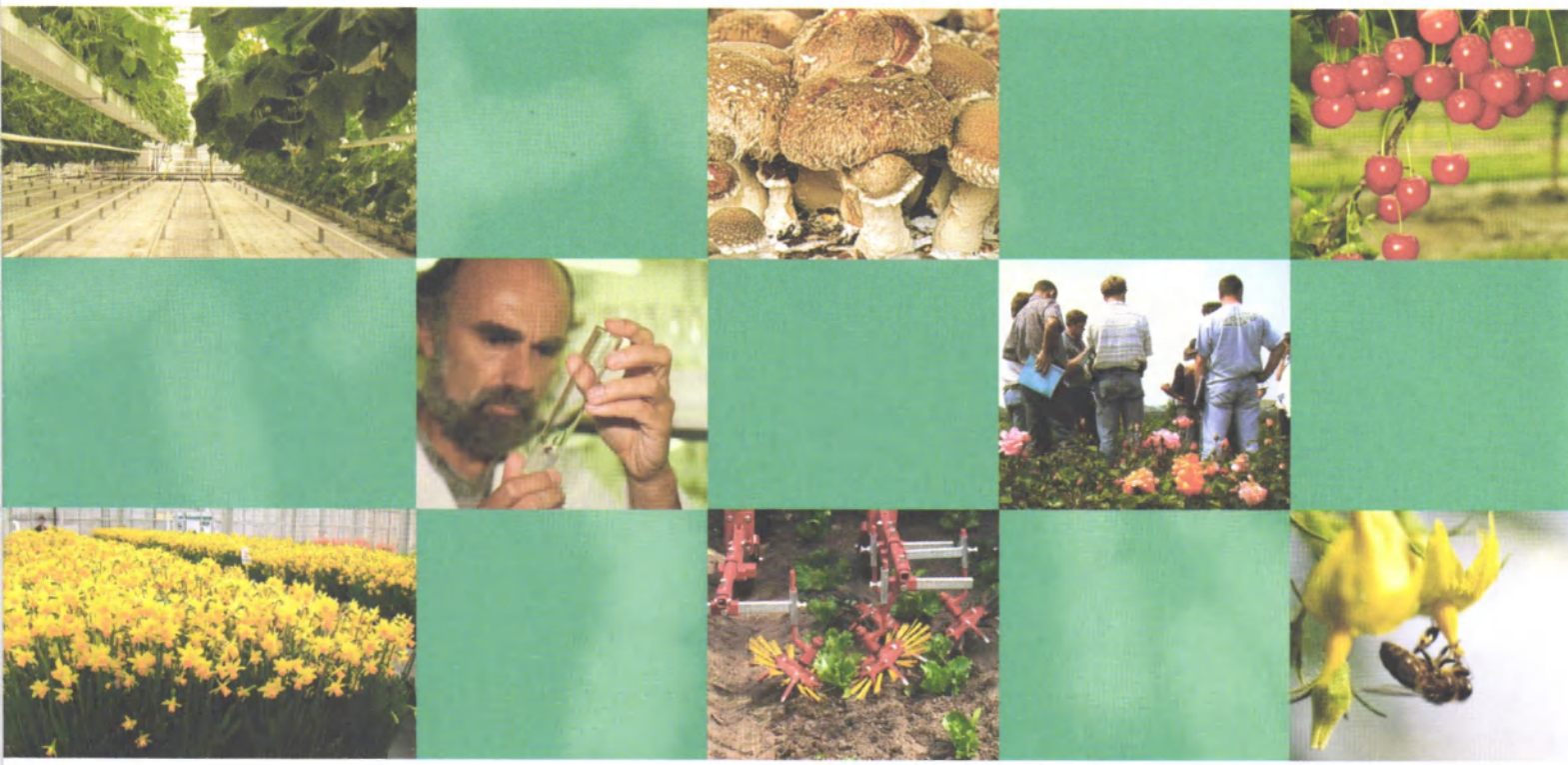
PRAKTIJKONDERZOEK
PLANT & OMGEVING
WAGENINGEN UR

Pear Decline in Pyrus en peer in Nederland; Verslag van een oriënterend onderzoek

Jelle Hiemstra, Frank Maas, Joop van Doorn, Herman Helsen,
Henk Kemp, Khanh Pham en Bart van der Sluis



Productschap Tuinbouw

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
Sector Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit
PPO nr. 32 360127 00
Augustus 2007

[illegible]

Pear Decline in Pyrus en peer in Nederland; Verslag van een oriënterend onderzoek

Jelle Hiemstra, Frank Maas, Joop van Doorn, Herman Helsen,
Henk Kemp, Khanh Pham en Bart van der Sluis

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
Sector Bloembollen, Boomkwekerij en Fruit
PPO nr. 32 360127 00
Augustus 2007

P 13
WM

2286557

© 2007 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
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 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van:

Productschap Tuinbouw

Postbus 280
2700 AG Zoetermeer

Louis Pasteurlaan 6
2719 EE Zoetermeer

Tel.: 079 3470707
Fax: 079 3470404

Email: info@tuinbouw.nl

Projectnummer: 32 360129 00

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bloembollen, Bomen en Fruit
Adres : Prof. Van Slogterenweg 2
: Postbus 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 462121
Fax : 0252 462100
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

1 INLEIDING 5

2 OMVANG VAN HET PROBLEEM 7
2.1 Fruitteelt (perenboomgaarden) 7
2.2 Vruchtbomenteelt 10
2.3 Laanbomenteelt 12

3 FACTOREN VAN INVLOED OP VERSPREIDING EN UITBREIDING 15
3.1 Inleiding 15
3.2 Detectie 15
3.3 Verspreiding in de plant in verschillende seizoenen 16
3.4 Besmettingsgraad perebladvlooien 17

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN 19

5 SAMENVATTING 21

BIJLAGE I: LITERATUUROVERZICHT PEAR DECLINE 23

BIJLAGE II: DETECTIEPROTOCOL EN LITERATUUR 25

BIJLAGE III OVERZICHT VAN FYTOPLASMA BEPALINGEN AAN VAN PLANTEN EN PERENBLADVLOOIEN 27

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

1 Inleiding

Pear Decline ofwel aftakelingsziekte bij *Pyrus* is een al langer bekende aantasting die zowel vruchtbomen en onderstammen als laanbomen (b.v. *Pyrus calleryana* 'Chanticleer) kan aantasten. In de verschillende sectoren werd in de afgelopen jaren geconstateerd dat de aantasting steeds verder lijkt toe te nemen. Daarom is in 2006 door PPO Bollen, Bomen en Fruit een verkennende studie uitgevoerd die zich richtte op de volgende doelen:

- Het in beeld brengen van de omvang van het probleem van Pear Decline; zowel in de opkweek en teelt van (sier)peren op de kwekerij als in de produktiefase in de boomgaard of na het uitplanten in het stedelijk groen;
- Het bepalen van de relevante risicofactoren met betrekking tot verdere verspreiding en/of uitbreiding van Pear Decline. Hierbij was het vinden en testen van een werkbare methode voor detectie van het Pear Decline fytoplasma in plantmonsters en in de perebladvlo een belangrijk onderdeel.

Bij de uitvoering van deze studie is samengewerkt met de Naktuinbouw; beschikbare kennis betreffende Pear Decline en detectie van het fytoplasma is uitgewisseld en voor het vinden van laan- en vruchtboombedrijven voor bemonstering is een beroep gedaan op de keurmeesters van de Naktuinbouw. Daarnaast is samengewerkt met de voorlichters van Fruitconsult, Fruitadvies Zuid Limburg en de Centrale Adviesdienst voor de Fruitteelt voor het vinden van fruitbedrijven voor bemonstering.

De nu verzamelde kennis vormt de noodzakelijke basis voor de ontwikkeling van een strategie gericht op beheersing van het probleem. Als vervolg op het huidige project zal in het najaar van 2007 in overleg met de betrokken partijen een voorstel voor de ontwikkeling van zo'n strategie worden uitgewerkt.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

2 Omvang van het probleem

2.1 Fruitteelt (perenboomgaarden)

Werkwijze
In 2006 is een inventarisatie gedaan van percelen met perenbomen die vroege herfstverkleuring vertonen, slecht groeien of wegkwijnen (foto's 1 en 2). Via de voorlichters is een oproep gedaan om percelen te melden waar bomen met bovengenoemde problemen voorkomen. Alle aangeschreven voorlichters reageerden snel. Binnen enkele weken ontstond een lijst met 28 bedrijven verspreid over de Nederlandse perenteeltgebieden.

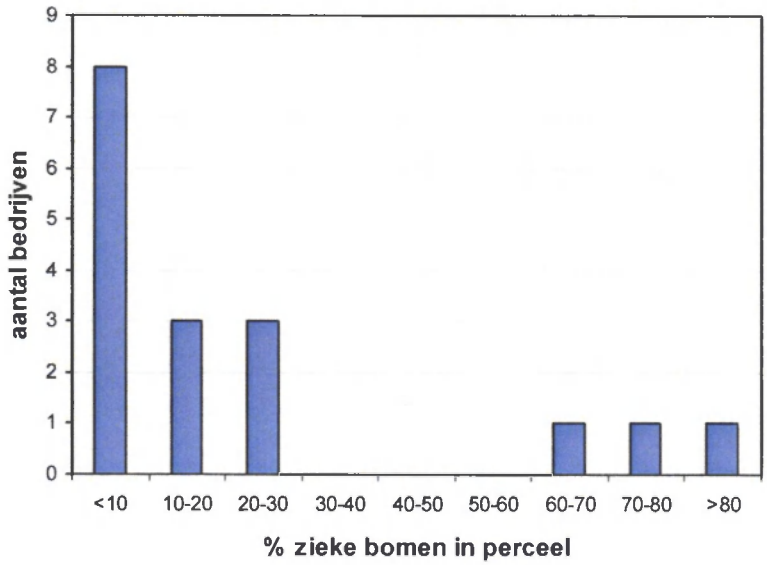
Foto 1 en 2: Typische roodverkleuring van blad aan éénjarige scheuten; en wegkwijnende bomen.

In totaal zijn tussen eind augustus en begin oktober 17 fruitteeltbedrijven bezocht (2 in Noord Holland, 4 in Zuid Limburg, 8 in Gelderland, 3 in Zeeland) en werden van 42 bomen monsters genomen die door PPO-Lisse werden geanalyseerd op de aanwezigheid van het Pear Decline fytoplasma. Daarnaast werden van 10 bomen in de proeftuin in Randwijk met een bekende historie van symptomen in eind maart 2006 monsters genomen van scheuten en wortels en geanalyseerd. Ook zijn perenbladvlooien, gevonden op het blad van een aantal bemonsterde scheuten, geanalyseerd.
Het onderzoek concentreerde zich voornamelijk op bomen met zichtbare symptomen van Pear Decline (roodverkleuring van de bladeren van eenjarige scheuten) en zwakgroeiende of kwijnende bomen. Incidenteel werd ter controle ook een gezond ogende boom bemonsterd.

Mate van aantasting
Uit Zuid Limburg werd van 13 bedrijven een melding ontvangen van bomen met verschijnselen van Pear Decline of groeiproblemen. Bij 11 van de 13 bedrijven zijn door de telers symptomen van Pear Decline waargenomen, waarbij door 2 telers ook nog bomen met groeiproblemen zijn waargenomen zonder de voor Pear Decline karakteristieke vroege herfstverkleuring. Bij 2 bedrijven werden alleen bomen met groeiproblemen waargenomen. Het aantal bomen met symptomen van Pear Decline bedroeg volgens de telers tussen 25 en 1600 bomen per bedrijf. Het aantal bomen met groeiproblemen zonder door de teler herkende symptomen van Pear Decline varieerde tussen 50 en 515 bomen per bedrijf. Deze gegevens zijn afkomstig uit een door Fruitadvies Zuid Limburg via een faxbericht aan haar klanten verzonden enquête. Uit het feit dat slechts een deel van de bedrijven de enquête heeft teruggestuurd kan niet worden afgeleid dat

de problemen met Pear Decline of het slecht groeien van bomen zich beperkt tot de 13 bedrijven die hebben gereageerd.
Uit het gebied Rivierenland in Gelderland, West Friesland in Noord Holland en Zuid Beveland in Zeeland kwamen achtereenvolgens 11, 2 en 2 meldingen van bedrijven met groeiproblemen en Pear Decline symptomen in perenboomgaarden. Ook hier geldt dat dit niet alle bedrijven hoeven te zijn die te maken hebben met deze problemen in peer, maar dat deze bedrijven door de voorlichters zijn genoemd als de bedrijven waar nader onderzoek gewenst was, dwz. de bedrijven met de meeste of duidelijkste symptomen.

De symptomen en mate van aantasting verschilden sterk per bedrijf. Over het algemeen werden de eerste symptomen van bladverkleuring en zwakkere groei waargenomen in het eerste of tweede groei-jaar. Het door telers aangegeven percentage aangetaste bomen varieerde bij Conference van minder dan 2% tot meer dan 80%. Figuur 1 geeft een overzicht van de mate van voorkomen van Pear Decline verdachte bomen of slecht groeiende bomen in de bezochte percelen. Bij 8 van de 17 bedrijven vertoonde minder dan 10% van de bomen deze symptomen en bij 3 bedrijven meer dan 60% van de bomen. Bij de meeste bedrijven waren de visuele symptomen van Pear Decline in 2006 minder dan in voorgaande jaren. De groei van de 'zieke' bomen is op deze bedrijven hersteld na het geven van extra ijzer, stikstof en fosfor aan de bomen met Pear Decline symptomen.



Figuur 1. Percentage pear decline verdachte of slecht groeiende bomen bij de 17 onderzochte bedrijven op basis van visuele symptomen en inschatting telers en voorlichters

Aangetaste perenrassen
Van de 42 onderzochte monsters waren er 38 afkomstig van het ras Conference. Bij een bedrijf in Kruiningen werd ook een drietal verdachte bomen van het ras Doyenné du Comice bemonsterd. In Tholen werd een hoogstamboom van het ras St. Remy bemonsterd op een naast het fruitbedrijf gelegen perceel van het waterschap. Bij de analyse van de monsters werd in 2 van de 3 Doyenné du Comice bomen en in de onderzochte St. Remy boom het Pear Decline fytoplasma aangetoond. Op basis van deze zeer beperkte inventarisatie kan worden geconcludeerd dat de verspreiding van het Pear Decline fytoplasma zich niet beperkt tot het ras Conference.

Invloed onderstam
In de Nederlandse perenteelt staan vrijwel alle bomen op onderstam Kwee MC. Uitgezonderd een boom van het ras Conference op de Zweedse onderstamselectie BP10030 in een aanplant in de proeftuin in Randwijk, stonden alle bemonsterde bomen van de rassen Conference en Doyenné du Comice op onderstam Kwee MC. De onderstam van de onderzochte St. Remy boom is niet bekend, maar is hoogstwaarschijnlijk een perenzaailing. In de zeer zwak groeiende Conference op onderstam BP10030 werd geen fytoplasma

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

aangetoond. Hoewel de bomen midden in een perceel staan met bomen waarin wel Pear Decline werd aangetoond kan niet worden uitgesloten dat de slechte groei van de bomen op BP10030 een andere oorzaak heeft dan Pear Decline. Ook is het mogelijk dat de geanalyseerde monsters geen fytoplasma bevatten, maar dat dit fytoplasma wel elders in boom aanwezig was.
Van in totaal 7 verdachte en 3 gezond ogende Conference bomen op Kwee MC uit de proeftuin in Randwijk zijn in maart 2006 monsters genomen van eenjarige scheuten en wortels. Alleen in de scheuten van de verdachte bomen werd het Pear Decline fytoplasma aangetoond. In geen van de wortelmonsters werd het fytoplasma gevonden.
In november 2006 is een verdachte tweejarige Conference boom met tussenstam Buerré Hardy en onderstam Kwee MC geanalyseerd op de aanwezigheid van het Pear Decline fytoplasma. Alleen in de monsters van het entras en de tussenstam kon het fytoplasma worden aangetoond. Ook bij deze zieke bomen werd het fytoplasma niet gevonden in de onderstam Kwee MC.
De resultaten van de uitgevoerde inventarisatie zijn te beperkt om een uitspraak te doen over de invloed van de onderstam op het ziekteverloop van Pear Decline. Een opvallende waarneming die werd gedaan is dat in een perceel in Randwijk, waar bij veel Conference bomen op Kwee MC symptomen van Pear Decline zichtbaar waren en waarin ook het Pear Decline fytoplasma is aangetoond, sterker groeiende Conference bomen geënt op eigen wortel staan die geen symptomen vertonen van Pear Decline.

Geografische verspreiding
De in 2006 uitgevoerde inventarisatie heeft duidelijk aangetoond dat in alle belangrijke gebieden waar in Nederland peren worden geteeld bomen zijn aangetroffen die besmet zijn met het Pear Decline fytoplasma. Echter de analyses geven geen uitsluitsel over de herkomst van het fytoplasma. Dit betekent dat niet kan worden uitgesloten dat de ziekte via de vruchtboomkwekerij bij de fruittelers is terechtgekomen, maar evenmin dat bomen bij de fruitteler besmet zijn geraakt via overdracht van de ziekte vanuit besmette bomen op omringende percelen of vanuit besmette hoogstambomen in de omgeving van de boomgaard.

Schatting van de schade
De schade veroorzaakt door Pear Decline kan in een aantal categorieën worden onderverdeeld:

a. verminderde groei in eerste jaar na aanplanten die mogelijk snel te herstellen is door extra bemesting
b. verminderde groei en maatverlies van peren gedurende een groot aantal productiejaren
c. wegkwijnen en afsterven van bomen

ad a.
Bij het tijdig kunnen herstellen van het groeiniveau van de bomen door extra bemesting en verdwijnen van de ziekte uit de boomgaard kan de schade beperkt blijven tot kosten van de meststoffen en de arbeid nodig voor het uitvoeren van de bemesting. Het uitvoeren van een economische berekening van deze kosten viel buiten het kader van dit project

ad b.
De schade hangt af van het percentage zieke bomen, de mate van maatverlies die optreedt, het aantal jaren dat maatverlies optreedt en het mogelijke lagere prijs die voor de kleinere peren wordt betaald. Ook voor deze schade geldt dat een uitvoerige economische berekening buiten het kader van dit onderzoeksproject viel.

ad c.
Het doodgaan van bomen levert de grootste schadepost op. Naast het verlies aan productie kost het geld en arbeid om de bomen te vervangen.

Discussie
Op basis van de bezochte perenboomgaarden en bemonsterde bomen is gebleken dat in alle belangrijke teeltgebieden bomen worden aangetroffen waarin het Pear Decline fytoplasma voorkomt. Het fytoplasma kon het duidelijkst worden aangetoond in eenjarige scheuten met duidelijk visuele symptomen (vroege herfstverkleuring). In sterk verzwakte of kwijnende bomen die in 2006 geen of nauwelijks nieuwe scheuten

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

vormden, werd over het algemeen geen Pear Decline fytoplasma aangetoond. Volgens ir. G. Jongedijk (viroloog Naktuinbouw, persoonlijke mededeling) is een dergelijke zwakke groei ook bekend als een tweedejaars effect van een Pear Decline infectie. De vraag is of dergelijke verzwakte bomen wel veroorzaakt zijn door Pear Decline en zo ja, of het fytoplasma dan nog op een andere plaats in de boom aanwezig is dan in het bemonsterde meerjarige bovengrondse deel van de boom.
In wortelmonsters van de Kwee MC onderstam van bomen waarbij het fytoplasma in monsters van eenjarige scheuten werd aangetoond kon noch in maart, noch in november het fytoplasma worden aangetoond. In tegenstelling tot de literatuur (bijlage 2) blijkt al in maart in monsters van de het vorige seizoen gegroeide scheuten het fytoplasma te kunnen worden aangetoond. Nader onderzoek is gewenst om na te gaan of het overleven van het fytoplasma in bovengrondse delen van een perenboom afhankelijk is van de temperatuur in de winterperiode.
Bij diverse telers waar in 2006 nog slechts sporadisch Pear Decline kon worden aangetoond, maar die in eerdere jaren meer bomen met symptomen van Pear Decline in hun perceel hadden, lijkt het erop dat extra bemesting met stikstof, fosfaat en ijzer de bomen heeft laten herstellen. Dit leidt tot de vraag: Hoe komt herstel van boom tot stand en verdwijnt het fytoplasma uit bomen die beter gaan groeien? Aanvullend kan de vraag worden gesteld hoe het komt dat Conference op eigen wortel midden in een perceel met door Pear Decline aangetaste Conference op Kwee MC geen symptomen van Pear Decline vertoonde? Als de verspreiding van de ziekte via perenbladvlooien plaats vindt is het niet goed voorstelbaar dat Conference op eigen wortel niet geïnfecteerd zou zijn. Het zou interessant zijn om te onderzoeken of het fytoplasma ook voorkomt in de ogenschijnlijk gezonde Conference op eigen wortel en, zo ja, waarom deze bomen dan geen symptomen van de ziekte ontwikkelen. Interessant in dit verband is ook de in de literatuur (zie bijlage 2) beschreven waarneming dat bepaalde perenonderstamselecties, zoals de Amerikaanse selecties OH x F 87 bomen tolerant kunnen maken voor Pear Decline. Waarop deze tolerantie berust is niet bekend, maar het zou interessant kunnen zijn om dit nader te onderzoeken en bij de selecties van toekomstige onderstammen voor peer ook meer aandacht te geven aan deze eigenschap.

2.2 Vruchtbomenteelt

Werkwijze
In 2006 zijn in overleg met de Naktuinbouw zeven vruchtboombedrijven bezocht waar het vermoeden bestond van Pear Decline in de opkweek van de perenbomen. De bedrijven liggen verspreid over alle teeltgebieden van vruchtbomen in Nederland. Er zijn 14 monsters op 9 percelen genomen in Limburg, Noord Brabant, Gelderland en Flevoland. Het onderzoek concentreerde zich voornamelijk op bomen met zichtbare symptomen van Pear Decline (roodverkleuring van de bladeren van eenjarige scheuten) met mogelijk gereduceerde groei. De bemonstering werd uitgevoerd in de periode 14 september- 24 oktober 2006. Van de bomen met symptomen werden enkele takken afgebroken en in plastic zakken afgevoerd voor verder onderzoek.

Geografische spreiding en ontwikkeling
Uit het fytosanitair jaarverslag van de Naktuinbouw zijn de volgende Pear Decline vondsten gehaald.

Tabel 1. Meldingen van Pear Decline uit fytosanitaire jaarverslagen van de Naktuinbouw.

Jaar	Aantal vondsten	Soort	Locatie	Bron
1996-1998	geen			Naktuinbouw
1999	2	'Conference' , 'Triomphe de Vienne'	niet vermeld	Naktuinbouw
2000	6	Pyrus - / Pyrus communis	niet vermeld	Naktuinbouw
2001	11	Pyrus -	niet vermeld	Naktuinbouw
2002	22 partijen op 10 percelen	Pyrus -	niet vermeld	Naktuinbouw
2003	21 partijen op 8 percelen	Pyrus -	niet vermeld	Naktuinbouw
2004	15 partijen op 13 percelen	Pyrus -	niet vermeld	Naktuinbouw
2005	Ca. 14 partijen	Pyrus div. rassen 'Conference / 'Triomphe de Vienne'/ 'Clara Frys'	Limburg en Gelderland	Naktuinbouw
2006	9 percelen	Pyrus div. rassen	Limburg, Brabant, Gelderland en Flevoland	PPO

De historische inventarisatie van Naktuinbouw laat vooral in de periode 1999-2002 een vrij sterke toename zien. Daarna lijkt het aantal meldingen zich te stabiliseren. Het tijdens dit onderzoek verkregen beeld sluit goed aan bij deze cijfers.

Aangetaste rassen
Onderstaande tabel geeft een beeld in welke rassen PD-symptomen zijn aangetroffen in het veld, in hoeverre in monsters van deze bomen het fytoplasma kon worden aangetoond en de mate van aantasting van de betroffen percelen. Opvallend is dat er bij de bomen met symptomen sprake is van een zeer duidelijke aanwezigheid van fytoplasma's.

Tabel 2. Vruchtboomrassen waarin het Pear Decline fytoplasma werd aangetoond.

Ras	Percelen met symptomen van Pear Decline	Aantal monsters	Fytoplasma aangetoond in .. monsters	Mate van aantasting van het perceel (volgens inschatting)
Clara Frijs	2	6	4	20%
Conference	6	7	6	2-10%
Williams	1	1	1	12%

Hoewel de inventarisatie een beperkte omvang heeft, kan toch geconcludeerd worden dat symptomen van PD in diverse rassen worden aangetroffen. Als onderstam wordt in alle gevallen *Cydonia oblonga* gebruikt (Kwee, diverse typen). Op basis van literatuuronderzoek is de onderstam Kwee een slechte waardplant voor fytoplasma's. Anderen menen echter dat deze onderstam de boom extra gevoelig maakt en een sterkere reactie bij het ras veroorzaakt in vergelijking met hetzelfde ras op *P. communis*.

Mate van aantasting
De mate waarin bomen met PD-symptomen worden aangetroffen loopt sterk uiteen op de bedrijven. Volgens de kwekers varieert het van enkele bomen tot 20%. Dit zijn zeer globale inschattingen. Bovendien kan het

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

per jaar verschillen. Bij sommige bomen verdwijnen de symptomen in het tweede teeltjaar. Voor de totale productgroep wordt het gemiddelde aantastingspercentage geschat op 5-7%

Symtomen en schade
De aantasting met het fytoplasma lijkt veel op de zaailingziekte. Verondersteld wordt dat het dezelfde ziekte betreft. In de vruchtboomteelt wordt de ziekte goed zichtbaar in september (foto's 3 en 4).

Foto 3 en 4. Eenjarige en tweejarige 'Clara Frijs' met PD-symptomen

De symptomen worden door enkele ondervraagde bedrijven al vanaf 1998/1999 waargenomen. Bij andere bedrijven zijn de symptomen voor de eerste keer pas in 2006 waargenomen. Het meest duidelijke kenmerk is de roodverkleuring van het blad. Daarnaast is er ook sprake van groeistagnatie en uitval. Opvallend is de verspreiding van de symptomen op enkele percelen. In een aantal gevallen staan de bomen met symptomen in rijtjes van 3-10 bomen achter elkaar. Op andere percelen echter staan de bomen met symptomen verspreid over het perceel. De symptomen worden in alle teeltjaren waargenomen. Volgens de kwekers worden aangetaste bomen gemerkt en later verwijderd.
Uitgaande van de kwantitatieve informatie (KWIN) resulteert een aantastingpercentage van 6% in een uitval van 1.900 bomen per hectare ofwel ruim €7000 per hectare.

2.3 Laanbomenteelt

Geografische spreiding en ontwikkeling
In de fytosanitair jaarverslagen van de Naktuinbouw zijn geen Pear Decline vondsten van laanboombedrijven gerapporteerd. Door de Naktuinbouw zijn in 2006 slechts enkele bedrijven aangereikt (4) waar bomen met PD-aangetasting konden worden bemonsterd. Aanvullend is op twee andere bedrijven ook bemonsterd. In totaal is er op 9 percelen bemonsterd (12 monsters) in Gelderland en in Limburg. De symptomen worden dus waargenomen in de belangrijke teeltgebieden in Nederland.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Tabel 3. Laanboomcultivars waarin het Pear Decline fytoplasma werd aangetoond.

Ras	Percelen met symptomen van Pear Decline	Aantal monsters	Fytoplasma aangetoond in .. van de monsters	% bomen met symptomen (volgens inschatting)
P. calleryana 'Chanticleer'	8	9	2	5%
P. calleryana 'Red Spire'	1	1	1	?
P. communis 'Beech Hill'	2	2	1	?

Mate van aantasting

Het percentage monsters waarin fytoplasma werd aangetoond was bij de laanbomen weliswaar lager dan bij de vruchtbomen, maar ook hier werd in één op de drie monsters het fytoplasma aangetoond. In alle gevallen zijn het relatief jonge laanbomen (maat 6/8): ofwel een 2-3 jarige boom in een spillenkwekerij of een 2 jarige opzetter. Omdat er slechts een beperkt aantal monsters per boom werd genomen en niet alle monsters van een geïnfecteerde boom positief hoeven te zijn is het percentage geïnfecteerde bomen zeker hoger.

De aantasting wordt op de laanboomkwekerijen niet in haarden aangetroffen, maar altijd verspreid op het perceel. De symptomen zijn bij de laanboomkwekers relatief onbekend. Hierdoor is het moeilijk aan te geven hoe de aantasting zich in de tijd ontwikkeld heeft. Ook de mate waarin de aantasting op de percelen voorkomt is moeilijk in te schatten. Op basis van eigen waarnemingen vertoont circa 5% van de bomen symptomen. Deze bomen vertonen evenals de vruchtbomen een roodverkleuring van het blad (foto 3), maar niet altijd groeireductie.

Aangetaste soorten en cultivars

In deze beperkte inventarisatie werd Pear Decline waargenomen in de *P. calleryana* cultivars 'Chanticleer' en 'Red Spire', en in *P. communis* Beech Hill'. Deze bomen staan op de onderstam *P. communis* (zaailing of selectie Kirchensaller) en *P. calleryana*.

De perebladvlo (=vector) komt volgens de kwekers minder voor op Chanticleer. Bij andere cultivars (bv. Beech Hill) is de druk van de perebladvlo hoger. Over het algemeen zijn er weinig problemen met perebladvlo in de teelt van laanbomen.

Schade

Een opbrengstderving als gevolg van PD is moeilijk te geven. Op basis van de uitkomsten van het onderzoek in 2006 kan een (zeer) voorzichtige schatting gemaakt worden: Teelt van driejarige spillen: 12.300 stuks/ha ; 5% met symptomen resulteert in 615 aangetaste bomen. De schade bedraagt dan € 4920/ha (bron: KWIN).

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

3 Factoren van invloed op verspreiding en uitbreiding

3.1 Inleiding

Volgens de literatuur is de belangrijkste overbrenger van het fytoplasma dat Pear Decline veroorzaakt, de perebladvlo (*Psylla pyri*). Daarnaast zou Pear Decline ook via oculatie en enthout overgebracht kunnen worden. De perebladvlo leeft op *Pyrus* en heeft meerdere generaties per jaar. De volwassen insecten overwinteren op *Pyrus* en waarschijnlijk ook op verwante gewassen zoals *Malus*. Het fytoplasma kan niet alleen overleven in de perebladvlo, het is ook in staat zich te vermeerderen in dit insect wat de overlevings- en verspreidingskansen van het fytoplasma sterk vergroot.
Fytoplasma's zijn voor hun overwintering in de boom volgens de literatuur aangewezen op actief zeefvatweefsel. 's Winters zouden fytoplasma's daarom alleen in wortelweefsel worden aangetroffen. Van het wortelstelsel kunnen zij dan in het voorjaar de bovengrondse delen van de boom herinfecteren. Schaper en Seemuller (1984) hebben aangetoond dat vanaf maart het fytoplasma met een snelheid van 7,5 tot 30 mm per dag vanuit de wortels omhoog de stam in komt. Gemiddeld bereikte het fytoplasma de onderste gesteltakken (100-130 cm boven maaiveld) 10-30 dagen na volle bloei.
Overwintering van het fytoplasma is mogelijk in overwinterende bladvlooien (Blomquist & Kirckpatrick, 2002). Bestrijding van overwinterende bladvlooien wordt beschouwd als een belangrijke factor om verspreiding van Pear Decline tegen te gaan (Carraro et al. 2001).
De symptomen in geïnfecteerde bomen zijn afhankelijk van de weersomstandigheden en kunnen van jaar tot jaar wisselen. Hierdoor is bij geïnfecteerde bomen de ziekte niet altijd zichtbaar. Vooral hete en droge zomers geven een vergroot risico. In mildere zomers (met regelmatig regenval) zijn de symptomen vrijwel afwezig.
Om meer inzicht te krijgen in de factoren die van invloed zijn op verspreiding en uitbreiding van Pear Decline onder de Nederlandse omstandigheden is het onderzoek in deze fase geconcentreerd op:

- Detectie van het fytoplasma in plantmateriaal en in de vector.
- Aanwezigheid van het fytoplasma in verschillende delen van de plant in relatie tot de periode van het jaar.
- De besmettingsgraad van perebladvlooien met het fytoplasma

3.2 Detectie

Inleiding
Momenteel berust de identificatie van fytoplasma's op verschillen in het 16 S rDNA. Hoewel de ribosomale DNA-sequentieverschillen tussen de nu onderscheiden soorten of groepen zeer klein zijn (minder dan 3%) worden hiermee ongeveer 14 groepen onderscheiden. Een groep waar veel fytoplasma's toe behoren, is de Aster Yellows groep (16SI) die voornamelijk in Europa en Noord-Amerika wordt aangetroffen. Identificatie berust enerzijds op restrictieanalyse van het ribosomale 16 S-gebied, anderzijds op directe sequentieanalyse van dit gebied. Voor diagnostische toepassing wordt vaak nested PCR gebruikt, waarbij de discriminerende primer in het groepsspecifieke variabele deel van het 16 S rDNA gebied ligt (Smart *et al.*, 1996).
In dit onderzoek werden RFLP (restrictie-enzym analyse van DNA-fragmenten) en sequentie analyse toegepast om te bevestigen dat het aangetoonde fytoplasma echt *Candidatus Phytoplasma pyri* is en tot subgroep 16SrX (Apple proliferation group) behoort.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Doel van dit projectonderdeel was:

- het isoleren van kwalitatief goed DNA uit monsters (peer, vector) om PD te kunnen detecteren
- het toetsen en verder ontwikkelen van bestaande PCR-methoden om PD aan te tonen
- het aantonen van PD in de vector (perenbladvlo)

Isolatie van DNA voor detectie van Pear Decline

Dit staat beschreven in bijlage II. Hiervoor werd uiteindelijk gebruikt gemaakt van commerciële kits: PureGene genomic DNA purification kit (Gentra systems) en de DNeasy Plant mini kit (Qiagen). DNeasy Plant mini kit (Qiagen) bleek de beste keuze wegens het verkrijgen van de beste DNA kwaliteit ondanks dat dit de meest bewerkelijke methode is.
Aanpassingen voor het isoleren van DNA (meer materiaal) gaf betere resultaten (meer kans op isolatie van DNA van Pear Decline).

Ontwikkeling van PCR methode

PCR's werden uitgevoerd volgens standaard procedures met PCR Mastermix (Promega, Madison, USA) met de primers die staan vermeld in Tabel 4. Gezien de lage concentratie van fytoplasma's werd bijna altijd nested PCR toegepast.

Tabel 4: Sequenties van gebruikte primers in project "Pear Decline"

Primers	Sequentie	Grootte DNA-fragment	Specificiteit	Literatuur (bijlage II)
P1	5'- AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3'			
P7	5'- CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3'	1800 bp		(1)
Tint	5'- TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C -3'	1650 bp	universeel	(2)
R16F1	5'- AAG ACG AGG ATA ACA GTT GG -3'			
R16R0	5'- GGA TAC CTT GTT ACG ACT TAA CCC C -3'	1400 bp	universeel	(3)
Fu5	5'- CGG CAA TGG AGG AAA CT -3'			
Ru3	5'- TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA -3'	880 bp	universeel	(4)
fO1	5'- CGG AAA CTT TTA GTT TCA GT -3'			
rO1	5'- AAG TGC CCA ACT AAA TGA T -3'	1050 bp	Groep X specifiek	(4)
fPD	5'- GAC CCG TAA GGT ATG CTG A -3'			
rPD	5'- CCC GGC CAT TAT TAA TTT TA -3'	1400 bp	PD specifiek	(4)

Directe PCR met primers P1/Tint bij lage annealing temperatuur gaf bandjes met achtergrond. Hogere annealing temperatuur gaf een beter resultaat, echter met deze set universele primers werden mogelijk ook bacteriële sequenties geamplificeerd (2). Primer combi P1/P7 geniet de voorkeur.
Voor de monsters, geanalyseerd in april, waren de fytoplasma- concentraties waarschijnlijk hoog. Direct PCR met universele primers Fu5/Ru3 of primers R16F1/R16R0 gaf toen namelijk ook duidelijke resultaten. Geen reacties werden gevonden bij wortelmonsters, ook niet bij nested PCR. PCR met primers fO1/rO1 (Groep 16SrX specifieke primers) geeft hetzelfde resultaat als met Fu5/Ru3. Met primers PDf/PDr is geen signaal gevonden; later bleek uit DNA sequentie-analyse dat deze primers isolaat specifiek zijn.

3.3 Verspreiding in de plant in verschillende seizoenen

Hiertoe zijn alleen oriënterende experimenten uitgevoerd. Deze pilots werden uitgevoerd aan monsters van verschillende bomen; er is geen individuele boom jaarrond bemonsterd. In tegenstelling tot literatuur

vermeldingen werden er in het geheel geen reacties gevonden bij wortelmonsters, ook niet bij toepassing van nested PCR. Dit onderdeel verdient daarom vervolgonderzoek.
In totaal zijn 50 monsters van perenscheuten geanalyseerd, afkomstig van 18 bedrijven (getabelleerd in Bijlage III). In 18 monsters was sprake van een duidelijke aanwezigheid van fytoplasma's (+) en in 6 monsters een iets minder duidelijk aanwezigheid van fytoplasma's (+/-). De overige monsters waren negatief. Uit Bijlage III blijkt dat in bomen zonder symptomen vrijwel nooit (uitzondering is monster TH1-4) fytoplasma is aangetoond. Bij de ziek ogende bomen zijn het vooral de bomen met roodverkleurd blad aan eenjarige scheuten waarin in deze scheuten het fytoplasma is aangetoond. In zieke, zeer zwak groeiende bomen zonder eenjarige scheuten, waarvan meerjarig hout is bemonsterd kon daarentegen geen fytoplasma worden aangetoond.
Fytoplasma kon ook worden aangetoond in perenbladvlooien afkomstig van bladeren van bemonsterde takken, echter alleen in bladvlooien afkomstig van takken waarin ook fytoplasma werd aangetoond.
Op 1 monster na werd in alle bemonsterde bomen bij vruchtboomkwekers met roodverkleuring een zeer duidelijke besmetting met fytoplasma aangetoond. Het monster waarin geen fytoplasma kon worden aangetoond kwam wel van een boom met rood verkleurde top. Volgens NAKT bestaat de kans dat als je alleen een monster uit de top van een dergelijke boom haalt je geen fytoplasma vindt.
Op dit moment is er te weinig inzicht in waar en op welk moment het fytoplasma zich in de boom bevindt en onder welke groeicondities het wel en geen ziektebeeld veroorzaakt. Mogelijk is na een ernstige eerstejaars infectie de reactie zo sterk, dat zonder herinfectie vanuit wortels of door uitblijven van nieuwe besmetting door perenbladvlooien (zonder jonge scheuten boom minder aantrekkelijk voor bladvlooien?) in het 2e jaar geen fytoplasma in de scheuten voorkomt.

3.4 Besmettingsgraad perebladvlooien

Om te onderzoeken of de voor plantmateriaal gebruikte detectiemethode ook bruikbaar is voor de detectie van het pear-decline fytoplasma in perebladvlooien werden een tweetal verkennende experimenten uitgevoerd.
1. Perebladvlooien aangetroffen op scheuten van een aantal in week 41 bemonsterde pear-dceline verdachte en gezond ogende bomen werden apart geanalyseerd op de aanwezigheid van het Pear Decline fytoplasma.
2. In het veld verzamelde eieren van perebladvlooien werden tot volwassen bladvlooien opgekweekt op bladeren van fytoplasma-vrije perenzaailingen verkregen van Naktuinbouw of op bladeren van scheuten van pear-decline verdachte bomen in de boomgaard in Randwijk. Algemeen wordt aangenomen dat het fytoplasma niet overdraagbaar is via eieren en dat perebladvlooien alleen door het zuigen aan besmette bomen het fytoplasma kunnen binnenkrijgen.

Het bleek met de ontwikkelde PCR's mogelijk om fytoplasma aan te tonen in perebladvlooien PBV). In perebladvlooien die waren geisoleerd van scheuten waarin het fytoplasma voorkwam werd het fytoplasma eveneens aangetoond en in bladvlooien geisoleerd van scheuten waarin geen fytoplasma kon worden aangetoond werd geen fytoplasma gedectecteerd.
Een opvallend resultaat werd verkregen uit de proef waarin bladvlooien vanuit ei werden opgekweekt op gezond en pear-decline verdacht plantmateriaal. Bij opkweek vermoedelijk ziek plantmateriaal werd het fytoplasma in zowel de plant als de perebladvlo aangetoond. Echter, bij opkweek op gegarandeerd gezond plantmateriaal werd het fytoplasma eveneens aangetoond in de bladvlooien, maar niet in het plantmateriaal. Een goede verklaring voor deze waarneming ontbreekt momenteel. Het verdient aanbeveling deze proef nogmaals te herhalen en ook eieren van bladvlooien te analyseren op het fytoplasma. De tabellen 5 en 6 geven een overzicht van de analyseresultaten.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Tabel 5: PBV (perenbladvlo) monsters geanalyseerd in week 41 (oktober) 2006: zie ook bijlage III.

Monster nr	Herkomst PBV	PCR-resultaat
20	gezond blad	-
21	ziek blad	+/-
22	ziek blad	+/-
23	rood blad	+
24	gezond blad	-

+ = positief, - = negatief, +/- = weinig aanwezig

Tabel 6: PBV-monsters geanalyseerd in week 46 (november) 2006.

Nr.	monster	PCR	Opmerking
1	PBV HH1	+/-	Perenbladvlo opgekweekt op 'gezonde' zaailingen afkomstig van NAK
2	PBV HH2	-	Materiaal **Zaailing** NAK
3	PBV HH3	+/-	Perenbladvlo opgekweekt op verdachte boom A-1-P2 Noord7 PPO
4	PBV HH4	+/-	Materiaal **tak** Conference boom A-1-P2 Noord7 PPO
5	PBV HH5	+/-	Perenbladvlo opgekweekt op verdachte boom B-4-P3 Noord7 PPO
6	PBV HH6	++	Materiaal **tak** Conference boom B-4-P3 Noord7 PPO

Door het moeizame vangen van de perebladvlooien kon er nog geen onderzoek naar het percentage geïnfecteerde perebladvlooien worden uitgevoerd. Voor onderzoek hiernaar in een vervolgproject is de toepassing van zg. real-time PCR noodzakelijk.

4 Conclusies en aanbevelingen

Conclusies fruitteelt
- Pear Decline komt in alle perenteeltgebieden in Nederland voor en wordt vooral waargenomen in de eerste jaren na het planten.
- In pas aangeplante boomgaarden met Pear Decline varieert het percentage bomen met symptomen van minder dan 10 tot meer dan 80%.
- Het lijkt erop dat aanvullende bemesting symptomen van Pear Decline kan doen verdwijnen.
- Het fytoplasma kon niet in de wortels van Kwee MC onderstammen van besmette Conference bomen aangetoond worden.
- Er werd ook geen fytoplasma aangetoond in kwijnende, afstervende bomen zonder eenjarige scheuten.

Conclusies vruchtbomenteelt
- In alle gebieden waar vruchtbomen worden geteeld komt Pear Decline voor.
- Eind jaren '90 is er een sterke toename geweest, waarna het aantal meldingen is gestabiliseerd.
- Het aantastingspercentage varieert van enkele bomen op een kwekerij tot 20%.
- De ziekte komt voor in meerdere perenrassen, waaronder 'Clara Frijs', 'Conference' en 'Williams'.

Conclusies laanbomenteelt
- Ook in bomen op laanboombedrijven in Gelderland en Limburg werd Pear Decline aangetroffen.
- De aantasting komt verspreid in de percelen voor (geen haarden) tot gemiddeld maximaal 5%
- Pear Decline is waargenomen in meerdere laanboomsoorten, waaronder *P. calleryana* 'Chanticleer' en 'Red Spire', en *P. communis* Beech Hill'.

Conclusies met betrekking tot verspreiding en ontwikkeling van Pear Decline
- De ontwikkelde methoden voor isolatie van fytoplasma-DNA en de primers voor identificatie zijn toepasbaar.
- Het Pear Decline fytoplasma is zeer consistent aangetoond in bomen met duidelijke symptomen van Pear Decline (roodverkleuring blad éénjarige scheuten).
- Het Pear Decline fytoplasma is bovendien aangetoond in perenbladvlooien van besmette planten.
- De analyse van monsters van zieke bomen wijst erop dat in tegenstelling tot vermeldingen in de literatuur het Pear Decline fytoplasma onder Nederlandse omstandigheden wel kan overwinteren in de bovengrondse delen van de perenboom.

Aanbevelingen

Het huidige project was opgezet als voorstudie voor een project gericht op beheersing van het Pear Decline probleem. Voorgesteld wordt om in dit vervolg de aandacht vooral te richten op:
- De verspreiding van het fytoplasma in aangetaste planten in de loop van het jaar.
- De wijze van besmetting en de rol van de perenbladvlo.
- De herkomst van de infectie van zieke fruitbomen
- Bescherming tegen infectie en factoren die het herstel van zieke bomen bevorderen.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

5 Samenvatting

Uit deze voorstudie komt het beeld naar voren dat Pear Decline wijd verspreid in Nederland aanwezig is. In alle onderzochte gebieden werden zowel in perenboomgaarden als in de teelt van vrucht- en laanbomen bomen met symptomen van Pear Decline aangetroffen. De symptomen en de mate van aantasting variëren sterk per bedrijf en per jaar; voor perenboomgaarden lopen de schattingen uiteen van 2% tot 80%, in de teelt van vruchtbomen van enkele bomen tot 20% en in de laanbomenteelt is de gemiddelde schatting ca 5%. Opvallend was dat het in de laanbomenteelt vooral om jonge bomen lijkt te gaan en dat ook in de perenteelt vooral in de eerste jaren na het planten zieke bomen worden waargenomen.
Een duidelijk effect van de onderstam werd niet waargenomen, aangetaste bomen komen echter voor op zowel Kwee onderstam (vruchtbomen) als op *P. communis* en *P. caleryana*. De steekproeven zijn te beperkt om te kunnen zeggen welke rassen eventueel niet worden aangetast, maar zieke bomen zijn in ieder geval waargenomen in 'Conference', 'Triomphe de Vienne', 'Clara Frijs' en 'Williams' voor de vruchtbomen en in *P. calleryana* 'Chanticleer' en 'Red Spire', en *P. communis* 'Beech Hill' voor de laanbomen.
Een opbrengstderving ten gevolge van Pear Decline is moeilijk te geven; maar voorzichtige schattingen uitgaande van het percentage aangetaste bomen leiden tot bedragen van 2000 €/ha voor laanbomen, 7000 €/ha voor vruchtbomen en ruim 2000 €/ha in de fruitteelt.
Er is ruim aandacht besteed aan het ontwikkelen en testen van technieken om het fytoplasma wat Pear Decline veroorzaakt aan te tonen m.b.v. moleculaire technieken. Isolatie van DNA uit monsters van zieke planten bleek goed mogelijk en in deze monsters kon het fytoplasma inderdaad aangetoond worden. Het fytoplasma werd aangetoond in diverse delen van zieke planten én in perebladvlooien afkomstig van zieke planten. Het is dus inderdaad goed mogelijk dat dit organisme als vector voor de ziekte fungeert. Opvallend was dat de verspreiding in zieke planten in de loop van het jaar niet overeenkwam met de literatuur. Het lijkt er op dat onder Nederlandse omstandigheden het fytoplasma in bovengrondse delen kan overwinteren. In wortelmonsters werd het helemaal niet gevonden.
Voor zekerheid over de ontwikkeling in de loop van het jaar is echter meer onderzoek nodig. Dit geldt ook voor het verklaren van de ontwikkeling van zieke bomen en de rol van de vector daarbij. Vervolgonderzoek dient zich daarom te concentreren op het vaststellen van latente infecties (symptoomloos), de rol van de (soorten) perebladvlo; de verspreiding van het fytoplasma in de boom in de loop van het jaar en mogelijkheden om besmetting te voorkomen of zieke bomen weer te laten herstellen.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bijlage I: Literatuuroverzicht Pear Decline

Pear Decline, in het Nederlands ook wel perenaftakelingsziekte of –degeratieziekte genoemd, wordt veroorzaakt door een fytoplasma, in de literatuur ook vaak aangeduid met mycoplasma. Een fytoplasma is een micro-organisme dat beschouwd kan worden als een primitieve bacterie met een afmeting van 0,1 – 1 µm zonder celwand (Lee et al. 2000, Christensen et al. 2003). Door het ontbreken van een celwand kunnen fytoplasma's van dezelfde soort sterk in vorm verschillen. Verschijnselen van Pear Decline gaan altijd samen met de aanwezigheid van fytoplasma's in de zeefvaten. De ziekte vertoont opvallende overeenkomsten met de vanouds bekende zaailingziekte. Aangenomen wordt dat beide ziektes identiek zijn. (Van der Meer, 1990). Heksenbezem of appelproliferatie is een door een verwant fytoplasma veroorzaakte ziekte in appelbomen (Musetti et al. 2004).

Bladvlooien treden op als vector voor het overbrengen van fytoplasma's van boom naar boom. Overwintering van fytoplasma is mogelijk in overwinterende bladvlooien (Blomquist & Kirckpatrick, 2002, Garcia-Chappa et al. 2005). Bestrijding van overwinterende bladvlooien wordt beschouwd als een belangrijke factor om verspreiding van Pear Decline tegen te gaan (Carraro et al. 2001). Verplaatsing van een gedeelte op natuurlijke wijze met Pear Decline besmette bomen met symptomen van Pear Decline (cultivar Williams op *Pyrus pyrifolia* onderstam) naar een gebied zonder perenbladvlooien gaf na twee jaar bomen die vrij waren van Pear Decline symptomen, terwijl van vergelijkbare bomen die waren achtergebleven in het gebied waar perenbladvlooien voorkomen 36% van de bomen dood was en 46% ernstige symptomen van Pear Decline vertoonde. Fytoplasma's konden uitsluitend worden aangetoond in bomen met symptomen van Pear Decline. (Westwood & Cameron, 1978).

Fytoplasms kunnen ook via oculatie en enthout worden overgebracht (Errea et al., 2002)

Er is geen duidelijk verband gevonden tussen mate van fytoplasma-infectie en zichtbare symptomen van Pear Decline. Gevoeligheid voor Pear Decline is mede afhandelijk van onderstam (Bell & Putarka 2004, Garcia-Chappa et al. 2004). Gevoeligheid is het grootst op Kwee A. Perenrassen Williams en Decan del Comizio zijn minder gevoelig dan Conference, vooral indien geënt op Franco comune onderstam (Pastore et al., 1998).

Uit Italiaans onderzoek (Giuchedi et al., 1994) bleek dat Conference weinig gevoelig is voor Pear Decline, ongeacht het type onderstam. Doyenné du Comice vertoont sterkere symptomen met *Pyrus communis* als onderstam dan bij gebruik van een kwee onderstam. Abate Fetel, Kaiser en Williams waren even gevoelig op zowel *Pyrus* als kwee onderstammen.
Perenras Hardy vertoonde minder symptomen indien geënt op kwee dan op een zaailing onderstam van de perenrassen Krichensaller Mostbirne (Seemuller et al., 1986).

Fytoplasma's zijn voor hun overwintering in de boom aangewezen op actief zeetvatweefsel. 's Winters worden fytoplasma's daarom alleen in wortelweefsel aangetroffen. Van het wortelstelsel kunnen zijn in het voorjaar de bovengrondse delen van de boom opnieuw infecteren. Schaper en Seemuller (1984) hebben aangetoond dat vanaf maart het fytoplasma met een snelheid van 7,5 tot 30 mm per dag vanuit de wortels omhoog de stam in komt. Gemiddeld bereikte het fytoplasma de onderste gesteltakken (100-130 cm boven maaiveld) 10-30 dagen na volle bloei. Deze herinfectie trad bij peer gewoonlijk iets trager op dan bij appel. Garcia-Chappa et al. (2003ab) hebben waargenomen dat onder Spaanse klimaatcondities het fytoplasma ook in bovengrondse delen van de perenboom kan overwinteren.

Pear Decline kan worden bestreden door behandeling van de bomen met oxytetracyline (McIntyre et al., 1979; Lacy et al. 1980) of terramycine (Nyland et al. 1979).

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Geraadpleegde literatuur

Bell RL and Putarka GL (2004). Modes of Host Plant Resistance to Pear Psylla; a Review. Acta Horticulturae 663: 183-188

Blomquist CL and Kirkpatrick BC (2002). Frequency and seasonal distribution of pear psylla infected with the Pear Decline phytoplasma in California pear orchards. Phytopathology 92: 1218-1226.

Brunner-Keinath S and Seemuller E (1987). Overwintering of the apple proliferation and Pear Decline causing MLOs at the graft union. Zeitschrift-fur-Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 94: 457-461.

Carraro L; Loi N; Ermacora P; Gregoris A; Osler R and Hadidi A (1998).Transmission of Pear Decline by using naturally infected Cacopsylla pyri L. Acta-Horticulturae. 472: 665-668.

Christensen NM; Axelsen KB; Nicolaisen M and Schulz A (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. Trends in Plant Sciences 10: 526-535.

Errea P; Aguelo V and Hormaza JI (2002).Seasonal variations in detection and transmission of Pear Decline phytoplasma. Journal of Phytopathology 150: 439-443.

Garcia-Chapa M; Laviña A; Sanchez I; Medina V and Batlle A (2003a). Occurrence, symptom expression and characterization of phytoplasma associated with Pear Decline disease in Catalonia (Spain). Journal Phytopathology 151: 584-590.

Garcia-Chapa M; Medina V; Viruel MA, Laviña A and Batlle A (2003b). Seasonal detection of Pear Decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. Plant Pathology 52: 513-520.

Garcia-Chapa M; Batlle A; Laviña A; Camprubí A; Estaún V and Calvet C (2004). Tolerance increase to Pear Decline phytoplasma in mycorrhizhal OHF-333 pear rootstock. Acta Horticulturae 657: 437-441.

Garcia-Chapa ML Sabaté J; Laviña A and Batlle A (2005). Role of Cacopsylla pyri in the epidemiology of Pear Decline in Spain. European Journal of Plant Pathology 111: 9-17

Lacy GH; McIntyre JL; Walton GS and Dodds JA (1980). Rapid method for and effects of infusing trees with concentrated oxytetracycline-HCl solutions for Pear Decline control. Canadian Journal of Plant Pathology. 2: 96-101.

Lee I-M; Davis R and Gundersen-Rindal DE (2000). Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. Annual Review Microb

Musetti R; di Toppi LS; Ermacora P and Ravali MA (2004). Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an utrastructural and biochemical study. Phytopathology 94: 203-208.

Nyland-G; Su-H-J (ed.); McCoy-RE (ed.) (1979). Chemotherapy of diseases of deciduous trees associated with mycoplasma and rickettsialike organisms. In::Proceedings of R.O.C. - United States Cooperative Science Seminar on mycoplasma diseases of plants. NSC-Symposium-Series. pp. 139-142.

Pastore M; Santonastaso M; Vibio M; Bertaccini A; Lee IM;la Cara F and Hadini A. (1998) Susceptibility to phytoplasma infection of three pear varieties grafted on different rootstocks. Acta-Horticulturae 472: 673-680.

Schaper U and Seemuller E (1984). Recolonization of the stem of apple proliferation and Pear Decline-diseased trees by the causal organisms in spring. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 91: 608-613.

Seemuller E; Schaper U and Kunze L A (1986).Effect of Pear Decline on pear trees on 'Quince A' and Pyrus communis seedling rootstocks. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und-Pflanzenschutz. 93: 44-50

van der Meer, FA (1990).Virus- en mycoplasmaziekten. In: De peer, S.J.W.Wertheim (ed.), Hoofdstuk 22, pag. 263-279, Mededelingen nr. 22, Proefstation voor de Fruitteelt, Wilheminadorp

Westwood MN and Cameron HR (1978). Environment-induced remission of Pear Decline symptoms. Plant Disease Reporter. 62: 176-179.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bijlage II: Detectieprotocol en literatuur

Protocol isolatie DNA van fytoplasma-verdacht materiaal en PCR

(gebaseerd op isolatieprotocol van Qiagen)

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

Literatuur

(1) Deng, S., and D. Hiruki, Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non culturable mollicutes. J. Microbiol. Methods 14: 53-61 (1991).
(2) C D Smart, B Schneider, C L Blomquist, L J Guerra, N A Harrison, U Ahrens, K H Lorenz, E Seemüller, and B C Kirkpatrick, Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. Appl Environ Microbiol. 1996 August; 62(8): 2988–2993.
(3) Davis, R. E., E. L. Dally, D. E. Gundersen, I.-M. Lee, N. Habili, "Candidatus Phytoplasma australiense", a new phytoplasma taxon associated with Australian Grapevine yellows. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 262-269 (1997).
(4) Lorenz, K.H., Schneider, B., Ahrens, U., and Seemuller, E. Detection of the apple proliferation and Pear Decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology 85: 771-776 (1995).

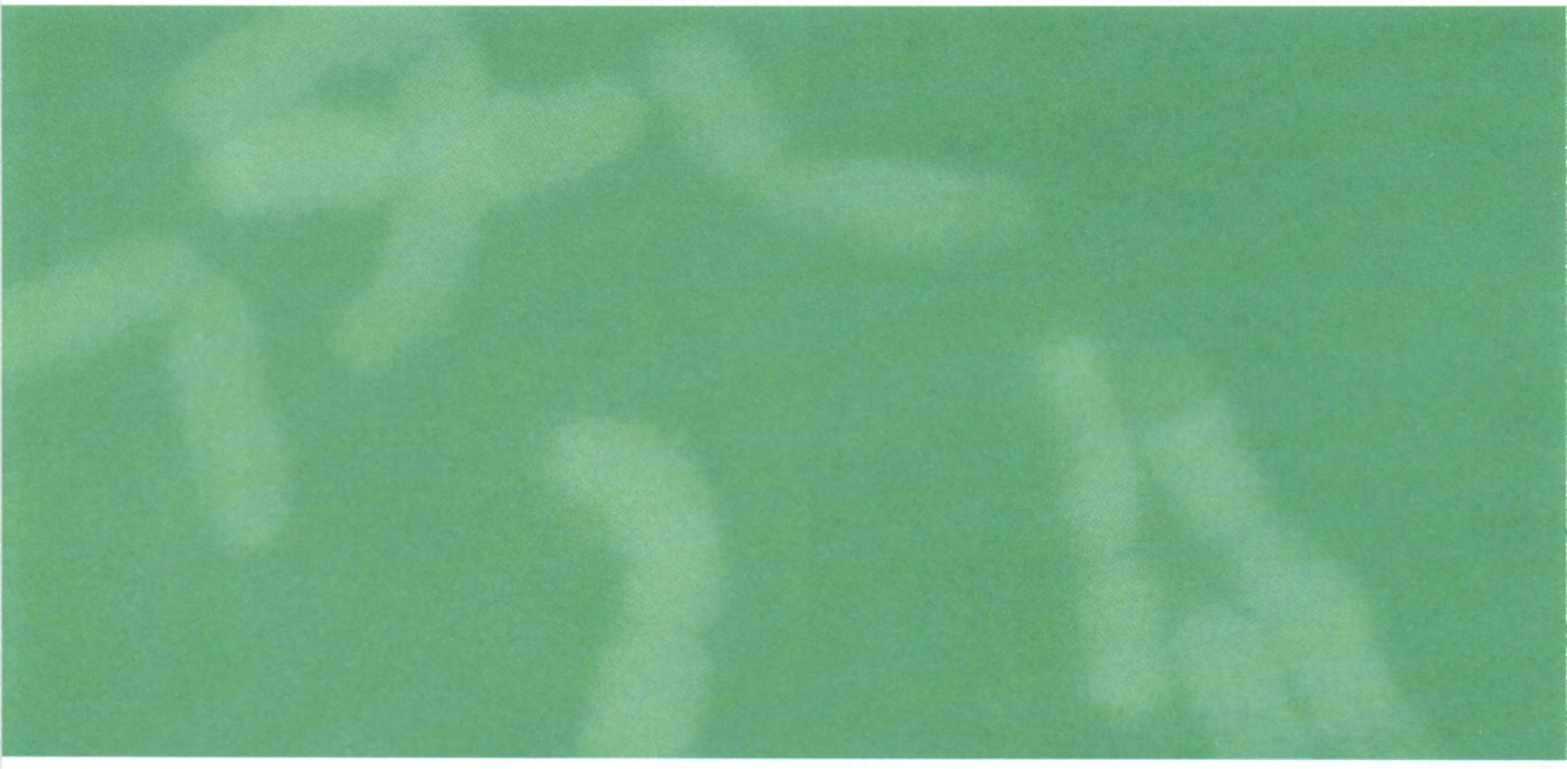
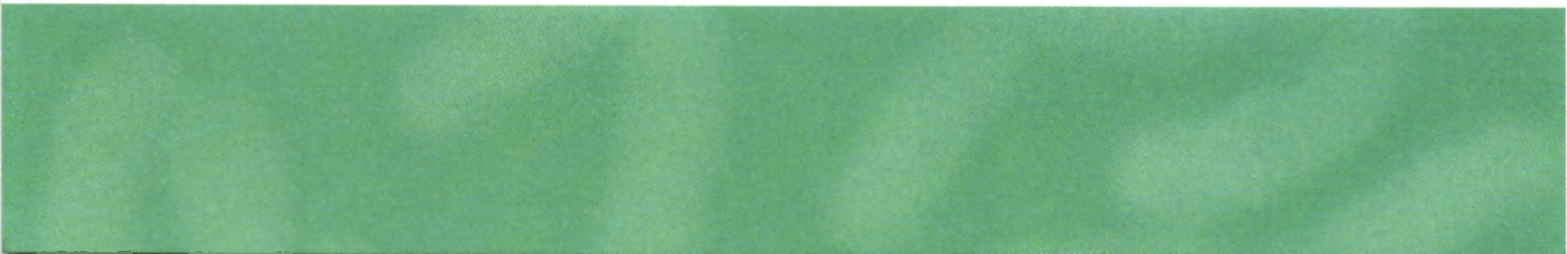
© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bijlage III Overzicht van fytoplasma bepalingen aan monsters van planten en perenbladvlooien

nr	Code	Plaats	Opmerkingen	fytoplasma
		Gelderland		
1	1A2	Randwijk	Roodverkleuring 2005 en 2004	+
2	1B3	Randwijk	Geen t/m 2005	-
3	1C2	Randwijk	Roodverkleuring 2005 en 2004	+
4	1D1	Randwijk	Geen t/m 2005	-
5	4B3	Randwijk	Roodverkleuring 2005 en 2004	+
6	4D2	Randwijk	Roodverkleuring 2005 en 2004	?*[1]
7	4E1	Randwijk	Geen t/m 2005	-
8	4E2	Randwijk	Roodverkleuring 2005 en 2004	+
9	4F2	Randwijk	Roodverkleuring 2005 en 2004	+
10	8A2	Randwijk	Roodverkleuring 2005 en 2004	+
11	R1-1	Randwijk	Wegkwijnende Conference op BP10030	-
12	R1-2	Randwijk	Wegkwijnende boom KP0503-10(62)	-
13	VB1	Buurmalsen	monster van bomen met erge symptomen, geen groei, klein blad, rood + lichtgroen bros blad, geen of een enkel klein peertje	-
14	VB2	Buurmalsen	monster van bomen met roodverkleuring in de scheuttoppen, die nog maar iets in groei achterblijven	+
15	VB3	Buurmalsen	monster van bomen met zeer weinig groei en roodbruinverkleuring	-
16	KE1	Enspijk	monster van een paar bomen in de rij met erg weinig groei maar geen bladverkleuring	-
17	VDG1	Geldermalsen	monster van enkele bomen met minder groei en wat ruwere kleinere peren, maar geen bladverkleuring	-
18	VLB1	Buren	monster van bomen in 3^{e} groei-jaar met kleine vruchten, zeer weinig groei en roodbruine bladverkleuring	-
19	VLB2	Buren	monster van bomen in 6^{e} groeijaar met minder groei, maar zonder bladsymptomen meer, wel 1 scheut met wel iets roodverkleuring in de top.	+/-
20	VDWB1	Buren	monster van bomen gemerkt (rode wasknijper), weinig groei, geen roodverkleuring, wel lichter groen/ gelig blad of bruine bladrandjes of geler in het midden	-
21	VHB1	Buren	monster van bomen met geen/ weinig groei en klein licht bladmet soms iets rood bruin erbij verkleurd	-
22	VHB2	Buren	monster van bomen met weinig groei, maar geen geel blad, wel wat roodbruinverkleuring	+/-

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

23	VDLO1	Ochten	rij 24 bm5 achter middenpad met zwakkere groei, geen verkleuring	-
24	VDLO2	Ochten	rij 25 bm 4 achter middenpad, zwakke maar niet heel zwakke groei, geen verkleuring	-
25	VDLO3	Ochten	rij 25 bm 10, echt weinig groei, geen verkleuring	-
26	VDLK1	Kesteren	vorig jaar gemerkte boom, nu wel iets minder groei maar geen verkleuring	-
27	VDLK2	Kesteren	vorig jaar niet gemerkte boom, maar nu wel rood/bruine verkleuring, maar niet in scheuttoppen	+

		Noord Holland		
28	K1	Oudijk	Zwakke groei, geen roodverkleuring, wel rood in voorgaande jaren. Door teler gemerkte boom	-
29	K2	Oudijk	Idem als K2	-
30	S1	Zwaagdijk	Beginnende roodverkleuring blad 1-jarige scheuten	+
31	S2	Zwaagdijk	Beginnende roodverkleuring blad 1-jarige scheuten	+
		Zuid Limburg		
32	W1	Reijmerstok	Roodverkleuring blad 1-jarige scheuten	+
33	W2	Reijmerstok	Geen rood blad in 2006, vermoedelijk wel in 2005	-
34	E1	Ransdaal	Geen duidelijke verkleuring, wel in jonge jaren aanplant	-
35	B1	Berg en Terblijt	Lichte roodverkleuring blad 1-jarige scheuten	+
36	B2	Berg en Terblijt	Lichte roodverkleuring blad 1-jarige scheuten	+
37	D1	Eckelrade	Kwarrende boom, geen bladverkleuring	-
38	D2	Eckelrade	Geen symptomen aan blad en qua groei	+
39	D3	Eckelrade	Geel en rood verkleurd blad	+
		Zeeland		
40	KR1-1	Kruiningen	Conference, gezond blad, veel perenbladvlooien	-
41	KR1-2	Kruiningen	Conference, ziek, half dood	+/-
42	KR1-3	Kruiningen	Doyenne, 3 wk geleden groen, nu zwart, deels licht bruin blad	+/-
43	KR1-4	Kruiningen	Doyenne, 3 wk geleden groen, nu zwart, deels groen geel blad	+
44	KR1-5	Kruiningen	Doyenne, licht groen, rood blad	-
45	TH1-1	Tholen	St. Remy terrein Waterschap, 3e boom vanaf Zuid, lichte roodverkleuring blad	+/-
46	TH1-2	Tholen	Conference, ziek, geel-lichtgroen blad	+/-
47	TH1-3	Tholen	Conference, twijfelachtige Pear Decline symptomen	-
48	TH1-4	Tholen	Conference, donkergroen blad, ± gezond	+
49	KW1-1	Kwadendamme	Rood blad sinds 3 maanden, gezond in 2005	+
50	KW1-2	Kwadendamme	Gezond ogende boom	-
		Perenbladvlo		
51	PBV KR1-1	Kruiningen	Perenbladvlo uit monster KR1-1	-
52	PBV KR1-2	Kruiningen	Perenbladvlo uit monster KR1-2	+/-
53	PBV TH-1-2	Tholen	Perenbladvlo uit monster TH1-2	+/-
54	PBV KW1-1	Kwadendamme	Perenbladvlo uit monster KW1-1	+
55	PBV R1-2	Randwijk	Perenbladvlo uit monster bedrijf R1	-