



# Ontwikkeling bemonsteringssystematiek voor het toetsen op latente infecties in voortkwekingsmateriaal

Eindrapportage OND/2004/16/03

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

© 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](mailto:info.pri@wur.nl); [Jan.vanderWolf@wur.nl](mailto:Jan.vanderWolf@wur.nl)  
Internet : [www.pri.wur.nl](http://www.pri.wur.nl)

# Inleiding

De Plantenziektenwet belast de PD met het onderzoek naar de aanwezigheid van schadelijke organismen (inspectie en diagnose). De PD besteedt een deel van de werkzaamheden uit aan de Keuringsdiensten, die onder toezicht van de PD inspecties uitvoeren en diagnoses stellen of toetsingen doen op bepaalde quarantaineorganismen. Van PD en Keuringsdiensten wordt verwacht dat de meest recente technieken worden gebruikt voor diagnose en detectie van quarantaineorganismen (juridisch betrouwbaar, gevoelig en snel). Op basis van nieuwe moleculaire methoden kan sinds kort worden getoetst op latente infectie met schimmels en bacteriën in symptoomloos voortkweekingsmateriaal; hiervoor moet per gewas en ziekte de gevoeligheid van de nieuwe toetsmethoden worden geanalyseerd en moet een statistisch onderbouwd bemonsteringsschema worden opgesteld. Een statistisch betrouwbare bemonsteringssystematiek voor het toetsen van symptoomloos voortkweekingsmateriaal op latente infecties ontbreekt maar is wel noodzakelijk om onderbouwde vrijwaringsgaranties te geven bij handel (plantenpaspoort) en export (fyto-sanitair certificaat); een noodzaak om Europese regelgeving en het IPPC-verdrag na te kunnen leven. Dit projectvoorstel betreft de ontwikkeling van een dergelijke systematiek.

# 1a. De producten

Volgens de offerte van 4 mei 2005 zouden de volgende producten opgeleverd worden:

1. *Verslag van de voorstudie met daarin keuze van organisme/uitgangsmateriaal combinatie(s) waarvoor bemonsteringsschema uitgewerkt zal worden. Uit de volgende combinaties zal gekozen worden: Xanthomonas fragariae in aardbeien, Erwinia amylovora in steenvruchten, Erwinia chrysanthemi in aardappel en/of siergewassen, Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus in aardappel.*  
Deze voorstudies zijn opgeleverd in februari 2006 (bijlage 1). Na overleg met de stakeholders en op basis van deze voorstudie is besloten om eerst een blauwdruk te maken voor generieke bemonstering van zich passief verspreidende pathogenen.
2. *Een rapportage van onderzoek naar distributiepatronen van bacterieziektes in het veld.*  
Een nota "Blauwdruk bemonstering" is in juli 2006 toegezonden aan de stakeholders (bijlage 2). Daarnaast is een inventarisatie gemaakt van de ruimtelijke verspreiding van *Xanthomonas 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* (bijlage 3)
3. *Een rapportage van onderzoek naar bemonsteringsschema voor gekozen organisme/uitgangsmateriaal combinatie(s)*  
Na overleg met en instemming van de begeleidingscommissie is besloten nader onderzoek te doen aan *Xanthomonas fragariae* in de aardbei. Doordat pas in november 2007 percelen met natuurlijk geïnfecteerde aardbeivermeerderingsmateriaal voor bemonstering beschikbaar kwamen, is nu pas deze rapportage gereed gekomen (bijlage 4).
4. *Protocol voor bemonstering en detectie van betreffende organismen/uitgangsmateriaal combinatie(s).*  
Een aanzet voor een verbeterd protocol voor bemonstering van vermeerderingsmateriaal van aardbei op *X. fragariae* is beschreven in bijlage 4. Algemene bemonsteringsprincipes voor latent geïnfecteerd vermeerderingsmateriaal is in bijlage 2 te vinden.
5. *Een rapportage met resultaten van toetsing van betreffende protocollen in praktijk in samenwerking met Keuringsdienst en PD.*  
Dit product kon niet opgeleverd worden, omdat het concept bemonsteringsschema pas in 2008 kon worden opgeleverd. Verder geldt dat de gevonden distributiepatronen maar beperkt informatie geven voor het ontwikkelen van een betrouwbare bemonsteringsstrategie.
6. *Een onderbouwd voorstel voor ontwikkeling van bemonsteringschema's voor de overige combinaties van gewassen en organismen.*  
Dit voorstel is te vinden in de blauwdruk bemonstering over onderzoek naar distributiepatronen (bijlage 2). Verder zijn er aanwijzingen voor de ontwikkeling van bemonsteringsschema's voor overige pathosystemen te vinden in bijlage 1. en 3.
7. *Halfjaarlijkse rapportages volgens een beschikbaar format.*  
Deze zijn volgens afspraak elk half jaar aangeboden aan Dienst Regelingen.

## **1b De contacten (voor gedetailleerde inhoud van de contacten, zie de halfjaarrapportages)**

- 29 maart 2005. Startbijeenkomst met de begeleidingscommissie bestaande uit vertegenwoordigers van PD, NAK, Naktuinbouw en PRI waarin de hoofdlijn van het project uiteengezet werd.
- 8 juni 2005. Bijeenkomst met begeleidingscommissie waarin plannen voor een literatuurstudie (product 1) over geselecteerde bacteriepathogenen in relatie tot bemonstering werden gepresenteerd en besproken.
- 27 september 2005. Presentatie voor de begeleidingscommissie van het aangepaste voorstel voor een literatuurstudie (product 1) door PRI.
- 24 januari 2006. Bijeenkomst met begeleidingscommissie waarin de plannen voor het maken van een blauwdruk besproken zijn (product 2).
- 10 oktober 2006. Bijeenkomst met de begeleidingscommissie waarin de ontwikkelingen binnen product 2 en 4 zijn gepresenteerd en er is gesproken over de implementatie (product 5). Daarnaast is besproken om het project budget-neutraal te verlengen in 2007. In 2006 waren er geen besmette percelen beschikbaar voor bemonsteringsonderzoek.
- 2 november 2007. Schriftelijk en telefonisch contact met Dienst Regelingen en de Plantenziektenkundige Dienst over het opnieuw budget-neutraal verlengen van het project bij het ontbreken van geschikte percelen voor bemonsteringsonderzoek.
- 25 september 2008. Deze datum is vastgesteld voor het bespreken van de resultaten van het bemonsteringsonderzoek en het bemonsteringsschema met de begeleidingscommissie.

## 2. Bereikte effecten

### De nulsituatie

Een statistisch betrouwbare bemonsteringssystematiek voor het toetsen van symptoomloos voortkweekingsmateriaal op latente infecties ontbreekt, maar is wel noodzakelijk om onderbouwde vrijwaringgaranties te geven bij handel (plantenpaspoort) en export (fytosanitair certificaat); een noodzaak om Europese regelgeving en het IPPC-verdrag na te kunnen leven.

### De doelstelling

Doelstelling van dit project was dan ook het voorzien in het benodigde instrumentarium voor uitvoering van (inter)nationale wet- en regelgeving door ontwikkeling van een statistisch betrouwbare bemonsteringssystematiek voor het toetsen op latente infecties in voortkweekingsmateriaal. Het project richtte zich daarbij op quarantaine-organismen, in het bijzonder op *Xanthomonas fragariae* in aardbeien. Er werd gestreefd naar de ontwikkeling van een universele bemonsteringsstrategie voor de detectie van deze bacterieziekten. Voor de ontwikkeling van een strategie werd onderzoek gedaan naar de ruimtelijke verdeling van een pathogeen binnen een perceel en binnen een plant. Op basis van de resultaten werd een proefmodel gegenereerd dat in september a.s. zal worden besproken met de stakeholders. De informatie werd gehaald uit de grijze literatuur, gesprekken met keurmeesters en eigen veldwaarnemingen.

### De realisatie

- a. In het vooronderzoek is d.m.v. een literatuurstudie uitgezocht wat de officiële richtlijnen zijn voor detectie van *Xanthomonas fragariae* in aardbeien, *Erwinia amylovora* in steenvruchten, *Erwinia chrysanthemi* in aardappel en/of siergewassen, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in aardappel (bijlage 1). Daarnaast is er een inventarisatie geweest van procedures die gehanteerd worden. Er zijn kennisleemtes beschreven en onderzoeksvragen geformuleerd die belangrijk zijn voor de ontwikkeling van een adequate bemonsteringssystematiek. Verder zijn de verschillende stappen in de keten van handelingen vanaf de monsternamen tot het verkrijgen van de uitslag geanalyseerd met het doel om per handeling de toegevoegde fout te bepalen. Hiermee kunnen de cruciale plekken binnen de bemonsteringssystematiek worden benoemd en de foutenbronnen gericht worden geminimaliseerd. Op basis van dit voorwerk is besloten voor *Xanthomonas fragariae* in aardbei de bemonsteringssysteematiek verder uit te werken en te valideren.
- b. Na overleg met de begeleidingscommissie en goedkeuring van Dienst Regelingen is besloten een generieke strategie te beschrijven voor de ontwikkeling van een bemonsteringssysteematiek voor pathogene bacteriën met een passieve verspreiding, de zgn. "Blauwdruk Bemonstering" (bijlage 2). In deze Blauwdruk zijn de potentiële horizontale verdelingen ((zeer) kleinschalig, middenschalig en grootschalig) en de verticale verdeling van deze pathogenen beschreven. Ook is uitgelegd welke stappen genomen moeten worden om tot kennis over de werkelijke verdeling te komen. Deze kennis vormt de basis voor een effectieve bemonsteringssysteematiek. Aan de hand van een casus en gebruikmakend van een aantal aannames zijn theoretische verdelingen van aardbeipathogenen in kaart gebracht. Deze blauwdruk is generiek en kan gebruikt worden bij de ontwikkeling van bemonsteringschema's van alle genoemde combinaties van gewassen en organismen
- c. Met de voorstudie en blauwdruk als basis, is voor *Xanthomonas fragariae* in aardbei, *Erwinia amylovora* in steenvruchten en *Erwinia chrysanthemi* in aardappel een inventarisatie gemaakt van kennis over de ruimtelijke verspreiding van deze pathogenen aan de hand van gesprekken met deskundigen bij de PD en met keurmeesters van Naktuinbouw en NAK (bijlage 3). Voor *Xanthomonas fragariae* is ook een eerste bemonstering van een besmet vermeerderingsperceel uitgevoerd. Aangetoond werd dat niet ieder blad van een besmette plant besmet is. *X. fragariae* werd ook in het rhizoom aangetoond. De middenschalige verdeling leek te wijzen op pleksgewijze verdeling.
- d. In november 2007 werden twee percelen met aardbeivoortkweekingsmateriaal, natuurlijk geïnfecteerd met *X. fragariae*, systematisch bemonsterd. Op een oppervlakte van ca. 100 m<sup>2</sup> werden van ca. 120 planten rond een symptomatische plant, de (negen) samengestelde bladeren geanalyseerd op aanwezigheid van *X. fragariae*. Van de symptomatische plant werden de deelbladen geanalyseerd en tevens rhizoom en

stolonen. Op plot 1 werd een geaggregeerde verdeling gevonden van latent besmette en niet besmette planten. Vaak waren maar hooguit twee bladeren per plant besmet. Perceel B vertoonde geen enkel distributiepatroon; slechts twee planten waren vrij van *X. fragariae*. In plot 2 waren oudere bladeren vaker besmet dan jongere bladeren.

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 m<sup>2</sup> worden bemonsterd, is de kans gering *X. fragariae* aan te tonen in met name perceel 1. Als de verdeling in dit 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 m<sup>2</sup> bemonsterd worden. Voor perceel 2 zijn dat 3 bladeren van drie verschillende planten. 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. Dan is een nog groter monster nodig.

Vanuit het oogpunt van bemonstering zouden meerdere (oudere) bladeren per plant bemonsterd moeten worden. De meest gewenste te bemonsteren éénheid is derhalve de plant.

Een uitgebreide beschrijving van de resultaten en aanbevelingen voor bemonstering van latente planten en vervolgonderzoek zijn te vinden in bijlage 4.

Uitvoering volgens de aanbevelingen zal niet in strijd zijn met huidige EPPO regels. Het zal leiden tot het nemen van een groter monster, wat binnen de regelgeving mogelijk is. Hierdoor kan *X. fragariae* wel met een grotere betrouwbaarheid aangetoond worden dan bij gebruik van de huidige bemonsteringssystematiek.

- e. De PD heeft samen met Groen AgroControl een nieuwe detectiemethode voor *X. fragariae* ontwikkeld op basis van PCR-amplificatie. De gevoeligheid van deze methode is geëvalueerd door vergelijking met de bestaande detectiemethode. Door de resultaten van de bepaling van de gevoeligheid van de detectiemethoden te combineren met die van de voorgestelde bemonsteringssystematiek kunnen meerdere protocollen met verschillende detectiekansen worden gedefinieerd. De PD en de keuringsdiensten kunnen hierop een kosten/baten analyse en een risico analyse uitvoeren. Uiteindelijk moet dit resulteren tot implementatie van een praktisch uitvoerbare en betrouwbare bemonsteringssystematiek.

### 3. Beleidssignalering

De doelstelling van dit onderzoek was de ontwikkeling van een statistisch betrouwbare bemonsteringssystematiek voor het toetsen van symptomloos voortkweekingsmateriaal op latente infecties. Dit project heeft een blauwdruk "Bemonstering" opgeleverd (bijlage 2), dat richtlijnen bevat voor het opzetten van een bemonsteringssysteem dat generiek toepasbaar is voor organismen die geen actieve bovengrondse verspreiding vertonen. De blauwdruk kan gebruikt worden door PD en keuringsdiensten, zowel bij bestaande als nieuwe pathogene organismen die een fytosanitair risico vormen.

Voor *Xanthomonas fragariae* in voortkweekingsmateriaal is vastgesteld dat de twee besmette percelen die nu onderzocht zijn, latente infecties niet met de gewenste betrouwbaarheid aangetoond zullen worden wanneer van de huidige bemonsteringssystematiek gebruik wordt gemaakt. Het verslag (bijlage 4) bevat aanbevelingen hoe de bemonstering kan worden verbeterd en suggesties voor vervolgonderzoek om de bemonsteringssystematiek uit te ontwikkelen.



## 4. Projectverloop

Het project is voor een belangrijk deel volgens planning verlopen (zie resultaten). Er moest wel tweemaal verlenging van het project worden aangevraagd, omdat in 2006 en de eerste helft van 2007 geen besmette percelen beschikbaar waren voor bemonstering. Dit betekent niet dat er geen besmettingen in die jaren zijn gevonden, maar het gewas werd vaak direct geruimd omdat de teler geen risico op verdere besmetting wilde lopen.

De resultaten van de bemonstering heeft weliswaar geleid tot kennis die direct kan worden toegepast bij bemonstering van aardbei vermeerderingsmateriaal, maar is niet onderscheidend genoeg om een uitgewerkt bemonsteringsprotocol op te baseren.

## 5. Financiën

Heb project is met het vastgestelde budget uitgevoerd. Een accountantsverklaring is aan het verslag toegevoegd (bijlage 5)