

Nederlands Xylella-onderzoek leidt tot meer kennis

Wageningen Plant Research heeft de afgelopen jaren onderzoek verricht naar *Xylella fastidiosa*. Zo is een aantal bomen en planten kunstmatig besmet om te zien in hoeverre de bacterie zich daarin kan vermenigvuldigen en verspreiden.

Peter Bonants en Jan van der Wolf (Wageningen Plant Research)
boomkwekerij@hortipoint.nl

Xylella *fastidiosa* veroorzaakt ziekten op meer dan 400 waardplanten. Verschillende insectensoorten zijn bekend als vector van de bacterie en deze komen in heel Europa voor. Vanuit taxonomisch oogpunt is *Xylella fastidiosa* een complexe soort. Isolaten van verschillende waardplanten zijn te groeperen in vier ondersoorten: *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa*, *multiplex*, *pauca* en *sandyi*.

Binnen het EU-programma Euphresco is een kennisagenda opgesteld met de belangrijkste onderzoeksonderwerpen. Dat zijn onder andere: betrouwbare en snelle protocollen ontwikkelen om de bacterie in plant en vector aan te kunnen tonen, en meer kennis opbouwen over vectoren, waardplanten, overleving en verspreiding in verschillende klimaatzones.

Het Nederlandse project is aangesloten bij de inventarisatie van deze kennisleemtes. Er is onderzoek verricht naar waardplanten, isolaten en geïnfecteerd materiaal. Daarnaast zijn stammen en verdacht plantmateriaal moleculair geanalyseerd. Het project is gefinancierd vanuit de Topsector Tuinbouw & Uitgangsmaterialen.

Veertien isolaten uit buitenland

In Nederland waren geen isolaten van *Xylella fastidiosa* aanwezig. Via collecties in België en Frankrijk en het aanschrijven van collega-onderzoekers zijn veertien isolaten verzameld, waaronder de Co-DiRO-stam afkomstig van olijfbomen uit Zuid-Italië. De isolaten liggen opgeslagen bij Wageningen Plant Research.

Bij de start van het project was er ook geen besmet plantmateriaal beschikbaar. Er zijn daarom onder quarantainecondities planten besmet met meerdere

isolaten. In eerste instantie zijn besmette tabaks- en *Catharanthus*-planten verkregen. Later ook andere uit het waardplantenonderzoek.

Variaties in DNA-volgorde

Tussen verschillende isolaten van *Xylella* zijn variaties in de genomsequentie (volgorde van genen in DNA) waargenomen. Deze zijn opgetreden als gevolg van mutaties en recombinaties, ofwel het husselen van genetisch materiaal. Dit kan gevolgen hebben voor het ziekteverwekkend vermogen van de bacterie. Er zijn aanwijzingen dat door het herhaaldelijk overzetten van de bacterie op een kunstmatig groeimedium, het ziekteverwekkend vermogen minder wordt. In dit deel van het project is onderzocht of door het overzetten van isolaten, of vier keer keer overzetten van drie verschillende isolaten op een groeimedium, sequentie-variantie wordt veroorzaakt.

Resultaten van de sequentie-analyse lieten zien dat er geen variatie tussen de genomen kon worden vastgesteld. Dit geeft aan dat, na vier keer overzetten en een verlengde groeiperiode, de genomsequentie niet snel verandert.

Er is verder een vergelijking gemaakt tussen het oude detectieprotocol van Naktuinbouw en een nieuw, verbeterd protocol. Voor braam en eik is een gedegen vergelijking gemaakt. Hiervoor werden aan 100 bladeren verschillende concentraties *Xylella*-bacteriën toegevoegd en werd vervolgens DNA geëxtraheerd volgens het oude en nieuwe protocol. Resultaten laten een betere detectie zien dankzij het nieuwe protocol, voor zowel braam als eik. Nak-

tuinbouw gaat dat verbeterde protocol nu verder testen.

Waard voor de ziekteverwekker

In het Nederlandse project zijn ook onderzoeksstrategieën voor waardplanten bekeken. Daarbij is gebruik gemaakt van een moleculaire toets die de dichtheden van de ziekteverwekker in plantmateriaal betrouwbaar kan vaststellen. Omdat symptoomontwikkeling na infectie vaak zeer langzaam verloopt, is vastgesteld of een plant kan functioneren als waard: kan *Xylella* zich vermenigvuldigen én verspreiden in de plant?

In het eerste jaar van het onderzoek (2017) zijn in een kas verschillende plantensoorten geïnoculeerd met een stam van ondersoort *fastidiosa*, een stam van *multiplex* of een stam van *pauca*: *Prunus avium*, *Acer palmatum*, *Fraxinus excelsior*, *Vinca minor*, *Lavandula angustifolia*, *Portulaca oleracea*, *Hedera helix*, *Nicotiana tabacum* en *Quercus robur*.

De planten groeiden onder condities die gunstig zijn voor ziekte-ontwikkeling: 27°C overdag en 21°C 's nachts. Vóór inoculatie werd de vitaliteit van de bacteriecellen bepaald. Deze liet zien dat de meeste cellen levenskrachtig waren.

Voor elke behandeling zijn vier planten geïnoculeerd. Voor houtige gewassen is deze inoculatie na twee weken herhaald om de kans op infectie te verhogen. Van een selectie van de planten is het inoculatiepunt één dag na inoculatie bemonsterd om de dichtheid van de bacteriecellen te kunnen vaststellen. Circa vier maanden later is het inoculatiepunt van alle planten bemonsterd alsmede stengeldelen op 5 en 10 cm afstand ervan.

De analyses lieten zien dat de inocula-

Betere detectie dankzij nieuw protocol

ties goed waren verlopen. Alleen is bij *Acer palmatum*, bij geen enkele plant, een consistent positieve reactie direct na inoculatie gevonden. Wel bleek dat de aantallen aanwezige bacteriecellen sterk varieerden. Na vier maanden is bij *Vinca minor*, *Portulaca oleracea* en *Nicotiana tabacum* een significante toename van het reactiesignaal gevonden, ofwel de bacterie heeft zich vermenigvuldigd. Bij die drie soorten is de bacterie ook op 5 en 10 cm van het inoculatiepunt gevonden, waardoor *Vinca minor*, *Portulaca oleracea* en *Nicotiana tabacum* als waardplanten van *multiplex* zijn aan te merken.

Voor de ondersoort *fastidiosa* was vermenigvuldiging en verspreiding alleen in *Nicotiana tabacum* vastgesteld. De houtige gewassen lieten geen vermenigvuldiging zien; vier maanden zijn vermoedelijk onvoldoende voor de bacterie hierin.

In het eerste onderzoeksjaar raakten niet alle planten van een waardplant systemisch geïnfecteerd. Daarom is in het tweede jaar onderzoek gedaan naar inoculatiemethoden die de kans op systemische infecties verhogen. Hiervoor zijn vier methoden met elkaar vergeleken: de methode in het eerste jaar (één keer inoculeren); drie keer inoculeren in dezelfde stengel met een interval van een half uur; het bovenste deel van zes bladeren per plant afknippen met een schaar gedoopt in bacteriecellen; en aanprikken van vijf jonge bladstelen per plant.

Gele onregelmatige bladplekjes

De experimenten zijn uitgevoerd met *Nicotiana tabacum*, *Vinca minor* en *Nerium oleander*. Opnieuw is de dichtheid van de bacterie in het plantmateriaal bepaald met de moleculaire toets, zowel één dag

na inoculatie als vier tot vijf maanden daarna. Bij het laatste zijn in *Vinca minor*-planten die drie keer zijn besmet, blad-symptomen gevonden: gele onregelmatige vlekjes die afwezig waren in de controleplanten. Symptomen op *Nicotiana tabacum* konden niet betrouwbaar worden waargenomen door een snelle veroudering van de planten. Op *Nerium oleander* zijn geen symptomen vastgesteld.

De strategie om aan te tonen of een plant een waard kan zijn van *Xylella*, heeft dus gewerkt voor *Vinca minor* in combinatie met ondersoort *multiplex*, binnen vijf maanden. Voor andere plantensoorten is naar verwachting een langere incubatieperiode nodig. Dit brengt in Nederland hoge kosten met zich mee, omdat experimenten met *Xylella fastidiosa* op het hoogste inperkingsniveau moeten worden uitgevoerd. <



Voor het Nederlandse project zijn waardplanten in de quarantaine-kas van Wageningen Plant Research kunstmatig geïnfecteerd met *Xylella*.

Foto: Wageningen Plant Research