

Maatregelen tegen Pear Decline Phytoplasma infectie via enten

Auteurs R. H. L. Dees, M. J. D. de Kock

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
PPO nr. 32 361383 00/PT nr. 14478
Maart 2014

© 2014 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.

Projectnummer: 3236138300

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
: Professor van Slogterenweg 2, 2161 DW, Lisse
Tel. : +31 252 462199
Fax : +31 252 462100
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

Inhoudsopgave

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING	7
2 LOKALE VERSCHILLEN IN PDP-CONCENTRATIE IN ENT- EN OCULATIEHOUT.....	9
2.1 Inleiding	9
2.2 Materiaal en Methode.....	9
2.3 Resultaten en discussie.....	11
2.4 Conclusie.....	12
3 MAATREGELEN TEGEN PDP TIJDENS HET ENTEN EN OCULEREN.	13
3.1 Inleiding - de maatregelen.....	13
3.2 Materialen en Methode	13
3.2.1 Enten en behandelingen tegen PDP	13
3.2.2 Oculeren en behandelingen tegen PDP	14
3.2.3 Monstername en het toetsen van de bomen met PCR	15
3.3 Resultaten en discussie.....	16
3.3.1 Pilot warmwaterbehandeling oculatiehout.....	16
3.3.2 De enten – overleving en symptomen	17
3.3.3 De oculaties - overleving en symptomen	19
3.3.4 Effecten van de diverse behandelingen op overleving PDP	19
3.4 Conclusie.....	21
4 ALGEMENE DISCUSSIE EN ADVIES.....	23
5 LITERATUUR.....	25

Samenvatting

Pear Decline is een ziekte bij perenbomen en wordt veroorzaakt door een fytoplasma. Zieke perenbomen worden gekenmerkt door een vervroegde en veelal intensieve roodverkleuring van de bladeren. Bij een ernstige aantasting sterft de boom af. Bomen gaan echter niet altijd dood. Sommige bomen groeien door de ziekte heen en verliezen het fytoplasma in de loop van de tijd. Het fytoplasma wordt overgedragen door de perenbladvlo (*Cacopsylla pyri*), maar kan ook tijdens het handmatig vermeerderen van perenbomen worden verspreid. De ziekte vormt op dit moment nog met name een probleem in de zuidelijke Europese landen rond het Middellandse Zeegebied. Ook in Nederland is de ziekte aanwezig, maar de verspreiding is beperkt. Dit neemt niet weg dat PDP een potentieel gevaar vormt voor de exportpositie van Nederlandse vruchtboomtelers en kwekers.

In het najaar van 2011 is bij PPO onderzoek gestart naar verschillen in infectiekans bij het enten en oculeren van peren als ook onderzoek naar maatregelen om de infectiekans tijdens de vermeerdering door enten of oculeren te verminderen. Voor deze bestrijding van PDP werd PDP-geïnfecteerd ent- en oculatie hout voorafgaand aan de vermeerdering behandeld met een warmwater-, koude- of tetracycline behandeling. Voor de warmwaterbehandeling werd het enthout behandeld met 1 uur 45°C of 20 minuten 50°C en oculatiehout met een 30 minuten 39°C. De koude behandeling bestond uit respectievelijk twee dagen -5°C of twee dagen -1°C voor het ent- of oculatiehout. De tetracycline behandeling werd alleen toegepast bij oculatiehout, waarbij de ogen voor het oculeren voor 30 minuten in een oplossing van 50 µg of 100 µg/ml tetracycline werden gelegd. Een jaar na het uitvoeren van de oculaties en enten is met behulp van PCR-diagnostiek de aan- of afwezigheid van PDP in het ent en oculatiehout getest.

De PCR en DNA extractie voor het routinematig toetsen van perentwijgen op PDP vereist verdere optimalisatie. Het type monsternormmateriaal blijkt hierbij o.a. erg belangrijk te zijn. Voor toetsen kan het beste de bladnerf en de toppen van twijgen worden genomen. Deze geven de minste remming in de uiteindelijke PCR reactie. Uit onderzoek naar de aan- of afwezigheid van PDP in ent- en oculatiehout blijkt dat:

- de efficiëntie van PDP-overdracht via enten of oculeren laag is (ca 10%)
- de manier van vermeerderen geen verschil lijkt te maken in de effectiviteit waarmee het fytoplasma wordt verspreid
- een koude behandeling het fytoplasma niet bestrijdt.

De warmwaterbehandeling van enthout met 50°C kende veel uitval. Deze temperatuur blijkt te hoog om enten nog te doen uitlopen. Over de effectiviteit van de andere warmwater en tetracyclinebehandeling zijn geen conclusies te trekken. Het aantal bomen, dat uiteindelijk betrouwbaar op PDP kon worden getoetst binnen deze behandelingen bleek te klein t.o.v. het aantal positief getoetste bomen uit de zieke onbehandelde controle (waar slechts 5 van de 50 met PCR getoetste bomen ziek bleken na enten). Geen van de bomen vertoonden hierbij duidelijke symptomen.

Op basis van dit onderzoek wordt het volgende geadviseerd aan kwekers van peren:

- Gebruik geen PDP-geïnfecteerd oculatie- of enthout.
- Laat op het oog verdacht hout met PCR toetsen op de afwezigheid van fytoplasma of gebruik hout van deze bomen uit voorzorg niet als ent- of oculatiehout.
- Gebruik bij monsternamen voor de PCR toets vooral het jong bastmateriaal van de toppen van de twijgen als ook de nerven van verdachte bladeren. Bemonster niet de bladschijf of basis van twijgen aangezien inhoudstoffen uit deze delen de PCR reactie remmen.

1 Inleiding

Het Pear Decline fytoplasma (PDP) staat als quarantaine organisme vermeld op de EPPO A2 lijst. Fytoplasma's zijn gespecialiseerde bacteriën zonder celwand die leven in het floëem van planten. De belangrijkste waard voor het PDP is peer (*Pyrus* spp.). Zieke bomen worden gekenmerkt door een vervroegde en veelal intensieve roodverkleuring van de bladeren. Bij een ernstige aantasting sterft de boom. Bomen gaan echter niet altijd dood. Sommige bomen groeien door de ziekte heen en verliezen het fytoplasma in de loop van de tijd.

De ziekte wordt op persistente wijze overgedragen door de perenbladvlo (*Cacopsylla pyri*). Draagt de perenbladvlo het fytoplasma eenmaal bij zich dan zal deze gedurende zijn gehele leven nieuwe bomen kunnen blijven besmetten. Verspreiding van het fytoplasma kan ook via handmatige veredeling plaatsvinden, wanneer met PDP-besmet ent- of oculatiehout wordt vermeerderd. Op basis van kleinschalige experimenten door Naktuinbouw is de efficiëntie van fytoplasma-infectie bij enten van geïnfecteerd materiaal $\pm 15\%$.

Op dit moment is de ziekte met name een probleem in de zuidelijke Europese landen rond het Middellandse zeegebied zoals Spanje, Zuid-Frankrijk en Italië. In sommige gebieden in deze landen heeft de ziekte de teelt en productie van peren geheel onmogelijk gemaakt. Bestrijdingsmaatregelen tegen het fytoplasma zijn er niet en de ziekte kan enkel worden beheerst door de vector actief te bestrijden of zieke bomen uit de teeltlocatie te verwijderen. Uit een inventarisatie uit 2007 is gebleken dat PDP ook in Nederland aanwezig is en zowel bij vruchtbomenteelt als in fruitbomen wordt aangetroffen (PT-project 12350-1). Tot dusver lijkt een PDP besmetting in Nederland niet oncontroleerbaar uit te breiden en bestaat er bij vruchtboom telers en kwekers nog weinig aandacht voor deze ziekte. De aanwezigheid van dit Q-organisme vormt echter een potentieel gevaar voor de exportpositie van Nederlandse vruchtboomtelers en vruchtboomkwekers.

In het najaar van 2011 is bij PPO een onderzoek gestart naar verschillen in infectiekans bij het enten en oculeren van peren als ook onderzoek naar maatregelen om de infectiekans tijdens de vermeerdering door handmatig enten of oculeren te verminderen.

Belangrijke vragen binnen dit onderzoek waren:

- 1) Zijn er lokale verschillen in PDP-concentratie in ent- en oculatiehout waardoor specifieke delen van dit hout geselecteerd kunnen worden, die minimale risico's geven op PDP-infectie.
- 2) Is er een verschil in infectiekans tussen enten (met 'winterhout') of oculeren (met 'zomerhout')?

In enthout van appel kan fytoplasma worden bestreden door een warmwaterbehandeling van 45°C gedurende 2 uur (Van der Meer, 1981). Ook het toepassen van een tetracycline behandeling kan een dodende of onderdrukkende werking hebben op fytoplasma's (Chung en Choi, 2002). Binnen dit project is voor het gezond maken van PDP-besmet ent- en oculatiehout de effectiviteit van volgende beheersmaatregelen onderzocht,:

- 1) Het toepassen van een warmwater behandeling bij ent- en oculatiehout.
- 2) Het toepassen van een koudebehandeling bij ent- en oculatiehout.
- 3) Het toepassen van een tetracycline behandeling bij oculatiehout.

De werkwijze, resultaten en conclusies uit dit onderzoek staan beschreven in dit rapport.

2 Lokale verschillen in PDP-concentratie in ent- en oculatiehout

2.1 Inleiding

Fytoplasma komt voor in het floëem en bij uitzondering in parenchym cellen van planten (Firrao, 2004). De lokalisatie van het fytoplasma in het floëem is grillig (Bertaccini, 2009). Daarbij komt het vaak in lage concentraties voor in het weefsel (<1 % van het totale DNA). Overwintering van PDP in bovengronds gewas is moeizaam. Het is onbekend of dit het gevolg is van degeneratie van floëem weefsel tijdens de winter waardoor ook de cellen afsterven die door PDP zijn gekoloniseerd, of dat de PDP-afsterving wordt veroorzaakt door temperatuurgevoeligheid van PDP. Een combinatie van oorzaken is wellicht ook mogelijk. In dit onderdeel is onderzocht waar PDP zich in ent en oculatiehout bevindt. Het doel van dit onderzoek was driedig:

- 1) Bepalen of er lokale verschillen in PDP-concentratie in ent- en inoculatiehout zijn, waardoor voor vermeerdering specifieke delen van de boom geselecteerd kunnen worden, die minimale risico's geven op PDP-infectie bij enten.
- 2) Bepalen welke delen het beste materiaal opleveren om te gebruiken in de verschillende koude-, warmte- of antibiotica- behandelingen voor enten.
- 3) Bepalen of PDP aanwezig is in de wortels van perenbomen in de winter waardoor deze als reservoir kunnen dienen voor herbesmetting van bovengrondse delen van de boom in het voorjaar.

2.2 Materiaal en Methode

Van vier perenbomen op pot, waarin eerder een besmetting met PDP was vastgesteld en die in de dubbelwandige gaaskas op de PPO proeftuin te Lisse stonden, werd twijgmateriaal verzameld om te toetsen. Het ging hierbij om de cultivars OHxF40 (2x) en Conference (2x) geënt op een onderstam van respectievelijk Kwee Mc en *Pyrus communis*. Materiaal werd verzameld van:

- de wortels,
- onderste twijgen,
- middelste twijgen
- de bovenste twijgen van de boom.

Twijgen uit het midden en top van de boom werden daarbij verder opgedeeld in de onderste knoppen (knop 1 t/m 3), de middelste knoppen (knop 4 t/m 6) en de top van de twijg. Monsters werden genomen door de bast van het hout te strippen en in stukjes te snijden. DNA werd geïsoleerd met de Mag Plant kit of sbeadex plant kit (LGC). Bast stukjes werden 1:5 gemalen in een 2 ml Eppendorf tube in lysisbuffer PN1 voor 2 minuten met de Retsch MM400 (stand maximaal). Na het malen werden monsters geïncubeerd voor 15 minuten bij 65°C, 1200 rpm. Monsters werden afgedraaid voor 10 minuten bij 4000 rpm, waarna 50 µl werd gebruikt voor extractie van het DNA met de King Fischer. 2 µl van het DNA werd gebruikt in de PCR, waarbij monsters werden getoetst voor COX en fytoplasma. PCR-analyse van de concentratie COX-DNA in een monster geeft relatieve informatie over de concentratie en kwaliteit van DNA in het monster en de kwaliteit van de PCR-toets.

Tabel 1. Primers en probes gebruikt voor het toetsen van de perenmonsters op COX (Weller et al. 2000) en het fytoplasma P23 gen (Hodgetts et al. 2009).

Primer	Sequentie
COX-F	CGTCGCATTCCAGATTATCCA
COX-R	CAACTACGGATATATAAGAGCCAAAAGT
COX-P	VIC-TGCTTACGCTGGATGGAATGCCCT-TAMRA
P23 (Hodgetts)	
JHF all (10 µM)	ATTTCCGAATGGGGCAACC
JH-R (10 µM)	CTCGTCACTACTACCRGAATCGTTATTAC
JH-P uni (2,5 µM)	6FAMAAGTAAAATATCTAAGTAAC-MGB

Tabel 2. PCR condities, waaronder de monsters zijn getoetst

Activeringsstap	10' 95 °C	1x
Denaturatie	15" 95 °C	40 cycli
Annealing/extension	1' 60 °C	

Tabel 3. Samenstelling van de reactiemixen voor de PCR's

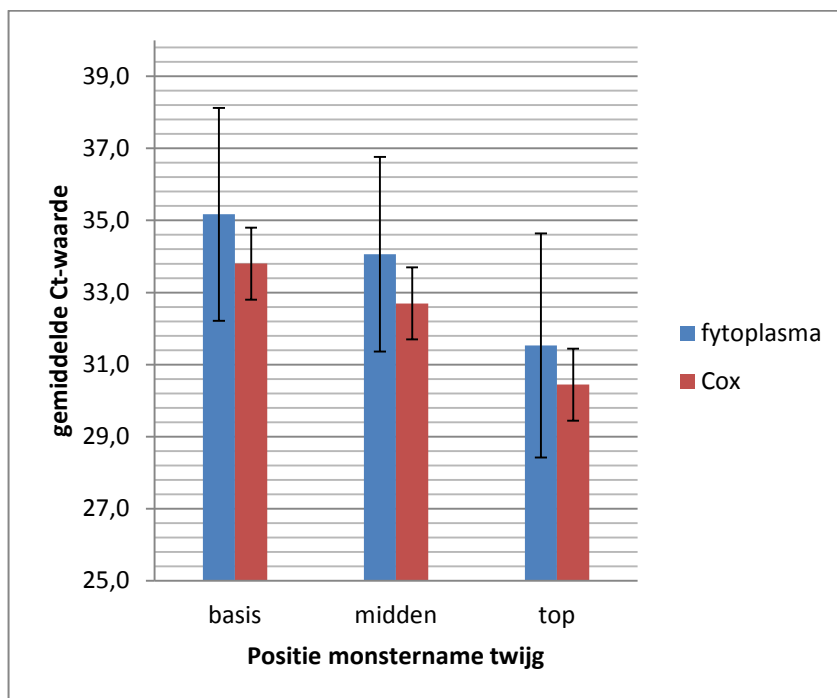
	Fytoplasma per reactie (µl)	cox per reactie (µl)	[eind]
DNase en RNase vrij water	6.875	7.625	-
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x, Applied Biosystems)	12,5	12,5	1x
JHF1 (10 µM)	0,75	-	0,3 µM
JHF all (10 µM)	0,75	-	0,3 µM
JH-R (10 µM)	0,75	-	0,3 µM
JH-P uni (2,5 µM)	1,0	-	0,1 µM
COX-F (10 µM)	-	0,75	0,3 µM
COX-R (10 µM)	-	0,75	0,3 µM
COX-P (2,5 µM)	-	1,0	0,1 µM
Rox 1/500	0.375	0.375	
Subtotaal	23,0	23,0	
Template 10 ⁰	2,0	2,0	
Totaal	25,0	25,0	

2.3 Resultaten en discussie

Met behulp van PCR werd het fytoplasma in de zijwortels en in de twijgen van de vier geteste bomen aangetoond. In twijgen onderin, middenin als ook bovenin de bomen werd het fytoplasma aangetoond. Het fytoplasma bevond zich zowel in de basis, het midden en de top van de twijgen. In de twijg werden in de top lagere Cq-waarden gemeten dan aan de basis of halverwege. Dit kan erop duiden dat de concentratie fytoplasma in de top hoger is dan in de rest van de twijg. Waarschijnlijker is echter, dat in de top minder stoffen aanwezig zijn die de PCR remmen. Dit doordat het hout hier jonger is dan aan de basis of halverwege de twijg. Dit wordt ondersteund door de eveneens lagere Cq-waarde die in de top voor Cox werd gevonden in verhouding tot het midden en de basis van de twijgen (Figuur 1, Tabel 4).

Tabel 4. Gemiddelde Cq waarde voor de verschillende twijg onderdelen.

positie twijg	toets	
	fytoplasma	Cox
basis	35.2	33.8
midden	34.1	32.7
top	31.5	30.4



Figuur 1. Gemiddelde Cq-waarde voor fytoplasma en cox in de verschillende delen van de twijg.

2.4 Conclusie

Uit de resultaten blijkt dat het fytoplasma in de vier geteste zieke bomen in alle delen van de twijg (basis, midden, top) als ook alle niveaus in de boom kon worden gedetecteerd. In principe kan dus elk onderdeel van de twijg gebruikt worden om een PDP infectie in enthout aan te tonen. De resultaten tonen echter ook dat het van een PDP-besmette boom lastig is gezond ent of oculatiehout te knippen. Bij gebruik van materiaal van de top van de twijgen wordt de PCR het minste geremd. Dit vergroot de detectiekans.

3 Maatregelen tegen PDP tijdens het enten en oculeren.

3.1 Inleiding - de maatregelen

In het project zijn drie behandelmethoden onderzocht:

- toepassing van een warmwater,
- een koude behandeling
- een tetracycline behandeling.

De behandelingen werden toegepast op twee verschillende momenten. In april in de periode dat in de praktijk wordt geënt en in augustus de periode dat wordt geoculeerd. De warmwater en koude behandeling zijn zowel met ent- als oculatiehout uitgevoerd. De tetracycline behandeling is alleen uitgevoerd met oculatiehout. De condities waaraan het oculatiehout tijdens de behandelingen werd blootgesteld, waren in vergelijking met het enthout milder. De knoppen van enthout zijn op het moment dat er wordt geënt in rust. Dit maakt ogen beter bestand tegen hoge temperaturen (> 40°C) en temperaturen onder het vriespunt. Dit in tegenstelling tot de knoppen van het oculatiehout, die groen en fysiologisch actief zijn en daardoor gevoeliger voor grote temperatuur schommelingen en extreme temperaturen.

3.2 Materialen en Methode

3.2.1 Enten en behandelingen tegen PDP

Voor het enten is in december 2011 enthout geknipt van 2- en 3-jarige perenbomen positief getoetst voor PDP in PCR (zie paragraaf 2.2 voor beschrijving van de PCR). Er was onvoldoende PDP-besmet enthout van één cultivar beschikbaar. Daarom was het enthout voor de behandelingen afkomstig van de perenrassen Charneux, Conference, Beurré Hardy, OHxF40 geënt op Kwee of *Pyrus communis* onderstammen. Het enthout werd tot april 2012 bij 2°C bewaard en kreeg daarna een koude of warmtebehandeling toegediend (Tabel 5). Twijgen werden niet gepooled, maar per moederboom (boom die de ent levert) apart behandeld zodat de resultaten uit de PCR uiteindelijk terug waren te traceren naar de oorspronkelijke moederboom.

Tabel 5. Overzicht van de toegepaste behandelingen

Behandeling	Temperatuur (°C)	Tijdsduur	Aantal enten
onbehandeld	n.v.t.	n.v.t.	50x Charneux; 50x Conference; gezond
wwb	45	60 minuten	100 x ziek
wwb	50	20 minuten	20 x ziek
kb	-5	2 dagen	100 x ziek

wwb = warmwaterbehandeling; kb = koude behandeling

De koude behandeling werd als volgt uitgevoerd. Twijgen (100 stuks) werden op 3 april 2012 van de 2°C voor zeven dagen in de -5°C geplaatst. Na zeven dagen werden de twijgen opnieuw voor één dag bij 2°C en vervolgens voor één dag bij 17-20°C gelegd. Op 12 april 2012 werd het hout geënt op onderstammen van *Pyrus communis*.

Voor de warmwaterbehandeling werden de twijgen op 10 april 2012 uit de 2°C gehaald en voor één dag bij 17- 20°C gelegd. Twijgen kregen vervolgens 1 uur 45 ° (100 enten) of 20 minuten 50°C (20 enten). De nawarmte bestond uit één dag 17- 20°C. Op 12 april werd aansluitend, het hout geënt op onderstammen van *Pyrus communis*.

De controle-behandeling bestond uit 50 enten van de perenrassen Conference en Charneux. De controle twijgen werden tot aan het enten bewaard bij 2°C en een dag voor het enten op de *Pyrus communis*

onderstammen bij 17-20°C gelegd.

Om bevriezen van de wortels in de winter te voorkomen zijn de potten in de winter van 2012-2013 afgedekt met bark en werden de bomen boven de grond beschermd met een vliesdoek.

In het vroege voorjaar van 2013 is de potgrond ververst en zijn de bomen overgeplant van 2 naar 5 liter potten.

3.2.2 Oculeren en behandelingen tegen PDP

Vooraf aan de oculatie is eind juli 2012 met stukjes twijg een kleinschalig experiment uitgevoerd om te bepalen bij welke temperaturen en incubatietijd de knoppen nog in staat waren uit te lopen. Hiervoor zijn van Conference bomen twijgen geknipt van jong hout die in stukjes werden geknipt van ongeveer 15 cm (3-4 ogen per stukje). Twijgen werden in water geplaatst en bij 17°C gezet. Gedurende vier weken werd het percentage twijgen dat uitliep bij geteld. Elke behandeling bestond uit drie herhalingen met per herhaling 4 stukjes twijg. Tabel 6 geeft de verschillende behandelingen uit het experiment weer.

Tabel 6. Overzicht van de temperatuur range in combinatie met de verschillende Tijdsduren gebruikt om de warmtetolerantie van oculatiehout te testen.

Behandel nr.	Beschrijving	Temperatuur (°C)	Tijdsduur
1	onbehandeld	20	60 minuten
2	wwb	39	60 minuten
3	wwb	41	60 minuten
13	wwb	43	30 minuten
4	wwb	43	60 minuten
14	wwb	45	30 minuten
5	wwb	45	60 minuten
19	wwb	47	15 minuten
15	wwb	47	30 minuten
6	wwb	47	60 minuten
30	kb	-1	1 dag
32	kb	-1	2 dagen
29	Kb	-2	1 dag
31	kb	-2	2 dagen

wwb = warmwaterbehandeling; kb = koude behandeling

Voor de uiteindelijke oculaties is in augustus 2012 oculatiehout geknipt van 2 en 3-jarige perenbomen positief getoetst voor PDP in PCR (zie paragraaf 2.2 voor beschrijving van de PCR). Het oculatiehout werd geknipt van Charneux, Conference, Beurré Hardy en OHxF40 bomen. Het gezonde oculatiehout betrof Conference. Het oculatiehout werd gepoold en vervolgens willekeurig verdeeld over de verschillende behandelingen.

Tabel 7 toont de verschillende behandelingen met het aantal oculaties dat per behandeling werd uitgevoerd.

Tabel 7. Het oculatieschema.

Behandel nr.	Beschrijving	Behandeling	Aantal oculaties
11	ziek - kb	1 dag -2°C	90
12	ziek - ww	30 minuten 39°C	90
13	ziek - Tetr 1	30 minuten 50 µg/ml	45
14	ziek - Tetr 2	30 minuten 100 µg/ml	45
15	ziek - onbehandeld	onbehandeld	90
16	gezond - KB	1 dag -2°C	22
17	gezond - WWB	30 minuten 39°C	22
18	gezond - Tetr 1	30 minuten 50 µg/ml	22
19	gezond - Tetr 2	30 minuten 100 µg/ml	22
20	gezond - onbehandeld	onbehandeld	22

kb = koude behandeling; ww = warmwaterbehandeling; Tetr = tetracycline behandeling (2 dosissen)

Voor de tetracycline behandeling werden de ogen van het oculatiehout voor 30 minuten in een oplossing met tetracycline hydrochlorine (Sigma-Aldrich T7660-5G) gelegd. Ogen werden vervolgens gedroogd met een tissue (Satino, 170547) en direct op de onderstam geoculeerd. Bomen stonden in potgrond op 2 L potten.

Om bevriezen van de wortels te voorkomen zijn de potten in de winter van 2012-2013 afgedekt met bark en werden de bomen boven de grond beschermd met een vliesdoek. Gezien het nog relatief kleine formaat van de bomen in het voorjaar van 2013 zijn deze niet overgeplant naar 5 L potten. In het vroege voorjaar van 2013 is de potgrond ververst en zijn de bomen overgeplant van 2 naar 5 liter potten.

3.2.3 Monsternamen en het toetsen van de bomen met PCR

De onbehandelde controle bomen zijn bemonsterd en getoetst in het najaar van 2012, een half jaar nadat de enten waren gemaakt. De geënte en geoculeerde bomen (incl. de controle behandeling) zijn aansluitend op 1 teeltseizoen naar het enten, resp. oculeren in september 2013 bemonsterd en getoetst voor PDP met PCR. Monsternamen vond in eerste instantie plaats door op 10 plekken verspreid over de boom met een pipetpuntje een klein stukje weefsel van de bast van de stam en twijgen te nemen samen met de bladnerf van drie bladeren. Deze monsternamenmethode bleek niet ideaal. Het merendeel van de monsters is vervolgens verzameld door op drie plaatsen op de boom met een scalpelmessje een dun plakje van de bast te snijden. Ook hier werd de bladnerf van 3 bladeren mee bemonsterd. Materiaal werd verzameld in een 96 wells plaat. Gezien het grote aantal bomen dat getoetst moest worden is de DNA extractie en PCR analyse van de monsters uitbesteed bij een extern routine toetslaboratorium. Het laboratorium heeft hiertoe de primers en protocollen aangeleverd gekregen zoals deze in dit rapport in Paragraaf 2.2 staan beschreven.

3.3 Resultaten en discussie

3.3.1 Pilot warmwaterbehandeling oculatiehout

De gevoeligheid van de twijgen met ogen voor temperatuursbehandeling is getest in een kleinschalig experiment. Twijgen werden hierbij getest in een temperatuur bereik lopend van 39°C tot en met 47°C. De tijd waarbij de twijgen werden blootgesteld aan de verschillende temperaturen werd gevarieerd. Tabel 8 toont de resultaten uit deze pilot met per behandeling het percentage overleving van de ogen van de twijgen. Dit is het percentage twijgen in een behandeling, waarvan de knoppen uitliepen.

Tabel 8. Overzicht percentage uitlopers tijdens de pilot waarbij oculatiehout werd getoetst voor haar warmtetolerantie.

Behandel nr.	Beschrijving	Temperatuur (°C)	Tijdsduur	% overleving
1	onbehandeld	20	60 minuten	100
2	wwb	39	60 minuten	75
3	wwb	41	60 minuten	25
4	wwb	43	30 minuten	41
5	wwb	43	60 minuten	25
6	wwb	45	30 minuten	0
7	wwb	45	60 minuten	0
8	wwb	47	15 minuten	0
9	wwb	47	30 minuten	0
10	wwb	47	60 minuten	0
11	kb	-1	1 dag	83
12	kb	-1	2 dagen	92
13	kb	-2	1 dag	100
14	kb	-2	2 dagen	83

kb = koude behandeling; wwb = warmwaterbehandeling.

Zoals uit Tabel 8 blijkt, zijn twijgen zeer gevoelig voor hogere temperaturen. Bij 1 uur 39°C (behandeling 2) liep reeds 25 % van de twijgen niet meer uit. Bij 1 uur 45°C (behandeling 10) liepen de twijgen in het geheel niet meer uit. Twijgen uit deze behandeling kleurden zwart. Twijgen uit de behandeling 6, 7 en 9 vertoonden na de behandeling zwarte necrotische plekken. Uitval van ogen door de behandeling vooraf aan het oculeren is voor de praktijk niet acceptabel. Om deze reden is ervoor gekozen de uiteindelijke warmwaterbehandeling van het oculatiehout uit te voeren bij 30 minuten 39°C.

De resultaten na de koude behandeling zijn niet eenduidig. 83% van de twijgen liep uit na 1 dag -1°C terwijl 100% van de twijgen uitliep bij 1 dag -2°C. Op basis van deze resultaten is besloten het oculatiehout voor de definitieve koude behandeling te behandelen bij de laagste temperatuur en langste incubatietijd waartegen de twijgen zijn getest in deze pilot door de twijgen twee dagen -2°C te geven.



Figuur 2. Voorbeeld van een twijg uit behandeling 1 - de onbehandelde controle (A) en behandeling 10 - 1 uur 47°C (B).

3.3.2 De enten – overleving en symptomen

Tabel 9 toont het aantal levende en dode entlingen in augustus 2013 uitgesplitst naar de verschillende behandelingen t.o.v. het oorspronkelijke aantal enten dat werd gemaakt.

Tabel 9. Weergave van de aantallen geënte bomen per behandeling en het aantal bomen dat in september 2013 is getoetst met PCR op een infectie met PDP.


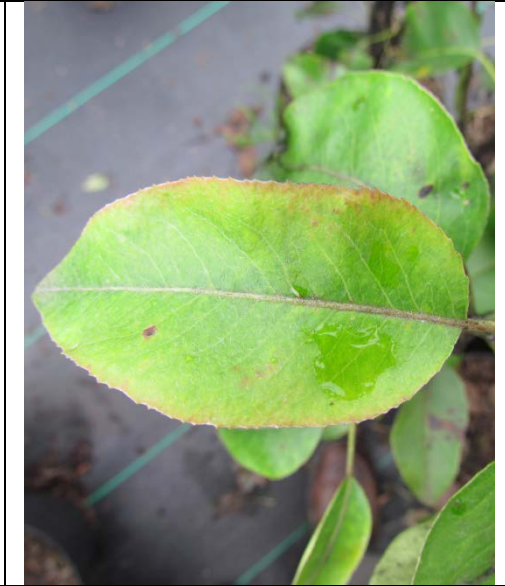


Behandeling	totaal aantal bomen	% levend	% uitval	aantal bomen getoetst in PCR	% getoetst
Ziek - WWB 45°C	98	84	16	74	90
Ziek - WWB 50°C	16	13	88	2	100
Ziek - KB -5°C	94	74	26	61	87
Ziek - onbehandeld	98	73	27	50	69
Gezond -Charneux	50	100	0	25	50
Gezond -Conference	50	86	12	25	58

De minste uitval kenden de gezonde controles Charneux en Conference met respectievelijk 0 en 12 % uitval. De warmwaterbehandeling met 45°C liet beperkte uitval zien. Met 16 % is dit percentage uitval vrijwel gelijk aan het percentage uitval van de onbehandelde gezonde Conference bomen. Een warmwaterbehandeling met 50°C is te veel voor de meeste entlingen. Veertien van de 16 bomen overleefden de behandeling niet. Dit is een uitval percentage van 88%.

De uitval voor de koude behandeling ligt met 26 % beduidend hoger en is nagenoeg gelijk met het percentage uitval bij de onbehandelde zieke controle (27 %). Deze aantallen in uitval waren reeds zichtbaar in de zomer van 2012, waarin een aantal jonge entlingen niet verder uitliepen en bladvorming achterwege bleef. Het aantal bomen dat uitviel is sinds de zomer van 2012 niet toegenomen. Met uitzondering van de enten die 50°C hebben gehad en waar de uitval grotendeels kan worden toegeschreven aan de toegepaste behandeling, is er geen duidelijk aanwijsbare reden voor de gevonden uitval percentage voor de overige behandelingen. Oorzaken kunnen liggen in natuurlijke uitval door het enten, de behandeling en aanwezigheid van PDP.

Tot en met de bemonstering in september 2013 zijn er geen duidelijke symptomen van PDP-infectie bij de bomen waargenomen. Een groot aantal bladeren in de top van de bomen kleurden wel deels rood (Figuur 3), maar deze roodverkleuring had vermoedelijk een fysiologische achtergrond. Met PCR werd in de betreffende bomen geen verband gevonden tussen deze roodverkleuring en de aanwezigheid van PDP.

De variatie in grootte en lengte van de entlingen was binnen de behandelingen groot (Figuur 3). Daarnaast kregen in september 2013 veel bomen last van roet door een uitbraak in de gaaskas van perenbladvlooien. Dit zal op het uiteindelijke toets resultaat geen tot weinig invloed hebben gehad.

	
<p>De drie standen van de entlingen</p>	<p>Fysiologische roodverkleuring van bladeren in de top van de bomen.</p>
	
<p>Entlingen met weinig en veel zijtakken.</p>	<p>Roet zoals deze bij diverse bomen was te zien als gevolg van de aanwezigheid van perenbladvlo in de gaaskas</p>

Figuur 3. Ontwikkeling enten september 2013.

3.3.3 De oculaties - overleving en symptomen

Tabel 10 toont het aantal levende en dode bomen in augustus 2013 na uitvoering van de oculatie met de verschillende behandelingen t.o.v. het oorspronkelijke aantal oculaties dat per behandeling werd uitgevoerd.

Tabel 10. Weergave van de aantallen levende geoculeerde bomen per behandeling, dat in september 2013 bemonsterd is en is getoetst middels PCR op een infectie met PDP.

Behandeling	totaal aantal bomen	% levend	% dood	aantal bomen getoetst in PCR	% getoetst
Ziek - KB	90	51	49	46	100
Ziek - WWB 39°C	90	49	51	44	95
Ziek - Tetr 1	45	38	62	17	100
Ziek - Tetr 2	43	42	58	18	100
Ziek - onbehandeld	90	61	39	48	82
Gezond - KB	25	40	60	10	100
Gezond - WWB	25	60	40	15	100
Gezond - Tetr 1	15	33	66	6	100
Gezond - Tetr 2	15	13	87	2	100
Gezond - onbehandeld	25	64	36	13	81

Het percentage uitval voor de verschillende behandelingen is relatief hoog. Het hoogste percentage overleving werd gevonden bij de onbehandelde zieke en gezonde controle, waar respectievelijk 61 en 64% van de ogen uitliepen. Een gedeelte van de uitval is dus veroorzaakt door natuurlijke afsterving van de ogen na oculatie. Het percentage uitval bij de gezonde controle, die een koude of tetracycline behandeling hebben gekregen was relatief hoog met respectievelijk 40 en 33 % overleving. Het percentage uitval voor tetracycline met gezond materiaal ligt hierbij aanzienlijk hoger dan het percentage uitval met ziek materiaal in de overeenkomstige behandelingen. Het is onduidelijk wat hiervan de oorzaak is.

De bomen zijn een jaar gevolgd. Gedurende deze periode vertoonden zich geen duidelijke visuele symptomen van PDP. Aangezien entlingen en geoculeerde bomen in dezelfde gaaskas stonden, hadden ook deze bomen last van roet door de sterke populatietoename in augustus 2013 van perenbladvlooien in de gaaskas.

3.3.4 Effecten van de diverse behandelingen op overleving PDP

De entlingen, waarvan de enten in april 2012 een koude of warmwaterbehandeling hadden ondergaan zijn in september 2013 bemonsterd en met PCR getoetst op aanwezigheid van PDP. Op hetzelfde moment zijn ook de bomen van de oculaties bemonsterd en getoetst. Gezien het grote aantal bomen dat moest worden getoetst, is dit uitbesteed bij een extern laboratorium die hiervoor de primers en protocollen heeft ontvangen zoals deze in gebruik zijn bij PPO in Lisse. Monsters werden getoetst voor PDP en COX. De uitslag van deze PCR toetsen staan in de Tabellen 11 en 12.

Tabel 11. Uitslag van de PCR toets op de jonge entlingen voor COX en PDP voor de verschillende behandelingen.

Behandeling	Aantal monsters COX negatief	Aantal montsers COX positief	gemiddelde Cq-waarde COX	Aantal monsters PDP negatief	Aantal monsters PDP positief
45°C	21	55	24.4	76	0
50°C	0	2	25.28	2	0
Ziek - KB -5°C	21	39	24.54	59	1
Ziek - onbehandeld	6	47	23.23	48	5
Gezond -Charneux	4	21	22.63	25	0
Gezond -Conference	2	23	23.42	25	0

[PDP = pear decline fytoplasma

Tabel 12. Uitslag van de PCR toets op de jonge oculaties voor Cox en PDP voor de verschillende behandelingen.

Behandeling	Aantal monsters COX negatief	Aantal montsers COXpositief	gemiddelde Cq-waarde COX	Aantal monsters PDP negatief	Aantal monsters PDP positief
Ziek - KB -2°C	8	38	23.87	43	3
Ziek – WWB 39°C	16	27	25.14	43	0
Ziek - Tetr 1	5	12	24.55	17	0
Ziek - Tetr 2	6	12	24.08	18	0
Ziek - onbehandeld	24	20	26.31	44	0
Gezond KB	2	8	25.47	10	0
Gezond WWB	3	12	25.46	15	0
Gezond Tetr 1	5	0	n.v.t.	5	0
Gezond Tetr 2	0	2	26.21	2	0
Gezond - onbehandeld	10	3	24.48	13	0

PDP = pear decline fytoplasma

Uit de PCR-analyse van september 2013 blijkt, dat slechts in een klein aantal bomen (9 stuks) fytoplasma werd aangetoond. Drie van de vijf enten uit de onbehandelde zieke controle waren ook positief in de PCR uit november 2012. Twee enten die in 2012 positief waren, waren nu echter negatief en *vice versa*. Een koude behandeling blijkt niet effectief. Fytoplasma werd aangetoond in hout van 1-jarige oculaties en entlingen dat een koude behandeling had gekregen. Er werd geen fytoplasma besmetting gevonden in bomen behandeld met warmwater en tetracycline. Een groot aantal monsters bleken in de PCR een negatieve uitslag te geven met de interne COX controle. Dit geldt voor 29,3 % van de getoetste monsters. De uitslag met COX had voor alle monsters positief moeten zijn. Blijkbaar is bij deze monsters de DNA-extractie onvoldoende effectief geweest en/of waren er te veel remmende stoffen in de PCR-reactie aanwezig. Dit heeft als consequentie, dat voor deze monsters de negatieve PDP uitslagen niet betrouwbaar zijn. Een negatieve uitslag voor PDP hoeft niet te duiden op afwezigheid van PDP in het monster.

3.4 Conclusie

De overdracht van PDP via geïnfecteerd ent en oculatiehout is beperkt tot een percentage rond de 10%. Een koude behandeling van PDP geïnfecteerd ent- en oculatiehout blijkt niet effectief in de bestrijding van fytoplasma vooraf aan het enten en oculeren. Na één jaar werd in bomen die een koude behandeling hadden gekregen met PCR fytoplasma aangetoond. De bomen, waarvan het ent- en oculatiehout was behandeld met warmwater of tetracycline bleven negatief in de PCR toets. Echter, een groot aantal van deze uitslagen uit de PCR toets was niet betrouwbaar vanwege de negatieve uitslag met Cox. Dit samen met het feit dat slechts vijf bomen uit de onbehandelde zieke controle positief waren in de toets maakt dat er geen eenduidige conclusie over de effectiviteit van deze behandelingen kan worden getrokken. Verdere optimalisatie van de PCR toets is nodig voor routinematige analyse op afwezigheid van PDP bij peer.

4 Algemene discussie en advies

Het verloop van een PDP infectie verloopt onvoorspelbaar. Dit blijkt o.a. uit de resultaten van dit onderzoek, waarbij bomen positief getoetst in het ene jaar, een jaar later negatief werden getoetst. Anderzijds kunnen bomen binnen een paar jaar volledig afsterven, zoals is gebeurd met een groot aantal moederbomen, dat is gebruikt voor het knippen van het PDP-zieke oculatie- en enthout.

Binnen dit onderzoek zijn geen aanwijzingen gevonden, dat het fytoplasma zich in de winter vanuit het bovengrondse bladerdek "terugtrekt" in de wortels van de boom. Fytoplasma werd in december 2011 zowel in de wortels als in de twijgen aangetoond. Opvallend hierbij was dat alle monsters, die bovengronds van zieke bomen zijn genomen positief waren in de toets. Zowel twijgen genomen van de lagere als hogere gedeelten van de boom bleken positief. Mogelijk dat hierin meespeelt dat de bomen in een afgesloten dubbelwandige gaaskas stonden, waar de temperatuur in verhouding met de buitenlucht buiten de kas minder daalt en bomen beter beschermd zijn tegen bijvoorbeeld de invloed van een koude oosten wind. Ook werd geen verschil gezien in aantasting van de twijgen. De basis van een twijg bleek evengoed geïnfecteerd met PDP als de top. Wel werd de PCR meer geremd met materiaal dat direct van de basis was gesneden dan met materiaal afkomstig van de top van de twijg.

Voor wat betreft de behandelingen die aan het ent en oculatie hout vooraf aan het enten en oculeren zijn gegeven, blijkt een koude behandeling zoals deze binnen dit onderzoek is toegepast niet effectief voor de afdoding van PDP. Een aantal bomen die een koude behandeling hadden ondergaan bleken nog steeds besmet te zijn op basis van de PCR toets voor PDP. Een positief effect door een warmwater of tetracycline behandeling kan niet worden uitgesloten. Alle bomen getoetst in de PCR voor PDP bleken negatief. Echter het aantal bomen dat uiteindelijk betrouwbaar op PDP kon worden getoetst was te klein t.o.v. het aantal positief getoetste bomen uit de zieke onbehandelde controle om aan de effectiviteit van deze behandelingen een conclusie te kunnen verbinden.

De positief getoetste entingen uit de onbehandelde zieke controle behandeling waren terug te voeren op vijf moederbomen, waarvan één moederboom maar liefst drie zieke entingen opleverde. Al met al bedroeg het percentage zieke bomen van de zieke onbehandelde controle dat positief werd getoetst bij de enten 10 % van het totale aantal getoetste bomen. Voor de oculaties was dit nul %. Het percentage van 10 % efficiëntie van fytoplasma-infectie bij enten van geïnfecteerd materiaal is vergelijkbaar met de 15 % die ooit op basis van een kleinschalig experiment door Naktuinbouw werd vastgesteld (mondelijke mededeling, Ellis Meekes). De kans op het overbrengen van een PDP besmetting bij enten door middel van besmette enten is dus aanzienlijk. Of hierbij het risico op het overbrengen van een PDP-infectie kleiner is door te vermeerderen via oculatie dan via enten is niet waarschijnlijk. Hoewel geen zieke bomen werden gevonden na oculatie in de zieke onbehandelde controle was het percentage zieke bomen in de koude behandeling 7%. Op basis van dit resultaat lijkt het risico op verspreiding van PDP via enten of oculeren redelijk vergelijkbaar te zijn. Hierbij kan bovendien niet worden uitgesloten, dat een deel van het ent- en oculatiehout afkomstig van een zieke moederboom het fytoplasma niet bij zich droeg. Hoewel fytoplasma in dit onderzoek homogeen bleek voor te komen in het bemonsterde materiaal, hebben andere studies laten zien dat de lokalisatie van PDP in een boom vaak grillig is. Het percentage van 7 en 10 % kan dus een onderschatting zijn.

Voor het routinematig testen van bomen op een PDP-infectie blijkt verdere optimalisatie van de PCR toets noodzakelijk. Dit blijkt uit het relatief hoge percentage monsters (29,3%) waarbij in de PCR geen COX signaal werd waargenomen. Bij kleinschalige analyse op COX en PDP in het laboratorium van PPO wordt doorgaans bij 100% van de monsters een positief COX-signaal verkregen. Overdracht van de PCR-methode van een diagnostisch lab naar een routine lab is blijkaar niet eenvoudig. Ondanks dat er veel aandacht aan overdracht van de methode besteed is, konden binnen dit project geen betere resultaten vanuit het routine lab verkregen worden.

Er zijn uit dit onderzoek helaas geen eenduidige conclusies te trekken over het gebruik van een warmwaterbehandeling in het voorkomen van PDP infectie tijdens enten of oculeren. Voor wat betreft de tetracycline behandeling. Deze kende veel uitval. Mocht een tetracycline behandeling effectief zijn geweest, dan is het belangrijk de toepassing van deze methode te stroomlijnen met de wet- en regelgeving m.b.t. dit type antibiotica voor dergelijke toepassingen.

Voor kwekers geldt op basis van de bovenstaande resultaten het volgende advies:

- Gebruik geen met PDP-geïnfecteerd oculatie- of enthout.
- Laat op het oog verdacht hout met PCR toetsen op de afwezigheid van fytoplasma of gebruik hout van deze bomen uit voorzorg niet als ent of oculatiehout.
- Gebruik bij monsternamen bij een extern laboratorium voor de PCR toets vooral het jong bastmateriaal van de toppen van de twijgen als ook de nerven van verdachte bladeren. Bemonster niet de bladschijf of basis van twijgen aangezien inhoudstoffen uit deze delen de PCR reactie remmen.

5 Literatuur

Betaccini A., Duduk B., (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia mediterranea*, 48: 355-378.

Chung B., N. (2002). Elimination of Aster Yellows Phytoplasma from *Dendranthema grandiflorum* by application of oxytetracycline as a foliar spray. *Plant Pathology Journal*, 18 (2): 93-97.

Firrao G. (2004). 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 54: 1243-1255.

Hodgetts J., Boonham N., Mumford R., Dickinson M. (2009). Panel of 23 S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (9): 2245-2950

Van der Meer F. A. (1981). Mozaiekvirus, heksenbezem en knobbeziekte bij populier, en een virusachtige groeiremming bij wilg. *Populier* 18: 51-59.

Weller S. A., Elphinstone J. G., Smith N. C., Boonham N., Stead D. E., (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (7): 2853-2858