gelegd voor het vervolgonderzoek en heeft ervoor gezorgd voor een snelle start van het vervolgonderzoek.

Dit consultancy-onderzoek heeft ook een bijdrage geleverd aan de Factsheet over *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* in Prunus spp., dat eind november 2009 is verschenen, zie bijlage 1.

5 Voorlopige conclusies

- Een Xap-isolaat dat afkomstig is van een bladverliezende Prunussoort gaf geen symptomen in *P. laurocerasus* 'Otto Luyken'. Een Xap-isolaat afkomstig van *P. laurocerasus* gaf wel ziekteverschijnselen in *Prunus laurocerasus* 'Rotundifolia'. Onderzoek moet aantonen of de virulentie van Xap soortspecifiek is.
- De dichtheid van het inoculum van Xap zou ongeveer 10^8 cfu/ml moeten zijn.
- Het inoculum heeft enige tijd nodig om een succesvolle infectie te bewerkstelligen
- Inoculatiepunten op de bladeren die direct contact hadden met de agar lieten meer infectie zien dan inoculatiepunten die geen direct contact met de agar hadden.

6 Aanbevelingen

- Voordat proeven worden gedaan met een Xap-isolaat is eerst nodig om de virulentie te testen.
- Aanbevolen wordt om onderzoek te doen naar soortspecifieke virulentie van Xap-isolaten.
- Het afdeppen van het inoculum na een bepaalde inwerktijd zou achterwege gelaten moeten worden.
- Interessant is om in vervolgonderzoek te bepalen of er mogelijkheden zijn voor het gebruiken van niet-virulente Xap-isolaten om infecties van virulente isolaten te voorkomen.
- Voor uitgebreid waardplantonderzoek wordt aanbevolen om contact op te nemen met W.H. (Wout) Kromhout, beheerder van de Nederlandse Planten Collectie van *P. laurocerasus*. In deze collectie staan 60 cultivars, zowel de oude cultivars als het moderne sortiment.

Bijlage 1 Factsheet *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Voor volledige tekst, zie <http://www.tuinbouw.nl/files/Factsheet%20Xanthomonas.pdf>



Sinds afgelopen zomer is in Nederland op meerdere kwekerijen verspreid over heel Nederland de bacterieziekte *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* (Xap), een quarantaineorganisme, geconstateerd. Vooral nog is deze bacterie alleen aangetroffen in cultivars van *Prunus laurocerasus*. In Nederland wordt op vele honderden hectaren dit gewas gekweekt. Bekend is dat deze bacterie ook andere *Prunus*soorten kan infecteren. Om verspreiding van quarantaineorganismen te beperken wordt in Europa een stringent beleid gevoerd. Voor kwekers met *Prunus* waarin *Xanthomonas* wordt aangetroffen kan deze ziekte grote consequenties hebben. Deze factsheet informeert u over de aantasting en welke maatregelen u kunt nemen om eventuele schade zoveel mogelijk te beperken.



Otto Luyken met Xap

Herkenning

De symptomen van *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* bestaan uit bladplekken. De bacterie infecteert het blad via natuurlijke openingen en via beschadigingen. Aanvankelijk zijn de vlekjes klein, lichtgroen tot gelig groen en zichtbaar aan de onderzijde van het blad. Bij het uitgroeien en verder ontwikkelen van de infectie, worden de bladplekken ook aan de bovenzijde van het blad goed zichtbaar als gelig groene vlekken waarvan het centrum afsterft en bruin verkleurd. Uit aantastingen in het verleden in het buitenland is gebleken dat ook takken en twijgen kunnen worden aangetast en reageren met de vorming van kankers. Hierin handhaaft zich de bacterie. Vanuit deze infecties kunnen nieuwe infecties ontstaan. De symptomen ontwikkelen zich in Nederland vooral in het najaar, maar kunnen (met name bij laurierkers) ook voorkomen in het eerste deel van de zomer. Inmiddels is *Xanthomonas* in meerdere monsters uit *Prunus laurocerasus*, aangetoond op diverse locaties in Nederland. De bacterie werd gevonden in de cultivars 'Otto Luyken', 'Rotundifolia', 'Novita', 'Etna', 'Anbri', 'Herbergii', 'Mischeana' en 'Caucasia'. De bacterie wordt voornamelijk aangetroffen bij gewassen in potten en containers, maar ook bij gewassen in de vollegrond. Van de bacterie is bekend dat deze met name in het najaar problemen geeft, en dat deze in het hout van gewassen kan overleven.

Niet te verwarren met andere ziekten

Zoals bekend kan in *Prunus* ook de ziekte hagelshot voorkomen. Verwarring met deze ziekte is mogelijk. Xap wordt lang niet in alle gevallen van bladplekken aangetroffen. Een goede diagnose is dus belangrijk. Soms werd de bacterie *Pseudomonas syringae* pv *morsprunorum* of een schimmel aangetroffen met ziektebeelden die op *Xanthomonas* lijken. De ziektebeelden veroorzaakt door Xap en *Pseudomonas* lijken bij laurierkers sterk op elkaar. Een onderscheid met het oog is eigenlijk niet mogelijk, temeer omdat beide bacteriën in éénzelfde aanplant kunnen voorkomen.

Verspreiding en besmetting door *Xanthomonas*

Besmetting van plantmateriaal door *Xanthomonas* kan plaatsvinden via besmet plantmateriaal, maar ook kan de verspreiding gebeuren via water en nevel. Door vocht kunnen bacteriën uit bestaande bladplekken meegenomen worden. Een andere belangrijke verspreidingsbron is contactoverdracht tijdens handelingen in het gewas. Hierbij kunnen bacteriën met gereedschap, handen en allerlei materialen van zieke naar gezonde planten worden overgebracht.

Bestrijding en preventie

Xanthomonas is een bacterieziekte waarvoor geen gewasbeschermingsmiddelen zijn toegelaten. Vernietiging van de aangetaste planten is de enige oplossing. U moet de oplossingsmogelijkheden voor uw bedrijf met name zoeken in preventiemaatregelen.

Bijlage 2 Data sheet *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

Voor origineel document zie:

http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas_pruni/XANTPR_ds.pdf

Xanthomonas arboricola pv. *pruni*

IDENTITY

Name: *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Smith) Vauterin *et al.*

Synonyms: *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (Smith) Dye

Xanthomonas pruni (Smith) Dowson

Taxonomic position: Bacteria: Gracilicutes

Common names: Bacterial leaf spot, shot-hole, black spot (English)

Tache bactérienne, bactériose (French)

Fleckenbakteriose (German)

Notes on taxonomy and nomenclature: The genus *Xanthomonas* has recently been extensively revised with a number of pathovars elevated to rank of species and existing species descriptions substantially altered (Vauterin *et al.*, 1995). The new name *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* was proposed as part of this revision.

Bayer computer code: XANTPR

EPPO A2 list: No. 62

EU Annex designation: II/A2

HOSTS

X. arboricola pv. *pruni* attacks only *Prunus* spp., and particularly the fruit crops almonds, peaches, cherries, plums, apricots and *P. salicina*. Other exotic or ornamental species of *Prunus* attacked include *P. davidiana* and *P. laurocerasus*. Cultivars of the Sino-Japanese group (*P. japonica* and *P. salicina*) are generally more susceptible than European plums (Bazzi & Mazzucchi, 1984; Topp *et al.*, 1989).

GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION

X. arboricola pv. *pruni* was first described in North America. It is not clear from the literature whether it has spread from there or naturally has a wider range.

EPPO region: Found in Austria (unconfirmed), Cyprus (unconfirmed), Lebanon, Moldova, Netherlands (unconfirmed), Switzerland (unconfirmed), Ukraine. Locally established in Bulgaria, Italy, Romania, Russia (European, Far East), Slovakia (unconfirmed) and Slovenia.

Asia: China (widespread), Cyprus (old unconfirmed record, now absent), Hong Kong, India (Himachal Pradesh), Japan, Korea Democratic People's Republic, Korea Republic, Lebanon, Pakistan, Russia (Far East), Saudi Arabia, Taiwan, Tajikistan.

Africa: South Africa, Zimbabwe.

North America: Bermuda, Canada (Manitoba, Nova Scotia, Ontario, Quebec), Mexico, USA (Alabama, Arkansas, Connecticut, Florida, Georgia, Kentucky, Louisiana, Maryland, Michigan, Missouri, Mississippi, New Jersey, North Carolina, South Carolina, Texas). *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* 2

South America: Argentina, Brazil (Santa Catarina, São Paulo), Uruguay.

Oceania: Australia (New South Wales, Queensland, Victoria, Western Australia), New Zealand.

EU: Present.

Distribution map: See CMI (1987, No. 340).

BIOLOGY

On peach, *X. arboricola* pv. *pruni* overwinters primarily in the intercellular spaces of the cortex, phloem and xylem parenchyma towards the tips of twigs produced during the preceding season. On plum and apricot, summer cankers formed in one season continue developing the following spring, so providing a source of inoculum at this time. Plum buds and fallen leaves have also been reported as overwintering sites.

In the spring, before host division starts, the bacteria in the intercellular spaces multiply and cause the epidermis to rupture, so initiating a visible lesion referred to as a spring canker. Inoculum from these cankers is disseminated in rain and wind and infects new leaf growth via stomata. Lesions developing on the leaf exude bacteria which bring about secondary infections. Du Plessis (1983; 1987) suggests that the bacterium may migrate systemically from twigs to leaves. Pruning operations will also transmit the disease (Goodman & Hattingh, 1988). Insects which damage plum bark, such as *Cicada* spp. in New Zealand, provide points for entry.

Following foliage infection, summer cankers develop in the green tissue of the shoot, but usually become sealed off by a periderm layer and, as cankers tend to dry out during the course of summer, the viability of bacteria therein is largely reduced; thus, except in certain localities, summer cankers in plum and peach are of no importance as overwintering sites for the bacterium, or in initiating infections the following spring. In general, it is the late infections of shoots, occurring during rains just before and during leaf fall in the autumn, when the host resistance mechanism of producing a periderm barrier is reduced, which constitute the primary inoculum source for the following spring.

A warm, moderate season with temperatures of 19-28°C and with light, frequent rains accompanied by fairly heavy winds and heavy dews is most favourable for severe infection. The disease tends to appear and spread in the spring, then makes little progress through the summer, but late infections occur in the autumn. In culture, bacteria have survived ice-box conditions of -2°C to +2°C for 5 months. The disease is not usually found in arid regions.

Strain differences have mostly not been noted in *X. arboricola* pv. *pruni*, but Du Plessis (1988a) has found differential virulence to peach, plum and apricot cultivars.

For more information, see Dunegan (1932), Thornberry & Anderson (1933), Anderson (1956), Hayward & Waterston (1965).

DETECTION AND IDENTIFICATION

Symptoms

On peach leaves

Infection is first apparent on the lower surface as small, pale-green to yellow, circular or irregular areas with a light-tan centre. These spots soon become evident on the upper surface as they enlarge, becoming angular and darkening to deep-purple, brown or black. The immediately surrounding tissue may become yellow. The diseased areas drop out, usually after darkening in colour, but they may drop out prior to the colour change, giving *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* 3 a shot-hole appearance to the leaf. Often, a dark ring of diseased tissue is left with the formation of the shot hole. Spots are usually concentrated towards the leaf tip, because the bacteria accumulate in this region in droplets of rain or dew. Bacterial ooze may be associated with the spots. Severely infected leaves turn yellow and drop off. Atypical symptoms reported for peach include a grey leaf spot on the upper surface, and a case in which bacteria infiltrated a large area, giving the leaf a greenish-yellow, translucent appearance.

On plum leaves

The shot-hole effect is usually more pronounced.

On peach fruit

Small circular brown spots appear on the surface. They become sunken, the margins are frequently water-soaked, and there are often light-green haloes which impart a mottled appearance to the fruit. As a result of natural enlargement of the fruit, pitting and cracking occur in the vicinity of the spots. These cracks are often very small and difficult to see, but where heavy infection has occurred on young fruit they can be extensive, severely damaging the fruit surface. Gum flow, particularly after rain, may occur from bacterial wounds; this may easily be confused with insect damage.

On plum fruit

Symptoms may be quite different; large, sunken black lesions are common on some cultivars, while, on others, only small pit-like lesions occur.

On peach twigs

Spring cankers occur on the top portion of overwintering twigs and on watersprouts before green shoots are produced; initially small, water-soaked, slightly darkened, superficial blisters, they extend 1-10 cm parallel to the long axis of the twig and may even girdle it. In this case the tip of the twig may die, while the tissue immediately below the dead area, in which the bacteria are present, is characteristically dark; this is the so-called "black tip" injury.

Twig infections later in the season result in summer cankers, which appear as water-soaked, dark-purplish spots surrounding lenticels. These later dry out and become limited, dark, sunken, circular to elliptical lesions with a water-soaked margin.

On plum and apricot twigs

Cankers are perennial, in contrast to peach, and continue developing in twigs of 2 and 3 years old. The inner bark is penetrated, resulting in deep-seated cankers which deform and kill twigs.

On cherries

Leaf symptoms are similar to those on peach, but rarely of importance. Early fruit infection, however, results in distorted fruit, and bacteria may be found from the epidermis to the stone.

For more information, see Dunegan (1932), Anderson (1956), Hayward & Waterston (1965), Moffett (1973).

Morphology

X. arboricola pv. *pruni* is an aerobic, motile, Gram-negative rod, 0.2-0.8 x 0.8-1.7 µm, with a single polar flagellum. Colonies are wet shining, convex, of a slimy mucoid consistency and produce a yellow water-insoluble pigment (Hayward & Waterston, 1965).

Detection and inspection methods

X. arboricola pv. *pruni* can be detected by a detached-leaf bioassay (Randhawa & Civerolo, 1985), and by isolation (Gitaitis *et al.*, 1988). Although serological techniques have been developed for other *X. campestris* pathovars on fruit crops, it seems that none is yet available for *X. arboricola* pv. *pruni*.
Xanthomonas arboricola pv. *pruni* 4

MEANS OF MOVEMENT AND DISPERSAL

X. arboricola pv. *pruni* has a limited capacity for local dispersal by rainsplash in orchards. In international trade, it is likely to be carried on plants for planting (except seeds) of host species, including budwood. The bacterium may also be found on fruits.

PEST SIGNIFICANCE

Economic impact

Greatest damage arises from severe defoliation resulting in weakened trees. Heavily infected trees (plum) gradually became uneconomic as leaders die following invasion by *X. arboricola* pv. *pruni*. In addition, fruit is small and often unmarketable. In neglected peach orchards, 25-75% of fruit may be attacked (Dunegan, 1932). In south-eastern Queensland (Australia), peach and plum losses are high in certain years; serious damage also occurs in New Zealand. Infection appeared on peaches and apricots in New Zealand and Australia, where these susceptible crops had been cultivated for many years without leaf spot problems, but in proximity to infected plums (Moffett, 1973).

This was possibly due to a strain or race of increased virulence developing. *X. arboricola* pv. *pruni* has attracted increasing attention in South Africa (Du Plessis, 1988b).

Control

Resistant cultivars are available, and *Prunus* breeding programmes in North America attach considerable importance to *X. arboricola* pv. *pruni* resistance. No direct control methods are suggested, but bactericides have been evaluated (Du Plessis, 1983). Care should be taken to ensure that budwood is obtained from disease-free trees, preferably grown in arid regions. Orchard management practices in New Zealand have been reviewed by Young (1987).

Phytosanitary risk

X. arboricola pv. *pruni* is listed as an A2 quarantine pest by EPPO (OEPP/EPPO, 1978) and is of quarantine significance for IAPSC. The disease is rated as of little economic importance by the EPPO countries where it currently occurs, but it is absent from several major countries producing *Prunus*. Its behaviour elsewhere in the world suggests that it would be likely to establish more widely in the EPPO region although, in general, the bacterium would not present a threat to arid regions.

PHYTOSANITARY MEASURES

The EPPO specific quarantine requirements recommend that consignments of plants for planting (except seeds and tissue cultures), and fruits, of *Prunus* should come from a field found free from the disease by growing-season inspection (OEPP/EPPO, 1990).

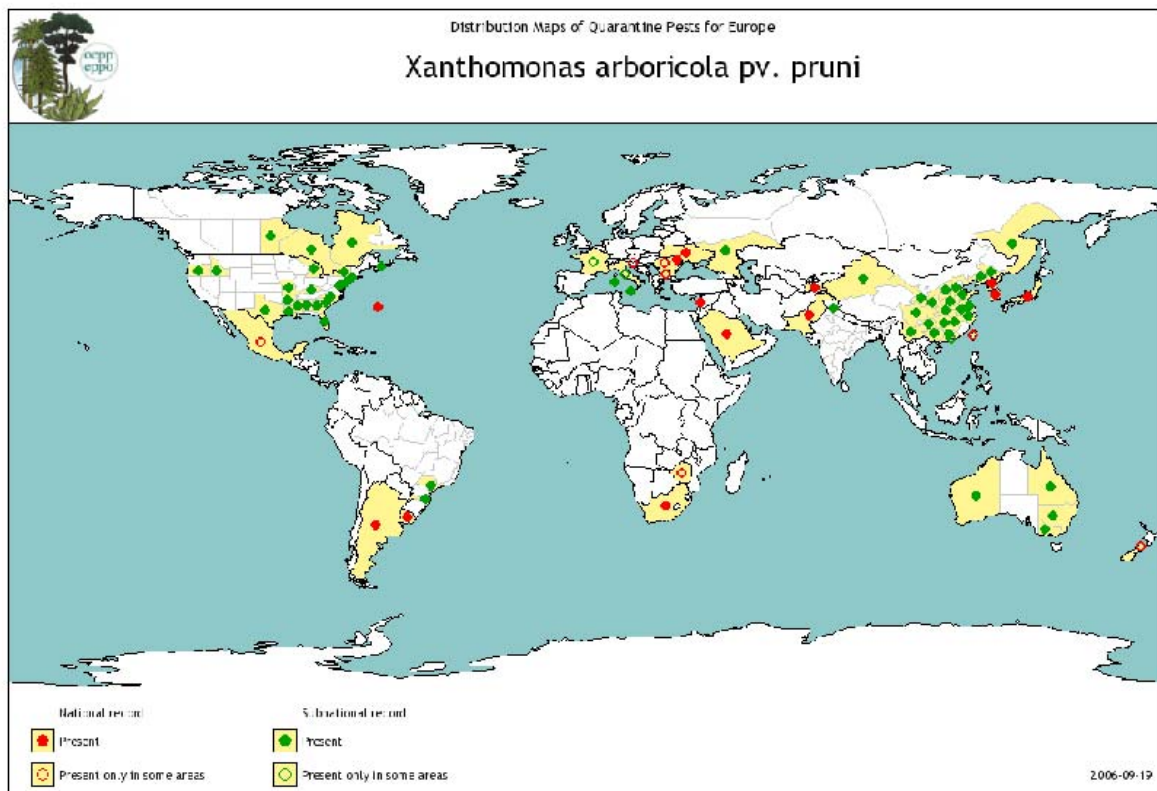
BIBLIOGRAPHY

- Anderson, H.W. (1956) *Diseases of fruit crops*, pp. 206-215. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York, USA.
- Bazzi, C.; Mazzucchi, U. (1984) [Update on the most important bacterial diseases of fruit crops in the nursery]. *Informatore Agrario* **34**, 51-62.
- CMI (1987) *Distribution Maps of Plant Diseases* No. 340 (edition 4). CAB International, Wallingford, UK. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* 5
- Dunegan, J.C. (1932) The bacterial spot disease of the peach and other stone fruits. *Technical Bulletin US Department of Agriculture* No. 273, 53 pp.
- Du Plessis, H.J. (1983) Chemical control of bacterial spot on plums: preliminary evaluation of bactericides. *Deciduous Fruit Grower* **33**, 413-418.
- Du Plessis, H.J. (1987) Canker development on plum shoots following systemic movement of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* from inoculated leaves. *Plant Disease* **71**, 1078-1080.
- Du Plessis, H.J. (1988a) Differential virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* to peach, plum and apricot cultivars. *Phytopathology* **78**, 1312-1315.
- Du Plessis, H.J. (1988b) Bacterial spot disease of stone fruits; overview of findings. *Deciduous Fruit Grower* **38**, 128-132.
- Gitaitis, R.D.; Hamm, J.D.; Bertrand, P.F. (1988) Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* from other yellow-pigmented bacteria by the refractive quality of bacterial colonies on an agar medium. *Plant Disease* **72**, 416-417.
- Goodman, C.A.; Hattingh, M.J. (1988) Mechanical transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* in plum nursery trees. *Plant Disease* **72**, 643.
- Hayward, A.C.; Waterston, J.M. (1965) *Xanthomonas pruni*. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria* No. 50. CAB International, Wallingford, UK.
- Moffett, M.L. (1973) Bacterial spot of stone fruit in Queensland. *Australian Journal of Biological Sciences* **26**, 171-179.
- OEPP/EPPO (1978) Data sheets on quarantine organisms No. 62, *Xanthomonas pruni*. *Bulletin OEPP/EPPO* **8**.
- OEPP/EPPO (1990) Specific quarantine requirements. *EPPO Technical Documents* No. 1008.

- Randhawa, P.S.; Civerolo, E.L. (1985) A detached-leaf bioassay for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Phytopathology* **75**, 1060-1063.
- Thornberry, H.H.; Anderson, H.W. (1933) Overwintering of *Phytophthora pruni* on peach. *Phytopathology* **23**, 787-801.
- Topp, B.L.; Heaton, J.B.; Russell, D.M.; Mayer, R. (1989) Field susceptibility of Japanese-type plums to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **29**, 905-909.
- Vauterin, L.; Hoste, B.; Kersters, K.; Swings, J. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 472-489.
- Young, J.M. (1987) Orchard management and bacterial diseases of stone fruit. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture* **15**, 257-266.

Bijlage 3. Distribution map *Xanthomonas arboricola* pv. *Pruni*

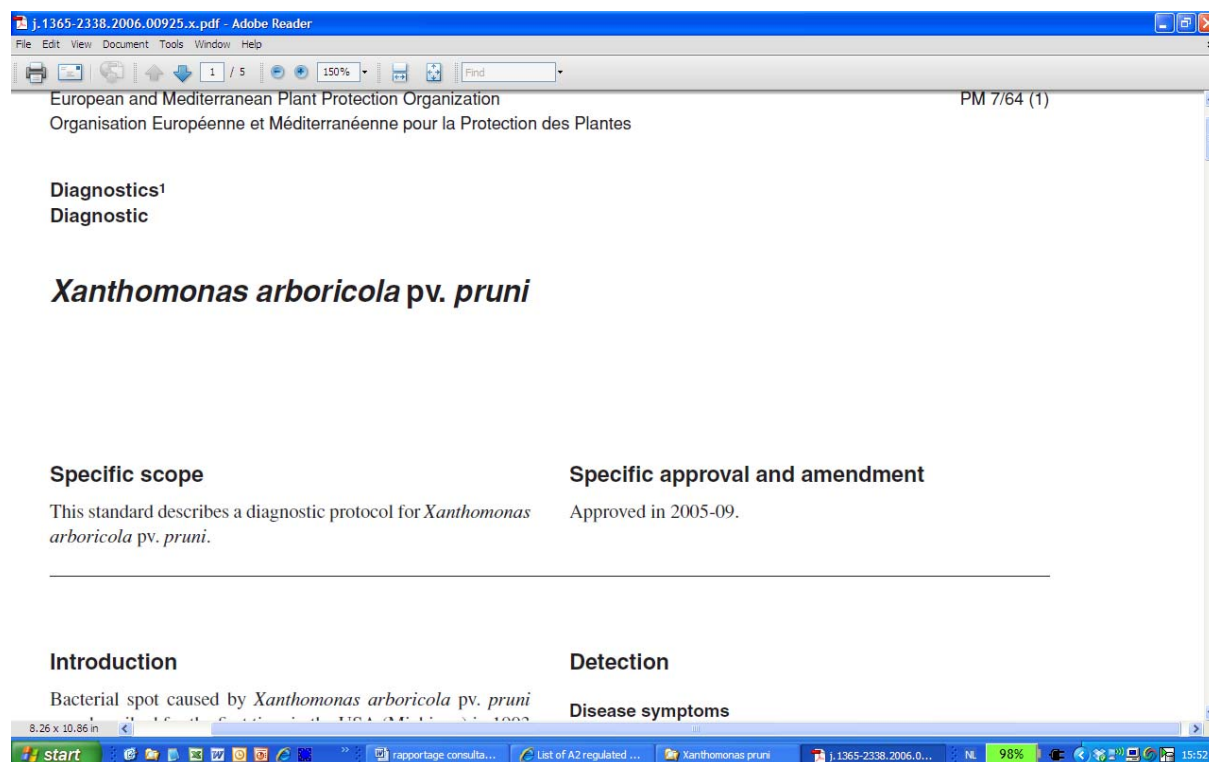
Zie http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Xanthomonas_pruni/XANTPR_map.htm



Bijlage 4 Diagnostics *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

(2006), *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. EPPO Bulletin, 36: 129–133. doi: 10.1111/j.1365-2338.2006.00925.x

Het document is te verkrijgen via: <http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm>



Voor originele tekst zie: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2338.2006.00925.x/abstract>