



Joop van Doorn en Bart van der Sluis,
30 juni 2008

Inleiding

Boomkwekerij M. van den Oever & Zn BV in Haaren heeft begin 2008 een onderzoekswens ingediend bij de NBvB om meer zicht te krijgen op de oorzaak van bastknobbels bij laanbomen in de kwekerij. Volgens het bedrijf komt dit in toenemende mate voor bij een aantal boomsoorten in de kwekerij, met name bij *Fagus*, *Fraxinus*, *Tilia* en *Platanus*. Tot op dat moment waren er nog geen meldingen gekomen van boomkwekerijen, terwijl het probleem in het stedelijk groen al enkele jaren speelt.

In overleg met de NBVB Cultuurgroep voor laan- bos- en parkbomen is een consultancy-aanvraag ingediend bij Productschap Tuinbouw (projectnummer 3236068300).

In het lopende onderzoek bij bomen in het stedelijk groen is anatomisch onderzoek uitgevoerd en wordt de groei van de knobbels gemeten en geanalyseerd. Verder worden in het land enkele inventarisaties gestart waaruit de mate van voorkomen kan worden bepaald. Op een proeflocatie wordt de groeisnelheid en ontwikkeling van de bastknobbels bepaald. In eerder diagnostisch onderzoek zijn geen microbiologische aantasters gevonden. Fytoplasma's maakten echter geen deel uit van het onderzoek. Gezien de aandacht die op het moment wordt besteed aan fytoplasma's bij roos (kroeskop) en peer (aftakelingsziekte) zijn er verdenkingen dat mogelijk ook bij bastknobbels een fytoplasma is betrokken. Diagnostisch onderzoek kan dit bevestigen dan wel uitsluiten.

Doel

Het doel van dit consultancy-onderzoek is om na te gaan of in de bastknobbels bij laanbomen fytoplasma's gevonden worden.

Achtergrond

In zieke of verzwakte bomen worden wel fytoplasma's gevonden. Deze celwandloze bacteriën verspreiden zich als virussen, en kunnen woekeringen veroorzaken als gevolg van de productie van plantenhormonen. Afwijkingen aan takken of bast zouden daarom veroorzaakt kunnen worden door fytoplasma's. Door gebruik te maken van DNA-gebaseerde detectie (PCR) kunnen (met zg. algemene en specifieke primers, die deze bacteriën kunnen aantonen) monsters van bastknobbels geanalyseerd worden op het wel of niet voorkomen van fytoplasma's.

Materialen en Methoden

Bemonstering

Binnen het consultancybudget past de analyse van 30 monsters. Voor de afstemming met het al lopende onderzoek in het stedelijk gebied wordt naast een aantal (21) monsters van de kwekerij (Haaren) een aantal (9) monsters van *Fraxinus excelsior* uit Alpen a/d Rijn in het onderzoek meegenomen.

De meest geschikte periode voor bemonstering is het voorjaar als de bomen beginnen uit te lopen. De bemonstering aan de boom vond plaats op drie locaties nl. gezond bast/hout weefsel, bast/hout weefsel uit de bastknobbel en een takscheutje met blad.

Dit resulteerde in het volgende bemonsteringsschema



Tabel 1. Monsternamen t.b.v diagnostisch onderzoek

| Locaties | Boomsoort | aantal bomen | aantal monsters per boom | totaal |
|------------------------------|-----------------|--------------|--------------------------|--------|
| Kwekerij (Haaren) | <i>Fagus</i> | 2 | 3 | 6 |
| | <i>Fraxinus</i> | 1 | 3 | 3 |
| | <i>Tilia</i> | 3 | 3 | 9 |
| | <i>Aesculus</i> | 2 | 3 | 6 |
| Gem. Groen (Alphen a/d Rijn) | <i>Fraxinus</i> | 3 | 2 | 6 |
| Totaal | | | | 30 |

Diagnostisch onderzoek

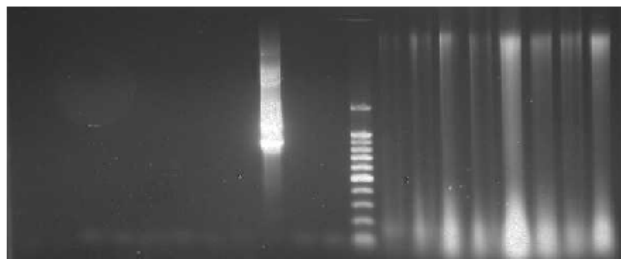
Met behulp van DNA-analyse methoden (PCR, nested PCR) zijn DNA-monsters van bastknobbels onderzocht op de aanwezigheid van fytoplasma-DNA. Voor het isoleren van DNA werd gebruikt gemaakt van commerciële kits: PureGene genomic DNA purification kit (Gentra systems) en de DNeasy Plant kit (Qiagen). PCR's werden uitgevoerd volgens standaard procedures met PCR Mastermix (Promega, Madison, USA) met universele primers P1/P7 voor fytoplasma's (Deng, S, 1991). Gezien de concentratie van fytoplasma's (vaak laag) werd zg. nested PCR met universele primers Fu5/Ru3 (Lorenz, K. H, 1995) toegepast.

Er vindt afstemming plaats met het al lopende onderzoek in het stedelijk gebied.

Resultaten

Analyseren van *Fagus* monsters (nr.1 en 2) en *Fraxinus* monsters uit gemeente Alphen (nr. 25 t/m 30). Analyseren van andere *Fagus* monsters (nr. 3,4), *Tilia* monsters (nr. 7, 8, 9,10), *Aesculus* monsters (nr.16,17) en *Fraxinus* monsters (nr. 23,24).

1 2 25 26 27 28 29 30 +C -C -C M 1 2 25 26 27 28 29 30



Figuur 1: Resultaten bij nested PCR met primers Fu5/Ru3 (product 880bp). DNA geïsoleerd met PureGene kit. Fytoplasma uit peer werd gebruikt als positieve controle (+C). M: 100bp ladder.

Er zijn geen positieve reacties gevonden bij de geanalyseerde monsters, de kwaliteit van het DNA geïsoleerd met PureGene kit werd gecontroleerd door op gel te brengen (zie de lanen na M (100bp ladder) in figuur 1). De kwaliteit en kwantiteit van DNA zijn goed te noemen om een geslaagde DNA-reactie (PCR) te verkrijgen. Als positieve monsters zijn fytoplasma-DNA, afkomstig uit appel en peer meegenomen; deze kwamen altijd positief (zichtbaar als een bandje op de gel (C+) uit de DNA-reactie. Een analyse werd gedaan met dezelfde monsters, deze keer met nog betere kwaliteit DNA (geïsoleerd met Qiagen kit). Ook deze gaven geen positieve reactie.

Afstemming onderzoek stedelijk gebied

Hoewel de knobbels van de bomen in dit onderzoek niet anatomisch zijn onderzocht is het aannemelijk dat het om dezelfde bastknobbels gaat. Zie foto's van bastknobbels op bomen van de kwekerij en in het gemeentelijk groen (nog toevoegen).



Foto 1. Bastknobbels op bomen in de kwekerij



Foto 2. Bastknobbels op Fraxinus in Alphen a/d Rijn

De bastknobbels die op initiatief van de gemeente Alphen aan den Rijn anatomisch zijn onderzocht op de leerstoelgroep Plantencelbiologie van Wageningen Universiteit vertoonden op een enkele uitzondering na eenzelfde opbouw waarbij de vorming van een vaatweefselvormend cambium ervoor zorgde dat er in de buitenste laag van de bast een bolvormige, gelaagde structuur ontstond met xyleem aan de binnenzijde van het cambium en floeem als een schil er omheen. De celtypen door het cambium gevormd vertoonden als belangrijkste afwijken de concentrische gelaagdheid van afzetting. De bouw van de verschillende celtypen was evenwel normaal hetgeen wijst op een normaal functioneren van het cambium en een normale celdifferentiatie. Deze gegevens wijzen erop dat vooral de initiatie van het cambium bijzonder is, wellicht niet zozeer de verdere ontwikkeling (opmerking A. van Lammeren).

Conclusies

Er zijn geen fytoplasma's aangetoond in de genomen monsters van verschillende boomsoorten (Fagus, Tilia, Aesculus en Fraxinus). Het is aannemelijk dat het om dezelfde bastknobbels gaat als in het bastknobbeldonderzoek in het stedelijk gebied. Uit het anatomisch onderzoek (bij bomen in het stedelijk gebied) blijkt dat vooral de initiatie van het cambium bijzonder is en niet zozeer de verdere ontwikkeling van de bastknobbel.

Aanbevelingen

De oorzaak is van het ontstaan van bastknobbels is niet gevonden. In dit aspectonderzoek is specifiek gekeken naar fytoplasma. Bastknobbels hebben een negatieve invloed op de marktwaarde van laanbomen. Mogelijk dat ze ook een negatieve invloed hebben op de vitaliteit van de bomen. Wil men de oorzaak van bastknobbels op laanbomen achterhalen, dan is verder



PRAKTIJKONDERZOEK
PLANT & OMGEVING

onderzoek nodig. Op dit moment zijn er echter weinig concrete aanknopingspunten. Ontwikkelingen op dit gebied zullen door PPO worden gevolgd.



Bijlage 1

Monsters bastknobbels

| monsternr. | monstercode | boomsoort | monstertype | locatie |
|------------|-------------|-----------|---------------------|---------------------|
| 1 | 1A | Fagus | scheut | Boerderij/Haaren |
| 2 | 1B | Fagus | knobbel + hout | Boerderij/Haaren |
| 3 | 1C | Fagus | gezonde bast + hout | Boerderij/Haaren |
| 4 | 2A | Fagus | scheut | Boerderij/Haaren |
| 5 | 2B | Fagus | knobbel + hout | Boerderij/Haaren |
| 6 | 2C | Fagus | gezonde bast + hout | Boerderij/Haaren |
| 7 | 3A | Tilia | scheut | Boerderij/Haaren |
| 8 | 3B | Tilia | knobbel + hout | Boerderij/Haaren |
| 9 | 3C | Tilia | gezonde bast + hout | Boerderij/Haaren |
| 10 | 4A | Tilia | scheut | Boerderij/Haaren |
| 11 | 4B | Tilia | knobbel + hout | Boerderij/Haaren |
| 12 | 4C | Tilia | gezonde bast + hout | Boerderij/Haaren |
| 13 | 5A | Tilia | scheut | Boerderij/Haaren |
| 14 | 5B | Tilia | knobbel + hout | Boerderij/Haaren |
| 15 | 5C | Tilia | gezonde bast + hout | Boerderij/Haaren |
| 16 | 6A | Aesculus | scheut | Verbeek/Haaren |
| 17 | 6B | Aesculus | knobbel + hout | Verbeek/Haaren |
| 18 | 6C | Aesculus | gezonde bast + hout | Verbeek/Haaren |
| 19 | 7A | Aesculus | scheut | Verbeek/Haaren |
| 20 | 7B | Aesculus | knobbel + hout | Verbeek/Haaren |
| 21 | 7C | Aesculus | gezonde bast + hout | Verbeek/Haaren |
| 22 | 8A | Fraxinus | scheut | Kerkeind/Haaren |
| 23 | 8B | Fraxinus | knobbel + hout | Kerkeind/Haaren |
| 24 | 8C | Fraxinus | gezonde bast + hout | Kerkeind/Haaren |
| 25 | 9B | Fraxinus | knobbel + hout | Prunusstraat/Alphen |
| 26 | 9C | Fraxinus | gezonde bast + hout | Prunusstraat/Alphen |
| 27 | 10B | Fraxinus | knobbel + hout | Engelenburg/Alphen |
| 28 | 10C | Fraxinus | gezonde bast + hout | Engelenburg/Alphen |
| 29 | 11B | Fraxinus | knobbel + hout | Assumburg/Alphen |
| 30 | 11C | Fraxinus | gezonde bast + hout | Assumburg/Alphen |



Bijlage 2 Referentie

Lorenz KH , B Schneider, U Ahrens and E. Seemuller (1995). Detection of the Apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology 85: 771-776.