

Xanthomonas-verwelkingsziekte in *Pelargonium*: ontrafeling van infecties




nak  tuinbouw

Productschap  Tuinbouw

April 2013
E.T.M. Meekes, M. Hooftman,
B. Koenen, C. Gazenbeek,
H.A.S. Teunissen, J. Westerhof

Xanthomonas-verwelkingsziekte in *Pelargonium*: ontrafeling van infecties

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

Opdrachtgever: Bedrijfsleven / Naktuinbouw Keuringen

Gefinancierd door: Productschap Tuinbouw

Uitgevoerd door: Naktuinbouw

Looptijd: april 2012 tot en met april 2013

COLOFON

Auteurs: E.T.M. Meekes
M. Hooftman
B. Koenen
C. Gazenbeek
H.A.S. Teunissen
J. Westerhof

Adres: Naktuinbouw
Sotaweg 22
2371 GD Roelofarendsveen
Tel: 071-2236262
e.meekes@naktuinbouw.nl
info@naktuinbouw.nl
www.naktuinbouw.nl

Titel rapport: Xanthomonas-verwelkingsziekte in *Pelargonium*: ontrafeling van infecties

Kernwoorden: Xanthomonas hortorum pv. pelargonii, Xanthomonas campestris, *Pelargonium peltatum*, *Pelargonium zonale*,

Voorpagina: *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, afwijkend symptoom in 2009-2010.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm, elektronisch of op geluidsband of op welke andere wijze ook en evenmin in een retrieval systeem worden opgeslagen zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de opdrachtgevers.

Samenvatting

De bacterie *Xanthomonas hortorum* pv. *perlargonii*, hier Xanthomonas-verwelkingsziekte genoemd, is een zeer lastige ziekte in Pelargonium en in mindere mate in Geranium. In seizoen 2009-2010 was er een grote Xanthomonas uitbraak in Europa. Uit voorgaand onderzoek bleek dat het hier om drie verschillende besmettingen ging. Verder kwam naar voren dat de genetische variatie en variatie in agressiviteit groot was. Hierdoor ontstond twijfel of een oud stukje stengel bij bemonstering nog voldoet voor vroegtijdige detectie van deze ziekte.

In dit onderzoek zijn een twaalfstal Xanthomonas isolaten uit 1988 t/m 2010 met elkaar vergeleken in een zomer- en een winterexperiment met extra aandacht voor isolaten uit 2009-2010. Planten zijn destructief bemonsterd om na te gaan hoe snel de bacterie zich door de plant verspreidde. Het infectieverloop is vastgelegd met foto's.

De isolaten kunnen in drie groepen verdeeld worden. Groep 1 is agressief. Deze groep isolaten zal zich in de zomer en in de winter snel door de hele plant verspreiden. De planten zullen snel symptomen vertonen en afsterven. Telers zullen de ziekte snel herkennen en de gewenste maatregelen kunnen nemen.

Groep 2 is een intermediaire groep: in de zomer worden snel symptomen zichtbaar, vergelijkbaar met de agressieve groep isolaten. In de winter verloopt de infectie veel trager en verspreid de bacterie zich minder makkelijk door de plant: vergelijkbaar met de milde groep. De intermediaire isolaten kunnen gedurende de winterperiode aan de aandacht ontsnappen.

Groep 3 is mild: in de zomer zijn milde symptomen waargenomen, maar de planten sterven niet volledig af. In de winter werden er visueel nauwelijks symptomen waargenomen. In deze groep wordt ook vaker een afwijkende symptoom waargenomen, namelijk vlekkerigheid van het blad. Deze isolaten zijn zelfs in de winter wel regelmatig terug te vinden onderin de plant en dus tijdens teelthandelingen makkelijk te verspreiden.

Bestrijding van Xanthomonas-verwelkingsziekte is niet mogelijk, voorkomen is de enige optie. Regelmatig toetsen van uitgangsmateriaal is belangrijk, zeker bij materiaal dat nieuw in het bestand komt. Het beste monster is en blijft een stengeldeel onderuit de plant. Bij het ontstaan van bladvlekken, die niet verklaard kunnen worden door teeltomstandigheden, is het verstandig om ook het blad te toetsen. Denk hierbij ook aan de mogelijke aanwezigheid van Xanthomonas-bladvlekkenziekte (*X. campestris*, zie hieronder). Bacteriën worden door spatten van water verspreid, onderlangs watergeven of met druppelaars zal de verspreiding van bacteriën remmen.

Xanthomonas campestris

Er is in Pelargonium een tweede Xanthomonas soort ontdekt: *Xanthomonas campestris*. Deze bacterie veroorzaakt bladvlekken. In dit onderzoek werd aangetoond dat de bacterie zich niet verspreid binnen de plant en niet met de gebruikelijke methoden voor detectie Xanthomonas-verwelkingsziekte kan worden aangetoond. Deze ziekte kan behoorlijke schade veroorzaken, maar komt – voor zover nu bekend – nog niet in Nederland voor. Het belang van deze ziekte zal in het komend jaar duidelijk worden. De manier van water geven en de gehanteerde teeltemperatuur heeft vermoedelijk veel invloed op de symptoomontwikkeling. Bij de bladvlekkenziekte heeft het geen zin om routinematig stengeldelen te toetsen, de bacterie wordt niet systemisch. De bacterie kan wel aangetoond worden in de bladschijf, maar men zal andere toetsmethoden moeten inzetten.

Inhoudsopgave

1. Inleiding	5
2. Selectie <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> isolaten	6
2.1 Inleiding	6
2.2 Methoden	7
2.3 Resultaten, discussie & keuze isolaten	7
3. Infectieverloop verwelkingsziekte <i>X. hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i>	9
3.1 Inleiding	9
3.2 Opzet infectie-experimenten	9
3.3 Resultaten infectie-experimenten	10
4.4 Discussie	27
4. <i>Xanthomonas campestris</i> in <i>Pelargonium</i> : bladvlekkenziekte	29
4.1 Inleiding	29
4.2 Infectie-experimenten	30
4.3 Detectie	31
4.4 Discussie	32
5. Opmerkingen tot slot	33
6. Referenties	33
Bijlagen B1 t/m B12	

1. Inleiding

De bacterie *Xanthomonas hortorum* pv. *perlargonii* (voorheen *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*), ook Xanthomonas-verwelkingsziekte genoemd, is een zeer lastige ziekte in *Pelargonium* en in mindere mate in *Geranium*. De ziekte wordt heel gemakkelijk verspreid. De bacteriën infecteren planten via wonden of direct via het blad door spatverspreiding. Van daaruit groeien ze snel naar de vaatbundels en komen dan via het vaatstelsel in de hele plant. Hierdoor raken de vaatbundels verstopt met als gevolg een verstoord watertransport, groeiachterstand en snel daarna verwelking als de planten veel verdampen. Bij lage temperaturen vermeerderen de bacteriën zich langzaam en duurt het lang voordat ziekteverschijnselen zichtbaar worden. Tijdens deze latente periode vindt echter wel verspreiding tussen planten plaats. Op het moment dat gewassymptomen zichtbaar worden is het vaak al te laat om nog in te grijpen. Ruimen van het gewas is dan de enige optie. In meerdere *Pelargonium*-soorten en -rassen is de ziekte moeilijk te herkennen. Bemonstering van symptoomloos materiaal is dé methode om de ziekte tijdig te detecteren.

In het teeltseizoen 2009-2010 zijn meerdere Nederlandse telers getroffen door Xanthomonas-verwelkingsziekte. Na zonnig en warm weer in de eerste weken van maart – en dus temperatuursverhoging in de kas – ontstonden geen symptomen. Er waren wel kleine necrotische vlekjes op het blad zichtbaar, maar de plant leek verder nog volledig vitaal. Op een teeltbedrijf is wel vaker een necrotisch blaadje te zien, dus werd niet direct de vraag gesteld of er iets aan de hand was. Pas in de tweede helft van april tot ver in mei werden de voor Xanthomonas kenmerkende symptomen zichtbaar en leek de ziekte steeds mee om zich heen te grijpen. Door de late herkenning van het probleem heeft de ziekte zich veel verder in de keten kunnen verspreiden dan anders het geval was.

Later, na toetsing, bleek dat in de necrotische vlekjes Xanthomonas aanwezig was. In meerdere gevallen kon de bacterie langere tijd niet in de vaatbundels worden aangetoond. Verder bleek dat er in 2009-2010 drie verschillende infecties te hadden plaatsgevonden (Teunissen *et al.*, 2010), die een verschillend ziekteverloop te zien gaven (Meekes *et al.*, 2011).

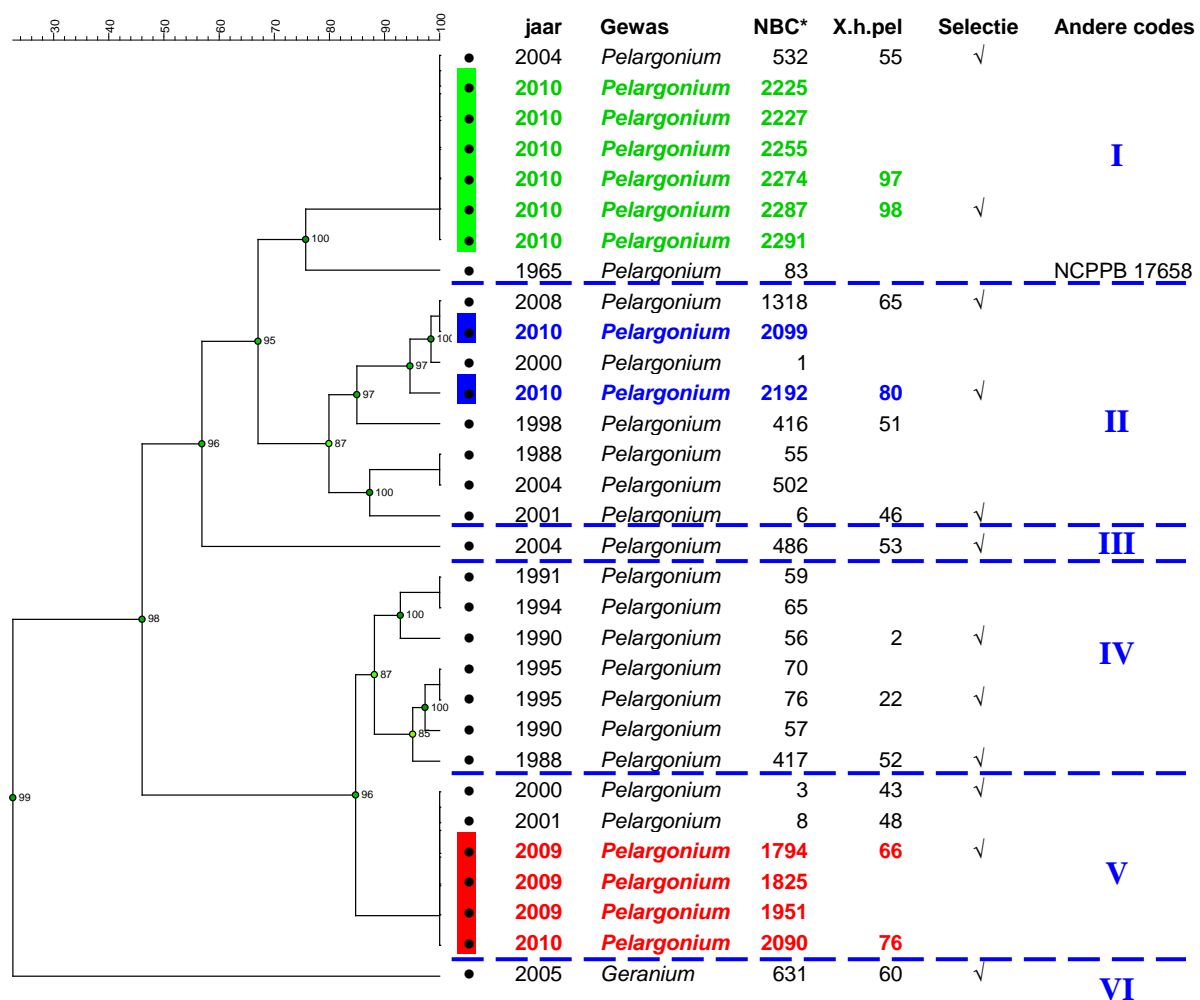
Dergelijke sluimerende infecties vormen een zeer groot risico voor de vermeerdering en de teelt van *Pelargonium*, omdat verspreiding van de bacterie zich makkelijk aan het oog van de scout onttrekt. Daarom is meer kennis over de symptoomontwikkeling in verschillende seizoenen en teeltomstandigheden gewenst. Daarnaast zal informatie over verspreiding van dergelijke bacterie-infecties in de plant een antwoord kunnen geven op de vraag welk gedeelte van de plant bemonsterd en getoetst moet worden om besmetting met Xanthomonas zoveel mogelijk uit te sluiten of in een vroeg stadium te ontdekken. Koppeling van symptoomontwikkeling en infectieverloop aan de genetische achtergrond van isolaten helpt om de risico's voor de toekomst beter in kaart te kunnen brengen.

Binnen dit project wordt het infectieverloop van isolaten met overeenkomstige en verschillende genetische achtergrond gevolgd onder verschillende klimatologische omstandigheden. Waarom is dit van belang? De ervaring met Xanthomonas in 2010 heeft ons geleerd dat scouting in een gewas waar een afwijkende ziekteverloop plaatsvindt veel intensiever moet zijn dan bij een bekend ziekteverloop. Tijdig herkennen van ziektebeelden en direct nemen van maatregelen is hierbij van belang. Verder zal dit project extra handvatten voor monsternamen opleveren, zodat door middel van juiste monsternamen gevolgd door toetsing een (latente) infectie met Xanthomonas zoveel mogelijk uitgesloten kan worden.

2. Selectie *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* isolaten

2.1 Inleiding

Naktuinbouw heeft een grote collectie isolaten van *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (april 2012: 130 X.h.pel. isolaten). In voorgaand onderzoek is al informatie verzameld over de verschillende *Xanthomonas* isolaten. Door onderzoek van Teunissen *et al.* (2010) is gebleken dat in het seizoen 2009-2010 in Europa geen twee maar drie verschillende *Xanthomonas* uitbraken zijn geweest (figuur 1). Uit deze drie groepen is in de winter van 2010-2011 één isolaat gekozen voor infectieproeven (Meekes *et al.*, 2011). Hieruit bleek dat verschillen groot waren (figuur 2): 1 isolaat was agressief, 2 isolaten waren mild. In dit hoofdstuk wordt de beschikbare informatie samengevoegd met nieuwe informatie. Op basis van de totale informatie worden 12 isolaten geselecteerd voor de infectie-experimenten.



Figuur 1. Dendrogram (gebaseerd op 266 merkers) dat de genetische verwantschap/diversiteit tussen de isolaten schematisch weergeeft. Voor de berekening is er gebruik gemaakt van de 'Jaccard' similariteitscoëfficiënt en clusteranalyse m.b.v. UPGMA parameters (Teunissen *et al.*, 2010); methode gebaseerd op Vos *et al.* (1996). Kleuren geven de isolaten weer die in het seizoen 2009-2010 een rol gespeeld hebben bij besmettingen in Europa. De met ✓ gemerkte isolaten zijn ook gebruikt voor dit onderzoek.

*NBC = Naktuinbouw Bacterial Collection, X.h.pel. = nummering *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* NBC subcollectie.



Figuur 2. Resultaten pilot-experiment (november 2010-februari 2011). Negen weken na inoculatie waren de planten met *X.h.pel.* 65 (NBC 1318) afgestorven, terwijl planten geïnoculeerd met *X.h.pel.* 66 (NBC 1794) en *X.h.pel.* 98 (NBC 2287) nog groen waren.

2.2. Methoden

In de periode 2010 - 2012 zijn er relatief weinig nieuwe isolaten aan de collectie toegevoegd, daarom is besloten om met technieken als ERIC-BOX PCR (Versalovic *et al.*, 1994) en Gyrase B sequentieanalyse (Parkinson *et al.*, 2009) de nieuwe isolaten te vergelijken met de isolaten die al in de collectie aanwezig waren. In deze analyse zijn 20 *X.h.pel.* isolaten meegenomen, waarbij beperkt oude isolaten (< 2000) zijn meegenomen. In 2000 zijn de NBC bacterie-isolaten namelijk overgezet naar opslag bij -80 °C. Isolaten van voor 2000 kunnen verminderd pathogeen zijn door de lange opslag onder minder stabiele omstandigheden.

2.3. Resultaten, discussie & keuze isolaten

In tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de 20 isolaten die in deze analyse zijn meegenomen. Binnen de infectie-experimenten is slechts ruimte voor 12 isolaten. Deze 12 isolaten zijn geselecteerd op basis van figuur 1, figuur 2 en tabel 1. Daarnaast is geprobeerd om het aantal isolaten van voor 2000 te beperken.

Bij de keuze van isolaten heeft figuur 1 een belangrijke rol gespeeld. De isolaten zijn in figuur 1 onderverdeeld in clusters. Uit de clusters groen, blauw en rood zijn 2 isolaten gekozen: 1 isolaat uit de 2009-2010 epidemie en 1 ouder isolaat. Verder zijn afhankelijk van de variatie 1 of meerdere isolaten uit de andere clusters gekozen.

De genetische variatie is in beeld gebracht door gegevens in figuur 1 en ERIC-BOX PCR patronen (tabel 1) komen redelijk goed overeen. Isolaten die identiek zijn in figuur 1 geven een identiek ERIC-BOX patroon. Zodra er meer verschillen binnen de clusters in figuur 1 optreedt, zijn deze meestal ook terug te vinden in de ERIC-BOX patronen, alleen isolaat 46 vormt hier een uitzondering op.

De andere isolaten uit 2010 (*X.h.pel.* 79 & 91) en de nieuwe isolaten uit 2011 (*X.h.pel.* 112 en 119) wijken op basis van de ERIC-BOX patronen niet af van de isolaten die in figuur 1 zijn meegenomen. Deze isolaten komen overeen met isolaten uit cluster I (isolaat 79) of cluster II (isolaat 91, 112, 119). Er is daarom gekozen voor isolaten waar al meer gegevens over bekend zijn.

Tabel 1. Genetisch profiel van 20 isolaten van *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* m.b.v. ERIC-BOX PCR, GyrB analyse en DNA profiel opgedeeld in 6 clusters.

X.h.pel.	NBC ¹	jaar	Gewas	DNA cluster ²	ERIC-BOX ³	GyrB	Path. ⁴	Selectie
2	56	1990	<i>Pelargonium</i>	IV	A-A 1	1	n.g.	√
22	76	1995	<i>Pelargonium</i>	IV	A-B 2	1	n.g.	√
43	3	2000	<i>Pelargonium</i>	V	B-C 3	1	n.g.	√
46	6	2001	<i>Pelargonium</i>	II	B-B 4	1	n.g.	√
48	8	2001	<i>Pelargonium</i>	V	B-C 3	1	n.g.	-
51	416	1998	<i>Pelargonium</i>	II	C-B 5	1	n.g.	-
52	417	1988	<i>Pelargonium</i>	IV	A-B 2	1	n.g.	√
53	486	2004	<i>Pelargonium</i>	III	B-D 6	1	n.g.	√
55	532	2004	<i>Pelargonium</i>	I	B-B 4	1	n.g.	√
60	631	2005	<i>Geranium</i>	VI	D-E 7	2	n.g.	√
65	1318	2008	<i>Pelargonium</i>	II	C-F 8	1	+++	√
66	1794	2009	<i>Pelargonium</i>	V	B-C 3	1	+	√
76	2090	2010	<i>Pelargonium</i>	V	B-C 3	1	n.g.	-
79	2099	2010	<i>Pelargonium</i>	-	C-F(G) 8 (9)	1	n.g.	-
80	2192	2010	<i>Pelargonium</i>	II	C-B 5	1	n.g.	√
91	2254	2010	<i>Pelargonium</i>	-	B-B 4	1	n.g.	-
97	2274	2010	<i>Pelargonium</i>	I	B-B 4	1	n.g.	-
98	2287	2010	<i>Pelargonium</i>	I	B-B 4	1	+	√
112	2852	2011	<i>Pelargonium</i>	-	B-B 4	1	n.g.	-
119	2866	2011	<i>Pelargonium</i>	-	C-B 5	1	n.g.	-

¹ NBC = Naktuinbouw Bacterial Collection; ² Clusters uit figuur 1; ³ ERIC patroon: 4 patronen geletterd van A t/m D, BOX patroon: 6 (7) patronen geletterd van A t/m F(G), de combinatie ERIC-BOX levert 8 (9) verschillende groepen op, waarbij isolaat 79 nagenoeg identiek is aan isolaat 65 op 1 vaag bandje in de BOX-PCR na;

⁴ Isolaten figuur 2, infectieproef 2010-2011: +++ = agressief, + = mild, n.g. = niet getoetst.

De uiteindelijke keuze:

- Cluster I: 2009-2010 epidemie, X.h.pel. **55** (2004) & X.h.pel. **98** (2010; figuur 2, groene cluster);
- Cluster II: 2009-2010 epidemie, X.h.pel. **65** (2008, figuur 2) & X.h.pel. **80** (2010, blauwe cluster). Verder is uit dit cluster ook X.h.pel. **46** gekozen: de ERIC-BOX patronen wijken af van X.h.pel. 65 en 80.
- Cluster III: X.h.pel. **53**, wijkt ook af met ERIC-BOX PCR;
- Cluster IV: redelijk variabel, hieruit zijn 3 isolaten gekozen;
 - X.h.pel. **2** was gekoppeld aan een grote uitbraak in 1990;
 - X.h.pel. **22** en **52**: deze isolaten hebben een ander ERIC-BOX patroon dan X.h.pel. 2, in figuur 1 zijn X.h.pel. 22 en 52 enigszins verschillend;
- Cluster V: 2009-2010 epidemie, X.h.pel. **43** (2000) & X.h.pel. **66** (2009, figuur 2, rode cluster).
- Cluster VI: 1 isolaat (X.h.pel. **60**) dat op alle eigenschappen afwijkt en afkomstig is uit *Geranium* sp. (oievaarsbek).

3. Infectieverloop verwelkingsziekte *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*

3.1 Inleiding

Het infectieverloop van de 12 X.h.pel. isolaten is gevolgd in twee seizoenen: de voorjaar/zomer en in de herfst/winter. Dat isolaten een totaal verschillend ziekteverloop kunnen hebben bleek al in een pilot-experiment dat in de winter van 2010-2011 is uitgevoerd met isolaat X.h.pel. 65, 66 en 98. De verwachting was dat isolaat 65 en 66 een normaal verloop zouden laten zien en isolaat 98 een mild verloop. Onder "normaal" ziekteverloop wordt een snelle afsterving verstaan: planten sterven af binnen 2 tot 3 weken na infectie. Uit dit pilot-experiment bleek al dat het infectieproces toch wat ingewikkelder in elkaar zat, niet alleen X.h.pel. 98 bleek mild ziekteverloop te geven, ook X.h.pel. 66 was mild.

3.2 Opzet infectie-experimenten

Voorjaar- zomer experiment

Het ziekteverloop is in twee soorten *Pelargonium* gevolgd: *Pelargonium zonale* 'Summer idols red' en *P. peltatum* 'Balkon roze'. Voor de voorjaars-/zomertoets werd eind mei 2012 door 2 bedrijven pas bewortelde stek geleverd. Deze planten hebben 2 à 3 weken kunnen acclimatiseren voordat inoculatie plaatsvond (13 juni, 2012). De kasttemperatuur was ingesteld op 20 °C continu met luchting bij 25 °C. De gerealiseerde gemiddelde temperatuur bedroeg tijdens het voorjaars/zomer experiment 22,1° C, tijdens het najaar/winter experiment 20,1° C. Het verschil in temperatuur tussen de twee experimenten is vooral het gevolg van een hogere dagtemperatuur in het voorjaars/zomer experiment. Er werd niet geschermd en niet belicht.

Om verspreiding via de wortels en door spatverspreiding te voorkomen zijn de planten op schotels geplaatst en is handmatig watergegeven op de schotels. Er is geen trips bestrijding uitgevoerd, bespuitingen zouden leiden tot verspreiding van bacteriën. Wel zijn – zover mogelijk – de bloemen uit de planten verwijderd waarbij per bloemsteel werd gedesinfecteerd.

Herfst – winter experiment

Het ziekteverloop is ook in de winterproef gevolgd in twee soorten *Pelargonium*: *P. zonale* 'Summer idols true red' en *P. peltatum* 'Balkon roze'. Voor de winterproef werd midden oktober 2012 door 2 bedrijven pas bewortelde stek geleverd. Deze planten hebben 3 à 4 weken kunnen acclimatiseren voordat inoculatie plaatsvond (6 november, 2012). De temperatuurinstellingen waren gelijk aan de zomerproef evenals de watergift. De tripsbestrijding is uitgevoerd m.b.v. natuurlijke vijanden, er is gedurende de hele proef geen trips op de vangplaten of in de bloemen waargenomen.



Figuur 3. Inoculeren van *Xanthomonas* isolaten.

Inoculatie bacterie

De inoculatie met 12 verschillende isolaten is uitgevoerd op 13 juni 2012 (zomerproef) en 6 november 2012 (winterproef). Per isolaat zijn 16 planten *P. zonale* en *P. peltatum* geïnoculeerd. De planten zijn

verdeeld over 2 veldjes: per veldje stonden 8 planten *P. zonale* en 8 planten *P. peltatum*. Per plant is 1 blad aangeprikt (figuur 3). Dit blad betrof het derde volledig ontwikkelde blad vanaf de basis van de plant. Elk blad is 2x aangeprikt met een injectienaald en er is een druppeltje bacteriesuspensie op het blad gelegd. De bacterieconcentratie voor elk isolaat is ingesteld op 1×10^8 cellen/ml (bepaald m.b.v. Nanodrop).

Destructieve bemonstering

Op verschillende momenten na inoculatie zijn per isolaat, per herhaling 2 planten *P. zonale* en 2 planten *P. peltatum* destructief bemonsterd. Hierbij werden per plant twee of drie monsters genomen: één monster aan de basis van de geïnoculeerde stengel, één monsters aan de top van deze stengel, en – indien aanwezig – een monster van de (niet geïnoculeerde) zijscheut (tabel 2).

Deze monsters werden vermalen in buffer en uitgeplaat op een groeimedium. Na 3 à 4 dagen is het groeimedium beoordeeld op bacteriegroei en werd het aantal bacteriën globaal geteld. Indien er getwijfeld werd aan de identiteit van de bacterie, werd alsnog een PCR uitgevoerd (gebaseerd op Van der Wolf *et al.*, 1996).

Tabel 2. Overzicht van de destructieve bemonstering zoals deze is uitgevoerd tijdens de zomer- en winterproef.

Seizoen	Plant	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17
Zomer	<i>P. peltatum</i>	2 x 2 planten	2 x 2 planten	2 planten	-
	<i>P. zonale</i>	2 x 2 planten	2 x 2 planten	-	-
Winter	<i>P. peltatum</i>	2 x 2 planten	2 x 2 planten	2 planten	Alle nog levende planten
	<i>P. zonale</i>	2 x 2 planten	2 x 2 planten	2 planten	Alle nog levende planten

Symptoomontwikkeling

Op gezette tijden zijn foto's genomen van de symptoomontwikkeling.

3.3 Resultaten infectie-experimenten

Destructieve bemonstering

Zomerproef

Binnen 1 week na inoculatie waren 11 isolaten al terug te vinden in de stengelbasis van twee of meer planten (tabel 3A); dit gold niet voor isolaat 2. Op het moment van bemonstering waren nog geen symptomen zichtbaar. *Xanthomonas* werd nog niet/nauwelijks teruggevonden in de top van de geïnoculeerde stengel of in de zijscheut (tabel 3B en 3C). Na één week zijn gemiddeld 40% van de planten geïnfecteerd aan de basis.

Twee weken na inoculatie was in nagenoeg alle bemonsterde planten *Xanthomonas* terug te vinden. Isolaat 2 werd wel teruggevonden in de basis van de plant (3 van de 8 planten), maar nog niet in de top van de geïnoculeerde stengel of de zijscheut. De andere isolaten zijn 2 weken na inoculatie al wel terug te vinden in de top van de geïnoculeerde stengel en soms ook al in de zijscheut. Na twee weken zijn gemiddeld 90% van de planten geïnfecteerd aan de basis van de plant.

Drie weken na inoculatie wordt het algemene beeld bevestigd door bemonstering van twee *P. peltatum* planten. Als *Xanthomonas* in de plant aanwezig is, is deze bijna altijd in de basis van de plant te vinden en soms ook in de top of zijscheut. Voor details zie bijlage B1 t/m B12.

Winterproef

Tijdens het winterexperiment kwam de infectie trager op gang: één week na inoculatie werden 9 isolaten in één of meerdere planten terug te vinden in de basis van de plant; isolaat 2, 65 en 98 werden daar nog niet gevonden (tabel 3A). Het aantal geïnfecteerde planten was lager dan in de zomerproef. Geen van de isolaten werd teruggevonden in de top of de zijscheut (indien aanwezig). Na 1 week is gemiddeld 20% van de planten geïnfecteerd.

Twee weken na infectie is het verschil tussen de isolaten groter: isolaten 2, 53 en 60 worden niet of af en toe gevonden, voor de andere isolaten zet de infectie door: isolaten worden in meer planten

Tabel 3. Overzicht ontwikkeling infectie waarbij gekeken is of *Xanthomonas* teruggevonden kon worden in verschillende delen van de plant d.m.v. uitplaten; percentage geïnfecteerde (en dode) planten is weergegeven.
3A. Ontwikkeling infectie vanuit inoculatiepunt naar de voet van de plant;

Isol.	Zomer				Winter				
	week1	week 2	week 3	week 10	week 1	week 2	week 3	week 17	
	Inf ¹	Inf ¹	Inf ²	# levende planten	Inf ¹	Inf ¹	Inf ²	# levende planten	Inf ³
2	0	38	0	14	13	25	0	12	25
22	38	88	100	1	38	100	100	0	100
43	100	100	100	7	25	75	50	11	67
46	25	100	100	3	38	88	75	4	100
52	38	100	100	4	38	13	50	10	83
53	25	100	100	11	25	0	75	12	75
55	50	100	100	13	13	75	0	12	42
60	25	75	100	12	13	38	75	12	0
65	25	100	100	0	0	88	100	1	92
66	50	100	50	7	13	88	100	12	67
80	25	88	100	3	13	88	75	2	100
98	63	100	50	12	0	100	50	12	67

3B. Ontwikkeling infectie vanuit inoculatiepunt naar de top van de plant (hoofdscheut).

Isol.	Zomer				Winter				
	week1	week 2	week 3	week 10	week 1	week 2	week 3	week 17	
	Inf ¹	Inf ¹	Inf ²	# levende planten	Inf ¹	Inf ¹	Inf ²	# levende planten	Inf ³
2	0	0	0	14	0	0	0	12	8
22	0	88	100	1	0	25	75	0	100
43	0	50	0	7	0	0	0	11	17
46	0	63	50	3	0	0	25	4	100
52	0	100	50	4	0	0	0	10	75
53	0	75	50	11	0	0	0	12	0
55	0	50	50	13	0	0	0	12	8
60	0	13	0	12	0	0	0	12	0
65	0	75	100	0	0	0	75	1	92
66	13	88	50	7	0	0	25	12	0
80	0	63	50	3	0	25	50	2	92
98	13	38	0	12	0	0	0	12	0

3C. Ontwikkeling infectie vanuit inoculatiepunt naar de zijscheut van de plant.

Isol.	Zomer				Winter				
	week1	week 2	week 3	week 10	week 1	week 2	week 3	week 17	
	Inf ¹	Inf ¹	Inf ²	# levende planten	Inf ¹	Inf ¹	Inf ²	# levende planten	Inf ³
2	0	0	0	14	0	0	0	12	8
22	0	50	100	1	0	0	75	0	100
43	0	20	50	7	0	0	0	11	8
46	0	40	100	3	0	0	75	4	92
52	0	80	50	4	0	0	0	10	17
53	0	0	0	11	0	0	0	12	0
55	0	40	0	13	0	0	0	12	0
60	0	0	0	12	0	0	0	12	0
65	0	80	100	0	0	0	75	1	92
66	0	50	0	7	0	0	0	12	0
80	0	20	50	3	0	40	50	2	92
98	0	0	0	12	0	0	0	12	0

¹ 8 planten getoetst, % geïnfecteerde planten:

0	1-25	26-50	51-75	76-100
---	------	-------	-------	--------

² 2 planten (zomer) of 4 planten (winter) getoetst, % geïnfecteerde planten:

0	1-50	51-100
---	------	--------

³ 0-12 planten getoetst: % geïnfecteerde / dode planten:

0	1-17	18-33	34-50	51-67	68-83	84-100
---	------	-------	-------	-------	-------	--------

teruggevonden, maar bijna altijd in de basis, zelden in top of zijscheut (tabel 3A-C). Na twee weken zijn gemiddeld 60% van de planten geïnfecteerd. Besmettingspercentages tussen de bemonsteringstijdstippen kunnen wisselen omdat vanwege de destructieve bemonstering steeds andere planten zijn bemonsterd.

Drie weken na inoculatie wordt in de vier bemonsterde planten in het winterexperiment *Xanthomonas* wel teruggevonden, altijd aan de basis, soms in top of zijscheut. In de planten geïnfecteerd met isolaat 2 en 55 wordt in deze vier planten geen *Xanthomonas* aangetroffen.

Na 17 weken – de winterproef is veel langer blijven staan omdat de planten er relatief groen bleven uitzien – blijkt dat vier isolaten agressief zijn: isolaat 22, 46, 65 en 80. De planten zijn nagenoeg allemaal afgestorven. De meeste andere isolaten zijn wel terug te vinden in de basis, maar zelden in de top van de geïnoculeerde stengel of in de zijscheut. Voor details zie bijlagen B1 t/m B12.

Symptoomontwikkeling

Symptomen

In figuur 4-14 is een selectie van symptomen voor *P. zonale* weergegeven die door *Xanthomonas* kunnen worden veroorzaakt. Beginnende symptomen variëren van een blad dat kleiner blijft dan verwacht (geknepen) en een andere kleur heeft (bijv. fig. 6 en 9), oplichten van nerven (bijv. fig. 5 en 7): een eerste teken dat de vaten verstopt raken en de plant waterstress krijgt, tot het hangen van het blad, de zogenaamde parapluutjes (fig. 4-5, 11-14). Daarnaast is veel dood blad in de plant waarneembaar (fig. 9-10, 13).

Een symptoom dat vaak niet als *Xanthomonas* wordt ingeschat is het optreden van “vlekkerig” blad. Voorbeelden hiervan zijn weergegeven in figuur 15 en 16. Deze symptomen komen overeen met de foto op de voorpagina van dit verslag. Opvallend is dat dit type symptoom vaak te vinden is bij isolaten die mildere symptomen geven, maar het is niet beperkt tot deze isolaten. Deze symptomen waren name zichtbaar in het zomerexperiment bij *P. zonale*. In de winter gaven deze isolaten nauwelijks symptomen. *P. peltatum* liet dergelijk symptomen niet zien.

De variatie in symptomen in *P. peltatum* is veel kleiner (fig. 17). Hier is eigenlijk alleen het afstervende blad zichtbaar. Als de infectie verder gevorderd is ziet men in de top symptomen van voedingsgebrek ontwikkelen, wat duidt op verstopte vaten (fig. 17E). Er is dan al wel veel dood blad in de plant zichtbaar (fig. 17C-17E).

Symptoomontwikkeling per isolaat

Voor drie isolaten is de symptoomontwikkeling in zomer en winter weergegeven. Hierbij is gekozen voor isolaten uit de 2009-2010 epidemie, te weten isolaat 80, 66 en 98 (figuur 18 - 20). Daarnaast is voor alle twaalf isolaten de eindsituatie gefotografeerd in de zomer en winter (figuur 21).

Uit figuur 18 blijkt dat in de zomer alle met isolaat 80 geïnoculeerde planten binnen 3 weken nagenoeg en na 4 weken geheel dood zijn. In het winterexperiment duurde het 6 weken om hetzelfde stadium te bereiken. In beide seizoenen sterven alle planten af. Isolaten 22, 46 en 65 laten eenzelfde beeld zien (figuur 21): de ontwikkeling van de infectie verloopt in de winter trager dan in de zomer, maar (nagenoeg) alle planten sterven af, ongeacht het seizoen.

Het intermediaire isolaat nr. 66 heeft in de zomer binnen 3 à 4 weken nagenoeg alle planten geïnfecteerd; een enkele plant ontsnapt aan de infectie. In de winter blijven alle planten groen. De geïnfecteerde bladeren sterven af, maar aan de plant is verder niet veel te zien (figuur 19). Isolaten 43, 52 en 53 laten een vergelijkbaar beeld zien (figuur 21).

In figuur 20 staat het infectieverloop van isolaat 98 weergegeven. In zowel het zomer- als het winterexperiment blijven planten lang groen. In de zomer is duidelijk te zien dat de planten aangetast zijn: de planten zijn er iel uit en hebben relatief veel dood blad aan de basis van de plant. In het winterexperiment zijn de geïnoculeerde bladeren wel afgestorven, maar lijkt de plant niet onder de infectie te lijden. Isolaten 2, 55 en 60 laten eenzelfde beeld zien: in beide seizoenen blijven planten nagenoeg allen groen (figuur 20).



Figuur 4. Isolaat 52, 9 dagen na inoculatie (zomer): het geïnoculeerde blad hangt slap, ook het jonge blad begint symptomen te vertonen.



Figuur 5. Isolaat 22, 9 dagen na inoculatie (zomer): het geïnoculeerde blad hangt slap, oplichtende nerven in het jonge blad.



Figuur 6. Isolaat 65, 16 dagen na inoculatie (winter): het nieuw ontwikkelde blad blijft achter in groei en de kleur van het blad is veel lichter dan men zou verwachten.



Figuur 7. Isolaat 80, 16 dagen na inoculatie (winter): oplichtende nerven van het jonge blad.



Figuur 8. Isolaat 55, 103 dagen na inoculatie (winter): slap hangen van bladeren, dode bladeren onderin de plant, jong blad is relatief klein.



Figuur 9. Isolaat 46, 43 dagen na inoculatie (winter): het geïnoculeerde blad is afgestorven (pijl, wit etiketje). Het nieuw gevormde blad blijft achter in groei en is anders van kleur; daarnaast is al meer dood blad in de plant zichtbaar.



Figuur 10. Isolaat 52, 43 dagen na inoculatie (winter): Secties van bladeren sterven af, meerdere afgestorven bladeren in de plant aanwezig.



Figuur 11. Isolaat 46, 21 dagen na inoculatie (winter, andere plant dan in figuur 9): het geïnoculeerde blad is afgestorven (pijl, wit etiketje). De plant heeft waterstress: bladeren beginnen slap te hangen of zijn al afgestorven.



Figuur 12. Isolaat 22, 19 dagen na inoculatie (zomer): blad hangt slap, de plant heeft last van waterstress. De jonge bladeren blijven sterk achter in groei.



Figuur 13. Isolaat 22, 19 dagen na inoculatie (zomer): de bacterie heeft zich door de plant verspreid gezien het volledig stoppen van de groei, het afsterven van meerdere bladeren – niet alleen het geïnoculeerde blad – onderin de plant en het afsterven van secties van bladeren.



Figuur 14. *Isolaat 65, 43 dagen na inoculatie (winter): slap hangen van blad, oplichtende nerven in het jonge blad.*



Figuur 15. Eerste symptomen van vlekkerig blad, 9 dagen na inoculatie (zomer). A- B. Isolaat 2; C-D. Isolaat 60; E. Isolaat 98.



Figuur 16. Doorzetten van vlekkerige symptomen tot necrotische vlekken op het blad en langzaam afsterven van secties van het blad A-C.28 dagen na inoculatie, A. Isolaat 2, B. Isolaat 60, C. 98; D-E. 42 dagen na inoculatie, D. Isolaat 2, E. Isolaat 60.



Figuur 17. Ontwikkeling van symptomen van *Xanthomonas* in *Pelargonium peltatum* (zomerproef).

- A.** 6 dagen na inoculatie: afsterving rond inoculatiepunten, isolaat 43;
- B.** 9 dagen na inoculatie: geïnoculeerde blad begint te verwelken, isolaat 65;
- C.** 19 dagen na inoculatie: bladeren aan de geïnoculeerde stengel beginnen te verwelken, isolaat 22;
- D.** 19 dagen na inoculatie: infectie heeft zich verspreid naar zijscheuten, isolaat 80;
- E.** 42 dagen na inoculatie: er vindt weinig transport meer plaats in de plant waardoor de bladeren voedingsgebrek laten zien, isolaat 80.
- F.** 69 dagen na inoculatie: scheuten zijn afgestorven, alleen aan de toppen blijft nog lang groen blad zichtbaar, isolaat 65.



Figuur 18. Ontwikkeling van symptomen van *Xanthomonas* isolaat 80 (agressief) in *Pelargonium zonale*. Bovenste rij foto's geven de ontwikkeling in de zomer weer vanaf dag 6 na inoculatie tot 10 weken na inoculatie. De onderste rij foto's geeft de ontwikkeling in de winter weer, vanaf dag 9 na inoculatie tot 17 weken na inoculatie.



Figuur 19. Ontwikkeling van symptomen van *Xanthomonas* isolaat 66 (intermediair) in *Pelargonium zonale*. Bovenste rij foto's geven de ontwikkeling in de zomer weer vanaf dag 6 na inoculatie tot 10 weken na inoculatie. De onderste rij foto's geeft de ontwikkeling in de winter weer, vanaf dag 9 na inoculatie tot 17 weken na inoculatie.



Figuur 20. Ontwikkeling van symptomen van *Xanthomonas* isolaat 98 (mild) in *Pelargonium zonale*. Bovenste rij foto's geven de ontwikkeling in de zomer weer vanaf dag 6 na inoculatie tot 10 weken na inoculatie. De onderste rij foto's geeft de ontwikkeling in de winter weer, vanaf dag 9 na inoculatie tot 17 weken na inoculatie.

Zomer: 10 weken na start infectie



Winter: 17 weken na start infectie



22

65

80

46

52

43

Agressief

Intermediair

Figuur 21. Symptomen veroorzaakt door verschillende isolaten van *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* aan het eind van het zomer experiment (10 weken na inoculatie) en aan het eind van het winterexperiment (17 weken na inoculatie). Foto's zijn gerangschikt op mate van agressiviteit van de *Xanthomonas* isolaten.

Zomer: 10 weken na start infectie



Winter: 17 weken na start infectie



Intermediair

Mild

Figuur 21. (Vervolg) Symptomen veroorzaakt door verschillende isolaten van *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* aan het eind van het zomer experiment (10 weken na inoculatie) en aan het eind van het winterexperiment (17 weken na inoculatie). Foto's zijn gerangschikt op mate van agressiviteit van de *Xanthomonas* isolaten

3.4 Discussie

Tijdens de winterproef verliep de infectie trager dan in de zomer. De instellingen van het kascompartiment waren identiek voor beide seizoenen, het is daarom niet alleen een temperatuur-effect, maar ook andere factoren zoals licht, en (daarmee) de waterbehoefte van *Pelargonium*, zullen het effect van *Xanthomonas* beïnvloeden hebben.

Xanthomonas hortorum pv. *pelargonii* is op basis van de pathogeniteitsexperimenten grofweg in drie groepen te verdelen:

Groep 1 is agressief. Deze groep isolaten zal zowel in de zomer als in de winter snel systemisch worden, de planten zullen door het jaar heen snel symptomen vertonen en afsterven. Telers zullen de ziekte snel en makkelijk herkennen en de gewenste maatregelen kunnen nemen.

Groep 2 is een intermediaire groep: in de zomer worden snel symptomen zichtbaar, vergelijkbaar met de agressieve groep isolaten. Echter in de winter verloopt de infectie veel trager en worden de isolaten ook minder makkelijk systemisch: vergelijkbaar met de milde groep. De intermediaire isolaten kunnen gedurende de winterperiode aan de aandacht van de teler en vermeerderaar ontsnappen. Dit is waarschijnlijk een verklaring voor wat zich in het seizoen 2009-2010 heeft afgespeeld. Dit experiment bevestigt de resultaten van 2010 (figuur 2). In 2009 is isolaat 66 geïsoleerd uit een plant met duidelijke symptomen, in het pilot-experiment in de winter van 2010-2011 gaf isolaat nauwelijks symptomen.

Groep 3 is mild: in de zomer zijn milde symptomen waargenomen, maar de planten sterven niet volledig af, maar vertonen dood blad aan de basis en verliezen wel hun verkoopwaarde. In de winter werden er visueel nauwelijks of geen symptomen waargenomen, maar in verschillende planten is de bacterie wel in de basis van de plant aangetroffen. In deze groep wordt ook vaker het afwijkende symptoom waargenomen, namelijk de vlekkerigheid van het blad. Wat het gevaarlijk maakt is dat deze isolaten zelfs in de winter wel terug te vinden zijn onderin de plant en dus tijdens teelthandelingen makkelijk verspreid kunnen worden.

Isolaten uit de intermediaire en milde groep kunnen zich makkelijk en langdurig met teeltmateriaal verspreiden, zonder dat men in de gaten heeft dat er een *Xanthomonas* infectie heeft plaatsgevonden. In het seizoen 2009-2010 hebben juist isolaten uit deze twee groepen infecties veroorzaakt. De kans is dan ook zeer reëel dat door deze isolaten besmette planten hun verkoopwaarde verliezen voordat ze afgeleverd kunnen worden. Deze isolaten zijn niet nieuw: nagenoeg identieke isolaten zijn in 2001 en 2004 ook gevonden en isolaten met vergelijkbare ziekteontwikkeling zijn eveneens niet zeldzaam (totaal 8 v/d 12 isolaten geven nauwelijks symptomen in de winter).

Vanaf 2000 zijn de isolaten opgeslagen bij -80°C . Dit is een beter systeem als voor 2000, waarbij bacterie-isolaten werden opgeslagen bij -20°C . De methode van opslag kan de ziekteverwekkende vermogen van isolaten beïnvloeden. Of dit bij deze experimenten ook het geval is geweest is moeilijk te zeggen. Isolaat 22 uit 1995 is zeer agressief, isolaat 52 uit 1988 is intermediair, en isolaat 2 uit 1990 is mild. Om de invloed van opslag zo veel mogelijk uit te sluiten is het aantal isolaten van voor 2000 beperkt (totaal 4).

Wat is het beste monster om te toetsen:

Tijdens de vermeerdering wordt een stengeldeel aan de basis van de plant getoetst op aanwezigheid van *Xanthomonas*. In deze experimenten werd de bacterie in nagenoeg alle gevallen geïsoleerd uit de basis van de plant. Dit is dus nog steeds het beste plaats voor bemonstering. Echter, voor mildere isolaten wordt de ziekte minder snel systemisch. Het is daarom aan te raden om bij het ontstaan van bladvlekken, ook het blad te toetsen op aanwezigheid van *Xanthomonas*.

Voorspellende waarde genetische variatie:

Isolaten die nauwelijks/geen genetische variatie vertonen en daarom in dezelfde genetische groep zijn ingedeeld geven hetzelfde infectiebeeld. Voorbeelden hiervan zijn bijv. isolaat 55 en 98 (mild) en 43 en 66 (intermediair). Zodra er enige genetische variatie optreedt, is over het infectieverloop weinig te zeggen. Voorbeelden hiervan zijn isolaat 2, 22 en 52, deze vallen binnen 1 genetisch cluster dat meer spreiding kent maar ze variëren enorm qua ziektebeeld. Daarentegen vallen ook isolaat 65 en 80 binnen eenzelfde cluster met meer genetische spreiding, maar toch geven deze eenzelfde

infectiebeeld. Hiervoor zullen meer isolaten getoetst moeten worden (genetische profiel en infectie-experimenten) om na te gaan of genetische variatie een meer voorspellende waarde heeft.

4. *Xanthomonas campestris* in *Pelargonium* : bladvlekkenziekte

4.1 Inleiding

In 2012 is een nieuwe bacterieziekte in *Pelargonium* ontdekt. Deze ziekte veroorzaakte bladvlekken in *Pelargonium zonale* (figuur 22). Het bleek om *Xanthomonas campestris* te gaan en niet om *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*. De naamgeving kan tot veel verwarring leiden want de oude naam van *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* was *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*. Het gaat hier echter om twee verschillende soorten namelijk *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (dit project) en *Xanthomonas campestris* (nieuwe ziekte). Om verdere verwarring te voorkomen wordt over *Xanthomonas*-bladvlekkenziekte (*X. campestris*) en *Xanthomonas*-verwelkingsziekte (*X. hortorum* pv. *pelargonii*) gesproken.

Op verzoek van de begeleidingscommissie is aan deze ziekte ook aandacht besteed, zij het beperkt. In een aantal kleine experimenten is gekeken naar eigenschappen van deze bacterie: wordt de bacterie systemisch (dringt hij door in de vaatbundels) en kunnen de detectiemethoden voor *X. hortorum* pv. *pelargonii* ook gebruikt worden voor detectie van deze *Xanthomonas campestris*.



Figuur 22. Symptomen van de nieuwe bacterieziekte in *Pelargonium* veroorzaakt door *Xanthomonas campestris*.

4.2 Infectie-experimenten

Inleiding

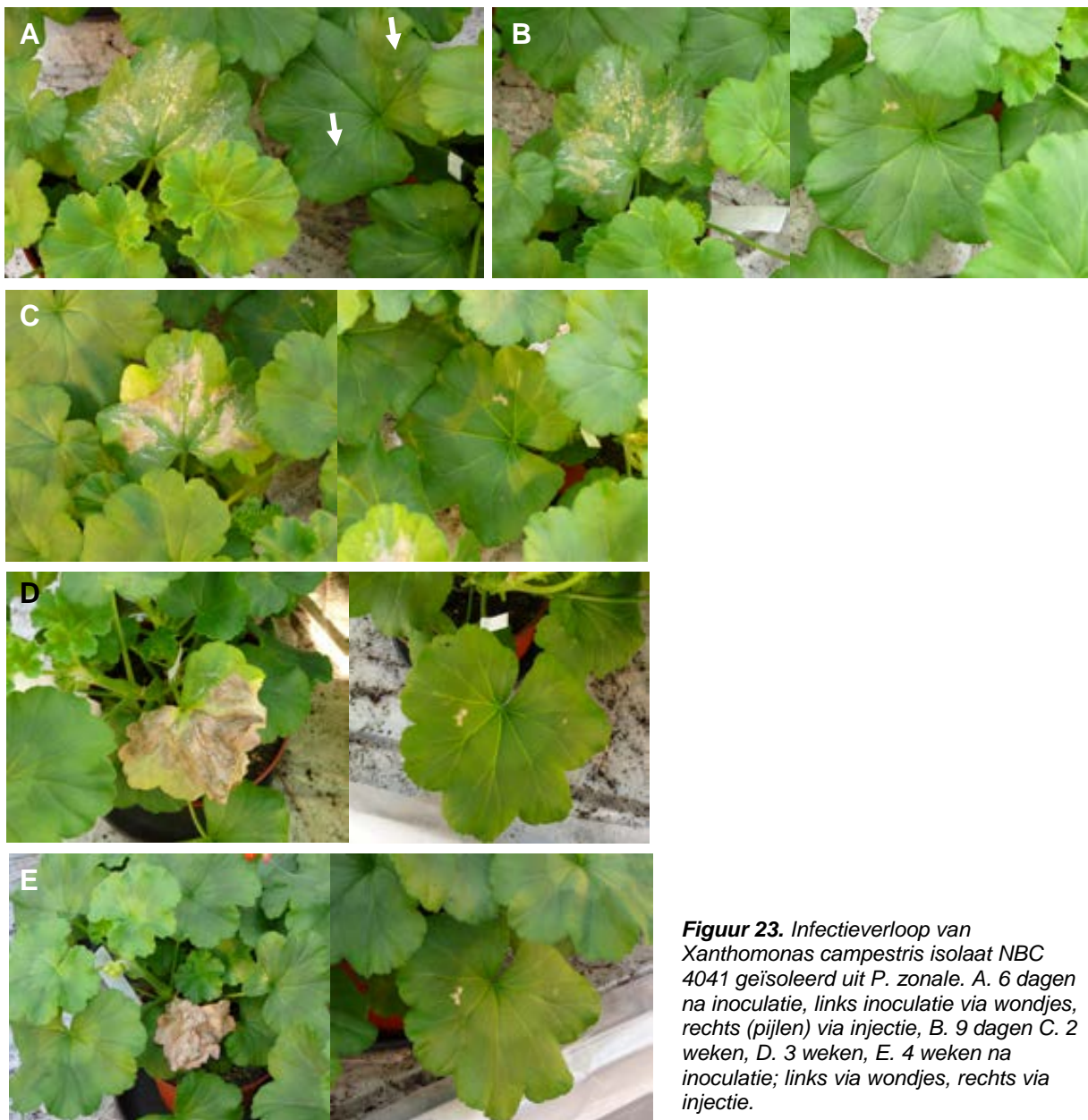
De nieuwe ziekte dook voor het eerst op begin 2012. Het is de vraag of deze *Xanthomonas campestris* net als *X. hortorum* pv. *pelargonii* systemisch kan worden in de plant.

Opzet

Pelargonium peltatum en *P. zonale* planten zijn op twee verschillende manieren geïnoculeerd (injectie en via meerdere kleine wondjes op het blad) met drie *X. campestris* isolaten die afkomstig zijn uit aangetast blad van *P. zonale*, te weten NBC 3978, NBC 3980 en NBC 4041. De symptomen werden gefotografeerd. Na 17 weken zijn de planten destructief bemonsterd en getoetst op aanwezigheid van *Xanthomonas*.

Resultaten

Xanthomonas campestris uit *P. zonale* moet op een andere manier geïnoculeerd worden, waarbij kleine wondjes op het blad gemaakt worden. De reactie van de bacterie is erg snel, binnen 6 dagen na inoculatie is het blad al erg necrotisch (figuur 23A). De ontwikkeling zet snel door in het geïnoculeerde blad. Dat blad sterft uiteindelijk af, maar verder blijft de plant groen. Inoculatie m.b.v. injectie werkt voor deze bacterie niet (figuur 23). Isolaat NBC 3980 en NBC 4041 lijken wat agressiever dan isolaat NBC 3978.



Figuur 23. Infectieverloop van *Xanthomonas campestris* isolaat NBC 4041 geïsoleerd uit *P. zonale*. A. 6 dagen na inoculatie, links inoculatie via wondjes, rechts (pijlen) via injectie, B. 9 dagen C. 2 weken, D. 3 weken, E. 4 weken na inoculatie; links via wondjes, rechts via injectie.

De bacterie werd na 17 weken niet teruggevonden in de plant: het geïnoculeerde blad was afgevallen en onderin de plant werd geen *X. campestris* aangetroffen.

Conclusie

Xanthomonas campestris blijft beperkt tot het blad waarop het geïnoculeerd is en wordt dus niet systemisch in de plant zoals *X. hortorum* pv. *pelargonii*.

4.3 Detectie

Inleiding

Veel bedrijven maken gebruik immunofluorescentie (IF, laboratorium techniek), snelkits of ELISA voor de detectie van *X. hortorum* pv. *pelargonii*. Deze methoden zijn gebaseerd op antiserum voor detectie van *X. hortorum* pv. *pelargonii*. Het is de vraag of deze antisera ook de nieuwe ziekte kunnen detecteren.

Opzet van experiment

Drie isolaten van de nieuwe ziekte (NBC 3978, NBC 3980, NBC 4041) zijn getoetst met IF (antiserum Prime Diagnostics), daarnaast zijn twee *X. hortorum* pv. *pelargonii* isolaten meegenomen te weten: X.h.pel. 22 en 60. Tegelijkertijd zijn een aantal antisera voor detectie van andere *Xanthomonas campestris* pathovars meegenomen, te weten: *Xanthomonas campestris* stam Lobelia, *X. campestris* pv. *vesicatoria* (ziekte in tomaat) en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (veroorzaakt zwartnervigheid in kool)

Twee isolaten van de nieuwe ziekte (NBC 3978 en 4041) zijn getoetst met twee verschillende snelkits, te weten ImmunoStrip® (Agdia, USA) en Pocket Diagnostics® (Forsite, UK). Daarnaast zijn ook X.h.pel. 60, 65, 66 en 98 meegenomen.

Het antiserum voor IF is een ander antiserum dan de antisera die gebruikt worden in de snelkits. Uiteindelijk zijn dus drie verschillende antisera getoetst.

Resultaten

De *Xanthomonas campestris* isolaten NBC 3978, 3980 en 4041 worden niet gedetecteerd met immunofluorescentie. De isolaten reageren wisselend met andere antisera voor detectie van *Xanthomonas campestris* pathovars (tabel 4).

Tabel 4. Reactie van reïncultures van verschillende *Xanthomonaden* met verschillende antisera tegen deze *Xanthomonaden*: *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*, *X. campestris* uit *Pelargonium*, *X. campestris* uit *Lobelia*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

antiserum	<i>Xanthomonas hortorum pelargonii</i>		<i>Xanthomonas campestris</i> uit <i>Pelargonium</i>			positieve controle
	X.h.pel.22	X.h.pel.60	NBC 4041	NBC 3978	NBC 3980	
X.h.pel.	+++	+++	-	-	-	+++
X.c.lob.	-	-	-	-	-	+++
X.c.ves.	-	-	+++	+	+++	+++
X.c.cam	+	+	+	+	-	++

Ook de sneltesten voor detectie van X.h.pel. (zie figuur 22), reageerden niet met deze *X. campestris* uit *P. zonale*. De verschillende X.h.pel. isolaten 60, 65, 66 en 98 werden allen gedetecteerd met de sneltesten (gegevens niet getoond).



Figuur 23. Resultaten sneltesten van Agdia en Pocket Diagnostics; C = controle, T = test (*X.h.pel.*) met isolaten *Xanthomonas campestris* NBC 3978 en NBC 4041, beide geïsoleerd uit aangetast blad van *Pelargonium zonale*. De sneltesten reageren niet met *Xanthomonas campestris* uit *Pelargonium*, er is geen test-bandje te zien.

Conclusie

Beide snelkits en immunofluoresentie reageren niet met de nieuwe bladvlekkenziekte uit *Pelargonium zonale*. Antisera voor immunofluoresentie voor detectie van andere Xanthomonaden reageren niet of zeer wisselend met isolaten van de nieuwe ziekte.

4.4 Discussie

Het is nog onduidelijk hoe belangrijk deze bladvlekkenziekte is / zal worden. Helaas is de ziekte eind 2012 en in 2013 opnieuw geconstateerd. Uit bovenstaande experimenten blijkt dat de bacterie niet systemisch wordt. Bij bladvlekkenziektes in het algemeen is spatverspreiding erg belangrijk, deze ziekte is vergelijkbaar met *Xanthomonas* bladvlekkenziekte in *Poinsettia*. Mocht deze bladvlekkenziekte optreden, dan is het belangrijk om onderlangs of met druppellaars water te geven. Bovenlangs water geven en eventuele bespuitingen met gewasbeschermingsmiddelen zullen het probleem verergeren.

Verder bestaat het sterke vermoeden dat deze bacteriën beter gedijen bij koelere temperaturen, terwijl *Xanthomonas* verwelkingsziekte beter gedijt bij hogere temperaturen.

Het vermoeden dat het alsnog om een gelegenheidspathogeen gaat is nog niet weggenomen, vooral omdat er minimaal twee stammen gevonden zijn. De ene variant lijkt ook iets minder agressief dan de andere variant, maar dit soort experimenten moeten herhaald worden om variatie uit te sluiten. Verder verschillen de varianten ook: de ERIC-BOX patronen wijken sterk af, GyrB sequentie verschilt, en ook de IF reageert verschillend.

Om de aanwezigheid van deze ziekte te bevestigen zullen de sneltesten die beschikbaar zijn voor *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* (*Xanthomonas* verwelkingsziekte) niet werken. Uitplaten blijft dan de enige methode, waarbij in gedachte gehouden moet worden dat *X. campestris* andere eisen stelt aan het kweekmedium dan *X. hortorum*.

Voor bemonstering op *X. campestris* moet de bladschijf gebruikt worden. De resultaten zeggen echter alleen iets over het onderzochte deel van het monster. Evenals bij andere door *Xanthomonas* veroorzaakte bladvlekkenziektes, zoals *Xanthomonas*-bladvlekkenziekte in *Poinsettia*, zeggen de resultaten weinig over de gezondheidstoestand van het gewas.

5. Tot slot

De variatie binnen *Xanthomonas*-verwelkingsziekte van *Pelargonium* is erg groot. Uit dit onderzoek bleek dat meerdere isolaten in de winter nauwelijks symptomen geven, terwijl deze wel systemisch worden. Een gedeelte van deze isolaten geeft wel hevige symptomen in de zomer, andere isolaten blijven ook dan vrij mild. De laatste groep geeft vaak een afwijkend ziektebeeld te zien, namelijk vlekkerigheid van het blad. De isolaten die in de winter weinig symptomen geven blijven lang onder de radar en kunnen zich makkelijk binnen het bedrijf en tussen bedrijven verspreiden. Dit is waarschijnlijk in 2009 / 2010 gebeurd. De agressieve isolaten zullen, onafhankelijk van seizoenen, snel symptomen geven en vermeerderders en telers zullen deze herkennen en maatregelen nemen.

Voorkomen is beter dan genezen. In het geval van *Xanthomonas*-verwelkingsziekte is genezen niet mogelijk, voorkomen is de enige optie. Regelmatig toetsen van uitgangsmateriaal is belangrijk, zeker bij materiaal dan nieuw in het bestand komt. Het beste monster is en blijft een stengeldeel onderuit de plant. Bij het ontstaan van bladvlekken die niet verklaard kunnen worden door teeltomstandigheden is het verstandig om ook het blad zelf te toetsen. Het zal lastig blijven om een *Xanthomonas* infectie soms te onderscheiden van veroudering van de plant of van onschuldige bladvlekken en bladnecrose. In elke teelt zal namelijk wel wat dood blad optreden.

Daarnaast is systematische aanpak van de bedrijfshygiëne erg belangrijk. Speerpunten hierbij zijn gezondheidsgaranties voor van buiten komend teelt- en plantmateriaal en strikte handhaving van ontsmettingseenheden. Onderlangs watergeven of via druppelaar in plaats van over het gewas zal verspreiding van *Xanthomonas* afremmen.

De *Xanthomonas*-bladvlekkenziekte komt tot nu toe – voor zover bekend – in Nederland niet voor. De normale detectiemethoden voor *Xanthomonas*-verwelkingsziekte zullen deze bacterie niet detecteren. Bij bladsymptomen is het belangrijk om deze bacterie in gedachten te houden. Ondanks de schade die de bladvlekkenziekte kan veroorzaken, is het de vraag hoe belangrijk deze ziekte echt zal worden. De manier van watergeven en de gehanteerde teelttemperatuur heeft vermoedelijk veel invloed op de symptoomontwikkeling. Bij de bladvlekkenziekte heeft het geen zin om routinematig stengeldelen te toetsen, de bacterie wordt niet systemisch. De bacterie kan aangetoond worden in de bladschijf.

6. Referenties

- Meekes, E.T.M., M. Hooftman, J. Westerhof (2011). Infectie *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii*. Intern onderzoeksrapport Naktuinbouw. 10 pp.
- Parkinson, N., C. Cowie, J. Heeney, D. Stead (2009). Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 264–274.
- Teunissen, H., J. Westerhof, D. Deinum, M. Hoekstra & I. Lukassen (2010). Karakteriseren isolaten *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* van toen en nu. Verslag consultancy onderzoek. Productschap Tuinbouw, 12 pp.
- Versalovic, J., M. Schneider, F.J. de Bruijn, J.R. Lupski (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular & Cellular Biology* 5: 25–40.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper, M. Zabeau (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 4407-4414.
- Wolf, J.M. van der, Beckhoven J.R.C.M. van, Messchendorp, J.W.J., Hooftman, R. (1996). Detection of *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* by immunofluorescence colony-staining and PCR. *Proceedings of the 9th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Madras India August 1996: p. 149-154.

Bijlagen

B1: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 2.

Isolaat 2				Zomer			Winter						
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17			
Plant	plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kol.	# kol.
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven	0	0
			Midden	0	0	0	0	0	Midden		0	0	
		Hoofdstengel	Boven	0	0	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
	Midden		0	0	0	0	0	Midden	0		0		
	1-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0		Zijst.	Boven	0	0
				Midden	0	0		0	0		Midden	0	0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0		Hoofdst.	Boven	0	0
	Midden		0	0		0	0	Midden	0		0		
	2-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven	0	
				Midden	0	0	0	0	0		Midden	0	
		Hoofdstengel	Boven	0	0	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	
	Midden		0	0	0	0	0	Midden	0				
	2-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0					
				Midden	0	0		0	0				
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0		Hoofdst.	Boven	0	
Midden	0		∞		0	0	Midden	0					
zonale	1-1	Zijstengel	Midden	-	9		-	-	0	Zijst.	Boven	0	0
			Midden	0	0		0	0	0		Midden	0	0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
	Midden		0	∞		0	0	0	Midden		0	0	
	1-2	Zijstengel	Midden	-	-		-	-		Zijst.	Boven	0	0
				Midden	0	0		0	0		Midden	0	0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0		Hoofdst.	Boven	0	0
	Midden		0	∞		0	0	Midden	0		0		
	2-1	Zijstengel	Midden	-	-		-	-	0	Zijst.	Boven	0	-
				Midden	0	0		0	0		0	Midden	0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
	Midden		0	0		0	2	0	Midden		0	80	
	2-2	Zijstengel	Midden	-	-		-	-					
				Midden	0	0		0	0				
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0		Hoofdst.	Boven	0	
Midden	0		0		1	0	Midden	0					

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedium, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedium, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medium.

B2: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 22.

Isolaat 22				Zomer			Winter						
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17			
Plant	plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kolonies	# kolonies
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	0	>>100	0	0	>>100	Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	>>100	∞	0	0	>>100	Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞	∞	200	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder		
	1-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0		Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	>>100		Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	0	0		300	>>100		Hoofdst.	Onder		
	2-1	Zijstengel	Midden	0	∞	∞	0	0	>>100	Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	>>100	∞	0	0	>>100	Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	300	∞	∞	0	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder		
	2-2	Zijstengel	Midden	0	∞		0	0					
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	>>100					
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100					
zonale	1-1	Zijstengel	Midden	-	-				0	Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder		
	1-2	Zijstengel	Midden	-	∞			0		Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0		Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100		Hoofdst.	Onder		
	2-1	Zijstengel	Midden	-	-				>>100	Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	>>100		1	0	>>100	Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	1	∞		0	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder		
	2-2	Zijstengel	Midden	-	-								
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	50	∞		0	>>100					

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedium, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedium, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medium, **Bruin**: planten dood.

B3: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 43.

Isolaat 43				Zomer			Winter						
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17			
Plant	Plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kolonies	# kolonies
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	0	∞	0	0	0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	0	100	0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	60	100	∞	3	∞	0	Hoofdst.	Onder	300	300
	1-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0		Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0		Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	150	100		0	0		Hoofdst.	Onder	200	0
	2-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	150	∞	∞	200	∞	∞	Hoofdst.	Onder	150	0
	2-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	25	∞		0	∞					
zonale	1-1	Zijstengel	Midden	-	-		-	0	-	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	300	∞		0	∞	∞	Hoofdst.	Onder	0	300
	1-2	Zijstengel	Midden	-	1		-	-		Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	100		0	0		Hoofdst.	Boven Midden	0 0	200 ∞
		Hoofdstengel	Onder	50	∞		0	0		Hoofdst.	Onder	0	∞
	2-1	Zijstengel	Midden	-	-		-	-	-	Zijst.	Boven Midden	0 0	
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	
		Hoofdstengel	Onder	80	∞		0	∞	0	Hoofdst.	Onder	50	
	2-2	Zijstengel	Midden	-	-		-	-					
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	50	∞		0	∞					

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedium, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedium, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medium, **Bruin**: planten dood.

B4: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 46.

Isolaat 46				Zomer			Winter						
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17			
Plant	Plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kolonies	# kolonies
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	0	>>100	0	0	0	Zijst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Boven	0	0	∞	0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Onder	300	2	∞	200	4	0	Hoofdst.	Onder	∞	∞
	1-2	Zijstengel	Midden	0	∞		2	0		Zijst.	Boven	0	
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0		Hoofdst.	Boven	0	
		Hoofdstengel	Onder	30	∞		0	2		Hoofdst.	Onder	∞	
	2-1	Zijstengel	Midden	0	0	>>100	0	0	2	Zijst.	Boven	0	
		Hoofdstengel	Boven	0	23	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	
		Hoofdstengel	Onder	0	∞	∞	2	>300	>300	Hoofdst.	Onder	∞	
	2-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	>300					
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		300	>300					
zonale	1-1	Zijstengel	Midden		-		-	-	>300	Zijst.	Boven		
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	>300	Hoofdst.	Boven		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>300	>300	Hoofdst.	Onder		
	1-2	Zijstengel	Midden	-	∞		-	0		Zijst.	Boven		
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0		Hoofdst.	Boven		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>300		Hoofdst.	Onder		
	2-1	Zijstengel	Midden	-	-		-	-	>300	Zijst.	Boven		
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>300	>300	Hoofdst.	Onder		
	2-2	Zijstengel	Midden	-	-		-	-					
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0					

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedum, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedum, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medum, **Bruin**: planten dood.

B5: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 52.

Isolaat 52				Zomer			Winter						
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17			
Plant	plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kolonies	# kolonies
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	∞	∞	0	0	0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞	∞	0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	300	∞	∞	300	0	0	Hoofdst.	Onder	150	0
	1-2	Zijstengel	Midden	0	10		0	0		Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	>>100		0	0		Hoofdst.	Boven Midden	0 ∞	0 ∞
		Hoofdstengel	Onder	300	∞		300	0		Hoofdst.	Onder	∞	∞
	2-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	1	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 ∞	0 ∞
		Hoofdstengel	Onder	300	>>100	∞	300	80	>300	Hoofdst.	Onder	∞	∞
	2-2	Zijstengel	Midden	0	-		0	0					
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0					
zonale	1-1	Zijstengel	Midden	-	∞		-	-		Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 100
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0	>300	Hoofdst.	Onder	0	∞
	1-2	Zijstengel	Midden	-	-		-	-		Zijst.	Boven Midden	0 0	
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0		Hoofdst.	Boven Midden	0 ∞	
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0		Hoofdst.	Onder	∞	
	2-1	Zijstengel	Midden	-	∞		-	-	0	Zijst.	Boven Midden	0 0	
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 150	
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Onder	300	
	2-2	Zijstengel	Midden	-	-		-	-					
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0					

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedium, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedium, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medium.

B6: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 53.

Isolaat 53				Zomer			Winter						
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17			
Plant	plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kol.	# kol.
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	200	>>100	0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	300	∞	∞	300	0	>300	Hoofdst.	Onder	20	50
	1-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0		Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0		Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	30	∞		30	0		Hoofdst.	Onder	∞	300
	2-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	0	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞	∞	0	0	>300	Hoofdst.	Onder	200	300
	2-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Boven	0	>>100		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0					
zonale	1-1	Zijstengel	Midden		-					Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Onder	0	0
	1-2	Zijstengel	Midden		-					Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0		Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0		Hoofdst.	Onder	300	150
	2-1	Zijstengel	Midden		0				0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0	100	Hoofdst.	Onder	100	0
	2-2	Zijstengel	Midden		-								
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0					

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedium, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedium, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medium.

B7: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 55.

Isolaat 55				Zomer			Winter						
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17			
Plant	plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kolonies	# kolonies
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Boven	0	0	>>100	0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞	∞	0	0	0	Hoofdst.	Onder	300	0
	1-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	>>100		Zijst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0		Hoofdst.	Boven	0	0
		Zijstengel	Onder	0	>>100		0	40		Hoofdst.	Onder	0	300
	2-1	Hoofdstengel	Boven	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Onder	0	0	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
		Zijstengel	Midden	0	>>100	∞	200	>>100	0	Hoofdst.	Midden	0	0
	2-2	Zijstengel	Midden	0	>>100		0	0					
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100					
zonale	1-1	Zijstengel	Midden		-				0	Zijst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Midden	0	0
		Hoofdstengel	Onder	300	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
	1-2	Zijstengel	Midden		-			0		Zijst.	Midden	0	0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0		Hoofdst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Onder	50	∞		0	>>100		Hoofdst.	Midden	0	0
	2-1	Zijstengel	Midden		-				0	Zijst.	Onder	0	0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Onder	80	∞		0	40	0	Hoofdst.	Midden	0	0
	2-2	Zijstengel	Midden		50								
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	50	∞		0	50					

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedium, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedium, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medium.

B8: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 60.

Isolaat 60				Zomer			Winter						
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17			
Plant	plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kolonies	# kolonies
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	0	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	300	18	30	0	0	>>100	Hoofdst.	Onder	0	0
	1-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0		Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0		Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	30	∞		0	0		Hoofdst.	Onder	0	0
	2-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	1	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞	∞	1	0	>>100	Hoofdst.	Onder	0	0
	2-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	6		0	0					
zonale	1-1	Zijstengel	Midden		-			0		Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	0		0	0	0	Hoofdst.	Onder	0	0
	1-2	Zijstengel	Midden		-					Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0		Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	3		Hoofdst.	Onder	0	0
	2-1	Zijstengel	Midden		0				0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	>>100		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	>>100		0	1	100	Hoofdst.	Onder	0	0
	2-2	Zijstengel	Midden		-								
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	0		0	>>100					

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedium, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedium, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medium.

B9: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 65.

Isolaat 65				Zomer			Winter						
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17			
Plant	plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kolonies	# kolonies
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	∞	∞	0	0	>>100	Zijst.	Boven Midden	0	
		Hoofdstengel	Boven	0	100	∞	0	0	>>100	Hoofdst.	Boven Midden	0	
		Hoofdstengel	Onder	∞	∞	∞	0	50	>>100	Hoofdst.	Onder	0	
	1-2	Zijstengel	Midden	0	∞		0	0		Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	100		0	0		Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	25	∞		0	>>100		Hoofdst.	Onder		
	2-1	Zijstengel	Midden	0	200	∞	0	0	>>100	Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	∞	∞	0	0	>>100	Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞	∞	0	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder		
	2-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100					
zonale	1-1	Zijstengel	Midden	-	∞		-		0	Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100	7	Hoofdst.	Onder		
	1-2	Zijstengel	Midden	-	-		-	0		Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0		Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0		Hoofdst.	Onder		
	2-1	Zijstengel	Midden	-	-		-		>>100	Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	>>100	Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder		
	2-2	Zijstengel	Midden	-	-		-						
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100					

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedium, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedium, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medium, **Bruin**: planten dood.

B10: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 66.

Isolaat 66				Zomer			Winter						
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17			
Plant	plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kolonies	# kolonies
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	50	0	0	0	0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞	>>100	0	0	>>100	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞	∞	2	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder	∞	∞
	1-2	Zijstengel	Midden	0	-		0	0		Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0		Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100		Hoofdst.	Onder	200	200
	2-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	100	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	8	∞	0	0	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder	200	∞
	2-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	∞	∞		0	>>100					
zonale	1-1	Zijstengel	Midden	-	-		-		0	Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder	0	13
	1-2	Zijstengel	Midden	-	-		-			Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	2	∞		0	0		Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	300	∞		0	0		Hoofdst.	Onder	0	200
	2-1	Zijstengel	Midden	-	-		-	0		Zijst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Boven	0	10		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden	0 0	0 0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100	40	Hoofdst.	Onder	0	0
	2-2	Zijstengel	Midden	-	∞		-						
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	∞	∞		0	>>100					

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedium, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedium, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medium.

B11: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 80.

Isolaat 80				Zomer			Winter							
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17				
Plant	plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kolonies	# kolonies	
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	>>100	Zijst.	Boven Midden	0		
		Hoofdstengel	Boven	0	0	0	0	0	>>100	Hoofdst.	Boven Midden	0		
		Hoofdstengel	Onder	0	0	∞	0	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder	∞		
	1-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0			Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	200			Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100			Hoofdst.	Onder		
	2-1	Zijstengel	Midden	0	0	∞	0	200	2		Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	0	∞	0	0	>>100		Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞	∞	0	>>100	>>100		Hoofdst.	Onder		
	2-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	4						
		Hoofdstengel	Boven	0	100		0	>>100						
		Hoofdstengel	Onder	50	∞		300	>>100						
zonale	1-1	Zijstengel	Midden		∞			0	0	Zijst.	Boven Midden			
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven Midden			
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	0	>>100	Hoofdst.	Onder			
	1-2	Zijstengel	Midden		-						Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	>>100		0	0			Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100			Hoofdst.	Onder		
	2-1	Zijstengel	Midden		-				0		Zijst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0		Hoofdst.	Boven Midden		
		Hoofdstengel	Onder	4	∞		0	>>100	0		Hoofdst.	Onder		
	2-2	Zijstengel	Midden		-									
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0						
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100						

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedum, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedum, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medium, **Bruin**: planten dood.

B12: Overzicht van destructieve toetsingen in zomer (2012) en winterexperiment (2012-2013) van isolaat X.h.pel. 98.

Isolaat 98				Zomer			Winter						
Monsternr.				Week 1	Week 2	Week 3	Week 1	Week 2	Week 3	Week 17			
Plant	plantnr.	Stengel	Deel stengel	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	# kolonies	Stengel	deel	# kolonies	# kolonies
peltatum	1-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Boven	0	0	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Onder	∞	>>100	0	0	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder	0	50
	1-2	Zijstengel	Midden	0	1		0	0		Zijst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0		Hoofdst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Onder	∞	∞		0	>>100		Hoofdst.	Onder	0	∞
	2-1	Zijstengel	Midden	0	0	0	0	0	0	Zijst.	Boven	-	0
		Hoofdstengel	Boven	5	0	0	0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Onder	300	∞	∞	0	16	0	Hoofdst.	Onder	∞	∞
	2-2	Zijstengel	Midden	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Boven	0	0		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	∞	∞		0	>>100					
zonale	1-1	Zijstengel	Midden		-				0	Zijst.	Boven	0	-
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Onder	150	∞		0	>>100	0	Hoofdst.	Onder	∞	0
	1-2	Zijstengel	Midden		-			0		Zijst.	Boven	-	0
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0		Hoofdst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		2	>>100		Hoofdst.	Onder	80	0
	2-1	Zijstengel	Midden		-				0	Zijst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Boven	1	∞		0	0	0	Hoofdst.	Boven	0	0
		Hoofdstengel	Onder	0	∞		0	>>100	>>100	Hoofdst.	Onder	47	70
	2-2	Zijstengel	Midden		0								
		Hoofdstengel	Boven	0	∞		0	0					
		Hoofdstengel	Onder	0	0		0	50					

Kleuren: **groen**: geen bacteriën gevonden op het groeimedium, **Oranje**: 1-150 bacteriën gevonden op het groeimedium, **Rood**: > 150 bacteriën gevonden op medium.