



Naar een bemonsteringsmethodiek voor *Xanthomonas fragariae* in aardbei

Verdeling van *Xanthomonas fragariae* in twee natuurlijk-besmette
vermeerderingsgewassen

Prof. dr. T. H. Been, Dr. P. Kastelein & Dr. J.M. van der Wolf

© 2008 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 – 48 60 01
Fax : 0317 – 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl; Jan.vanderWolf@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
1. Samenvatting	3
2. Inleiding	5
3. Materiaal en methoden	6
3.1. Bemonstering planten	6
3.2. Situatieschets bemonsterde percelen	6
3.3. Verwerking monsters	8
3.4 Immunofluorescentie cel-kleuring (IF)	8
4. Resultaten en discussie	10
4.1. Resultaten perceel 1	10
4.2. Resultaten perceel 2	13
4.3. Algemene discussie	16
4.4. Voorstellen vervolgonderzoek	17
5. Literatuur	19

1. Samenvatting

In november 2007 werden twee percelen met aardbeivoortkweekingsmateriaal, natuurlijk geïnfecteerd met *X. fragariae*, systematisch bemonsterd. Op een plot met een oppervlakte van ca. 100 m² werden van ca. 120 planten rond een symptomatische plant, de (negen) samengestelde bladeren geanalyseerd op aanwezigheid van *X. fragariae*. Per m² werd 1 plant bemonsterd door de samengestelde bladeren, na uitwendige ontsmetting, afzonderlijk te toetsen met immunofluorescentie celkleuring, een serologische detectiemethode. Van de symptomatische plant werden de deelbladen geanalyseerd en tevens de rhizoom en uitlopers.

Op plot 1 werd een geaggregeerde verdeling gevonden van latent besmette en niet besmette planten. Vaak waren maar hooguit twee bladeren per plant besmet. Plot 2 vertoonde geen enkel distributiepatroon; slechts twee planten waren vrij van *X. fragariae*. In plot 2 waren oudere bladeren vaker besmet dan jongere bladeren. Van de symptomatische planten werden infecties in alle samengestelde bladeren, de rhizomen, maar niet in de uitlopers gevonden. Niet alle deelbladeren van de samengestelde bladeren waren besmet.

Op basis van deze gegevens is geen uitgewerkte bemonsteringssystematiek te ontwerpen. Er is informatie nodig met een groter oplossend vermogen en besmettingen moeten meer gedetailleerd in kaart worden gebracht. Ook moet het infectieverloop in de tijd meegenomen worden.

Toch leveren de gegevens wel een aantal handvatten voor een bemonsteringsstrategie. In de huidige bemonsteringssystematiek, waarbij 10 samengestelde bladeren van 10 verschillende planten per 2000 m² worden bemonsterd, is m.n. in perceel 1 de kans gering *X. fragariae* aan te tonen. Als de verdeling in het bemonsterde plot representatief is voor het hele perceel moeten er, om een besmetting aan te kunnen tonen met een zekerheid van 90%, minstens 20 bladeren van 20 verschillende planten per 100 m² bemonsterd worden. Voor perceel B zijn dat 3 bladeren van drie verschillende planten. Vanuit het oogpunt van bemonstering zouden meerdere (oudere) bladeren per plant bemonsterd moeten worden. De meest gewenste te bemonsteren éénheid is de plant.

Er worden in dit rapport verder suggesties gegeven voor gefaseerd vervolgonderzoek dat uitgevoerd moet worden om een betrouwbaarder bemonsteringsprotocol te ontwikkelen.

2. Inleiding

De uitvoering van het onderzoeksproject “Ontwikkeling bemonsteringssystematiek voor het toetsen op latente infecties in voortkweekingsmateriaal” is in verschillende fasen verlopen. Eerst is de biologie van vier ziekteverwekkende bacteriën in kaart gebracht, nl. van *Erwinia chrysanthemi* en *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* als aardappelpathogenen, *Erwinia amylovora* als pathogeen van steenvruchten en *Xanthomonas fragariae* als aardbeipathogeen. Deze pathogenen zijn van groot belang voor de Nederlandse land- en tuinbouw (Van der Wolf et al., 2005). Daarna is een blauwdruk “Bemonstering” geschreven, met daarin een generieke strategie voor de ontwikkeling van een bemonsteringssystematiek voor organismen met passieve verspreiding (Been et al., 2006). Vervolgens is een inventarisatie gemaakt van de ruimtelijke verspreiding van *X. fragariae* in aardbei, *Erwinia amylovora* in steenvruchten en *Erwinia chrysanthemi* in aardappel aan de hand van interviews met keurmeesters. Dit is aangevuld met gegevens uit (grijze) literatuur en oriënterend veldonderzoek voor *X. fragariae* (Speksnijder et al., 2006). Tenslotte is er in 2007 op grotere schaal veldonderzoek verricht aan *X. fragariae*. De gegevens over distributie en ruimtelijke verspreiding werden als basis gebruikt voor een eerste opzet van een bemonsteringssystematiek voor toetsen op latente infecties in voortkweekingsmateriaal. In dit rapport worden de resultaten van het veldonderzoek beschreven en voorstellen gedaan voor toetsing op latente infecties.

In november 2007 werden twee percelen met aardbei vermeerderingsmateriaal bemonsterd waarin lage aantallen symptomatische planten voorkwamen. Van elk veld werd één plot van ca. 100 m² bemonsterd waarbij een zieke plant in het centrum van de plot lag. Per m² werd 1 plant bemonsterd door de samengestelde bladeren, na uitwendige ontsmetting, afzonderlijk te toetsen met immunofluorescentie celkleuring, een serologische detectiemethode. Van de zieke plant werden deelbladeren afzonderlijk getoetst, evenals het rhizoom en de runners. Op basis hiervan werd de verdeling en de ruimtelijke distributie van de bacterie in kaart gebracht. Deze gegevens zijn gebruikt voor het vaststellen van een aantal adviezen m.b.t. bemonstering. Ook worden er suggesties gedaan voor vervolgonderzoek

3. Materiaal en methoden

3.1. Bemonstering planten

Bij het in kaart brengen van de ruimtelijke verdeling van *X. fragariae* (Xf) moest er een keuze worden gemaakt betreffende de intensiteit van de bemonstering. Om zicht te krijgen op de middenschalige verdeling, is bij de keuze van de gebiedsgrootte van ca. 100 m² uitgegaan van de gegevens van de pilot bemonstering uit 2006 en van de spaarzame gegevens in de literatuur (Kocks, 1998). Binnen het beschikbare budget konden twee van deze gebieden worden bemonsterd, om een eerste indruk van vorm en grootte van de besmettingen te verzamelen.

Er konden maar een beperkt aantal metingen worden verricht terwijl ook de hoeveelheid materiaal die per monster kon worden getest beperkt was. Het was onduidelijk of van een latent besmette plant, een deelblad, een samengesteld blad of de hele plant bemonsterd moest worden. Het was in het project niet mogelijk alle deelbladen te testen. Er is daarom gekozen voor samengestelde bladeren. Uitgaande van gemiddeld 9 bladeren per plant, konden er op een plot van ca. 100 m² maximaal 1 plant per m² bemonsterd worden op latente aanwezigheid van *Xanthomonas fragariae*. Hierbij werd aangenomen dat deze plant representatief is voor de hele vierkante meter. Deze aanname is niet onderbouwd, maar dit was de enige optie om een groter oppervlak in kaart te kunnen brengen. Verwacht werd dat er over het bemonsterde oppervlak een duidelijk patroon zou kunnen worden waargenomen van infectie-incidenties van samengestelde bladeren en ook van de dichtheden bacteriecellen per samengesteld blad..

3.2. Situatieschets bemonsterde percelen

De locaties van de percelen worden op verzoek van de Naktuinbouw niet bekend gemaakt.

Perceel 1

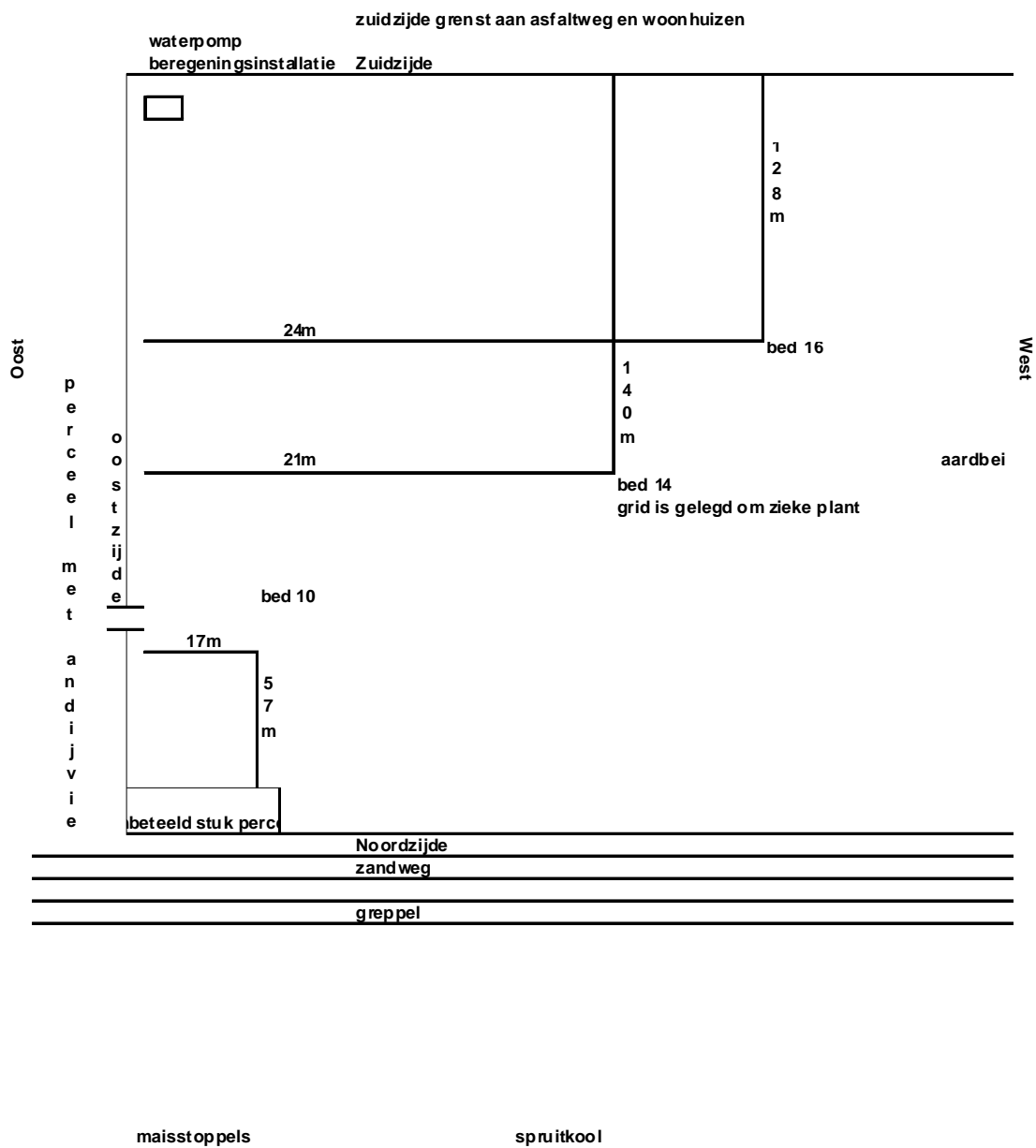
Op het perceel werden twee puntinfecties gevonden en één kleine haard. De haard en één puntinfectie van twee planten bevonden zich ongeveer halverwege de lengte van de bedden. Het centrum van het bemonsterde grit lag op bed 14 op 140 m van de perceelsrand aan de zuidzijde en 21 m van de perceelsrand aan de oostzijde.

Het grid overspande een totale breedte van 6 bedden, waarbij de X-coördinaten -4, +1 en +4 zich bevonden in de paden (hierdoor konden voor deze X-coördinaten geen planten bemonsterd worden). Er werd op 12 november 2007 bemonsterd. Tijdens het monstern was het droog en zonnig weer, weinig wind, 10 - 15 °C.

Het perceel was juni/juli beplant met stekken (cv. Elsanta). De bedden liepen van noord naar zuid; de lange zijden van het perceel liepen parallel met een weg en een zandpad die van oost naar west liepen (zie figuur 1). De bedbreedte was 120 cm. Tussen de bedden waren paden van 40 cm breedte aangebracht. Er waren 4 rijen planten per bed geplant, de afstand tussen de rijen was 30 cm en in de rijen 20 cm. Er was vrijwel geen onkruid aanwezig. De meeste planten hadden minder dan 9 volledig ontwikkelde bladeren. De bladeren waren donkergroen en gezond. Er waren geen bloemen aanwezig. Enkele planten vormden nieuwe uitlopers.

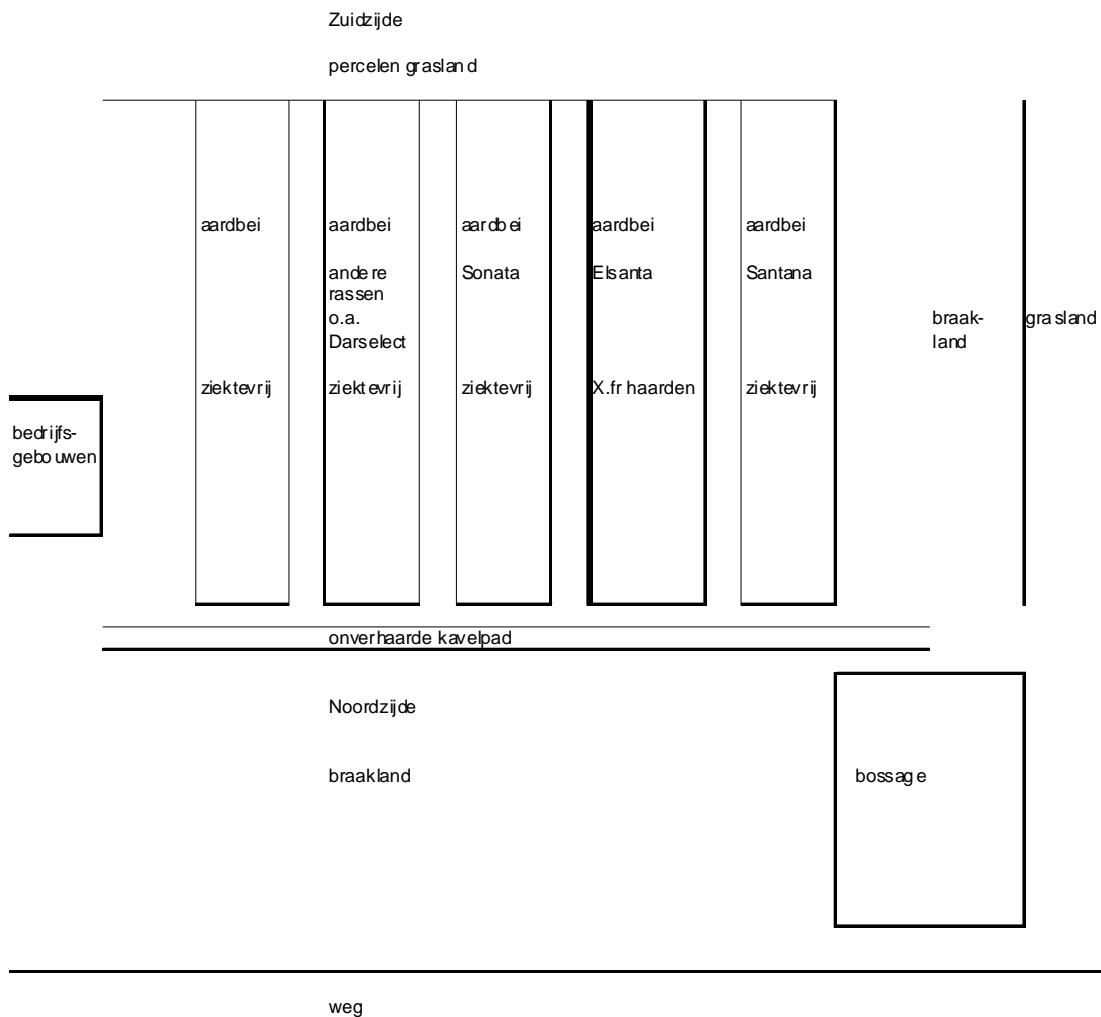
Perceel 2

Bedden liepen van noord naar zuid. De bedbreedte was 125 cm (zie figuur 2). Tussen de bedden lagen paden van 40 cm breedte. Een bed bestond uit 5 rijen planten, de afstand tussen rijen en tussen planten was 20cm. Er was vrijwel geen onkruid aanwezig op het perceel. Het veldje (210x18.4 m) bestond uit 10 bedden van 5 rijen met aan de oost- en westzijde een bed van 3 rijen planten. Het veld bevatte 12 puntbesmettingen die als volgt verdeeld waren (x,y coördinaten (in meters) gemeten vanaf oostzijde veldje als Y-as en X-as aan noordzijde): 15.4x11; 4.0x27; 15.5x30; 14.0x56; 5.9x62; 15.6x81; 5.5x92; 15.7x128; 5.7x158; 5.5x172; 15.5x192; 5.7x203.



Figuur 1. Situatieschets perceel 1.

Tijdens de bemonstering op 31 oktober 2007 was het ca. 8 °C, zwaar bewolkt met geringe neerslag. Elk blad werd bij punt gepakt, de steel werd doorgesnipt en het blad werd in een plastic zak gebracht. Vòòr bemonstering van een plant werden schaar en handschoenen ontsmet met 96% ethanol



Figuur 2. Situatieschets perceel 2.

3.3. Verwerking monsters

Het plantmateriaal werd in afzonderlijke gecodeerde plastic zakjes gedurende ca. 8 weken ingevroren bij -20 °C. Het blad werd 2 minuten ondergedompeld (uitwendig gesteriliseerd) in 0,4% actieve chloor. Het blad werd een halve minuut gespoeld met kraanwater onder de lopende kraan. Het blad werd op filterpapier gelegd om uit te lekken. Het sap werd uit het blad geperst door middel van een Pollähnepers en opgevangen in 1 ml buisjes. Indien nodig werd een beetje water op de rollers gespoten om voldoende sap te verkrijgen. De pers werd na ieder monster schoongemaakt met een sterke straal kraanwater en met een afwaskwast gedoopt in zeepwater.

3.4. Immunofluorescentie cel-kleuring (IF)

De sapmonsters werden 1:10, 1:100 en 1:1000 verdund in steriel MQ water en 5 µl van deze verdunningen werden op de met alcohol ontvette IF glaasjes gebracht. Voor preparatie van positieve en negatieve controles werden tienvoudige verdunningen van suspensies van *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (IPO-161) en *Xanthomonas fragariae* (PD4450) gemaakt in water of een schoon aardbei-extract (10^8 – 10^1 cellen/ml) gebruikt.

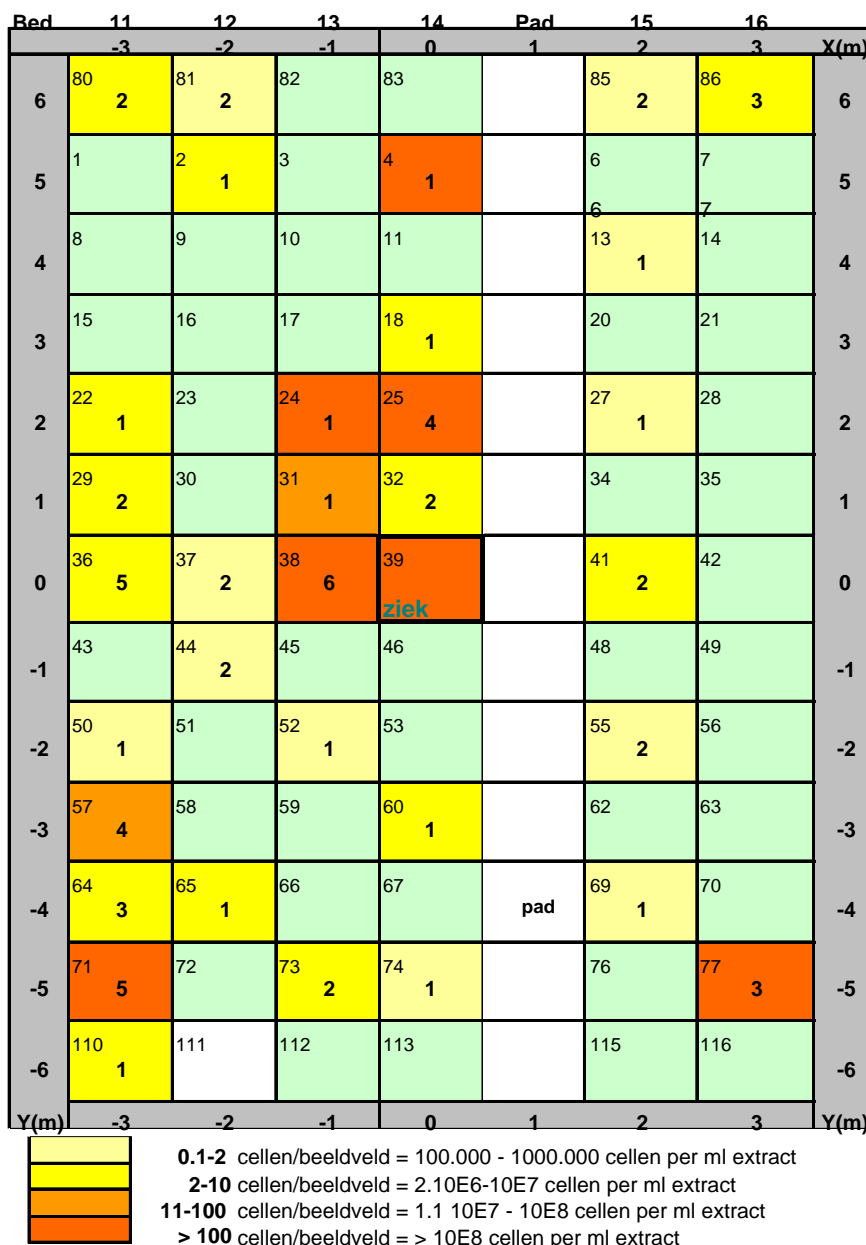
De glaasjes werden gedroogd op een verwarmingsplaat van 50 °C. De glaasjes werden net zo lang door een vlam gehaald totdat het glaasje donker kleurde maar niet kapot sprong. Op elk welletjes werd 5 µl primair antilichaam (I9534-06, 1:250 in 1x PBS) gepipetteerd. Glaasjes werden geïncubeerd in een moisture chamber (30 minuten bij 27 °C). De glaasjes werden 3x5 minuten gewassen met PBS (0,01%) en vervolgens gespoeld met water. De

glaasjes werden gedroogd op een plaat van 50 °C. Op elk welletje werd 5 µl GAR-FITC conjugaat gepipetteerd (1:200 in 1x PBS). De glaasjes werden geïncubeerd in een moisture chamber (30 minuten bij 27 °C). De glaasjes werden 3x5 minuten gewassen met PBS (0,01%) en vervolgens gespoeld met water. De glaasjes werden weer gedroogd op een plaat van 50 °C. Een aantal druppels vectashield (inbedbuffer) werd op elk glaasje gebracht en de glaasjes werden afgedekt met een dekglasje. De glaasjes werden bewaard (max. 1 dag) in het donker in een moisture chamber. Er werden per monster 100 beeldvelden beoordeeld met een UV microscoop bij een vergroting van 1000 maal. 80 µl van elk extract werd in een microtiterplaat gemengd met 40 µl 50% glycerol en bewaard bij -20 C. Het aantal cellen per beeldveld werd geschat.

4. Resultaten en Discussie

4.1. Resultaten perceel 1

In Figuur 3 en Tabel 1 zijn de resultaten weergegeven van de geanalyseerde monsters van plot 1 op Perceel 1. In Tabel 1 staan gedetailleerd de resultaten van de analyse van de twee symptomatische planten. Alle bladeren zijn getest, inclusief de jongere bladeren, de bladsteel, de uitloper en het rhizoom. Alle samengestelde bladeren, behalve de jonge niet of net ontvouwen samengestelde bladeren waren besmet. Van respectievelijk 2 van de 6 en 2 van de 3 besmette samengestelde bladeren bleken alle drie deelbladen besmet te zijn. Eén van de 8 bladstelen was besmet, evenals 1 van de twee rhizomen. Beide uitlopers waren niet aantoonbaar besmet.

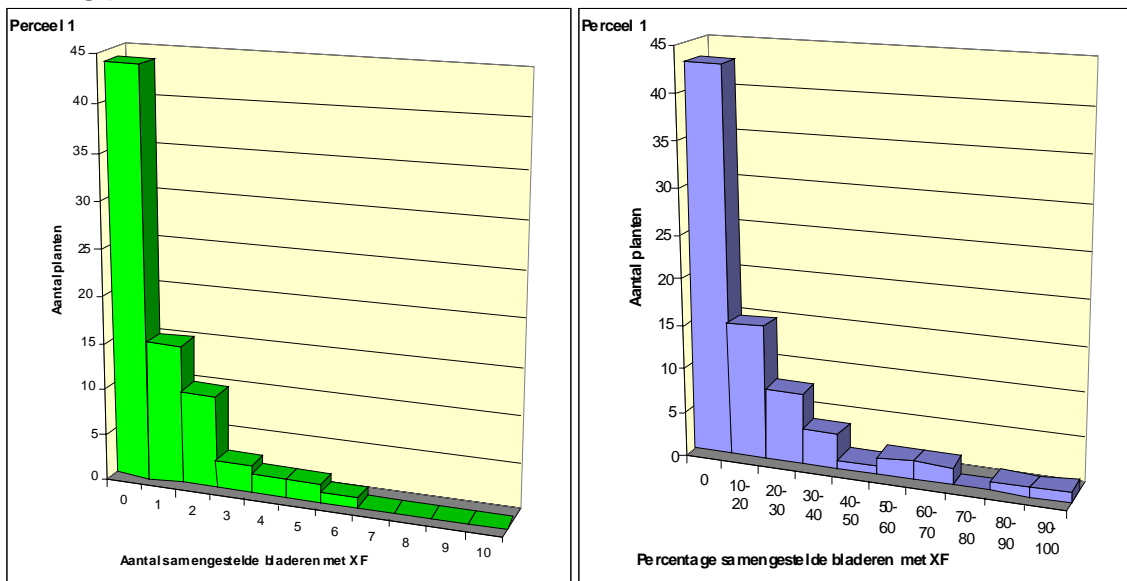


Figuur 3. Situatie schets en infectieniveaus per plant op plot 1 (perceel 1). Elk vakje bestaat uit 1 m². de dikgedrukte getallen in het midden van de vakjes representeren het aantal besmette samengestelde bladeren per plant. De hoogte. De kleur van de vakjes de mate van besmetting met *X. fragariae*.

Zieke plant	plantdeel		IF resultaat verd.100X cellen/gezichtsvel	Cellen/ml extract
1	uitloper	uitloper	0	0
	rhizoom	rhizoom	1	1,000,000
	nog niet ontvouwen blad, geen symptomen	jong blad a	0	0
	nog niet ontvouwen blad, geen symptomen	jong blad b	0	0
	nog niet ontvouwen blad, geen symptomen	jong blad c	0	0
	nog niet ontvouwen blad, geen symptomen	jong blad d	0	0
	net ontvouwen blad, geen symptomen	jong blad e	0	0
	net ontvouwen blad, geen symptomen	jong blad f	0	0
	net ontvouwen blad, geen symptomen	jong blad g	0	0
	net ontvouwen blad, geen symptomen	jong blad h	0	0
	dood blad	dood blad i	1	1,000,000
	dood blad	dood blad j	0	0
	half dood blad	half dood blad k	0	0
	groen blad zonder symptoom - bladsteel	blad l, bladsteel	0	0
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad l, 1	0	0
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad l, 2	0	0
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad l, 3	1	1,000,000
	groen blad zonder symptoom - bladsteel	blad m, bladsteel	0	0
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad m, 1	10	10,000,000
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad m, 2	0	0
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad m, 3	0	0
	groen blad zonder symptoom - bladsteel	blad n, bladsteel	1	1,000,000
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad n, 1	0	0
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad n, 2	0	0
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad n, 3	1	1,000,000
	groen blad, weinig symptomen - bladsteel	blad o, bladsteel	0	0
	groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad o, 1	20	20,000,000
	groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad o, 2	5	5,000,000
	groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad o, 3	1	1,000,000
	groen blad, enkele symptomen - bladsteel	blad p, bladsteel	0	0
	groen blad, enkele symptomen - deelblad	blad p, 1	>100	>100,000,000
	groen blad, enkele symptomen - deelblad	blad p, 2	20	20,000,000
	groen blad, enkele symptomen - deelblad	blad p, 3	50	50,000,000
2	uitloper	uitloper	0	0
	rhizoom	rhizoom	0	0
	nog niet ontvouwen blad, geen symptomen	jong blad	0	0
	groen blad zonder symptoom - bladsteel	blad a, bladsteel	0	0
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad a, 1	5	5,000,000
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad a, 2	10	10,000,000
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad a, 3	10	10,000,000
	groen blad zonder symptoom - bladsteel	blad b, bladsteel	0	0
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad b, 1	0	0
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad b, 2	10	10,000,000
	groen blad zonder symptoom - deelblad	blad b, 3	0	0
	groen blad met bladvlekken - bladsteel	blad c, bladsteel	0	0
	groen blad met bladvlekken - deelblad	blad c, 1	50	50,000,000
	groen blad met bladvlekken - deelblad	blad c, 2	100	100,000,000
	groen blad met bladvlekken - deelblad	blad c, 3	50	50,000,000

Tabel 1. Resultaten IF analyse van 2 symptomatische planten die in het centrum van plot 1 stonden.

Plot 1 vertoont een geaggregeerde verdeling van besmette en niet besmette subplots (Figuur 3). Rond de plant met visuele symptomen blijken ook de andere subplots ten minste één met *Xanthomonas fragariae* besmette plant te herbergen. Elders in het plot zijn ook clusters aanwezig van subplots met een centrale latent besmette plant. Aan de westzijde (hier rechts) lijkt de besmetting af te nemen. Het lijkt hier alsof de middenschalige verdeling veel kleiner is dan aangenomen en dat er sprake is van meerdere introducties van *Xanthomonas fragariae* die zich aan het uitbreiden zijn. Bemonstering van één plant per vierkante meter is in dit geval onvoldoende om een goede indruk te krijgen van de aangetroffen verdeling. Er is een kans dat in de 'niet aangetaste' plots de bemonsterde plant weliswaar niet latent is besmet, maar andere planten binnen deze vierkante meter wel. In vervolgonderzoek moet bij een dergelijke incidentie van geïnfecteerde planten deze vierkante meters in totaal, alle 15 tot 18 planten, worden bemonsterd. Op basis van de hier gegenereerde gegevens, met enkele punten per cluster, kan geen generiek model worden gepostuleerd.



Figuur 4. Aantal samengestelde bladeren per plant besmet met *X. fragariae* (links) en het percentage besmette bladeren met *X. fragariae* (rechts)

Van de 78 m²-subplots die zijn bemonsterd, is in 34 subplots een latente besmetting aangetoond. De kans is groot dat in meerdere van de niet-besmet gevonden subplots eveneens besmette planten te vinden zijn. De bemonsterde aardbeiplanten hadden gemiddeld 8 samengestelde bladeren. De besmette planten hadden meestal één samengesteld blad en soms twee samengestelde bladeren met een lichte besmetting. In Figuur 4 is de frequentieverdeling van het aantal besmette bladeren per plant weergegeven (links). In Figuur 4 (rechts) is dit getal gecorrigeerd met het totale aantal samengestelde bladeren per plant en is het percentage besmette samengestelde bladeren weergegeven.

Uiteindelijk blijken 70 van de 621 geteste samengestelde bladeren besmet te zijn. Dit is een percentage van 11%. We kunnen aannemen dat dit percentage een goede schatter is voor de besmettingskans van de niet geteste samengestelde bladeren binnen het bemonsterde areaal. Dit betekent dat de kans om een besmet samengesteld blad te plukken uit de gehele populatie van samengestelde bladeren op 11% gesteld kan worden ($p = 0.89$ voor geen detectie). In Figuur 5 kan de detectiekans worden afgelezen indien 1 tot 30 samengestelde bladeren worden verzameld. Met de huidige 10 bij 20m bemonstering met verzameling van 10 samengestelde bladeren van 10 verschillende planten per 200 m² is de kans gering dat *X. fragariae* in dit plot wordt aangetoond. Van de geteste 78 subplots die bijna 100 m² vertegenwoordigen zou hooguit 1 samengesteld blad zijn bemonsterd. De kans op detectie is dan dus lager dan $1 - 0.89^5 = 0.11$ (11%). Om een kans van tenminste 90% te hebben zouden er minstens 20 samengestelde bladeren per 100 m² bemonsterd moeten worden. Er kan ook worden beredeneerd dat het besmette oppervlak groter is dan het oppervlak dat daadwerkelijk is bemonsterd. Aan de linkerkant (de oostzijde van het veld) kan niet worden aangenomen dat de besmetting hier abrupt eindigt. Het werkelijk besmette areaal is dan

veel groter en de werkelijke detectiekans ligt dus ook hoger, maar kan niet boven de $1 - 0.89^{10} = 0,668$ (68.8%) komen. De enige mogelijkheid om deze besmetting aan te tonen is intensivering van de bemonstering t.o.v. de huidige systematiek.

Indien de gehele aardbeiplant als bemonsteringseenheid zou kunnen worden gebruikt, wordt het eenvoudiger om een besmetting aan te tonen. Immers, 34 van de 78 planten zijn besmet (44%). De detectiekans binnen het bemonsterde oppervlak met 1 verzamelde plant ligt dus op 44%. Als de besmetting in plot A representatief is voor het hele perceel, is er bij een bemonstering vanaf 4 planten een detectiekans van 90% gegarandeerd.

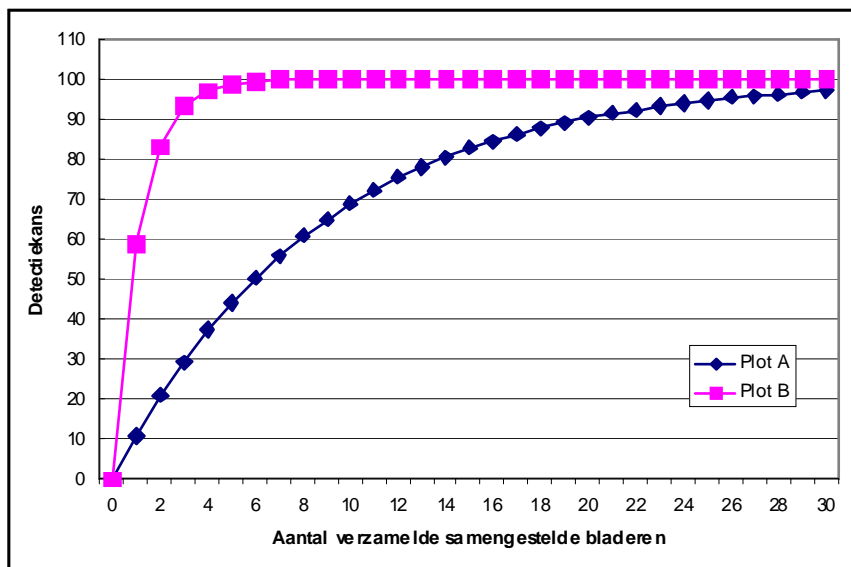


Fig 5. Detectiekansen voor het opsporen van latent aanwezige *X. fragariae* besmetting bij verzameling van 0 tot 30 samengestelde bladeren uit Plot A en B.

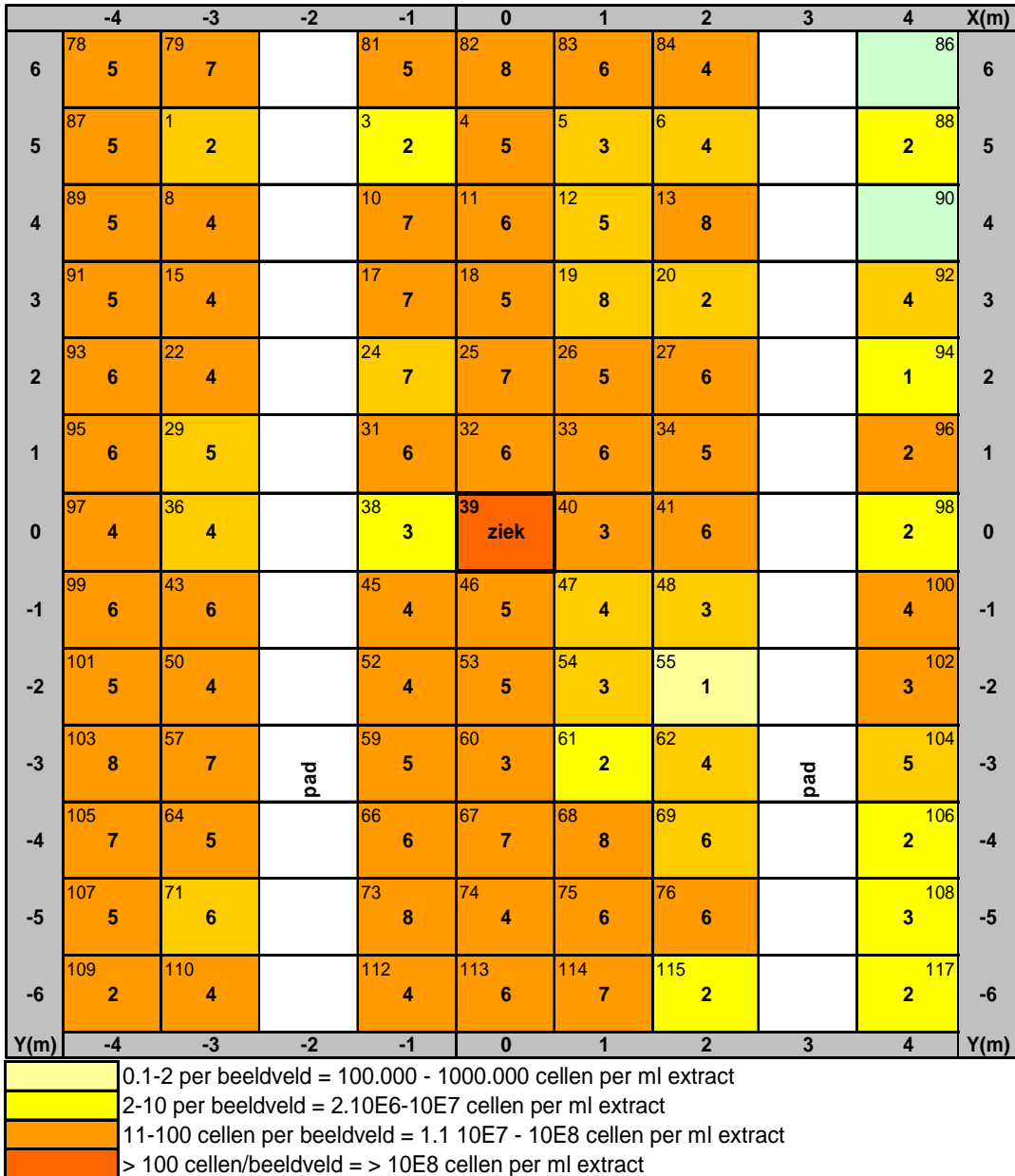
4.2. Resultaten perceel 2

Perceel 2 geeft een totaal ander beeld te zien (Figuur 6). Het bemonsterde plot vertoont geen enkel distributiepatroon. Van de 117 planten die bemonsterd waren, lijken er slechts 2 vrij van een latente infectie. De rest van de planten had 1 of meerdere samengestelde bladeren die latent waren besmet. Er is een lichte afname van incidentie en zwaarte van besmetting te zien aan de westzijde van Perceel 2 vergelijkbaar met Perceel 1. Het veld is dus hevig besmet en de besmetting is duidelijk groter dan het geteste oppervlak. Met grote waarschijnlijkheid kan worden aangenomen dat ook de andere aardbeiplanten binnen de besmette vierkante meters grotendeels zijn aangetast.

Van de 732 geteste samengestelde bladeren bleken er 434 latent besmet te zijn met *Xanthomonas fragariae*. Dit betekent dat de kans om een besmet samengesteld blad te vinden 59% is of $p = 0.41$ voor geen detectie. In figuur 3B is de frequentieverdeling van het aantal besmette bladeren weergegeven (links). Rechts is het percentage besmette deelbladeren weergegeven.

Ook hier kunnen we aannemen dat het gevonden percentage besmette samengestelde bladeren op basis van 732 geteste samengestelde bladeren identiek is aan de kans dat een niet getest samengestelde blad is besmet. Wanneer één samengesteld blad wordt getest is de kans op detectie $1 - 0.41 = 59\%$, worden twee samengestelde bladeren worden verzameld is detectie $1 - 0.41^2 = 83\%$ en bij drie samengestelde bladeren is $1 - 0.41^3 = 93\%$ detectie haalbaar. In Figuur 5 kan de detectiekans worden afgelezen indien 1 tot 30 samengestelde bladeren worden verzameld uit het bemonsterde gebied ($13 * 9 \text{ m} = 117\text{m}^2$ oftewel 59% van het gebied waarvan normaal maar één blad wordt verzameld (200m^2). Met gebruik van deze zeer waarschijnlijke aanname dat het besmette oppervlak veel groter is en een p-waarde heeft van 0.41, hoeven er maar 3 bladeren te worden verzameld van het besmette oppervlak om deze besmetting betrouwbaar ($P_{\text{detectie}} \geq 90\%$) aan te kunnen tonen.

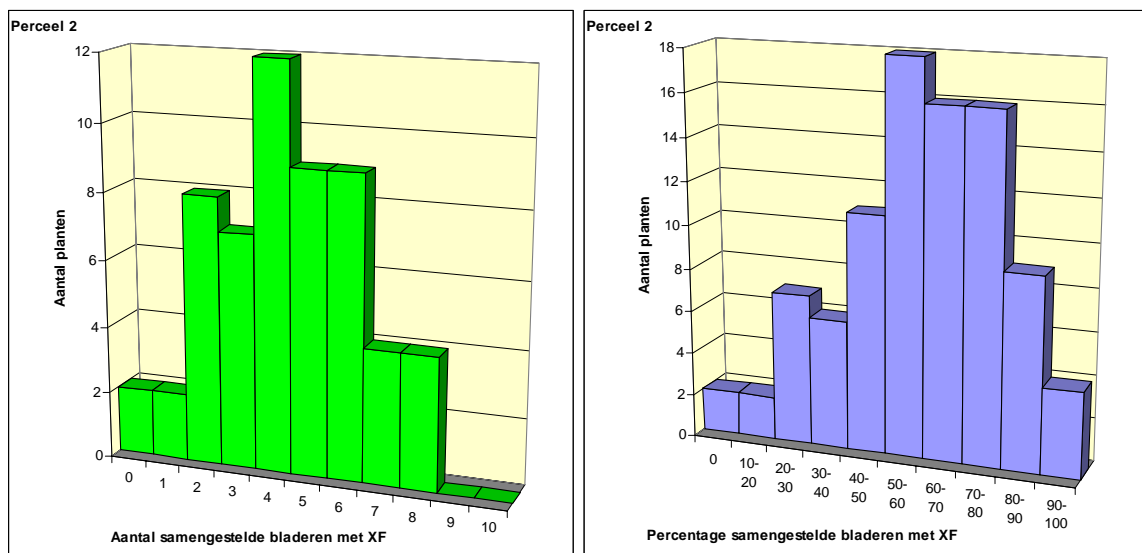
In Tabel 2 zijn de gegevens weergegeven van de geteste symptotische plant van Perceel 2. Evenals in Perceel 1 zijn alle samengestelde bladeren van deze plant, behalve de heel jonge, aantoonbaar besmet. Van de 7 samengestelde bladeren zijn er 4 bladeren (blad a, c, e en f) waarvan alle drie deelbladen symptomen vertonen of latent besmet zijn. Twee van de 7 bladstelen waren besmet, de rhizoom was niet aantoonbaar besmet.



Figuur 6. Situatie schets en infectieniveaus per plant op plot 2 (perceel 2). Elk vakje bestaat uit 1 m². de dikgedrukte getallen in het midden van de vakjes representeren het aantal besmette samengestelde bladeren per plant. De hoogte. De kleur van de vakjes de mate van besmetting met *X. fragariae*.

plantdeel	IF cellen/beeldveld	Cellen/ml extract
rhizoom	rhizoom	0
groen blad zonder symptoom - bladsteel	blad a, steel	0
groen blad zonder symptoom - deelblad	blad a, 1	5
groen blad zonder symptoom - deelblad	blad a, 2	10
groen blad zonder symptoom - deelblad	blad a, 3	10
groen blad, weinig symptomen - bladsteel	blad b, steel	0
groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad b, 1	1
groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad b, 2	0
groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad b, 3	10
groen blad, weinig symptomen - bladsteel	blad c, steel	0
groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad c, 1	20
groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad c, 2	5
groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad c, 3	25
groen blad, weinig symptomen - bladsteel	blad d, steel	0
groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad d, 1	0
groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad d, 2	0
groen blad, weinig symptomen - deelblad	blad d, 3	5
groen blad, duidelijke symptomen - bladsteel	blad e, steel	0
groen blad, duidelijke symptomen - deelblad	blad e, 1	100
groen blad, duidelijke symptomen - deelblad	blad e, 2	100
groen blad, duidelijke symptomen - deelblad	blad e, 3	100
jong vrijwel geheel ontvouwen blad, geen symptomen - bladsteel	blad f, steel	3
jong vrijwel geheel ontvouwen blad, geen symptomen - deelblad	blad f, 1	10
jong vrijwel geheel ontvouwen blad, geen symptomen - deelblad	blad f, 2	10
jong vrijwel geheel ontvouwen blad, geen symptomen - deelblad	blad f, 3	1
jong vrijwel geheel ontvouwen blad, geen symptomen - bladsteel	blad g, steel	5
jong vrijwel geheel ontvouwen blad, geen symptomen - deelblad	blad g, 1	1
jong vrijwel geheel ontvouwen blad, geen symptomen - deelblad	blad g, 2	0
jong vrijwel geheel ontvouwen blad, geen symptomen - deelblad	blad g, 3	0
nog niet ontvouwen blad, geen symptomen	blad h	0

Tabel 2. Resultaten IF analyse van de symptomatische plant die in het centrum van plot 2 stond.



Figuur 7. Aantal samengestelde bladeren per plant besmet met *X. fragariae* (links) en het percentage besmette bladeren met *X. fragariae* (rechts) gevonden op plot 2.

Gaan wij weer uit van de mogelijkheid om als bemonsterende eenheid de aardbeiplant in zijn geheel te benutten, dan is de detectiekans drastisch hoger; 115 van 117 planten waren besmet wat een detectiekans van 98% oplevert. Detectie is nu zo goed als zeker, uitgaande van de aanname dat het werkelijk besmette gebied minimaal 200m² groot is.

Hoe ver zich deze besmetting zich over de rest van het perceel uitstrekt is onduidelijk. Is het geteste oppervlak onderdeel van een grotere haard of is hier al sprake van een volveld besmetting? Gezien het feit dat er 12 symptomatische planten gevonden zijn in dit veld is dit zeker mogelijk. Als de aanname van een volveld besmetting wordt gehanteerd, kan met de huidige 10 bij 20m bemonstering, met verzameling van 10 samengestelde bladeren per 0.2 ha *Xanthomonas fragariae* zonder problemen worden aangetoond. Echter bij het vinden van 12 symptomatische planten is bemonstering om latente infecties op te sporen niet meer nodig.

4.3. Algemene discussie

Van de drie symptomatische planten waarvan alle plantendelen afzonderlijk werden bemonsterd (met uitzondering van de wortels (Tabel 1 en 2), kon in bijna alle plantendelen *X. fragariae* worden gedetecteerd, behalve in de uitlopers. In alle overige plantendelen konden besmettingen soms wel, soms niet worden gedetecteerd. Van de jonge nog niet ontwikkelde deelbladeren was gemiddeld 19% positief (3 van de 16). Van de niet symptomatische oudere deelbladeren was 56% positief (10 van de 18 bladeren). Van de symptomatische deelbladeren was 86% positief (18 van de 21 bladeren). Van de bladstengels was 29% positief (4 van de 14 stengels). Van de rhizomen 1 van de 3 monsters.

Bedacht moet worden dat de bemonsterde percelen symptomatische planten bevatten. Als er op percelen zonder symptomatische planten wordt bemonsterd, is de kans groot dat het infectiepercentage lager is dan in de hier bemonsterde percelen A en B. Dan is een nog groter monster nodig.

Op basis van de gegevens van het zeer grove pilot bemonstering, uitgevoerd in 2006 op een natuurlijk besmet aardbeiveld, kon worden geconcludeerd dat niet alle deelbladeren van een geïnfecteerde plant (latent) besmet zijn. Dit is in het huidige onderzoek op beide proefvelden nog eens aangetoond (Tabel 1 en 2). Hiermee vervalt de mogelijkheid deelbladen te gebruiken voor het detecteren van latente infecties. Van de symptomatische planten waren alle samengestelde bladeren besmet. Echter, van de bemonsterde planten, waar een latente besmetting werd vastgesteld, waren niet alle samengestelde bladeren besmet. Vooral in plot 1 was het aantal besmet aangetoonde samengestelde bladeren laag. Om geïnfecteerde plant op te sporen zullen dus bij voorkeur alle bladeren van die plant moeten worden bemonsterd. Als dit op praktische bezwaren stuit, dient er meer kennis te komen over de frequentieverdeling van besmette planten en de bijbehorende besmette samengestelde bladeren.

De bemonsterde plots hebben zeer verschillende resultaten opgeleverd. Het eerste plot leverde een heterogeen plaatje op van een ogenschijnlijk geaggregeerde besmetting maar met een onduidelijke structuur, terwijl op het tweede veldje de latente besmetting vrijwel het gehele bemonsterde veld besloeg. Op Perceel 1 zouden, bij aanname dat het besmette oppervlak twee keer zo groot is als het bemonsterde oppervlak, 200 samengestelde bladeren per 20 are moeten worden verzameld, 20 keer zoveel als nu, terwijl voor perceel 2 slechts 40 samengestelde bladeren hoeven te worden verzameld om een detectiekans van 90% te verkrijgen. Als de hele plant zou kunnen worden bemonsterd, zijn de aantallen 40 en 10 respectievelijk. Er kan dus een beduidende winst in detectiekans worden behaald door het gebruik van de hele plant.

Bij de symptoomvrije ("gezonde") planten werden de samengestelde bladeren in een vaste volgorde van de planten verzameld (van oud naar jong). Ook daar werden er gemiddeld meer positieve extracten gevonden in oudere bladeren dan in jongere bladeren. Op basis hiervan kan geconcludeerd worden dat laat in het groeiseizoen er oudere bladeren van symptoomloze planten bemonsterd dienen te worden. De Plantenziektenkundige Dienst heeft als ervaring dat eerder in het seizoen de jongere bladeren vaker besmet zijn. In dat geval zouden juist de jongere bladeren moeten worden bemonsterd.

In dit project zijn bladeren bemonsterd na uitwendige ontsmetting door middel van wassen in een chlooroplossing. Hierdoor worden vooral inwendige infecties aangetoond die direct kunnen leiden tot symptoomontwikkeling. Verwacht wordt dat er ook planten zullen zijn met een contaminatie van alleen de buitenkant. Niet ontsmetten zal dus leiden tot een grotere kans op het vinden van positieve monsters. Echter, de betekenis van uitwendige besmetting van bladeren (epifytische populaties) op het ontstaan van de ziekte is onbekend. Verder, kon met de gehanteerde detectiemethode (immunofluorescentie cel-kleuring) geen onderscheid gemaakt worden tussen levende en dode cellen. Bacteriën aan de buitenkant van de planten sterven relatief snel en spelen dan geen rol meer in de epidemiologie van de bacterie.

4.4. Voorstellen vervolgonderzoek

In de literatuur is nauwelijks informatie te vinden over de ruimtelijke verdeling van *X. fragariae* besmettingen in een aardbei vermeerderingsgewas. De bemonsteringen, uitgevoerd in 2005 en 2007, zijn in feite de eerste pogingen om een indruk van de ruimtelijke verspreiding van *X. fragariae* te krijgen. De verkregen informatie is uniek, maar roept nieuwe vragen op. Verschillende van deze vragen zullen moeten worden beantwoord voor het ontwikkelen van een betrouwbaardere bemonsteringsmethode. Bij de aanvang van dit onderzoek waren de volgende vragen gesteld:

1. Wat is de te bemonsterende eenheid? Het deelblad of het samengestelde blad van de aardbei of de aardbeiplant zelf.
2. Over welk oppervlakte strekt zich de middenschalige verdeling uit die ontstaat door verspreiding van het organisme vanuit de primaire infectie?
3. Is deze middenschalige verdeling vergelijkbaar met wat bij bodemgebonden organismen een besmettingshaard of hotspot wordt genoemd (Schoemaker & Been, 1999)
4. Kan deze wiskundig worden beschreven zodat hiervoor een generieke bemonsteringsmethode kan worden ontwikkeld?
5. Hoe snel in de tijd breidt deze middenschalige verdeling zich uit? Worden secundaire besmettingen geïnitieerd en wanneer is er sprake van een volveld besmetting?
6. Is de huidige bemonsteringswijze voor percelen waarin geen of slechts een enkele symptomatische plant zichtbaar is voldoende?

Voor de beantwoording van veel van deze vragen is verder epidemiologisch onderzoek nodig. De enige vragen die (gedeeltelijk) beantwoord kunnen worden zijn vraag 1 en 6. Van een latent besmette plant zijn niet alle samengestelde bladeren latent besmet en van een latent besmet samengesteld blad niet alle deelbladeren. Daarom is de aardbeiplant de ideale te bemonsteren eenheid. Echter, extractie van de gehele plant zal naar verwachting op praktische problemen stuiten. Als toch samengestelde bladeren bemonsterd worden, zal er meer onderzoek moeten worden verricht naar de incidentie van latent besmettingen. Verder is duidelijk dat de huidige bemonsteringsmethode niet voldoet. Hiermee is de kans groot dat latente besmettingen op perceel A gemist worden. De oppervlakten die zijn bemonsterd voor het bepalen van de middenschalige verdeling bleken te klein om de verdeling volledig in kaart te brengen en

Op basis van de resultaten van twee bemonsterde percelen, waarbij slechts een beperkt oppervlak grofmazig in kaart is gebracht, kan nog geen generiek model ontwikkeld worden. Hiervoor zijn meer datasets van de ruimtelijke verdeling nodig. Een gefaseerde aanpak van onderzoek over een langere termijn is van belang voor het ontwikkelen van een betrouwbare bemonsteringsmethode voor *X. fragariae*. De volgende stappen dienen genomen te worden:

- Er is informatie nodig met een groter oplossend vermogen. Wat is de ziekte-incidentie binnen afzonderlijke subplots (vierkante meters). Dit moet op voldoende percelen en in verschillende seizoenen worden onderzocht om te kunnen generaliseren.
- Besmettingen moeten op grotere schaal in kaart worden gebracht dan in het onderhavige project. Echter, eerst dient de verspreiding binnen subplot voldoende bekend te zijn, om te beoordelen met welke inzet aan onderzoekscapaciteit een vierkante meter in het grotere oppervlak nog betrouwbaar kan worden getest. Ook hier dienen verschillende percelen in verschillende seizoenen te worden onderzocht om informatie generiek te maken.
- De tijd moet meegenomen worden die tussen introductie en bemonstering is verlopen. Perceel 1 kan wel eens een jonge besmetting met meerdere introducties zijn die zich aan het uitbreiden is terwijl Perceel 2 een oudere goed uitgegroeide besmetting is. Dergelijk onderzoek is alleen uit te voeren in een quarantaine veld van de Plantenziektenkundige Dienst door zelf een puntinfectie aan te brengen. Immers, als er bij een teler een besmetting wordt geconstateerd, gaat men zo snel mogelijk over tot ruiming van het gewas.

- Er zijn niet genoeg data verzameld betreffende de besmetting van de deelbladeren; het is nog onduidelijk of het deelblad of het samengestelde blad de te bemonsterende eenheid moet worden. Wat volume betreft, kan een samengesteld blad worden vervangen door drie deelbladeren. Daarom moet nu aangeraden worden om samengestelde bladeren te verzamelen voor vaststelling van latente aanwezigheid. Onderzoek in de toekomst moet uitwijzen of het gebruik van een deelblad het gebruik van een samengesteld blad kan vervangen waardoor er meer monster (deelbladeren) kunnen worden verzameld, en een intensiever bemonsteringsraster mogelijk wordt. Dit heeft uiteraard geen zin als bemonstering van de hele plant praktisch mogelijk is.

5. Literatuur

- Been, T.H., Speksnijder, A.G.C.L. & Van der Wolf, J.M. 2006. Blauwdruk bemonstering. Een generieke strategie voor de ontwikkeling van een bemonsteringssysteem voor organismen met passieve verspreiding. Plant Research International, Wageningen. Intern rapport. 9 pagina's.
- Kocks, C.G. (1998) Black rot in cabbage in the Netherlands: Studies on spatial and temporal development. Phd-dissertation, Landbouwwuniversiteit Wageningen. ISBN 90-54858575; 198 p
- Schomaker C.H. & Been T.H. (1999). A model for infestation foci of potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Phytopathology* 89: 583-590.
- Speksnijder, A., Been, T. & Van der Wolf, J. 2006. Onderzoek naar de ruimtelijke verspreiding van drie belangrijke bacteriepathogenen in het Nederlandse open veld. Distributie van *Xanthomonas fragariae* in aardbei, *Erwinia amylovora* in steenvruchten en *Erwinia chrysanthemi* in aardappel. Plant Research International, Wageningen. Intern rapport. 14 pagina's
- Van der Wolf, J., Been, T. & Speksnijder, A. 2005. Voorstudie aan 4 plantpathogene bacteriën in voortkweekingsmateriaal. Literatuuronderzoek ten behoeve van de ontwikkeling van een universele bemonsteringssysteem voor de detectie van latente infecties. Plant Research International, Wageningen. Intern rapport. 21 pagina's