

BACTERIEKANKER BIJ STEENVRUCHTEN¹⁾

II. DE IDENTITEIT VAN *PSEUDOMONAS MORS-PRUNORUM* WORMALD EN *PSEUDOMONAS SYRINGAE* VAN HALL

With a summary: Bacterial canker of stone fruits

II. On the identity of Pseudomonas mors-prunorum Wormald and Pseudomonas syringae van Hall

DOOR

A. FUCHS ²⁾

De symptomen van bacteriekanker werden voor het eerst duidelijk beschreven door GRIFFIN (1911) en BARSS (1918); de eerstgenoemde auteur gaf aan de verwekker ervan ook zijn naam: *Pseudomonas cerasus*, later verbeterd in *Pseudomonas cerasi*.

Aanvankelijk onafhankelijk van deze Amerikaanse onderzoekingen, beschreef WORMALD in een reeks van publikaties de symptomen en verwekkers van bacteriekanker, zoals deze in Engeland optreden. Hij onderscheidde daarbij een tweetal micro-organismen, door hem onder de namen *Pseudomonas prunicola* (1930, 1938) en *Pseudomonas mors-prunorum* (1932, 1938) beschreven. Beide bacteriën kunnen – althans bij kers en pruim – alle symptomen van bacteriekanker veroorzaken, hoewel *Pseudomonas prunicola*, wat pruimebomen betreft, slechts uit verwelkte groene scheuten geïsoleerd kon worden (WORMALD, 1930). Kunstmatige inoculaties met laatstgenoemde bacterie gaven hier echter ook in andere delen der bomen een positief resultaat.

WILSON noemt in zijn onderzoekingen aanvankelijk (1933) *Pseudomonas cerasi* en *Pseudomonas prunicola* – die hij als een variëteit van de eerste soort beschouwt (*Pseudomonas cerasi* var. *prunicola*) – als mogelijke verwekkers van alle symptomen van bacteriekanker bij abrikoos, amandel, kers, nectarijn, perzik en pruim. In latere publikaties (1936, 1940) spreekt hij echter als zijn overtuiging uit, dat deze soorten alle aan elkaar gelijk zijn en identiek met de door VAN HALL (1902) beschreven soort *Pseudomonas syringae*. Hierbij sluiten andere auteurs (CROSSE, 1954; DYE, 1954) zich tegenwoordig aan, zodat thans voor het optreden van bacteriekanker gewoonlijk twee bacteriesoorten verantwoordelijk gesteld worden: *Pseudomonas mors-prunorum* WORMALD en *Pseudomonas syringae* VAN HALL.

Het was het doel van dit onderzoek, na te gaan, of deze beide bacteriesoorten ook als de veroorzakers van de in ons land geconstateerde symptomen van bacteriekanker (FUCHS et al., 1957) kunnen worden onderscheiden.

DE ISOLATIE VAN DE VOOR BACTERIEKANKER VERANTWOORDELIJKE ORGANISMEN

De wijze van isolering liep al naar de aard van het materiaal enigszins uiteen. Bij isolaties uit stam- en takkankers werden op de grens van aangetast en ge-

¹⁾ Aangenomen voor publikatie 20-2-1957.

²⁾ Thans werkzaam op het Laboratorium voor Microbiologie, Delft.

zond weefsel oppervlakkig stukken van de bast¹⁾ verwijderd. De cortex en het phloeem zijn op deze plaatsen bruin gekleurd; veelal wordt gom uitgeperst. Na een ontsmetting van het buitenoppervlak met 96 %-ige alcohol en verwijdering der buitenste kurklagen werden kleine stukjes uitgesneden en uitgelegd op platen met peptonagar-5 % saccharose. Daarnaast werden aangetaste weefselstukjes in steriel water gesuspenderd, waarna uit de suspensie op platen van gelijke samenstelling werd afgestreken. Indien de bacteriën uit de bladvlekken moesten worden geïsoleerd, geschiedde dit het eenvoudigst door het blad even in 96 %-ige alcohol onder te dompelen en daarna de aangetaste delen „ruim” uit te snijden en in stukjes te verdelen. De stukjes werden terstond op platen peptonagar-5 % saccharose uitgestrooid of wel in steriel water gesuspenderd, waarna uit deze suspensie werd afgestreken op platen van dezelfde samenstelling.

Er werd altijd gecultiveerd bij ca 23°C.

Na enkele dagen werden bij dergelijke isolaties op het bovengenoemde voedingsmedium vrij snel groeiende kolonies van bacteriën aangetroffen, die zich door hun slijmig uiterlijk en fijne radiaire structuur op deze voedingsbodem zeer gemakkelijk lieten herkennen. Deze kolonies waren in de meeste gevallen in de meerderheid; daarnaast traden ook kolonies van niet-slijmvormende bacteriën en schimmels op. Omdat van de verwekkers van bacteriekanker bekend is, dat zij op saccharose bevattende peptonagar slijmvormende kolonies vormen, door een radiaire structuur gekenmerkt, werden slechts dergelijke kolonies in reincultuur gebracht. Het reinkweken geschiedde op de gebruikelijke wijze; reincultures werden op peptonagar-2 % glycerine of peptonagar aangehouden.

DE GEÏSOLEERDE STAMMEN

Uit kerse-, perzik- en pruimebomen werden vele bacteriestammen geïsoleerd, die aan het bovengestelde criterium van slijmvorming en het bezit van een radiaire structuur bij cultivering op peptonagar-5 % saccharose voldeden. Niet alle stammen zijn echter pathogeen gebleken; van diegene, die bij inoculatie in bladeren van één of meer der volgende rassen: (kers) Franse Wijnkers, Varikse Zwarte; (perzik) Wassenberger en (pruim) Ontario laesies bleken te veroorzaken, werd een 10-tal nader onderzocht. Isoleringsdatum en herkomst van deze stammen zijn de volgende:

Nr.	datum	herkomst
1	30-5-'53	eenjarige scheut pruim (Ontario) (Wageningen)
2	9-6-'53	bladschijf kers (ras onbekend) (Bemmel)
3	10-7-'53	bladschijf kers (ras onbekend) (Bemmel)
4	2-6-'54	takkanker pruim (Ontario) (Wageningen)
5	14-6-'54	takkanker pruim (Ontario) (Wageningen)
6	14-6-'54	takkanker pruim (Ontario) (Wageningen)
9	6-7-'54	bladschijf kerse-onderstam (ras onbekend) (Opheusden)
11	21-7-'54	bladschijf pruim (Ontario) (Kerkdriel)
12	21-7-'54	bladsteel pruim (Ontario) (Kerkdriel)
14	10-8-'54	bladschijf perzik (Wassenberger) (Wageningen)

Daarnaast werden nog stammen geïsoleerd uit bladeren en tak- en stamkan-

¹⁾ Niet op te vatten in plantenanatomische zin.

kers van verschillende kersebomen (Early Rivers, c.a.; Malden, Wageningen); hiertoe behoort een stam op 10 Augustus '54 geïsoleerd uit een takkanker van een kers (Early Rivers (?); Wageningen).

DE DETERMINATIEKENMERKEN DER ONDERZOCHEDE STAMMEN

Van de 10 bovengenoemde stammen werd nu vervolgens nagegaan in hoeverre hun kenmerken overeenkomen met de voor het geslacht *Pseudomonas* en de daartoe behorende soorten *Pseudomonas mors-prunorum* en *Pseudomonas syringae* in *BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology* (6th ed., 1948) genoemde eigenschappen.

Alle stammen zijn beweeglijk, niet sporevormend, staafvormig, obligaat aëroob met polaire cilien.

Ze vormen alle onder bepaalde omstandigheden een groen fluorescerend pigment, hoewel de verscheidenheid hierin onder de verschillende stammen zeer groot is.

De stammen 2, 3, 5, 6, 9 en 14 vervloeien gelatine wèl, de andere niet in steekcultuur bij 18°C. Volgens *BERGEY* vervloeit zowel *Pseudomonas mors-prunorum* als *Pseudomonas syringae* gelatine; ook *WORMALD* signaleert echter een verscheidenheid in deze eigenschap.

De kolonies op pepton- en bouillonagarmedia zijn wit tot beigewit, glanzend, glad en rond.

In bouillon-5% saccharose is de groei sterk en geeft tot een dichte, witte troebeling aanleiding.

Geen der stammen vormt binnen 14 dagen nitriet in bouillon-0,1% KNO_3 .

Alle stammen produceren (soms zwak) zuur in peptonwater-1% fructose, glucose en saccharose; gasvorming treedt niet op bij anaërobe cultivering in media met fructose, glucose, glycerine, inuline, lactose, mannitol, raffinose en saccharose. In dit verband werd nog nagegaan, welke pH-veranderingen in bouillon (Difco nutrient broth)-media met resp. 1% glucose, 1% glycerine, 1% lactose en 1 en 5% saccharose in 4 dagen optreden; ter vergelijking werd eveneens in bouillonmedia zonder toevoeging van suikers geënt. In tabel I zijn de resultaten van een aantal isolaties weergegeven. Het is duidelijk, dat in media met glucose en saccharose een aanzienlijke verlaging der pH optreedt, terwijl glycerine en lactose onder dezelfde omstandigheden – althans aanvankelijk – geen pH-verlaging bewerkstelligen.

TABEL I. pH-veranderingen in een aantal Difco-bouillonmedia, opgetreden binnen 4 dagen na enting; het eerste getal duidt de pH van het niet geënte medium aan

TABLE I. pH-changes in different Difco nutrient broth media, within 4 days after inoculation; the first number indicates the pH at the beginning.

Cultuurmedium (Culture medium)	Bacteriestammen (Bacterial strains)				
	2	5	9	12	14
bouillon	6,5-7,8	6,5-8,0	6,5-7,8	6,5-8,0	6,5-8,0
bouillon-1% glucose	6,7-4,6	6,7-3,9	6,5-4,1	6,5-3,9	6,5-4,9
bouillon-1% glycerine	6,9-7,9	6,9-7,3	6,5-7,4	6,5-6,8	6,5-7,0
bouillon-1% lactose	6,8-8,0	6,8-8,4	6,4-8,1	6,4-7,9	6,4-8,0
bouillon-1% saccharose	6,9-4,5	6,9-5,5	6,5-4,2	6,5-6,6	6,5-5,5
bouillon-5% saccharose	6,8-4,7	6,8-3,9	6,4-4,2	6,4-3,9	6,4-5,5

Geen der stammen hydrolyseert zetmeel (bouillonagar-0,2 % zetmeel).

Uit de verkregen gegevens kan worden geconcludeerd, dat de verschillende stammen wel is waar ten aanzien van een aantal kenmerken een zekere verscheidenheid vertonen (zie p. 51), doch alle zonder bezwaar tot één der beide soorten *Pseudomonas mors-prunorum* en *Pseudomonas syringae* kunnen worden gerekend.

Omdat door een aantal auteurs (WORMALD, 1932, 1938; CROSSE, 1953) aan de verschillen tussen deze soorten veel waarde wordt gehecht, is naar de onderscheidende kenmerken een nader onderzoek ingesteld. Gemakshalve is daarom de tabel, waarin WORMALD (1932) de verschillende eigenschappen van deze beide bacteriën samenvat, hier gereproduceerd en aangevuld met gegevens van DOWSON (1949) en CROSSE (1953) (Tabel II).

TABEL II. Kenmerken, waarin *Pseudomonas mors-prunorum* en *Pseudomonas syringae* van elkaar verschillen ¹⁾

TABLE II. Characteristics in which *Pseudomonas mors-prunorum* and *Pseudomonas syringae* differ from each other (see WORMALD, 1932 and CROSSE, 1953)

Bacteriesoort Cultuurmedium	<i>Pseudomonas mors-prunorum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
Difco nutrient broth + 5 % saccharose	wit, troebel	geelachtig, meer doorschijnend
Difco nutrient agar + 5 % saccharose	snelle zuurproductie; bacteriën binnen 4-6 dagen afstervend	langzame zuurproductie; bacteriën blijven verscheidene weken in leven
Difco nutrient agar + 2 % lactose + BCP ²⁾	eerst alkalisch (paars), later zuur wordend, waarbij kleuromslag naar geel optreedt	alkalisch blijvend, dus geen kleuromslag naar geel
Uschinsky's medium ³⁾	indien groei optreedt, geen of zeer zwak gele kleur	duidelijk gele kleur
Mineraal medium + 1 % lactose en idem + 1 % maltose ⁴⁾	pH-verlaging in lactose > maltose	pH-verlaging in lactose < maltose

¹⁾ DOWSON (1949) geeft in tegenstelling tot andere auteurs aan, dat zetmeel door *Pseudomonas mors-prunorum* niet, door *Pseudomonas syringae* daarentegen wel wordt gehydrolyseerd.

²⁾ BCP = broomcresolpurper; gebruikt wordt 1 ml van een 1,6 % alcoholische oplossing per liter medium.

³⁾ De door WORMALD gebruikte samenstelling van dit medium wordt door hem niet vermeld.

⁴⁾ De pH-verlaging betreft die, binnen 28 dagen optredend in een medium van de volgende samenstelling (DOWSON, 1949):

(NH ₄)H ₂ PO ₄	0,1 %	pH 7,0 (door toevoeging van 1 N Na ₂ CO ₃)
KCl	0,02 %	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,02 %	

in aqua dest.

Hieraan wordt resp. 1 % lactose en 1 % maltose toegevoegd (CROSSE, 1953).

Ten behoeve van deze nadere identificatie werden alle onderzochte stammen daarom geënt op Difco nutrient agar + 2 % lactose + broomcresolpurper. Alle stammen, behalve 14, brachten hierin binnen 7 dagen – stam 5 na iets langer tijd – een kleuromslag naar geel teweeg. Op grond hiervan en op grond van het feit, dat de genoemde stammen, behalve 14, in bouillon-5 % saccharose een snelle zuurproductie veroorzaken, zou men tot de conclusie kunnen komen, dat alle stammen met uitzondering van stam 14 tot *Pseudomonas mors-prunorum* behoren; laatstgenoemde zou dan tot *Pseudomonas syringae* moeten worden

gerekend. Dat zou betekenen, dat *Pseudomonas mors-prunorum* behalve in Engeland, ook in Nederland uit door bacteriekanker aangetaste *Prunus*-soorten kan worden geïsoleerd¹⁾.

Het feit evenwel, dat alle stammen ook na een week nog levenskrachtig waren op 5% saccharose bevattende peptonagarmedia maakte deze conclusie minder zeker, hoewel moet worden opgemerkt, dat reeds ERIKSON (1945) constateerde, dat de vitaliteit van *Pseudomonas mors-prunorum* op saccharose bevattende peptonagarmedia sterk afhankelijk is van de verdere samenstelling van de voedingsbodem: alleen „nutrient heart broth agar” + 5% saccharose had snel afsterven der bacteriën ten gevolge (na 8–12 dagen); op B.D.H. peptonagar + 5% saccharose waren zowel *Pseudomonas mors-prunorum* als *Pseudomonas syringae* na 20–30 dagen nog levenskrachtig.

Na een jaar werden alle stammen – na een aantal overentingen op peptonagar-2% glycerine of peptonagar – nog eens met elkaar vergeleken.

In Dowson's mineraal medium + 1% lactose en 1% maltose werd in alle gevallen een – meestal zeer geringe – pH-verlaging geconstateerd; alle stammen, behalve 5 en 6, brachten in lactose een iets sterkere pH-verlaging teweeg dan in maltose. De pH-veranderingen, door de stammen 5 en 6 veroorzaakt, waren onderstaande:

	lactose	maltose
stam 5	7,2 → 6,8 a); 7,1 → 6,6 b)	7,1 → 6,1 a); 7,0 → 6,1 b)
stam 6	7,2 → 6,8 a); 7,1 → 6,4 b)	7,1 → 5,5 a); 7,0 → 5,4 b)

a) na 28 dagen; b) na 30 dagen

In Uschinsky's medium, waarvan de gebruikte samenstelling in zoverre van die gegeven door DUNEGAN (1932) afweek, dat in plaats van Na-asparaginaat een gelijke hoeveelheid asparagine gebruikt werd, bleken alle stammen te groeien onder vorming van een lichtgroen fluorescerend pigment. De pH steeg in 14 dagen tot 8,1–8,4.

Bij enting op Difco nutrient agar + 2% lactose + broomcresolpurper werd nu nog slechts door de stammen 1, 2, 3 en 4 een kleuromslag naar geel teweeggebracht (op 1% lactose trad geen kleurverandering op). Daarom werd nagegaan of en in hoeverre wel op hogere percentages lactose (tot 5%) kleuromslag binnen de tijdsduur van het experiment – 28 dagen – optrad; het resultaat is in Tabel III vermeld.

Hieruit blijkt, dat alle stammen op 4 en 5% lactose nog wèl, doch op lagere percentages nièt meer alle een geelkleuring veroorzaken, zoals eerder werd vastgesteld; geen der stammen geeft een kleuromslag op 1% lactose.

Bij enting op Difco nutrient agar + 5% saccharose bleken de stammen 1, 2, 3 en 4 nog niet na een week, doch wel na 14 dagen hun vitaliteit te hebben verloren. De andere stammen waren echter toen nog levenskrachtig.

¹⁾ Waarschijnlijk ten gevolge van een onjuiste weergave van literatuurgegevens door DOWSON (1949) geeft ook CROSSE (1954) aan, dat *Pseudomonas mors-prunorum* eveneens in Zweden en Australië voorkomt; in beide gevallen (BJÖRLING & NILSSON, 1945; MILLTHORPE & VINCENT, 1946) is hier, zoals ook in de Verenigde Staten (WILSON, 1933) en Nieuw-Zeeland (DYE, 1954) van *Pseudomonas syringae* (*Ps. cerasi* var. *prunicola*, *Ps. prunicola*) sprake.

TABEL III. Aantal dagen, waarna een kleuromslag naar geel is opgetreden, bij cultivering der stammen 1-14 op Difco nutrient agar met stijgende lactose-concentraties en broomcresolpurper als indicator

TABLE III. Number of days after which a colour change to yellow was shown, on cultivation of 10 strains of the bacterial canker organism on Difco nutrient agar with increasing lactose concentrations and bromocresol purple as an indicator

Stammen (Strains)	1	2	3	4	5	6	9	11	12	14
1 % lactose	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2 % lactose	6	2	2	8	—	—	—	—	—	—
3 % lactose	4	2	2	2	—	6	12	—	6	6
4 % lactose	2	2	2	4	4	4	4	6	2	4
5 % lactose	2	2	2	2	4	2	2	4	2	4

De kenmerken, op grond waarvan *Pseudomonas mors-prunorum* en *Pseudomonas syringae* worden onderscheiden, blijken dus bij lang aanhouden der stammen niet altijd constant te zijn; terwijl bijv. de stammen 5 en 6 op grond van de eerst verkregen gegevens tot *Pseudomonas mors-prunorum* zouden moeten worden gerekend, wijzen de laatste resultaten er op, dat deze stammen tot de soort *Pseudomonas syringae* behoren. Er kan aan dit soortonderscheid dan ook geen betekenis worden gehecht.

ENKELE ANDERE KENMERKEN DER ONDERZOCHE STAMMEN

Op saccharose bevattende agarmedia vertonen de kolonies van alle stammen een zeer duidelijke radiaire structuur, terwijl ze bovendien in staat zijn tot vorming van belangrijke hoeveelheden „bacterieslijm” op deze media. Dit slijm is een laevulan, een polymerisatieproduct van fructofuranose (COOPER & PRESTON, 1935; ERIKSON, 1945; GILBERT & STACEY, 1948; BELL & DEDONDER, 1954). Deze laevulanen worden alleen gevormd uit die di-, tri- en tetrasacchariden, die een eindstandige fructofuranose-groep bezitten (saccharose, raffinose, stachyose, e.d.).

Bij cultivering van de onderzochte stammen op peptonagar met andere suikers dan saccharose, en wel met 5 % arabinose, fructose, galactose, lactose en maltose trad dan ook geen slijmvorming op. Hierbij deed zich overigens het verrassende feit voor, dat alleen de beide disacchariden (lactose en maltose) in alle gevallen een duidelijke groei verzekerden; op de arabinose en fructose bevattende media vertoonde geen der stammen enige groei, terwijl op galactose alleen de stammen 2, 4, 5, 6 en 14 geringe groei te zien gaven; op glucose groeiden alle stammen, behalve 1 en 11. Omdat de groei op peptonagar zonder toevoeging van suikers in alle gevallen zeer goed was, moet aan de hoge percentages arabinose en fructose – en in een aantal gevallen ook aan galactose en glucose – klaarblijkelijk een groeiremmende invloed worden toegeschreven; in laag percentage gegeven (1 %) kunnen alle genoemde suikers daarentegen zelfs als enige C-bron worden toegediend (ERIKSON, 1945). Een overeenkomstig verschijnsel werd door COOPER & PRESTON (1935) geconstateerd; zo oefenen 7½ % arabinose, mannose en in mindere mate ook galactose een groeiremmende invloed op een aantal laevulanvormende bacteriën uit. In ons geval is intussen gebleken, dat in geschudde vloeistofcultures een snelle aanpassing aan deze hogere suikerconcentraties optreedt.

Gebleken is, dat geen van deze andere suikers een radiaire structuur der kolonies teweegbrengt en dat de bacteriën op elk der met deze suikers bereide media gedurende lange tijd levenskrachtig zijn, uiteraard waar van enige groei sprake is.

Wat de oorzaken der spoedige sterfte op saccharose betreft, zijn vooral door ERIKSON (1945) enkele hypothesen geuit. De zuurvorming is vermoedelijk niet de verantwoordelijke factor, want ook op glucose, dat niet tot een vroeg afsterven aanleiding geeft, treedt – zoals wij boven zagen een vaak nog sterkere – zuurvorming op. Ook de laevulanvorming acht ERIKSON niet de oorzaak van dit feit; raffinose leidt niet tot een zo vroegtijdig afsterven der bacteriën. Bovendien bleek in ons onderzoek een mineraal medium met saccharose wel tot laevulanvorming, doch niet tot de snelle dood van elk der onderzochte stammen aanleiding te geven. ERIKSON besluit met te zeggen, dat de verminderde vitaliteit waarschijnlijk een gevolg is van de bijproducten in het meer complexe „nutrient heart broth” medium.

DE VERSCHIEDENHEID DER ONDERZOCHE STAMMEN

Duidelijk is hierboven de grote verscheidenheid tussen de door ons geïsoleerde stammen gebleken. Wij resumeren een aantal bijzonderheden ten dien aanzien en laten nog enkele andere volgen.

1. Er zijn – zoals hierboven reeds werd opgemerkt – vrij grote verschillen in groei op 5% galactose en glucose bevattende peptonagarplaten.
2. Zeer groot zijn verder de verschillen in de vorming van een geelachtig groen, soms sterk fluorescerend pigment in vele vaste en vloeibare media. Terwijl het in sommige geheel achterwege blijft, kan de vorming ervan in een ander medium zeer evident zijn. Doch niet alleen ten aanzien van de verschillende media, ook onderling tonen de tien stammen hierin een grote verscheidenheid. Het meest treedt de pigmentvorming daarbij in synthetische media op, doch kan ook hierin achterwege blijven.
3. De grote verscheidenheid in het vermogen tot gelatinevervloeiing werd ook door WORMALD (1932)esignaleerd.
4. Ook ten aanzien van de zuurvorming in verschillende media tonen de diverse stammen grote onderlinge verschillen. In suikerhoudende bouillon-media variëren de optredende pH-veranderingen sterk, zoals uit Tabel II blijkt. Dit geldt in het bijzonder voor bouillon-1% saccharose: in tegenstelling tot de stammen 5, 6, 11, 12 en 14 laten de andere een snelle zuurvorming zien. In 5% saccharose treedt bij alle stammen – met uitzondering van stam 14 – een snelle pH-daling op. Stam 5 en 6 onderscheiden zich van de andere door sterkere zuurvorming in maltose- dan in lactose-bevattende media.
5. Opvallend is het feit, dat laatstgenoemde stammen zich bovendien onderscheiden door de vorming van een zeer sterk huidje in bouillon-1% glycerine.

Niet alleen ten aanzien van de kenmerken, waarin *Pseudomonas mors-prunorum* en *Pseudomonas syringae* zich volgens WORMALD onderscheiden, doch ook in andere blijkt er dus een grote verscheidenheid te bestaan. Het lijkt bij een dergelijke verscheidenheid in eigenschappen tussen de verschillende stammen niet verantwoord aan de verschillen, die er tussen *Pseudomonas mors-prunorum* en

Pseudomonas syringae in de differentiërende kenmerken bestaan, grote betekenis toe te kennen, te meer niet, omdat ook deze verschillen in genen dele een constant karakter dragen.

INOCULATIEPROEVEN EN HERISOLATIES

Om de pathogeniteit der verschillende stammen en de door deze veroorzaakte ziektesymptomen te onderzoeken, en tevens om de gevoeligheid van een aantal kerse-, perzik- en pruimerassen na te gaan, werden een groot aantal inoculatieproeven verricht. Daartoe werden de bacteriën, na 3 dagen groei op peptonagar-5% saccharose, met een entnaald op de boven- en onderzijde van bladeren gebracht, en wel op 20 plaatsen, in 4 rijen van 5 ter weerszijden van de middennerf gelegen. In sommige gevallen werd de bladschijf van te voren op deze plaatsen aangeprikt; in andere gevallen werd zonder voorafgaand prikken geënt. Alle hier besproken inoculaties hadden in de boomgaard plaats; de behandelde bladeren werden niet op een of andere wijze ingehuld. Na 13 dagen werd elke proef als geëindigd beschouwd.

Reeds na enkele dagen ontstonden bruine, soms (perzik) enigszins paars-bruine, laesies, bij het pruimeras Ontario door een lichtgroene zone omgeven; enige dagen na het verschijnen van de laesies kunnen de bruingeworden plekken uitvallen, zodat hagelschot ontstaat (vooral bij perzik).

Gebleken is, dat Ontario een gevoeliger ras is dan Reine Claude d'Oullins; de gekozen kerse- (Franse Wijnkers, Varikse Zwarte) en perzikrassen (Wassenberger, op eigen wortel en onderstam Gele Kroosjespruim) zijn alle zeer gevoelig.

Indien de bladeren van te voren zijn aangeprikt, geven zowel de inoculaties aan de boven- als aan de onderzijde van de bladschijf tot laesies aanleiding, hoewel de laatste gewoonlijk uitgebreider zijn; niet aangeprikte bladeren vertonen alleen laesies, indien aan de onderzijde wordt geënt. Dit houdt verband met de aanwezigheid der stomata aan de onderzijde van het blad; door deze stomata immers dringen de bacteriën in de bladschijf door (CROSSE, 1954, 1955, 1956; FUCHS et al., 1957). Deze inoculaties leverden tot laat in het seizoen een positief resultaat; zo konden bladeren van kers, perzik en pruim nog eind Augustus met succes worden geïnoculeerd. Isolaties uit kers, perzik en pruim bleken in al deze steenvruchten laesies te veroorzaken.

In alle gevallen, waarin getracht werd de bacterie uit geïnoculeerde bladeren te herisoleren, zijn de pogingen daartoe geslaagd. Meestal waren daarbij de kolonies met een duidelijk radiaire structuur in de meerderheid, hoewel ook andere bacteriën en schimmels veelvuldig voorkwamen.

Alle 10 stammen gedroegen zich, wat hun pathogeniteit en het opgetreden ziektebeeld betreft, volkomen gelijk, zodat de onderzochte stammen niet alleen morfologisch en fysiologisch, doch ook phytopathologische identiek geacht kunnen worden.

DE VERWANTSCHAP VAN *PSEUDOMONAS SYRINGAE* MET ANDERE BACTERIESOORTEN

Evenals *Pseudomonas mors-prunorum* vertoont een groot aantal onder zeer uiteenlopende namen beschreven bacteriën (*Bacterium matthiolae* BRIOSI & PAVARINO (1912), *Bacterium citriputeale* SMITH (1913), *Bacterium citrarefaciens*

LEE (1917), *Bacterium nectarophila* DOIDGE (1917), *Bacterium hibisci* NAKATA & TAKIMOTO (1923), *Bacterium trifoliorum* JONES et al. (1923), *Bacterium vignae* GARDNER & KENDRICK (1923), *Pseudomonas viridifaciens* TISDALE & WILLIAMSON (1923), *Bacillus barkeri* BERRIDGE (1924), *Bacterium holci* KENDRICK (1926), *Pseudomonas utiformica* CLARA (1932) en *Pseudomonas rimaefaciens* KONING (1938)) een grote verwantschap met *Pseudomonas syringae*, of is daarmee wellicht zelfs identiek (BRYAN, 1928; SMITH & FAWCETT, 1930; ROSEN & BLEECKER, 1933; CLARA, 1934; WILSON, 1936; BURKHOLDER, 1938; SMITH, 1943). Al deze bacteriën tasten een groot aantal hogere planten aan, hoewel een aantal ervan een zekere „specialisatie” vertoont.

Uit een onderzoek van KRYTHE (mond. med.) is gebleken, dat bacteriën, geïsoleerd uit door bacteriekanker aangetaste *Prunus*-soorten, ook met succes konden worden geïnoculeerd in stengels van balsemien, peulen en zaadlobben van bruine boon, vruchten van citroen, zaadlobben van lupine, vruchten van peer, bladeren van rode klaver en bladeren van sering. Negatief of zeer zwak positief was het resultaat van inoculaties in boekweit, erwten, mais, melde, roos, tomaat, tuinboon, *Vigna sinensis* en violier.

Het lijkt verantwoord aan alle hier genoemde soorten de naam te geven van de voor het eerst door BEIJERINCK geïsoleerde, doch door VAN HALL (1902) beschreven soort *Pseudomonas syringae*.

DE ISOLATIE VAN *AEROBACTER LEVANICUM* HESTRIN ET AL

Naast de bovengenoemde, voor *Prunus* spp. pathogene bacteriën, werd een viertal malen een niet-pathogeen gebleken bacterie geïsoleerd, waarvan de kolonies in morphologisch opzicht sterk aan die van *Pseudomonas syringae* doen denken. Ook hier worden op saccharose bevattende agarplaten slijmige kolonies gevormd, die eveneens door een radiaire structuur zijn gekenmerkt.

Drie stammen werden uit sterk gommende kankers van door bacteriekanker aangetaste bomen geïsoleerd en wel (7) uit een takkanker van een perzik (onbekend ras; Wageningen), (8) uit de gom, door deze kanker geproduceerd en (10) uit een zeer ernstige okselkanker in een kers (Early Rivers; Malden). Een vierde stam (16) werd geïsoleerd uit een twijg van een perzik (Wassenberger; Wageningen), geïnoculeerd met stam 9.

Alle stammen zijn beweeglijk, niet sporevormend, staafvormig, facultatief aëroob met peritriche cilien.

Twee der stammen (7 en 8) vervloeien gelatine niet of soms zeer zwak de beide andere (10 en 16) niet; alle reduceren nitraat tot nitriet zowel in bouillon-0,1% KNO_3 als in nitraat als enige N-bron bevattende media. Ze vormen zuur en gas in peptonwater-1% fructose, glucose, lactose, mannitol, raffinose en saccharose; in glycerine en inuline wordt slechts zwak zuur gevormd; stam 10 wijkt hier echter af in zijn vermogen tot vorming van zuur en gas in glycerine. De schijnbare verhouding H_2/CO_2 bij vergisting van glucose is <1 , de Voges-Proskauer-reactie is positief, de methylroodtest is negatief of zwak positief (stam 7). Zetmeel wordt niet gehydrolyseerd; groei treedt op in het urinezuur- en het citraatmedium van Koser.

Op grond van bovengenoemde kenmerken konden alle stammen worden geïdentificeerd met de, voorzover ons bekend, tot nu toe slechts eenmaal, door HESTRIN et al. (1943) uit een vruchtboom, geïsoleerde en door hen beschreven *Aerobacter levanicum*.

Deze laevulanvormende bacterie kon met grote regelmaat uit tuingrond, slootwater, e.d. worden geïsoleerd in ophopingscultures met 1% kersegom en 0,1% NH_4Cl , 0,1% K_2HPO_4 en 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH ca 7,2). Na enige overentingen in hetzelfde medium en na afstrijken op peptonagar-5% saccharose konden vele stammen worden geïsoleerd, waarvan de kolonies zich op het laatstgenoemde medium onderscheidden, doordat zij slijmig en halfbolvormig waren en een radiaire structuur bezaten. Alle stammen bleken tot de soort *Aerobacter levanicum* te behoren. Geen van deze stammen bleek intussen in staat in rein-cultuur in het kersegommedium te groeien.

Naast deze laevulanvormende bacteriën werd een enkele maal uit een sterk gommende tak van een Victoria-pruimeboom een stam geïsoleerd van de dextranvormende bacterie *Leuconostoc mesenteroides* (syn. *Betacoccus arabinosaceus*); ook van deze stam bleken de kolonies slijmig en door een zeer fijne radiaire structuur gekenmerkt.

Uit door bacteriekanker aangetaste plantendelen kunnen dus tot geheel verschillende soorten behorende stammen worden geïsoleerd, die in morfologisch uiterlijk grote gelijkenis vertonen. Vooral bij herisolaties zal het dus immer noodzakelijk zijn ook andere – physiologische – kenmerken bij de determinatie te beschouwen. Dit is daarom zo belangrijk, daar kon worden vastgesteld, dat alle laevulanvormende *Aerobacter* en *Pseudomonas*-soorten (tot het laatste geslacht behoort een groot aantal phytopathogene organismen!) door een dergelijk uiterlijk zijn gekenmerkt, waarbij vooral de radiaire structuur der kolonies opvalt (FUCHS, 1956).

SAMENVATTING

Op grond van een onderzoek van een tiental door ons geïsoleerde bacteriestammen uit door bacteriekanker aangetaste kerse-, perzik- en pruimebomen kon worden vastgesteld, dat de in Tabel II samengevatte kenmerken, waarin *Pseudomonas mors-prunorum* WORMALD en *Pseudomonas syringae* VAN HALL geacht worden te verschillen, bij aanhouden op peptonagar-2% glycerine of peptonagar allermindst constant zijn. Bij inoculatie in kerse-, perzik- en pruimebladeren toonden de stammen geen enkel verschil. Aan het soortsonderscheid kan dan ook geen betekenis worden gehecht.

Bij inoculatieproeven bleken de bacteriekanker veroorzakende organismen naast *Prunus*-soorten talrijke andere planten te kunnen infecteren. Evenals *Pseudomonas mors-prunorum* kan een groot aantal andere, evenzo weinig specifieke, phytopathogene bacteriën identiek geacht worden met *Pseudomonas syringae*.

Naast deze pathogene bacterie werd in het bijzonder uit gommende kankers een niet-pathogene bacterie geïsoleerd, die identiek is gebleken met *Aerobacter levanicum* HESTRIN et al. De kolonies van deze bacterie blijken op saccharose bevattende agarmedia in morfologisch opzicht zeer sterk met de bacteriekanker veroorzakende organismen overeen te stemmen.

Het is, vooral ook bij herisolaties, niet voldoende gebleken de bacteriën naar het uiterlijk der kolonies te determineren.

SUMMARY

A number of bacterial strains were isolated from cherry, peach and plum

trees attacked by bacterial canker. The two species, *Pseudomonas mors-prunorum* WORMALD and *Pseudomonas syringae* VAN HALL, could not consistently be distinguished by cultural characteristics. All but one of these strains at first might have been identified as *Pseudomonas mors-prunorum*. However, after a number of serial transfers on peptone agar or peptone agar plus 2% glycerine it was impossible to separate them from *Pseudomonas syringae* by some differentiating characters presented by WORMALD (1932) and CROSSE (1953). Thus, these characters such as longevity on sucrose-containing agar media, colour change on Difco nutrient agar plus 2% lactose and bromcresol purple (see Table III), fluorescent green pigment production, and pH change in a basic mineral medium plus lactose and the same basic medium plus maltose varied in a completely inconstant manner.

Not only in these differentiating characteristics but also in others the isolated strains showed a great diversity.

Thus, no great reliability may be placed on such inconstant characters, in which according to WORMALD, the two species differ.

After being inoculated into the leaves of cherry, peach and plum trees all strains caused identical symptoms.

Therefore, it is impossible to separate the two species after prolonged cultivation on peptone agar media either by biochemical or by pathogenic characteristics.

The bacterial canker organism could be inoculated successfully in many plants unrelated to *Prunus* spp.; e.g. balsamine, bean, lemon, lilac, lupine, pear and red clover. Thus, the bacterial canker organism proved to be rather unspecific in its ability to infect higher plants. In these respects too it shows a certain relationship with many other bacteria, now generally included in the species *Pseudomonas syringae* (BERGEY, 6th ed., 1948). From data in the literature it can be concluded, that the species *Pseudomonas matthiolae*, *Pseudomonas nectarophila*, *Pseudomonas barkeri* and *Pseudomonas rimafaciens* can also be grouped in this species. Therefore, it seems warranted to apply the name of *Pseudomonas syringae* to all these bacteria, including *Pseudomonas mors-prunorum*.

In addition to this pathogenic bacterium another one has been isolated which could be identified as *Aerobacter levanicum* HESTRIN et al.; this bacterium which is a common saprophyte, found on cherry and plum gum, has some morphological characteristics very similar to those shown by the bacterial canker organism: both organisms, if grown on sucrose-containing agar media, are characterized by slimy, hemispherical colonies with a distinct radial structure. It was possible to enrich for *Aerobacter levanicum* in a medium containing 1% cherry gum and small amounts of inorganic salts from soil, ditch water, etc. After enrichment on the cherry gum medium, the organisms were isolated on peptone agar + 5% sucrose. It is noteworthy that although the cherry gum medium was good for enrichment, it did not support the growth of any of the strains thus isolated in pure culture.

Morphological characters of the colonies such as radial structure and slime production proved to be insufficient for determination of the isolated bacterial strains.

Gaarne zij hier dank betuigt aan Prof. Dr. A. J. P. OORT en Dr. M. H. VAN

RAALTE voor de belangstelling door hen getoond tijdens dit onderzoek, dat grotendeels werd verricht op het Laboratorium voor Phytopathologie te Wageningen. Ook Mej. Dra. J. M. KRYTHE heeft door vele adviezen dit onderzoek gesteund; bovendien stond zij een aantal gegevens ter publikatie af.

Tenslotte mag niet onvermeld blijven, dat het gehele onderzoek met een aantal resultaten werd aangevuld en afgerond op het Laboratorium voor Microbiologie te Delft. Naar wijlen Prof. Dr. A. J. KLUYVER gaat voor de door hem getoonde belangstelling mijn oprechte dank uit.

LITERATUUR

- BARSS, H. P., - 1918. Bacterial gummosis of stone fruits. Mon. Bull. Calif. Comm. Hort. 7: 121-135.
- BELL, D. J. & R. DEDONDER, - 1954. Structural re-examination of the levans formed by *Pseudomonas prunicola*, Wormald, and *Bacillus subtilis*, BG2 F1. J. Chem. Soc.: 2866-2870.
- BERRIDGE, E. M., - 1924. The influence of hydrogen-ion concentration on the growth of certain bacterial plant parasites and saprophytes. Ann. App. Biol. 11: 73-85.
- BJÖRLING, K. & L. NILSSON, - 1945. Bakteriell hagelskottsjuka på plommon. Växtskyddsnotiser, Växtskyddsanst., Stockholm, 1945: 81-84 (Abstr. Rev. App. Mycol. 25: 564-565 1946)).
- BRIOSI, G. & L. PAVARINO, - 1912. Una malattia batterica della „Matthiola annua L.” (*Bacterium Matthiolae* n. sp.). Atti della Reale Accad. dei Lincei Rend. 21: 216-220.
- BRYAN, M. K., - 1928. Lilac blight in the United States. J. agric. Res. 36: 225-235.
- BURKHOLDER, W. H., - 1938. A bacterial blight of stocks caused by *Phytomonas syringae*. Phytopath. 28: 935-936.
- CLARA, F. M., - 1932. A new bacterial disease of pears. Science 75: 111.
- CLARA, F. M., - 1934. A comparative study of the green-fluorescent bacterial plant pathogens. Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Mem. 159: 3-36.
- COOPER, E. A. & J. F. PRESTON, - 1935. Enzyme formation and polysaccharide synthesis by bacteria. Biochem. J. 29: 2267-2277.
- CROSSE, J. E., - 1953. Bacterial diseases of stone-fruit trees in Britain IX Bacteriosis of apricot. Trans. Brit. Mycol. Soc. 36: 38-45.
- , - 1954. Bacterial canker, leaf spot, and shoot wilt of cherry and plum. Ann. Rep. East Mall. Res. Sta., 1953: 202-207.
- , - 1955. Bacterial canker of stone fruits I Field observations on the avenues of autumnal infection of cherry. J. Hort. Sci. 30: 131-142.
- , - 1956. An epidemic leaf spot and spur wilt of cherry caused by *Pseudomonas mors-prunorum*. Ann. Rep. East Mall. Res. Sta., 1955: 121-125.
- DOIDGE, E. M., - 1917. A bacterial blight of pear blossoms occurring in South Africa. Ann. App. Biol. 4: 50-74.
- DOWSON, W. J., - 1949. Manual of Bacterial Plant Diseases, London.
- DUNEGAN, J. C., - 1932. The bacterial spot disease of the peach and other stone-fruits. U.S. Dept. Agric. Techn. Bull. 273: 1-53.
- DYE, D. W., - 1954. Blast of stone-fruit in New Zealand. New Zeal. J. Sci. Techn., Sec. A 35: 451-461.
- ERIKSON, D., - 1945. Certain aspects of resistance of plum trees to bacterial canker. Part I Some biochemical characteristics of *Pseudomonas mors-prunorum* (Wormald) and related phytopathogenic bacteria. Ann. App. Biol. 32: 44-52.
- FUCHS, A., - 1956. Levan synthesis by *Pseudomonas*. Nature 178: 921.
- , J. GROSJEAN, J. M. KRYTHE & TH. W. REIJENGA, - 1957. Bacteriekanker bij steenvruchten I. Symptomen en ziekteverloop bij kers en pruim. T. Plziekten 63: 33-45.
- GARDNER, M. W. & J. B. KENDRICK, - 1923. Bacterial spot of cow pea. Science 57: 275.
- GILBERT, V. E. & M. STACEY, - 1948. The constitution of a levan produced from sucrose by *Pseudomonas mors-prunorum* (Wormald), J. Chem. Soc. 1948: 1560-1561.
- GRIFFIN, F. L., - 1911. A bacterial gummosis of cherries. Science 34: 615-616.
- HALL, C. J. J. VAN, - 1902. Bijdragen tot de kennis der bakteriële plantenziekten. Proefschrift, Amsterdam.

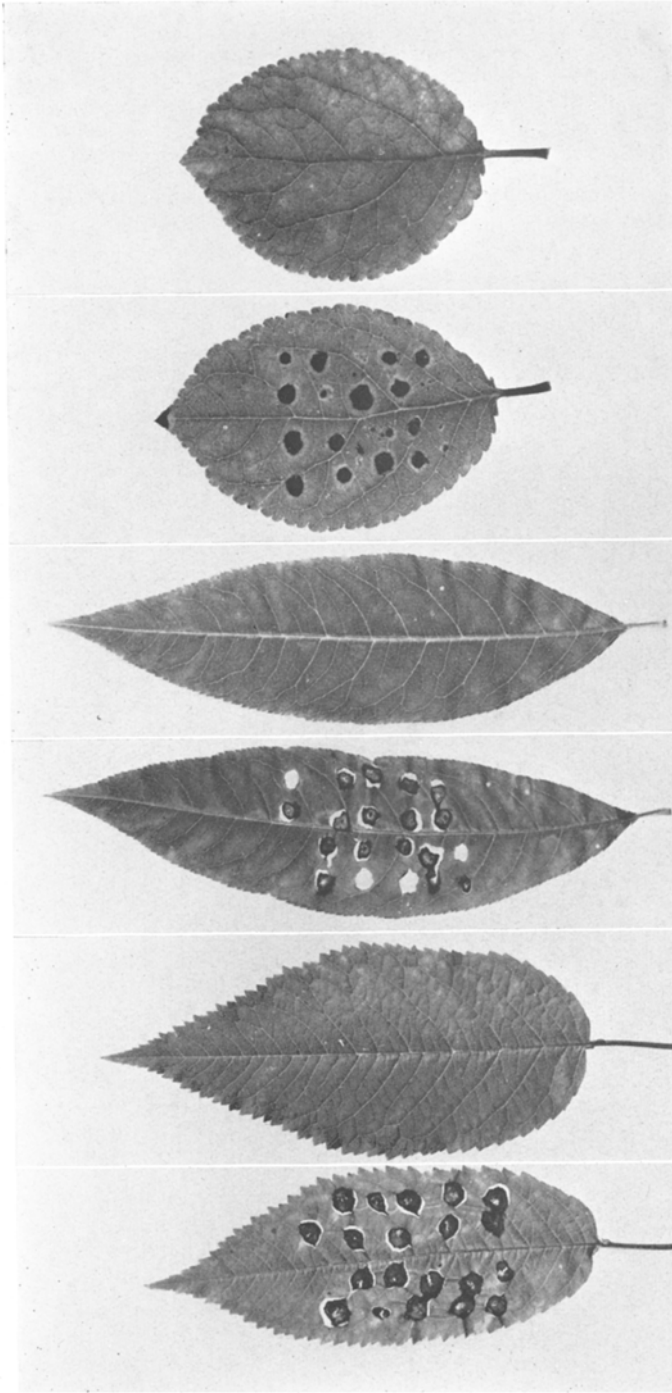
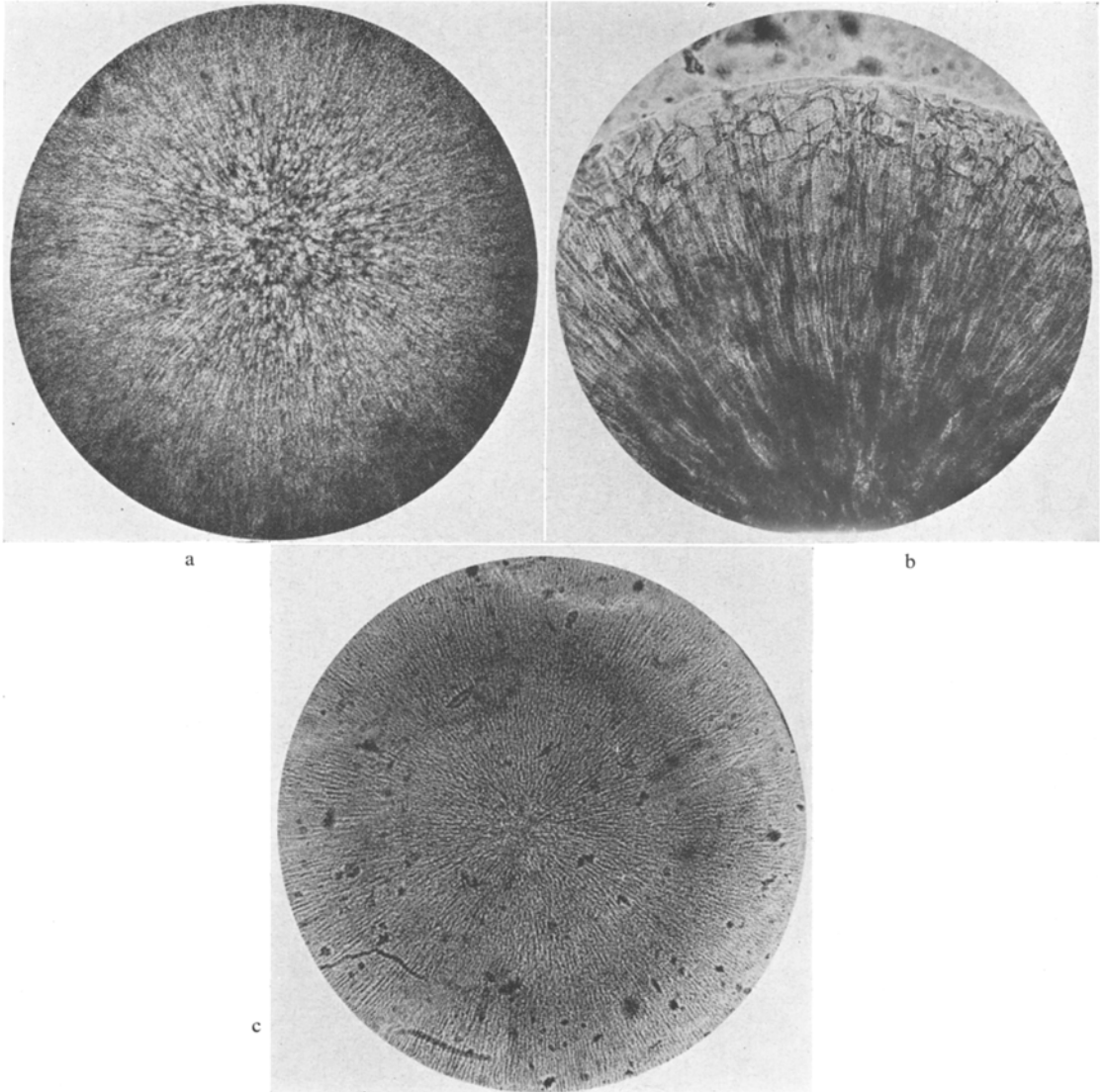


FIG. 1. Laesies, veroorzaakt door kunstmatige inoculaties van een aantal stammen van *Pseudomonas syringae* in kers (Franse Winkers, stam 5), perzik (Wassenberger, stam 3) en pruim (Ontario, stam 9); het rechter blad van elk tweetal is niet geïnoculeerd.

Lesions produced after artificial inoculations of some strains of the bacterial canker organism in the leaves of cherry (variety Franse Winkers, strain 5), peach (variety Wassenberger, strain 3) and plum (variety Ontario, strain 9); control at right side of each pair.

FIG. 2. Kolonies van enige geïsoleerde stammen op peptonagar-5% saccharose; let op de radiaire structuur: a. *Pseudomonas syringae* (stam 9); b. Detail van *Aerobacter levanicum* (stam 8); c. *Leuconostoc mesenteroides*, een dextranvormende bacterie, die kolonies vormt met een zeer fijne radiaire structuur.

Colonies of some isolated strains on peptone agar plus 5% sucrose, showing more or less distinct radial structures: a. bacterial canker organism (strain 9); b. Detail of *Aerobacter levanicum* (strain 8), note the foamy structure at the margin of the colony; c. *Leuconostoc mesenteroides*, a dextran forming bacterium isolated from the branch of a Victoria plum tree badly damaged by bacterial canker; note the very fine radial structure in comparison with that in a.).



- HESTRIN, S., S. AVINERI-SHAPIO & M. ASCHNER, - 1943. The enzymic production of levan. *Biochem. J.* 37: 450-456.
- JONES, L. R., M. M. WILLIAMSON, F. A. WOLF & L. McCULLOCH, - 1923. Bacterial leaf spot of clovers. *J. agric. Res.* 25: 471-490.
- KENDRICK, J. B., - 1926. Holcus bacterial spot on species of Holcus and Zea mays. *Phytopath.* 16: 236-237.
- KONING, H. C., - 1938. The bacterial canker of poplars. *Meded. Phytopath. Lab. W. C. Scholten, Baarn* 14: 5-42.
- LEE, H. A., - 1917. A new bacterial citrus disease. *J. agric. Res.* 9: 1-8.
- MILLTHORPE, F. L. & A. E. VINCENT, - 1946. Bacterial canker of stone fruit. *Agric. Gaz. New South Wales* 57: 255-257.
- NAKATA, K. & K. TAKIMOTO, - 1923. Bacterial blight of Hibiscus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 1: 13-19.
- ROSEN, H. R. & W. L. BLEECKER, - 1933. Comparative serological and pathological investigations of the fire-blight organism and a pathogenic, fluorescent group of bacteria. *J. agric. Res.* 46: 95-119.
- SMITH, C. O., - 1913. Black pit of lemon. *Phytopath.* 3: 277-281.
- , - 1943. A leaf-spot of Hibiscus sp. induced by *Phytomonas syringae* (Phytopath. Notes). *Phytopath.* 33: 82-84.
- & H. S. FAWCETT, - 1930. A comparative study of the citrus blast bacterium and some other allied organisms. *J. agric. Res.* 41: 233-246.
- TISDALE, W. B. & M. M. WILLIAMSON, - 1923. Bacterial spot of lima bean. *J. agric. Res.* 25: 141-153.
- WILSON, E. E., - 1933. Bacterial canker of stone-fruit trees in California. *Hilgardia* 8: 83-123.
- , - 1936. Symptomatic and etiologic relations of the canker and the blossom blast of Pyrus and the bacterial canker of Prunus. *Hilgardia* 10: 213-240.
- , - 1940. Comparisons of *Phytomonas cerasi* with *Phytomonas syringae* (Abstr.). *Phytopath.* 30: 27.
- WORMALD, H., - 1930. Bacterial diseases of stone-fruit trees in Britain II Bacterial shoot wilt of plum trees. *Ann. App. Biol.* 17: 725-744.
- , - 1932. Bacterial diseases of stone-fruit trees in Britain IV The organism causing bacterial canker of plum trees. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 17: 157-169.
- , - 1938. Bacterial diseases of stone-fruit trees in Britain VII The organisms causing bacterial diseases in sweet cherries. *J. Pomol. Hort. Sci.* 16: 280-290.