

Aanvullend advies betreffende de effecten van bekalken en/of rooien van 76 hoogstammige wilgen langs het kanaal Roeselare-Leie te Ingelmunster

Nummer:	INBO.A.2011.16
Datum advisering:	28 september 2011
Auteur(s):	Arthur De Haeck, Pierre Van Peteghem, Maud Raman, Bruno De Vos en Suzanna Lettens
Contact:	Sophie Vermeersch (sophie.vermeersch@inbo.be)
Kenmerk aanvraag:	e-mail op datum van 27 januari 2011
Geadresseerden:	Waterwegen en Zeekanaal nv Afdeling Bovenschelde t.a.v. Nathalie Devaere Nederkouter 28 B-9000 Gent nathalie.devaere@wenz.be

AANLEIDING

In het advies INBO.A.2010.260 'Advies betreffende de effecten van bekalken en/of rooien van 76 hoogstammige wilgen langs het kanaal Roeselare-Leie te Ingelmunster' wordt gesteld dat op basis van de beschikbare info de watermerkziekte niet met zekerheid kan worden vastgesteld. Om zekerheid te bekomen zijn dwarsdoorsnedes van aangetaste levende takken nodig. Mogelijk zijn er andere (mede-) oorzaken van de boomsterfte (grondwerken, maaischade, andere aantastingen).

VRAAGSTELLING

Kan op de betrokken wilgen een analyse uitgevoerd worden om na te gaan of deze drager zijn van de watermerkziekte?

TOELICHTING

1. Diagnose watermerkziekte

1.1 Ziekte veroorzaakt door *Brenneria salicis*

De bacterie *Brenneria salicis* (vroegere *Erwinia salicis*), een vasculaire parasiet die in de houtvaten van wilgen voorkomt, wordt als de ziekteverwekker van de watermerkziekte beschouwd. Deze ziekte veroorzaakt grote verliezen bij zowel de bestaande wilgenpopulatie als bij aanplantingen van jonge bomen. De door *Brenneria salicis* aangetaste wilgen hebben verwelkte, verdroogde en bruin gekleurde bladeren en hun hout heeft van een waterachtige, doorzichtige, oranjebruine kleur. De verwelking van de bladeren is het resultaat van de **verstopping van de houtvaten** door de accumulatie van fenolische componenten van de gewonde plantencellen. Een zware infectie tijdens opeenvolgende jaren kan leiden tot boomsterfte.

1.2 Observatie en bemonstering van takmateriaal te Ingelmunster

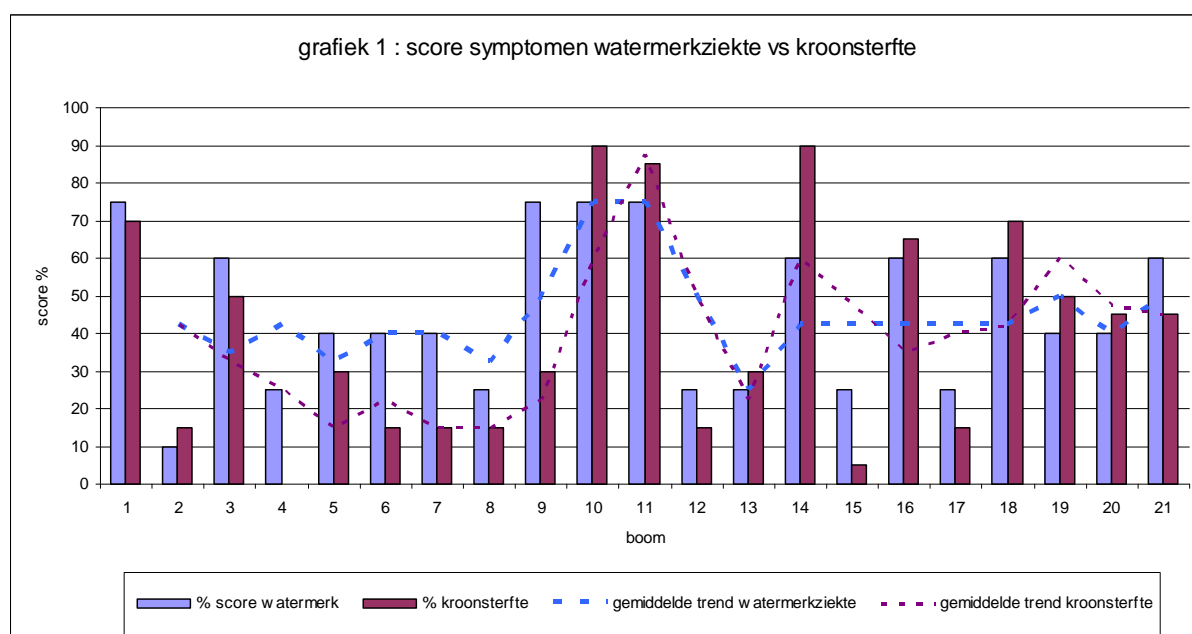
Op 22 juni 2011 hebben twee INBO medewerkers (Arthur De Haeck en Pierre Van Peteghem) op het terrein de betreffende wilgen geobserveerd en bemonsterd. Elk van de 76 bomen werd gequoteerd aan de hand van een schaal van 0 tot 5. Deze quotatie is gebaseerd op het procentueel aandeel van de plant dat uitwendige symptomen van de Watermerkziekte vertoont (tabel 1).

Tabel 1: de gehanteerde quotatieschaal voor uitwendige symptomen van de Watermerkziekte met het aantal geobserveerde bomen per score.

Score	Uitwendige symptomen	Aantal bomen
0	geen uitwendige symptomen	2
1	0% tot 25% van de boom vertoont verdroogde bladeren	37
2	25% tot 50% van de boom vertoont verdroogde bladeren	10
3	50% tot 75% van de boom vertoont verdroogde bladeren	16
4	> 75% van de boom vertoont verdroogde bladeren	9
5	volledig verdroogde boom.	2

Van de 76 bomen hadden 37 een score 1. Dat wil zeggen dat minder dan 25% van hun takken verwelkte bladeren vertoonden. Daarnaast vertoonden 37 bomen (10 + 16 + 9 + 2 bomen) respectievelijk score 2, 3, 4 en 5. Slechts twee bomen vertoonden geen uitwendige symptomen (score 0).

Bij wijze van steekproef werden 21 aangetaste bomen ad random geselecteerd. Van deze wilgen werden takken geoogst voor analyse van het boomsap ter identificatie van *Brenneria salicis*. De 21 aangetaste wilgen werden in detail geobserveerd. De significante verzwakkingssymptomen (kroonsterfte, bladverlies, aantastingen,...) werden procentueel geschat. De procentuele score voor kroonsterfte geeft het kroonvolume (takken) weer dat afgestorven is en waaraan geen bladeren meer kunnen groeien. Het percentage kroonsterfte kan als een resultante beschouwd worden. De absolute waarden van watermerkscore en kroonsterfte zijn niet altijd gelijklopend, maar de trend van beiden is wel sterk vergelijkbaar (figuur 1). De procentuele score voor watermerkziekte (vijf gradaties van overwegend 25 %) is gebaseerd op het geschatte volume van verdorde bladeren in de boomkroon (tabel 1).



Figuur 1: de grafiek geeft weer in welke mate de bomen symptomen van watermerkziekte en van kroonsterfte vertonen. De trend van de waarnemingen is sterk vergelijkbaar.

1.3 Genetische analyses voor identificatie van *Brenneria salicis*

Voor detectie van *B. salicis* uit sap van wilgen beschikt het INBO over een gevalideerde methode. Hiervoor wordt uit het sap de bacterie geïsoleerd door uitplating op een selectief medium (GYca), wordt het DNA uit de bacterie geëxtraheerd en wordt een specifieke *Polymerase Chain Reaction-test* (PCR) uitgevoerd. De **polymerase-kettingreactie** is een manier om uit zeer kleine hoeveelheden DNA (enkele moleculen) specifiek een of meer gedeeltes te multipliceren (amplificeren) tot er genoeg van is om het te analyseren.

1.3.1 Proefopzet: isoleren van de bacterie, DNA-extractie en controle door validatie van de amplificatie van de specifieke PCR op agarose

1. Stalen:

Van 10 van de 21 stalen was het mogelijk om voldoende sap uit te persen om genetische analyses uit te voeren.

2. Isoleren van de bacterie:

- petriplaten met GYCA
- steriele epjes met 200 µl gedistilleerd water
- vortex
- pipettor van 200-1000 µl en bijhorende steriele tips
- Drigalski-spatel
- Van elk sapstaal wordt een vijfvoudige verdunningsreeks van 1/5 gemaakt. Telkens wordt 50 µl in 200 µl gebracht en goed gemengd met behulp van een vortex.

Falcontube



- Van elke verdunning wordt 100 µl op een GYCA-plaat gebracht en open gestreken met een Drigalski-spatel. (cfr. Protocol)
- Incubatie bij 21°C gedurende 2 – 4 dagen



- Kandidaat kolonies worden overgeënt op een GYCA-plaat

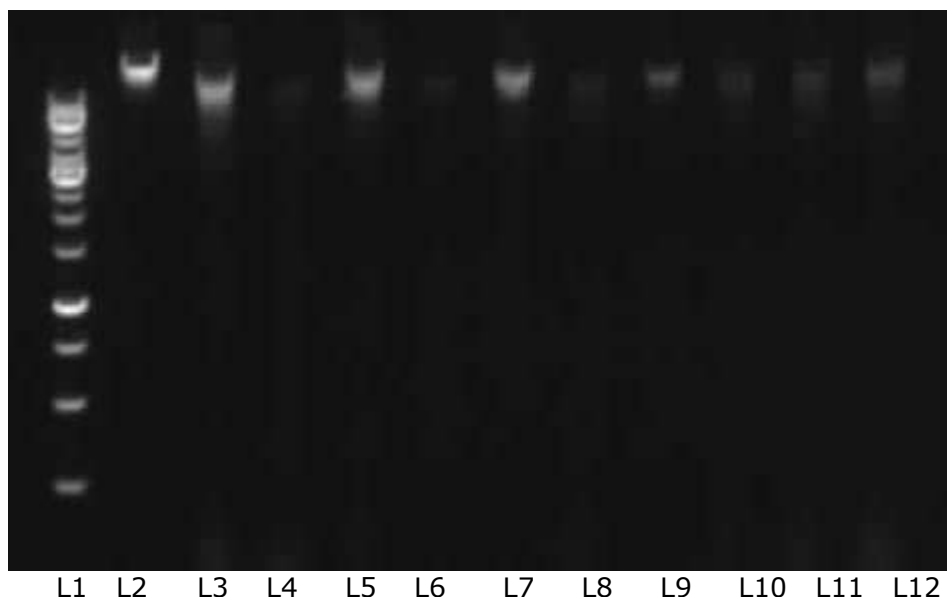
3. DNA-extractie

De goed gegroeide kolonies werden geëxtraheerd met de Blood&Tissue Kit van Qiagen. Na extractie werd de DNA concentratie spectrofotometrisch bepaald (nanodrop) en werd het DNA gecontroleerd op agarose.

In tabel 2 zijn de resultaten weergegeven van de concentratiebepaling met de spectrofotometer en in figuur 2 de resultaten van het DNA op agarosegel.

Tabel 2: Bepaling van de DNA concentratie met de spectrofotometer.

Labo_ID	Concentratie	A260/A280
C/11/5087_111	311	1.8
C/11/5089_111	206.7	1.7
C/11/5090_111	59.2	1.9
C/11/5091_111	11.3	2.3
C/11/5091_211	28.2	1.8
C/11/5092_111	103.7	1.8
C/11/5093_111	11.4	2.1
C/11/5094_111	74.9	1.7
C/11/5095_111	282.6	1.6
C/11/5096_111	308.3	1.6



Figuur 2: bepaling van DNA op agarose, met L1: mixladder, L2: referentie voor DNA concentratie 25 ng/μl, L3 – L12: stalen (volgorde zie tabel 2).

4. Meting: PCR-bepaling

De PCR reactie werd uitgevoerd met een simplex-PCR. De PCR-reactie is met een standaardprogramma uitgevoerd (zie tabel 3). De reactie werd uitgevoerd op verdund DNA (5 à 10 ng/μl). Het gevolgde recept voor de PCR-mix is weergegeven in tabel 4. Bij het uitvoeren van de PCR is ook een referentiestaal (LMG6151) en een blanco meegenomen. Het te verwachten fragment heeft een grootte van ongeveer 550 baseparen. De primers gebruikt bij de simplex-PCR zijn:

forward primer es1a 12μM: **Es1a (5' to 3') GCG GCG GAC GGG TGA GTA AA**
reverse primer es4b 12μM: **Es4b (5' to 3') CTA GCC TGT CAG TTT TGA ATG CT**

Tabel 3: instelling van de PCR reactie

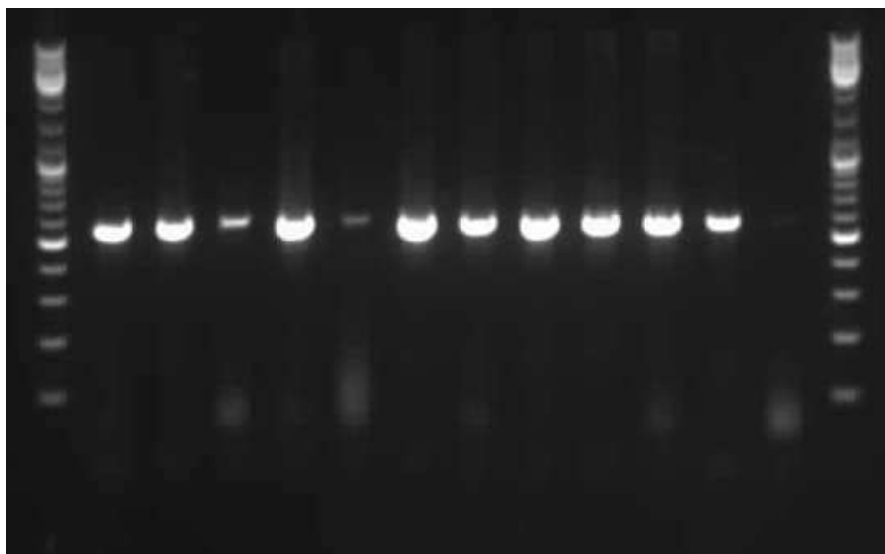
PCR programma (PTC100/MAIN/BREN):		
5'		95°C
35x	25"	95°C
	15"	60°C
	15"	72°C
10'	72°C	
	4°C	

Tabel 4: samenstelling PCR-mix.

produkten	Volume (µl)	Concentratie
MILLIQ, steriel	8,50	-
Taq Buffer met KCl (10x)	3,00	1x
Forward primer (12 µM)	0,40	0,24 µM
Reverse primer (12 µM)	0,75	0,24 µM
dNTP (10 mM)	0,75	375 µM
Taq polymerase (5U/µl)	0,20	1 U
MgCl ₂ (25 mM)	1,20	1,5 mM
Template DNA	5	-
Totaal	20	-

De blanco en de referentie werden correct geanalyseerd. Bij alle onderzochte stalen werd duidelijk amplificatieproduct gevonden, behalve voor C/11/5091_111. Hiervoor is het amplificatieproduct zwak, wat meestal duidt op menging van 2 bacteriesoorten. (zie figuur 3).

Restrictie met Dde-enzym zal bevestiging geven.

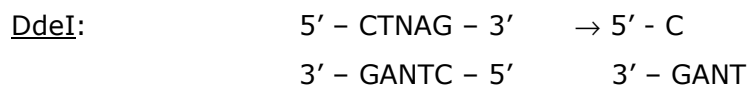


L1 L2 L3 L4 L5 L6 L7 L8 L9 L10 L11 L12 L13 L14

Figuur 3: controle PCR op agarose met L1: mixladder, L2: referentiestaal (LMG6151), L3 – L12: stalen (volgorde zie tabel 3), L13: blanco, L14: mixladder.

5. Restrictie met DdeI enzyme

Het bekomen PCR-product wordt in stukjes geknipt met het enzym DdeI. De restrictie is met een standaardprogramma uitgevoerd, nl. 60 min bij 37°C. De reactie werd uitgevoerd op 10 µl PCR-product. Het gevolgde recept voor de restrictie-mix is weergegeven in tabel 5. Op die manier wordt een indicatie verkregen over in welke groep *Brenneria salicis* zich situeert.



Tabel 5: samenstelling restrictie-mix.

producten	Volume (µl)	Concentratie
MILLIQ, steriel	7,00	-
Tango buffer (10x)	2,00	1x
DdeI enzym (10U/µl)	1,00	1 U
PCR-product	10 µl	-
Totaal	20 µl	-

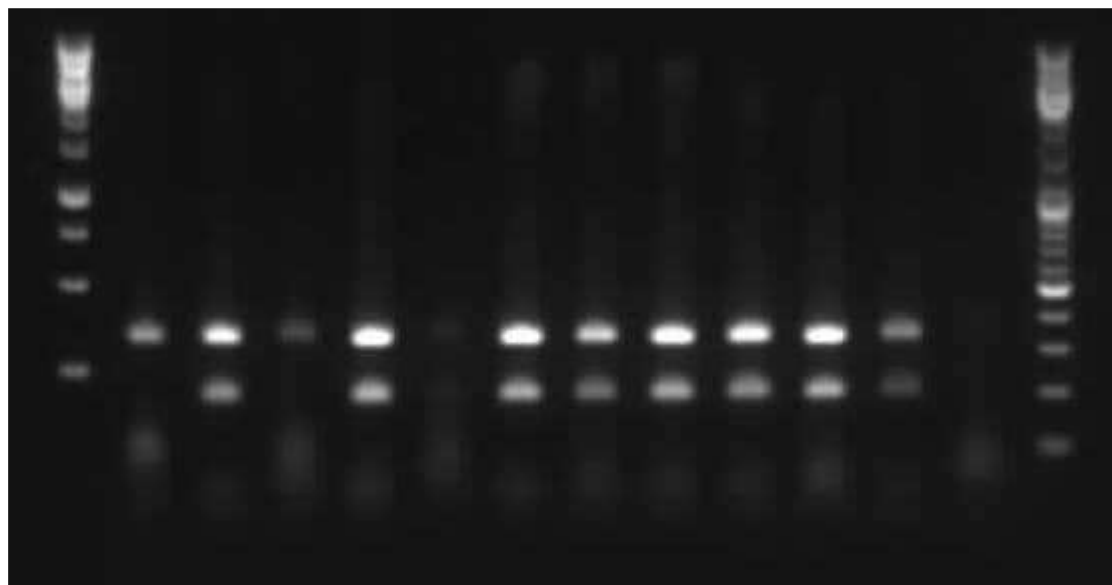
De blanco en de referentie werden correct geanalyseerd. Bij alle onderzochte stalen werden duidelijke restrictiefragmenten gevonden, behalve voor C/11/5091_111. (zie figuur 4).

Te verwachten resultaat voor stammen uit groepI: (L2 en L4)

4 restrictiefragmenten: 333bp, 106bp, 88bp en 27bp*

Te verwachten resultaat voor stammen uit groepIII: (L3, L5, L7 tot en met L12)

3 restrictiefragmenten: 333bp, 194bp en 27bp



Figuur 4: controle restrictie op agarose met L1: 1 kb ladder, L2: referentiestaal (LMG6151), L3 – L12: stalen (volgorde zie tabel 3), L13: blanco, L14: mixladder.

Alle onderzochte stalen zijn duidelijk positief voor *Brenneria salicis*,
behalve C/11/5091_111, die geen restrictiefragmenten vertoonde wegens een
menging van 2 bacteriesoorten. (analyse 2x uitgevoerd)

CONCLUSIE

Op het terrein is vastgesteld dat 74 van de 76 bomen uitwendige symptomen van de watermerkziekte vertoonden. Ter bevestiging van de visuele terreindiagnose werden kwalitatieve genetisch analyses uitgevoerd voor de detectie van *Brenneria salicis*. Deze bacterie wordt als ziekteverwekker van de watermerkziekte beschouwd. Een steekproef van 21 bomen werd bemonsterd en 10 stalen hiervan geanalyseerd. Allemaal (behalve één met een menging van bacteriesoorten) waren drager van *Brenneria salicis*. Watermerkziekte wordt dan ook als de hoofdoorzaak van de vastgestelde symptomen en van de boomaftakeling aanzien.

De ziekte lijkt algemeen voor te komen in dit bestand. Het is aannemelijk dat de bomen die nog geen ziektesymptomen ontwikkeld hebben eveneens ziek zijn. De boomconditie zal waarschijnlijk verder afnemen. Hiertegen is geen bestrijding mogelijk.

Minstens in een eerste fase is het aangewezen om de zwaarst aangetaste bomen, met meer dan 50% verdroogde bladeren (\geq score3), te kappen. Omwille van de algemene aanwezigheid van de watermerkziekte op deze site, is een andere en meer aanbevolen oplossing om alle 76 bomen te kappen.

REFERENTIES

Hauben L., Steenackers M. and Swings J. PCR-based detection of the causal agent of watermark disease in willow (*Salix* spp.). *Appl. Environm. Microbiol.* 64, pp. 3966-3971 (1998)