

Monitoring van *Xanthomonas fragariae* in de aardbeiteelt en de ontwikkeling van een hygiëneprotocol

Augustus 2008

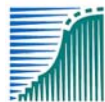
Dr. Ir. Adriaan Vermunt, Groen Agro Control
Drs. Alexander van Beuningen, Plantenziektenkundige Dienst



landbouw, natuur en
voedselkwaliteit



Groen Agro Control
LABORATORIUMONDERZOEK & ADVIES



INHOUDSOPGAVE

INHOUDSOPGAVE.....	3
SAMENVATTING	4
1 INLEIDING	5
1.1 Identificatiemethode.....	6
1.2 Quarantainestatus	6
1.3 Verspreiding	6
1.4 Hygiëne	7
1.5 Doelen van het project.....	7
2 MATERIAAL EN METHODEN.....	8
2.1 Diagnose bij de Plantenziektenkundige Dienst.....	8
2.2 PCR-toets	9
2.4 Monstername	10
2.5 Risicoanalyse verspreiding en overleving.....	11
2.6 Hygiëneprotocol.....	15
3 RESULTATEN.....	16
3.1 Optimalisatie DNA-extractie en PCR-toets	16
3.2 Validatie PCR-toets.....	18
3.3 Monstername	19
3.4 Verspreiding in de praktijk.....	20
3.5 Risicoanalyse verspreiding.....	22
3.6 Hygiëneprotocol.....	30
4 CONCLUSIES	38
5 AANBEVELINGEN	38
6 LITERATUUR.....	39
Bijlage 1 Lijst geteste isolaten	40
Bijlage 2 PCR-resultaten isolaten van <i>X. fragariae</i>	41
Bijlage 3 Dendrogram.....	43
Bijlage 4 Inventarisatie hygiënemaatregelen bedrijven.....	44



SAMENVATTING

In het hier omschreven project is een gevoelige toets ontwikkeld om *Xanthomonas fragariae* in aardbei te detecteren. *Xanthomonas fragariae* is een bacterie die in de aardbeiteelt aantastingen kan veroorzaken op bladeren en in het rhizoom van de plant.

Bacterievlekkenziekte en aantastingen van het rhizoom kunnen voor aanzienlijke economische schade zorgen. De bacterie is zeer besmettelijk en kan via gewashandelingen verspreid worden. Daarnaast is besmet plantgoed een belangrijke route van verspreiding. Voor *Xanthomonas* in vermeerderingsmateriaal geldt een quarantainestatus, in vruchtproductie geldt deze status niet.

De hier ontwikkelde toets voor *Xanthomonas fragariae* is specifiek, gevoelig en snel (drie werkdagen). De ontwikkelde toets is gebaseerd op de DNA-techniek PCR. Uit de validatie van de PCR-toets is gebleken dat deze specifiek is voor *Xanthomonas fragariae* en gevoeliger is dan bestaande toetsen. Visueel niet-zichtbare infecties zijn met deze toets aantoonbaar, waardoor besmet materiaal in een vroeg stadium vernietigd kan worden en hiermee verdere verspreiding op een bedrijf kan worden tegengegaan. De toets is gebruikt om bij twee vermeerderaars en drie vruchtproductietelers besmettingen in kaart te brengen. Hieruit bleek dat de vermeerderaars dankzij alertheid en gevoelige metingen tijdig besmet materiaal konden verwijderen waardoor geen verdere problemen werden ondervonden tijdens de vermeerdering. De deelnemende productietelers hebben dankzij strikte hygiëne en de ondersteunende PCR-analyse van het plantmateriaal de problemen met *Xanthomonas* drastisch kunnen terugdringen in eigen vermeerdering en in productieteelt tot een acceptabel niveau. Uit experimenten bleek dat de bacterie overwintering in ondergewerkte plantresten kan overleven. Echter overdracht van besmetting vanuit deze besmette gewasresten naar een nieuwe teelt is niet aangetoond. Opgedroogd bacteriemateriaal op rubber, metaal en hout kan na twee weken nog levensvatbaar zijn. Effectieve ontsmetting is mogelijk met bekende middelen op basis natrium hypochloriet, perzuren, benzoëzuur, quaternaire ammoniumverbindingen of alcohol. Hierbij is het wel belangrijk dat de te ontsmetten oppervlakken eerst grondig gereinigd worden om organisch materiaal te verwijderen.

Op basis van de onderzoeksresultaten zijn praktijkrichtlijnen opgesteld voor hygiënemaatregelen ter preventie van *Xanthomonas*. Naast ontsmetting van gereedschap, machines, schoeisel en handen is het allerbelangrijkst om te starten met gecontroleerd ziektevrij uitgangsmateriaal. Verder is het aan te bevelen om de vermeerdering en vruchtproductie fysiek duidelijk gescheiden te houden. De vermeerdering kan het beste maximaal twee jaar op hetzelfde perceel plaatsvinden. Het personeel hiervoor dient niet werkzaam te zijn in de vruchtproductievelden en viceversa. Een logische werkvolgorde, eerst in schoon hooggekwalificeerd materiaal en op het laatst in (potentieel) besmet materiaal te werken, is aan te raden. Besmet materiaal kan het beste in een gesloten zak afgevoerd en vernietigd worden. Verder brengt beregenen ter preventie van nachtvorstschade in het vroege voorjaar extra risico met zich mee vanwege verspreidingsrisico van de bacterie door spatwater. De ontwikkelde toets kan gebruikt worden ter ondersteuning van het hygiëneprotocol. Uiteindelijk zal ziektevrij uitgangsmateriaal en goede hygiënemaatregelen de problemen met *Xanthomonas* beheersbaar maken. Het project is uitgevoerd door Groen Agro Control en de Plantenziektenkundige Dienst en gefinancierd door Plantum NL en Productschap Tuinbouw.

1 INLEIDING

De laatste jaren werden met regelmaat aardbeiplanten aangetroffen die besmet zijn met *Xanthomonas fragariae* (Fig. 1)(1, 2). Deze bacterie veroorzaakt typische vlekssymptomen op bladeren (Fig. 2 en 3). De ziekte die deze bacterie veroorzaakt wordt bacterievlekkenziekte of olieplekkenziekte genoemd. Hiernaast wordt de bacterie ook in het rhizoom aangetroffen, waarin de bacterie verkleuring van merg veroorzaakt (Fig. 4). Daar waar planten die zichtbaar geïnfecteerd zijn soms groeiachterstand vertonen, blijven latente infecties (geen visuele symptomen) onopgemerkt bij inspecties. Bacterievlekkenziekte bij aardbei is zeer besmettelijk en kan zich o.a. verspreiden via latent geïnfecteerd vermeerderingsmateriaal.

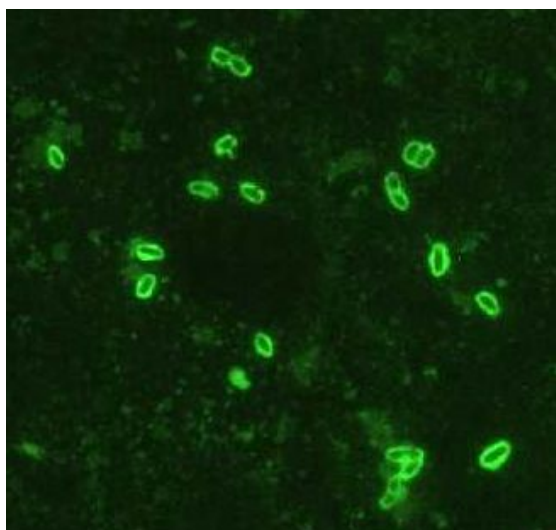


Fig. 1. Microscopisch opname van de bacterie *Xanthomonas fragariae*, na immunofluorescentie-kleuring



Fig. 2. Typisch symptomen van *Xanthomonas* op de onderkant van aardbeibladeren.



Fig. 3. Symptomen van aantasting door *Xanthomonas* op de onderkant van een aardbeiblad goed zichtbaar met tegenlicht.



Fig. 4. Bruinverkleuring van de vaatbundelring in het rhizoom van een aardbeiplant, veroorzaakt door *Xanthomonas*.



1.1 Identificatiemethode

De huidige methode voor detectie van *X. fragariae* in plantextracten is gebaseerd op richtlijnen opgesteld binnen EPPO. Deze omvat de kweek van de bacterie op Wilbrink's medium, en identificatie van verdachte kolonies m.b.v. IF-microscopie en PCR (3). Ook wordt IF-microscopie en PCR direct op plantextracten uitgevoerd als een eerste screeningsmethode. Probleem bij het aantonen van latente infecties is in eerste instantie de monsternamen. Niet zichtbaar is welke plantdelen latent geïnfecteerd zijn en de grootte van een representatieve steekproef is onbekend. Verder is de verwachting dat latent geïnfecteerd materiaal erg lage aantallen *X. fragariae* bacteriën bevatten die met de huidige methoden van IF en PCR niet of moeilijk aan te tonen zijn. Kweken van *X. fragariae* uit extracten, hetgeen het uiteindelijke bewijs levert voor de aanwezigheid van levende bacteriën in IF- of PCR-positieve extracten, wordt bemoeilijkt door de trage groei van *X. fragariae* op het Wilbrink's medium. *X. fragariae* wordt in groei onderdrukt door saprofytische bacteriën die in de extracten aanwezig zijn. Ook moet rekening gehouden worden met de interpretatie van een latente infectie bij de isolatie/detectie van *X. fragariae*. *X. fragariae* kan epifytisch op plantmateriaal aanwezig zijn en onbekend is wat dan het fytosanitaire risico voor infectie is. Vast staat wel dat de aanwezigheid van *X. fragariae* duidt op de nabije aanwezigheid van een geïnfecteerde bron. Bij werkelijke latente infecties moet gedacht worden aan initieel geïnfecteerd bladmateriaal, zgn. micro-lesies die met het blote oog niet of nauwelijks waarneembaar zijn.

1.2 Quarantainestatus

Xanthomonas fragariae heeft een Europese quarantainestatus (Fytorichtlijn 2000/29/EG), hetgeen o.a. betekent dat besmettingen met deze bacterie gemeld dienen te worden bij de Plantenziektenkundige Dienst (PD). Transport van besmet materiaal is niet toegestaan zonder een ontheffing van de PD. Daarnaast dienen alle besmettingsbronnen volgens gestelde richtlijnen vernietigd te worden.

1.3 Verspreiding

Voor zover bekend is alleen *Fragaria* (cultuuraardbei: cultivars en hybriden van *F. chiloensis* of *F. x ananassa* en de wilde aardbei: *F. vesca*, *F. virginiana*) de natuurlijke waardplant van *X. fragariae*. Bladeren van besmette planten en uitlopers bestemd voor uitgangsmateriaal zijn de mogelijke primaire infectiebronnen. De bacterie komt vrij uit bladvlekken en wordt door regen (en spatwater van over de kop beregenen) en wind verspreid naar gezonde planten. Hierdoor kan kruisbesmetting plaatsvinden van aangrenzende percelen met planten voor vermeerdering of vruchtproductie. Als de detectie van *X. fragariae* in het veld verbeterd en versneld kan worden, zou dit bijdragen aan het voorkomen van verdere verspreiding van de bacterie. Aangenomen wordt dat de overleving van *X. fragariae* buiten de waardplant zeer beperkt is. Eliminatie van de bacterie kan dan ook goeddeels bereikt worden door vernietiging van al het besmette plantmateriaal en rhizoommateriaal, inclusief latent geïnfecteerde planten. Uit onderzoek is gebleken dat onder laboratoriumomstandigheden *X. fragariae* enkele jaren kan overleven op gedroogde bladeren. Bij proeven met ondergewerkte besmette bladeren werd aangetoond dat de bacterie minimaal één seizoen in de grond (in/op plantmateriaal) kan overleven en een primaire besmetting kan veroorzaken in het volgende seizoen (1, 2). Dus wanneer planten niet volledig opgeruimd worden dan kunnen achtergebleven blad- en rhizoomresten een primaire bron van infectie voor de latere teelt vormen. Een ruime



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

vruchtwisseling wordt daarom aanbevolen. Plantmateriaal dat besmet is met *X. fragariae* kan vernietigd worden door verbranding of na versnipperen onder te werken in de grond eventueel in combinatie met loofafdoeding vooraf.

Verder vormen teelthandelingen en bewerkingen een belangrijk risico voor verspreiding. Bespuiting, plukken, snijden en bladmaaien zijn handelingen waarbij de velden betreden worden en via contact verspreiding kan optreden. Ontsmetting van machines, schoeisel, verpakking- en traymateriaal kan ertoe bijdragen dat risico's van contactbesmettingen gereduceerd worden. Middelen die in de bedrijfsvoering al worden gebruikt zijn middelen op basis van chloorbleekloog (Natrium hypochloriet), quaternaire ammonium verbindingen zoals didecylmethylammoniumchloride (Menno ter forte), Mennoclean (op basis van benzoëzuur), Menno H, Dimanin-algendoder (alkylmethylbenzylammoniumchloride) en perzuren (Clarmarin 51, Jet-5). Chemische middelen om een bacterie-infectie in planten te bestrijden zijn niet voorhanden.

1.4 Hygiëne

Hygiënemaatregelen bedoeld om verspreiding van *Xanthomonas fragariae* te voorkomen en/of terug te dringen dienen te bestaan uit richtlijnen voor werkwijzen (contactbesmettingen uitsluiten), richtlijnen voor ontsmetting en een goed meetinstrument om besmettingen te traceren (monitoren) en daarmee ook schoon uitgangsmateriaal te garanderen. In het verleden is in de glastuinbouw bewezen dat met hygiëneprotocollen bacterieproblemen teruggedrongen kunnen worden. Een voorbeeld hiervan is Wortelverdikking bij komkommer, tomaat en paprika.

Het ontwikkelen van hygiëneprotocollen voor openteelten is moeilijker dan voor de bedekte teelten (4). In de kas wordt in een gesloten systeem geteeld en zijn alle processen strak geconditioneerd en gecontroleerd. In openteelten zijn er bijna geen fysieke barrières en daarom kan verspreiding van het ene naar het andere perceel makkelijker optreden. Als de infectiedruk bij een teler in een bepaalde regio hoog is, kunnen ook andere telers en plantvermeerderaars in die regio daar last van ondervinden. Daarom moet het *Xanthomonas* probleem ook breed aangepakt worden: zowel geografisch als door de hele keten, van opkweek tot vruchtproductie. Hierbij is het dus zeer belangrijk dat de hele sector van de hygiënische aanpak overtuigd is. Je kunt zelf nog zo schoon werken, maar als de burens niet schoon werken is de kans op besmetting in de openteelten nog steeds groot.

1.5 Doelen van het project

Aangezien *Xanthomonas* een hoge schadepost voor telers en vermeerderaars kan betekenen, was er dringend onderzoek nodig, waarbij direct in de praktijk op *Xanthomonas* getoetst werd en oplossingen voor het probleem aangedragen werden. Dit onderzoek is in opdracht van Plantum NL en LTO Groeiservice uitgevoerd door GAC en de PD. Het project is gefinancierd door Plantum NL en Productschap Tuinbouw.

De twee voornaamste doelen van het project waren:

- Het *Xanthomonas* probleem bij aardbei in kaart brengen door met name latente infecties aan te tonen in praktijkmonsters.
- Richtlijnen voor een hygiëneprotocol opzetten.

Het bereiken van deze doelen valt of staat met de beschikbaarheid van een gevoelige toets voor *Xanthomonas fragariae*.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Diagnose bij de Plantenziektenkundige Dienst

Bij de Plantenziektenkundige Dienst (PD) worden hoofdzakelijk symptomatische planten in behandeling genomen om te bepalen of ze al dan niet besmet zijn met *Xanthomonas fragariae*. Planten zonder visuele aantasting worden bij de PD niet geanalyseerd op de aanwezigheid van *Xanthomonas*. De reden hiervoor is dat de methode om latente infecties aan te tonen nog niet gevoelig en betrouwbaar genoeg is. Daarnaast zijn latent geïnfecteerde planten moeilijk te bemonsteren omdat de aantasting niet waar te nemen is.

Een belangrijke stap in de diagnose bij de PD is dat de bacterie opgekweekt en geïsoleerd dient te worden volgens diagnoserichtlijnen die binnen EPPO zijn opgesteld. Dit kan enkele weken in beslag nemen. Grofweg worden bij deze procedure verdachte plantdelen gewassen om vervolgens in stukjes te worden gesneden. Daarna worden de stukjes in een buffer geweekt die vervolgens wordt uitgeplaat op een vast groeimedium waarop aanwezige bacteriën kunnen gaan groeien (Fig. 5). Het medium is niet erg specifiek voor *X. fragariae* waardoor expertise nodig is voor de herkenning van *X. fragariae* kolonies te midden van andere bacteriën



Fig. 5. Bacteriekolonies van *Xanthomonas fragariae* op Wilbrink medium. De beige kolonies zijn typisch voor *Xanthomonas fragariae*. Een dergelijke kolonie kan miljoenen bacteriën bevatten. De gele en oranje kolonies zijn afkomstig van andere organismen.



Fig. 6. Microscopie.

Na de isolatie van een typische bacteriekolonie wordt de identiteit van de bacterie bevestigd met immunofluorescentie (IF)-microscopie (Fig. 6), vetzuuranalyse of PCR (volgens richtlijnen opgesteld binnen EPPO; Fig. 7). Om de pathogeniciteit van de geïsoleerde bacterie vast te stellen is een besmetting van aardbeibladeren vereist. De laatste stap kan een maand vergen (3).

2.2 PCR-toets

Zowel bij GAC als bij de PD wordt de PCR-toets gebruikt ter ondersteuning van de diagnose in zowel de screening op plantpathogene bacteriën als de identificatie van bacterie-isolaten. PCR (Polymerase Chain Reaction) is een DNA-techniek waarmee een specifiek DNA fragment geamplificeerd en gedetecteerd wordt. Op basis van alleen PCR kan geen diagnose worden gesteld van zieke planten. Hiervoor moet vaak breder gekeken worden. De procedure voor een PCR neemt ongeveer drie werkdagen in beslag en staat schematisch afgebeeld in Fig. 7.

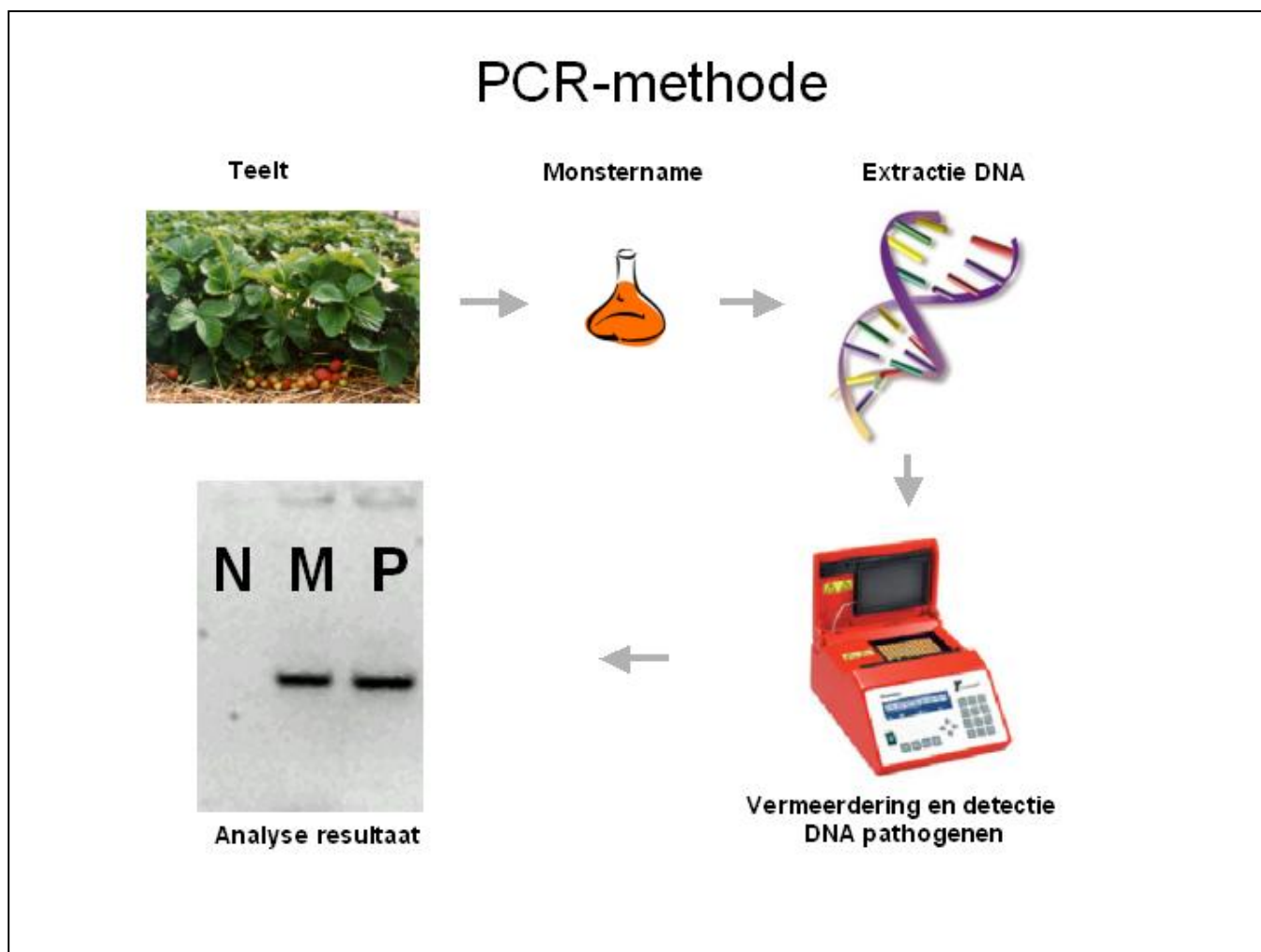


Fig. 7. Schematische weergave van de PCR-methode. Van plantmateriaal wordt eerst een monster genomen. Uit dit monster wordt DNA geëxtraheerd. Het geëxtraheerde DNA wordt in vitro vermenigvuldigd door het enzym Taq-polymerase dat van DNA-bouwstenen, en twee korte startfragmenten (primers) voor het enzym kopiën maakt van het DNA van de aanwezige plantpathogene bacterie. Doordat de primers specifiek het DNA van de plantpathogeen herkennen wordt alleen een specifiek deel van het DNA van de plantpathogeen vermenigvuldigd. De specifieke amplificatie gebeurt in een temperatuurafhankelijk proces dat door een PCR-apparaat (thermo-cycler) wordt aangestuurd. Het product van de amplificatie wordt zichtbaar gemaakt in gelelectroforese. Met gelelectroforese wordt het product van het monster (M in plaatje “Analyse resultaat”) op grootte en lading gescheiden en vergeleken met een positieve controle, dit is het product van het doelpathogeen (P in plaatje “analyse resultaat”). Tevens wordt altijd een negatieve controle (N) meegenomen om vast te stellen of in de opwerking van het monster geen kruisbesmetting is opgetreden.



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Om te controleren of de bestaande PCR-toets voor *X. fragariae* specifiek en gevoelig is, werd deze in samenwerking met de PD gevalideerd. De specificiteit is bepaald met behulp van referentiestammen van Groen Agro Control en de PD. De gevoeligheid en daarmee de gevoeligheidsgrens van de PCR is bepaald door verdunningsreeksen van de bacterie te analyseren. De robuustheid is bepaald aan de hand van herhalingen van de analyses door zowel GAC als door de PD. Het in het project opgezette PCR protocol is vergeleken met de PCR uit de gevalideerde diagnostische procedures (EU Standards, Measurements and Testing project “Diagnostic protocols for organisms harmful to plant; Diagnosis of *Xanthomonas fragariae*”) zoals die door de PD toegepast wordt. De bestaande diagnoseprocedure bij de PD houdt in: PCR en IF op plantextract en gelijktijdige isolatie van de *X. fragariae* bacterie, opkweken, identificeren van het zuivere isolaat met IF/PCR, verzuuranalyse en een pathogeniteitstoets.

Met de snelle en gevoelige PCR toets zouden frequenter latente infecties aangetoond kunnen worden. Dit zou een enorme stap voorwaarts betekenen, omdat dan sneller maatregelen genomen kunnen worden tegen verspreiding van de bacterie, nog voordat visueel besmette planten zijn waar te nemen zijn. Het is belangrijk om te bepalen of de test gevoelig en specifiek genoeg is om te kunnen garanderen dat de kans op een besmetting die gemist of onterecht geconstateerd wordt zo gering mogelijk is. Resultaten van dit gedeelte staan in paragraaf 3.1 en 3.2.

2.4 Monstername

Naast een robuuste, specifieke en gevoelige PCR-methode is een bemonsteringsstrategie van groot belang. Deze bepaalt of de infectie in het genomen monster aanwezig is. Bij planten met symptomen, is het duidelijk waar bemonsterd moet worden. Hier worden stukjes plantmateriaal verzameld die visuele aantasting laten zien. Als een latente infectie in een partij aardbeiplanten aangetoond moet worden, zal een representatieve steekproef genomen moeten worden om met een redelijke betrouwbaarheid uitsluitsel te kunnen geven of de partij besmet is. Als voorlopige richtlijn is hierbij aangehouden dat van elke partij of perceel die getoetst wordt, van 20 planten één deelblaadje per plant bemonsterd wordt. De verzameling van 20 deelblaadjes van een bewuste partij of perceel wordt beschouwd als één mengmonster. Op het laboratorium worden van alle 20 bladeren van een mengmonster een stukje blad uitgesneden. Deze 20 stukjes worden gemengd om vervolgens het DNA uit te extraheren. Om een analyse uit te voeren op de wortels of het rhizoom kan uit praktische overweging een mengmonster gemaakt worden van maximaal vijf planten. Bij zeer kritische monsters, bijvoorbeeld hoog elitemateriaal, is het aan te raden elke plant apart te bemonsteren. De bemonsterstrategie is getest met proefmonsters. Hiervoor zijn licht besmette bladeren (met lichte symptomen) gemengd met verschillende hoeveelheden onbesmette bladeren. In een andere benadering zijn gezonde bladeren kunstmatig besmet met bekende hoeveelheden bacteriën. Deze proeven zijn belangrijk om de monstername te optimaliseren maar ook om de gevoeligheid van de PCR-toets met besmet plantmateriaal vast te stellen. Resultaten van dit gedeelte staan in paragraaf 3.3.



2.5 Risicoanalyse verspreiding en overleving

Aan de hand van literatuuronderzoek en advies van experts is geïnventariseerd wat het verspreidingspatroon is in het veld en in de kas. In de praktijk is gevolgd hoe de bacterie zich verspreidt door in de tijd op kritische punten van de vermeerdering en teelt op de aanwezigheid van de bacterie te toetsen. Daarnaast is gekeken naar overleving van de bacterie in ondergewerkte plantresten en op verschillende materialen. Tevens zijn verschillende middelen en hittebehandelingen getest om de bacterie af te doden.

Besmettingen op praktijkbedrijven in kaart brengen

Bij twee aardbeiplantvermeerderaars en drie aardbeitelers, zijn monsters genomen en getoetst op de aanwezigheid van *Xanthomonas*. Zowel grond, water als gewas is bemonsterd. Uiteraard is het meeste gangbare ras Elsanta bekeken maar daarnaast zijn ook andere rassen onderzocht waaronder Evie, Honeoye, Darselect, Sonata en Lambada. Met de deelnemende bedrijven is regelmatig overleg geweest over de analysesresultaten.

Deelnemende bedrijven:

Vermeerderaars

- Bedrijf 1 vermeerdert planten van verschillende rassen, maar Elsanta is het hoofdras. Het bedrijf is geïsoleerd gelegen. In de wijde omtrek zijn geen andere aardbeibedrijven te vinden, hetgeen een voordeel kan betekenen om besmettingen buiten de deur te houden. Het uitgangsmateriaal voor de vermeerdering bestaat uit ongeveer 500 SEE-planten van NAK-tuinbouw per jaar. Vermeerdering vindt plaats twee jaar in luisdichte tunnels en daarna twee jaar buiten de tunnels.
- Bedrijf 2 vermeerdert planten voornamelijk van het ras Elsanta en van enkele andere rassen. Het bedrijf is gelocaliseerd in een gebied waar relatief veel aardbeibedrijven gelegen zijn. In de periode 2003 en 2004 had het bedrijf een serieus *Xanthomonas*-probleem. Een aantal planten die toen geleverd werden aan productietelers bleken achteraf aangetast te zijn met *Xanthomonas* in het rhizoom. Sindsdien is de hygiëne fors aangescherpt.

Productietelers

- Bedrijf 1 teelt op stellingen en in vollegrond. Dit bedrijf heeft jaren last gehad van *Xanthomonas*, maar in wisselende mate. Vruchtproductievelden en vermeerderingsveld liggen vlak bij elkaar op één locatie. Vermeerderingsveld is wel het meest ver weggelegen van het erf.
- Bedrijf 2 heeft enkele jaren problemen ondervonden van *Xanthomonas* op blad en in rhizoom. In 2005, werd een nieuw perceel voor moederplanten en wachtbedden in gebruik genomen dat een aantal kilometer verwijderd ligt van andere aardbeivelden.
- Bedrijf 3 vermeerdert zelf voor de onbedekte vollegrondsteelt startende met EE-materiaal. Voor de kasteelt worden trayplanten opgekweekt. Naast onbedekte teelt en kasteelt heeft dit bedrijf ook shelters gebouwd om zo bijna het hele jaar aardbeien te kunnen leveren.

Resultaten van dit gedeelte staan in paragraaf 3.4.



Overleving van *Xanthomonas fragariae* buiten de plant op verschillende materialen

Om de overleving van *Xanthomonas fragariae* op verschillende materialen vast te stellen, zijn hout (vuren), metaal (blank en geschilderd roestvrijstaal), rubber (stuk laars), katoenen stof (stuk laboratoriumjas) eerst ontsmet met ethanol. Hierna zijn de materialen in steriele plastic bekertjes gedaan en is 100 µl van een suspensie van *X. fragariae* (isolaat PD 4550; 10^8 cfu/ml) op het materiaal aangebracht. Nadat de suspensie is ingedroogd zijn de bekertjes gesloten en geïncubeerd bij kamertemperatuur onder normaal dag/nacht ritme. Direct en na 7, 17 en 38 dagen zijn van alle materialen drie exemplaren uitgeplaat. Hiervoor is 30 ml 0.01M fosfaatbuffer toegevoegd aan de plastic bekertjes en 1 uur geschud bij 80 rpm in de schudincubator. Hierna is 50 µl uitgeplaat op Wilbrink's medium. Na 5 dagen zijn Wilbrink's platen beoordeeld en zijn verdachte kolonies geïdentificeerd d.m.v. IF-microscopie.

Om de overleving van *X. fragariae* in slootwater vast te stellen is eerst gekeken of de kweek van deze bacterie uit slootwater mogelijk is. Hiervoor is 1 ml van een suspensie van 10^8 cfu/ml (isolaat PD 4550) toegevoegd aan 100 ml slootwater afkomstig van het PD-terrein in Wageningen. Van de oplossing is vervolgens direct daarna 100 µl uitgeplaat op 3 Wilbrinkplaten, d.m.v. doorplaten met 1 spatel. Van dezelfde suspensie is ook 1 ml toegevoegd aan 100 ml steriel kraanwater. Dit is ook uitgeplaat.

Overleving van *Xanthomonas fragariae* in ondergewerkte gewasresten

In een veldproef op het terrein van de PD werd d.m.v. simulatie van de praktijksituatie onderzocht of *X. fragariae* overleeft in of op natuurlijk besmette gewasresten die zijn ondergewerkt. Tevens werd gekeken of de loofdoedingsmiddelen, Finale (glufosinaat-ammonium), en Roundup (glyfosaat) gunstig effect hebben op het weggroten van plantendelen en daarmee ook op de afdoding van de bacterie.

Voor de proef was natuurlijk-besmet en schoon aardbeiplantenmateriaal beschikbaar van het ras Elsanta. Het besmette materiaal bestond uit planten met rhizoom- en bladbesmetting. Er werden 12 ringcontainers (diameter 1,2 m diameter) beplant in november 2006 en op de volgende wijze behandeld:

8 ringcontainers met besmette planten (B):

- twee containers (aangeduid met BR) werden bespoten met Roundup
- twee containers (aangeduid met BF) werden bespoten met Finale
- twee containers werden niet bespoten, er werd groenbemester (wintertarwe) ingezaaid (BW)
- twee overige containers werden niet bespoten (B)

4 ringcontainers met gezonde planten (G):

- één container (aangeduid met GR) werden bespoten met Roundup
- één container (aangeduid met GF) werden bespoten met Finale
- in één container werd niet bespoten, er werd groenbemester (wintertarwe) ingezaaid (GW)
- de overige container werd niet bespoten (G)

Alle behandelingen staan ook in Tabel 1. Voor de bespuiting werd van de besmette ringcontainers de besmettingsgraad bepaald door individuele planten te beoordelen op symptomen van aantasting door *X. fragariae*. Twee weken na bespuiting werden de planten ondergewerkt (10 cm). Een deel werd vermengd met grond in nylonkousen (2 per container) gedaan en op dezelfde diepte ingegraven. Later werd op betreffende containers BG en GG wintertarwe gezaaid. Binnen de containers is vervolgens geen verder onderhoud uitgevoerd.



Fig. 8. Overzicht van de containers beplant met besmette of gezonde aardbeiplanten, november 2006, terrein van de Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen.

Tabel 1: Behandelingen van planten in ringcontainers. G, gezonde planten; B, besmette planten; R, Round-up behandeld; F, Finale behandeld; W, wintertarwe.

Nrs. containers	Code	Gezonde of planten besmet met <i>Xanthomonas</i>	Loofdodingsmiddel	Groenbemester
1	G	Gezond	-	-
2, 11	B	Besmet	-	-
3, 5	BR	Besmet	Roundup	-
4	GF	Gezond	Finale	-
6	GW	Gezond	-	Wintertarwe
7, 8	BF	Besmet	Finale	-
9	GR	Gezond	Roundup	-
10, 12	BW	Besmet	-	Wintertarwe

Na 4,5 en 5,5 maanden werden de containers onderzocht op de aanwezigheid van aardbeiplantresten en op de aanwezigheid van *X. fragariae*. Hiervoor werd een nylonkous uitgegraven en onderzocht op aanwezige gewasresten met mogelijk aanwezige *X. fragariae* bacteriën. Gebruikte methoden hiervoor zijn de PCR-methode van GAC, IF-microscopie en kweek op Wilbrink-medium. Daarna werden in alle 12 containers gezonde aardbeiplanten gezet om mogelijke besmetting vanuit de bodem te onderzoeken. Deze planten werden in 2007 gevolgd en regelmatig beoordeeld op symptomen van *X. fragariae* aantasting. De resultaten staan in paragraaf 3.5.

Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol**Effectiviteit van middelen tegen *Xanthomonas fragariae***

In dit experiment werd onderzocht hoe effectief een aantal middelen *Xanthomonas* kunnen afdoden. De incubatie van de middelen is uitgevoerd op bacteriesuspensies zonder plantmateriaal. Middelen die getest zijn:

- MC: Mennoclean (benzoëzuur, werkzaam beneden een pH van 4.5): stock 3%, werkconcentratie 1%
- MH: Menno H (organische zuren en alcohol, handontsmetting), onverdund
- MF: Menno ter Forte (0,2 en 0,4%) (advies 0,5-1,0%)
- C51: Clarmarin 51 (Degussa) : 0,1 en 0,01%
- Jet 5: (0,5 en 1%) (werkzame stoffen : waterstofperoxide 210g/l, perazijnzuur: 55g/l: 0,5 en 1% (advies, 5 minuten laten inwerken)
- NaOCl : Natrium hypochloriet (chloorbleekloog)100 ppm; werkconcentratie sterk afhankelijk van de hoeveelheid organisch materiaal, 2-100 ppm. 2 ppm in water met weinig organisch materiaal en voornamelijk bedoeld om gram-negatieve bacteriën te doden. 100 ppm op materiaal waar redelijk veel organisch materiaal aanwezig is en ook schimmelsporen gedood moeten worden.
- EC: EasyClean 1%; geleverd in poedervorm.

Een isolaat van *X. fragariae* uit de PD-collectie, PD 4550, een Nederlands isolaat uit productieteel (2006) was opgekweekt op nutriëntagar. Van de twee dagen oude cultuur werd een uitgangssuspensie van ongeveer 10^8 cfu per ml geautoclaveerd kraanwater gemaakt. (De concentratie werd bepaald door uitplaten van een verdunningsreeks op Wilbrink-medium en kolonietellingen). De suspensie is verdeeld over disposable buizen waarin op tijdstip $T_{0 \text{ min}}$ kraanwater en als laatste de middelen werden toegevoegd volgens Tabel 2. Na mengen werd op gezette tijden (T_1 min, T_5 min en T_{15} minuten) 20 μ l uitgeplaat op 2 kweekschalen met Wilbrink-agar. (T_0 is voor toevoeging van het middel). Na 9 dagen werden de Wilbrinkschalen beoordeeld en de *X. fragariae*-kolonies geteld om zo de afdoding vast te stellen. Per ontsmettingsmiddel is de identiteit van een kolonie vastgesteld d.m.v. IF-microscopie (serum van PRI: IPO 9534 D1/1b en conjugaat SwAR/FITC). De proef is in tweevoud uitgevoerd vanaf het bereiden van de uitgangssuspensie. De resultaten staan in paragraaf 3.5.

Tabel 2. Verdunningen middelen.

De al dan niet voorverdunde middelen zijn op tijdstip T_0 toegevoegd

Middel	MC	MC	MH	MF	MF	C51	C51	Jet5	Jet5	EC	NaOCl	contr
Bacteriesuspensie	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5 ml	5ml	5ml
Kraanwater (steriel)	15	24	0	24,4	23,8	22	24,7	23,5	22	15	14,25	25
Middel (voorverdunding)	10	1	25	0,6	1,2	3	0,3	1,5	3	10	0,75	0
Totaal	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Eindconc.	1%	0.1%	83%	0,2%	0,4%	0,1%	0,01%	0,5%	1%	1%	100ppm	water

EasyClean: hiervan is 0,3 gr opgelost in 10 ml steriel kraanwater (voorverdunding).



Afdoding door een hittebehandeling

Om te controleren bij welke temperatuur *Xanthomonas* afgedood wordt, zijn glazen reageerbuisjes met een 0,5 ml bacteriesuspensie van *X. fragariae* geïncubeerd bij vier verschillende temperaturen (20°C, 46°, 70°C en 120°C) en bij verschillende tijden. Na de incubatie zijn de bacteriën uitgeplaat op Wilbrink-medium en is gekeken of de bacteriën groei vertoonden. Er is ook bij 46°C getest omdat in een ander project deze temperatuur als alternatief getest werd om aardbeimijten te doden in een dompelbad. Als blijkt dat *Xanthomonas* bij deze temperatuur overleeft, werkt deze temperatuurbehandeling tegen mijten de verspreiding van *X. fragariae* in de hand. Resultaten staan in paragraaf 3.5.

2.6 Hygiëneprotocol

Er zijn geen effectieve chemische middelen tegen *X. fragariae* met een toelating voor de aardbeiteelt. Daarom kunnen planten die latent geïnfecteerd zijn of die symptomen bevatten alleen verwijderd en vernietigd worden. Vroege opsporing van *X. fragariae* beperkt de periode waarin de bacterie zich kan verspreiden via gewashandelingen. Alleen verwijdering van de besmettingsbronnen en strikt uitgevoerde hygiëneprotocollen kunnen verdere verspreiding van de bacterie tegengaan.

Inventarisatie van hygiënische maatregelen bij deelnemende vermeerderaars en telers

Alle deelnemende vermeerderaars en telers zijn bezocht. Met de verantwoordelijke personen is het bedrijfsproces doorgenomen. Daarnaast zijn de velden, kassen, tunnels en bedrijfsruimtes bezocht. Tevens is een checklist doorgenomen betreffende bedrijfshygiëne.

Opzetten van een hygiëneprotocol ter voorkoming van besmettingen met *Xanthomonas fragariae*

Bestaande hygiëneprotocollen zijn verzameld, waaronder:

- Hygiëneprotocol Tomaat van GAC, NAK-T, LTO Groeiservice en WUR glastuinbouw (4)
- Informatieset *Xanthomonas fragariae* in aardbeien van Plantum NL (5)
- “Code of Practice for Angular leaf spot (*Xanthomonas fragariae*) van Defra UK, Plant Health (6)

Nuttige informatie uit deze bestaande protocollen is overgenomen. Daarnaast is gesproken met voorlichters, telers en instanties om goede bestaande maatregelen over te nemen en om te controleren of nieuwe maatregelen praktisch haalbaar zijn.

De informatie die verkregen is uit de risicoanalyse betreffende verspreiding en overleving is ook verwerkt in de opgezette richtlijnen voor het hygiëneprotocol. De resultaten van dit gedeelte staan in paragraaf 3.6.



3 RESULTATEN

3.1 Optimalisatie DNA-extractie en PCR-toets

Optimalisatie DNA-extractie

DNA-extracties kunnen uitgevoerd worden op monsters van bladeren, wortels, rhizomen, grond en water. Voor watermonsters moeten *Xanthomonas*-bacteriën geconcentreerd worden, omdat deze vaak sterk verdund zijn in het water. Het concentreren wordt uitgevoerd met vacuümfiltratie. Voor de extractie uit grond wordt een door Groen Agro Control ontwikkeld procédé gevolgd. Ook voor de DNA-extracties uit plantmateriaal worden procédés gevolgd die ontwikkeld zijn door Groen Agro Control. Een probleem bij monsters van aardbeiplanten is dat deze berucht zijn om stoffen die de enzymreactie in de PCR-toets remmen. Deze stoffen moeten dus geneutraliseerd of verwijderd worden. Na verschillende technieken getest te hebben, is het uiteindelijk gelukt om PCR-remmers te neutraliseren en te verwijderen. Om er zeker van te zijn dat PCR-remmers afwezig zijn, worden er in de PCR-toets altijd interne controles meegenomen die positief moeten uitvallen.

Optimalisatie PCR

Voor de PCR-toets zijn verschillende primersets getest, die specifiek zijn voor *Xanthomonas fragariae* (Fig. 9). Alle drie geven alleen met *X. fragariae* een PCR product (bandje in laantjes met “Xf”, Fig 9). Dit PCR-product is afwezig bij andere *Xanthomonas*-soorten die nauw verwant zijn aan *X. fragariae*. Ook in het blanco watermonster en een monster van een gezonde aardbeiplant is het PCR-product afwezig (Fig. 9). De primersets zijn op verschillende stammen van *X. fragariae* getest en alle waren positief. Een andere *Xanthomonas*-soort die schadelijk is voor aardbei, *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, is ook negatief met alle drie primersets (Xaf, Fig 9). Tevens zijn naast verschillende *Xanthomonas*-soorten ook nog andere plantpathogene en niet-pathogene bacteriën getest. Deze waren ook allemaal negatief voor de drie primersets. Eén primerset gaf de hoogste gevoeligheid voor verscheidene soorten monsters (plant, grond, water). Dat was primerset nummer 3. De condities voor de PCR, zoals primerconcentratie, PCR-mix en temperatuurcyclingprogramma zijn voor deze primerset verder geoptimaliseerd.

De hele procedure van monsters in ontvangst nemen tot rapporteren, neemt in het algemeen drie werkdagen in beslag. De volgende handelingen worden hierbij uitgevoerd: inschrijven van monsters, visuele beoordeling, monstervoorbewerking, DNA-extractie, PCR-toets, eventuele herhaling van extractie en PCR, en rapportage.

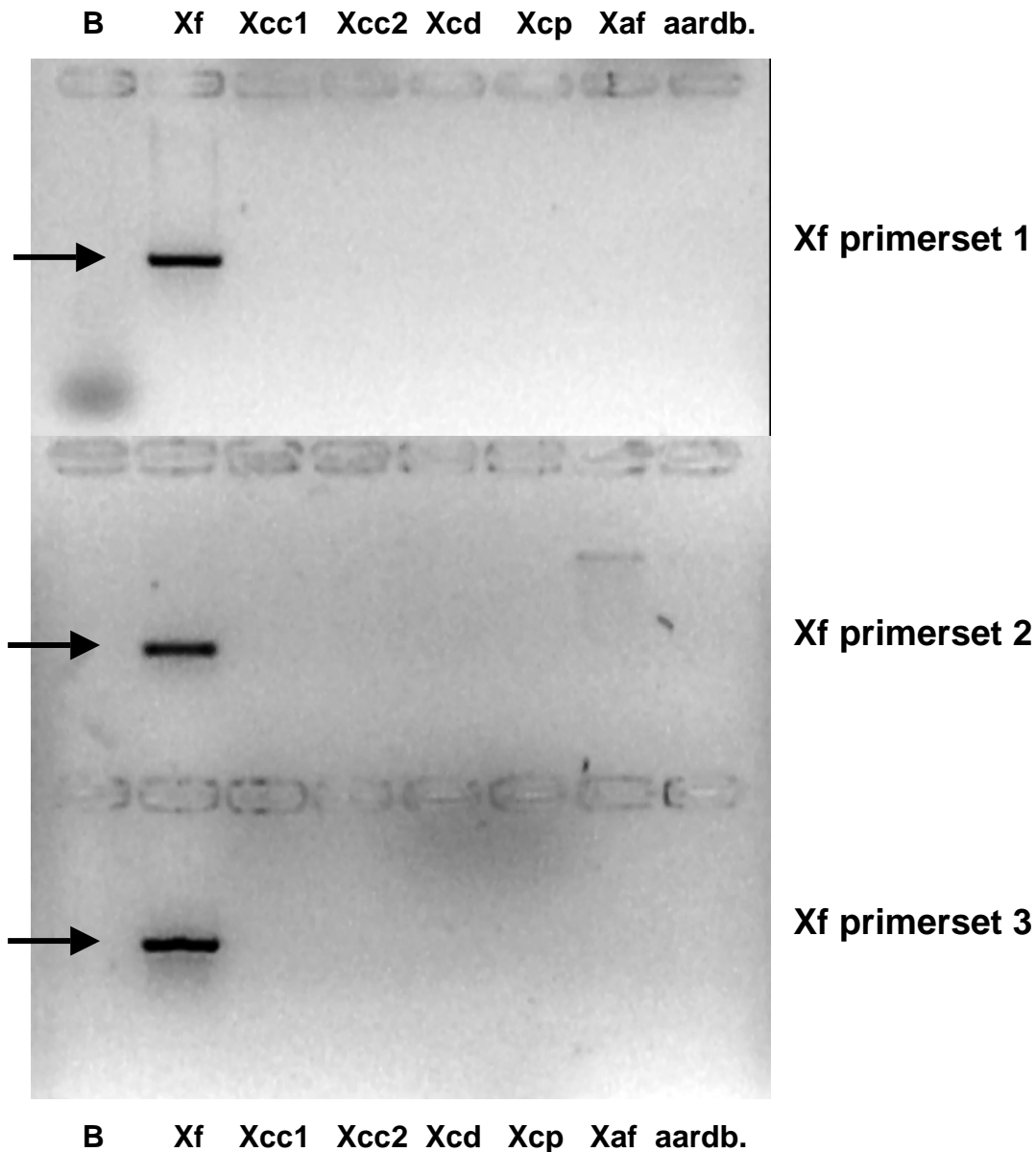


Fig. 9. Analyse van PCR-producten m.b.v. gelelectroforese. Drie primersets voor *Xanthomonas fragariae* (Xf) zijn getest op een positieve referentiestam, een aantal nauw verwante *Xanthomonas*-soorten, een watermonster en een monster van een gezonde aardbeiplant. Alleen bij de positieve referentiestam is een duidelijk PCR-product waarneembaar (aangegeven met een pijl).

B: blanco, watermonster

Xf: positieve controle, *Xanthomonas fragariae*.

Xcc1: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, stam 1

Xcc2: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, stam 2

Xcd: *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*

Xcp: *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*

Xaf: *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*

Aard.: negatieve controle, gezonde aardbeiplant

3.2 Validatie PCR-toets

Specificiteit

Zowel door GAC als de PD is de specificiteit van de PCR-primers onderzocht. Bij GAC bleek dat *X. fragariae* uit tien praktijkisolaten en stammen uit collecties te reageren met de PCR primers. De praktijkisolaten kwamen uit verschillende plantdelen, zoals blad, bloem, rhizoom, kroontjes en wortelresten in grond. De gebruikte primers bleken niet te reageren met andere plantpathogene en onschadelijke *Xanthomonas*-soorten (8) (Fig. 9). Ze reageerden ook negatief met een andere soort van *Xanthomonas* die ook schadelijk is voor aardbei, nl. *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*.

Door de PD is één primersset gevalideerd op specificiteit voor een aantal isolaten uit de PD-collectie. Dit zijn isolaten van *X. fragariae* en *X. arboricola fragariae* uit o.a. Nederland, Portugal, Griekenland, Frankrijk, Spanje en Italië, serologisch kruisreagerende *Xanthomonaden* en aardbei-saprophyten (Bijlage 1). Naast de PCR van Pooler (7) is als referentie de PCR van Roberts (8) in de vergelijking meegenomen. Met de Pooler-PCR gaven alle *X. fragariae*-isolaten een PCR bandje van 550 bp. Resultaten van de PCR testen zijn weergegeven in Bijlage 1. Foto's van electroforese gelen waarin de PCR producten van de Pooler PCR voor een aantal isolaten zichtbaar zijn, zijn weergegeven in Bijlage 2. De PCR van Roberts is iets minder specifiek voor *X. fragariae* omdat soms zwakke reacties optreden met *X. arboricola fragariae* en aardbeisaprophyten.

Om mogelijke verwantschap van de isolaten aan te tonen is REP-PCR uitgevoerd (9), na clusteranalyse van de PCR-bandenpatronen met software van Bio- Numerics is een dendrogram gemaakt (Bijlage 3). Gebaseerd op de homologie in bandenpatronen gegenereerd in REP-PCR vormen alle *X. fragariae* isolaten een groep die zonder uitzondering reageren in de Pooler PCR (primers P241 A/B) en de Roberts PCR (primers Xf9/Xf11) (Bijlage 1). De *X. arboricola fragariae* isolaten reageren niet met de Pooler-PCR, maar soms met de Roberts-PCR en vormen een groep met REP-PCR clusteranalyse. De overige isolaten reageren zonder uitzondering niet in de beide PCR's, maar laten soms wel zwakke reacties (bij Roberts-PCR) en a-specifieke reacties zien (Bijlage 2).

Gevoeligheid

Ook de gevoeligheid van de PCR-toets is door zowel GAC als de PD onderzocht. GAC heeft meerdere malen in planten, zonder visueel zichtbare symptomen, met PCR *X. fragariae* aangetoond. Als één licht besmet blad met microlesies gemengd werd met 19 schone bladeren, liet het mengsel een positieve uitslag zien met de PCR-toets. Als bacteriemateriaal toegevoegd werd aan schone bladeren dan was de detectieondergrens circa 1000 bacteriën die toegevoegd waren aan vijf bladstukjes van 1,5 cm². Dit komt overeen met circa 40 bacteriën in de PCR-assay (gemiddelde van twee herhalingen).

Door de PD zijn aan gezonde bladmonsters bekende hoeveelheden van *X. fragariae* bacteriën toegevoegd en getest met de PCR methode. Met de PCR-methode bleek 2,5 x 10⁴ cfu/ml in plantextract aantoonbaar te zijn. Extra zuivering van het DNA met een PVPP- kolom gaf een verbeterde gevoeligheid.



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

De PCR-methode is ook getest op natuurlijk geïnfecteerd materiaal. Het geïnfecteerde extract is hiertoe opgewerkt door één ziek bladponsje (afkomstig van een blad-lesie) samen met 24 gezonde ponsjes te mengen. Voor het gezonde extract zijn 25 gezonde bladponsjes genomen. Het geïnfecteerde extract is doorverdund in gezond extract door steeds één deel geïnfecteerd extract te mengen met vier delen gezond extract. Het geïnfecteerde extract gaf een sterk PCR-sigitaal met onverdund, 5x en 25x doorverdund extract. Verdunningen van 125x en 625x gaven zwakke PCR-signalen.

De PCR-methode voor de detectie van *X. fragariae* is gevalideerd voor specificiteit en gevoeligheid. Beide prestatiekenmerken werken voldoende om lichte infecties van *X. fragariae* in bladmateriaal mee aan te kunnen tonen. Uitvoerige validatie is niet uitgevoerd voor grond en rhizoommateriaal (of andere plantdelen). Wel is de methode geschikt om *X. fragariae* DNA aan te tonen in vuile (grond) monsters zoals hieronder uiteengezet. Uit de spikingsexperimenten waarbij bacteriën zijn toegevoegd aan bladextracten kan geen uitspraak gedaan worden over het aantonen van latente infecties omdat niet bekend is welke bacterie aantallen horen bij een latente infecties. Echter uit de ponsjesproef blijkt dat 1/625ste van een besmet ponsje nog aantoonbaar te zijn met de PCR. In praktijkmateriaal uit aarbei-vermeerdering of productieteel dat niet visueel besmet was bij monsternamen maar wel positief scoorde in de PCR werden bij nadere inspectie bij de PD altijd kleine lesies in de bladeren gevonden.

De nieuwe PCR-methode is gevoeliger dan de huidige PCR-methode en de methode van bacterie-isolatie en immunofluorescentie-microscopie die bij de PD in gebruik zijn.

3.3 Monsternamen

Voor aangetast plantmateriaal is het vanzelfsprekend dat symptomatisch materiaal bemonsterd dient te worden voor diagnostische toetsen als PCR, isolatie en IF-microscopie.

Voor eventuele latente besmettingen in blad wordt uitgegaan van 20 deelblaadjes in een mengmonster. Uit de experimenten voor de gevoeligheid bleek dat hiermee een redelijk betrouwbare uitspraak gedaan kan worden omtrent de besmetting van één van de 20 blaadjes.

Voor een grote partij planten is 20 blaadjes uiteraard een kleine steekproef die geen uitsluitend kan geven over een kleine besmetting in de partij. Meerdere mengmonsters per partij geven hier meer betrouwbaarheid. Bij een massale besmetting van een partij zal met grotere zekerheid een besmetting geconstateerd worden. Het analyseren van een groot aantal monsters om latente infecties op te sporen kan te kostbaar zijn voor een groot aantal telers. Een andere oplossing voor dit dilemma is om alleen verdachte planten te laten toetsen of in de tijd meerdere mengmonsters te laten toetsen. In het eerste geval verhoog je de kans dat een besmetting wordt gevonden en in het laatste geval zal een besmetting vroeg of laat geconstateerd worden aangezien de bacterie zich over meer planten zal verspreiden.

Voor zeer kritische monsters, zoals SEE-planten, en in-vitro planten om nieuwe rassen te volgen, is het aan te raden om elke plant apart te laten toetsen.

3.4 Verspreiding in de praktijk

Bij twee vermeerderaars en vier productietelers is in de vermeerdering en in de vruchtproductieteel de verspreiding van *X. fragariae* in kaart gebracht.

Vermeerderingsmateriaal is getoetst met PCR. In de vruchtproductieteel zijn alleen visuele besmettingen in kaart gebracht. Het grootste risico zit tenslotte bij het uitgangsmateriaal.

Daarom is dit uitvoeriger getoetst met PCR dan het plantmateriaal dat in het eindstadium als vruchtproductieplant wordt gebruikt. Ook zijn er water- en grondmonsters getoetst met PCR.

Tevens zijn er veegmonsters genomen om te testen of er op machines *Xanthomonas* aanwezig was.

Van twee plantvermeerderaars en drie productietelers zijn in totaal ongeveer 500 monsters verzameld en geanalyseerd voor het project. Hiervan waren circa 70 monsters positief voor *Xanthomonas*.

Certificeringsschema NAK-tuinbouw Elite

Kandidaatplanten (geselecteerd door NAK-T, volledig ziektevrij)



SEE (door NAK-T vermeerderd en geleverd, 1 jaar)



SE1 (teelt in luisdichte kas/tunnel, 1 jaar)



SE2 (teelt in luisdichte kas/tunnel, 1 jaar)



EE (onbedekte teelt, moederplanten van vruchtproductieplanten, 1 jaar)



E (onbedekte teelt voor vruchtproductieplanten, 1 jaar)

- trayplanten voor kasteelt
- wachtbedplanten voor buitenteelt



vruchtproductie (bedekt of onbedekte teelt)

Fig. 10. Schema van vermeerdering van aardbeiplanten en teelt in Nederland, certificering volgens het Elite-keurmerk van NAK-tuinbouw.



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Vermeerderaars:

- Bij bedrijf 1 waren er in het tijdsbestek van het project, november 2005 tot november 2007 meer dan 200 plantmonsters getoetst op *Xanthomonas*. Zes niet-visueel zichtbare geïnfecteerde plantmonsters waren er positief voor *Xanthomonas*. De positieve monsters betroffen enkele nieuwe rassen uit het buitenland en een paar partijen met EE-materiaal van een gangbaar ras geteeld bij derden. Andere monsters waren allemaal negatief.
- Bij bedrijf 2 zijn tijdens het project circa 70 monsters getoetst. Eén verdacht plantmonster met symptomen uit november 2005 (E-materiaal) was positief voor *Xanthomonas*. De grond met gewasresten waaruit deze plant kwam bleef nog een half jaar PCR-positief. Na het bewerken van de grond waren de grond- en plantmonsters van dat perceel allemaal negatief. Grond- en plantmonsters van andere percelen, van verschillende rassen en verschillende stadia in het vermeerderingsproces (SEE, SE1, SE2, EE, E) waren ook allemaal negatief.

Productietelers:

- Teler 1 had enkele jaren last van *Xanthomonas*-besmettingen, zowel in de wachtbedden als in de productieteelt. Deze teler had in het najaar van 2005, enkele plekken op het wachtbed met visueel besmette planten. Hiervan waren zowel bladeren als rhizomen besmet. Ook grondmonsters waren positief. In het begin van 2006 waren van verdachte wachtbedplanten uit de koelcel, de rhizomen besmet. Ook waren de rhizomen van plantresten op het wachtbed in maart 2006 PCR-positief. In 2006 is deze teler de eigen vermeerdering gestopt en heeft productieplanten aangekocht bij een plantenkweker. In de productievelden van 2007 waren geen *Xanthomonas*-problemen ondervonden.
- Teler 2 ondervond in 2004 veel problemen met *Xanthomonas* in zowel de vruchtproductie als in de vermeerdering. In 2005 werd de hygiëne aanscherpt en een nieuw geïsoleerd wachtbedperceel in gebruik genomen. In het najaar van 2005 werden toch besmette rijen en besmette losse plekken geconstateerd in het vermeerderingsveld. Hierbij waren zowel bladeren als rhizomen besmet. Begin 2006 waren enkele achtergebleven rhizomen op het wachtbed nog steeds PCR-positief voor *Xanthomonas*. De achtergebleven rhizomen zijn vervolgens opgeruimd. In de zomer en het najaar van 2006 waren alle geteste planten uit de vermeerdering negatief voor *Xanthomonas* (22 monsters). Ook in het voorjaar van 2007 waren alle monsters uit de vermeerdering negatief. In 2007 waren er weinig besmettingen gevonden in de vruchtproductieteelt.
- Bij teler 3 was in het najaar van 2005 een hoog percentage planten positief voor *Xanthomonas*. Enkele planten waren besmet in het rhizoom. In 2006 was een klein percentage planten in de kas positief in het rhizoom. In de kas waren er geen besmettingen op de bladeren geconstateerd. In het najaar van 2006 waren enkele wachtbed- en trayplanten positief voor *Xanthomonas*. In 2007, waren er in de kas en shelters geen aangetaste planten waargenomen. In de buitenteelt waren er wel planten geconstateerd met *Xanthomonas*-symptomen op het blad, maar er was geen oogstderving en tevens waren er geen zwartverkleurde kroontjes geconstateerd.

In Bijlage 4 staan de hygiënemaatregelen die de vermeerderaars en telers genomen hebben om infecties te verminderen.

3.5 Risicoanalyse verspreiding

Overleving van *Xanthomonas fragariae* op verschillende materialen

Bij de experimenten waar gekeken werd naar de overleving op verschillende materialen was na 17 dagen een duidelijke afname waarneembaar in het aantal levende *X. fragariae* bacteriën op hout, RVS en rubber. Voor katoen was deze afname al duidelijk na 7 dagen te zien. De bacterie overleeft het langste op gelakt metaal en rubber. Na 38 dagen was op geen van de materialen nog overleving van *X. fragariae* waargenomen. Na 62 dagen was nog een extra waarneming gedaan en er werd eveneens geen overleving geconstateerd (Tabel 3).

De Wilbrinkplaten werden na 5 dagen beoordeeld op het voorkomen van typische kolonies van *X. fragariae*. Alleen op de controleplaten was typische groei waarneembaar (plaat 1 en 2: niet te tellen, plaat 3: meer dan 1000 kolonies).

Tabel 3. Overleving van *X. fragariae* op verschillende materialen.

Waarden zijn het aantal *X. fragariae* kolonies (bevestigd met de IF-test) op Wilbrink's plaat. Per tijdstip is van elk materiaal drie stukje (n=3) de overleving van *X. fragariae* bepaald door uit te platen op 1 Wilbrink's plaat. RVS, roestvrij staal. >> 1000, veel meer dan 1000 kolonies op Wilbrink's plaat; > 1000, rond de 1000 kolonies op Wilbrink's plaat. IF, immunofluorescentie. T0, tijdstip 0; T7, tijdstip na 7 dagen, etc.

Materiaal	T0	T7dagen	T17dagen	T38dagen	T62dagen
Hout	3x>>1000	0, 2x>1000	0,0,2	0,0,0	0,0,0
RVS blank	3x>>1000	3x>>1000	0,0,1	0,0,0	0,0,0
RVS gelakt	3x>>1000	3x>>1000	100,1000, >1000	0,0,0	0,0,0
Rubber	3x>>1000	3x >1000	0, 75,50	0,0,0	0,0,0
Katoen	3x>>1000	2 x 0, 1x 37	0,0,0	0,0,0	0,0,0
Slootwater	Niet uitvoerbaar				

Het vaststellen van de overleving van *X. fragariae* in slootwater d.m.v. kweek op Wilbrink-medium was praktisch moeilijk uitvoerbaar omdat slootwater veel bacteriën bevat die de uitgroei van *X. fragariae* onderdrukken. Mogelijk lukt de detectie beter met de PCR toets. Dit is echter niet uitgeprobeerd.

De overleving van *X. fragariae* op materialen is aangetoond tot maximaal 17 dagen. De overleving op katoen is korter, minder dan 17 dagen.

De mogelijkheid om d.m.v. contact met besmette materialen (schoeisel, kleding, traymateriaal) *X. fragariae* bacteriebesmetting over te brengen op gezonde aardbeiplanten is niet nader onderzocht. Er zijn wel literatuurgegevens bekend waarin hiervan melding wordt gemaakt (2, 10).

Overleving van *Xanthomonas fragariae* in ondergewerkte gewasresten

Voor het experiment waar de overleving van de bacterie in ondergewerkte gewasresten werd onderzocht, werd de besmetting vastgesteld (Tabel 1) door visuele beoordeling van 6-7 planten aan de rand van de ringcontainers. Van deze planten werden de sub-bladen geteld en beoordeeld op aanwezigheid van symptomen. (Fig. 11).



Fig. 11. Plant in container met typische bladvleksymptomen van *X. fragariae*.

De symptomen zijn onderverdeeld in aantallen bladeren zwaar besmet, middelmatig besmet licht besmet en niet besmet (Tabel 4). Van deze planten is materiaal verzameld voor bevestiging van de waarnemingen d.m.v. uitplaten op Wilbrink's medium. Van elke container waarbij typische kolonies voor *X. fragariae* op Wilbrink-medium groeiden is de identiteit van 1 kolonie bevestigd met PCR en IF-microscopie (EPPO methode).

Tabel 4. Score van aantal visueel besmette sub-bladeren van aardbeiplanten in ringcontainers.

Van 6-7 planten zijn de subbladeren visueel beoordeeld in 4 klassen; niet zichtbaar besmet (NB), zwaar besmet (ZB), middelmatig besmet (MB) en licht besmet (LB). Van alle ringcontainers met zichtbare besmetting kon de aanwezigheid middels kweek en identificatie (IF) worden aangetoond. De codering staat weergegeven in Tabel 1.

Ringcontainer	G	GF	GR	GW	B	B	BF	BF	BR	BR	BW	BW
Aantal sub-bladeren	87	64	77	57	144	130	138	129	180	174	117	141
Aantal NB	87	64	77	57	87	77	74	78	104	102	62	101
Aantal ZB	0	0	0	0	38	33	64	40	52	69	26	31
Aantal MB	0	0	0	0	16	12	0	0	22	0	27	7
Aantal LB	0	0	0	0	3	8	0	11	2	3	2	2



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Ongeveer 2 weken na doodspuiten met Roundup en Finale (containers GR, BR, GF en BF) werd het plantmateriaal met een grasschaar in grove stukken geknipt en op ongeveer 10 cm diepte ondergewerkt. (22 nov 2006). De gezaaide groenbemester (wintertarwe) in containers GW en BW was slecht opgekomen. Verschillende malen was er bijgezaaid maar schijnbaar was de temperatuur al te laag om volledige kieming te krijgen.

In maart 2007 werden de ringbakken bemonsterd. Hiervoor was één kousnetje met inhoud opgegraven en onderzocht op de aanwezigheid van blad en rhizoomresten. Een deel van het grond /plant mengsel werd door GAC en door de PD getoetst met het grondextractieprotocol en PCR. Verder was getracht uit de plantenresten (hoofdzakelijk rhizoom- en wortelresten) *X. fragariae* te kweken (Fig. 12, isolatieschaal). Verdachte kolonies werden verder geïdentificeerd met Kolonie-IF. Verder werden op de PD de grondmonsters (5 maanden) uitgeplaat (30 gr/100 ml 0.05 M PB, 2 uur in schudincubator, 20 µl uitplaat op 4 Wilbrink-platen). Resultaten van deze toetsen zijn weergegeven in Tabel 5 en 6.

De PCR-toets (incl. extractie methode) bleek zeer geschikt voor het detecteren van DNA van *Xanthomonas fragariae* in gewasresten met daaraan gehechte gronddeeltjes. Overleving van *X. fragariae* in besmette gewasresten was vastgesteld voor 5,5 maanden met bacterie-kweek en IF-microscopie en 11 maanden met PCR. Het effect van Roundup op de afdoding van *X. fragariae* was groter dan dat van Finale. Bij Roundup was in een aantal gevallen nog DNA aangetoond maar werd niets gekweekt. Bij Finale bleef PCR én kweek positief (in ieder geval tot 5,5 maanden).



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Tabel 5. Uitplaatresultaten en kolonie-identificatie van verdachte kolonies m.b.v. IF-microscopie.

Grond en gewasresten zijn na overwintering van 4,5 maanden (4/4 2007) en 5,5 maanden (16/5 2007) uitgekweekt en *X. fragariae* gelijkende kolonies zijn geïdentificeerd m.b.v. IF-microscopie.

AT= a-typische kolonies, bij kolonie-IF zijn de genoemde kolonienummers getest.

Nd= niet gedaan

Niet alle typische kolonies zijn met IF getoetst, omdat ze ofwel na overzetten op een nieuwe voedingsbodem toch a-typisch bleken te zijn (**) of dood waren (*).

Uit grondmonsters groeiden geen verdachte kolonies

Grijs gearceerd: ringcontainer waarin besmette planten zijn ondergewerkt.

In de rode cellen staan gewasresten met teruggeïsoleerde *X. fragariae*. De codering staat weergegeven in Tabel 1.

Behandeling	Grond Na 4,5 maand	Gewas-resten Na 4,5 maand		Gewas-resten Na 5,5 m	
	Isolatie uit grond (# kolonies)	Isolatie uit gewasresten (# kolonies)	Kolonie- IF	Isolatie uit gewasresten (#kolonies)	Kolonie-IF
G	AT (**)				
B	AT			3	-
BR	AT	Nd		3*	Nd
GF	AT	Nd		9	-
BR	AT	2 T	-		
GW	AT	2 T	-		
BF	AT	3 T	-	3	+
BF	AT	3 ^e plaat: 59 T 4 ^e plaat: 37 T	+	5	+
GR	AT	2 ^e plaat: 2 T	-	6	-
BW	AT	2 ^e plaat >100 T 3 ^e plaat: 56 T 4 ^e plaat: 35 T	+	4	+
B	AT			2*	Nd
BW	AT	2 ^e plaat: 4 T 3 ^e plaat : 4 T 4 ^e plaat: 2 T	+		+

Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Tabel 6. PCR uitslagen van de planten/grond monsters (wortels en rhizoom) na onderwerking en ondergrondse overleving.

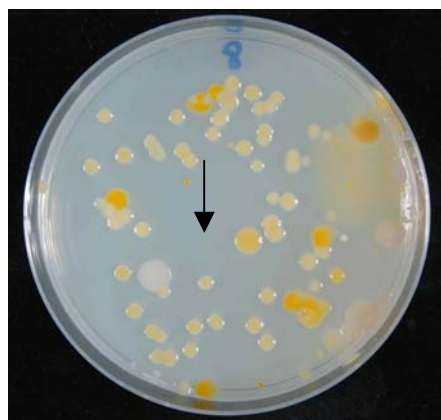
Grijs: ringcontainer waarin besmette planten zijn ondergewerkt.

Nd: niet gedaan

Zzw+: zeer zwakke PCR bandjes die duiden op een kruisreactie of contaminatie tijdens opwerking van het monster voor PCR. Codering staat weergegeven in Tabel 1.

Plot	PCR op grond , gewasresten of beide				Kweek uit grond of gewasresten Kweek uit Rhizoom	
	Aantal maanden in de grond				Aantal maanden in de grond	
	4,5		5,5	11	5	6
	grond en gewasresten	gewas resten	gewas resten	grond en gewasresten	gewas resten	gewas resten
G		zzw+	nd	nd		nd
B	+	+	+	+		
BR	+	nd	+	+	nd	
GF		nd		nd	nd	
BR	+	+	nd	+		nd
GW			nd	-		nd
BF		zw+	nd	+		+
BF		+	nd		+	+
GR		zzw+		nd		
BW	+	+	nd	+	+	+
B	+	+	+	zw+		
BG		+	nd		+	+

Half april 2007 werden voor de nateelt schone planten van Elsanta (klasse E) op de containers geplant. Tot november 2007 waren er geen bladsymptomen waargenomen die werden veroorzaakt door *X. fragariae*. Bij beëindiging van het experiment in november 2007 is van elke container een blad en rhizoommonster verzameld voor toetsing in PCR. In alle gevallen werd in de nateeltplanten geen besmetting met *X. fragariae* aangetoond. Alle containers zijn op 11 oktober 2007 nogmaals bemonsterd op overgebleven plantresten. Op deze gewasresten is alleen nog PCR uitgevoerd omdat de monsters te ver waren vergaan voor mogelijke kweek van de *X. fragariae* bacterie (Tabel 6). In veel monsters bleek na 11 maanden nog DNA van *X. fragariae* terug te vinden.



De nateelt van aardbeiplanten (ras Elsanta) op besmette grond heeft geen infecties in het gewas opgeleverd. Blijkbaar is de kans op besmetting via besmette teeltaarde niet zo groot. Uit de literatuur zijn ook geen gegevens te vinden over opname van *X. fragariae* door de wortels. Eerder moet gedacht worden aan bladcontact met spatwater dat eerder in aanraking is geweest met de besmette gewasresten die aan de oppervlakte komen.

Fig.12. Bacteriekolonies van container 8, overleving na 4,5 maand.
Typische kolonie voor *Xanthomonas fragariae* is aangegeven met een pijl



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Ontsmetting van *Xanthomonas fragariae*

De volgende middelen zijn getest voor de ontsmetting van de bacterie in steriel kraanwater: Jet-5, MennoH, MennoF, MennoClean, Easyclean, NaOCl (natrium-hypochloriet) en Clarmarin 51. Alleen Jet-5 en MennoClean zijn toegelaten ontsmettingsmiddelen. De andere middelen zijn toegelaten schoonmaakmiddelen die tevens ontsmetten.

Van de geteste middelen bleek alleen Clarmarin 51 bij 0,01 en 0,1% en MennoClean bij 0,1% onvoldoende afdodende werking te hebben (Tabel 1). Jet 5, Menno-H, Menno F, Easyclean en NaOCl voldoen goed aan de gestelde eisen voor ontsmettingsmiddelen. Bij deze middelen en de gebruikte concentratie gaven deze middelen binnen 1 minuut afdoding van de *X. fragariae* bacterie in een suspensie van 5×10^8 cfu/ml bacteriën (Tabel 6). MennoClean bleek bij 1,0%, hetgeen de aangeraden concentratie is, wel ontsmettend te werken binnen een minuut.

Voor Clarmarin is niet eenvoudig te verklaren waarom er geen snelle afdoding plaatsvindt bij de gebruikte concentraties. Ervaringen met ontsmetting van oppervlaktewater dat besmet is met de bruinrot bacterie (*Ralstonia solanacearum*) zijn dat een snelle afbraak van bruinrot bacteriën optreedt bij een concentratie van bij 0,01% Clarmarin (Gewasbescherming 2005, nr. 6, blz 248-252). Een verklaring voor het feit dat *X. fragariae* minder goed wordt afgedood kan zijn dat *X. fragariae* catalase bevat waarmee waterstofperoxide uit Clarmarin wordt afgebroken. Controle van het gebruikte *X. fragariae* isolaat in deze proef in de catalase-test liet zien dat deze bacterie inderdaad positief is voor catalase. Dit zou de verhoogde tolerantie t.a.v. Clarmarin kunnen verklaren.



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Tabel 6. Overleving van *X. fragariae* in een waterige oplossing waaraan ontsmettingsmiddel is toegevoegd. Getallen geven de getelde aantallen bacteriekolonies weer. >>1000: veel meer dan 1000; 1000: ongeveer 1000. Het experiment werd in tweevoud uitgevoerd, alleen voor 0.1% Clarmarin 51 waren de duplo waarden afwijkend. Voor de andere middelen zijn de duplo's daarom niet weergegeven. Op een aantal platen werden enkele andere kolonies waargenomen, die geen *X. fragariae* bleken te zijn.

Resultaten: Ontsmettingsproef *Xanthomonas fragariae* (13/2/07)

	T0 min		T1 min		T5 min		T15 min	
	Aantal konies <i>X.fra.</i>	Aantal konies <i>X.fra.</i>	Aantal konies <i>X.fra.</i>	Aantal konies <i>X.fra.</i>	Aantal konies <i>X.fra.</i>	Aantal konies <i>X.fra.</i>	Aantal konies <i>X.fra.</i>	Aantal konies <i>X.fra.</i>
	Schaal 1	Schaal 2	Schaal 1	Schaal 2	Schaal 1	Schaal 2	Schaal 1	Schaal 2
Clarmarin 51								
0.01%	>>1000	1000	>>1000	1000	>>1000	1000	>>1000	1000
0.1%	>>1000	1000	28	0	19	0	7	0
0.1%	>>1000	1000	1000	207	462	18	136	0
Jet5								
0.5	>>1000	1000	0	0	0	0	0	0
1.0	>>1000	1000						0
Menno H								
	>>1000	1000	0	0	0	0	0	0
Menno F								
0.2%	>>1000	1000	0	0	0	0	0	0
0.4%	>>1000	1000	0	0	0	0	0	0
Mennoclean								
0.1%	>>1000	1000	>>1000	1000	>>1000	1000	>>1000	1000
1.0%	>>1000	1000	0	0	0	0	0	0
Easyclean								
1.0%	>>1000	1000	0	0	0	0	0	0
NaOCL								
100 ppm	>>1000	1000	0	0	0	0	0	0
Onbehandeld								
	>>1000	1000	>>1000	1000	>>1000	1000	>>1000	1000



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Afdoding door een hittebehandeling

Van een dichte suspensie van *X. fragariae*-bacteriën overleefde geen van de bacteriën 10 minuten op 70°C of 10 min op 120°C. De overleving bij 46°C was afhankelijk van de incubatietijd. Bij 5 min. op 46°C bleef het merendeel van de bacteriën in leven. Bij 10 en 15 min. op 46°C werd een groot gedeelte afgedood (Tabel 7).

Tabel 7. Hittebehandeling om *X. fragariae* af te doden.

Temperatuur	tijd	groei op Wilbrink-plaat
positieve controle, 20°C	Meer dan 15 min.	+++
46°C	5 min.	++
46°C	10 min.	+
46°C	15 min.	+
70°C	10 min.	-
120°C	10 min.	-

3.6 Hygiëneprotocol

Voor het hygiëneprotocol ter preventie van *Xanthomonas fragariae* in de aardbeiteelt werd er eerst geïnventariseerd wat de deelnemende bedrijven al deden aan hygiënemaatregelen. Daarnaast werden bestaande hygiëneprotocollen en voorlichters geraadpleegd. Dit resulteerde in een handzame set van adviezen die gebruikt kunnen worden door vermeerderaars en productietelers. Voor hygiëneprotocollen in de tuinbouw zijn er twee basisregels die in acht genomen dienen te worden, nl: 1. Schoon starten; 2. Schoon blijven.

Inventarisatie van hygiënische maatregelen deelnemende bedrijven

Voor de inventarisatie van hygiënische maatregelen bij de deelnemende bedrijven zijn alleen opvallende zaken gerapporteerd die nuttig kunnen zijn voor het opstellen van het hygiëneprotocol (Bijlage 4).

Potentiële besmettingsbronnen en risico's voor verspreiding

- *Xanthomonas fragariae* heeft alleen de aardbeiplant als waardplant. Er is een risico dat de ziekte op het bedrijf wordt gebracht met symptoomloos geïnfecteerd materiaal. De bacterie wordt voornamelijk overgedragen door gewashandelingen, machines, en plantafval. In het veld vindt plaatselijke verspreiding plaats via regenval en beregening (spatwater). De bacterie kan overwinteren in plantafval en symptoomloze planten. Preventieve maatregelen zijn het belangrijkste aangezien geen toegestane bestrijding op planten mogelijk is.
- De bacterie kan jaren overleven in plantresten. Ook in harde plantresten in de grond. Als besmette plantresten boven de grond liggen of uitsteken kunnen ze verse planten die op de grond geplant zijn door middel van spatwater besmetten.
- Beregening en met name nachtvorstberegening is riskant t.a.v. verdere verspreiding. Preventieve nachtvorstberegening dient zoveel mogelijk te worden voorkomen. Een alarmsysteem 's-nachts dat bij dreigende nachtvorst afgaat zou een oplossing kunnen bieden. Bij beregening dient voorkomen te worden dat deze tegen de planten slaat. Nooit lage sproeiers gebruiken, altijd hoge sproeiers.
- Wanneer hoge temperaturen overdag worden afgewisseld met lage temperaturen 's-nachts, kan eventuele aanwezige bacteriebesmetting massaal verspreiden. Onder deze omstandigheden dient er zo weinig mogelijk beregend te worden.
- Veel bacteriebesmettingen treden op wanneer het gewas te lang nat blijft.
- Als met besmet uitgangsmateriaal gestart wordt, zal dit problemen opleveren in de daarop volgende vermeerdering en productieteelt. Het is dus belangrijk om met gecertificeerd, vitaal en goed gecontroleerd uitgangsmateriaal te starten.
- Gewashandelingen waarbij beschadigingen optreden kunnen riskant zijn als er planten besmet zijn of het gereedschap of machines besmet zijn. De bacterie verspreidt zich het makkelijkst onder natte omstandigheden. Dus afranken onder natte omstandigheden is niet aan te bevelen. Eventuele nachtvorst daarbovenop kan de plant extra gevoeliger maken voor *Xanthomonas* besmettingen.
- Medewerkers kunnen besmettingen van plant naar plant overdragen en van perceel naar perceel, via handen, schoeisel en kleding.
- Mogelijke besmettingsbronnen van buiten het bedrijf kunnen zijn: bezoekers, collega's, voorlichters, dieren zoals vogels, knaagdieren, honden en katten.
- Besmette percelen in de buurt. Hiervandaan kunnen besmette bladeren of plantrestjes overwaaien.



Hygiëneprotocol Aardbei ter voorkoming van *Xanthomonas fragariae*

Voor elk onderdeel in de vermeerdering en de productieteelt gelden de twee basisprincipes van een hygiëneprotocol: Schoon starten en Schoon blijven. Echter hoe hoger de klassificering, des te nauwgezetter behoort de hygiënediscipline te zijn. Hoog gecertificeerd materiaal vereist ook hygiëne van het hoogste niveau. Voor elk bedrijf dient een bedrijfsspecifiek hygiëneprotocol opgemaakt te worden dat toegespitst is op de situatie in het bedrijf. Hieronder staan richtlijnen die gehanteerd kunnen worden. Eenmaal een bedrijfsspecifiek plan opgezet, dan dient ervoor gezorgd te worden dat het nageleefd wordt en hierop dus ook controle plaatsvindt.

Ontsmetten:

Alles wat ontsmet moet worden, dient eerst grondig gereinigd te worden. Organisch materiaal neutraliseert ontsmettingsmiddelen, waardoor ze niet meer actief zijn. Daarom moeten de te ontsmetten spullen eerst schoon gespoten of schoon gespoeld worden voordat deze spullen ontsmet worden.

- A. Handen kunnen ontsmet worden met warm water en desinfecterende zeep of met alcoholhoudende gelen (bijvoorbeeld MennoH).
- B. Schoeisel kan ontsmet worden door goed te stappen in een doordrenkte ontsmettingsmat met één van de sterkere ontsmettingsmiddelen (Jet-5, Easyclean, MennoClean). Laarzen met een gladde zool zijn het makkelijkst te reinigen en te ontsmetten.
- C. Machines zoals tractor, planter, rooier, frees en ploeg kunnen ontsmet worden met aanbevolen concentraties ontsmettingsmiddel (Jet-5, MennoClean, Easyclean, 100 ppm natriumhypochloriet)
- D. Gereedschap, zoals messen, scharen en schoffel kunnen ontsmet worden met Jet-5, MennoClean, Easyclean of 100 ppm natriumhypochloriet.
- E. Oppervlakken zoals werktafels, vloeren, muren, kassen kunnen ontsmet worden met aanbevolen concentraties ontsmettingsmiddel (Jet-5, MennoClean, Easyclean, of 100 ppm natriumhypochloriet).

Ontsmettingsmiddelen:

Toegestane ontsmettingsmiddelen zijn:

- Jet-5
- MennoClean.

Als deze middelen volgens de instructies van de leverancier gebruikt worden, werken deze middelen effectief. Als alternatief kunnen reinigingsmiddelen gebruikt worden die tevens ontsmettend werken, zoals:

- Natriumhypochloriet (chloorbleekloog), 100-200 ppm.
- EasyClean
- Alcohol, 70-80%.

Voor de handen, is wassen met een desinfecterende zeep en warm water voldoende. Tussendoor ontsmetten van de handen kan met middelen op basis van alcohol en/of organische zuren zoals bijvoorbeeld MennoH.



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Vermeerdering

- Teelt van SE1- en SE2-planten:
 - SEE-planten: hoogst gecertificeerd uitgangsmateriaal: door NAK-T gekeurd en geleverd.
 - Indien gewenst alle SEE-planten individueel toetsen. Voordat materiaal vrijgeven wordt eerst in quarantaine plaatsen (geïsoleerd houden en verder geen gewashandelingen in plaats laten vinden). Pas na vrijgeven, vermeerdering starten in luisdichte kas.
 - Productie van SE1- en SE2-planten in luisdichte kas met sluis bij ingang.
 - Elke vermeerderingsstap certificeren en keuren door NAK-T. Eventueel zelf extra steekproefsgewijs laten toetsen.
 - Jaarlijks schoon perceel zonder aardbei- of aardappelhistorie. Ver geïsoleerd van vruchtproductievelden en ook van vermeerderings- en wachtbedvelden met mogelijke besmettingen (minimaal 500 meter).
 - Personeel inzetten voor SE1- en SE2-productie dat niet op besmette of riskante percelen komt.
 - Voornamelijk in het begin van de week in deze kassen/tunnels werken.
 - Per perceel en bij ingang van perceel ontsmetten van gereedschap en machines (zie methode C en D).
 - Ontsmet of niet eerder gebruikt fust (kisten) gebruiken (zie methode E) .
 - Bezoekers niet toelaten in ruimtes met SEE, SE1 of SE2-planten.
 - Deze ruimtes zoveel mogelijk op slot (letterlijk en figuurlijk).
- Teelt van EE- en E-planten:
 - NAK-T - gecertificeerd en -gekeurd materiaal gebruiken. Eventueel zelf steekproefsgewijs laten toetsen.
 - Maximaal twee jaar op zelfde perceel vermeerdering en wachtbedden. Daarna minimaal vijf jaar niet gebruiken (deze maatregel is voornamelijk bedoeld voor Verticillium en aaltjes; Xanthomonas zou na twee jaar afgestorven moeten zijn).
 - Vermeerderingsvelden en wachtbedvelden selecteren die geïsoleerd liggen van vruchtproductievelden en andere velden waar mogelijk besmet materiaal is (minimaal 200 meter).
 - Fust (kisten) afkomstig van riskante percelen ontsmetten voor gebruik (methode E).
 - Bezoekers bij voorkeur in auto laten zitten bij bezoek van velden.
 - Als bezoekers na overleg toch planten op velden gaan bekijken, overlaarzen en wegwerphandschoenen aan laten doen.
- Werkvolgorde
 - De werkvolgorde van machines, bezoekers en medewerkers moet altijd in de richting zijn van laag risico (hoog uitgangsmateriaal) naar hoog risico (lager uitgangsmateriaal, vruchtproductie). Als laatste dienen besmette percelen betreden te worden.
- Bezoekers en medewerkers:
 - Bezoekers en medewerkers van vermeerderaars mogen niet eerder op de dag aardbeiproductietelers bezocht hebben als ze percelen of bedrijfsruimte betreden. Anders geheel gesloten overall plus wegwerphandschoenen plus overlaarzen aan.



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

- Medewerkers en bezoekers dienen van tevoren handen te wassen met zeep als ze velden, kassen of werkruimtes betreden.
- Iedereen die zowel laag geklassificeerd als hoog geklassificeerde percelen betreedt zijn mogelijke verspreiders van *X. fragariae*, inclusief de teler.
- Handen, schoenen en kleding:
 - Per perceel handen wassen, daarna handen ontsmetten (methode A) of wegwerphandschoenen gebruiken.
 - Gebruik laarzen met gladde zool. Verwijder grond en plantresten van schoeisel. Medewerkers en bezoekers dienen schoongemaakt en ontsmette laarzen (methode B) of wegwerp laarshoezen te gebruiken als ze velden betreden. Als laarshoezen kapot gaan, nieuwe gebruiken. Voor het betreden van kassen is een ontsmettingsmat waar men niet omheen kan aan te raden (methode B).
 - Per perceel plastic overhoezen voor schoeisel of ontsmet schoeisel (methode B) gebruiken. Als alternatief kan voor personeel per perceel schone laarzen ondersteboven op paaltjes gezet worden.
 - Personeel moet schone kleding gebruiken dat niet in contact is geweest met andere werkkleding of materiaal dat mogelijk besmet is.
 - Speciale jassen of overalls voor bezoekers (eventueel wegwerp)
 - Regenjassen regelmatig ontsmetten (methode E) (per perceel en per dag)
 - Plaats een ontsmettingsbak bij de bedrijfsingang waar men niet om heen kan (methode B).
- Beregening
 - Voorkom preventieve nachtvorstberegening.
 - Alleen nachtvorstberegening als het echt gaat vriezen.
 - Hoge sproeiers of haspel gebruiken voor beregening.
 - Als alternatief kunnen druppelslangen of T-tape gebruikt worden. Hierbij minder spatwater, waardoor een eventuele besmetting zich minder snel verspreidt.
- Gewashandelingen
 - Planten niet dompelen. Eventueel wel van bovenaf besproeien indien nodig.
 - Machines (rooier, planter, tractoren, karren) dienen schoongemaakt en ontsmet te worden na gebruik wanneer van het ene veld naar het andere veld gegaan wordt (methode C). Zeker nadat vruchtproductievelden bewerkt zijn.
 - Ook machines van loonwerkers laten reinigen en ontsmetten (methode C).
 - Maaien, afranken en verwijderen van bloemen, alleen als gewas droog is.
 - Bij maaien van visueel niet besmette planten, bij voorkeur blad opvangen. Visueel besmette planten niet maaien!!
 - Voorkom zoveel mogelijk de verspreiding van plantafval. Verwijder harde plantresten.
- Verwijderen van aangetaste en verdachte planten
 - Inspecteer regelmatig planten op mogelijke symptomen.
 - Verwijder besmette planten en een buffer van planten daar omheen (1-2 m²).
 - Verwijder besmette planten in afgesloten zakken.
 - Was na verwijderen van besmette planten handen grondig met zeep en indien kleding in aanraking is gekomen met verdacht besmet plantmateriaal de kleding uittrekken en wassen op hoge temperatuur (minimaal 70°C met wasmiddel).



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

- Na verwijderen van aangetaste planten, bewuste plek markeren en in de gaten blijven houden of er niet meer aantastingen bij gekomen zijn. Zoja, dan deze ook verwijderen.
- Indien om bepaalde redenen besmette planten niet verwijderd kunnen worden, deze dan afzetten en bij gewashandelingen als laatste betreden. Na afloop wegwerphandschoenen weggooien of handen ontsmetten en overlaarzen weggooien of schoeisel ontsmetten. Als kleding in aanraking is gekomen met besmet materiaal, deze apart leggen en wassen.
- Onderwerken van plantresten zonder aantasting
 - Omhoog werken van achtergebleven rhizomen.
 - Bij voorkeur harde plantresten verwijderen.
 - Achtergebleven plantresten kunnen gehakseld en geklepeld worden. Daarna goed onderwerken, zodat plantmateriaal met besmetting snel verteert. Zorg voor een goed bodemleven zodat plantmateriaal beter verteert.
- Gewasbescherming
 - Onkruiden verwijderen of bestrijden.
 - Ziekten en plagen bestrijden.
 - Gaas zetten als omheining van velden om te voorkomen dat dieren het perceel betreden.
 - Vogels zoveel mogelijk verjagen.
- Vervoeren en inpakken van plantmateriaal
 - Eenmalig fust gebruiken of bij meermalig fust ontsmetten (methode E).
 - Bij het inpakken van planten, regelmatig werkbladen ontsmetten (methode E)(éénmaal per dag).

Vruchtproductieteelt:

- Specifiek onbedekte teelt
 - Voorkom preventieve nachtvorstberegening.
 - Alleen nachtvorstberegening als het echt gaat vriezen.
 - Hoge sproeiers of haspel gebruiken voor beregening.
 - Als alternatief kunnen druppelslangen of T-tape gebruikt worden. Hierbij minder spatwater, waardoor een eventuele besmetting zich minder snel verspreidt.
 - Planten niet dompelen. Eventueel wel van bovenaf besproeien indien nodig.
- Specifiek voor bedekte teelt
 - Xanthomonas op het blad komt hier nauwelijks voor. Echter Xanthomonas kan via plantmateriaal wel in het rhizoom aantastingen veroorzaken. Deze planten vertonen groeiachterstand, kunnen verwelken en laten bruinverkleurde vaatbundelringen zien in het rhizoom.
- Werkvolgorde
 - De werkvolgorde van machines, bezoekers en medewerkers moet altijd in de richting zijn van laag risico (vermeerdering/wachtbedden) naar hoog risico (vruchtproductie). Als laatste dienen besmette percelen betreden te worden.
- Bezoekers en medewerkers:
 - Medewerkers en bezoekers dienen van tevoren handen te wassen met zeep als ze velden, kassen of werkruimtes betreden (methode A).
 - Bezoekers dienen schoeisel te ontsmetten of speciale bezoekerslaarzen van het bedrijf aan te trekken (methode B).



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

- Iedereen die verschillende percelen betreedt zijn mogelijke besmettingsbronnen, inclusief de teler.
- Handen, schoenen en kleding:
 - Per perceel handen wassen (bij aangetaste planten, ook handen ontsmetten (methode A))
 - Per perceel schoeisel schoonmaken (bij aangetaste planten, ook schoeisel ontsmetten (methode B))
 - Personeel moet schone kleding gebruiken dat niet in contact is geweest met materiaal dat mogelijk besmet is.
 - Speciale jassen of overalls voor bezoekers (eventueel wegwerp)
 - Regenjassen regelmatig ontsmetten (per perceel en per dag na gebruik) (methode E).
- Gewashandelingen
 - Machines (rooier, planter, tractoren, karren) dienen schoongemaakt en ontsmet te worden na gebruik wanneer van het ene veld naar het andere veld gegaan wordt (methode C). Zeker nadat vruchtproductievelden bewerkt zijn.
 - Ook machines van loonwerkers laten reinigen en ontsmetten (methode C).
- Verwijderen van aangetaste en verdachte planten
 - Inspecteer regelmatig planten op mogelijke symptomen.
 - Verwijder altijd aangetaste planten en een kleine buffer van planten daaromheen (1-2 m²).
 - Verwijder besmette planten in afgesloten zakken.
 - Was na verwijderen van besmette planten handen grondig met zeep en indien kleding in aanraking is gekomen met verdacht besmet plantmateriaal de kleding uittrekken en wassen op hoge temperatuur (minimaal 70°C met waspoeder).
 - Na verwijderen van aangetaste planten, bewuste plek in de gaten blijven houden of er niet meer aantastingen bij gekomen zijn. Zoja, dan deze ook verwijderen.
 - Indien om bepaalde redenen besmette planten niet verwijderd kunnen worden, deze dan afzetten en bij gewashandelingen als laatste betreden. Na afloop handen ontsmetten (methode A) en schoeisel ontsmetten (methode B). Als kleding in aanraking is gekomen met besmet materiaal, deze apart leggen en wassen.
- Onderwerken van plantresten zonder aantasting
 - Voorkom zoveel mogelijk de verspreiding van plantafval.
 - Omhoog werken van achtergebleven rhizomen.
 - Bij voorkeur harde plantresten verwijderen.
 - Achtergebleven zachte plantresten kunnen gehakseld en geklepeld worden. Daarna goed onderwerken, zodat plantmateriaal met besmetting snel verteert. Zorg voor een goed bodemleven zodat plantmateriaal beter verteert.
 - Eventueel kan plantafval gecomposteerd worden. Al het besmette materiaal moet minimaal een paar dagen een temperatuur van 55-60°C bereikt hebben. Tijdens de compostering moet het plantmateriaal regelmatig gemengd worden.



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

- Gewasbescherming
 - Onkruiden verwijderen of bestrijden.
 - Ziekten en plagen bestrijden.
 - Gaas zetten als omheining van velden om te voorkomen dat dieren het perceel betreden.
 - Vogels zoveel mogelijk verjagen.

Middelen ter bestrijding van *Xanthomonas fragariae*:

Er zijn in Nederland geen toegestane chemische middelen die *Xanthomonas fragariae* afdoden in en op de plant. De middelen Aliëtte en Fungifend verhogen de weerstand van een plant en zouden besmettingen van *Xanthomonas* enigszins kunnen onderdrukken. Ervaringen hiermee van tuinders zijn wisselend. Alleen met ontsmettings- en reinigingsmiddelen kan de bacterie buiten de plant afgedood worden. Als deze toegepast worden binnen een hygiëneprotocol kan verspreiding van de bacterie op het bedrijf voorkomen of afgeremd worden. Met schoon schoonuitgangsmateriaal en goede hygiëne kan zoveel mogelijk voorkomen worden dat besmettingen optreden.

Quarantaine-status

Omdat op *Xanthomonas fragariae* een quarantaine-status van toepassing is, dient er wanneer planten verdacht zijn van een besmetting met *Xanthomonas*, de Plantenziektkundige Dienst (PD) ingelicht te worden (meldplicht). Bij besmettingen in de vermeerdering zullen door de PD en NAK maatregelen opgelegd worden. Betreffende besmettingen in de vruchtproductieteel wordt in de praktijk geen actie ondernomen door de PD. Wel wordt in het laatste geval geadviseerd om besmette planten en een buffer daaromheen te verwijderen.



Kan er *Xanthomonas*-vrij geteeld worden?

Besmettingen van *Xanthomonas* in het blad komen voornamelijk voor in de onbedekte teelt, in de volle grond. Ter voorkoming van *Xanthomonas*-besmettingen zou men kunnen overwegen om bedekt op stellingen te gaan telen. Dus in tunnels of shelters en dan bij voorkeur op stellingen of in de kas met goten. Bedekt telen voorkomt echter niet besmettingen in het rhizoom. Hiervoor geldt dat schoon uitgangsmateriaal en bedrijfshygiëne de enige oplossing is.

Verlagen van de totale infectiedruk in de hele sector is mogelijk door gedegen hygiënebeleid. Hoe lager de infectiedruk des te kleiner de kans op besmettingen. Na een paar jaar kan het probleem teruggedrongen worden tot enkele incidenten, maar dan wel met de voorwaarde dat iedereen zich volledig inzet voor een hygiënische aanpak, sectorbreed. Incidenten kunnen niet uitgesloten worden. Maar op deze manier zal het probleem wel beheersbaar worden.

In hooginfectieus gebied blijven incidentele besmettingen onoverkomelijk door medewerkers, bezoekers, dieren en overwaaien van plantresten. Indien men de keuze heeft, verdient het de aanbeveling om de productieteelt en vermeerdering in gebieden plaats te laten vinden waar verder geen aardbeiplanten in de buurt zijn. Als daar gestart wordt met schoon uitgangsmateriaal, goede hygiëne en controle daarop, is de kans zeer klein dat daar besmettingen optreden.

Bij plantenkwekers wordt er standaard twee jaar vermeerderd in luisdichte kassen en twee jaar in onbedekte teelt. De laatste tijd bestaat er vanuit de markt steeds meer vraag naar EE-materiaal dat direct ingezet wordt als vruchtproductieplant, dat betekent dat het laatste vermeerderingsjaar er steeds vaker uitgaat. Uiteraard vermindert dit de kans op ziektes die via handelingen in de vegetatieve vermeerdering overgedragen kunnen worden, zoals *Xanthomonas*.

Belangrijk bij een hygiëneprotocol is de controle daarop. Procedures moeten in kaart gebracht worden en er moet op toegezien worden dat hygiënische maatregelen daadwerkelijk worden uitgevoerd. Om te controleren of er toch geen besmettingen opgetreden zijn die nog niet visueel zichtbaar zijn, is een gevoelige en snelle toets onontbeerlijk. Hiervoor is de hier ontwikkelde PCR-toets uitermate zeer geschikt.

Waarde van de ontwikkelde PCR-toets

Vanwege de Q-status op *Xanthomonas fragariae* in vermeerderingsmateriaal heeft dit consequenties voor officiële toetsingen. Het vermeerderingsmateriaal behoort NAK-tuinbouw te toetsen onder verantwoordelijkheid van de PD met als basis het EPPO-protocol. De in dit project ontwikkelde PCR-toets kan wel gebruikt worden om in de vermeerdering en de productieteelt besmettingen op te sporen, maar heeft op dit moment geen officiële toetsingsstatus. Bij verdenking op basis van deze PCR geldt wel de meldingsplicht bij PD/NAK-tuinbouw. Zoals eerder vermeld heeft de hier ontwikkelde PCR-toets zijn meerwaarde in de gevoeligheid en de snelheid. Praktisch gezien kan dus eerder actie ondernomen worden om besmettingen te verwijderen en terug te traceren naar de besmettingsbron en eventueel extra hygiënische maatregelen te treffen om de verspreiding van de bacterie een halt toe te roepen.



4 CONCLUSIES

De PCR-toets:

- De hier ontwikkelde PCR-toets voor *Xanthomonas fragariae* is specifiek, gevoelig en snel (3 werkdagen)
- Visueel niet-zichtbare infecties zijn aantoonbaar met deze PCR-toets.
- De PCR-methode is gevoeliger dan de huidige methode van bacterie-isolatie en immunofluorescentie microscopie maar kan (nog) niet als vervanging hiervan worden gebruikt.

Experimenten:

- De bacterie overleeft één tot twee weken gedroogd op verschillende materialen.
- De bacterie kan overwintering overleven in harde plantresten die in de grond zijn ondergewerkt.
- De bacterie overleeft niet een behandeling van 10 minuten bij 70°C.
- De geteste ontsmettingsmiddelen zijn effectief als de instructies van de fabrikant opgevolgd worden.

Hygiëneprotocol:

- Het hier ontwikkelde hygiëneprotocol kan gebruikt worden ter ondersteuning van de bedrijfshygiëne bij vermeerderaars en vruchtproductietelers.
- Schoon uitgangsmateriaal en hygiëne zijn belangrijk om besmettingen te voorkomen.
- De PCR-toets kan dienen ter ondersteuning van de hygiënische maatregelen.

5 AANBEVELINGEN

- Detectie van de bacterie staat of valt bij de keuze van bemonstering van het bladmateriaal. Bij andere instanties is onderzoek gaande die hier meer inzicht in zullen geven.
- Om het hygiëneprotocol sectorbreed te implementeren zal voorlichting gegeven moeten worden naar telers en vermeerderaars. De vorm waarin zal besproken worden met de opdrachtgevers.
- Voor het verspreiden van het hygiëneprotocol dient er afstemming plaats te vinden met de hygiënerichtlijnen uit het eliminatiescenario voor *Xanthomonas fragariae* van de PD.



6 LITERATUUR

1. **Kennedy BW & King TH** (1962) Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* sp. nov. *Phytopathology* **52**, 873-875.
2. **Kennedy BW & King TH** (1962) Studies on epidemiology of bacterial angular leaf spot of strawberry. *Plant Disease Reporter* **46**, 873-875.
3. EPPO protocol *Xanthomonas fragariae* (2006) EPPO Bulletin **36**, 135–144.
4. Vernieuwd Hygiëneprotocol Tomaat (2007) GAC, LTO Groeiservice, NAK-T en WUR Glastuinbouw). www.groeiservice.nl.
5. Informatie over *Xanthomonas fragariae* in aardbeien. Plantum. NL. http://www.plantum.nl/pdf/informatieset_aardbei.pdf
6. “Code of Practice for Angular leaf spot (*Xanthomonas fragariae*) Advice on hygiene measures for PHPS soft fruit propagation nurseries (2004) Defra UK, Plant Health.
7. **Pooler MR, Ritchie DF & Hartung JS** (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.
8. **Roberts PD, Jones JB, Chandler CK, Stall RE & Berger RD** (1996) Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *PlantDisease* **80**, 1283–1288.
9. **Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT & de Bruijn FJ** (1994) Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovar and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2286–2295.
10. **Maas JL** (redacteur) (1998) Compendium of strawberry diseases. 2nd edition. The American Phytopathological Society, St. Paul, USA.

Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Bijlage 1 Lijst geteste isolaten

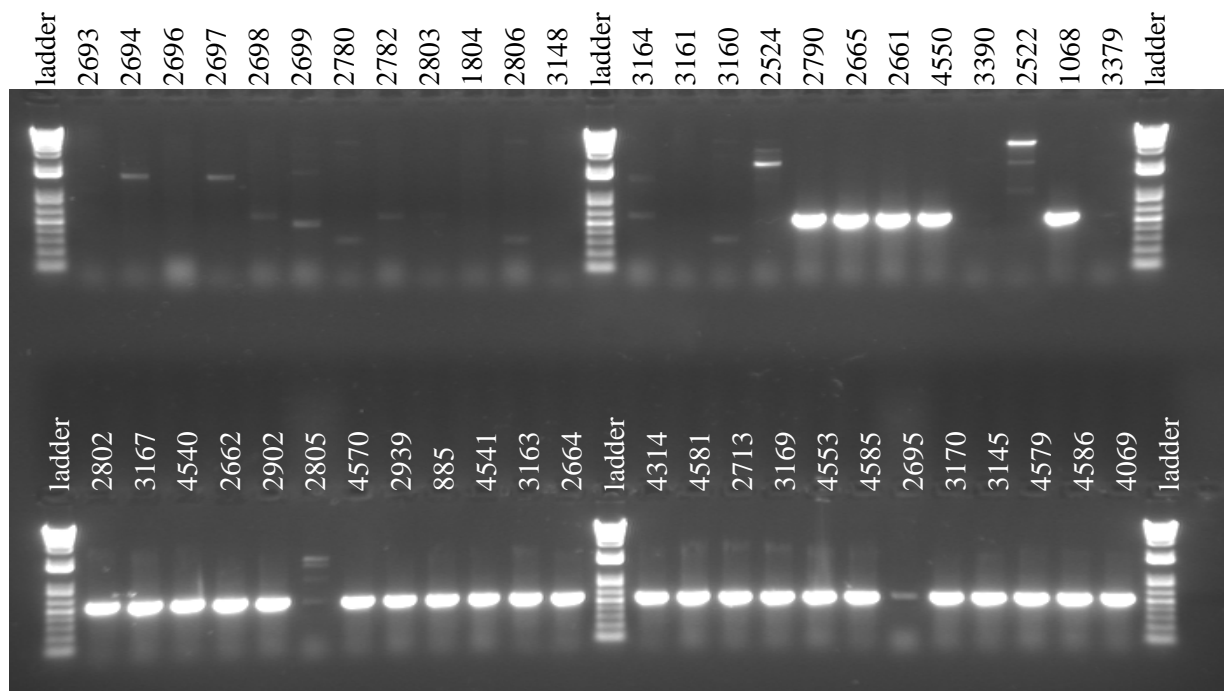
Geel-gemarkeerd, *X. arboricola fragariae*; rood-gemarkeerd; serologische kruisreagerende xanthomonaden en saprophyten van aardbei. Niet-gemarkeerd, *X. fragariae* isolaten. PCR resultaten met de primers van Pooler en van Roberts zijn weergegeven: +, positieve reactie; zw+, zwakke reactie; zzw+, zeer zwakke reactie.

PD nummer	Naam	Pooler	Roberts	Afkomst Jaar	PD nummer	Naam	Pooler	Roberts	Afkomst Jaar
885	<i>X.frag</i>	+	+	USA 1960	3155	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997
2522	<i>Xanthomonas</i>	+	zww+	Italië 1994	3156	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997
2524	<i>Xanthomonas</i>	+	zw+	Italië 1994	3157	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997
2659	<i>X.frag</i>	+	+	USA 1962	3158	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997
2660	<i>X.frag</i>	+	+	N. Zeeland 1972	3159	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997
2661	<i>X.frag</i>	+	+	Australië 1975	3160	<i>Xanthomonas</i>	+	+	Frankrijk 1997
2662	<i>X.frag</i>	+	+	Griekenland 1979	3161	<i>Xanthomonas</i>	+	+	Frankrijk 1997
2663	<i>X.frag</i>	+	+	Griekenland 1979	3163	<i>X.frag</i>	+	+	Italië
2664	<i>X.frag</i>	+	+	USA 1966	3164	<i>X.arbo</i>	+	+	Frankrijk 1997
2665	<i>X.frag</i>	+	+	Italië 1972	3165	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997
2693	<i>X.frag</i>	-	-	Italië 1994	3167	<i>X.frag</i>	+	+	Spanje 1997
2694	<i>X.arbo</i>	+	+	Italië 1994	3168	<i>X.frag</i>	+	+	Z. Amerika 1997
2695	<i>X.arbo</i>	+	zww+	Italië 1994	3169	<i>X.frag</i>	+	+	? 1996
2696	<i>X.arbo</i>	+	+	Italië 1994	3170	<i>X.frag</i>	+	+	? 1996
2697	<i>X.arbo</i>	+	+	Italië 1994	3171	<i>X.frag</i>	+	+	? 1996
2698	<i>X.arbo</i>	+	+	Italië 1994	3379	<i>Xanthomonas</i>	+	zww+	? 1998
2699	<i>X.arbo</i>	+	+	Italië 1994	3390	<i>Xanthomonas</i>	+	zww+	? 1998
2713	<i>X.frag</i>	+	+	Italië 1995	4068	<i>X.frag</i>	+	+	? 1996
2780	<i>X.arbo</i>	+	+	Italië 1996	4069	<i>X.frag</i>	+	+	Portugal 1996
2782	<i>X.arbo</i>	+	+	Italië 1996	4070	<i>X.frag</i>	+	+	Portugal 1996
2790	<i>X.frag</i>	+	+	Argentinië	4314	<i>X.frag</i>	+	+	USA 1960
2802	<i>X.frag</i>	+	+	Z. Amerika	4540	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
2803	<i>X.arbo</i>	+	+	Italië 1996	4541	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
2804	<i>X.arbo</i>	+	+	Italië 1996	4550	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
2805	<i>X.arbo</i>	+	zww+	Italië 1996	4553	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
2806	<i>X.arbo</i>	+	+	Italië 1996	4554	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
2895DP	<i>X.frag</i>	+	+	Portugal 1996	4555	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
2902	<i>X.frag</i>	+	+	Brazilië 1977	4558	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
2905DP	<i>X.frag</i>	+	+	Portugal 1996	4570	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
2938DP	<i>X.frag</i>	+	+	Portugal 1996	4571	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
2939	<i>X.frag</i>	+	+	? 1996	4572	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
3143	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997	4574	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
3144	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997	4575	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
3145	<i>X.frag</i>	+	+	Spanje 1997	4576	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
3146	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997	4579	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
3147	<i>X.frag</i>	+	+	Frankrijk 1997	4580	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
3148	<i>Xanthomonas</i>	+	+	Frankrijk 1997	4581	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
3149	<i>X.frag</i>	+	+	Griekenland 1997	4582	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
3150	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997	4584	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
3151	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997	4585	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
3152	<i>Xanthomonas</i>	+	+	USA 1997	4586	<i>X.frag</i>	+	+	NL 2003
3153	<i>X.frag</i>	+	+	Griekenland 1997					

Bijlage 2 PCR-resultaten isolaten van *X. fragariae*

Resultaten met de Pooler-PCR van isolaten van *X. fragariae*, aardbei-saprofyten en serologisch kruisreagerende Xanthomonaden. Pijl in Fig 1a geeft het product van primers 241A/B aan (ongeveer 550 basenparen). Nummers komen overeen met de isolaatnummers uit Bijlage 1.

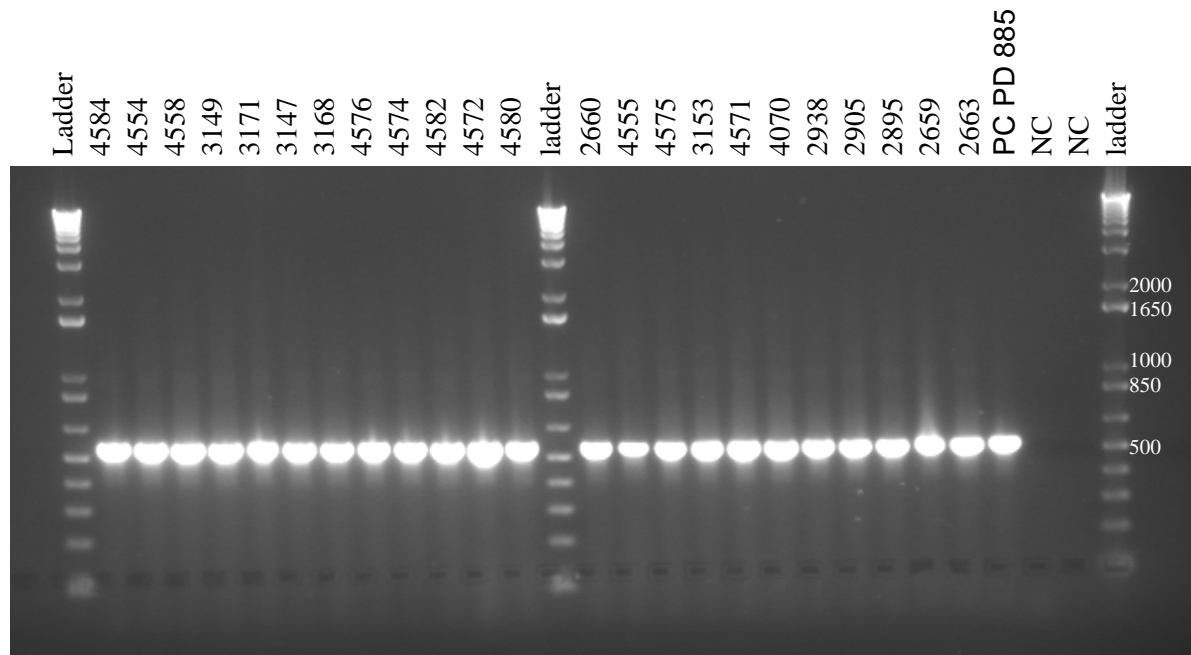
1A



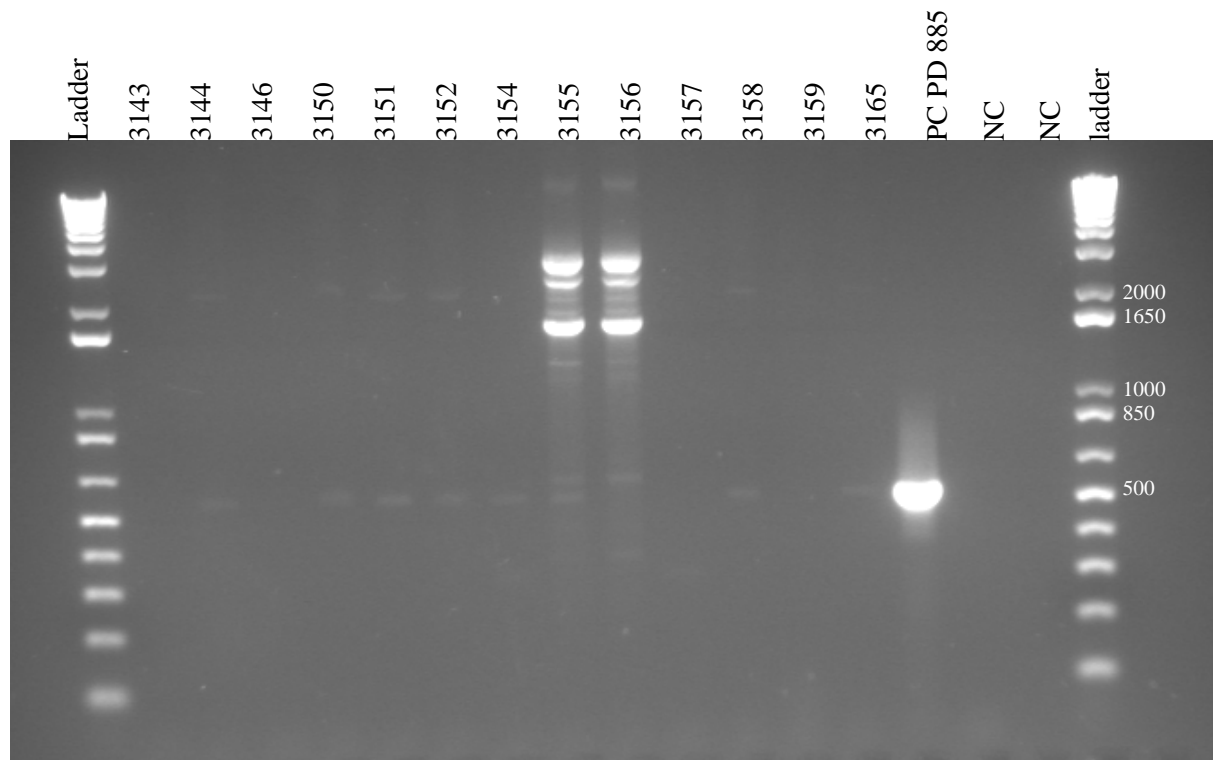


Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

1B



1C



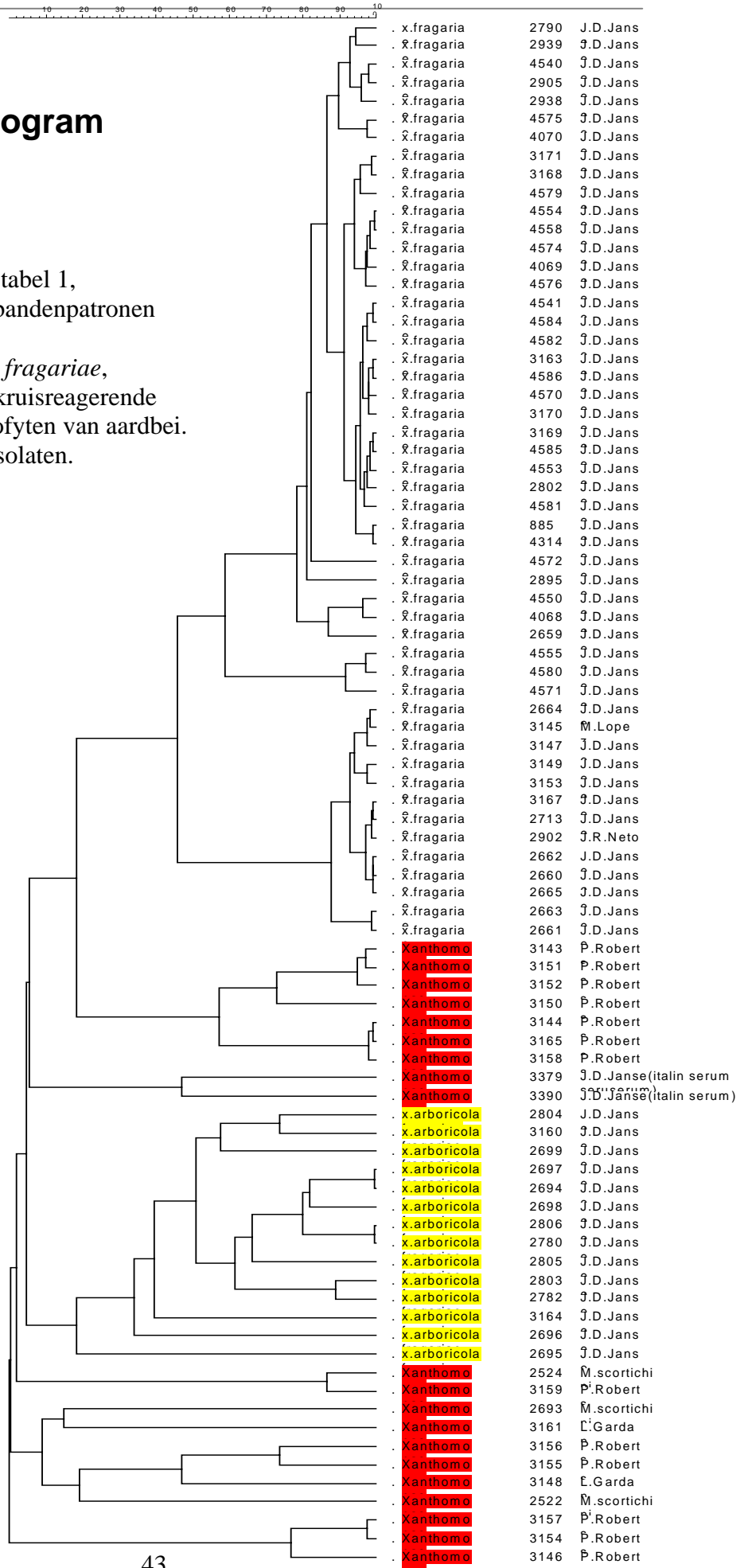


Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Bijlage 3 Dendrogram

Dendrogram van de isolaten uit tabel 1, op basis van cluseranalyse van bandenpatronen gegenereerd met Rep-PCR.

Geel gemarkeerd; *X. arboricola fragariae*, rood gemarkeerd; serologische kruisreagerende xanthomonaden en saprophyten van aardbei. Niet gemarkeerd; *X. fragariae* isolaten.





Bijlage 4 Inventarisatie hygiënemaatregelen bedrijven

Vermeederaars

Bedrijf 1:

- Uitgangsmateriaal SEE opgekweekt tot SE1 en SE2 in luisdichte kassen.
- SE1 en SE2 jaarlijks nieuw perceel met geen aardbeihistorie.
- EE en E bij voorkeur op percelen maximaal eens in de vijf jaar met aardbeihistorie. In praktijk vaak twee jaar achtereenvolgend op hetzelfde perceel en daarna zes jaar geen aardbeiplanten.
- Al het uitgangsmateriaal eerst op quarantaineveld. Als alle toetsen negatief zijn, gaan planten naar vermeerderingskassen.
- NAK-tuinbouw toetst steekproefsgewijs de tabletten met SEE-planten.
- Mogelijke invalspoorren worden getoetst.
- Ontsmettings-/reinigingsmiddel: Clarmarin 51 (azijnzuur, peroxide en katalysator)
- Machines en gereedschap worden van perceel naar perceel ontsmet. Wielen worden schoon gespoten en ontsmet.
- Apart ontsmet schoeisel voor medewerkers en bezoekers.
- Nieuwe handschoenen per perceel voor veldwerkzaamheden.
- Bezoekers blijven in de regel in de auto bij het bezoeken van de velden.
- Hoog geïncubatie plantmateriaal mag niet bezocht worden door bezoekers.
- Moederplanten worden weggefreest voor het rooien van dochterplanten.
- Blad wordt gemaaid en blijft achter en wortelresten blijven achter.
- Na rooien harde plantresten verwijderen.
- Maaien van planten en verwijderen van bloemen is riskant vanwege het verder verspreiden van eventuele besmettingen. Maar deze handelingen moeten wel uitgevoerd worden in de vermeerdering.
- Alleen éénmalig fust wordt gebruikt, dus niet retour van klanten.
- Beregening gebeurt bovenaf, maar ook met druppelstralen.



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Bedrijf 2:

- Percelen:
 - o Uitgangsmateriaal SEE opgekweekt tot SE1 en SE2 in luisdichte kassen
 - o In luisdichte kas een sluis bij ingang.
 - o 2 jaar vermeerdering in luisdichte kas (SE1 en SE2), gevolgd door 1 jaar vermeerdering onbedekt (EE). Steeds minder 2^e jaar vermeerdering onbedekt (E).
 - o Meeste vermeerderings- en wachtbedvelden zijn een aantal kilometer van hoofdbedrijf gelegen. Ze zijn zoveel mogelijk uit de buurt van productietelers. De verschillende percelen zelf zijn ook weer duidelijk van elkaar gescheiden.
- Werkvolgorde:
 - o Personeel werkt begin van de week op gevoelige percelen
- Ontsmettingen:
 - o Ontsmettingsmiddel: Jet-5 (azijnzuur en peroxide)
 - o Eerst materiaal reinigen, daarna ontsmetten met Jet-5
 - o Gereedschap en machines ontsmetten met Jet-5 voordat perceel betreden wordt.
 - o Na rooien van wachtbed, harde plantdelen verwijderen. Zoveel mogelijk gewasafval verwijderen. Wortels en enkele bladresten laten verteren.
- Kleding, schoeisel, handen
 - o Plastic wegwerphoezen voor over de laarzen of schoenen van bezoekers.
 - o Personeel draagt altijd handschoenen. Wegwerphandschoenen voor personeel. Enkele paren per dag. Tussen partijen nieuwe handschoenen.
 - o Personeel geen overschoenen, meestal eigen schoenen.
 - o Geen overalls voor bezoekers.
- Teeltwerkzaamheden:
 - o Alleen beregening als dat nodig is. Geen druppelslangen, omdat beregenen helpt bij het vast laten liggen van de wortels.
 - o Planten worden niet meer gedompeld. Wel van bovenaf besproeid.
 - o Haspel raakt planten niet. Rivier- en grondwater wordt gebruikt voor beregening.
 - o Houten kuubskisten voor het rooien worden niet ontsmet. Voorheen bij bekende besmette percelen, werden kisten wel ontsmet.
 - o Plantmachine wordt per partij ontsmet.
 - o Onkruiden worden bestreden.
 - o Insectenbestrijding alleen na waarnemingen in gewas.
 - o Tunnels worden nooit ontsmet. Ook nooit besmetting geconstateerd.
 - o Tussen percelen wordt ontsmet (na maaien, afranken, rooien)
 - o Meermalig fust wordt met water uitgespoten.
 - o Bij inpakken planten Frigo en moederplanten, worden regelmatig werkbladen en fust ontsmet.



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Productietelers

Bedrijf 1:

- Vermeerdering, wachtbedden
 - Tot en met 2005 zelf vermeerderd en planten uit laten groeien op wachtbedden. Vruchtproductiepercelen en vermeerderings- en wachtbedvelden aaneengesloten.
 - In 2005:Uitgangsmateriaal EE-materiaal (moederplanten) opkweken op verst weggelegen perceel.
 - In 2005: Wachtbedden ook op verst weggelegen perceel.
 - Wachtbedpersoneel komt niet bij oogstplanten
 - Bij knippen/afranken, 3x indien gewas droog is, verdachte hoek als laatste.
 - Maaien, 1-3 weken voor oprooien; niet direct in koelcel.
 - Loonwerker eerst schoonspuiten, dan ontsmetten met rugspuit.
 - Rooien, alleen machine, machine wordt ontsmet.
 - Voor inpakken geen nieuwe handschoenen.
 - Beregening van bovenaf met bronwater.
 - Vermeerdering, slechte planten worden niet verwijderd.
 - Ontsmettingsmiddel: Jet-5.
 - In 2006: productieplanten direct aankopen bij bedrijven die gespecialiseerd zijn in het vermeerderen van aardbeiplanten.
 - Geen extra maatregelen voor bezoekers. Wel laarzen voor een aantal voorlichters.
- Voor productieteelt
 - grond gekeerd.
 - Elke twee jaar wordt grond geanalyseerd op aaltjes / Verticillium
 - Wordt geen rekening met windrichting.
 - Beregening bovenaf met bronwater
 - Onderdrukken van Xanthomonas met Fungifend.
 - Slechte planten worden niet verwijderd.
- Algemeen
 - Laarzen worden ontsmet
 - Regenpak ontsmet met Jet-5
 - Gereedschap en machines, eerst met water afsprengen, dan drogen, daarna 1% Jet-5.
 - Logische werkvolgorde niet realiseerbaar gedurende week, wel op de dag.
 - Advies van GAC: banden ontsmetten, niet direct weer land op, min. 2 min inwerkingsduur beter.
 - Nachtvorstberegening verergert Xanthomonas-probleem. Dit zo veel mogelijk voorkomen. Alternatief stellingen, daar geen Xanthomonas problemen.
 - Sproeiers op 25 cm, niet door plant heen spuiten.



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

Bedrijf 2:

- Uitgangsmateriaal EE-materiaal (moederplanten) opkweken op geïsoleerd perceel (aantal kilometer verwijderd van productiepercelen)
- Wachtbedden ook op geïsoleerd perceel, naast oude opkweek moederplanten.
- Ontsmettingsmiddel: Jet-5
- Maximaal twee jaar op één veld vermeerdering.
- Aangetaste planten verwijderen.
- Na rooien, harde plantdelen verwijderen.

Bedrijf 3:

- Uitgangsmateriaal EE-materiaal (moederplanten) opkweken op verst weggelegen perceel.
- Wachtbedden op verst weggelegen perceel van erf.
- Ontsmettingsmiddel: Jet-5
- Fungifend om verspreiding te onderdrukken
- Planten in kas die wegwijnden verwijderen (*Xanthomonas* in het rhizoom)
- Vruchtproductievelden liggen naast wachtbedden.

Bedrijf 4:

- Wachtbedden
 - Geen vermeerdering, wel wachtbedden
 - Eigen vermeerderingsveld opgeruimd.
 - Wachtbedplanten aankopen.
 - Plaatsing van wachtbed achterin bij aangesloten percelen van productie en vermeerdering. Belangrijkste: schoon uitgangsmateriaal, 100% schoon materiaal, zuiver de koelcel in. Wachtbed steeds ander plek.
 - Wachtbed 2004, lichte besmetting in wachtbed.
 - Wachtbedden altijd in de wind
 - Plantmachines voor plantmateriaal ontsmetten
 - Voor nieuw materiaal, schone kleding.
 - Geen extra ontsmetting handen of handschoenen.
 - Slechte planten, worden in plastic zak gedaan en gemerkt (wachtbedden)
 - Maaien alleen als het gewas droog is.
 - Bovenaf beregenen met bronwater
- Vruchtproductieteelt
 - Slechte planten worden niet verwijderd.
 - Voor oogsten hoeven handen niet ontsmet te worden.
 - 's-Ochtends beregenen, proberen zo kort mogelijk het gewas nat te laten, bovenaf met bronwater
 - als aantasting is waargenomen, met Fungifend bestrijden.
 - Nachtvorstberegening (om bloemen niet te laten bevriezen) zeer slecht, kort hierna grote uitbraak.
 - In 2005 en 2006, lichte problemen in productieteelt.
 - Sleëen ontsmetten.



Xanthomonas fragariae: monitoring en hygiëneprotocol

- Algemeen:
 - o Ontsmetten alleen met 5% Dettol
 - o Laarzen worden op veld ontsmet.
 - o Gereedschap en machines, stoomcleanen + 5% Dettol + overnacht laten staan (min. 12 uur)
 - o Werkvolgorde, jong naar oud.
 - o Schoonste perceel eerst spuiten. Dan spuit dag laten staan. Droog kan Xanthomonas niet tegen (kijk resultaten).
 - o Niet van besmet perceel naar schoon perceel.
 - o Perceel 1x ploegen en niet 2x ploegen. Eventueel besmet materiaal blijft onder.
 - o Bij lage sproeier, begin van ontsmetting bij sproeier. Bij hoge sproeier zie je niet direct dat besmetting bij sproeier begint.
 - o Ergste periode met besmettingen: bij nachtvorstberegening. Dus zoveel mogelijk geen nachtvorstberegening uitvoeren. Alternatief alarm bij dreigende vorst en dan pas beregenen. Alternatief: folie.
 - o Als loonwerker maait: machines ontsmetten met Jet-5.
 - o Logisch nadenken. Bacteriën lopen niet. Kunnen wel weggespoeld worden.
 - o Stroomdraden, gaas op afscheiding. Tegen dieren die besmetting met zich meedragen.
 - o Wind kan factor zijn.
 - o Tegen luis kritisch.
 - o Aardbeizaad dat ontkiemt lijkt net onkruid. Mogelijke drager van Xanthomonas.
 - o Regenkleiding plukkers en planters gescheiden houden.
 - o Schone laarzen.
 - o Ontsmettingsmiddel: Dettol (chloroxylenol)
 - o Spuiten op de laarzen (5% Dettol)
 - o Na ontsmetten materiaal, minimaal 12 uur wachten (??)
 - o Alleen afranken als gewas droog is!
 - o Wachtbedplanten in december kartelmesjes, geen loonwerker.
 - o Elk bed messen ontsmetten.
 - o Fungifend onderdrukt.
 - o Planten in productie die besmet zijn worden niet verwijderd. In wachtbed wel.
 - o T-tape of sproeiers omhoog brengen. In ieder geval niet de sproeier door plant heen.