



Wetenschappelijk eindrapport

*Mysterie van zwarte stippen op Natyra® (en andere robuuste appelrassen) eindelijk via projectonderzoek onttrafeld?
(Raadselspot)*

België, 2024-2025



AGENTSCHAP
LANDBOUW &
ZEEVISSERIJ



In opdracht van:

CCBT

carmen.landuyt@ccbt.be

Uitgevoerd door:

Proefcentrum Fruitteelt VZW, pcfruit vzw

yana.deruyter@pcfruit.be

renske.petre@pcfruit.be

michelle.holtappels@pcfruit.be

wendy.vanhemelrijck@pcfruit.be

30-04-2026

Ref. CCBT Raadselspot

Mysterie van zwarte stippen op Natyra® (en andere robuuste appelrassen) eindelijk via projectonderzoek ontrafeld?

INHOUDSTABEL

1. SAMENVATTING	2
2. LITERATUURSTUDIE	3
3. PROEF INFORMATIE	4
3.1. IDENTIFICATIE ZIEKTEVERWEKKER	4
3.1.1. <i>Identificatie via morfologische kenmerken</i>	4
3.1.2. <i>Identificatie via genetische identificatie</i>	5
3.1.2.1 DNA-extractie van mycelium gevolgd door PCR en sequencing	5
3.1.2.2 DNA-extractie van geïnfecteerd plant materiaal gevolg door qPCR.....	6
3.2. DETECTIE VAN <i>E. PYRI</i> IN VERSCHILLENDE TYPES BLADVLEKKEN	7
3.3. IDENTIFICEREN VAN <i>E. PYRI</i> IN BLAD EN BLOEMKNOPPEN.....	9
3.4. VENSTERPROEF 2024 MET ZWAVEL.....	10
3.5. VENSTERPROEF 2025 MET KOPER.....	14
3.6. VELDPROEF – WERKING VAN MIDDELEN 2025.....	17
3.7. VELDPROEF – TOEGEVOEGDE WAARDE CHARGE.....	19
4. BESPREKING	19
5. BRONNEN	21

1. SAMENVATTING

Dit onderzoek had als doel de oorzaak van de kleine zwarte vlekjes op Natyra®-appels te identificeren, de infectieperiode van *Elsinoë pyri* te achterhalen en de werking van verschillende middelen te evalueren. Er werd bevestigd dat *E. pyri* de oorzaak is van deze zwart-verzilverde vlekken op zowel appel als blad. Tegelijk werd een snelle en praktisch bruikbare detectiemethode uitgewerkt. Daarnaast werd *E. pyri* ook teruggevonden bij andere biologische appelrassen zoals Rewena, Jonagored, Rusticana en Wurtwinning. Op basis van de analyse van verschillende soorten vlekken op Natyra bladeren, werd bovendien duidelijk dat niet enkel de klassieke zwart-verzilverde symptomen, maar ook minder typische rood-paarse en bruine vlekken veroorzaakt kunnen worden door *E. pyri*.

Analyse van blad- en bloemknoppen toonde aan dat de pathogeen reeds vroeg in het seizoen aanwezig is, met detectie van sporen eind februari tot begin maart in zowel blad- als bloemknoppen. Dit bevestigt dat infectiebronnen al zeer vroeg in het seizoen aanwezig zijn in de percelen.

De vensterproeven van 2024 en 2025 leverden geen eenduidige infectieperiode op, maar tonen wel duidelijke seizoensinvloeden. In 2024, een nat jaar, werd een vroege en sterke infectie vastgesteld waarbij vooral april belangrijk leek voor symptoomreductie. In 2025, een meer droger seizoen, verschoof de kritieke periode naar later in het seizoen, waarbij vooral de periode april-mei-juni bepalend was voor het beperken van symptomen, met mei als meest cruciale maand. Analyse van de positie van bladeren op scheuten leverde geen consistent patroon op om de infectieperiode verder te verfijnen. Wel werd vastgesteld dat de zonzijde van de boom een hogere aantasting vertoont, met meer vlekken op zowel bladeren als vruchten.

Bewaring van vruchten had een duidelijke invloed op symptoomontwikkeling. De aantasting nam toe naarmate de bewaartijd langer werd, en dit effect werd versterkt bij hogere temperaturen (18–22°C).

Koper (Hydro Super 25WG) bleek effectiever dan zwavel (Kumulus) in het reduceren van symptomen. De toevoeging van het middel Charge (basisstof chitosan) gaf geen eenduidige meerwaarde. In één veldproef werd geen effect waargenomen, terwijl in een andere proef wel een verhoogde werking werd vastgesteld, maar enkel zichtbaar na bewaring van de vruchten.

2. LITERATUURSTUDIE

Topaz spot, veroorzaakt door *E. pyri* werd voor het eerst gerapporteerd door Jenkins (Jenkins, 1932 en 1946) in o.a. Rusland, Italië, Portugal, Zwitserland en Frankrijk. Nadien is de ziekte nog in meerdere landen, waaronder Denemarken, Nederland en België aangetoond (Chandelier et al., 2022; Glazowska et al., 2013; Korsgaard et al., 2014). Er is tot op heden nog niet zoveel geweten over de biologische cyclus en de beheersingsmaatregelen van de pathogeen. Een Nieuw-Zeelandse studie onderzocht de omstandigheden voor sporenproductie en kieming (Scheper et al., 2013) en Beresford et al. (2015) zetten de eerste stappen naar een infectierisico model voor Elsinoë spot. Daarnaast beperken de meeste studies zich tot de identificatie van de ziekteverwekker (Chandelier et al., 2022; Glazowska et al., 2013; Korsgaard et al., 2014; Scheper et al., 2013) en de studie omtrent de gevoeligheid van verschillende appelrassen (Chandelier et al., 2022; Korsgaard et al., 2014). Uit deze studies blijkt dat het probleem vooral terug te brengen is tot biologische boomgaarden. In conventionele boomgaarden zorgen de behandelingen met chemische fungiciden (tegen ondermeer schurft, witziekte en bewaarziekten) blijkbaar ook voor een voldoende bescherming tegen het optreden van 'Topaz spot'. Enkele studies tonen aan dat middelen op basis van koper en zwavel wel een zekere werking hebben tegen Topaz spot (Scheper et al., 2009; mondelinge communicatie onderzoek WUR).

Tot op heden is er echter nog geen onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van *E. pyri* bij Natyra® en enkele andere variëteiten waarop het in België aan de oogst van 2023 duidelijk waarneembaar was. De bevestiging van deze aanwezigheid via dit project, zou de toekomst van Natyra® kunnen vrijwaren en het zou ook voordelen kunnen opleveren voor andere Vf resistente rassen met Natyra® genen, evenals andere robuuste rassen, door de ontwikkeling van een mogelijke beheersingsstrategie.

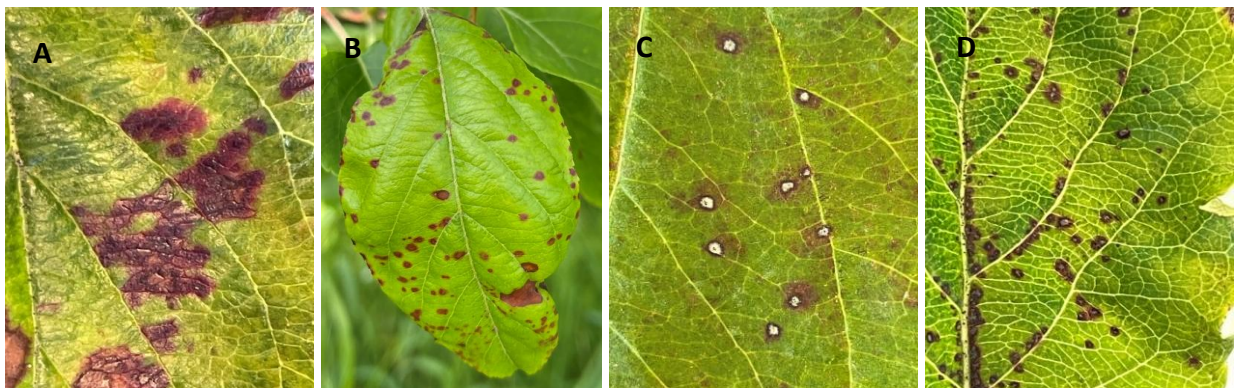
3. PROEF INFORMATIE

3.1. IDENTIFICATIE ZIEKTEVERWEKKER

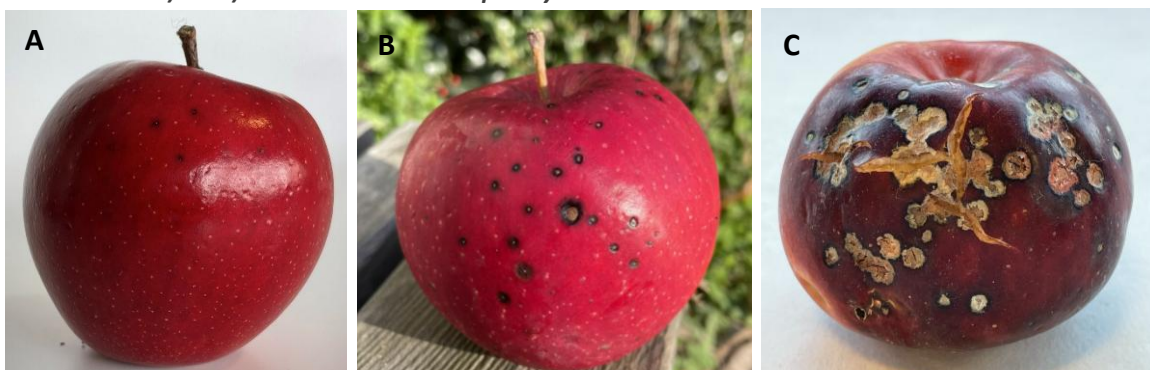
Uit voorgaand intern onderzoek bleek dat de kleine zwarte vlekken die vlak vóór de oogst op Natyra®-appels verschijnen, niet veroorzaakt worden door een fysiologisch probleem. De eerste doelstelling binnen Raadselspot was daarom het identificeren van de oorzaak van deze zwarte vlekjes. Er bestond een vermoeden dat de pathogeen *E. pyri*, de veroorzaker van Topaz-spot, hierbij betrokken zou kunnen zijn. Om dit na te gaan, werden stalen van zowel blad als vrucht met symptomen verzameld.

3.1.1. Identificatie via morfologische kenmerken

De eerste stap in de identificatie is het herkennen van de symptomen die kunnen variëren naargelang het ontwikkelingsstadium van de vlekken. Symptomen komen voor op zowel blad als op vrucht, waarbij de bladeren doorgaans als eerste aangetast worden. Op het blad verschijnen de eerste symptomen als rood-paarse tot zwarte vlekken, waarbij de kleur afhangt van de bladkleur. Op lichtgroene bladeren zijn de vlekken eerder rood-paars, terwijl ze op donkerder blad meer zwart kleuren. Naarmate de aantasting vordert, treedt er een verzilvering op in het centrum van de vlekken, wat resulteert in de karakteristieke 'Topaz-spot'-symptomen (Korsgaard *et al.*, 2014). Op de vruchten worden steeds duidelijk afgeijnde zwarte vlekjes waargenomen. Deze starten vaak zeer klein, maar nemen geleidelijk in grootte toe, eveneens gepaard gaande met een verzilvering in het centrum. Voorbeelden van deze symptomen zijn weergegeven in figuur 1 en 2.



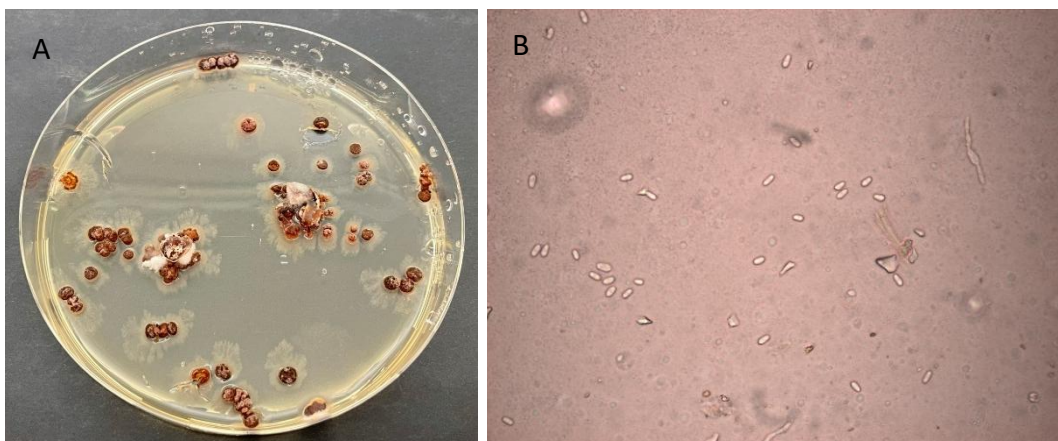
Figuur 1: *E. pyri* vlekken op blad. A) Rood-paarse vlekken op Natyra® blad. B) Rood-paarse vlekken op jong Rewena blad. C) en D) Verzilverde vlekken op Natyra® blad.



Figuur 2: *E. pyri* vlekken op appel. A) Enkele kleine beginnende zwarte vlekken op Natyra®. B) Veel zwarte vlekken met verzilvering op Natyra®. C) Zeer zware aantasting met verzilverde vlekken op red Topaz.

Na een eerste identificatie op basis van symptomen op bladeren en vruchten werden vlekjes uitgesneden en ontsmet (30 seconden in 70% ethanol, gevolgd door 3 minuten in 1% javel en daarna tweemaal 1 minuut spoelen in gedemineraliseerd water (dH₂O)). Vervolgens werden deze stalen op potato dextrose agar (PDA) medium geplaatst en minstens 3 weken geïncubeerd bij 20°C in het donker.

Hieruit kon een donkerrode schimmel met een eerder rotsachtige groei geïsoleerd worden (figuur 3A). Samen met de aanwezigheid van kleine, doorzichtige, langwerpige/ellipsvormige, eencellige sporen (figuur 3B) gaf dit een eerste morfologische bevestiging dat de ziekteverwekker effectief *E. pyri* was (Korsgaard *et al.*, 2014). Door de trage groei van de schimmel trad echter vaak bijbesmetting op met sneller groeiende schimmels. Daarnaast werden enkel succesvolle isolaties verkregen uit verzilverde vlekken en niet uit zwarte vlekken.



Figuur 3: Links) 4 week oude myceliumgroei van E. pyri op PDA. Rechts) Conidia van E. pyri

3.1.2. Identificatie via genetische identificatie

3.1.2.1 DNA-extractie van mycelium gevolgd door PCR en sequencing

Na de morfologische identificatie werd eveneens een genetische identificatie uitgevoerd om verder te bevestigen dat het om *E. pyri* ging. Mycelium werd afgeschraapt en in een epje verzameld voor DNA-extractie. Deze extractie werd uitgevoerd met de NucleoSpin Plant II kit. Vervolgens werd een PCR uitgevoerd met de universele ITS1- en ITS4-primers, waarna het PCR-product werd gesequencet.

Bij de eerste poging werden geen positieve isolaties van *E. pyri* teruggevonden. Ook bij de gelelektroforese werd geen bandje vastgesteld. Daarom werden andere technieken toegepast om de DNA-extractie en PCR te optimaliseren. Tabel 1 geeft een overzicht van de verschillende methodes die werden uitgetest.

Over zeven verschillende DNA-extractiemethodes, in combinatie met meerdere PCR-varianten, werd slechts een slaagpercentage van 5,7% behaald voor de identificatie van *E. pyri*.

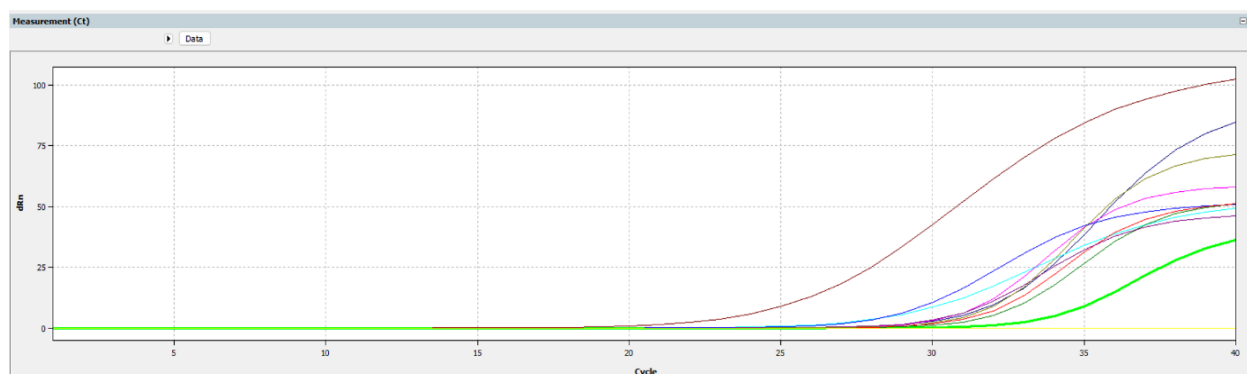
Tabel 1: Overzicht van verschillende geteste DNA-extractie en PCR methodes.

Kit	Lysiscondities	PCR-condities	Voorbehandeling	Succes
NucleoSpin Plant II	Geen extra lysis	Standaard	Geen	1/9 (11%)
SurePrep soil DNA isolation	Geen extra lysis	Standaard	Geen	0/9 (0%)
NucleoSpin Plant II (2×)	Fysische lysis: verschillende bead-groottes (geen Zr-beads)	Standaard	Geen	0/17 (0%)
NucleoSpin Plant II	Fysische lysis: glass + Zr beads, vortex (geen Precellys)	5 µL DNA i.p.v. 2 µL	Geen	1/10 (10%)
NucleoSpin Plant II	Standaard	5 µL DNA i.p.v. 2 µL; ITS4 + ITS5 (i.p.v. ITS1)	Geen	1/4 (25%)
NucleoSpin Plant II	Standaard	5 µL DNA i.p.v. 2 µL; ITS4 + ITS5 (i.p.v. ITS1)	Mycelium: overnacht in 100% ethanol	0/4 (0%)

3.1.2.2 DNA-extractie van geïnfecteerd plant materiaal gevolg door qPCR

een moleculaire techniek voor detectie in plantenweefsel werd geoptimaliseerd gedurende dit project. De ontsmette vlekjes van blad en/of vrucht werden onmiddellijk gebruikt voor DNA-extractie met de NucleoSpin Plant II kit. Dit DNA werd vervolgens gebruikt voor qPCR-analyses volgens de methode van Chandelier et al. (2021).

Bij een eerste test met 9 stalen van blad en vrucht waren alle stalen positief voor *E. pyri*, zoals te zien is in figuur 4. Een eerder positief gesequencet staal gaf de beste Ct-waarde en de vroegste piek. Er werd geen standaardcurve opgesteld, aangezien het enkel om identificatie ging en niet om kwantificatie. Deze aanpak werd vervolgens gebruikt als standaardmethode voor de identificatie van *E. pyri* in alle verdere stalen.






Figuur 4: Output van Qiaquant software van eerste qPCR met 9 verschillende stalen. De hoogste bruine lijn is de positieve controle (positieve sequencing uit DNA-extracties). Gele lijn onderaan is de water controle.









3.2. DETECTIE VAN *E. PYRI* IN VERSCHILLENDE TYPES BLADVLEKKEN

Om de relatie tussen het type bladvlek en de aanwezigheid van *E. pyri* te onderzoeken, werden verschillende types bladvlekken verzameld en moleculair geanalyseerd. Daarom werden verschillende types vlekken verzameld van Natyra®-bladeren. Ook bladeren zonder vlekken van Natyra® en bladeren van Magic Star in IPM werden meegenomen als controle.

De uitgesneden vlekjes werden ontsmet volgens de methode beschreven in paragraaf 3.1.1. Per type vlek werden 10 vlekjes uitgesneden en samengevoegd voor DNA-extractie. Ook van de bladeren zonder vlekken werden 10 stukjes uitgesneden. Voor elk type vlek werden twee herhalingen getest. In tabel 2 worden de verschillende vlekken visueel weergegeven, samen met de aan- of afwezigheid van *E. pyri*. Er werden bladeren met vier verschillende types vlekken onderzocht. Drie daarvan waren geen typische vlekken, maar gaven toch een positieve detectie voor *E. pyri*, terwijl bladeren zonder vlekken geen detectie gaven.

Tabel 2: Resultaten van de analyse van verschillende bladvlekken op Natyra®. Voorbeeldfoto's van de geteste bladeren met vlekken worden weergegeven, samen met de detectie van *E. pyri*.

Foto	Uitleg	<i>E. pyri</i> gedetecteerd
	Gezond Magic star IPM blad	Nee
	Gezond Natyra® blad	Nee
	Enkel vlekken achterkant Natyra® blad	Ja

		<p>Bruin verkleurde vlekken op Natyra® blad</p>	<p>Ja</p>
		<p>Niet mooi afgelijnde rood/paarse vlekken (zonder verzilvering) op Natyra® blad</p>	<p>Ja</p>
		<p>Mix van bruine en rood/paarse vlekken. Geen éénduidige vlekken op Natyra® blad</p>	<p>Ja</p>
		<p>Typische <i>E. pyri</i> vlekken op Natyra® blad</p>	<p>Ja</p>

3.3. IDENTIFICEREN VAN *E. PYRI* IN BLAD EN BLOEMKNOPPEN

Chandelier *et al.* (2021) hadden reeds een vermoeden dat *E. pyri* vroeg in het seizoen aanwezig is in percelen en al infecties kan veroorzaken. In hun onderzoek werden knoppen (niet verder gespecificeerd) geanalyseerd, waarbij in 53% van de knoppen *E. pyri* werd teruggevonden bij een gevoelige cultivar (Rubinola). Om dit verder te onderzoeken, werden in 2025 blad- en bloemknoppen verzameld. Dit gebeurde midden februari in het perceel waar vensterproef 2024 werd uitgevoerd en begin maart in het nieuwe perceel voor de vensterproef in 2025.

De knoppen werden ontsmet (2 minuten in 2% javel en daarna tweemaal 1 minuut spoelen in dH₂O) en vervolgens gecrusht met vloeibare stikstof. Het verkregen poeder werd bewaard in epjes bij -80°C tot de DNA-extractie, die uitgevoerd werd met de NucleoSpin Plant II kit. Nadien werd een qPCR uitgevoerd. Voor dit experiment werd wel een standaardcurve opgesteld, op basis van verschillende concentraties sporenoplossingen.

Voor het verkrijgen van de sporenoplossingen werden 6 isolaten van *E. pyri* van 3–6 weken oud op PDA-medium geselecteerd. Kleine myceliumstukjes (2 mm × 2 mm) werden om de centimeter op corn meal (CM) medium geplaatst. Deze CM-platen werden gedurende 2 dagen geïncubeerd bij 20°C in het donker. Vervolgens werden de myceliumstukjes van het CM-medium gehaald en geschud in een 0,005% Tween 20-oplossing. Met behulp van een Burkard-sporenkamer werd de concentratie van de oplossingen bepaald en werd een verdunningsreeks opgesteld (1 000 000; 100 000; 10 000; 1 000; 100; 10 sporen per epje).

De detectielimiet van de qPCR was 1000 sporen. Met de verkregen standaardcurve werden de Ct-waarden van de knoppen omgerekend naar het aantal sporen (tabel 3). Hieruit wordt duidelijk dat *E. pyri* gevonden kan worden in zowel blad- als bloemknoppen. Het ontsmetten van de knoppen zorgt er bovendien voor dat een deel van de sporen wordt verwijderd. In de vensterproef van 2024 (staalname 11/02/2025) werden de meeste sporen teruggevonden in de bladknoppen, terwijl dit in de vensterproef van 2025 (staalname 6/03/2025) omgekeerd was. In 2025 werden er echter geen sporen gedetecteerd in de ontsmette bladknoppen. Het is dus duidelijk dat er al eind februari/begin maart sporen aanwezig zijn in de percelen.

Tabel 3: Resultaat van de qPCR van blad- en bloemknoppen.

			Aantal knoppen	Gemiddeld aantal sporen
Vensterproef 2024 – staalname 11/02/2026	Bladknoppen	ontsmet	5	9874
		niet ontsmet	5	25774
	Bloemknoppen	ontsmet	3-4	6131
		niet ontsmet	3-4	103931
Vensterproef 2025 – staalname 6/03/2026	Bladknoppen	ontsmet	5	0
		niet ontsmet	5	20189
	Bloemknoppen	ontsmet	3-4	914
		niet ontsmet	3-4	10560

3.4. VENSTERPROEF 2024 MET ZWAVEL

Om meer informatie te verzamelen omtrent de infectieperiode van *E. pyri* werd in 2024 een eerste vensterproef aangelegd. Deze proef werd uitgevoerd op een onbehandeld Rewena-perceel van een bioteler. In de periode van april tot augustus kreeg elk object gedurende één maand vier behandelingen met Kumulus (zwavel) aan een dosis van 2 kg/ha loofwand. Dit is schematisch weergegeven in tabel 4. Elk object bestond uit 6 bomen en werd aangelegd in 3 herhalingen.

Tabel 4: Behandelingsschema vensterproef 2024.

	April	Mei	Juni	Juli	Augustus
Object 1 (controle)					
Object 2	9/apr 18/apr 23/apr 30/apr				
Object 3		7/mei 14/mei 21/mei 28/mei			
Object 4			5/jun 12/jun 18/jun 25/jun		
Object 5				2/jul 9/jul 16/jul 23/jul	
Object 6					31/jul 6/aug 13/aug 20/aug

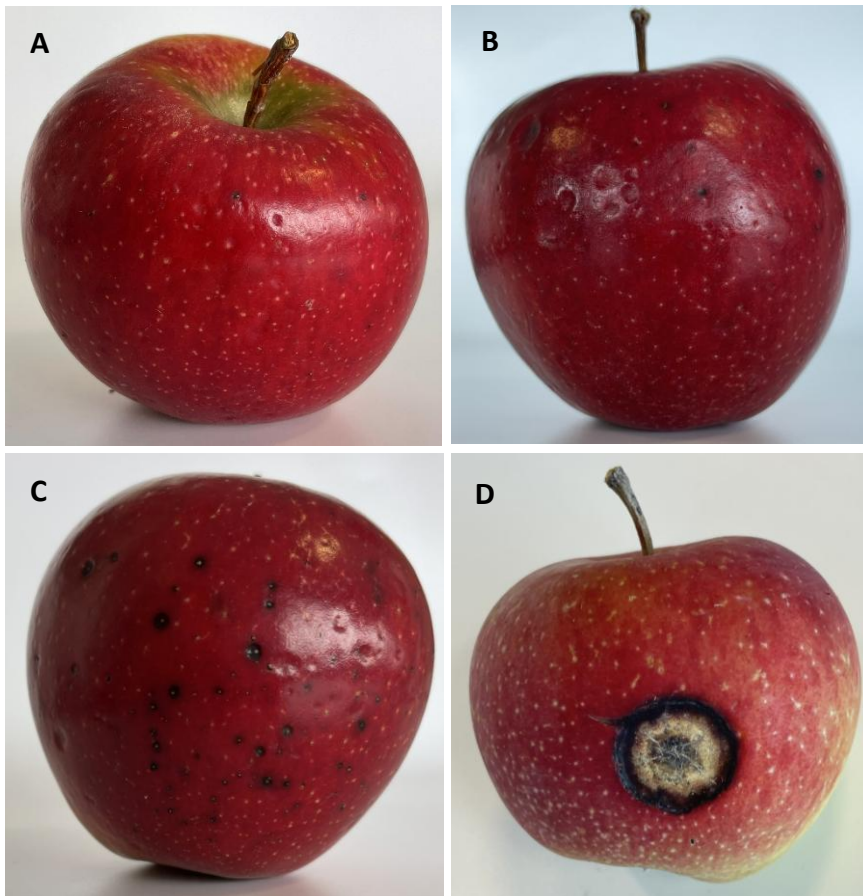
De eerste symptomen werden begin mei waargenomen. Daarom werd eind mei (28/05/2024) een eerste veldevaluatie uitgevoerd. Hierbij werd gekeken naar de eerste vijf bladeren van 20 scheuten links en rechts van de appelbomen. De symptomen werden onderverdeeld in onderstaande klassen:

- 0) bladoppervlakte zonder vlekken
- 1) 0-10% van bladoppervlakte bedekt met vlekken
- 2) 10-20% van bladoppervlakte bedekt met vlekken
- 3) 20-30% van bladoppervlakte bedekt met vlekken
- 4) 30-40% van bladoppervlakte bedekt met vlekken
- 5) 40-50% van bladoppervlakte bedekt met vlekken
- 6) 50-60% van bladoppervlakte bedekt met vlekken
- 7) 60-70% van bladoppervlakte bedekt met vlekken
- 8) 70-80% van bladoppervlakte bedekt met vlekken
- 9) 80-90% van bladoppervlakte bedekt met vlekken
- 10) 90-100% van bladoppervlakte bedekt met vlekken

Daarnaast werden ook 100 vruchten, verspreid over het object, geëvalueerd. Hierbij werden de symptomen onderverdeeld in drie klassen:

- 1) geen vlekken
- 2) 1-4 vlekken
- 3) 4 en meer vlekken of één grote vlek. (De meeste appels in deze klasse zijn niet meer verkoopbaar.)

Een voorbeeld per klasse is weergegeven in figuur 5. Door het lage aantal vruchten per boom konden er echter niet voor elk object 100 vruchten beoordeeld worden en varieerde het aantal per object.



Figuur 5: Voorbeeld foto's van symptomen volgens de evaluatie klassen. Appels zijn afkomstig van de veldproef met middelen in 2025. Foto A is een klasse 1 appel, Foto B,C en D zijn klasse 3 appels.

Tijdens deze eerste evaluatie bedroeg het infectiepercentage van de bladeren in het onbehandelde object reeds 99,3%. In het object met behandelingen in april was dit 98,7% en bij de mei-behandelingen 100%. Er werd dus geen reductie in infectie vastgesteld door de zwavel-behandelingen. Wel werd een reductie in aantastingsgraad waargenomen. Grafiek A en B (figuur 6) tonen de werkingspercentages van Kumulus op respectievelijk blad en vrucht bij toepassing in april of mei. Hieruit blijkt dat behandelingen in april, met een werkingspercentage van 57,4%, beter de symptomen op blad reduceren dan behandelingen in mei (24,4%). Op de vruchten werd het omgekeerde waargenomen: hier gaven de mei-behandelingen een hoger werkingspercentage (52,9%) dan de april-behandelingen (38,8%).

Bij een tweede evaluatie op 30/07/2024 werden opnieuw werkingspercentages berekend, die duidelijk lager lagen (grafiek C en D figuur 6). Zo bedroeg het werkingspercentage van Kumulus op bladeren nog 38,1% bij april-behandelingen en 12,3% bij mei-behandelingen. Behandelingen

in juni en juli leken geen duidelijke reductie van symptomen meer te geven, gezien de aantasting al zeer hoog was. Ook op de vruchten daalden de werkingspercentages sterk, al werd nog een beperkte invloed gezien bij behandelingen in juni en juli, met respectievelijk 20,9% en 14,2%.

Door het lage aantal appels in het perceel zijn de resultaten op de vruchten minder betrouwbaar. Daarom werd voor het verdere onderzoek vooral gekeken naar de bladresultaten. Deze resultaten, waarbij in seizoen 2024 de beste werking van Kumulus in april werd waargenomen, wijzen op een mogelijke vroege infectie in het seizoen. Om die reden werd in de volgende vensterproef ook de maand maart opgenomen in het behandelingschema.



Figuur 6: Werkingspercentages en graad van aantasting, waargenomen op 28/05/2024 en 30/07/2024, weergegeven in grafieken. Werkingspercentages zijn berekende via de Abbott formule.

3.5. VENSTERPROEF 2025 MET KOPER

In 2025 werd een tweede vensterproef aangelegd, aangepast op basis van de resultaten van 2024. Voor deze vensterproef werd er gekozen om de proef uit te voeren op een Natyra®-perceel bij een andere bioteler in Sint-Truiden. Daarnaast werden ook een aantal extra objecten toegevoegd. In de periode van maart tot augustus kreeg elk object gedurende één maand of gedurende drie maanden behandelingen met Hydro Super 25WG (koper). De één-maand behandelingen bestonden uit 3 toepassingen van Hydro Super aan 0,4 kg/ha loofwand (200g koper/ha grond), terwijl de drie-maand blokken uit 9 toepassingen bestonden. Schematische weergaven van dit behandelingsschema is weergegeven in tabel 5. Elk object telde 10 bomen en werd aangelegd in 3 herhalingen.

Tabel 5: Schematische weergave van bespuitingen vensterproef 2025

	Maart	April	Mei	Juni	Juli	Augustus
Object 1 (controle)						
Object 2	7/mrt 17/mrt 28/mrt					
Object 3		7/apr 18/apr 28/apr				
Object 4			8/mei 19/mei 27/mei			
Object 5				5/jun 17/jun 27/jun		
Object 6					8/jul 18/jul 29/jul	
Object 7						7/aug 18/aug 26/aug
Object 8	7/mrt 17/mrt 28/mrt	7/apr 18/apr 28/apr	8/mei 19/mei 27/mei			
Object 9		7/apr 18/apr 28/apr	8/mei 19/mei 27/mei	5/jun 27/jun 27/jun		
Object 10			8/mei 19/mei 27/mei	5/jun 27/jun 27/jun	8/jul 18/jul 29/jul	
Object 11				5/jun 27/jun 27/jun	8/jul 18/jul 29/jul	7/aug 18/aug 26/aug

Symptoomontwikkeling werd begin september waargenomen en eind september (25/09/2025) werd de veldevaluatie uitgevoerd. Zowel blad als vrucht werden geanalyseerd. Voor bladeren werden nu 10 volledige scheuten links en rechts van de bomenrij bekeken. Elk blad werd apart geëvalueerd en onderverdeeld in dezelfde klassen als in 2024 (zie paragraaf 3.4). De analyse van de vruchten bleef hetzelfde als in 2024.

De resultaten van de werking van Hydro Super 25WG op de symptoomontwikkeling van *E. pyri* op bladeren zijn weergegeven in grafiek A figuur 7. Hieruit blijkt dat de behandelingen in mei 2025 cruciaal waren voor het onderdrukken van de symptoomontwikkeling. Met een werkingspercentage van 63,3% sprong mei eruit in vergelijking met de andere maandbehandelingen. Opvallend is ook dat bijna alle drie-maandbehandelingen resulteerden in hogere werkingspercentages dan de maand-behandelingen. Zo blijkt de behandelingsperiode april–mei–juni in 2025, met een werkingspercentage van 86,4%, duidelijk de belangrijkste periode te zijn geweest voor symptoomreductie, waarbij opnieuw de maand mei een centrale rol speelt.

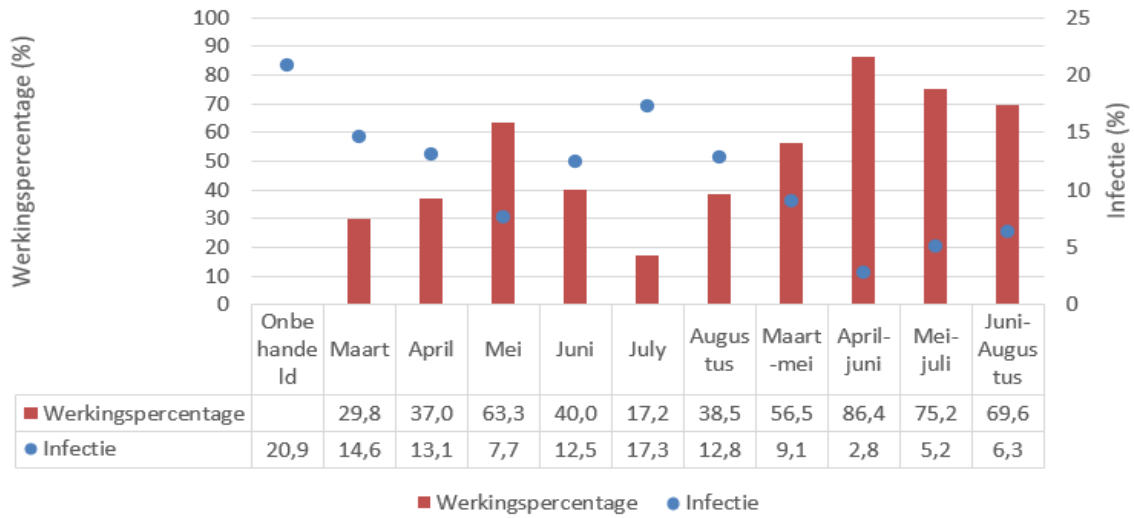
Het infectiepercentage op de vruchten in de onbehandelde blokken was zo laag dat werd beslist om 100 appels per object in bewaring te plaatsen. Op 26/02/2026 werd een eerste evaluatie uitgevoerd, maar door de zeer lage infectiepercentages werden de appels nog eens 3 weken bewaard bij 18°C. De resultaten van deze laatste evaluatie zijn weergegeven in grafiek B figuur 7. Het infectiepercentage in het onbehandelde object bleef vrij laag (5,5%), maar er waren wel duidelijke verschillen tussen de objecten. De individuele maandbehandelingen in mei en juni gaven de grootste symptoomreductie binnen de maandbehandelingen. Ze hadden respectievelijk een werkingspercentage van 68,2% en 75,7%. Waar in maart en april nog een beperkte werking van Hydro Super 25WG op de bladeren werd waargenomen, is er op de vruchten nu zo goed als geen effect meer zichtbaar. Wel zien we dezelfde trend voor de drie-maandbehandelingen, die over het algemeen hoger liggen dan de maandbehandelingen. Ook hier is de periode april–mei–juni, met een werkingspercentage van 86,6%, de belangrijkste voor symptoomreductie in 2025.

De procentuele verdeling van appels per klasse en per object na bewaring in de vensterproef van 2025 is weergegeven in figuur 8. Het hoogste percentage niet-verkoopbare appels (klasse 3) bedroeg 1,5% in maart. De meeste geïnfecteerde appels vielen onder klasse 2, die nog als verkoopbaar wordt beschouwd.

Aangezien de data afkomstig is van evaluaties links en rechts van de boom, overeenkomend met de zon- en schaduwzijde, kon dit verschil ook worden onderzocht. Er was al geweten dat vlekken op appels vooral aan de zonzijde verschijnen. In deze proef werd ook vastgesteld dat vlekken op bladeren vaker voorkomen aan de zonzijde van de boom, met 7,4% meer vlekken in vergelijking met de schaduwzijde.

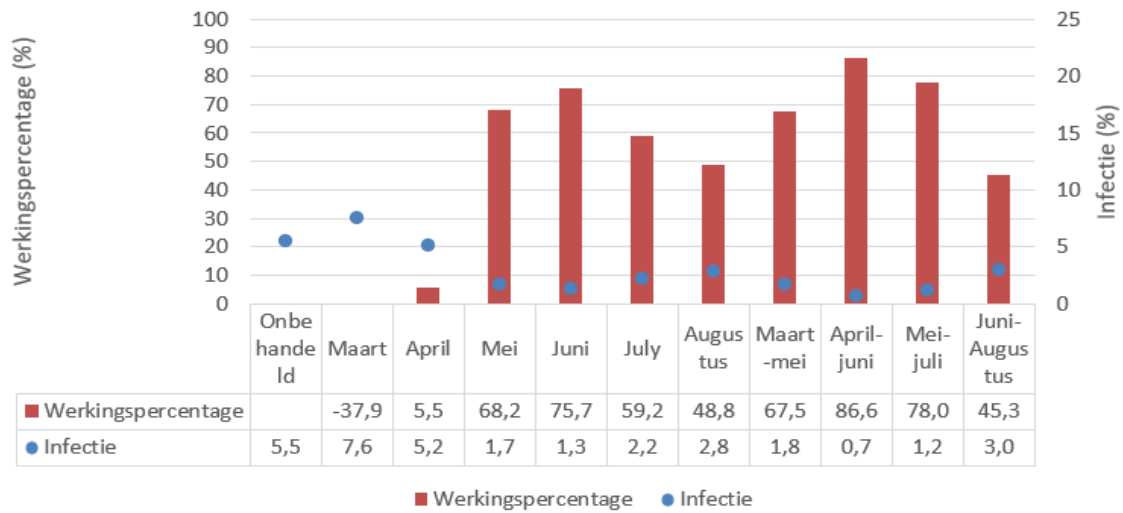
A

Werking Hydro Super 25WG op *E. pyri* op blad vensterproef 24/09/2025



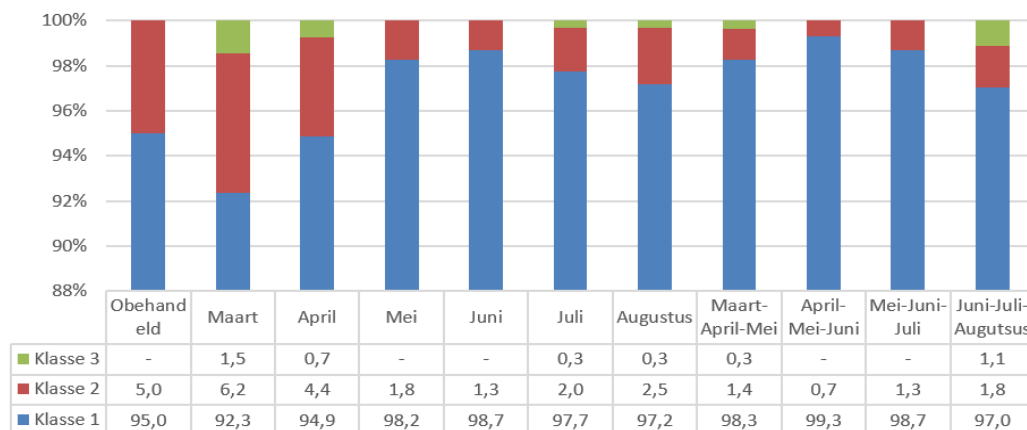
B

Werking Hydro Super 25WG op *E. pyri* op vrucht vensterproef 2025 na bewaring



Figuur 7: Grafische weergave van resultaten vensterproef 2025. Werkingspercentages zijn berekend volgens de Abbott formule.

Appels per klasse vensterproef 2025 na bewaring



Figuur 8: Procentuele verdeling van appels per klasse en per object na bewaring in de vensterproef van 2025.

3.6. VELDPROEF – WERKING VAN MIDDELEN 2025

In het projectvoorstel was voorzien om de middelenproef in vitro uit te voeren. Door de trage groei van de schimmel bleek dit echter niet haalbaar, waardoor er werd gekozen om in plaats daarvan een bijkomende veldproef uit te voeren.

Op aanraden van de biotelers werd er in de vensterproef van 2025 gekozen voor Hydro Super 25WG in plaats van Kumulus. Om het verschil in werking tussen koper en zwavel te achterhalen, werd bij pcfruit een veldproef aangelegd op een Natyra®-perceel, waarin verschillende middelen tegen *E. pyri* werden getest. Tabel 6 geeft een overzicht van de objecten met de bijhorende producten. Het behandelingschema liep doorlopend, met een tweewekelijkse toepassing van 21/03/2025 tot 05/08/2025. Elk object bestond uit 8 bomen en 4 herhalingen.

Tabel 6: Schematische weergave van de objecten en producten van de veldproef in 2025 op pcfruit.

	Product	Dosis (L of kg/ha loofwand)
Object 1	/	/
Object 2	Hydro Super 25WG	0,350
Object 3	Hydro Super 25WG	0,350
	Charge (chitosan hydrochloride)	4,350
Object 4	Kumulus (Tot bloei)	3,000
	Kumulus (na bloei)	1,667
	Kumulus (bij hoge temperatuur)	1,250
Object 5	Vitisan (kaliumwaterstofcarbonaat) - afwisselend	2,800
	Natriumwaterstofcarbonaat - afwisselend	2,000

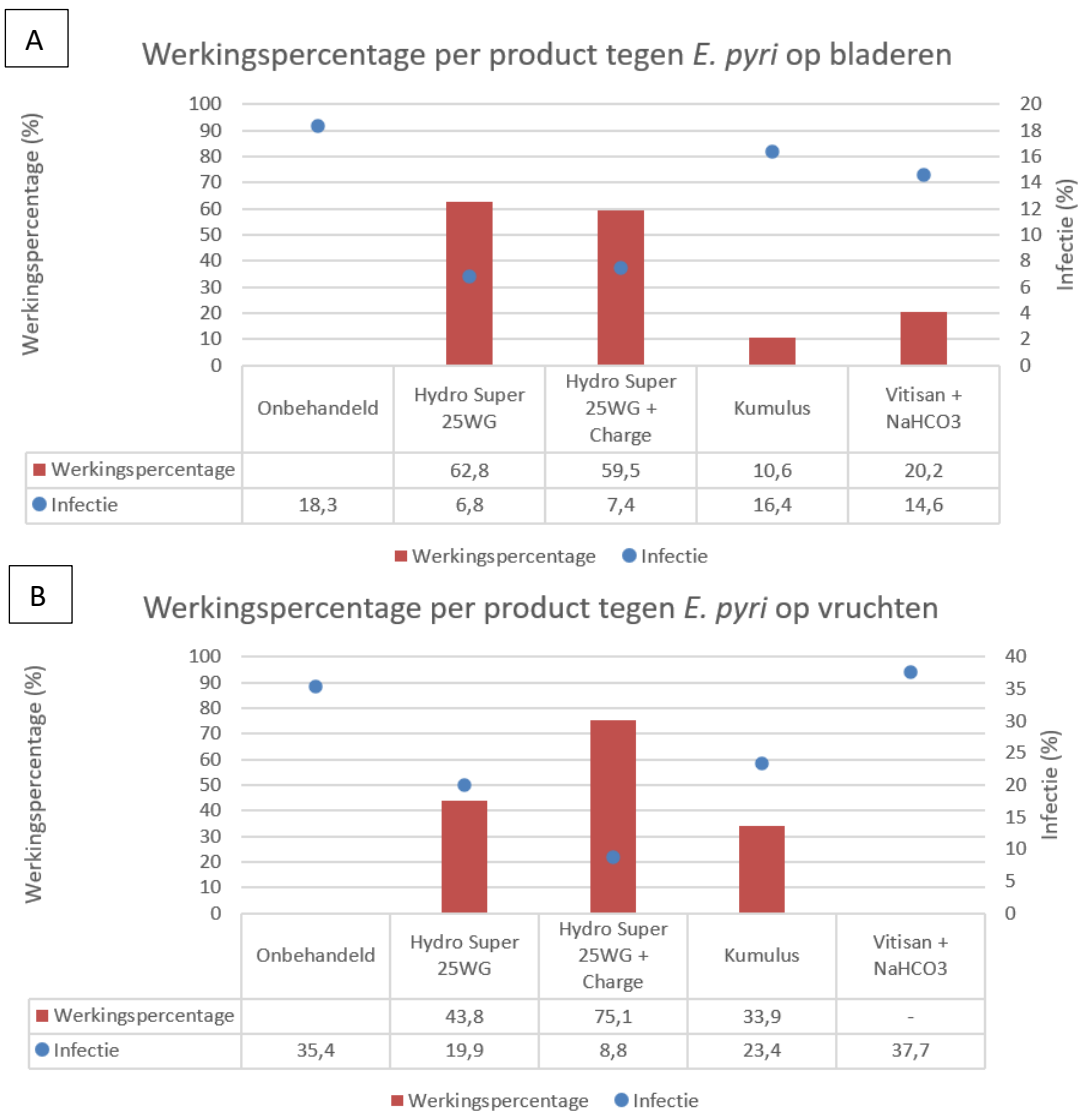
Een eerste evaluatie werd uitgevoerd op 19/08/2025, maar aangezien de aantasting toen nog vrij laag was, werd er ook een tweede evaluatie uitgevoerd op 30/09/2025. De evaluatie gebeurde op dezelfde manier, zowel voor blad als vrucht, als in de vensterproef van 2025. Ook hier werden de appels in bewaring geplaatst, maar in tegenstelling tot de vensterproef van 2025 werden niet 100 appels geselecteerd. In plaats daarvan werden alle beschikbare appels per object meegenomen in de evaluatie.

Bij de eerste bladevaluatie bedroeg het infectiepercentage in de onbehandelde objecten 10,3%, en 18,3% bij de tweede evaluatie. Enkel de resultaten van de tweede evaluatie worden hier besproken en zijn weergegeven in grafiek A van figuur 9. Hydro Super 25WG vertoont hierbij een werkingspercentage van 62,8%. Wanneer Charge aan dit schema wordt toegevoegd, is er geen bijkomende werking waarneembaar. Kumulus en de afwisseling van NaHCO₃ en Vitisan vertonen beide lage werkingspercentages en reduceren de symptomen slechts beperkt.

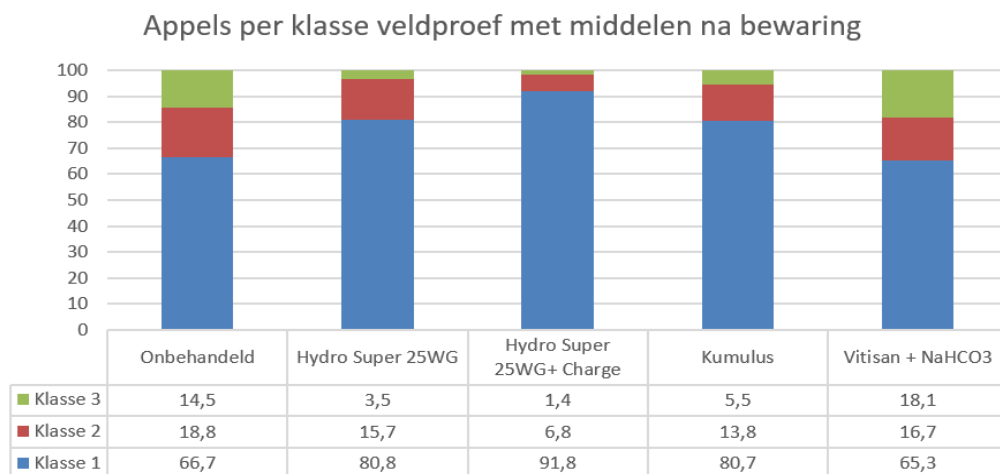
Bij de evaluatie van de vruchten, na frigobewaring en 3 weken bij 18°C, blijkt dat de werking van Hydro Super 25WG lager ligt dan bij de bladeren, namelijk 43,8%. In dit geval heeft Charge wel een meerwaarde en verhoogt het werkingspercentage tot 75,1%. Kumulus vertoont hier een betere werking met 33,9%, terwijl Vitisan en NaHCO₃ geen werking laten zien tegen *E. pyri* op de vruchten. Resultaten zijn weergegeven in grafiek B figuur 9.

Figuur 10 geeft de procentuele verdeling van appels per klasse per object weer. In deze proef lagen zowel de infectie als de aantastingsgraad hoger. Zo was ongeveer 14,5% van de appels in het onbehandelde object en 18,1% in het Vitisan- en NaHCO₃-object niet meer verkoopbaar.

Behandelingen met zwavel of koper konden dit percentage echter verlagen tot onder 6%.



Figuur 9: Grafische weergave van de werking van verschillende producten tegen *E. pyri*. De werkingspercentages werden berekend volgens de Abbott-formule.



Figuur 10: Procentuele verdeling van appels per klasse en per object na bewaring in de veldproef met middelen.

3.7. VELDPROEF – TOEGEVOEGDE WAARDE CHARGE

Voor deze veldproef werd aan een bioteler in Bekkevoort gevraagd om op de helft van zijn Natyra®-perceel twee wekelijks Charge toe te voegen bovenop zijn standaardschema. Charge is een basisstof op basis van chitosan. Deze stof zou de natuurlijke plantafweer versterken. In dit perceel werd bovendien enkel met zwavel gespoten en dus geen koper.

Op 26/09/2025 werd een evaluatie uitgevoerd op bladeren en vruchten volgens hetzelfde principe als in de vensterproef van 2025 en de veldproef met middelen. Op de helft van het perceel zonder Charge bedroeg de infectiegraad 25,1% op de bladeren en 6,5% op de vruchten. Op het deel met Charge waren deze waarden respectievelijk 29,8% en 8,8%. In deze proef had Charge geen toegevoegde waarde in het reduceren van symptomen van *E. pyri*. Deze vruchten zijn nog niet na bewaring geëvalueerd (deze komen pas uit bewaring in mei 2026).

4. BESPREKING

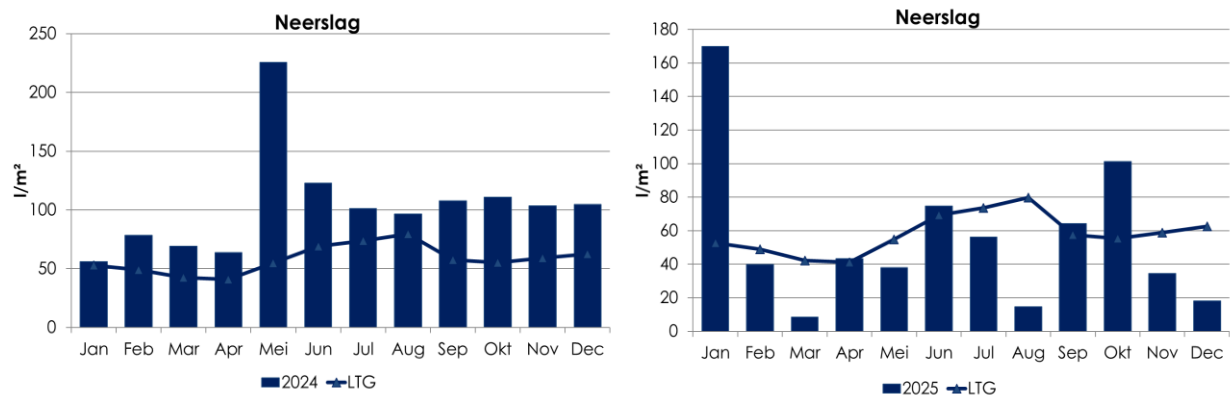
Het eerste doel van dit project was het identificeren van de ziekteverwekker van de zwart verzilverde vlekjes op Natyra®-appels. Dit is succesvol gebeurd. Ondertussen werd *E. pyri* ook teruggevonden in andere bio-appels zoals Rewena, Jonagored, Rusticana en Wurtwinning. De meest geschikte methode voor identificatie is een DNA-extractie rechtstreeks op geïnfecteerd plantmateriaal, gevolgd door een qPCR. Deze methode geeft het snelste en meest betrouwbare resultaat.

Uit de analyse van verschillende bladvlekken op Natyra®-bladeren werd ook duidelijk dat niet alleen de gekende zwart-verzilverde vlekken op het blad veroorzaakt worden door *E. pyri*, maar ook minder afgelijnde rood-paarse en bruine vlekken kunnen door *E. pyri* worden veroorzaakt.

Het tweede doel was om via vensterproeven de infectieperiode van *E. pyri* te achterhalen. Hieruit kwam geen eenduidig resultaat naar voren, maar de veldproeven geven wel duidelijke aanwijzingen. In 2024, een nat seizoen, werd een snelle symptoomontwikkeling en een zeer hoge infectiegraad waargenomen. Het perceel van de vensterproef in 2024 werd bovendien niet behandeld, wat mogelijk heeft bijgedragen aan de zware aantasting. De resultaten wijzen erop dat er in dit jaar een vroege infectie heeft plaatsgevonden, waarbij april een belangrijke maand was voor symptoomreductie. In 2025, een droger seizoen, verliep de symptoomontwikkeling zoals telers dit de voorbije jaren observeerden, namelijk het verschijnen van vlekjes op de vruchten enkele weken voor de pluk. In dit jaar lag de infectieperiode later en was de periode april–mei–juni het belangrijkste voor het beperken van symptomen, met mei als meest cruciale maand. Ook was er in 2025 zeer weinig regen in de zomermaanden, zodat niets geconcludeerd kon worden over infecties in de zomermaanden.

De resultaten van de vensterproeven van 2024 en 2025 werden ook vergeleken met de weerdata, maar er werd geen duidelijke link vastgesteld tussen de neerslaggebeurtenissen binnen een maand en de resultaten in diezelfde maand. Daarom werd verder enkel gekeken naar het algemene weerverloop van het seizoen en de evolutie van de symptoomontwikkeling. In figuur 11 wordt de maandelijkse neerslag weergegeven ten opzichte van het langetermijngemiddelde (LTG).

Op basis van deze resultaten kan nog geen algemene aanbeveling voor behandelingen worden geformuleerd. Hiervoor zou de proef van 2025 herhaald moeten worden, bij voorkeur met behandelingen afgestemd op de weersomstandigheden.



Figuur 11: Weersgegevens 2024 en 2025. Neerslag per maand is weergegeven in L/m² in balken ten opzichte van het langetermijngemiddelde (LTG) (1991-2020).

Een andere manier om de infectieperiode te achterhalen is door te kijken naar de infectiegraad van de bladeren op een scheut, meer bepaald of de eerste of de laatste bladeren het meest aangetast zijn. Voor de drie proeven in 2025 werd dit bekeken voor de eerste vijf bladeren van een scheut en voor de bladeren vanaf blad 6 tot het einde van de scheut. Dit is weergegeven in tabel 7. In twee van de drie proeven werd een hogere aantasting vastgesteld op de laatste bladeren van een scheut, terwijl in de vensterproef van 2025 net het omgekeerde werd waargenomen. Op basis hiervan kan dus geen eenduidige conclusie worden getrokken over de infectieperiode.

Tabel 7: Schematisch overzicht van infectiepercentage voor de verschillende bladeren op een scheut uit de onbehandelde objecten van de proeven uit 2025.

	Vensterproef 2025	Veldproef middelen	Charge proef
Infectiepercentage (%) - blad 1-5	16,7	23,8	41,3
Infectiepercentage (%) - blad 6-...	24,5	10,9	95

Het vermoeden dat *E. pyri* al vroeg in het seizoen aanwezig is, werd bevestigd door de resultaten op knoppen. Zowel in bloem- als bladknoppen van de percelen uit veldproef 1 en 2 werd *E. pyri*-DNA teruggevonden.

De stelling dat er een zwaardere aantasting optreedt aan de zonzijde werd eveneens bevestigd. Er werden meer vlekken waargenomen aan de zonzijde van de appel en ook de bladeren vertoonden daar een hogere infectiegraad.

Door de appels in bewaring te plaatsen werd duidelijk dat de symptoomontwikkeling toeneemt naarmate de bewaartijd langer wordt. Dit effect werd nog versterkt door de appels gedurende een periode bij 18–22°C te bewaren, wat de optimale temperatuur is voor de ontwikkeling van *E. pyri* volgens De Scheper *et al.* (2013). Tabel 8 geeft een schematisch overzicht van de toename in infectiepercentage en aantastingsgraad van onbehandelde appels tijdens frigo bewaring van 4-5 maanden, gevolgd door 3 weken bewaring bij 18°C.

Tabel 8: Schematische weergave van stijging in aantal vlekken op appels van *E. pyri* na bewaring.

		Evaluatie voor bewaring	Evaluatie na bewaring	Vershil
Vensterproef 2025	Infectiepercentage	2.0%	5.5%	+3.5%
	Graad van infectie	1.0	2.8%	+1.8%
Veldproef middelen 2025	Infectiepercentage	20.3%	35.4%	+15.1%
	Graad van infectie	15.9%	25.5%	+9.6%

Tot slot werd aangetoond dat koper een betere werking heeft tegen *E. pyri* dan zwavel. In de extra veldproef, waarbij een bioteler Charge bovenop zijn standaardschema toepaste, werd geen meerwaarde vastgesteld. In de veldproef met middelen op pcfruit werd wel een meerwaarde van Charge gezien in combinatie met koper. Deze meerwaarde was enkel zichtbaar na bewaring van de vruchten.

5. BRONNEN

Beresford, R. (2015). *Calibrating a disease forecaster for Elsinoe spot in organic apples using receiver operating characteristic curve analysis.* : IOBC/WPRS Bulletin 2015 Vol.110 pp.33-42

Chandelier, A., Mingeot, D., Ghrissi, I., Hoon Song, J., Lateur, M. (2021). *Development of a qPCR test to detect and quantify Elsinoë piri in unsprayed and organic apple orchards and assessment of apple cultivar susceptibility to the disease.* Plant Pathology 71:1579-1593.

Glazowska, S.E.; Schiller, M.; Lund, O.S.; Johnson, P.R. and Korsgaard, M. (2013). *First report of elsinoe leaf and fruit spot and Elsinoe pyri on apple in Denmark.* J. Plant Pathol. 95, supplement pp.S4.76

Jenkins, A.E. (1932). *Elsinoë on apple and pear.* J. Agricultural Research 44, 689-700.

Jenkins, A.E. (1946). *Elsinoe piri in France and Spain in the light of quarantine interceptions.* Mycologia 38, 450-452.

Korsgaard, M.; Glazowska, S.E.; Schiller, M; Johnston, P.R. and Lund, O.S. (2014). *“Topaz spot” in apple identified as “Elsinoë leaf and fruit spot” (Elsinoe pyri [Wor.]Jenkins).* Fördergemeinschaft ökologischer Obstbau e.V. (FÖKO) Ecofruit, 16th international conference on organic fruit growing, Proceedings, 17-19 Febr. 2014, p.83-89.

Scheper, R.W.A., Wood, P.N, Fisher, B.M. (2013). *Isolation, spore production and Koch’s postulates of Elsinoe pyri.* New Zealand plant protection 66: 308-316.

Scheper, R.W.A., Wood, P.N.; Chigozie, B. and Fisher, B. (2009). *Effect of fungicidal treatments on severity and incidence of elsinoe leaf spot of apple.* New Zealand Plant Protection 62 (August 1, 2009): 405–405.

Scheper, R.W.A.; Wood, P.N. and Fischer, B.M. (2013). *Isolation, spore production and Koch's postulates of Elsinoë pyri*. New Zealand Plant Prot. 66, 308-316.