Beheersing bacterieziekte in *Prunus*

J. van Doorn, P. van Dalfsen, K. Pham, Jet Reeuwijk (PPO, Lisse)

Marco Schuurmans (Cultus Agro Advies)

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
PPO nr. 3236113900/PT nr: 13934
April 2013

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.
Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

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

Het project is in samenwerking uitgevoerd met Cultus Agro Advies te Lottum.

Projectnummer PPO: 32 361139 00.
PT nr. 13934

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

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

Adres : Postbus 85, 2160 AB Lisse
: Prof. Van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse
Tel. : +31 252 46 21 21
Fax : +31 252 46 21 00
E-mail : infobomen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Samenvatting

Prunus laurocerasus is een belangrijk gewas binnen de groep Sierheesters en coniferen. Diverse bedrijven hebben zich gespecialiseerd in deze teelt. Hagelschot is een ziekte die zich manifesteert door bladvlekken en gaten in het blad. Een van de gevonden bacteriën, naast een pseudomonas , ***Pseudomonas syringae pv. morsprunorum*** (Psm) in *Prunus laurocerasus* is een quarantaineziekte, ***Xanthomonas arboricola*** **pathovar pruni** (Xap) waardoor deze bedrijven bedreigd worden in hun voortbestaan. Het beheersbaar maken van dit quarantaineprobleem is noodzakelijk om het product *Prunus* in de markt te houden. Veel kennis ontbreekt over de verspreiding, overleving, bestrijding en toetsing van deze bacterie.
Het bleek, dat op grond van **symptomen** het niet mogelijk is Xap te onderscheiden van bv. aantasting door Psm of schimmels. Binnen dit project is een **DNA-toets ontwikkeld om Psm te identificeren** en te detecteren. Er zijn gedurende 3 jaar veel monsters vanuit de praktijk onderzocht. Het bleek dat Xap en Psm pas na een warme periode (juni en later) aangetoond konden worden middels DNA-toetsen (PCR). Binnen dit project is een doe-het-zelf kit ontwikkeld in samenwerking met PRIME Diagnostics: een zg. **lateral flow device** gebaseerd op antiserum welke Xap herkent. Hoewel minder gevoelig dan PCR bleek deze toepassing goed te voldoen om symptomatisch (blad-) materiaal van laurierkers te testen. Deze wordt momenteel door telers en tussenpersonen regelmatig toegepast voor een inschatting van mogelijke Xap infectie op bedrijven.
Om de infectieroute van Xap zichtbaar te maken, en een modelsysteem te ontwikkelen om bestrijding van Xap te onderzoeken zijn **infectieproeven** in een quarantainekas uitgevoerd. Er is helaas geen duidelijke infectie waargenomen ondanks herhaalde pogingen. Dit heeft in vivo onderzoek naar **middelen** om Xap te remmen of te bestrijden sterk bemoeilijkt. Zo gaven koperhoudende middelen geen effect hoewel infectie experimenten moeizaam verliepen onder kunstmatige omstandigheden. Onderzoek naar **de invloed van de nutriëntenbalans** in de plant en grond van zieke en planten gaven aan, dat het mangaangehalte in zieke planten in 6 van de 7 gevallen lager was dan in gezonde planten. De overige elementen toonden nauwelijks verschillen in gezonde dan wel zieke planten.
Bedrijfsbezoeken op bedrijven met een vroegere of recente Xap besmetting toonden aan dat spuitkappen, leidingen en ook schoeisel Xap kunnen bevatten. **Verspreiding** via machines (en personeel) van Xap en Psm is daarmee aannemelijk. Hygiënische maatregelen en ontsmetting van apparatuur zijn van groot belang; er zijn aanwijzingen dat bacterieziekten via insecten kunnen worden verspreid.
Om een gerichte beheersing van Xap en Psm mogelijk te maken is in 2012 een uitgebreid **lokalisatie-experiment** uitgevoerd in een quarantaine gaaskas aan 30 latent geïnfecteerde *P. laurocerasus* planten. Dit experiment, jaar rond uitgevoerd, bestond uit de uitgebreide bemonstering van wortels, twijgen, -okselknoppen en bladeren waar en welke mate deze zijn besmet met deze bacteriesoorten. In alle deelnemende planten is wel ergens Xap aangetoond: deze bacterie bleek inderdaad latent in deze planten in alle delen aanwezig. Xap werd het meeste in bladeren met symptomen aangetoond met een piek in mei/juni. Dit is tevens uitgevoerd aan Psm.
Er werd een grote variatie in plantdeel in tijd qua detectie van Xap vastgesteld. In het algemeen waren de gevonden bacteriehoeveelheden laag: slechts 3% (28 monsters) gaven een duidelijk positieve uitslag terwijl 22% (196 monsters) zwak positief in de DNA test waren. Psm werd in alle delen van de plant aangetroffen, meestal in stengel met kanker en eveneens met een grote variatie door het seizoen (optimum in juli).Slechts 7% gaf een duidelijk positieve uitslag; 12% is zwak positief.

Aanbevelingen om Xap en Psm beter beheersbaar te maken in de teelt van laurierkers zijn:

- Voer zo weinig mogelijk handelingen uit in het gewas, zeker in een nat gewas bij hogere temperaturen, om verspreiding te voorkomen
- Indien mogelijk: ontsmet onkruidspuitkappen, snoeischaren, stekmessen en andere machines met ontsmettingsmiddelen tussen percelen/partijen.
- Voorkom besmetting met Xap/Psm door hygiënische maatregelen. Vraag aan uw loonwerker of deze de machines ontsmet op uw bedrijf brengt.
- Toets moerplanten op Xap/Psm: start met gezond uitgangsmateriaal.

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING 3

INHOUDSOPGAVE 5

1 INLEIDING 7
1.1 Doelstelling 8

2 PCR EN LAMP VOOR IDENTIFICATIE EN DETECTIE VAN XAP EN PSM 11
2.1 Materiaal en Methoden 11
2.1.1 Plantextractie en bacteriekweek 11
2.1.2 DNA isolatie 11
2.1.3 PCR toetsen 11
2.2 Ontwikkelen van LAMP PCR voor Psm 13
2.3 Serologische toetsing: Lateral Flow Device 14
2.3.1 Materiaal en methode 14
2.3.2 Resultaten 16
2.4 Conclusies 16

3 SYMPTOOMANALYSE EN MONSTERS UIT DE PRAKTIJK 17
3.1 Symptoomanalyse 17
3.2 Diagnose van praktijkmonsters: PCR 19
3.3 Inductie van symptoomexpressie 21
3.3.1 Aanpak 22
3.3.2 Resultaten 22
3.3.3 Conclusie 22

4 INFECTIE EXPERIMENTEN 23
4.1 Bladeren 23
4.2 Planten 24
4.2.1 Infectie experiment voorjaar 2011 24
4.2.2 Infectie experiment zomer 2011 25
4.2.3 Conclusie infectie experimenten 25
4.3 Wortels 25
4.3.1 Conclusie wortelinfectie experimenten 26

5 TOEPASSING VAN GEWASBESCHERMINGSMIDDELEN 27
5.1 Proefopzet gewasbeschermingsmiddelen 27
5.2 Resultaten toepassing gewasbeschermingsmiddelen 28
5.3 Conclusies gewasbeschermingsmiddelen 28

6 BEDRIJFSBEZOEKEN 29
6.1 Bezoeken in 2010 29
6.1.1 Bedrijf A, zomer 2010 29
6.1.2 Monstername 30
6.1.3 Bedrijf A, herfst 2010. 31
6.1.4 Bedrijf B, herfst 2010. 32
6.2 Bedrijfsbezoeken in 2011 34
6.2.1 Bedrijf A, herfst 2011. 34

6.2.2 Bedrijf C, zomer en herfst 2011 ... 34
6.3 Bedrijfsbezoeken in 2012 ... 36
6.3.1 Bedrijf A, herfst 2012. ... 36
6.3.2 Bedrijf C, zomer 2012. ... 36
6.3.3 Bedrijf D, zomer 2012. ... 36
6.3.4 Vangplaten op diverse bedrijven. ... 37
6.4 Conclusie bedrijfsbezoeken ... 38

7 LOKALISATIE VAN *XANTHOMONAS* EN *PSEUDOMONAS* IN *PRUNUS* JAAR ROND ... 39
7.1 Lokalisatie Xap: oriënterende analyse 2011 ... 39
7.2 Bemonstering in 2012 ... 39
7.2.1 Proefopzet ... 39
7.2.2 Resultaten ... 40
7.3 Conclusies ... 44

8 RELATIE NUTRIËNTEN GEHALTEN EN BACTERIEZIEKTEN IN *PRUNUS* ... 45
8.1 Opzet experiment ... 45
8.2 Resultaten nutriënten gehaltes ... 45
8.3 Conclusies ... 46

9 DISCUSSIE ... 47

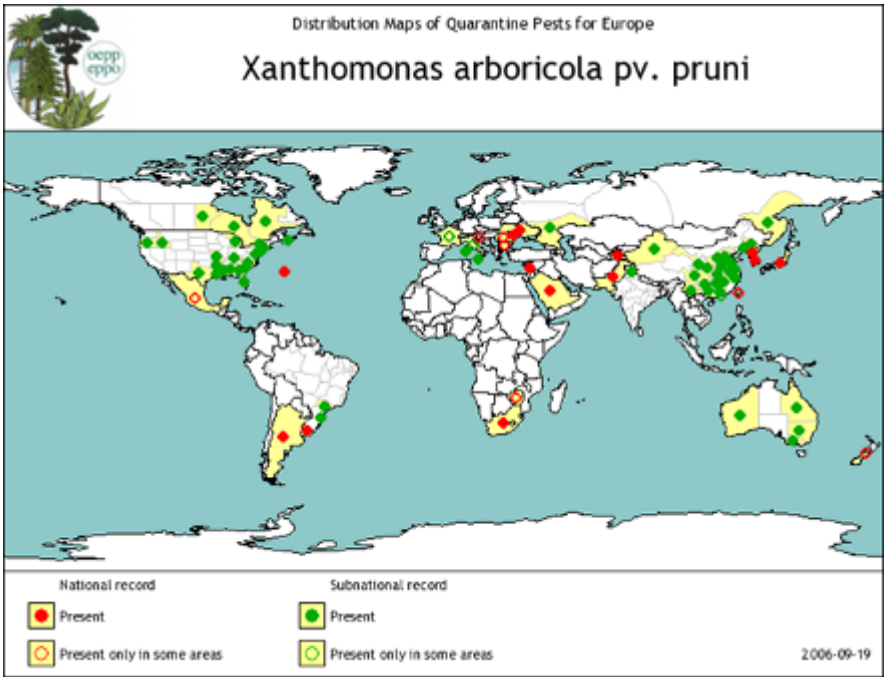
10 LITERATUUR ... 51

11 OUTPUT ... 53
11.1 Begeleidingscommissies ... 53
11.2 Lezingen ... 53
11.3 Posters ... 53
11.4 Vakbladartikelen ... 53
11.5 Congressen en websites ... 54

12 BIJLAGEN ... 55
12.1 Posters 2010-2012 ... 55

1 Inleiding

In de teelt van *Prunus laurocerasus* komt al enige jaren een agressieve vorm van bladvlekkenziekte voor. De ziekte is niet te bestrijden met de weinige beschikbare toegelaten gewasbeschermingsmiddelen. De symptomen zijn bladvlekken, die kunnen samensmelten en uitgroeien tot grote vlekken en uiteindelijk bladval.
Er zijn gevallen bekend waarbij binnen twee weken een complete opstand waardeloos werd. Enkele *Prunus laurocerasus*-kwekers zijn al in hun voortbestaan bedreigd door deze nieuwe ziekte in *Prunus*.



Figuur 1. Wereldwijde verspreiding van X. arboricola pv. pruni (Xap). Bron: EPPO.

Omdat *Prunus laurocerasus* een belangrijk gewas is in de boomkwekerij (naar schatting 1000 ha) en de sector erg afhankelijk is van export, is het nodig dat dit probleem op sectorniveau snel en goed opgepakt wordt, om de export veilig te stellen.
In de zomer van 2009 werd in aangetaste bladeren van *Prunus laurocerasus* ook de bacterie *Xanthomonas arboricola* pv. pruni (Xap) gevonden. Dit is een quarantaine organisme. Bladvlekkenziekte in *Prunus* is een serieus probleem, gezien de schade die wordt veroorzaakt aan het gewas. De quarantainestatus van de betrokken bacterie *Xanthomonas arboricola* pv. pruni (Xap) maakt dit probleem extra lastig vanwege de maatregelen die NVWA en keuringsdienst (Naktuinbouw) moeten handhaven. Niet alleen wordt de sierwaarde sterk verminderd, maar vooral doordat de handel in gevaar komt door het niet mogen leveren van *Prunus*. Op het moment zijn geen gewasbeschermingsmiddelen tegen bacteriën toegelaten. De waardplanten van Xap zijn in principe alle plantensoorten die behoren tot het geslacht *Prunus*. Het is wel bekend dat er ook resistentie of tolerantie ten opzichte van Xap aanwezig is in het sortiment. De bacterie komt wijd verspreid in de wereld voor en is in Europa aanwezig in diverse landen, o.a. Frankrijk en Italië. Daarnaast komt de bacterie voor Azië, Noord- en Zuid-Amerika, Australië en Nieuw-Zeeland (Fig.1). In Nederland is de bacterie tot aan zomer 2009 toe niet gevonden. Naast verspreiding van de ziekte via besmet plantmateriaal, kan de bacterie ook worden verspreid via water. Een andere belangrijke verspreidingsbron is contactoverdracht tijdens handeling in het gewas. Hierbij kunnen bacteriën met gereedschap, handen en allerlei andere materialen van ziek naar gezonde planten worden overgebracht.

Meer informatie over Xap is te vinden op www.eppo.org
(European and Mediterranean Plant Protection Organization) waar Xap op de "EPPO), A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests" staat (Data Sheets on Quarantine Pests *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni)*. *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* is derhalve een bacteriesoort waarvoor binnen de Europese unie de quarantaine status geldt.

In de praktijk is het voor kwekers en adviseurs erg lastig om een juiste diagnose te stellen. Gebleken is dat er verschillende veroorzakers zijn van bladvlekken in *Prunus* en vaak komen deze zelfs gelijktijdig voor. Er zijn aanwijzingen dat de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* (Psm) ook bladvlekken kan veroorzaken in *Prunus*. Met het blote oog en met eenvoudige toets technieken is niet te bepalen of Xap aanwezig is. Daarom moet elke verdachte inzending worden onderzocht door Naktuinbouw Laboratoria, team Diagnostiek. Na ongeveer een week is bekend of het plantmonster vrij is van Xap, dan wel met zeer grote waarschijnlijkheid is besmet. Dat laatste wordt hierna definitief vastgesteld door de Plantenziektenkundige Dienst (NVWA). Juist in het afleverseizoen is het van belang dat de toets uitslag snel bekend is. Voor het bedrijfsleven is vooral de tijd die de toets in beslag neemt, maximaal negen weken, erg problematisch.
Middelen tegen bacterieziekten zijn namelijk niet voorhanden of toegelaten. De bacterie kan alleen worden bestreden door teeltmaatregelen, zoals het verwijderen van aangetaste planten en omringende buurplanten. Om een schone teelt te kunnen beginnen zou er een methode moeten komen die bacterievrij uitgangsmateriaal kan garanderen via sanitatie-technieken o.a. met ontsmettingsmiddelen om verspreiding van deze bacterie tegen te gaan. Hiervoor is onderzoek naar ontsmettingsmaatregelen van uitgangsmateriaal en de effectiviteit van alternatieve bacteriebestrijdingsmiddelen nodig.

De aanleiding voor dit onderzoeksproject lag in 2009, toen circa 25 bedrijven met laurierkers-productie een besmetting hadden. Onbekend was in welke mate cultivars gevoelig zijn voor deze bacterie. Verder bestond er zorg dat de bacterie kan overspringen naar bladverliezende *Prunus*-soorten, bv. P. avium. Tot op heden is dit echter niet vastgesteld. Onderzoek was derhalve noodzakelijk om het *Prunus*-sortiment te toetsen op gevoeligheid voor Xap.

In mei 2009 hebben Cultus Agro Advies en PPO een consultancyproject opgestart in opdracht van Productschap Tuinbouw. Doel was om te achterhalen met welke ziekte we te maken hebben. Aanvankelijk werd gedacht aan een schimmel*, Phyllosticta* genaamd. Er zijn vele monsters uit het hele land verzameld en bekeken welke ziekteverwekkers aanwezig waren. Er werd een reeks aan schimmels gevonden, waaronder *Phoma*, maar nooit *Phyllosticta.*
De gevonden schimmels worden momenteel niet als veroorzaker gezien voor deze nieuwe ziekte. Daarbij werden wel vaak bacteriën gevonden. Onderzoek door de NVWA heeft aangetoond dat de bladvlekkenziekte werd veroorzaakt door de bacteriesoorten *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* en *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*. De ziektebeelden van *Xanthomonas* en *Pseudomonas* liggen dicht bij elkaar. *Pseudomonas* is geen Q-organisme. Ook is de rol van Psm nog onbekend. Is er sprake van een menginfectie van beide bacteriën, zijn er eventueel nog andere micro-organismen bij betrokken of is er sprake van elkaar versterkende infecties? Dit onderzoeksproject moet antwoorden geven op mogelijkheden (maatregelen, preventie, algemene informatie, toetsen) die de bacterieziekte in *Prunus* kunnen voorkomen en beheersen.

1.1 Doelstelling

Binnen dit onderzoek wordt gezocht naar zowel chemische als niet-chemische oplossingen voor de beheersing en sanitatie bij de vermeerdering om besmetting te voorkomen; er zijn momenteel geen gewasbeschermingsmiddelen tegen *Xanthomonas* in de boomteelt bekend. Gedurende 3 jaar onderzoek zal op basis van uitkomsten en in overleg met de begeleidingscommissie een beheersing strategie worden ontwikkeld die de problemen met bladvlekken in de teelt van *Prunus* beheersbaar moeten maken. De doelstellingen binnen dit onderzoek zijn:

- Verder ontwikkelen van een snelle betrouwbare diagnostiek voor Xap en eventueel Psm: zie hoofdstuk 2

- Duidelijkheid over de rol van Xap en Psm in de bladvlekkenziekte en beschrijving van ziektebeelden door de bacteriën in *Prunus*: zie Hoofdstuk 3
- Vaststellen van gevoeligheid van het *Prunus*-sortiment voor Xap en Psm; mogelijkheden aangeven voor het verkrijgen van schoon uitgangsmateriaal: zie hoofdstuk 4 en 6
- Duidelijkheid trachten te krijgen over (neven-) werking van gewasbeschermingsmiddelen tegen bacteriën. Alleen middelen die een kans hebben op toelating voor de praktijk worden getoetst: zie hoofdstuk 5 en 8
- De verspreiding en verspreidingswijze van beide bacteriën in kaart brengen (lokalisatie): zie hoofdstuk 6 en 7
- Communicatie: zie hoofdstuk 11

2 PCR en LAMP voor identificatie en detectie van XAP en PSM

In dit hoofdstuk wordt beschreven hoe plantenmonsters (meestal blad, twijg, knoppen of wortel) worden behandeld om DNA te isoleren, en welke PCR's gebruikt zijn of ontwikkeld. Zie ook hoofdstuk 5. Daarnaast is beknopt beschreven hoe een zg. LAMP PCR is ontwikkeld om Psm aan te tonen. De basis voor de toets op Xap is een toets, gebaseerd op een zg. ABC transporter gen van Xap zoals beschreven door Pagini in 2002. Alle experimenten zijn uitgevoerd onder de door de NVWA verleende ontheffing (TRCPD/2008/4725) om met het quarantaine organisme Xap te mogen werken.

2.1 Materiaal en Methoden

2.1.1 Plantextractie en bacteriekweek

Van het te onderzoeken biologisch materiaal wordt het weefsel bemonsterd (o.a. topmeristeem, blad zonder symptomen, blad met symptomen, bloemknop, stengelstukje, stukje wortel, stengel met kanker symptoom bij lokalisatie experimenten en blad/veegmonsters bij bedrijfsbezoeken). Van dit vaste monster wordt een vloeibaar (plant-) extract (oplossing met alle cellen/stoffen die aanwezig zijn in het monster) verkregen. Hiervoor zijn verschillende methoden ontwikkeld, afhankelijk van het soort biologisch materiaal:

- Sample bag: in de sample bag kan een kleine hoeveelheid monster worden opgenomen. Hierbij wordt volgens het protocol een standaard hoeveelheid buffer toegevoegd. Met behulp van een hamer of een hand-rolpers wordt het materiaal fijn geperst en gemengd met de buffer. In de sample bag wordt het monstermateriaal gescheiden door een gaasje waardoor alleen het ontstane plantextract in een eppendorf cupje gepipetteerd kan worden en het grove materiaal achterblijft.
- Retsch 400mm: een kleine hoeveelheid monster wordt in een eppendorf cupje gebracht. Hierbij wordt een standaard hoeveelheid buffer toegevoegd. Als laatst voegt men er twee stalen kogels aan toe. Met de Retsch 400mm 'schudmachine' wordt het reactievaatje hard geschud waardoor de twee kogels in het vaatje het biologisch materiaal fijn maken.

Plantextracten (geëxtraheerd met lysis buffer) zijn geschikt voor DNA isolatie. Echter, gezien de verwachte lage concentratie van bacteriën is vaak een zg. verrijkingstap nodig. De plantextracten worden met groeimedium (LB medium) geïncubeerd bij 27°C gedurende 2 nachten om bacteriën te laten groeien. De waterige fase (met bacteriën) is vervolgens gebruikt voor DNA isolatie (volgens het procedure beschreven door de fabrikanten).

2.1.2 DNA isolatie

Afhankelijk van het type uitgangmateriaal werden 2 DNA isolatie methoden gebruikt. Voor (geïnfecteerde) plantmaterialen werd gebruik gemaakt van Qiagen DNeasy Plant Mini kit. Qiagen DNeasy Plant Mini kit is een kolom-methode die doorgaans de meeste DNA opbrengst geeft. Voor de gekweekte bacteriecellen kan DNA geïsoleerd worden met de snelle en ook milieuvriendelijke methode waarbij gebruik gemaakt van AGOWA mag plant reagentia in combinatie met het Thermo Scientific Kingfisher systeem. Hierbij wordt uit gelyseerd materiaal (DNA komt vrij uit zowel planten- als bacteriecellen) via DNA-bindende magnetische bolletjes DNA gebonden. DNA van veegmonsters en insectenmonsters is geïsoleerd met de DNeasy Plant Mini kit.

2.1.3 PCR toetsen

Binnen dit project werden diverse PCR toetsen ontwikkeld en toegepast voor detectie van de bacteriën Xap en Psm (*Xantomonas arboricola* pv. *pruni* resp. *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum.* Een overzicht van de gebruikte toetsen staat vermeld in Tabel 1. De PCR's zijn uitgevoerd volgens standaard procedures met Brillant II mastermix QPCR (Stratagene) voor TaqMan PCR en Brillant II SyberGreen mastermix QPCR voor Sybergreen PCR.

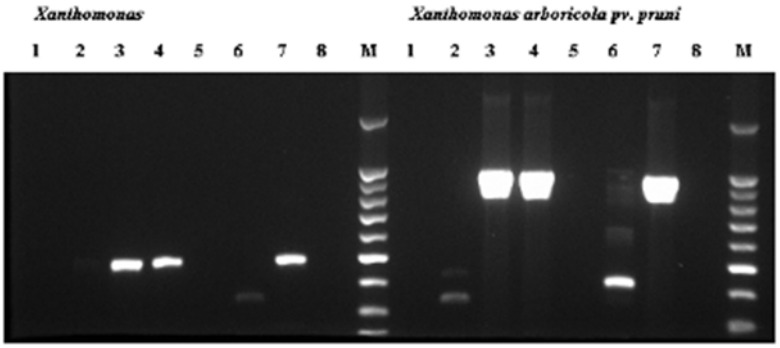
Tabel 1. Gebruikte PCR toetsen binnen dit project.

Toets	Primer/ Probe	Sequentie (5'-3')	Target gen	Soort	Toelichting
Xap	Y17CoF3	TCA AGG TGG CAG AAT GAG TG	ABC gen	TaqMan Q-PCR	(1)
	Y17CoR	GAC GTG GTG ATG ATG ATC TGC			
	Probe Xap-P	CTC GCA GAT CCC GGT TAT T			
Psm	G3	CGT CGG TGA AAG TGA TAC CAC	GyrB gen	SybrGreen Q-PCR	(2)
	G4	CAG CGC AAT CTC GAC ACC AAT			

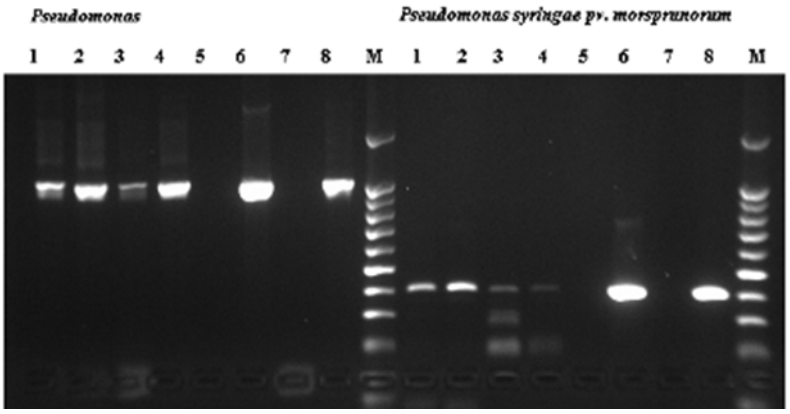
(1) Tamra Probe, 5'kant gelabeld met 6-FAM. Deze TaqMan PCR toets voor Xap is ontwikkeld binnen een FES project (2009), deze is vergelijkbaar met de toets beschreven door Palatio-Bielsa *et al*, 2011). Deze toets bleek achteraf niet 100% specifiek voor Xap, In afwachting op een nieuwe Q-PCR toets (gebaseerd op chromosomale DNA) werd deze toets gebruikt voor bestudering van de verdeling van Xap binnen een plant. Het PCR-programma begint eerst met 2 min. bij 50°C gevolgd door 10 min. bij 95°C. Aansluitend worden 40 cycli uitgevoerd die elk bestaan uit 15 sec bij 95°C en 1 min op 60°C.

(2) Deze toets detecteert naast Psm ook Pss, voor bevestiging van aanwezigheid van Psm is een restrictie analyse nodig (PCR fragment knippen met knipenzym AluI). Het PCR-programma begint eerst met 10 min bij 95°C. Aansluitend worden 40 cycli uitgevoerd die elk bestaan uit 15 sec bij 95°C, 40 sec 62°C en 40 sec op 72°C (Schmidt et.al, 2009).

Diverse PCR toetsen voor Psm zijn ontwikkeld, gebaseerd op andere genen als hrpZ en fruK omdat de variaties in sequenties tussen de pathovars binnen deze genen groot zijn (Inoue et al. 2006). Echter, een absoluut specifieke toets voor een specifieke pathovar (bijv. Psm) is zeer lastig gebleken om te ontwikkelen. Sequentie analyse lijkt momenteel de enige methode voor identificatie van Psm (en andere pathovars) op pathovar niveau.



Figuur 2. Algemene PCR (Maes, 1993) voor *Xanthomonas* identificatie (links van de ladder) en rechts de standaard PCR (Pagini- primers; amplicon 943 bp)



Figuur 3. Algemene PCR voor *Pseudomons syringae* (Porteuos et. al, 2002 (ampl. 990 bp), rechts fragmenten geamplificeerd met primers van Schmidt et.al, 2009 (ampl. 298 bp). Bij laan 3 en 4 zijn achtergrond bandjes te zien.

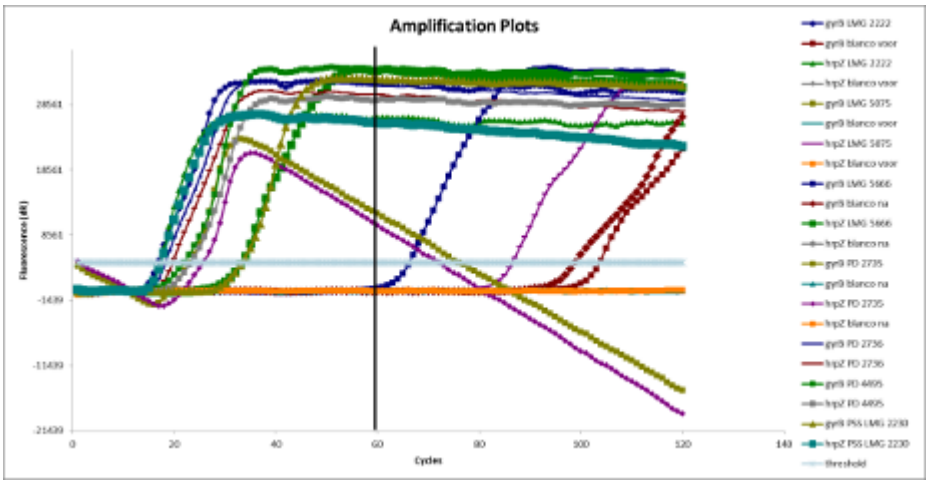
2.2 Ontwikkelen van LAMP PCR voor Psm

Een nieuwe PCR techniek is LAMP PCR (Loop-mediated isothermal amplification). Binnen dit project is ook een LAMP PCR voor Psm ontwikkeld. LAMP is een nucleïnezuur amplificatie methode die net als PCR in korte tijd (30-60min.) enkele kopieën DNA kan amplificeren tot miljoenen detecteerbare fragmenten. Deze methode heeft de potentie om een snelle, specifieke en gevoelige detectie te worden net als PCR. Het verschil met PCR is dat de LAMP reactie isotherm is (bij één temperatuur uitgevoerd kan worden) en dus met relatief goedkope apparatuur kan worden uitgevoerd, zoals een waterbad of hitteblok.
Een aantal Psm isolaten en 1 Pss isolaat werden gebruikt voor toetsing van LAMP PCR (LMG 2222, LMG 5075, LMG 5666, PD 2735, PD 4495 en LMG 2230 (PSS). De resultaten staan vermeld in onderstaande tabel 2. De resultaten werden vergeleken met eerdere Q-PCR op zelfde Psm isolaten. De Ct curve hiervan (zg. threshold waarbij er net detecteerbare hoeveelheden DNA worden geamplificeerd) staat in Figuur 4.

Tabel 2. LAMP resultaten, zoals verkregen met de verschillende Psm en Pss isolaten en Ct waarden van de verschillende monsters. Oranje aangegeven zijn opvallend hoge Ct waarden van Psm isolaten.

		LMG 2222	LMG 5075	LMG 5666	PD 2735	PD 2736	PD 4495	LMG 2230
Methode	primer	Psm	Psm	Psm	Psm	Psm	Psm	Pss
LAMP	GyrB 1	16.86	No Ct	66.28	23.00	18.27	21.94	33.37
LAMP	HrpZ	17.31	86.52	33.29	25.71	19.69	23.29	17.46
Q-PCR*	G3/G4	19.79	no Ct	35.11	22.53	22.82	22.96	n.v.t.

		Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Methode	primer	Voor	Voor	Na	Na
LAMP	GyrB	103.75	No Ct	98.88	No Ct
LAMP	HrpZ	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct



Figuur 4. Amplificatie plots zoals verkregen bij de LAMP PCR

LMG 2222, PD 2735, PD 2736 en PD 4495 gaven een goede positieve reactie. Dit was te zien aan de lage Ct waarde. Wel was gebleken dat de primers niet specifiek zijn, omdat het PSS isolaat 2230 ook een succesvolle amplificatie gaf. Psm isolaten LMG 5075 en 5666 gaven zeer hoge Ct waarden of geen Ct bij LAMP maar ook bij de Q-PCR. Dit kan te maken hebben met de kwaliteit van het geïsoleerde DNA. De overige waarden waren vergelijkbaar met de huidige Q-PCR. Erg belangrijk was ook dat blanco 's niet besmet waren. GyrB primer blanco 's gaven namelijk zeer hoge Ct waarden als gevolg van aspecifieke amplificaties (Tabel 2). Er kan geconcludeerd worden dat de ontworpen primers op basis van de Psm genen hrpZ en gyrB bruikbaar zijn voor toepassing in LAMP.
De doorlooptijd (duur) van de LAMP toets was veel korter dan de standaard Q-PCR reactie: LAMP neemt minimaal 30 minuten in beslag versus 2 uur bij PCR. Er is echter wel gekozen voor een dubbele reactie tijd van 60 minuten bij LAMP om meer inzicht te krijgen in eventuele aspecifieke amplificaties na 30 minuten (zie Fig.4).

Een nadeel van LAMP PCR is dat deze niet werkt bij een combinatie van lage concentratie van pathogeen en onzuiver DNA. Deze LAMP PCR toets is niet uitgebreid gevalideerd en daarom ook niet gebruikt voor bestudering van de experimenten betreffende de lokalisatie en verdeling van Psm binnen *Prunus laurocerasus* (zie hoofdstuk 7).

2.3 Serologische toetsing: Lateral Flow Device

Op dit moment duurt de standaard procedure om een mogelijke besmetting met Xap op een bedrijf te onderzoeken (NVWA, Naktuinbouw) ongeveer 2 tot soms wel 3 maanden. Voor een uitslag dient een Xap isolaat geïsoleerd te worden en nader onderzocht volgens de afgesproken Europese regelgeving. Om telers een handvat te geven om zelf een voorscreening te doen (**die de officiële procedure van de NVWA en Nakttuinbouw niet kan vervangen**) is in samenwerking met PRIME Diagnostics onderzocht of een doe-het-zelf kit (soort predictor test) ontwikkeld kon worden. Deze is gebaseerd op een antiserum welke Xap herkent en bij aanwezigheid een reactie toont.

2.3.1 Materiaal en methode

PRIME Diagnostics leverde LFD's met hierin verwerkt een antiserum welke Xap herkent. Voor het testen van deze LFD is Xap isolaat 998 gekweekt op Nutrient Agar volgens standaard procedures en opgenomen in PBS Buffer (OD 0.1 bij OD600 = $1.5x10^7$ bacteriën/ml). Van deze bacteriesuspensie is een verdunningsreeks gemaakt volgens Tabel 3.

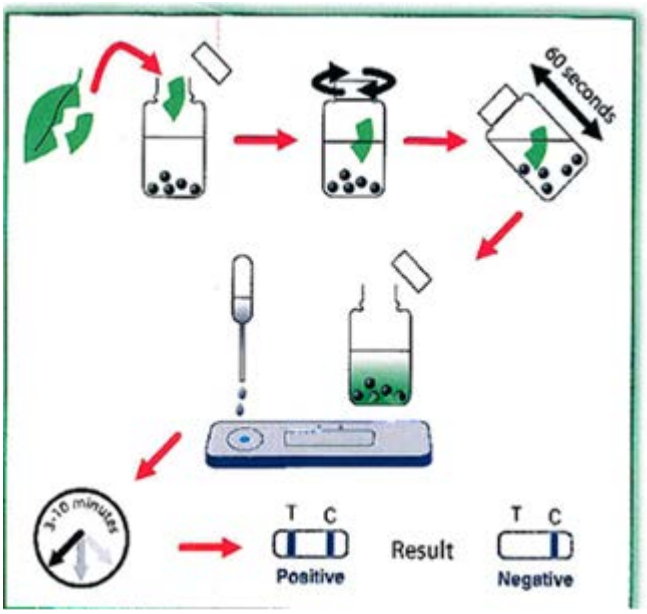
Voor verdere analyse van dit monster zijn de Diag A kit instructies opgevolgd (figuur 5):

- Stukje blad om het symptoom
- Schudden met glasparels in water
- Met pipetje in houder druppelen
- Specifiek antiserum herkent Xap:
- Toont zich door extra streepje

Tabel 3. Verdunningsreeks voor de gevoeligheidsbepaling de ontwikkelde LFD voor Xap.

Xap-concentraties	LFD kit (blad + bacteriën)	DNA isolatie Uit A
1.5×10^6	A1	D1
1.5×10^5	A2	D2
1.5×10^4	A3	D3
1.5×10^3	A4	D4
1.5×10^2	A5	D5

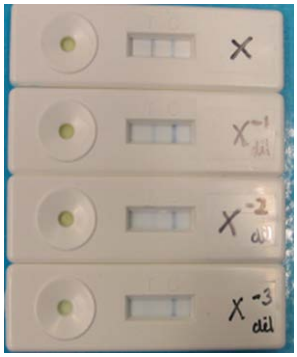
Voor een vergelijking wat betreft de gevoeligheid van deze LFD ten opzichte van PCR detectie is 0.2g laurierkers direct aan 3 ml DNA lysis buffer (Agowa) toegevoegd, gehomogeniseerd in een kogel schudmachine volgens standaard protocol en gespiked met eenzelfde hoeveelheid Xap 998 als gebruikt voor de LFD test (Fig.6B).
De supernatant werd gecentrifugeerd (2000 rpm, 5 mins) en 2.5 µl van dit supernatant gebruikt voor DNA gezuiverd (uit 50µl standaard Kingfisher protocol). Vervolgens is hier de standaard gebruikte PCR zoals hierboven beschreven toegepast.



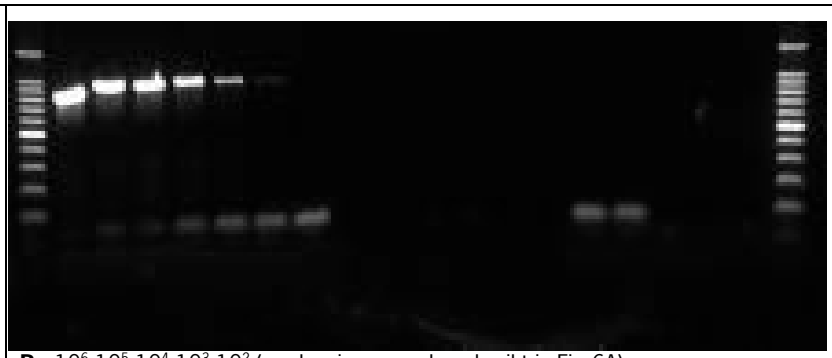
Figuur 5. De procedure om met een LFD (lateral flow device) in plantmateriaal een plantpathogene bacterie aan te tonen. Een stukje blad wordt fijngemalen door schudden met kogeltjes in een buffer, waarna enkele druppels in de LFD worden gebracht. Na 15 minuten wordt een extra band zichtbaar wanneer er een positieve reactie plaatsvindt (herkenning van het pathogeen door het antiserum). Bron: Prime Diagnostics.

2.3.2 Resultaten

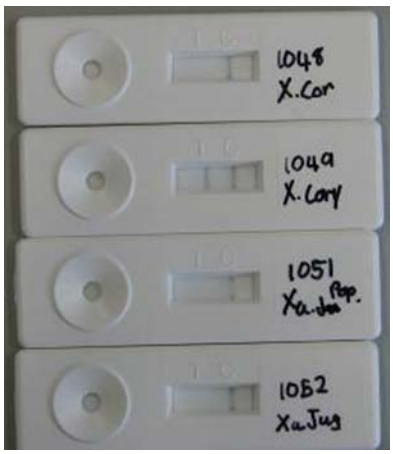
De resultaten met de LFD-kit gaven aan (Fig. 6 A) dat tussen de 1.5 x 10^4 en 1.5 x 10^5 bacteriën kunnen worden aangetoond. De DNA test kan echter nog tot enkele honderden bacteriën (1.5 x 10^2) aantonen (Fig. 6B. Echter, op ongezuiverd lysaat werkt de PCR niet; dit moet minstens 100x verdund worden om geen storing van de PCR te geven (resultaten niet weergegeven). De testkit is dus minder gevoelig dan DNA-test, maar robuuster (kan zonder verdere isolatie of zuivering worden uitgevoerd) en is uitvoerbaar binnen 15 minuten in tegenstelling tot een DNA-test die op een laboratorium moet worden uitgevoerd.
Het antiserum vertoont wel kruisreacties met enkele andere *Xanthomonas*-soorten (**Figuur**) die echter niet op *Prunus* zullen voorkomen.
De kosten voor deze LFD Xap kit bedragen voor 5 testkits € 27,50 en zijn te verkrijgen bij Prime Diagnostics. Cultus Agro Advies voert deze tests ook uit (zie paragraaf 2.4) en hebben in dit project goede resultaten bereikt met deze kit. Echter, deze kit vervangt niet de diagnose door de NVWA!



A.


B. 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 (verdunningen zoals gebruikt in Fig.6A)

Figuur 6. Uitslag van LFD test (A) in vergelijking met PCR test (B) bij verschillende verdunningen van Xap. Bij de LFD is er nog een positieve reactie (streepje) bij 10^4; in PCR is nog een bandje bij 10^2.



Figuur 7. Vals positieve kruisreactie van de Xap LFD met een verwante- *Xanthomonas arboricola* corylina; overige geteste soorten: 1049- *Xanthomonas arboricola* corylina; 1051 *Xanthomonas arboricola* pv. populi en 1052 *Xanthomonas arboricola* pv. juglandis.

2.4 Conclusies

De TaqMan PCR, gebaseerd op de "Pagini"- primers voldoet goed; vergeleken met de LFD is de PCR zeker honderdmaal gevoeliger, maar wel na DNA isolatie. Voor Psm is het lastig deze van *P. syringae* pv. *morsprunorum* te onderscheiden; de LAMP is een handige nieuwe techniek maar niet specifiek voor Psm.

3 Symptoomanalyse en monsters uit de praktijk

Een van de gestelde vragen uit de praktijk is, of het mogelijk is om hagelschotsymptomen te kunnen onderscheiden, veroorzaakt door respectievelijk Xap, Psm, of schimmels. Bij een bedrijfsbezoek in 2010 zijn daarom van een groot aantal *Prunus laurocerasus*-soorten blad- en twijgmateriaal geplukt, gefotografeerd en geanalyseerd via PCR. Daarnaast is getracht symptoomontwikkeling te versnellen via zg. symptoominductie (kunstmatig aangelegde warme, vochtige condities) om op deze wijze eventuele latente besmettingen zichtbaar te maken.

3.1 Symptoomanalyse

Om te kunnen beantwoorden welke symptomen nu veroorzaakt worden door Xap en/of Psm, en waar geen van beiden (dus dan mogelijk als gevolg van een schimmelinfectie veroorzaakt), zijn symptomen gefotografeerd en geanalyseerd met PCR. Een aantal voorbeelden zijn weergegeven in Fig.8.

Figuur 8. Foto's en bijbehorende testuitslag van verdachte symptomen in gewasmonsters.

<table>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>Monster 1; cv 'Etna' geen symptomen, geen Xap en Psm</td><td>Monster 2; cv 'Etna'; afgevallen bladeren met hagelschotsymptomen. Xap en Psm aanwezig.</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
</table>

Monster 3. *Prunus* lusitanica; bladeren met hagelschot symptomen; geen Xap en Psm	Monster 4; cv 'Caucasica'; bladeren met hagelschotsymptomen; geen Psm, Xap in lage hoeveelheid.
	
Monster 5. Cv 'Herbergii'; bladeren met symptomen; oud en nieuw blad; geen Xap en Psm	Monster 6. Cv 'Herbergii'; bladeren met hagelschotsymptomen; oud en nieuw blad; geen Psm; Xap in lage hoeveelheid
	
Monster 7. Cv. 'Otto Luyken'; bladeren; geen Xap, wel Psm	Monster 8. Cv. 'Polster'; bladeren; geen Xap en Psm aanwezig.
	
Monster 9. Cv. 'Grüner Teppich'; blaadjes met symptomen, ook jong blad; Xap en Psm aanwezig.	Monster 10. Cv. 'Etna'; jong en oud blad; geen Xap en Psm aanwezig.

	
Monster 11. Cv. Herbergii; jonge scheut van plant met hagelschotsymptomen. Geen Xap en Psm	

Xap is aangetoond in monsters 2, 4, 6, en 9 (Fig. 8). De concentratie in monster 4 en 6 was niet hoog, zoals bepaald in PCR. Psm is aangetoond in monsters 2, 7, 9. Er lijkt een trend dat wanneer monsters positief zijn voor Xap of Psm, vaak een gelige rand (halo) rondom het symptoom (verdord stukje blad) aanwezig is. Dit is duidelijk te zien bij monster 9, en ook in Fig.9: foto van monster 'kweker6". In kunstmatige infectie-experimenten zijn dergelijke halo's ook waargenomen (zie Hoofdstuk 4.1). Echter, er zijn ook uitzonderingen gevonden: daar waar geen halo gevonden werd, zijn ook positieve uitslagen (aanwezigheid van Psm en/of Xap) gevonden. Bevestiging via PCR is daarom noodzakelijk.
De symptomen van de monsters die geen reacties geven op Xap en Psm kunnen veroorzaakt zijn door schimmels.
Schimmels die geïsoleerd zijn uit deze symptomen, maar ook in voorafgaande studies zijn in 2012 geanalyseerd. Hierin zijn *Stigmina carpophila*, maar ook *Alternaria* soorten en *Epicoccum nigrum* aangetoond. Ook zijn *Cladosporium* soorten, *Phoma* soorten en *Phomopsis* soorten geïsoleerd. Er zijn geen infectie-experimenten uitgevoerd met deze schimmels. Het is dus de vraag of, en zo ja welke van deze niet nader gekarakteriseerde schimmels ook voor de typische hagelshot symptomen kunnen zorgdragen.

3.2 Diagnose van praktijkmonsters: PCR

Vooral in 2010, maar ook in 2011 en 2012 zijn monsters uit de praktijk verzameld van bedrijven waar eerder een besmetting met Xap werd vastgesteld. Cultus Agro Advies heeft veel van deze monsters aangeleverd; De bewerking en analyse middels PCR is uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 2.1. De monsters van 2010 en 2011 zijn weergegeven in tabel 4. Enkele symptomen zijn weergegeven in figuur 9. De monsters in 2012 zijn meestal vooraf getest met de LFD test (hfst.2.3), zie Tabel 5 en 6.

Tabel 4. Analyse van praktijkmonsters van *P. laurocerasus* cv's op de aanwezigheid van Xap en Psm in 2010 en 2011.

Monster nr.	herkomst	Gewas/cv van *Prunus* (laurocerasus)	Xap	Psm	opmerkingen
42649	Kweker 4	Rotundifolia	nee	ja	vollegrond
42650	Kweker 5	,,	nee	ja	volle grond
42651	Kweker 6	,,	ja	ja	container
42652	Kweker 7	,,	ja	ja	container
42653	Kweker 1	,,	nee	-	schimmel
42654	Kweker 2	P. laurocerasus	nee	ja	
42655	Kweker 3	Etna	nee	-	schimmel
-	Zundert 1	P. serotina (Amerikaanse vogelkers)	nee		schimmel?
-	Zundert 2	P. serotina (Amerikaanse vogelkers)	nee		schimmel
42689	Kweker 8.1	Rotundifolia	nee	nee	schimmel
42690	Kweker 8.1	Rotundifolia	nee	nee	schimmel
42720	-	Caucasica	nee		

Monster nr.	herkomst	Gewas/cv van *Prunus* (laurocerasus)	Xap	Psm	opmerkingen
42721	-	P. laurocerasus	nee		
42735	-	Etna	ja	ja	
42740	-	Etna	ja		
42782	-	P. laur.	ja		
42797	-	Otto Luyken	ja		
42799	-	Lusitanica	ja		
42811 A	-	Rotundifolia	nee		
42811 B	-	Etna	ja	ja	
42815	-	Rotundifolia	ja	nee	
42820	Kweker 9	Rotundifolia	ja	nee	
42821	Kweker 10	P. laurocerasus	nee	nee	
42822		Otto Luyken	ja	nee	
42838		Rotundifolia	ja	ja	
42851		Otto Luyken	ja	nee	
42855		Novita	nee		
42657	PPO	P. (kers)	nee		
42722	Kweker 12	Otto Luyken	ja		
42746	-	Novita	ja		
42831	-	Rotundifolia	ja	ja	
42906 A	-	Herbergii	nee		
42906 B	-	Novita	ja		
42923	plantsoen	Rotundifolia	nee		
42927	Kweker 11	Rotundifolia	nee		

Figuur 9. Symptomen, behorende bij de uitslagen van enkele monsters uit tabel 4.



Kweker 4: symptomen van Psm



Kweker 5: Psm



Kweker 6: Psm + Xap



Kweker 7: Psm + Xap



Kweker 8.1: schimmel



Zundert 1: schimmel in Vogelkers

Tabel 5. Diagnose-uitslagen van 9 *Prunus*monsters genomen in 2012, getest met zowel de LFD als PCR-test (Xap en Psm).

Monster	Teelt	Kweker	Datum Ontvangst	LFD-test	PCR Xap	PCR Psm
1	Kas, *Prunus* rotundifolia	Kweker 1	1-mei-12	neg	neg	zwak pos
2	Vollegrond, wilde haag	Kweker 2	5-jun-12	neg	neg	neg
3	Containerveld, buiten	Kweker 2	5-jun-12	neg	neg	neg
4	Vollegrond, wilde haag	Kweker 3	5-jun-12	neg	neg	neg

5	Vollegrond, *Prunus* rotund.	Kweker 5	11-jun-12	neg	neg	neg
6	Vollegrond, 7.1	Kweker 7	1-aug-12	pos	pos	pos
7	Container, Herbergii, 7.2	Kweker 7	1-aug-12	pos	pos	pos
8	Vollegrond, haag, 8.1	Kweker 8	1-aug-12	pos?	neg	neg
9	Vollegrond, 8.2	Kweker 8	1-aug-12	pos	pos	zwak pos

In 2011 zijn in totaal 40 monsters getoetst met LFD: de Xap doe-het-zelf-test. Deze toets is uitgevoerd door Cultus Agro Advies op een groot aantal bedrijven in Midden- en Zuid-Nederland. Een selectie hieruit is tevens getoetst bij PPO-BBF met DNA-toetsen, specifiek voor Xap en Psm. Vier monsters die negatief in de LFD-kit scoorde, waren ook negatief in de Xap DNA-test; twee hiervan reageerden wel (hoewel zwak) in de DNA-toets op Psm. De vier bladmonsters, positief in de LFD-test, scoorden ook positief in de DNA-toets. De LFD-kit voldoet derhalve goed op symptomatisch bladmateriaal, wanneer het voorschrift van de kit wordt gevolgd.
Opvallend is, dat er na medio 2011 en medio 2012 (veel) meer positieve uitslagen in de toetsen zijn gevonden. Dit was steevast na een warme en vochtige periode. Dit is goed te zien in Tabel 5 en 6. In Tabel 5 worden met name positieve (Psm en/of Xap aanwezig) reacties na een warme periode in augustus gevonden. Dit is tevens vastgesteld voor de jaren 2010 en 2011 (niet weergegeven).
Tabel 6 geeft weer per regio de incidentie in de tijd. In de regio Venlo bleken geteste symptomen in laurierkers cultivars op bedrijven negatief van april tot begin augustus; positieve monsters werden gevonden in eind augustus en begin september.
Voor de regio Zundert : 14 negatieve monsters van april tot begin augustus, 5 negatieve monsters van half augustus tot half oktober. Positieve monsters 2 eind augustus, 2 half september en 1 begin oktober.
In de regio Midden Brabant werden 2 negatieve monsters van april tot begin augustus, 3 negatieve monsters van half augustus tot half oktober. En pas 1 positief monster half september gevonden.
Regio Oost en “de rest van Nederland” : 2 negatieve monsters van april tot begin augustus, 3 negatieve monsters van half augustus tot half oktober. 2 positieve monsters tussen half en eind september.
Er zijn 35 monsters getest op visuele afwijkingen aan de planten. Er zijn 5 monsters getoetst waar geen symptomen aan de plant te zien waren. Deze 5 monsters gaven een negatieve uitslag (niet weergegeven).

De conclusie is, dat latent aanwezige (symptoomloos) Xap of Psm na inductie door externe omstandigheden (warmte en vochtigheid) wordt getriggerd en dan aanzet tot vermeerdering en symptoomvorming.

Tabel 6. Analyse van symptomatische laurierkers op bedrijven middels de LFD toetsing in 2012 door Cultus Agro Advies.

Monsters/regio	Xap positief	Xap negatief	Opmerkingen*
Venlo	2	9	Positieve monsters: eind aug-begin sept
Zundert	5	14	Pos.monsters: eind aug-begin okt
Midden Brabant	1	4	Pos.monsters: half september
Oost- rest Nederland	2	3	Pos.monsters: half- eind september

*NB: pas positieve reacties na de warme periode in augustus!

3.3 Inductie van symptoomexpressie

Het is gebleken dat de bacteriën Xap en/of Psm in lage hoeveelheden in de plant aanwezig kunnen zijn, zonder dat symptomen zichtbaar zijn. De aanwezigheid van bacteriën kan dan niet worden gedetecteerd door de LFD-test. Zo’n test is makkelijk toepasbaar door kwekers, maar is voor die situatie niet gevoelig genoeg.
Er is behoefte aan een eenvoudige methode, waarin de plant gedwongen kan worden tot symptoomexpressie, waarna alsnog de LFD-test uitgevoerd kan worden. In de praktijk kwam naar voren dat tijdens warme, vochtige perioden de bacterieziekte massaal tot symptoomvorming overgaat. Aan de hand

van deze gegevens is een proef ingezet om bacteriële symptomen te induceren in laurierkers.

3.3.1 Aanpak

In het laatste kwartaal van 2012 zijn 2 besmette *Prunus* planten cv. 'Otto Luyken' (besmetting aangetoond in maart tot juni) gedurende 6 weken in een klimaatkast gezet bij 25°C en een RV-instelling van 95%. Om de RV verder op te voeren, is er een plastic zak geplaatst over de planten (Figuur 10). Wekelijks werd ruim water gesproeid over de planten. De planten kregen 12 uur licht per dag. Door de hoge temperatuur ging de plant bloeien. Regelmatig zijn de planten beoordeeld op symptoomvorming. Verdachte symptomen zijn beoordeeld met een LFD-test; na 6 weken zijn monsters genomen van bladknop, blad zonder symptoom, blad met symptoom, bloemknop, stengel éénjarig en wortel (oude met nieuwe wortelvorming). Deze zijn geanalyseerd met PCR op de aanwezigheid van Xap.



Figuur 10. Inductie van symptoomexpressie van Xap en Psm in klimaatkast bij hoge RV en temperatuur.

3.3.2 Resultaten

Na ca. 2 weken waren diverse bladeren aan de onderzijden donkergroen verkleurd. Deze zijn getest met de LFD-test, maar de uitslag was negatief. Opvallend was dat deze beelden op de geplukte bladeren na ca. 2 uur verdwenen waren. Vermoedelijk ging het alleen om waterverzadiging van het weefsel en niet om kapotte en met bacteriën geïnfecteerde cellen.

Na 3-4 weken ontstonden er bruine vlekken in het blad met een gelige rand er om heen. Ook werden breuklijnen in deze bruine vlekken zichtbaar (Figuur 11). Deze symptomen zijn opnieuw beoordeeld met de LFD-test, maar de uitslag was wederom negatief. Na 6 weken bleken ook alle PCR-uitslagen van de genomen monsters negatief.



Figuur 11. Symptomen uit symptoom inductie-experiment (bruine vlek met gele rand en breuklijn).

3.3.3 Conclusie

De geteste methode blijkt niet toepasbaar voor het induceren van symptomen. Blijkbaar is een continue hoge temperatuur en RV (zoals gebruikt in dit experiment) niet voldoende voor symptoomexpressie. Het vermoeden is dat de omstandigheden heel wisselend moeten zijn. Kwekers hebben in de praktijk de indruk dat lage druk / onweer het zou kunnen bespoedigen. Toch verdient deze insteek (toediening van "stress") herhaald te worden.

4 Infectie experimenten

4.1 Bladeren

In juni 2010 is een infectieproef gestart met Xap en Psm op bladeren. Als basis is het EPPO-protocol 7/64 gebruikt (Palacio et al. 2011). De proef is uitgevoerd met 8 verschillende cultivars. Per plant werden 2 bladeren verzameld (3e van boven). Per cultivar per behandeling werden 6 bladeren gebruikt (van 3 planten elk 2 bladeren).

Behandelingen:

1. *Prunus laurocerasus* 'Rotundifolia' + PBS-buffer
2. *Prunus laurocerasus* 'Novita' + PBS-buffer
3. *Prunus laurocerasus* 'Rotundifolia' + Psm
4. *Prunus laurocerasus* 'Novita' + Psm
5. *Prunus laurocerasus* 'Rotundifolia' + Xap
6. *Prunus serrulata* 'Kanzan' + Xap
7. *Prunus lusitanica* + Xap
8. *Prunus pumila* var. depressa + Xap
9. *Prunus laurocerasus* 'Caucasica' + Xap
10. *Prunus laurocerasus* 'Novita' + Xap
11. *Prunus avium* + Xap
12. *Prunus laurocerasus* 'Etna' + Xap

Als inoculum werd een bacteriesuspensie gebruikt van $1{,}6x10^7$ CFU/ml (Xap) en $1{,}0x10^6$ CFU/ml (Psm). Deze dichtheid aan levende bacteriën is achteraf bepaald door monsters uit te platen in 2 verdunningen (10^5 en 10^3) op agarplaten.
Als inoculatie werd met een injectiespuit zonder naald een ring gedrukt in de onderzijde van het blad (ca. 10 inoculaties per blad). Op deze beschadigingen werd vervolgens 20 µl inoculum op de onderzijde van het blad aangebracht. De geïnoculeerde bladeren werden per 2 bladeren in een steriele petrischaal op vochtig filtreerpapier gelegd. De schalen werden geseald met parafilm en daarna bij 24°C en 16 uur licht per dag en na 2 weken beoordeeld.

Tabel 7. Waargenomen beelden na inoculatie van bladeren met Xap resp. Psm na 2 weken.

Inoculatie van verschillende cultivars	**Waarneming na 2 weken**
Controle: P. 'Novita' + buffer geinoculeerd	Geen symptomen
Controle: P. 'Rotundifolia' + buffer geinoculeerd	Geen symptomen
P. 'Novita' + Psm	Geen effect rond inoculum plek
P. 'Rotundifolia' + Psm	Halo rond inoculum plek
P. 'Rontundifolia' + Xap	Halo rond inoculum plek;
P. 'Novita' + Xap	Halo effect rond inoculum plek
P. serrulata 'Kanzan' + Xap	Necrosis rond inoculum plek, maar niet in alle gevallen
P. lusitanica + Xap	Necrosis rond inoculum plek, maar niet overal en even duidelijk
Prunus pumila var. depressa + Xap	Necrotische vlekken rond inoculum plek
P. 'Caucasica' + Xap	Geen effect van inoculum te zien
P. 'Etna' + Xap	Halo rond inoculum plek
P. avium + Xap	(Zware) necrosis rond inoculum

Bij de beoordeling bleek dat er nauwelijks symptomen waren opgetreden (Tabel 7). De inoculatiemethode beschadigde het bladweefsel. Dit deel verkleurde dan bruin. Daarmee was een nieuwe symptoomvorming moeilijk te onderscheiden van de bladreactie op de beschadiging (figuur 12). De symptoomvorming was niet uniform verdeeld over de herhalingen; in sommige cultivars ontwikkelde slechts 1 van de 6 bladeren duidelijke symptomen.

Hierdoor kon geen index systeem ontwikkeld worden om de cultivargevoeligheid te bepalen. Hiermee lijkt deze toetsmethode minder geschikt om cultivargevoeligheid en de werking van gewasbeschermingsmiddelen vast te stellen.



Watercontrole	Inoculatie met Psm	Inoculatie met Xap

Figuur 12. Resultaat van inoculatieproef met bladeren van *Prunus laurocerasus* 'Novita', vlnr watercontrole, inoculatie met Psm resp. Xap.

4.2 Planten

4.2.1 Infectie experiment voorjaar 2011

Eind april zijn in een quarantainekas infectie-experimenten uitgevoerd met Xap, Psm en een gemengde infectie met beide bacterie-soorten in *Prunus laurocerasus* 'Rotundifolia', *P. laurocerasus* 'Etna' en *P. serrulata* 'Kanzan'.
Een Xap- en een Psm isolaat zijn overnacht gekweekt op een agarplaat. Hierna zijn de bacteriën overgebracht naar een PBS-buffer en op een dichtheid gebracht van $1x10^7$ CFU/ml.

Hiermee zijn 4 behandelingen uitgevoerd (26 april 2011):

1. Water controlebehandeling
2. Psm: $1x10^7$ CFU/ml
3. Xap: $1x10^7$ CFU/ml
4. Psm + Xap: $1x10^7$ CFU/ml

Per behandeling zijn 2 inoculatiemethoden getest, namelijk injectie in de hoofdnerf van het blad of in een okselknop. Na inoculatie werd een druppel inoculum op de wond aangebracht, welke aan de lucht kon drogen. Vervolgens zijn de planten in de kas geplaatst, ingepakt in een plastic zak om een hoge RV te handhaven. Na 4 dagen is het plastic verwijderd en is de symptoomontwikkeling is tot half mei gevolgd.



Figuur 13. Ontwikkeling van bruine vlekken in *Prunus*planten in infectieproef met planten.

Na enkele weken ontstonden bruine vlekken in de bladeren in alle behandelingen (Figuur 13), ook in de controlebehandeling (water). Geïnoculeerde planten leken een sterkere wondreactie hebben als de controleplanten. De symptomen breidden zich echter niet uit. Wel ontstond er schimmelvorming op de bladeren. Vermoedelijk kwam dit doordat de plastic zakken langdurig over de planten zaten en contact maakten met de bladeren.
De bruine vlekken in het gewas blijken veroorzaakt door een te hoge EC in de pot. Bij het oppotten is Osmocote toegevoegd aan de potgrond. Vervolgens hebben de planten in de kas gestaan bij hogere temperaturen. Vermoedelijk kwam hierdoor de langzaam werkende meststof versneld vrij.
Na 10 weken zijn er monsters genomen van de planten, en getoetst in PCR op Xap en Psm. Deze bleken niet aantoonbaar. Klaarblijkelijk heeft er onder deze condities geen infectie plaatsgevonden.

4.2.2 Infectie experiment zomer 2011

Daar de vals positieve symptomen van inoculatie experimenten met Xap of Psm experimenten met gewasbeschermingsmiddelen zullen hinderen, is dit experiment uit de vorige paragraaf herhaald in juni/juli op drie cultivars in verschillende herhalingen en met een ander inoculatietechniek;
In een tweede pilot (juli 2011) is de RV in de kas verhoogd (90%) vanaf 24 uur voor inoculatie tot 3 dagen na inoculatie. In tegenstelling tot het vorige experiment is er geen zak over de planten gedaan.

Voor de proef zijn dezelfde cultivars gebruikt als in de vorige proef (*Prunus laurocerasus* 'Rotundifolia', *P. laurocerasus* 'Etna' en *P. serrulata* 'Kanzan'). Er zijn planten uitgezocht, die geen bladverbranding en hagelschotsymptomen vertoonden. Voor inoculatie zijn de bladeren schoongeveegd met 70% alcohol. Voor inoculatie is een mengsel gebruikt van 3 Xap-isolaten voor een grotere kans op infectie. Er zijn 3 behandelingen ingezet:

1. Watercontrole: met een injectiespuit zonder naald is een ring gedrukt in de onderzijde van het blad. Op de wond werd een druppel PBS-buffer gelegd.
2. Als behandeling 1, maar dan een druppel Xap-suspensie op de wond
3. De onderkant van het blad werd ingewreven met carborundum poeder (geeft beschadiging). Hierna werd een druppel Xap-suspensie op dit punt aangebracht.

Na inoculatie werden de planten horizontaal gelegd, zodat het inoculum niet van het blad kon aflopen. De temperatuur in de kas was rond inoculatie 23°C. Deze inoculatiemethode is ook gebruikt voor de zg." detached leaf" experimenten die vorig jaar zijn uitgevoerd.

Ook dit gaf onvoldoende resultaat. Er ontstonden geen nieuwe symptomen in deze planten en kon geen Xap of Psm in PCR worden aangetoond.

4.2.3 Conclusie infectie experimenten

De kas lijkt niet de juiste omgeving om inoculatie-experimenten te doen. Ook is de symptoomontwikkeling niet goed verdeeld, zodat een eventueel effect van bestrijdingsmiddelen niet goed meetbaar is. Deze teleurstellende bevinding is per mail aan de begeleidingscommissie gemeld in juli 2011. Dit is aanleiding geweest om in 2012 de nadruk te leggen op onderzoek waar Xap en ook Psm zich nu door het jaar heen in latent besmette planten bevinden (zie hoofdstuk 5).

4.3 Wortels

Bacteriën die bladvlekken veroorzaken, geven in het algemeen meer aantasting bij langere bladnatperioden. Om de kans op aantasting in *Prunus* te verkleinen, is het idee om in het teeltsysteem alleen onderdoor water te geven. Een van de mogelijkheden daarvoor is het pot in pot systeem, waardoor de planten via een eb-vloed principe water krijgen. Voor zover bekend infecteert de *Xanthomonas*-bacterie niet via de wortels.

Omdat eerder aangetoond is dat de bacterie wel in het gietwater kan voorkomen (zie 6.1.4), is het verzoek van een *Prunus*-kweker om vast te stellen of er via deze manier van watergeven inderdaad geen infectie optreedt.
Plantgoed van *Prunus laurocerasus* 'Caucasica' is begin oktober 2012 overgepot vanuit P9 in 3 liter potten en in de quarantainekas geplaatst. Bij het overpotten is 2,5 gram Osmocote 8-9 maanden toegevoegd aan de nieuwe potgrond als voorraadbemesting.

De volgende 5 behandelingen zijn uitgevoerd met 10 planten per behandeling:
1. Potten aangieten met water
2. Potten aangieten met Xap
3. Wortels beschadigen en dan aangieten met Xap
4. Water over plant gieten
5. Xap over plant gieten

Als inoculatie is er een mengsel gebruikt van 3 Xap-isolaten. De bacteriedichtheid is ca. 10^7 per ml.
De inoculatie gebeurde met 200 ml per plant. Dit werd op de potkluit gegoten (beh 1-3) of over de plant (beh 4 en 5). Na inoculatie kregen de planten op de schotel water (vergelijkbaar met eb-vloed systeem) naar behoefte. De watercontrole-behandelingen stonden op een aparte tafel om kruisbesmetting te voorkomen. Na inoculatie werd in de kas een temperatuur aangehouden van aanvankelijk 18 graden en in december, januari 15 °C. De planten vormden vrij snel een nieuw schot.

Als beschadiging van de wortels (beh 3) zijn er per pot kluit 10 verticale sneden gemaakt met een scherp mes van ca. 1 cm diep, vlak voor overpotten en vervolgens inoculatie.

Na 3 maanden (half januari 2013) zijn bladknop- en wortelmonsters genomen van 5 willekeurige planten per behandeling. Ook zijn veegmonsters genomen van de schotel onder deze planten. De gewas- en veegmonsters zijn geanalyseerd met PCR. Tot dan toe waren geen hagelschot en/of bacterieziekte symptomen ontstaan.

Uit toetsing van de monsters bleek dat Xap in 2 behandelingen in de bladknop is gevonden (**Tabel**), maar niet in wortels en op de schotels. In planten, waarbij de wortels beschadigd waren vlak voor infectie was een lage hoeveelheid Xap aanwezig. In de behandeling waarbij Xap over de planten werd gegoten, werd duidelijk Xap in de rustknoppen teruggevonden.

Tabel 8. Toetsing van gewas en veegmonsters op aanwezigheid van Xap na wortelinfectieproef van *Prunus* in kas.

Nr.	Behandeling	bladknop	wortel	schotel
1	Potten aangieten met water	nee	nee	nee
2	Potten aangieten met Xap	nee	nee	nee
3	Wortels beschadigen en dan aangieten met Xap	**zwak**	nee	nee
4	Water over plant gieten	nee	nee	nee
5	Xap over plant gieten	**ja**	nee	nee

4.3.1 Conclusie wortelinfectie experimenten
Uit dit experiment kan geconcludeerd worden dat het technisch mogelijk is dat Xap via beschadigde wortels de plant binnen kan komen en zich verplaatst naar de rustknoppen. Ook bij het overgieten van de plant met een hoge concentratie Xap, kan Xap zich in de bladknop ophouden. Dit experiment geeft echter geen uitsluitsel van het risico hiervan tijdens de teelt.

5 Toepassing van gewasbeschermingsmiddelen

Een belangrijke vraag voor *Prunus* telers met bacterieziekten problemen, maar feitelijk ook breed in de teelt van cultuurgewassen is hoe bacterieziekten te beheersen. Er zijn echter weinig middelen commercieel beschikbaar, en de werking is erg wisselend. Nog steeds worden veel koperhoudende middelen gebruikt, die voor bepaalde bacterieziekten een effect sorteren, maar waarvan bekend is dat resistentie kan optreden (Cooksey 1993). In deze beknopte experimenten zijn 5 middelen, waaronder koperoxychoride, onderzocht op hun werking onder laboratorium condities. Deze zijn niet in kasexperimenten getest vanwege onvoldoende symptoomontwikkeling van kunstmatige Xap en Psm infectie.

5.1 Proefopzet gewasbeschermingsmiddelen

Voor de middelentoetsing is in september 2010 gestart met een in vitro toets, waarbij de remming van de bacteriegroei gemeten wordt na toediening van het middel in een toenemende concentratie. Dit is een praktisch makkelijk uitvoerbare proef. Het geeft alleen de directe (contact)werking weer op de bacteriegroei. Sommige middelen hebben een meer plantversterkende werking, die in deze proefopzet geen remmende werking zullen vertonen.

Als basis is een PPO-protocol gebruikt voor een in vitro toets met *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Van een twee dagen oude cultuur werd een Xap-suspensie gemaakt (ca. 10^7 cfu per ml.). Hiervan werd 100 µl op een Nutrient Agar groeiplaat gebracht en verdeeld met steriele glasparels. De glasparels werden verwijderd, waarna de schalen 3 uur aangedroogd werden in een broedstoof (24°C).

Intussen werden de volgende middelen klaargemaakt:

1. Aliette
2. Koperoxychloride
3. Menno Clean
4. Captan
5. ArgicinPlus
6. Controle Streptomycine
7. Controle water

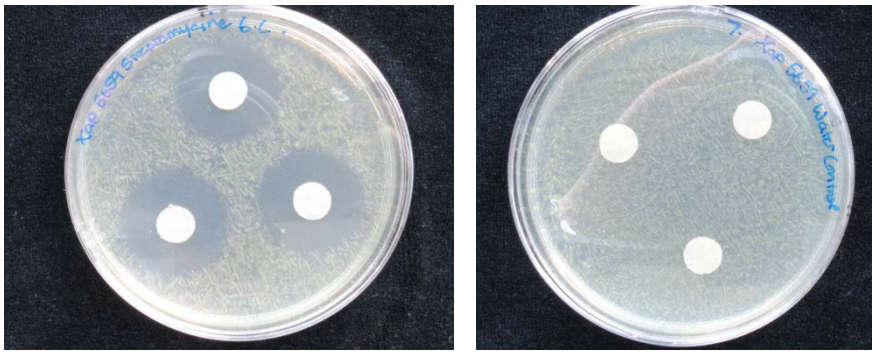
Elk middel werd getest in 3 doseringen, namelijk 50, 500 en 5000 ppm. Op steriele filterschijfjes (Ø 8 mm) werd 25 µl vloeistof aangebracht. Overtollige vloeistof werd zo nodig licht afgedept aan de rand voor het opbrengen. Per verdunning werden 3 filterschijfjes op 1 bacterieschaal gelegd. Hierna werden de schalen 7 dagen in de stoof (24°C) gezet om groeiremming vanuit het filter te kunnen waarnemen.

5.2 Resultaten toepassing gewasbeschermingsmiddelen

Tabel 9. Groeiremming (mm) rond filterschijfje van 6 middelen in 3 doseringen op een agarplaat met Xap na 7 dagen.

Middel	A. 50 ppm	B. 500 ppm	C. 5000 ppm
1. Aliette (w.s. fosethyl-aluminium)	0	0	0
2. Koperoxychloride (w.s. koper)	0	0	2
3. Menno Clean (w.s. benzoëzuur)	0	0	0
4. Captan (w.s. captan)	0	3	3
5. Argicin Plus (w.s.: zilver)	0	0	0
6. Controle Streptomycine	0	3	8
7. Controle water	0	0	0

Uit Tabel 9 blijkt dat streptomycine als controlebehandeling (antibioticum) de meeste groeiremming geeft (Figuur 14). Van de geteste middelen gaf Captan zowel bij 500 ppm als bij 5000 ppm een groeiremming. Koperoxychloride gaf bij 5000 ppm een groeiremming. Bij de overige middelen werd geen groeiremming waargenomen. Het middel Argicin Plus bevat naast 0,1% zilver (contactwerking) ook salicine, wat de plantweerstand verhoogt.



Figuur 14. Groei-remmende werking van 5000 ppm streptomycine rond filterschijfjes (links) op Xap in vergelijking met watercontrole (rechts).

Volgens het projectvoorstel was het de opzet om het middelen onderzoek voort te zetten met geïnoculeerde planten. Omdat het inoculeren niet leidde tot aantoonbaar besmette planten, incl. symptomen is eind 2011 in overleg met de begeleidingscommissie besloten het middelenonderzoek niet voort te zetten.

5.3 Conclusies gewasbeschermingsmiddelen

In *in vitro* experimenten kon alleen een werking worden vastgesteld via groeiplaat remmingsexperimenten van Captan en koperoxychloride. De andere middelen kunnen wellicht alleen in of op de plant hun werking uitoefenen.

6 Bedrijfsbezoeken

Er zijn gedurende drie jaar een aantal bedrijven onderzocht op de aanwezigheid van met name Xap. Het betrof hier bedrijven die een Xap besmetting hadden doorgemaakt.

6.1 Bezoeken in 2010

6.1.1 Bedrijf A, zomer 2010.

Dit bedrijf is bezocht in zomer 2010. In 2009 is hier Xap vastgesteld door de Naktuinbouw/NVWA in de cultivar 'Etna'. Het bedrijf teelt 10 ha *Prunus laurocerasus* in ca. 12 cv's. Daarnaast teelt het bedrijf ook *Prunus lusitanica*. De kweker ervaart verschillen in gevoeligheid. In de cultivars 'Etna' en 'Polster' ontstaan snel symptomen. De cultivar 'Otto Luyken' is ook gevoelig. In cultivars 'Caucasica', 'Novita' en 'Rotundifolia' zijn nauwelijks symptomen waargenomen.

Het bedrijf heeft de volgende ervaringen:

- Het bedrijf teelt cv 'Etna' al 15 jaar. 5-6 jaar geleden is plantmateriaal ingekocht in de regio en is eigen plantmateriaal gebruikt. In het plantmateriaal uit de regio ontstonden bacterieziekte symptomen. Dit is vervolgens uitgebreid naar de planten van de andere herkomsten van de cultivar 'Etna'. Het was toen niet bekend wat het was.
- Van de partij 'Etna' waarin vorig jaar Xap is vastgesteld, zijn in voorjaar 2010 7000 planten vanuit de vollegrond opgepot in de kas gezet. Het nieuwe schot is dan nog steeds vrij van symptomen. De bladeren onderin het gewas met symptomen worden handmatig verwijderd, waarna de planten alsnog geleverd worden. Planten met te zware aantasting worden niet schoongemaakt, maar geruimd.
- Jaarlijks gaan er planten met dit soort symptomen naar een kweker op veengrond, waar er grote struiken van worden gekweekt. Daar ontstaan geen symptomen in het nieuwe schot, zelfs niet na drie jaar.
- Ook planten van cv 'Herbergii' die hiernaast staan, zijn vrij van symptomen, wel is er hagelschot te zien. In monsters van hagelschotsymptomen is geen Xap en Psm vastgesteld.
- Vorig jaar ontstond op een perceel de aantasting op een plek onder grote bomen (langer bladnat?), waar ook de structuur slechter was.
- Als er visueel schoon uitgangsmateriaal wordt geplant, ontstaan er pas in het tweede najaar symptomen in het gewas.
- In 2007 zijn 5000 planten met te heftige symptomen weggegooid; in 2008 en 2009 resp. 10.000 planten, grotendeels van cv. 'Etna'.
- Symptomen van de bacterie-aantasting zitten vooral onderin het gewas, terwijl hagelschot juist bovenin het gewas zichtbaar is.

Teelthandelingen op het bedrijf:

- Een groot deel van de teelt vindt plaats op huurpercelen (voorvrucht vaak mais). Deze percelen worden vooraf niet geploegd. Er wordt een bodemanalyse gedaan via Soiltech Solution. Op basis van deze uitslag wordt compost (ca. 40 ton/ha) met de benodigde meststoffen gemengd en door de grond gewerkt.
- Van het perceel, waar nu aangetaste 'Etna' staat, is vooraf een bodemanalyse gedaan. Toen waren diverse elementen laag in concentratie; dit is aangevuld via compost en bemesting. Opvallend is dat het zwavelgehalte als vrij laag wordt gewaardeerd, maar dat dit niet extra wordt toegevoegd. Wellicht wordt dit via compost alsnog aangevoerd.
- De laatste jaren wordt 'Etna'-stek van een eigen haag geknipt en bij een stekbedrijf beworteld. Daarna wordt het voor twee jaar uitgeplant, zodat een maat 60-80 of 80-100 gehaald wordt. Er worden geen grotere struiken van geteeld.

- De cv ‘Etna’ wordt niet gesnoeid; wel wordt bewortelde stek getopt met een cirkelmaaier. Andere cv’s worden soms wel getopt met een cirkelmaaier.
- Gewasbespuiting gebeurt met een veldspuit vanaf vaste rijpaden, ingezaaid met gras.
- Onkruidbestrijding gebeurt met een trekker met kappenspuit; gemiddeld elke 5 weken worden bodemherbiciden en contactherbiciden gespoten; jaarlijks wordt er ca. 5 keer gespoten. Dit jaar wordt de besmette hoek als laatste gespoten, waarna de kappenspuit met een hogedrukreiniger schoongespoten wordt. De trekker zelf wordt niet gereinigd.
- Het overblijvend onkruid wordt met de hand verwijderd (schoffel), afhankelijk van het seizoen tussen de 2 en 10 keer. Gemiddeld zo’n 5 keer per jaar.
- Laatste jaren wordt er zo min mogelijk beregend in de zomer; in 2009 is 1 x beregend, symptomen ontstonden toen pas in het najaar; in 2010 tot nu toe 2 keer. Het beregenen gebeurt vanaf de vaste rijpaden met bronwater.
- Eind september wordt het gewas ondersneden, enkele weken voor het rooien. Dit gebeurt vaak bij nat weer om het gunstiger voor de planten te maken; waarschijnlijk geeft dit echter meer risico voor verspreiding.
- Vlak voor het rooien worden de planten door een regionale loonwerker rondgestoken; deze komt bij veel bedrijven. Voor zover bekend wordt de machine tussendoor niet schoongemaakt.
- Zodra er orders gekomen, worden de planten gerooid. Normaal gesproken zijn partijen zo uniform, dat het gehele perceel voor de voet gerooid kan worden (wel in kleine gedeelten, omdat de orders niet zo groot zijn). In cv. ‘Etna’ lukte het al 3 jaar niet meer om voor de voet te rooien. Dan worden de planten selectief gerooid (juiste maat er tussen uit halen). Daarvoor wordt er veel door het gewas gelopen. De gerooide planten worden namelijk lopend naar het dichtstbijzijnde rijpad (max. 6 meter lopen) gebracht en daar in de pallet box gelegd.
- Dit jaar is twee keer gespoten met koperoxychloride (2 kg/ha) + Captan (2kg/ha); verder wordt vnl. gespoten tegen echte meeldauw.

6.1.2 Monstername

Er zijn 11 gewasmonsters genomen van bladeren met verdachte symptomen. Deze zijn geanalyseerd met de PCR-techniek op Xap en Psm. In 6 van de 11 monsters zijn geen bacteriën gevonden. 2 keer bleek Xap in lage hoeveelheid voor te komen. 1 keer werd alleen Psm aangetoond. In de overige twee monsters bleek zowel Xap als Psm duidelijk aantoonbaar aanwezig, waarvan 1 partij waarin nog niet eerder symptomen zijn gevonden. Het andere monster betrof afgevallen gele bladeren(Figuur 15).



Figuur 15. In gele afgevallen bladeren van een besmette plant werd zowel Xap als Psm aangetoond.

Behalve gewasmonsters is er ook een veegmonster genomen van de kappenspuit (onkruidbestrijding) (Figuur 16); deze is 2-3 weken geleden door de besmette partij ‘Etna’ gereden; op het moment van bemonsteren werd gespoten in ‘Rotundifolia’. Met een vochtig filtreerpapier werd een deel van de kap afgeveegd, waarna deze getoetst werd met de PCR-techniek op aanwezigheid van Xap en Psm. Xap werd in lage hoeveelheid aangetroffen, Psm was duidelijk aantoonbaar.



Figuur 16. Onkruidkappenspuit, waarop via een veegmonster Psm en in lage hoeveelheid ook Xap werd aangetroffen.

6.1.3 Bedrijf A, herfst 2010.

Bedrijf A is nogmaals bezocht in herfst 2010 en zijn er 9 veegmonsters genomen door een filtreerpapier vochtig te maken met PBS-buffer en daarna het te bemonsteren deel af te vegen. Bij elk monster zijn nieuwe handschoenen gebruikt.

De veegproeven zijn grotendeels uitgevoerd in cv 'Etna'. In zomer 2010 is hierin zowel Xap als Psm aangetoond. Het droge gewas was niet echt droog, want het was nog nat van de dauw. Een deel is extra nat gemaakt door deze te bespuiten met een rugspuit met water. Vervolgens zijn er verschillende afstanden gelopen door het gewas. Voor de proef met het natte gewas zijn er andere laarzen gebruikt. Op de laarzen is niet tweemaal hetzelfde stuk bemonsterd.

De laars en de stekschaar van een medewerker zijn voor bemonsteren gebruikt in cv. 'Otto Luyken', waarin hij 1 uur heeft gelopen, waarvan ca. een half uur stekgeknipt. In zomer 2010 is in deze partij Psm gevonden; toen is echter het monster in een andere hoek van de partij genomen.

Er is ook een gewasmonster van *Prunus laurocerasus* 'Rotundifolia' genomen, omdat deze partij verdachte symptomen had.

Aan de veegmonsters is groeimedium toegevoegd, om vervolgens overnacht te laten groeien. Hieruit is DNA geïsoleerd. Als de PCR-uitslag positief is, is er kans dat de Xap-bacteriën nog levend zijn.

Tabel 10. Toetsing van veeg- en gewasmonsters op aanwezigheid van Xap; monsters afkomstig van bedrijf A in herfst 2010.

Omschrijving	Xap
Bladmonster laars 'droog' gewas 'Etna'	nee
Veegmonster laars 'droog' gewas 'Etna' 20 meter	nee
Veegmonster laars 'droog' gewas 'Etna' 60 meter	nee
Veegmonster laars 'droog' gewas 'Etna' 250 meter	nee
Bladmonster laars nat gewas 'Etna'	**ja**
Veegmonster laars nat gewas 'Etna' 20 meter	nee
Veegmonster laars nat gewas 'Etna' 60 meter	nee
Veegmonster laars nat gewas 'Etna' 250 meter	nee
Veegmonster laars medewerker	nee
Veegmonster stekschaar medewerker	nee
Veegmonster onderzijde blad 'Etna'	nee
Grondmonster 'Etna' vollegrond	nee
Gewasmonster P. 'Rotundifolia' plantgoed vollegrond	**ja**

In het bladmonster van het 'droge' Etna-gewas is geen Xap gevonden (Tabel 10). Het is echter waarschijnlijk dat deze hoek wel besmet was, want zowel in het bed ernaast (nat gewas 'Etna') als in zomer 2010 is in deze partij Xap gevonden.

In de veegmonsters van de laarzen is geen Xap aangetoond. Op Psm is niet getoetst. Hoewel deze resultaten bemoedigend zijn, betekent het niet dat er geen risico's zijn. Onder deze omstandigheden (tijd van het jaar, temperatuur, etc) is er geen Xap gevonden.

Ook in een veegmonster van de onderzijde van het blad van planten met symptomen is geen Xap gevonden. Mogelijk was de bacterie onder deze omstandigheden niet aan de buitenzijde van het blad aanwezig.

Het feit dat op de laars en de stekschaar van de medewerker geen Xap is gevonden, is niet vreemd. In de hoek waar hij die middag gewerkt had, is in de zomer 2010 alleen Psm gevonden.

6.1.4 Bedrijf B, herfst 2010.

Het bedrijf teelt een breed sortiment sierheesters op 0,7 ha containerveld; daarnaast wordt er gestekt in 0,3 ha kas. Op het containerveld stonden dit jaar 350 m^2 *Prunus* met een tiental cultivars (laurocerasus cv's: 'Novita', 'Etna', 'Angustifolia', 'Caucasica', 'Rontundifolia', 'Zabeliana', 'Van Es' en 'Grüner Teppich' en P. lusitanica). Totaal gaat het om bijna 40.000 planten in P9. In september dit jaar ontstonden de eerste symptomen in cv's 'Novita' en 'Etna'. Binnen 2 maanden waren er symptomen in alle cultivars. Begin november kwam het bericht dat al deze planten geruimd moesten worden. Zes jaar geleden is er ook een keer een partij 'Novita' geweest met symptomen die op bacterieziekte leken; dit was een partij van een andere stekleverancier. Toen was niet bekend wat het was.

Symptoomontwikkeling:
- De eerste symptomen kwamen in cv's 'Novita' en 'Etna', terwijl deze cultivars niet hagelschotgevoelig zijn.
- Cv. 'Zabeliana' vertoonde ook veel symptomen
- Cv. 'Caucasica' bleef vrij lang zonder symptomen. Hierin lag een snoeiproefje, een deel was teruggeknipt in augustus. Beide deelpartijtjes vertoonden op hetzelfde moment toch symptomen.
- De haarden met symptomen waren verspreid over alle partijen.
- 'Rotundifolia' kreeg het laatst symptomen, terwijl deze partij middenin stond.

Gewashandelingen
- Stek wordt ongeworteld ingekocht ('Etna' en 'Novita') of geknipt in een eigen moerhoek. De stekleverancier gaf aan er dit jaar en vorig jaar geen last van te hebben. De moerhoek is grotendeels 10 jaar oud en vertoont geen symptomen.
- Het ongewortelde stek wordt vanaf week 40 in de kas beworteld. Zolang het geen zonnig weer is, ligt er geen plastic overheen. In 2009 waren er geen symptomen te zien in het stek, wat in 2010 ziek geworden is.
- Stekken worden beregend met regenwater uit een silo
- Het containerveld wordt in het voorjaar gespoten met Butisan (herbicide) en Menno ter Forte op het doek. Dit voorjaar is ook een deel gespoten met Jet 5.
- In het voorjaar worden de stekken opgepot in nieuwe potten. De potmachine staat buiten op het hoofdpad. Met lopende banden wordt het naar het containerveld gebracht, waar het met handmatige potvorken weggezet wordt.
- Gedurende de zomer wordt er 1 x per 2 weken handmatig onkruid geraapt
- Tijdens het groeiseizoen wordt er niet gesnoeid, behalve dit jaar een proefje in cv 'Caucasica'.
- Er wordt overhead beregend met gerecirculeerd water. Dit gebeurt steeds 's avonds of 's nachts. Dit jaar stond *Prunus* voor het eerst in 1 kraanvak bij elkaar.
- Al het beregeningswater gaat vanuit de silo's eerst door een zandfilter

- Als bemesting krijgen de planten Kristalon wit; er worden geen sporenelementen aan de potgrond toegevoegd. Dit jaar werd ook geen libremix (snelwerkende kunstmest + sporenelementen voor de eerste fase van de teelt) toegvoegd.
- Elke 10 dagen werd bitterzout en spuitzwavel gespoten.
- Sinds september werden de *Prunus* uitsluitend met regenwater beregend.
- Dit jaar wordt het nieuwe stek regelmatig met Captan gespoten; er zijn in cv. 'Genolia' (= Mari Blon) weer verdachte symptomen gevonden. De leverancier hiervan heeft ook het stek van 'Etna' en 'Novita' geleverd.
- Bij het opruimen van de besmette partijen zijn zo veel mogelijk maatregelen genomen over herbesmetting te voorkomen:
    - De afvalbakken zijn zo dicht mogelijk bij de zieke partij gezet. Na gebruik zijn deze ontsmet met dettol (chloorxylenol)
    - Gebruikt gereedschap is na gebruik ontsmet met dettol
    - De gebruikte heftrucks zijn ingespoten met dettol
    - Na de werkzaamheden zijn de handen gewassen
    - Er is gewerkt in weggooi-overalls
    - Er werd consequent in een aparte ruimte omgekleed
    - Na het opruimen is de teeltvloer aangeveegd en bespoten met Menno ter forte

Op het bedrijf zijn 8 monsters genomen, zowel veegmonsters, gewasmonsters als een zandmonsters. Aan de veegmonsters is groeimedium toegevoegd, om vervolgens overnacht te laten groeien. Hieruit is DNA geïsoleerd.

Tabel 11. Toetsing van veeg- en gewasmonsters op aanwezigheid van Xap; monsters afkomstig van bedrijf B in herfst 2010.

Monsterlocatie	Xap
Veegmonster 'ontsmet' containerveld 'Novita'; in de periode tussen het leeghalen en de bemonstering is het containerveld behandeld met Menno ter forte.	**ja**
Veegmonster binnenzijde regenleiding 'Rotundifolia'; dit is hetzelfde kraanvak als andere *Prunus*. Zie Figuur .	**ja**
Veegmonster buitenzijde nachtvorstberegening 'Novita'. Deze is waarschijnlijk ook wel meebehandeld met Menno ter forte. Zie Figuur .	**ja**
Bladrest containerveld 'Novita'. Hoewel het containerveld schoongeveegd was en bespoten met Menno ter forte, lag er toch nog een enkele groene bladrest.	**ja**
Veegmonster filter beregeningspomp. Door dit filter gaat al het water voor de beregening voor heel de kwekerij (containerveld + kas).	nee
Veegmonster zandfilter. De binnenzijde van de vulopening van het zandfilter is bemonsterd. Er zat aanslag op. Zie foto zandfilter.	nee
Veegmonster drainagewatersilo. Deze silo was afgedekt met een groot doek tegen algen. Het lag net onder water. De bovenzijde had wat aanslag; dit is bemonsterd.	nee
Zandmonster zandfilter. Van de bovenlaag van het zandfilter (zwarte film op het zand) is een monster genomen.	nee

Uit de uitslagen (Tabel 11) valt af te leiden dat het containerveld nog als besmet moet worden gezien, omdat op het doek en aan de buitenzijde van de nachtvorstberegening (Figuur 17) nog DNA van Xap is vastgesteld. Ook waren er nog enkele bladresten, waarin de bacterie aanwezig was.

De aanwezigheid van Xap in het gietwater is nog niet goed duidelijk. Het is (opmerkelijk) wel gevonden in de regenleiding aan het begin van het vak 'Rotundifolia', maar niet op het filter van de beregeningspomp, in het zandfilter en op het doek op de drainagewatersilo.



Figuur 17. Zowel aan de binnenzijde van de regenleiding (links) als de buitenzijde van de nachtvorstberegening (rechts) en op het doek van het containerveld is Xap aangetoond.

6.2 Bedrijfsbezoeken in 2011

6.2.1 Bedrijf A, herfst 2011.

Bedrijf A is in herfst 2011 voor de 3e keer bezocht. Eind juli/begin augustus begonnen nieuwe symptomen in de planten zich te ontwikkelen. Opvallend is dat in de cv 'Etna' waar in 2010 veel symptomen zaten, nu nauwelijks nieuwe symptomen ontwikkelen. Het gewas voelt harder aan als gewoonlijk. Cv. 'Etna' wordt als meest gevoelige cultivar ervaren; cv 'Rotundifolia' komt op de tweede plaats. Het bedrijf ziet geen verschil in symptoomontwikkeling tussen lichte en zwaardere percelen (dekzandgrond). Twee percelen met meer aantasting zijn als laatste rondgeknipt. Tussen andere partijen is niet ontsmet. Door het rondknippen komt er meer lucht tussen de planten, waardoor ze makkelijker opdrogen. Het bedrijf is voorzichtiger met teelthandelingen. Er wordt zo min mogelijk door het gewas gereden; planten worden om die reden ook niet meer getopt.
Het bedrijf heeft silicium toegepast als plantversterker. Een klein deel is onbehandeld gebleven. Het bedrijf ziet nog geen verschillen.
In vollegronds percelen ziet de kweker de symptomen met name onderin het gewas, terwijl hij in de pottenteelt symptomen juist bovenin het eerst tegenkomt.
Het bedrijf meldt in 2009 plant sap metingen gedaan te hebben in zowel zieke als gezonde planten. Hierin werden geen opvallende verschillen waargenomen.

Er zijn tijdens het bezoek 3 veegmonsters en 2 gewasmonsters genomen op het bedrijf.
De veegmonsters waren van de binnenzijde en buitenzijde van de beregening op het containerveld en van de onkruidkappenspuit. Op het containerveld hebben tot 1 week geleden besmette planten gestaan. Daarna is het niet ontsmet. Dit containerveld is niet gerecirculeerd, maar er wordt beregend met recirculatiewater uit de kas, waar wel besmette planten gestaan hebben. De bemonsterde onkruidkappenspuit is 3 weken geleden voor het laatst gebruikt. De veegmonsters zijn voorgekweekt en daarna geanalyseerd met PCR. Er bleek in geen van de drie monsters Xap en Psm aantoonbaar.

Ook is er zowel een blad van cv. 'Etna' uit de kas met verdachte symptomen als een dood, afgevallen blad met gaten van het besmette vollegronds perceel getest. Ook hierin was geen Xap en Psm aanwezig.

6.2.2 Bedrijf C, zomer en herfst 2011.

Bedrijf C teelt *Prunus laurocerasus* in vollegrond op veengrond. Op het perceel staan 1-jarige partijen van cv. 'Etna' en 'Otto Luyken'. Aan de andere kant van het perceelspad staat een 2-jarige partij 'Otto Luyken'. In beide 'Otto Luyken'-partijen zijn verdachte symptomen aanwezig.

De partij 'Etna' is visueel vrij van symptomen. Beide blokken worden door de kweker intensief behandeld met kopermeststoffen en Captan. Tijdens gewashandelingen wordt tussen behandelingen van partijen niet ontsmet.

In een 2-jarige partij cv 'Otto Luyken' met veel symptomen (>80% van partij) zijn in zomer 2011 enkele gele vangplaten tussen de planten opgehangen. Na ca. 2 maanden zijn de vangplaten verzameld. Voor analyse zijn 10 grote vliegen verzameld met getoetst met of zonder voorkweek. In beide submonsters van de vliegen is Xap aangetoond.

In de herfst is in dezelfde partij een loopproef gedaan met verschillende afstanden (Figuur 18). Er is 300 resp. 1000 meter door de bewuste partij gelopen. Op dat moment was het gewas licht vochtig en sprake van wat aangevroren mist. Hierna is er na beide afstanden een veegmonster van de laars genomen en zijn de laarzen ontsmet met alcohol. De volgende dag was het gewas nat van de dauw en is opnieuw 1000 (20 * 50) meter door het gewas gelopen, waarna de laars opnieuw bemonsterd is. In hetzelfde gewas is met een snoeischaar ca. 200 keer geknipt in aangetaste planten. Hierna is er een veegmonster van de snoeischaar genomen.
Verder zijn er van deze partij een aantal gewasmonsters genomen. De monsters zijn voorbewerkt met een voorkweekstap en vervolgens geanalyseerd met PCR op Xap en Psm.



Figuur 18. Na lopen door een besmet gewas zijn zowel Xap als Psm op de laarzen aangetroffen, weliswaar soms in lage hoeveelheden.

In Tabel 14 is te zien dat in de gewasmonsters zowel Xap als Psm aangetoond is. Het kon zowel in groene bladeren, in afgevallen bladeren als in kankerachtige symptomen op de stengel aangetoond worden. Na een afstand van 1000 meter konden beide soorten bacteriën aangetoond worden op de laars. Vanaf 300 meter werd Psm ook al op de laars gevonden. Ook bleven bacteriën in lage hoeveelheden achter op de snoeischaar na ca. 200 keer knippen.

Tabel 12. Toetsing van gewas en veegmonsters op aanwezigheid van Xap en Psm; monsters afkomstig van bedrijf C in herfst 2011.

Monster	Toelichting	Xap	Psm
Groen blad	Groen blad met symptomen	pos	zwak
Geel blad	Afgevallen geel blad met symptomen	zwak	pos
Bruin blad	Afgevallen bruin blad met symptomen	pos	zwak
Stengel	Kankerachtige symptomen, afgestorven toppen	pos	pos
Laars 1	Veegmonsters laars na 300 m door ziek gewas; licht vochtig gewas (rijp)	neg	pos
Laars 2	Veegmonsters laars na 1000 m door ziek gewas; licht vochtig gewas (rijp)	zwak	pos
Laars 3	Veegmonsters laars na 1000 m door ziek gewas; nat gewas (mist)	zwak	neg
Snoeischaar	Veegmonster van snoeischaar na ca. 200 x knippen in zieke planten	zwak	zwak

6.3 Bedrijfsbezoeken in 2012

6.3.1 Bedrijf A, herfst 2012.

Bedrijf A is in najaar 2012 gevraagd naar de ervaringen. In 2012 was er minder aantasting door bacterieziekten. Er is meer aandacht voor bedrijfshygiëne. Er wordt niet meer door een nat gewas gelopen/gereden. In jonge planten wordt alleen geschoffeld, niet meer chemisch behandeld. In een dichter gewas (grotere planten) wordt helemaal niet meer gewerkt met machines. Als er een besmetting ontstond, dan bleef het bij de ene plant en breidde het niet meer uit. Tevens heeft Servaplant een begeleiding gedaan met plantversterkende middelen.

6.3.2 Bedrijf C, zomer 2012.

Bedrijf C is in zomer 2012 opnieuw bezocht. In de inmiddels 2-jarige partijen 'Otto Luyken' en 'Etna' hebben beide verdachte symptomen van bacterieziekten. Op dit perceel zijn een drietal gele vangplaten gehangen. Na 2 maanden zijn de gevangen vliegen op de vangplaat getest op aanwezigheid van Xap en Psm. Beide bacteriesoorten zijn niet aangetroffen.

6.3.3 Bedrijf D, zomer 2012.

In zomer 2012 is op bedrijf D een bemonstering gedaan op een perceel. Op het perceel stond een partij cv 'Etna' met een niet te zware aantasting. Ca. 20% van de planten vertoonde symptomen. In de partij bleek zowel Xap als Psm aanwezig te zijn (Tabel 13). Een onkruidkappenspuit is na diverse afstanden door het gewas (0,5; 1,5 of 3 km) bemonsterd op aanwezigheid van Xap en Psm. Xap werd soms in lage hoeveelheden gevonden, maar Psm werd wat vaker aangetroffen. Er was geen lineair verband aanwezig m.b.t. de gewerkte afstanden.
Ook is er diverse afstanden (250 m, 750 resp. 1,5 km) door het gewas gelopen, waarbij er nadrukkelijk contact is gemaakt met het gewas. Vervolgens zijn de laarzen per afstand bemonsterd op Xap en Psm. Xap werd hierbij niet aangetoond, maar Psm wel in lage hoeveelheden bij alle 3 afstanden.

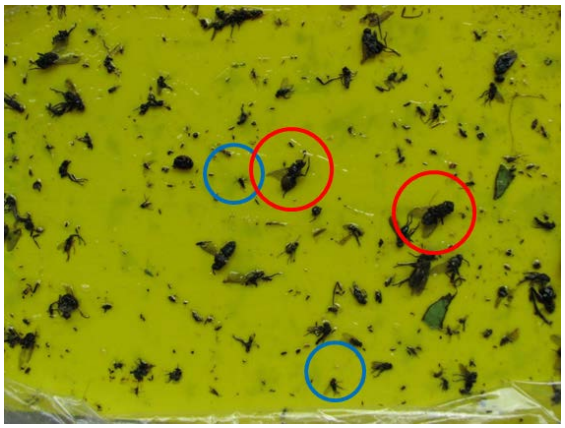
Verder werd zowel Xap als Psm in lage hoeveelheid aangetoond in vliegen (formaat huisvlieg, niet gedetermineerd) op vangplaten. Wanneer deze monsters via voorkweek werden verrijkt, werden beide bacteriën niet meer aangetroffen. Vermoedelijk was er in deze voorkweekfase een sterkere groei van andere bacteriën (concurrentie). Ook werd wel Psm, maar geen Xap aangetoond in een veegmonster van nectarklieren van een plant met symptomen.

Tabel 13. Toetsing van gewas en veegmonsters op aanwezigheid van Xap en Psm; monsters afkomstig van bedrijf D in zomer 2012.

Monster	**Gegevens**	**Xap**		**Psm**	
		A	B	A	B
Prunus bladmonsters	met verdachte symptomen	**pos**	**pos**	**pos**	**zwak**
Spuitkap 1	Veegmonster: Na 1 ochtend werken in *Prunus*; eerst zieke Etna, dan conifeer, toen symptoomvrije *Prunus laurocerasus*; na veegmonster spuitkap ontsmet	neg	neg	neg	**zwak**
Spuitkap 2	Veegmonster: 4 x 125 meter (0.5 km) door zieke Etna	neg	**zwak**	neg	**zwak**
Spuitkap 3	Veegmonster: 12 x 125 meter (1,5 km) door zieke Etna	neg	neg	**zwak**	neg
Spuitkap 4	Veegmonster: 24 x 125 meter (3 km) door zieke Etna	**zwak**	neg	**pos**	neg
Gewasgeleider 1	Veegmonster: 's ochtends gewerkt + 3 km ziek gewas	neg	neg	neg	neg
Laarzen 1	Veegmonster: 2 x 125 meter (0,25 km) door zieke Etna; laarzen licht vochtig door dauw	neg	neg	neg	**zwak**
Laarzen 2	Veegmonster: 6 x 125 meter (0,75 km) door zieke Etna; laarzen licht vochtig door dauw	neg	neg	neg	**zwak**
Laarzen 3	Veegmonster: 12 x 125 meter (1,5 km) door zieke Etna; laarzen nagenoeg droog	neg	neg	neg	**zwak**

Monster	Gegevens	Xap		Psm	
		A	B	A	B
Kleine vliegen	20 kleine vliegen (<5 mm) van vangplaat (4 dagen opgehangen)	neg	neg	neg	neg
Grote vliegen	10 grote vliegen (huisvliegen) van vangplaat (4 dagen opgehangen)	**zwak**	neg	**zwak**	neg
Nectarklieren	Veegmonster: 10 x langs nectarklieren symptomatische plant geveegd	neg	neg	neg	**pos**

Serie A: Direct DNA isolatie uit monster;
Serie B: DNA isolatie na voorkweek;



Figuur 19. Op vangplaten in een besmette *Prunus*-partij werden zowel grote (rood omcirkeld) als kleine vliegen (blauw omcirkeld) aangetroffen. Alleen in grote vliegen werden (lage hoeveelheden) Xap en Psm aangetoond.

6.3.4 Vangplaten op diverse bedrijven.

In de zomer zijn op *Prunus laurocerasus* vaak vliegen en wespen te zien, die op de nectarklieren afkomen (Figuur 19A resp. 19B). Om dit risico beter in kaart te brengen heeft Cultus Agro Advies in zomer 2012 op een tweetal bedrijven 2 vangplaten en 2 vanglinten opgehangen tussen o.a. besmette partijen (3 x in kas, 1 x buitenteelt). Na ca. 2 maand zijn de vangplaten en –linten beoordeeld. Er waren hierop niet duidelijk vliegen zichtbaar; de aanwezige organische fracties zijn geanalyseerd met PCR. Hierin werd geen Xap en Psm vastgesteld.



Figuur 19 A en B. Vliegen (links) en wespen (rechts) komen in de zomer af op nectarklieren (donkere stippen in blad) in *Prunus laurocerasus*.

6.4 Conclusie bedrijfsbezoeken

Uit de bedrijfsbezoeken is er op diverse posities Xap en Psm aangetoond, soms in lage hoeveelheden. Op onkruidspuitkappen, laarzen, snoeischaar, doek van containerveld, buiten- én binnenzijde van beregeningsystemen en op vliegen is Xap aangetoond en soms ook Psm (niet altijd getest). Dit betekent dat er risico's zijn op verspreiding van bacteriën, waardoor nieuwe aantastingen kunnen ontstaan. Chemische bestrijding van bacteriën is een lastig verhaal. Daarom is preventie middels hygiëne zeer belangrijk in het beheersen van bacterieziekten. Bij enkele bezochte bedrijven werd dit beleid al zichtbaar. In 2009 en 2010 was sprake van veel symptoomvorming. In de jaren erna is er veel meer nadruk gelegd op hygiëne en zo min mogelijk teelthandelingen uitvoeren in (besmette) partijen. In 2012 was er veel minder sprake van nieuwe symptoomvorming op deze bedrijven. Toch blijft het risico van bacteriële besmetting aanwezig.

7 Lokalisatie van *Xanthomonas* en *Pseudomonas* in *Prunus* jaar rond

In de loop van het project 'Beheersen Bacterieziekten in *Prunus*' kwam naar voren dat in de praktijk in de zomerperiode tijdens of kort na warme, vochtige perioden in het hele land plotseling massaal nieuwe symptomen ontstonden, die zich snel uitbreidden. Voordat symptomen ontstaan is Xap niet aan te tonen met de LFD-test. Dit doet vermoeden dat de bacterie latent in de plant aanwezig is en onder bepaalde omstandigheden massaal tot symptoomvorming kan overgaan. Dit fenomeen is ook bekend bij bv. bacterievuur (*Erwinia amylovora*, Vrancken et al. 2013). Om beter zicht te krijgen op de aanwezigheid van Psm en Xap in *Prunus*, zijn uitgebreide lokalisatie experimenten uitgevoerd.

7.1 Lokalisatie Xap: oriënterende analyse 2011

In oktober 2011 zijn er 3 verdachte planten aangeleverd van een bedrijf van de cultivar 'Etna':

Plant 1: 'gezond, vlg': geen symptomen, wel enkele hagelschot gaatjes, afkomstig uit vollegrond. Opgepot bij binnenkomst

Plant 2: 'ziek pct' :afkomstig uit vastgelegde partij ivm. Xap. Plant in 10 liter pot; plant bestaat uit 3 deelplanten. Alle deelplanten hebben symptomen.

Plant 3: 'ziek, stek': afkomstig van beworteld stek. Nagenoeg alle bladeren hebben symptomen. Meerdere stekken in 1 pot.

Per plant zijn verschillende onderdelen (gezond blad, verdacht blad, stengel, topmeristeem en wortel) geanalyseerd m.b.v. PCR op Xap. In Tabel 14 is te zien dat alleen in bladeren met verdachte symptomen de bacterie is aangetroffen.

Tabel 14. Analyse van 3 *Prunus laurocerasus* 'Etna' planten op aanwezigheid van Xap in verschillende plantdelen.

Plantnr.	Type	Xap
Plant 1	Gezond blad	Neg
	Verdacht blad (symptomen)	Neg
	Stengel tussen 3e en 4e blad van boven, zonder symptomen	Neg
	Topmeristeem van scheut	Neg
	Oude wortel (Ø ca. 4 mm)	Neg
Plant 2	Gezond blad	Neg
	Verdacht blad (symptomen)	**pos**
	Stengel tussen 3e en 4e blad van boven, zonder symptomen	Neg
	Topmeristeem van scheut	Neg
	Oude wortel (Ø ca. 4 mm)	Neg
Plant 3	Verdacht blad (symptomen)	**pos**
	Gezond blad	Neg
	Stengel tussen 3e en 4e blad van boven, zonder symptomen	Neg
	Topmeristeem van scheut	Neg

7.2 Bemonstering in 2012

7.2.1 Proefopzet

In 2012 zijn er van 3 partijen elk 10 besmette planten van een praktijkbedrijf in de quarantaine ("Q") -

gaaskas (Figuur 20) bij PPO in Lisse geplaatst. Het betrof cv. 'Etna' in 10 liter pot (potgeteeld in 2011), cv. 'Otto Luyken' in 2 liter pot (potgeteeld in 2011) en cv. 'Otto Luyken' in 10 liter pot (in 2011 in vollegrond, najaar opgepot). In alle drie herkomsten is zowel Xap als Psm aangetoond via PCR analyses.



Figuur 20. Foto van de quarantaine (Q)-gaaskas, waarin besmette *P. laurocerasus* planten voor de jaar rond bemonstering zijn geteeld.

Maandelijks is van (een deel van) deze planten monsters genomen op de volgende punten, indien aanwezig:

- Bladknop (okselknop)
- blad zonder symptoom
- blad met symptoom
- bloemknop
- stengel éénjarig
- wortel (oud met nieuw)
- stengel met kanker



Figuur 21. Monstername van bladknop van *Prunus laurocerasus*.

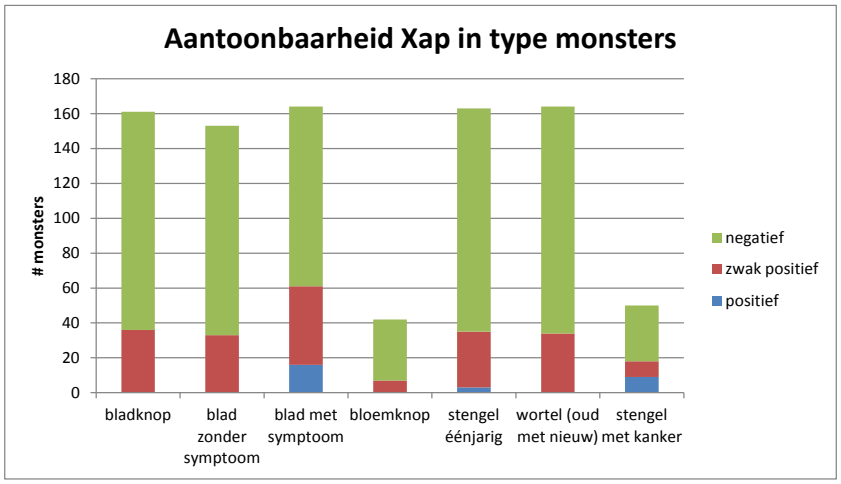
Bij de bemonstering is gewerkt met 1 steriel mesje per monster (Figuur 20). Gebruikte mesjes zijn minimaal 10 minuten ontsmet in 70% alcohol voor hergebruik.
Deze gewasmonsters zijn geanalyseerd met Q-PCR op Xap en Psm (incl. voorkweekstap).
In totaal zijn tussen februari en december 900 monsters genomen. De monsters in de maanden oktober tot december zijn alleen op Xap geanalyseerd.
Gedurende 2012 ontwikkelden geen van de deelnemende planten nieuwe bacteriesymptomen.

7.2.2 Resultaten

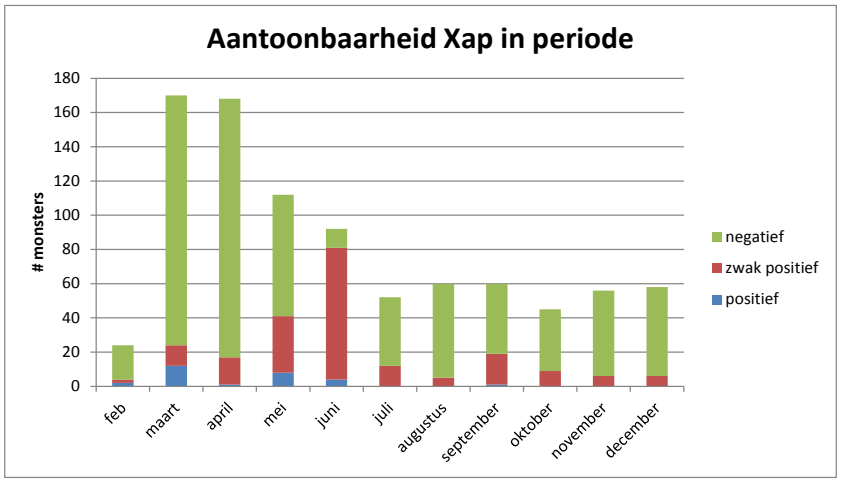
7.2.2.1 Aanwezigheid van Xap

In het algemeen bleek Xap in de monsters meestal niet of in lage hoeveelheid aantoonbaar. In 75% van de monsters is geen Xap aangetoond, 22% van de monsters was Xap in lage hoeveelheid aanwezig (zwak positieve PCR-reactie) en slechts in 3% van de monsters is duidelijk Xap aangetoond.

Het meest duidelijk (positieve monsters) werd Xap in bladeren met symptomen aangetroffen, maar ook wel in stengels met kankersymptomen (Figuur 22). In de andere plantdelen was Xap hooguit zwak (hoge Ct waarde in PCR) aantoonbaar.



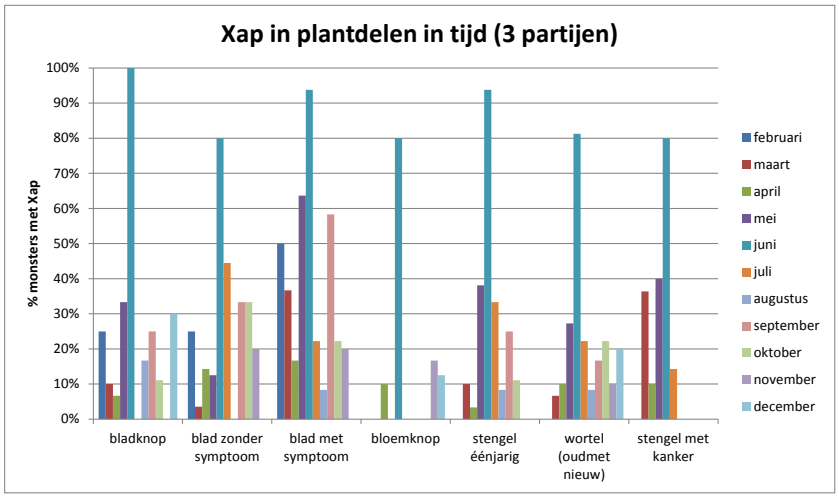
Figuur 22. Aantoonbaarheid van Xap in de verschillende delen van besmette *Prunus* planten.



Figuur 23. Aantoonbaarheid van Xap in de loop van het jaar in besmette *Prunus* planten.

Figuur 23 laat zien dat er zowel in maart, mei als juni Xap duidelijk is aangetoond in monsters van de planten. Wat betreft de zwak positieven, is er vanaf maart tot juni een duidelijke toename te zien; in juli is het sterk gedaald. Ook in september is er een kleine piek zichtbaar.

Figuur 24 is een samenvoeging van Figuur 22 en 23. Hierin wordt duidelijk dat Xap in de maand juni in alle plantonderdelen aantoonbaar was, zelfs in wortels en bladknoppen. Bij beoordeling van de afzonderlijke uitslagen kwam naar voren dat in alle deelnemende planten wel ergens Xap is aangetoond. Er was echter grote variatie per plant over de verschillende plantonderdelen in de tijd; de bacterie blijkt dus latent in hele plant aanwezig te kunnen zijn.

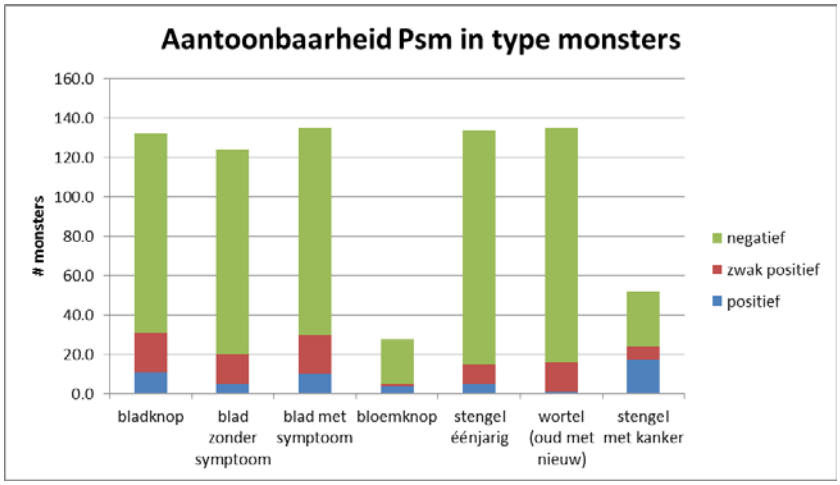


Figuur 24. Aantoonbaarheid van Xap per plantdeel in de loop van de tijd. Voor aanwezigheid van Xap zijn positieve als zwak positieve uitslagen samengevoegd.

7.2.2.2 Aanwezigheid Psm

In het algemeen bleek Psm in de monsters meestal niet of in lage hoeveelheid aantoonbaar. In 81% van de monsters is geen Psm aangetoond, 12% van de monsters was Psm in lage hoeveelheid aanwezig (zwak positieve PCR-reactie) en in 7% van de monsters is duidelijk Psm aangetoond.

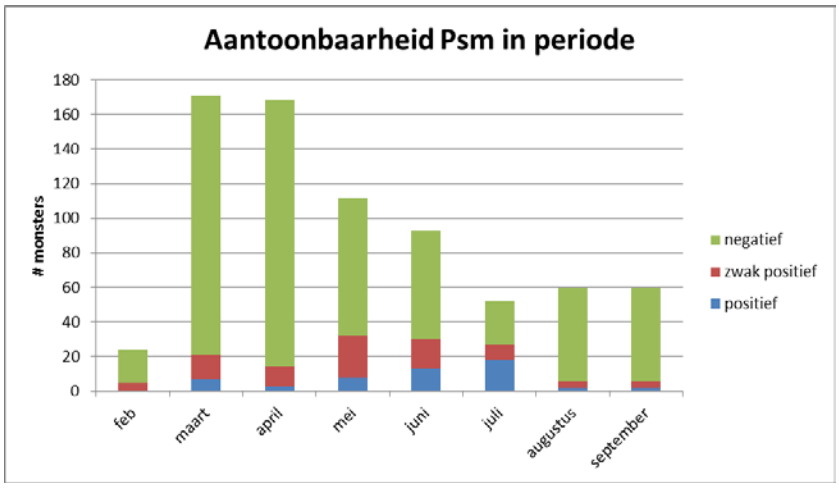
In de meeste plantonderdelen werden duidelijk positieve uitslagen van Psm gevonden, maar niets in de wortels. Relatief werd Psm het meest in stengels met kankersymptomen aangetroffen (Figuur 25).



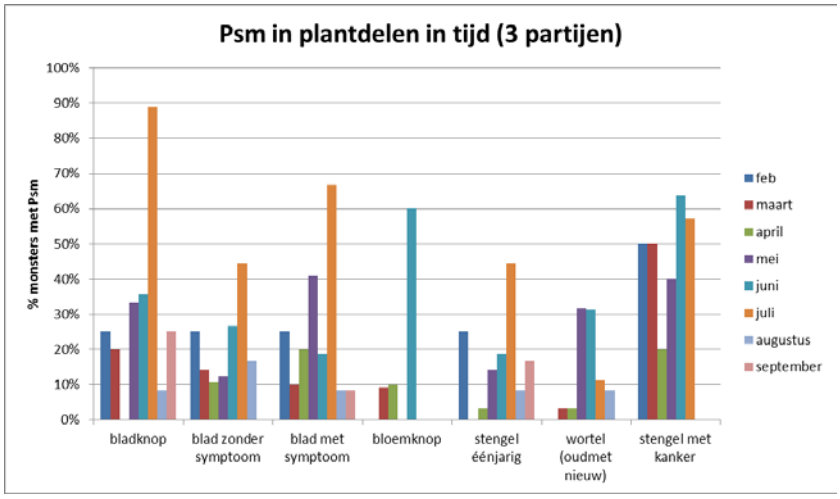
Figuur 25. Aantoonbaarheid van Psm in de verschillende delen van besmette *Prunus*-planten.

Figuur 26 laat zien dat er zowel vanaf maart tot juli een duidelijke toename is te zien van aantoonbaarheid van Psm; na juli daalt het sterk.

Figuur 27 is een samenvoeging van Figuur 25 en 26. Hierin wordt duidelijk dat Psm het vaakst in de maand juli in de bladknop werd aangetroffen. In alle plantonderdelen was Psm aantoonbaar. De bacterie blijkt dus latent in hele plant aanwezig te kunnen zijn.



Figuur 26. Aantoonbaarheid van Psm in de loop van het jaar in besmette *Prunus* planten.



Figuur 27. Aantoonbaarheid van Psm per plantdeel in de loop van de tijd. Voor aanwezigheid van Xap zijn positieve als zwak positieve uitslagen samengevoegd.

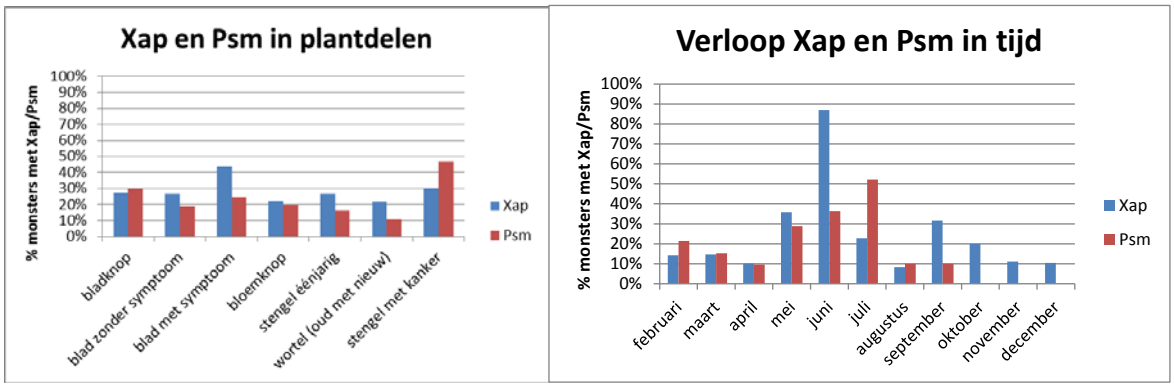
7.2.2.3 Vergelijking Xap en Psm

Tabel laat zien dat in de gewasmonsters tussen februari en september vaker Xap is aangetoond dan Psm. Het aantal positieve uitslagen ligt voor Psm echter iets hoger.

Tabel 15. Aantoonbaarheid van Xap en Psm in monsters van *Prunus* (periode: februari-september).

Aantoonbaarheid	Xap	Psm
Duidelijk positief	4%	7%
Zwak positief	24%	12%
Niet aantoonbaar	72%	81%

Figuur 28 laat zien dat Xap het meest in bladeren met symptomen werd aangetroffen, en Psm vooral in stengel met kanker. Ook is er een verschil in verloop in de tijd. Xap bereikte de piek (meeste positieve uitslagen) in juni, terwijl deze voor Psm een maand later lag. Na de piek daalde de aantoonbaarheid sterk.



Figuur 28. Vergelijking van aantoonbaarheid van Xap en Psm in plantdelen (links) en in de tijd (rechts). Tussen oktober en december is geen Psm-toetsing uitgevoerd.

7.3 Conclusies

Zowel Xap als Psm kunnen in alle delen van de plant aanwezig zijn, zij het in lage concentraties. Het is dus niet verstandig om stekken te nemen van planten die in meer of mindere mate besmet zijn (geweest) met bacterieziekten. Symptoom loosheid is geen garantie op afwezigheid van Xap of Psm! Voor het vaststellen van aanwezigheid van Xap en/of Psm kunnen het beste symptomatische delen (blad, stengel) bemonsterd worden. In de maanden juni en juli is de kans het grootst om de bacteriën aan te treffen. In de overige maanden was de bacterie veel moeilijker aantoonbaar.
Opvallend was dat in deze getoetste planten geen nieuwe symptoomontwikkeling optrad. Dit zou verband kunnen houden met het klimaat in de Q-gaaskas en de manier van watergift (onderdoor).

8 Relatie nutriënten gehalten en bacterieziekten in *Prunus*

In 2011 bracht de begeleidingscommissie de onderzoeksvraag naar voren in hoeverre bacterieziekten meer kans zouden hebben als planten een tekort hebben aan nutriënten, zoals calcium en zwavel. Naar aanleiding hiervan is er een inventarisatie opgezet in de 2e helft van september 2011.

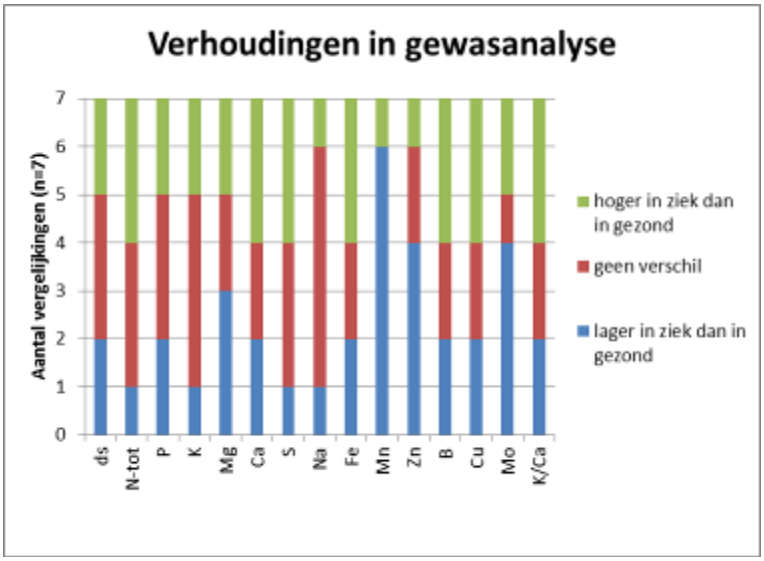
8.1 Opzet experiment

In totaal zijn van 14 percelen grondmonsters genomen; op deze percelen zijn 15 gewasmonsters genomen en geanalyseerd door BLGG Agroxpertus op macro- en sporenelementen. Per herkomst is steeds een vergelijking gemaakt tussen planten met wel of geen bacterieziektes.
De grond- en gewasmonsters hadden de volgende herkomst:

- Grondsoort: dekzand (9), veengrond (3), potgrond (2)
- vier bedrijven
- drie cultivars (Etna, Otto Luyken, Rotundifolia)
- Wel of geen gips toegediend op perceel.

Per vergelijking is steeds de verhouding berekend van het gehalte in planten met symptomen ten opzichte van het gehalte in planten zonder symptomen. Als deze rekenkundige verhouding rond waarde '1' ligt, zijn er geen verschillen. In totaal zijn er 6 grond- en 7 gewasvergelijkingen gemaakt. Vervolgens is het aantal afwijkingen groter als 10% naar onderen respectievelijk naar boven geteld als indicatie dat er een relatie bestaat.

8.2 Resultaten nutriënten gehaltes

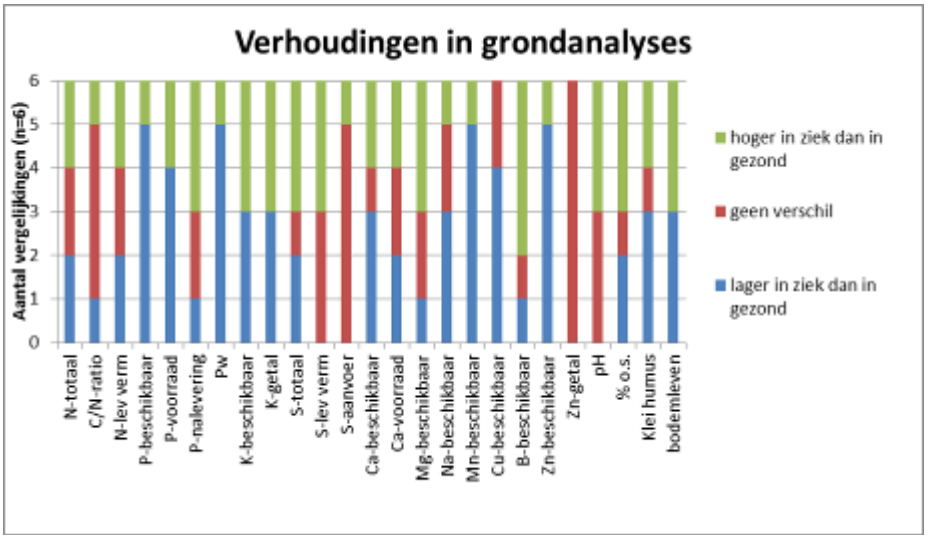


Figuur 29. Grafische weergave van afwijkingen (groter dan 10%) in gewasanalyses van 7 vergelijkingen tussen ziek en gezond

Figuur 29 laat het resultaat zien van de gewasanalyses. Hieruit komt naar voren dat het mangaangehalte (Mn) in zieke planten in 6 van de 7 gevallen lager was dan in gezonde planten.

De overige elementen vertonen nauwelijks afwijking. Het calciumgehalte in planten op veengrond en in potgrond was beduidend hoger dan van planten op dekzandgronden; toch kwam op veengrond en in pottenteelt wel degelijk (zware) aantasting voor.

Figuur 30 toont de verhoudingen bij de grondanalyses. Hierin vallen P-beschikbaar, P_{water}, mangaan (Mn), koper (Cu) en zink (Zn) op. Deze zijn in 5 van de 6 gevallen lager in zieke planten dan in gezonde planten. De overige elementen vertonen geen duidelijke afwijking. Wat betreft fosfaat moet opgemerkt worden dat ondanks de gevonden verschillen, in alle gevallen de hoeveelheid P_{water} in het perceel aan de hoge kant was (meetwaarden tussen 49 en 93 mg P_2O_5/l) t.o.v. de landbouwkundige normen[1].



Figuur 30. Grafische weergave van afwijkingen (groter dan 10%) in grondanalyses van 6 vergelijkingen tussen ziek en gezond.

In de analyse was er ook een vergelijking opgenomen van een kweker die op twee percelen (dekzandgrond) wel of geen gips had toegediend (levert calcium en zwavel). Toediening van gips uitte zich op het ene perceel in meer symptomen en op het andere perceel in minder symptomen.

8.3 Conclusies

Uit deze beperkte analyse zijn geen aanwijzingen naar voren gekomen dat het nutriëntengehalte (in het bijzonder Calcium en zwavel) in de bodem of in de plant een relatie heeft met de symptoomvorming van bacterieziekten in *Prunus laurocerasus*. Bij de elementen mangaan (zowel plant als bodem), koper en zink (alleen bodem) was het gehalte in planten met symptomen vaker lager. Hierbij speelt vermoedelijk een relatie met de toepassing van gewasbeschermingsmiddelen gebaseerd op deze werkzame verbindingen.

[1] 'laag': < 36 mg P_2O_5 / l; 'neutraal': 36 – 55 mg P_2O_5 / l; 'hoog' : > 55mg P_2O_5 /l (bron: www.hetlnvloket.nl)

9 Discussie

Verspreiding in Nederland
Een opvallend aspect van de bacterieziekte in *Prunus laurocerasus* is het feit, dat Xap niet is aangetroffen in de bladverliezende vruchtdragende *Prunus*-soorten in Nederland, zoals pruim en kers. In de rest van vooral Zuid-Europa en ook elders in de wereld worden deze *Prunus*-soorten, inclusief amandel, perzik en abrikoos, wel aangetast. Er bestaat de mogelijkheid, dat de populatie Xap in laurierkers iets anders is als die in bv. perzik wordt aangetroffen. Via moleculaire merkers (zg. VNTRs) zijn hier aanwijzingen voor gevonden (Bergsma et al. 2012). In recente resultaten is gebleken, dat via de genoemde merkertechniek op bedrijven verschillende isolaten van Xap zijn gevonden. Dit kan betekenen, dat Xap via besmette planten of stekmateriaal meerdere malen op het bedrijf geïntroduceerd is. Een belangrijke conclusie uit dit onderzoek is, dat Xap latent aanwezig kan zijn. Ogenschijnlijk gezond gewas kan wel degelijk een latente besmetting bevatten, wat via stekken makkelijk naar andere bedrijven verspreid kan worden.
Over Psm is minder bekend. Wel wordt deze *Pseudomonas syringae* pathovar *morsprunorum* regelmatig in pruim aangetroffen, maar is geen quarantaineziekte.
Uit de meldingen van zieke *Prunus*teelten van de afgelopen jaren blijkt dat containerteelten vaker aangetast waren dan vollegrondsteelten. Het verschil in aantasting tussen containerteelt en vollegrond zou te maken kunnen hebben doordat containerplanten misschien meer kortdurend bloot staan aan stressfactoren. Ook hebben deze planten vaker bladnat door beregening. Een eventueel verband tussen het meer voorkomen van bacterieziekte in containerteelt in vergelijking met vollegrondteelt zou verder onderzocht moeten worden.

Toetsontwikkeling en toepassing
De gebruikte PCR toets om Xap te detecteren in symptomatisch en verdacht plantmateriaal is gebaseerd op primers, ontwikkeld door Pagini. Deze bleek niet 100% specifiek te zijn, zoals vastgesteld in een door FES betaald onderzoek in 2010. Echter, de vastgestelde kruisreactie betrof enkele *Xanthomonas arboricola* pathovars die niet voorkomen op *Prunus*. Wat wel een probleem kan zijn is de kruisreacties met zg. look-alikes: andere *Xanthomonas*-soorten (nauwelijks gekarakteriseerd) die voorkomen op *Prunus*, en heel sporadisch geïsoleerd zijn door Naktuinbouw. Immers, positief bevonden *Prunus* planten moeten worden geanalyseerd door isolatie van het veroorzakende organisme (Xap). Binnen een ander onderzoeksproject (Diagnostiek van Xap) wordt een 100% specifieke toets op Xap ontwikkeld; in een aantal gevallen zijn monsters uit het bacterieziekte project gecontroleerd met deze in ontwikkeling zijnde test. Er zijn geen aanwijzingen gevonden dat in de experimenten look- a likes aanwezig waren. De gevoeligheid van de PCR toets voor Xap is zodanig dat enkele honderden bacteriën aangetoond kunnen worden (onder laboratorium condities uitgevoerd).
Psm en Pss bleken beide te kunnen voorkomen in *P. laurocerasus* maar niet direct van elkaar te onderscheiden in de gebruikte PCR. Via een “knip”-reactie met een restrictie-enzym aan het geamplificeerde stukje DNA konden deze wel van elkaar te kunne worden onderscheiden. Meestal bleek Psm voor te komen, en niet Pss. Om Psm te kunnen detecteren is een nieuwe amplificatie-techniek gebruikt, LAMP, die het voordeel heeft bij eenzelfde temperatuur te kunnen worden toegepast en op deze wijze makkelijker “on site” kan worden gebruikt om in het veld snel te kunnen diagnosticeren. Deze LAMP herkende echter ook Pss, en was meer storingsgevoelig dan de gebruikte PCR. Toch heeft deze test perspectief, zeker als deze bruikbaar is om door telers of intermediairs op bedrijven te kunne worden ingezet.
De ontwikkelde LFD test is feitelijk zo’n on site test. Deze bleek goed toepasbaar: de gevoeligheid (tienduizenden bacteriën) en de robuustheid (toepasbaar op laurierkers blad sap) en snelheid (15 minuten) maakte deze test goed bruikbaar voor analyses. Deze zijn in de praktijk getest door Cultus Agro Advies; in vrijwel alle gevallen kwamen de analyses van monsters overeen met de contraexpertise bij PPO (PCR test) LFD test. Voor 5 testkits betaalt men € 27,50 en zijn te verkrijgen bij PRIME Diagnostics. Deze test vervangt niet de test die door NVWA of Naktuinbouw wordt uitgevoerd. De kit is niet een officiële toets, en kruisreageert met andere *Xanthomonas*-soorten die echter niet voorkomen (behalve de look-a likes) op *Prunus*. Er zijn momenteel al specifieke DNA toetsen voor Xap gepubliceerd, o.a. een LAMP PCR (Porthier et al. 2013).

Aangezien de NVWA en Naktuinbouw werken met een zg. TaqMan format, zal de in ontwikkeling zijnde PCR toets hierop gebaseerd zijn.

Symptoom- en monster analyses
Hagelschot symptomen kunnen door meerdere organismen veroorzaakt worden. Symptomen verworden tot gaten in het blad wanneer het necrotische bladweefsel er uit valt. Gemiddeld zijn de symptomen die een groenig-gelige halo om zich heen hebben afkomstig van een bacteriële infectie, hoewel dit niet altijd bevestigd is via PCR. Dit geeft aan, dat een controle test middels PCR altijd noodzakelijk is en men van visuele beoordeling zeker niet op aan kan. Daarbij zijn Psm symptomen niet van Xap symptomen te onderscheiden.
Om eventuele latent besmette planten aan te zetten tot versnelde symptoom ontwikkeling (en zo met meer zekerheid vast te stellen op en plant besmet is met Xap of Psm) is een experiment uitgevoerd om symptoom expressie te induceren. Deze methode wordt al met succes toegepast om o.a. hyacintenbollen te testen op aanwezige bacterieaantasting (*Dickeya* en *Pectobacterium* subspecies).
De geteste methode, gebaseerd op een verhoogde lokale luchtvochtigheid via een plastic zak en extra hoge temperatuur (25°C) bleek niet voldoende voor het induceren van symptomen. Blijkbaar is een continue hoge temperatuur en RV niet voldoende voor symptoomexpressie. Het vermoeden is nu dat de omstandigheden heel wisselend moeten zijn. Kwekers hebben in de praktijk de indruk dat lage druk / onweer het zou kunnen bespoedigen.

Infectie experimenten en middelen
Inoculatie met Xap en/of Psm gaf weinig of geen symptomen, hoewel volgens protocol uitgevoerd (Randhawa et al. 1985). Mogelijk leidde de gebruikte (weliswaar gepubliceerd voor zachtbladige *Prunus*) inoculatie-techniek niet tot symptomen, maar wel tot asymptomatisch verspreiding van de ingebrachte bacteriën naar het vaatsysteem. Pas in het vroege voorjaar zal door bv. groeistress de bacterie zich kunnen vermenigvuldigen in de knoppen. Een aanwijzing hiervoor is de bevinding, dat in winterknoppen van *P. laurocerasus*, Xap is aangetoond.
De kas lijkt niet de juiste omgeving om inoculatie-experimenten te doen voor de hardbladige *P. laurocerasus*. Om naar andere infectie technieken te zoeken, is wortelinfectie toegepast. Xap kon vervolgens worden aangetoond in rustknoppen na het gieten van een Xap verdunning over de plant en (zwak) na aangieten kluit met beschadigde wortels. Hierbij moet worden opgemerkt, dat een hoge concentratie Xap is toegepast bij een intensieve beschadiging van de wortels en er relatief kort na inoculatie is bemonsterd, hoewel in nieuw gevormde wortels.
Effecten van bestrijdingsmiddelen zijn niet meetbaar in planten waar inoculatie met Xap niet of zeer zwak aanslaat en daarom is in 2012 de nadruk gelegd op onderzoek waar Xap en ook Psm zich nu door het jaar heen in latent besmette planten bevinden. Deze informatie zou kunnen leiden tot een betere manier van infecteren van de plant. De juiste condities voor infectie experimenten moeten gezocht worden in de waarnemingen die in de praktijk plaatsvinden: massale symptoomontwikkeling na een natte en warme periode.
In dit onderzoek is echter gebleken, dat het lastig is nieuwe symptomen in laurierkers te weeg te brengen. Inductie van Xap in de plant heeft klaarblijkelijk met omstandigheden te maken, die niet makkelijk onder kascondities zijn aan te brengen.

Invloed van nutriënten
Uit een beperkte analyse van de relatie tussen nutriënten en de aanwezigheid van bacteriële symptomen in laurierkers zijn geen aanwijzingen naar voren gekomen dat calcium of zwavel hierbij een rol speelt.
Het mangaangehalte (Mn) in zieke planten was meestal lager dan in gezonde planten. Bij koper en zink was ook het gehalte in bodemsubstraat van zieke planten vaak lager dan in bodemsubstraat van gezonde planten. De overige elementen vertonen nauwelijks afwijking. Het calciumgehalte in planten op veengrond en in potgrond was beduidend hoger dan van planten op dekzandgronden; toch kwam op veengrond en in pottenteelt wel degelijk (zware) aantasting voor. Derhalve zal Ca geen rol spelen; de hogere hoeveelheden zware metalen (zoals mangaan, koper en zink) zouden volgens de literatuur bescherming kunnen bieden tegen Xap, maar er wordt ook melding gedaan van resistentie tegen bv. koper van xanthomonaden.

Gezien de beperkte analyse is de Invloed van substraatcomponenten op bv. verhoogde weerbaarheid van laurierkers cv's of remming van de groei van (pathogene) bacteriën onvoldoende onderzocht en verdient meer aandacht.

Bedrijfsbezoeken
Uit de bedrijfsanalyses van bedrijven met een "Xap"- verleden kwam het risico naar voren van verspreiding van Xap en Psm via besmet teeltgereedschap. Op onkruidspuitkappen, laarzen, snoeischaar is Xap aangetoond en soms ook Psm (niet altijd getest). De aangetoonde hoeveelheden (concentraties) bacteriën waren soms laag. De bemonsterde handelingen zijn ook relatief kort uitgevoerd (enkele uren tot een halve dag).
Ook op andere teeltmaterialen, zoals doek van containerveld, buiten- én binnenzijde van beregeningsystemen zijn de ziekteverwekkers aangetoond.
Het was niet mogelijk om vast te stellen of bacteriën hiermee daadwerkelijk worden overgedragen. Vanwege het feit dat de bacteriën hierop aangetoond zijn en dat dergelijke routes ook in andere sectoren bekend zijn, is het verstandig om deze besmettingsbronnen te voorkomen middels hygiëne en ontsmetting.
In vliegen op vangplaten tussen besmette *Prunus*planten is zowel Xap als Psm aangetoond. Ook kon Psm (geen Xap) aangetoond worden in een veegmonster langs een nectarklier. Op basis hiervan is het niet uit te sluiten dat vliegen een rol spelen in het infectieproces.
Dit betekent dat er aantoonbaar risico's zijn op verspreiding van bacteriën op bedrijven met een aanwezige of vroegere bacteriële besmetting, waardoor nieuwe aantastingen kunnen ontstaan. Chemische bestrijding van bacteriën is een lastig verhaal. Daarom is preventie middels hygiëne zeer belangrijk in het beheersen van bacterieziekten. Bij enkele bezochte bedrijven werd dit beleid al zichtbaar. In 2009 en 2010 was sprake van veel symptoomvorming. In de jaren erna is er veel meer nadruk gelegd op hygiëne en zo min mogelijk teelthandelingen doen in (besmette) partijen. In 2012 was er veel minder sprake van nieuwe symptoomvorming door Xap of Psm op deze bedrijven.

Lokalisatie van Xap en Psm
Xap en Psm waren duidelijk aantoonbaar (via PCR) in plantdelen met symptomen (blad en stengel), maar bleek aanwezig te kunnen zijn in alle plantdelen tot aan de wortel toe. De hoeveelheid Xap in de plant lag het hoogst in de maand juni, terwijl dit bij Psm in juli was. De getoetste planten ontwikkelden opvallend genoeg geen nieuwe symptomen. Mogelijk had dit te maken met het kasklimaat (dubbel gaasnet, waar regen niet snel doorheen komt). De testplanten kregen water via druppelaars, waardoor er alleen natuurlijke bladnatperioden ontstonden.
Zowel Xap als Psm kunnen in alle delen van de plant aanwezig zijn, zij het in lage concentraties. Het is dus niet verstandig om stekken te nemen van planten die in meer of mindere mate besmet zijn geweest met bacterieziekten. Voor het vaststellen van aanwezigheid van Xap en/of Psm kunnen het beste symptomatische delen (blad, stengel) bemonsterd worden. In de maanden juni en juli is de kans het grootst om de bacteriën aan te treffen. In de overige maanden was de bacterie veel moeilijker aantoonbaar. Opvallend was dat in deze getoetste planten geen nieuwe symptoomontwikkeling optrad. Dit zou verband kunnen houden met het klimaat in de Q-gaaskas en de manier van watergift (onderdoor).

Aanbeveling voor toekomstig onderzoek
Een belangrijke vraag blijft, hoe bacteriële besmetting in laurierkers te voorkomen of te beheersen. Voorkomen kan door schoon uitgangsmateriaal te gebruiken. Toetsing met PCR kan hierbij zeker helpen en in veel gevallen besmette moerplanten aantonen. Of in alle gevallen deze toets, ook na voorkweek van plantmateriaal om bacteriën te laten uitgroeien, gevoelig genoeg is, is de vraag. De lokalisatie experimenten lieten namelijk veel zwak-positieve reacties zien wat er op duidt dat er lage aantallen bacteriën aanwezig zijn. Mogelijk kan de nieuw, nog in ontwikkeling zijnde TaqMan PCR een verbeterde detectie van Xap mogelijk maken. **Het verdient sterk aanbeveling alleen moerplanten te gebruiken die bewezen hebben nooit zieke planten op te leveren, en deze zeer zorgvuldig te vrijwaren van besmetting.**
De theorie is, dat deze latente besmetting onder bepaalde condities (warm, vochtig,...?) tot explosieve uitbraken kunnen overgaan. Nader onderzoek zou zich moeten richten op hygiëne protocollen om geen besmetting op te lopen dan wel te verspreiden (dus: schone laarzen en apparatuur, goede ontsmetting voordat van het ene naar het andere perceel wordt gegaan).

Doordat de inoculatie experimenten niet tot goed zieke test planten leidden, zijn er geen gewasbeschermingsmiddelen op planten getest. Dit is zeker nog belangrijk om te testen, temeer omdat bestaande middelen zoals Maneb/Mancozeb, en Daconil zullen wegvallen en de toekomst van Captan onzeker is. Een alternatief is het behandelen van stekmateriaal of moerplanten met een speciale temperatuurbehandeling zodanig, dat Xap en Psm worden afgedood maar de plant nog kan uitgroeien.

10 Literatuur

Bereswill S, Bugert P, Vo¨ lksch B, Ullrich M, Bender CL, Geider K, 1994. Identification and relatedness of coronatine-producing Pseudomonas syringae pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. Applied and Environmental Microbiology 60, 2924–30.
Bergsma-Vlami,M., W. Martin, H. Koenraadt, H. Teunissen, J.F. Pothier, B. Duffy, J. van Doorn. 2012. MOLECULAR TYPING OF DUTCH ISOLATES OF XANTHOMONAS ARBORICOLA pv. PRUNI ISOLATED FROM ORNAMENTAL CHERRY LAUREL Journal of Plant Pathology (2012), 94 (1, Supplement), S1.29-S1.35
Cooksey A.D. Copper uptake and resistance in bacteria. Molecular Microbiology (1993) 7(1), 1-5
Inoue Y. and Y. Takikawa (2006). The hrpZ and hrpA genes are variable, and useful for grouping Pseudomonas syringae bacteria. J. Gen Plant Pathol. 72: 26–33.
Kałużna M. , J. Puławska and P. Sobiczewski (2010). The use of PCR melting profile for typing of Pseudomonas syringae isolates from stone fruit trees. European Journal of Plant Pathology, 126: 437-443
Maes M., 1993. Fast classification of plant-associated bacteria in the Xanthomonas genus. FEMS Microbiology Letters. 113: 161-166
Pagani, M.C. (2004). An ABC transporter protein and molecular diagnosis of *Xanthomonas arboricola* pv. pruni causing bacterial spot of stone fruits. Ph.D. Thesis, North Carolina State University, Raleigh, USA.
Palacio-Bielsa, A., Jaime Cubero, Miguel A. Cambra, Raquel Collados , Isabel M. Berruete, and María M. López. Development of an efficient real-time quantitative PCR protocol for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. pruni in *Prunus* species. Appl. Environ. Microbiol. doi:10.1128/AEM.01593-10
Pothier J.F., M.C. Pagani, C. Pelludat, D.F. Ritchie, B. Duffy. A duplex-PCR method for species- and pathovar-level identification and detection of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. pruni. J. of Microbiol. Methods 86 (2011): 16-24.
Porteous, L. A.; Widmer, F. and Seidles, R. T. (2002). Multiple enzyme restriction fragment length polymorphism analysis for high resolution distinction Pseudomonas 16S r RNA genes. J. Microbiol. Meth., 51:733-843
Randhawa, P.S. and Civerolo, E.L. (1985). A detached-leaf bioassay for Xanthomonas campestris pv. pruni . Phytopathology 75: 1060-1063
Schmidt, O., Moreth, U., Dujesiefken, D., Stobbe, H., and Gaiser, O. 2009. Fast molecular detection of Pseudomonas syringae pv. aesculi in diseased horse chestnut trees. For. Path. 39: 343-348.
Vicente J.G and S. J. Roberts. Discrimination of Pseudomonas syringae isolates from sweet and wild cherry using rep-PCR. Eur J Plant Pathol (2007) 117:383–392
Vrancken K, Holtappels M, Schoofs H, Deckers T, Valcke R. 2013. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen Erwinia amylovora in Rosaceae: State of the Art. Microbiology. 2013 Mar 14. [Epub ahead of print

11 Output

11.1 Begeleidingscommissies

- Begeleidingscommissie Bacterieziekte in *Prunus*, 1 juli 2010, Wernhout
- Begeleidingscommissie Bacterieziekten in *Prunus*, 23 november 2010, Randwijk
- Begeleidingscommissie Bacterieziekte in *Prunus*, 28 november 2011, Randwijk
- Begeleidingscommissie Bacterieziekten in *Prunus*, 7 februari 2013, Randwijk

De Klankbordgroep bemesting en gewasbescherming, Werkgroep toelatingen en de Cultuurgroep Siergewassen van LTO vakgroep Boom- en vaste plantenteelt (voorheen NBvB) zijn regelmatig op de hoogte gebracht van voortgang van het project.

11.2 Lezingen

2010
- 7 presentaties over het onderzoek tijdens Open dag Opheusden, 23 september: 225 bezoekers
- Toelichting op poster bij open dag Proeftuin in Boskoop: ca. 100 bezoekers
- Gewasbeschermingsdag Boskoop, 11 november 2010. In 2 presentaties is het project gepresenteerd aan ong. 70 boomkwekers.

2011
- ZLTO-Studieclub Midden Brabant, 31 mei: 5 bezoekers
- Lezing Ziekte en plagen dag 23 juni Almkerk
- Open dag Boskoop, 21 september: demo LFD-test: 115 bezoekers
- Open dag De Buurte, 22 september: demo LFD-test: 120 bezoekers
- Lezing gewasbeschermingsdag Boskoop, 1 december 2011: 80 bezoekers

2012
- Kennismiddag duurzame bomen en vaste plantenteelt, Randwijk, 9 maart;
- Lezing Meet & Green, 20 juni, Venlo; 50 bezoekers
- 28 sept Poster op Open dag Boskoop: 180 bezoekers

11.3 Posters

Bladvlekken in *Prunus*: Xanthomonas of Pseudomonas? (2011)

Bladvlekken in *Prunus*: Xanthomonas of Pseudomonas? (2012)

Zie ook bijlagen 12.1 en 12.2.

11.4 Vakbladartikelen

Van Doorn J. en Fons van Kuik. Onderzoek naar Xanthomonas in *Prunus* gestart. Boomkwekerij 27/28, 2010: p.17
Van Doorn et al. 2011. Teler kan zelf toetsen op Xanthomonas in *Prunus*. Boomkwekerij 22/23 2011: p.13
Joop van Doorn, Pieter van Dalfsen, Khanh Pham. Slaat Xanthomonas dit jaar weer toe in *Prunus*? Boomkwekerij 2012, nr.5: p.14-15.

Bacterieziekten in *Prunus*: jaarrond aanwezig
Joop van Doorn, Pieter van Dalfsen, Khanh Pham, Jet Reeuwijk (PPO Bomen, Bollen en Fruit) (Boomkwekerij april 2013)
Bericht in de nieuwsbrief voor de Cultuurgroep Siergewassen (juni 2010: ong. 700 leden)

11.5 Congressen en websites

Research Program For Control and Management of *Xanthomonas arboricola* pv pruni In Fruit and Nursery Stocks COST 873 Annual WG Meeting Sept2010 Latvia. Wendy Martin, Joop van Doorn, Fons van Kuik, Khanh Pham, Trees Hollinger, Pieter van Dalfsen, Jan van Leijden
Lezing COST873, 1 december 2010, NVWA *(COST 873 2012, Zurich)

http://boomkwekerij.groenweb.nl

12 Bijlagen

12.1 Posters 2010-2012

PRAKTIJKONDERZOEK PLANT & OMGEVING WAGENINGEN UR

Cultus Agro Advies

Bladvlekken in laurierkers: *Xanthomonas* of *Pseudomonas*?

Joop van Doorn, Pieter van Dalfsen, Fons van Kuik, Trees Hollinger, Khanh Pham en Wendy Martin
e-mail: joop.vandoorn@wur.nl

Bladvlekken in *Prunus*

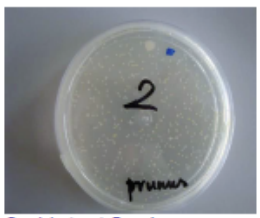
In Nederland wordt laurierkers sinds 2008 belaagd door een quarantaineziekte, veroorzaakt door de bacterie *Xanthomonas arboricola* pathovar pruni (Xap). Echter, ook de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. morsprunorum (Psm) kan vergelijkbare bladvlekken in het blad veroorzaken. Bovendien kunnen beide bacteriën tegelijkertijd voorkomen. Momenteel voert PPO, samen met Cultus, onderzoek uit naar deze bladvlekkenziekten.

Onderzoek

- Detectie, snel en betrouwbaar. Om *Xanthomonas* en *Pseudomonas* apart te kunnen aantonen is een gevoelige en soortspecifieke DNA-test ontwikkeld
- Gewasbeschermingsmiddelenonderzoek, hiervoor wordt nu hard gewerkt aan het ontwikkelen van een betrouwbare proefopzet
- Gevoeligheid *Prunus*-sortiment. Welke cultivars zijn weinig gevoelig?
- Verspreiding van Xap in een kwekerij. Op verschillende plekken van een kwekerij worden monsters genomen en getoetst op aanwezigheid van Xap

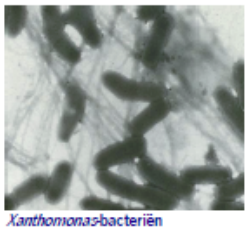
Resultaten

- een gevoelige en specifieke DNA-toets is ontwikkeld voor *Xanthomonas* (Xap); deze wordt gebruikt door de keuringsdienst; die voor *Pseudomonas* (Psm) is in ontwikkeling
- tot op heden: in 20 onafhankelijke monsters van verschillende cv's laurierkers, ook in afgevallen blad, is 8-maal Psm, en 6-maal Xap aangetoond.
- de infectieproeven met Xap zijn gaande
- bij een bedrijf zijn in monsters (gevallen blad, jonge scheuten en bladeren met symptomen van verschillende cv's) Xap en Psm aangetoond; ook in veegmonsters van een kappenspuit werd Xap en Psm gevonden.



Groeiplaat met *Pseudomonas*


Symptomen op *Prunus*


Xanthomonas-bacteriën *(sterk vergroot)*


Quarantaine kas met *Prunus*

Vervolgonderzoek

- gewasbeschermingsmiddelenonderzoek
- analyse van (laurierkers-) monsters op Xap en Psm (vervolg)
- verdere bedrijfsanalyses (waar is Xap aanwezig op een "besmet bedrijf" ?)
- overleg binnen een Europese werkgroep (COST837) die zich bezighoudt met *Xanthomonas*
- toetsing van *Prunus* cultivars op gevoeligheid voor Xap

Communicatie

- De Boomkwekerij 27/28, p.17: onderzoek gestart naar *Prunus*-ziekten.
- Website: http://boomkwekerij.groenweb.nl (kennisgroep 'Bacterieziekte in Prunus' op Boomkwekerij)

Dit onderzoek wordt gefinancierd door Productschap Tuinbouw

PRAKTIJKONDERZOEK PLANT & OMGEVING
WAGENINGEN UR

CULTUS Agro Advies

Bladvlekken in laurierkers: *Xanthomonas* of *Pseudomonas*?

Joop van Doorn, Pieter van Dalfsen, Fons van Kuik, Trees Hollinger, Khanh Pham en Wendy Martin
e-mail: joop.vandoorn@wur.nl

Bladvlekken in *Prunus*

In Nederland wordt laurierkers sinds 2008 belaagd door een Quarantaineziekte, veroorzaakt door de bacterie *Xanthomonas arboricola* pathovar pruni (Xap). Echter, ook de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. morsprunorum (Psm) kan vergelijkbare bladvlekken in het blad veroorzaken. Bovendien kunnen beide bacteriën tegelijkertijd voorkomen. Momenteel voert PPO, samen met Cultus, onderzoek uit naar deze bladvlekkenziekten.

Symptomen

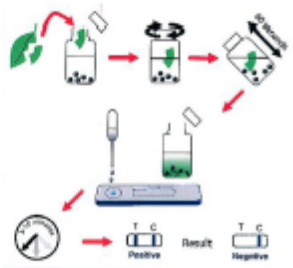
- Geen verschil in symptomen tussen Xanthomonas of Pseudomonas
- Gele randjes rondom bladvlek is verdacht
- Kankers op stengel



Gele randjes rondom bladvlek duidt op bacterie-aantasting

Detectie

- Snelle LFD test voor Xanthomonas. Binnen 15 minuten uitslag.
- een gevoelige en specifieke DNA-toets is ontwikkeld voor *Xanthomonas* (Xap); deze wordt gebruikt door de keuringsdienst; die voor *Pseudomonas* (Psm) is in ontwikkeling



Uitleg van snelle testmethode met LFD-kit

Waar kunnen bacteriën aanwezig zijn?

- Bladeren met symptomen
- Kankers op stengel
- Afgevallen bladeren met symptomen (>1 jaar)
- Nectarklieren (Psm)
- Doek containerveld
- Binnenzijde regenleiding
- Buitenzijde beregening
- Spuitkap onkruidbestrijding
- Laarzen (Psm)
- Vliegen (lage hoeveelheid)



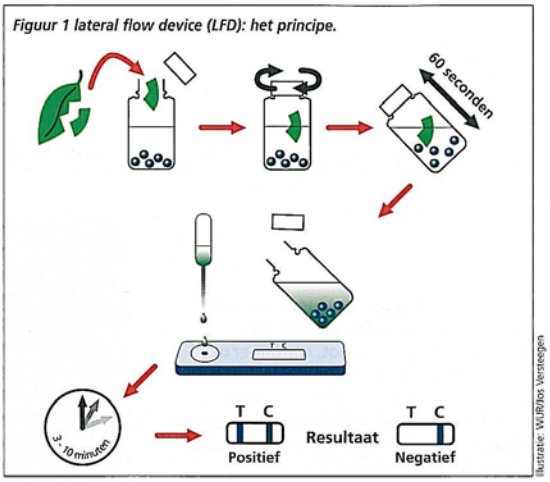
Bacteriën kunnen na een besmet gewas op de spuitkap achterblijven

Is er een invloed van nutriënten in plant of grond?

- Meeste elementen geen verschillen
- Mangaan, zink, koper (grond): Hogere gehaltes minder symptomen
- Geen effect gips

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
Prof. Van Slogterenweg 2
Postbus 85; 2160 AB Lisse
Tel.: 0252 - 462 121
Fax: 0252 - 462 100
Email: infobonen.ppo@wur.nl
Internet: www.ppo.wur.nl

Uw sector investeert in dit project via het Productschap Tuinbouw



Figuur 1 lateral flow device (LFD): het principe.

Prime Diagnostics uit Wageningen heeft een methode ontwikkeld waarmee kwekers eenvoudig kunnen bepalen of *Prunus* is aangetast door de bacterie *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*. Voor een officiële uitslag is nog steeds wel een test uitgevoerd door de nVWA of Naktuinbouw nodig.

Kweker kan zelf toetsen op Xanthomonas in Prunus

Xanthomonas arboricola pv *pruni* (*X. a.* pv *p.*) kan laurierkers aantasten en voor veel schade zorgen: het veroorzaakt een quarantaineziekte. De symptomen zijn niet te onderscheiden van aantasting door schimmels zoals *Phoma* en *Stigmina* (hagelschot), of van aantasting door de bacterie *Pseudomonas syringae* pv *morsprunorum*, mogelijk ook *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*.

Toetsing om te achterhalen waardoor het schadebeeld wordt veroorzaakt, was tot nu toe eigenlijk alleen mogelijk via de keuringsdienst Naktuinbouw en de nVWA (voorheen Plantenziektekundige Dienst). Prime Diagnostics heeft echter een antiserum ontwikkeld dat *X. a.* pv *p.*kan aantonen. Via een systeem in zakformaat is het voor kwekers mogelijk om binnen een kwartier een uitslag te krijgen.

Hoe werkt de toets?

Het ontwikkelde antiserum wordt ook gebruikt in de zogenoemde Elisa-test en bij immunofluorescentie kleuring (IF). Bij IF wordt een *X. a.* pv *p.*-bacterie herkend door het antiserum met een fluorescerende kleurstof die oplicht onder ultraviolet licht onder een speciale microscoop. Bij herkenning van *X. a.* pv *p.* in plantensap geeft de Elisa een kleurreactie.

Het antiserum dat wordt gebruikt in de Elisa-test of bij IF kan ook worden gebruikt in een lateral flow device (LFD) (**figuur 1**). Hierbij wordt plantensap gemaakt van bladmateriaal rondom het symptoom. Dit sap kan worden gemaakt met behulp van een bij de test geleverd buisje met kogeltjes in een waterige oplossing.

Een stukje blad wat wordt verdacht van infectie door *X. a.* pv *p.*, wordt stukgemaakt door het schudden van het buisje met deze kogeltjes. Hierdoor ontstaat plantensap, waarin mogelijk de *X. a.* pv *p.*-bacteriën aanwezig zijn. Met een pipetje wordt wat van dit sap opgezogen en in een gaatje van de test gedruppeld. Bij een positieve reactie (*X. a.* pv *p.* is aanwezig in het sap) bindt het serum zich aan de bacterie op de test en dat geeft een kleurreactie. Er verschijnt dan binnen 15 minuten een extra streepje op de test (**figuur 1**).

Deze toets is minder gevoelig dan een DNA-toets, maar heeft als voordeel dat het te testen plantensap niet hoeft te worden gezuiverd. Zuivering is meestal wel nodig om een DNA-test uit te voeren.

Zelf toetsen

X. a. pv *p.* is een quarantaine-bacterie en valt onder de regelgeving van de nVWA. De hier beschreven test kan de definitieve test bij de nVWA niet vervangen. Toch is dit een mogelijkheid om zelf in te schatten of *Prunus* met hagelschotachtige symptomen besmet zijn met *X. a.* pv *p.*, of met iets anders.

Naast deze toets bestaan ook andere mogelijkheden om uit te vinden of *X. a.* pv *p.* de veroorzaker van het schadebeeld is. Er is door PPO een DNA-toets ontwikkeld, die in vrijwel alle gevallen *X. a.* pv *p.* kan aantonen. Dit moet echter in het laboratorium gebeuren. Voor een officiële uitslag moet de bacterie worden aangetoond. Dit betekent dat voor een echt betrouwbare uitslag de bacterie moet worden geïsoleerd uit het plantmateriaal, en vervolgens moet worden getest bij de nVWA; dit kan weken duren.

Betrouwbaarheid

De LFD blijkt 10.000 *X. a.* pv *p.*-bacteriën per test te kunnen aantonen. Dit is in de meeste gevallen ruimschoots genoeg. Wanneer er symptomen zichtbaar zijn op het blad, zijn er bijna altijd tienduizenden bacteriën aanwezig. Verder is onderzocht of plantmateriaal geen remmend effect of vals-positieve reactie geeft. Dit was niet het geval. De kwaliteit van het antiserum was al eerder getest.

Daarnaast zijn in totaal 450 verschillende praktijkmonsters en geïsoleerde bacteriekweken getest. De resultaten van de LFD-testen kwamen 100% overeen met de resultaten uit de Elisa- of IF-test. Het bleek dat LFD voor het aantonen van *X. a.* pv *p.* geschikt is voor gebruik in de praktijk.

In 2011 worden op enkele bedrijven monsters geanalyseerd door Cultus Agroadvies met deze test. Wanneer deze monsters een negatieve uitslag geven (geen *X. a.* pv *p.* aanwezig), worden de monsters door PPO met DNA-toetsen gecontroleerd. ■

Joop van Doorn, Wendy Martin, Fons van Kuik
zijn werkzaam bij PPO Boomkwekerij/WUR, (0252) 46 21 49, joop.vandoorn@wur.nl.

José van Beckhoven en Henry van Raaij
zijn werkzaam bij Plant Research International/WUR.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving