



# Effect van loofdoodmiddel op de overleving van *Xanthomonas fragariae* in ondergewerkte gewasresten van aardbei

Pieter Kastelein, Ineke de Vries, Marjon Krijger & Jan van der Wolf







# Effect van loofdoodmiddel op de overleving van *Xanthomonas fragariae* in ondergewerkte gewasresten van aardbei

Pieter Kastelein, Ineke de Vries, Marjon Krijger & Jan van der Wolf

© 2009 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

## **Plant Research International B.V.**

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen  
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen  
Tel. : 0317 – 47 60 24  
Fax : 0317 – 41 80 94  
E-mail : [info.pri@wur.nl](mailto:info.pri@wur.nl)  
Internet : [www.pri.wur.nl](http://www.pri.wur.nl)

# Inhoudsopgave

	pagina
Inleiding	1
Materiaal en methoden	3
Resultaten	7
Discussie	11
Literatuur	13



# Inleiding

De bacterie *Xanthomonas fragariae* veroorzaakt de bacteriebladvlekkenziekte van aardbei. Alle delen van de plant, met uitzondering van vruchten, kunnen worden aangetast. De bacteriebladvlekkenziekte is een quarantaineziekte. Wanneer de ziekte optreedt, worden maatregelen getroffen om verspreiding te voorkomen. Het aangetaste gewas wordt doodgespoten met een herbicide en verbrand, of de planten worden na rooien gekneusd en ondergewerkt om de vertering te bevorderen (Anonymus, 2004). In het laatste geval mag twee jaar lang geen aardbei geteeld worden op het perceel. Het is echter niet bekend hoe lang *X. fragariae* onder Nederlandse omstandigheden kan overleven op ondergewerkte gewasresten.

Om te onderzoeken hoe lang *X. fragariae* kan overwinteren, werden met de bacterie geïnoculeerde kasaardbeiplanten doodgespoten met een herbicide, ondergewerkt in grond en daarna geïncubeerd bij temperaturen die overeenkomen met de bodemtemperaturen tijdens het winterhalfjaar 2006/2007. Halverwege de incubatieperiode werd nagegaan of bladresten nog cellen van *X. fragariae* bevatten en of de grond met gewasresten nog besmettelijk was voor een nateelt van aardbei. Een tweede portie gewasresten werd aan het einde van de incubatieperiode onderzocht op aanwezigheid van het pathogeen.





# Materiaal en methoden

## Aardbeiplanten

De proef is uitgevoerd met 288 aardbeiplanten cv Elsanta die werden opgekweekt uit gekoelde wachtbedplanten. De wachtbedplanten werden individueel opgepot in literpotten met Lentse potgrond nr. 4. De planten werden vijf weken opgekweekt in PKM-II kassen bij een temperatuur van 19°C overdag en van 17°C 's nachts. Wanneer nodig werd de daglengte verlengd tot 16 uur door bijverlichting met SON-T lampen. De relatieve luchtvochtigheid tijdens de groei van de planten was 70%. De potten met aardbeiplanten stonden in drie rijen op kweektafels. De afstand tussen de planten in en tussen de rijen was 30cm. De potgrond werd dagelijks nat gemaakt door broezen. Het overtollige water werd opvangen in vloeimatten.

## Inoculatie met *X. fragariae*

De middag voor inoculatie werden de potten met aardbeiplanten dicht tegen elkaar geplaatst. De vloeimatten waarop de planten stonden, werd verzadigd met water, waarna de planten werden overkapt met transparant plastic. De bladeren en de binnenzijde van de wanden van de tunnels werd natgespoten om de lucht rond de planten te verzadigen met waterdamp. De planten werden geïnoculeerd met isolaat PD4450 van *X. fragariae*. Voor de bereiding van het inoculum werden 48-uurs kweken gebruikt die bij 25°C waren geïncubeerd op Yeast Peptone Glucose agar (Lelliott en Stead, 1987). De bacteriegroei werd gesuspenseerd in 0.3% Silwet-oplossing waarna de celdichtheid spectrofotometrisch werd gesteld op een OD<sub>600</sub> van 0.21 ( $4 \times 10^9$  cfu/ml). Vlak voor inoculatie werd 5 g/L carborundumpoeder 400 (deeltjesgrootte 30 µm) toegevoegd aan de bacteriesuspensie. Met een hogedruk bloemenspuit is per plant 9 – 10 ml bacteriesuspensie over de onderzijde van de bladeren verneveld. Door de deelbladeren tussen duim en wijsvinger vast te pakken en draaiende bewegingen te maken over het bladoppervlak werden de bladeren verwond. Na inoculatie verbleven de aardbeiplanten nog een etmaal onder hoge luchtvochtigheid in de plastic tunnels. Na verwijderen van de tunnels werden 32 groepen van 9 planten gevormd, waarna de planten verder werden opgekweekt.

## Doodspuiten

Vier weken na inoculatie werden de bladeren van 8 groepen van 9 planten behandeld met door de fabrikant aanbevolen concentraties van het herbicide Duplosan MCPP (4 liter/ha), Grammoxone (5 liter/ha), of Roundup Evolution (7 liter/ha). Als controle op de effecten van de herbiciden werden 8 groepen van 9 planten behandeld met water. Proeftechnisch werden de groepen met de 4 verschillende behandelingen (Duplosan MCPP, Grammoxone, Roundup Evolution en water) gerangschikt volgens het schema van twee blokkenproeven met elk 4 blokken. Tijdens het afsterven van de planten werden de vloeimatten op de kweektafels vochtig gehouden en werd alleen water gegeven wanneer de potgrond dreigde uit te drogen. De met water behandelde planten werden dagelijks matig begoten.

## Onderwerpen gewasresten

Twee weken na doodspuiten van de planten werden de afzonderlijke deelbladeren van de bladstelen losgeknipt. Van elke groep van 9 planten werd 1/3-deel van de deelbladeren bewaard bij -20°C t.b.v. het vaststellen van het besmettingsniveau met *X. fragariae* op het tijdstip van onderwerpen van de bladeren. Van de overige bladeren werd het bladoppervlak vastgelegd, waarna deze werden ondergewerkt. De bladloze planten werden met wortel en al uit hun pot gehaald. De wortels werden zoveel mogelijk ontdaan van potgrond. Een deel van de plantenresten werd op een 10cm dikke laag vochtige (70% waterhoudend vermogen) zwarte aarde (pH-H<sub>2</sub>O: 5.98; pH-KCl: 5.15; gehalte organische stof: 3.07%; waterhoudend vermogen: 212 g/kg) gelegd in een kunststof krat (l=65cm, b=36cm en

h=20cm). Op de gewasresten werd een nylon netzak uitgespreid waarin de onder te werken bladeren verspreid over het grondoppervlak werden neergelegd. Het restant van de plantresten werd verspreid over de netzak neergelegd, waarna de gewasresten werden afgedekt met een 10cm dikke laag van een mengsel van vochtige zwarte aarde en de potgrond waarin de planten waren opgekweekt.

## Simulatie winterse bodemtemperaturen

Een week na onderwerken van de gewasresten werden de kratten op twee pallets opgeslagen in een koelcel. De kratten op de ene pallet werden 11 weken opgeslagen en de kratten op de andere pallet 23 weken. Elke periode van vier weken werd de temperatuur van de koelcel ingesteld op een temperatuur die overeenkomt met het maandgemiddelde van de bodemtemperaturen die tijdens de winter van 2006/2007 in de Bilt werden gemeten op 10cm diepte (Tabel 1).

Tabel 1. *Bodemtemperaturen tijdens de winter 2006/2007 en de temperaturen waarbij gewasresten werden opgeslagen in een koelcel.*

Periode <sup>1</sup>	Bodemtemperatuur winter 2006/2007 <sup>2</sup>	Temperatuur in koelcel <sup>3</sup>
1	wk 2 - wk 4 10°C november 2006	9°C
2	wk 5 - wk 8 8°C december 2006	8°C
3	wk 9 - wk 13 7°C januari 2007	7°C
4	wk 14 - wk 17 6°C februari 2007	6°C
5	wk 18 - wk 20 8°C maart 2007	7°C
6	wk 21 - wk 24 12°C april 2007	11°C

<sup>1</sup> Periode van vier weken.

<sup>2</sup> Maandgemiddelden voor november 2006 t/m april 2007 van de bodemtemperaturen gemeten op 10cm diepte te De Bilt (Bron: KNMI, de Bilt).

<sup>3</sup> Gemiddelde luchttemperatuur gemeten vlak boven de kratten met gewasresten bevattende grond.

## Bladvertering

Door op het moment van onderwerken, 12 en 24 weken na onderwerken het totale door de deelbladeren of bladresten bedekte oppervlak te meten, werd de bladvertering bepaald. De stukken blad werden op een wit vel plastic met een oppervlak van 0,25m<sup>2</sup> gelegd en afgedekt met een raster met een lijnafstand van 2cm en gefotografeerd. De foto's zijn gebruikt om het door bladmateriaal bedekte oppervlak te meten. Het aantal hokjes, dat voor meer dan de helft werd gevuld door bladmateriaal, werd vermenigvuldigd met de oppervlakte per hokje.

## Overleving van *X. fragariae*

Op de momenten dat bladoppervlakten werden vastgelegd, werden ook bladmonsters genomen voor analyse op de aanwezigheid van *X. fragariae*. De bladmonsters werden bewaard bij -20°C. Na 23 weken opslag onder winterse omstandigheden werden ook de restanten van de rhizomen en de bladstelen van de geïnoculeerde planten ingevroren voor analyse op aanwezigheid van het pathogeen. De infectieusiteit van gewasresten die 12 weken onder winterse omstandigheden waren opgeslagen, werd onderzocht door de gewasresten (bladresten, restanten van de rhizomen en de bladstelen van de geïnoculeerde planten) in de verschillende kratten door de grond te mengen en per krat zes gekoelde wachtbedplanten op deze grond te planten en zes weken op te kweken onder de omstandigheden die boven worden beschreven. De nateelt werd wekelijks gecontroleerd op de ontwikkeling van blad-

symptomen. Aan het einde van de teelt werden de rhizomen van de nateeltplanten en de restanten van de rhizomen en de bladstelen van de geïnoculeerde planten ingevroren voor analyse op aanwezigheid van *X. fragariae*.

## Analyse op aanwezigheid van *X. fragariae*

De bevroren gewasrestmonsters werden gewogen en in 4ml water per gram weefsel vermalen in een Waring commercial blender met een 1-liter beker. Voor groen plantmateriaal was meer water nodig om een goed homogenaat te verkrijgen. Vanaf het moment dat het plantmateriaal bij stand 2 (=high) goed door het water mengde, werd het materiaal in 20 seconden kapot geslagen. Nadat het homogenaat ongeveer een uur had gestaan om de grofste plantdelen te laten bezinken, werd de bovenste vloeistoflaag verzameld voor onderzoek op aanwezigheid van cellen van *X. fragariae* m.b.v. immunofluorescentie cel-kleuring (IF). Van het verzamelde materiaal werd 10µl onverdunde, 10x en 100x verdunde vloeistof overgebracht naar gemerkte plekken op een IF-glaasje. Door het in de vloeistof aanwezige water bij 54°C te laten verdampen, werd het opgebrachte materiaal gedroogd. De in het materiaal aanwezige bacteriecellen werden op het IF-glaasje gefixeerd door het glaasje door een vlam te halen. Daarna werden de bacteriën met behulp van indirecte immunofluorescentie cel-kleuring gekleurd. Eerst werd op elke gemerkte plek van het IF-glaasje 10µl oplossing van primaire antilichamen tegen *X. fragariae* opgebracht. De antilichamen kregen 30 minuten de tijd om bij 27°C te binden aan eventueel aanwezige cellen van *X. fragariae*. Ongebonden antilichamen werden verwijderd door het IF-glaasje 10 minuten te dompelen in een wasbakje met 0.001M fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS). De gebonden antilichamen werden met fluorochroom gemerkt door op elke gemerkte plek van het IF-glaasje 10µl oplossing van FITC conjugaat op te brengen. Het conjugaat kreeg 30 minuten de tijd om bij 27°C te binden aan de door de monsters gebonden antilichamen tegen *X. fragariae*. Na een tweede wasbeurt (10 min, 0.001M PBS) om ongebonden conjugaat te verwijderen, werden de IF-glaasjes bekeken met de 100x objectief van een fluorescentie microscoop. De bacteriecellen die groen oplichtten, werden aangemerkt als IF-positief (cellen die antilichamen tegen *X. fragariae* hadden gebonden). Doordat in onverdunde en 10x verdunde vloeistof teveel storende deeltjes aanwezig waren, werden uiteindelijk alleen 100x verdund materiaal beoordeeld. Elk monster werd eerst van links naar rechts doorzocht op aanwezigheid van IF-positieve cellen. Wanneer deze aanwezig bleken, werd op 10 willekeurige plekken het aantal IF-positieve cellen per beeldveld geteld. De mediaan van de tellingen werd gebruikt om het aantal IF-positieve cellen in het monster te schatten. Materiaal van vier groepen van vier niet-geïnoculeerde planten, die gescheiden van de met *X. fragariae* geïnoculeerde planten waren opgekweekt maar wel op dezelfde manier werden behandeld als de geïnoculeerde planten, werd gebruikt als negatieve controle op de aanwezigheid van het pathogeen.

Ter bevestiging van de IF resultaten, werd een deel van de monsters, die ca. 1.5 jaar ingevroren waren geweest bij -80 °C, geanalyseerd m.b.v. een PCR methodiek uitontwikkeld door Groen Agro Control. PCR reactie vond plaats met de Pooler primers 241A (5'-GCCCGACGCGAGTTGAATC-3') en 241B (5'-GCCCGACGCGCTACAGACTC-3') volgens het volgende PCR protocol: 3 min, 94 °C, (1 min 94 °C, 1 min 60 °C, 1 min 72 °C)x40, 10 min 72 °C, 5 min 4 °C, 15 °C (Pooler *et al.*, 1996). Het PCR product (550 bp) werd aangetoond m.b.v. gelelectroforese. DNA extracten werden onverdund en 10x verdund geanalyseerd



# Resultaten

## Symptoomontwikkeling

Toen de aardbeiplanten werden geïnoculeerd, stonden zij in bloei. Een week na inoculatie waren aan de onderzijde van de meeste jonge bladeren 'watersoaked' laesies te zien. Bij de oudere bladeren ontbraken deze doorschijnende vlekken. Drie weken na inoculatie hadden de geïnoculeerde planten 2 á 3 bladeren met typische symptomen van de bacteriebladvlekkenziekte. Bij de bladeren met necrotische laesies was 5 – 20% van hun oppervlak aangetast door de ziekte. Van de individuele planten was 1 – 2% van het totale bladoppervlak aangetast.

## Effectiviteit loofdoodmiddelen

Bij de planten, die niet met loofdoodmiddel werden behandeld maar met water, trad geen bladsterfte op. Bij deze planten vergeelden de onderste bladeren door veroudering. Op het moment van onderwerken van de planten was ongeveer 90% van het totale bladoppervlak groen. Vierentwintig uur na behandeling met Duplosan MCPPP waren de eerste bruine vlekken zichtbaar. Verder vertoonden de bladstelen abnormale draaiingen. Als loofdoodmiddel bleek Duplosan MCPPP weinig effectief: 80% van het bladoppervlak bleef groen. Het loof van de met Grammoxone behandelde planten begon al 24 uur na bespuiten duidelijk op te krullen en uit te drogen. Na 48 uur waren de bladeren grotendeels egaal bruin. Uiteindelijk stierf het loof voor 90% af. Na behandeling met Roundup Evolution stierven de bladeren niet af. Wel krulden de bladranden licht op. Tachtig procent van het totale bladoppervlak bleef groen.

## Vertering van gewasresten

Twaalf weken na onderwerken van de bladeren bleken deze al grotendeels verteerd (Tabel 2). Bij de met Grammoxone doodgespoten bladeren was de afname van het bladoppervlak het grootst. Vierentwintig weken na onderwerken was de afname in bladoppervlak niet groter dan na 12 weken. Na behandeling met de verschillende herbiciden was de afname in bladoppervlak vergelijkbaar met die na bespuiting met water. Van de overige gewasresten verteerden de vruchten het snelst. Deze waren, met uitzondering van de zaden, 12 weken na onderwerken al geheel verdwenen. Vierentwintig weken na onderwerken waren nog steeds resten van bladstelen, wortels en rhizomen aanwezig in de grond.

Het inwendige weefsel van de rhizomen van planten, die met water waren behandeld, was nog grotendeels blank. Bij de planten die waren behandeld met Duplosan MCPPP of met Roundup Evolution, waren de rhizomen inwendig geelbruin van kleur. De rhizomen van de met Grammoxone behandelde planten waren inwendig donkerbruin verkleurd. Vierentwintig weken na onderwerken waren de rhizomen bij alle vier de behandelingen inwendig donkerbruin verkleurd.

Tabel 2. Afname van het bladoppervlak in procenten, 12 en 24 weken na onderwerken in vochtige grond.

Herbicide	12 weken	24 weken
Water	89 c	93 abc
Duplosan MCPPP	89 c	91 bc
Grammoxone	96 a	91 abc
Roundup Evolution	91 bc	94 ab

Getallen gevolgd door eenzelfde letter verschillen niet van elkaar ( $P=5\%$ ).

## Overleving van *X. fragariae* op bladresten

*IF-kleuring.* In de op het moment van onderwerken (0 weken) genomen monsters van de niet-geïnoculeerde bladeren was minder dan 1 IF-positieve cel per beeldveld aanwezig (Tabel 3). Dit komt neer op minder dan 500 IF-positieve cellen per gram blad. In de bladmonsters van de geïnoculeerde planten waren steeds meer dan 1000 IF-positieve cellen per beeldveld aanwezig (meer dan  $5 \cdot 10^8$  IF-positieve cellen per gram blad). Op de bladresten van de niet-geïnoculeerde planten bleef de dichtheid van de IF-positieve cellen tijdens de incubatie onder winterse omstandigheden op hetzelfde niveau als op het moment van onderwerken. Op de bladresten van de geïnoculeerde planten nam de dichtheid IF-positieve cellen sterk af tot een niveau vergelijkbaar met die bij de niet-geïnoculeerde planten.

Tabel 3. *IF (cellen per beeldveld) en PCR resultaten na 0, 12 en 24 weken bewaring van aardbeibladmateriaal in teelgrond afkomstig van wel- of niet-geïnoculeerde planten behandeld met verschillende loofdoodmethoden.*

Herbicide	0 weken, - Xf		0 weken, +Xf		12 weken, - Xf		12 weken, + Xf		24 weken, - Xf		24 weken, +Xf	
	IF*	PCR**	IF	PCR	IF	PCR	IF	PCR	IF	PCR	IF	PCR
Water	<1	1N	>1000	8P	<1	1N	<1	3P,1N	<1	1N	2	4N
Duplosan MCPP	0	1N	>1000	8P	<1	1N	<1	4N	<1	1N	10	1P,3N
Grammoxone	<1	1N	>1000	7P,1N	<1	1N	0	1P,3N	<1	1N	10	4N
Round up Evolution	<1	1N	>1000	7P,1N	1	1N	<1	2P,2N	<1	1N	2	4N

\* *In IF werd het bladmateriaal van de niet-geïnoculeerde planten in enkelvoud en van de geïnoculeerde planten in viervoud getoetst; de mediaan va het aantal IF-positieve cellen in 100x verdunde extracten wordt vermeld.*

\*\* *In PCR werden monsters in enkelvoud, viervoud of achttvoud getoetst. Het aantal positief (P) en negatief (N) bevonden monsters is vermeld.*

*PCR-analyse.* De PCR methode bevestigde i.h.a. de positieve IF resultaten op tijdstip T=0. Toch waren nog twee van deze 24 onderzochte IF-positieve monsters PCR negatief. Aangenomen wordt dat in deze gevallen de PCR reactie geremd is geweest. Daarnaast werd met PCR in *X. fragariae* besmet materiaal, dat na een verblijf van 12 weken ondergronds IF negatief was na 12 weken, DNA van *X. fragariae* gedetecteerd in 6 van de 16 monsters. Na 24 weken wordt er nog in 1 van de 16 monster DNA van Xanthomonas in besmet materiaal gedetecteerd. De niet-geïnoculeerde monsters (Xf-) waren allen PCR negatief.

## Overleving van *X. fragariae* in rhizomen en bladstelen

*IF-kleuring.* De resten van de rhizomen en stengeldelen van de niet-geïnoculeerde planten waren steeds vrij van IF-positieve cellen. Dit was ook het geval bij de monsters van de geïnoculeerde aardbeiplanten die werden behandeld met water, Duplosan MCPP of Grammoxone (Tabel 4 en 5). Echter in één van de vier herhalingen van gewasresten, afkomstig van geïnoculeerde planten behandeld met Roundup Evolution werden na 18 weken hoge aantallen IF-positieve cellen gevonden ( $> 10^7$  IF-positieve cellen/gram plantmateriaal) (tabel 4). Na een verblijf van 24 weken in teelgrond waren alle herhalingen van met Roundup Evolution behandelde planten IF-negatief.

*PCR-analyse.* Na 18 weken waren 6 van de 16 Xf-geïnoculeerde gewasresten (anders dan blad) PCR-positief (Tabel 4). Ook het IF-positieve monster was PCR positief. Na 24 weken was nog 1 van de 16 monsters PCR-positief. Van de getoetste rhizomen van de nateelt was geen enkel monsters PCR positief (tabel 5). Ook de niet-geïnoculeerde monsters waren allen negatief. Het viel ons op dat soms PCR-resultaten alleen positief zijn in de onverdunde monsters en soms alleen positief in de 10x verdunde monsters (data niet weergegeven). Dit betekent dat bij voorkeur beide verdunningen moeten worden getoetst.

Tabel 4. Aantal IF en PCR positieve gewasresten van aardbei na 18 en 24 weken bewaring in teelgrond, afkomstig van geïnoculeerde planten behandeld met verschillende loofdodingsmiddelen.

	18 weken, -Xf		18 weken, + Xf		24 weken, -Xf		24 weken, + Xf	
	IF*	PCR**	IF	PCR	IF	PCR	IF	PCR
Water	Nd	Nd	<1	2P,2N	0	nd	<1	4N
Duplosan MCPP	Nd	Nd	0	4N	0	1N	1	4N
Grammoxone	Nd	Nd	0	1P,3N	0	1N	1	4N
Round up Evolution	Nd	Nd	0, >1000 (1x)***	2P**,2N	0	1N	1	1P,3N

\* In IF werd het materiaal van de niet-geïnoculeerde planten in enkelvoud en van de geïnoculeerde planten in viervoud getoetst; de mediaan van het aantal IF-positieve cellen in 100x verdunde extracten is vermeld.

\*\* In PCR werden monsters in enkelvoud of viervoud getoetst. Het aantal positief (P) en negatief (N) bevonden monsters is vermeld.

\*\*\* IF positieve monster was positief in PCR.  
Nd = niet getoetst (monster ontbrak).

Tabel 5. Aantal IF en PCR positieve rhizomen uit de nateelt na 18 en 24 weken bewaring in teelgrond, afkomstig van geïnoculeerde planten behandeld met verschillende loofdodingsmiddelen.

	18 weken, -Xf		18 weken, + Xf	
	IF*	PCR**	IF	PCR
Water	0	Nd	0	4N
Duplosan MCPP	0	Nd	0	4N
Grammoxone	0	1N	0	1P,3N
Round up Evolution	0	1N	0	4N

\* In IF werd het materiaal van de niet-geïnoculeerde planten in enkelvoud en van de geïnoculeerde planten in viervoud getoetst; de mediaan van het aantal IF-positieve cellen in 100x verdunde extracten is vermeld.

\*\* In PCR werden monsters in enkelvoud of viervoud getoetst. Het aantal positief (P) en negatief (N) bevonden monsters is vermeld.

Nd = niet getoetst (te weinig materiaal aanwezig).

## Infectieusiteit gewasresten voor nateelt van aardbei

Gedurende de nateelt van 6 weken werden geen symptomen vastgesteld. De rhizomen van de nateeltplanten bleken na 6 weken geen IF-positieve cellen te bevatten. Wel werd er een PCR-positief monster gevonden na 18 weken b.





## Discussie

Na inoculatie van aardbeiplanten met isolaat PD4450 van *X. fragariae* vertoonden de bladeren typische symptomen van de bacteriebladplekkenziekte. Hieruit blijkt dat het gebruikte isolaat het bladweefsel heeft gekoloniseerd en virulent is. Op het moment van onderwerpen was de celdichtheid van *X. fragariae* bij de vier groepen aardbeiplanten even hoog (ca.  $10^8$  cellen per gram). Bij de met de drie gebruikte loofdoodmiddelen behandelde planten stierven alleen bij Grammoxone de bladeren al na enkele dagen af. Hoewel de ontwikkeling van de aardbeiplanten werd verstoord door de herbiciden Duplosan MCPP en Roundup Evolution, ging het loof niet dood. De vertering van de met Grammoxone behandelde bladeren verliep de eerste 12 weken sneller dan bij de andere behandelingen. Na 24 weken was dit verschil echter weer verdwenen. Na behandeling met Grammoxone was het weefsel van de rhizomen ook eerder afgestorven dan bij Duplosan MCPP en Roundup Evolution. Grammoxone doodt dus niet alleen het loof, de vroege processen in de vertering van gewasresten worden door dit middel bevorderd.

Op het moment dat de bladeren van de geïnoculeerde planten met grond werden afgedekt, waren de aantallen IF-positieve cellen (meer dan  $5 \times 10^8$  cellen per gram) in extracten van deze bladeren aanzienlijk hoger dan de aantallen (minder dan  $5 \times 10^2$  cellen per gram) in extracten van bladeren van niet-geïnoculeerde planten. Daar de bladeren van de geïnoculeerde planten waren aangetast door de bacteriebladplekkenziekte, zijn de IF-positieve cellen vrijwel zeker cellen van *X. fragariae*. Dit wordt nog eens bevestigd door de PCR resultaten; vrijwel alle IF-positieve monsters waren ook PCR positief. De identiteit van de lage aantallen IF-positieve cellen in de bladeren van de niet-geïnoculeerde planten is onbekend. In tegenstelling tot de ontwikkeling van de populaties IF-positieve cellen bij de met isolaat PD4450 geïnoculeerde planten bleef het aantal IF-positieve cellen bij de niet-geïnoculeerde planten tijdens de incubatie in grond vrijwel constant. Omdat deze monsters PCR-negatief waren, mag er van uitgegaan worden dat het hier gaat om bacteriën die kruisreageren met het gebruikte antiserum.

Het aantal PCR-positieve bladmonsters afkomstig van Xf-positieve planten, daalde van 94% op het moment van onderwerpen ( $T=0$ ), naar 20% en 3% na een verblijf van respectievelijk 12 en 24 weken in de grond. Er werden dus ook PCR-positieve bladmonsters gevonden op latere tijdstippen, wanneer met IF geen duidelijk positieve monsters konden worden teruggevonden. Het is waarschijnlijk dat dit komt door een hogere gevoeligheid van de PCR methodiek. Het is niet uitgesloten dat in PCR DNA van dode cellen of celresten is gedetecteerd, maar in een microbiële actieve grond wordt dit meestal snel afgebroken. Het is dus waarschijnlijk dat *X. fragariae* tot 6 maanden in bladmonsters in grond kan overleven. In de overige gewasresten van geïnoculeerde planten, die gedeeltelijk bestonden uit verhoude rhizoomdelen werd in IF één positief monster na 18 weken bewaren in grond gevonden.

In rhizomen van de nateelt, geogst van besmette gronden werden geen IF-positieve monsters gevonden. Er werd wel één van de zestien Xf-besmette rhizoom monsters PCR-positief gevonden. Om organisatorische redenen was het niet mogelijk om de overdracht van *X. fragariae* vanuit besmette gewasresiduen naar wortels van schone planten verder te volgen. De resultaten geven aan dat de overdracht van de (lage aantallen) cellen van *X. fragariae* in gewasresten naar schone planten in grond niet efficiënt verloopt. Het risico van besmettingen in grond voor herinfectie wordt dan ook laag ingeschat. Kennedy en King (1962) toonden in de staat Minnesota (Verenigde Staten van Amerika) aan dat in het vrije veld in grond begraven bladeren van door bacteriebladplekkenziekte aangetaste aardbeiplanten tot het voorjaar infectieus bleven. De onderzoekers toonden in hetzelfde onderzoek ook aan dat, wanneer bladeren werden ingegraven in de grond van een kas met een temperatuur van  $18^\circ\text{C}$ , deze slechts 3,5 maanden infectieus bleven. De winters in Minnesota, waar de bodemtemperatuur op 10cm diepte van december t/m februari onder het vriespunt ligt, zijn strenger dan in Nederland. Hierdoor zal de bladvertering in de grond en de ontwikkeling van de microflora op deze bladeren in Minnesota trager verlopen dan in Nederlandse bodems. Waarschijnlijk zijn de mogelijkheden voor *X. fragariae* om in Nederlandse bodems te overwinteren slechter dan in Minnesota. De waarneming dat de nateeltplanten, gegroeid op grond waarin besmette gewasresten waren gemengd, niet werden aangetast door bacteriebladplekkenziekte lijken dit vermoeden te bevestigen.



## Literatuur

Anonymus (2004).

Informatie over *Xanthomonas fragariae* in aardbeien. Werkgroep *Xanthomonas* Aardbei. 3pp.  
([www.plantum.nl/pdf/informatieset\\_aardbei](http://www.plantum.nl/pdf/informatieset_aardbei)).

Kennedy, B.W. en King, T.H. (1962).

Studies on epidemiology of bacterial angular leafspot on strawberry. *Plant Disease Reporter* 46: 360-363.

Lelliott, R.A. en Stead, D.E. (1987).

Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Pooler, M.R., Ritchie, D.F. en Hartung, J.S. (1996). Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3121-3127.

