



Risico op verspreiding van *Xanthomonas* tijdens CATT aardbeiplanten

Bert Evenhuis¹, Jan van der Wolf², Pieter Kastelein², Marjon Krijger²,
Odette Mendes², Els Verstappen², Els Otma³,
Gijs van Kruistum¹ & Jan Verschoor³



Risico op verspreiding van Xanthomonas tijdens CATT aardbeiplanten

Bert Evenhuis¹, Jan van der Wolf², Pieter Kastelein², Marjon Krijger²,
Odette Mendes², Els Verstappen², Els Otma³,
Gijs van Kruistum¹ & Jan Verschoor³

¹Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR

²Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR

³Food & Biobased Research, onderdeel van Wageningen UR

© 2015 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, AGV

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Onderzoek gefinancierd door de Stichting aardbeionderzoek:



Projectnummer: 3250293000

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR
Business Unit AGV

Address : Postbus 16, 6700 AA Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : +31 320 29 35 55
Fax : +31 317 41 80 94
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	4
1 INLEIDING	6
2 MATERIAAL EN METHODEN	7
2.1 Plantmateriaal	7
2.2 CATT	8
2.3 Monsters	11
2.4 Monsterverwerking voor en na CATT	13
2.5 Natoets.....	14
3 RESULTATEN	15
3.1 Luchtmonsters	15
3.2 Xanthomonas-suspensies en bacterieslijm.....	16
3.3 Lekwater	18
3.4 Aardbeiplanten	20
3.4.1 Latent geïnfecteerde frigoplanten (B).....	20
3.4.2 Frigoplanten met vroege symptomen (C en F)	21
3.4.3 Uitwendig besmette frigoplanten (E)	21
3.4.4 Frigoplanten met gevorderde symptomen (D).....	22
3.4.5 Planten met vroege symptomen, geen frigo (G & H).....	22
4 DISCUSSIE EN CONCLUSIES	23
4.1 Discussie	23
4.1.1 Verspreiding door de lucht.....	24
4.1.2 Lekwater.....	24
4.1.3 Overleving in suspensie en op plaat.....	24
4.1.4 Verspreiding van Xanthomonas tijdens CATT	25
4.2 Conclusies en aanbevelingen	27
LITERATUUR.....	28

Samenvatting

Risico tijdens CATT op overdracht van *Xanthomonas* zeer gering

De belangrijkste conclusie uit het onderzoek naar de overdracht van *Xanthomonas* van plant naar plant tijdens CATT is dat dit risico uitermate klein is. Bij latent geïnfecteerd plantmateriaal werden geen aanwijzingen gevonden voor de verspreiding van *Xanthomonas* tijdens CATT. Dit suggereert dat in een partij zonder symptomatische planten het risico op verspreiding van *Xanthomonas* nagenoeg afwezig is. Werd zwaar besmet symptomatisch plantmateriaal blootgesteld aan CATT dan werd af en toe met de Bio-TaqMan een aanwijzing voor besmetting van doelplanten gevonden. Dit leidde overigens in geen van deze gevallen tot het daadwerkelijk isoleren van de *Xanthomonas* bacterie. Ook werd geen symptoomontwikkeling in de doelplanten waargenomen, nadat deze waren uitgeplant en nageteeld. Dit geeft aan dat hoewel verspreiding tijdens CATT niet geheel uit te sluiten is, het risico van infectie van *Xanthomonas*-vrije planten zeer klein is.

CATT

CATT van aardbei(moeder)planten is door PPO Lelystad en Food & Biobased Research (FBR) Wageningen UR in samenwerking met de branche organisatie Plantum ontwikkeld ter bestrijding van aardbeimijt (*Phytonemus pallidus*). Een gecontroleerde begassing en temperatuur behandeling (CATT) van planten is het alternatief tegen aardbeimijt sinds het verdwijnen in 2008 van de begassing van aardbeimoederplanten met methylbromide.

CATT wordt uitgevoerd onder warme (35°C) en vochtige omstandigheden. Daarnaast is er in de CATT kamer sprake van luchtcirculatie. Op het eerste gezicht ideale omstandigheden voor de verspreiding van *Xanthomonas fragariae*. Uiteraard is verspreiding, laat staan secundaire infectie, niet gewenst. De vraag is of CATT de verspreiding van *Xanthomonas* bevordert. Om dit te onderzoeken werden er in 2013 twee proeven uitgevoerd. Hierin kwam aan het licht dat het risico op verspreiding tijdens CATT zeer klein is. In deze proeven is gebruik gemaakt van vers plantmateriaal dat geen frigo periode had doorstaan. In de praktijk worden de meeste planten echter in het voorjaar behandeld. Naast de aardbeimijt CATT is er de Nema-CATT ontwikkeld. Bij deze behandeling worden de planten eerst 20 uur blootgesteld aan 35°C, gevolgd door 20 uur 40°C. In het vervolgonderzoek 2014-2015, gefinancierd door de Stichting Aardbei Onderzoek, is gekeken naar de verspreiding van *Xanthomonas* tijdens Nema-CATT. Ter vergelijking met het onderzoek van 2013 zaten in het huidige experiment ook objecten waarin planten behandeld werden met de aardbeimijt CATT.

Detectie

Voor detectie van *Xanthomonas* werden in het onderzoek vier verschillende (complementaire) methoden gebruikt. Via uitplaten (en vangplaten) worden de levende *Xanthomonas* bacteriën gekweekt en herkend, directe TaqMan toont het DNA van dode en levende bacteriën aan, Bio-TaqMan toont het DNA van levende bacteriën aan, via nateelt in de kas worden de symptomen zichtbaar die door *Xanthomonas* worden veroorzaakt.

Xanthomonas overleeft CATT nauwelijks in water, wel in de plant

In tegenstelling tot eerder onderzoek in 2013 overleefde *Xanthomonas* in waterige suspensie de aardbeimijt CATT in deze proef wel. Overigens was er wel een sterke afname van de vitaliteit. Bij de Nema-CATT werd geen overleving aangetoond. Uit een laboratorium proef bleek overigens dat die afname in de eerste 8 uur niet sterk was en daarna snel toenam. Hieruit blijkt duidelijk dat de omstandigheden tijdens CATT uiteindelijk vrijwel dodelijk zijn voor "onbeschermd" bacteriecellen. Werd de bacterie op een voedingsbodem blootgesteld aan CATT, dan was er wel een afname in vitale cellen maar zeker geen volledige afdoding. In de Nema-CATT was de afname sterker dan in de Aardbeimijt-CATT.

In plantmateriaal wordt de bacterie nog beter beschermd. Planten die besmet de aardbeimijt CATT in gingen, kwamen er ook besmet uit. De bacteriecellen die beschermd worden door de plant, worden bij de Aardbeimijt-CATT en de Nema-CATT niet gedood. Geconcludeerd kan worden dat als de *Xanthomonas* bacteriën een zekere mate van bescherming hebben (plant, bacterieslijm), deze de omstandigheden tijdens de duur van de CATT kunnen overleven.

CATT en verspreiding van Xanthomonas

Nu blijkt dat de aardbeimijt CATT Xanthomonas in besmet plantmateriaal niet doodt, blijft de vraag over of er kruisbesmetting plaats kan vinden. In theorie zou verspreiding veroorzaakt kunnen worden met lekwater, via de lucht en via spatwater. In lucht dat uit de CATT kamers stroomt, werden geen levende cellen van Xanthomonas gevonden. Op vangplaten in de CATT kamers werd in 2013 ook niets gevonden, maar in de huidige proef werd met de Bio-TaqMan 1 positieve plaat gevonden, wat suggereert dat er toch verspreiding van Xanthomonas kan optreden. Opvallend genoeg was dat in de Nema-CATT en niet in de aardbeimijt CATT.

In condenswater dat van geïnoculeerde bronplanten lekte, werd wel een geringe hoeveelheid Xanthomonas aangetroffen bij directe TaqMan-PCR. Het lukte echter niet om aardbeiplanten met dit lekwater succesvol te inoculeren. Ook de Bio-TaqMan gaf geen reactie. Dit suggereert dat de Xanthomonas in het lekwater niet vitaal was. Werde met een Xanthomonas-suspensie geïnoculeerd dan werden de planten wel ziek. Opvallend was wel dat de Bio-TaqMan bij de als negatieve controle met water geïnoculeerde planten een positief signaal gaf, hoewel de planten niet zichtbaar ziek werden.

Tijdens CATT lijkt het risico op horizontale verspreiding van Xanthomonas beperkt. Alleen bij bronplanten met het hoogste infectieniveau (symptomatisch necrotisch) was er in twee van de zes monsters van de doelplanten sprake van besmetting op basis van de Bio-TaqMan in de natoets zonder dat dit leidde tot symptomen. Bij materiaal dat geen frigo periode heeft doorstaan, was direct na de CATT de Bio-TaqMan positief bij 2 van de 8 monsters van doelplanten. Echter hier vonden we weer geen positieve uitslagen in de natoets.

Praktijktoepassing

In deze proeven is gebleken dat tijdens CATT de kans op kruisbesmetting met Xanthomonas in de praktijk zeer klein is, zeker in het licht van de andere handelingen op een praktijkbedrijf. In de proeven is een hoog niveau van besmetting aangebracht. Alleen bij symptomatisch besmet materiaal werd af en toe met de Bio-TaqMan een aanwijzing voor besmetting van doelplanten gevonden. Dit leidde overigens in geen gevallen tot het daadwerkelijk isoleren van de bacterie. Ook werd geen symptoomontwikkeling in de doelplanten waargenomen.

Bij latent geïnfecteerd materiaal werden geen aanwijzingen gevonden voor de verspreiding van Xanthomonas tijdens CATT.

1 Inleiding

CATT (Controlled Atmosphere Temperature Treatment) van aardbei(moeder)planten is door PPO Lelystad en Food & Biobased Research (FBR) Wageningen in samenwerking met Plantum ontwikkeld ter bestrijding van aardbeimijt. De vermeerderingsbedrijven passen deze duurzame en niet chemische ontsmettingsmethode inmiddels volop toe. CATT kan bij twee gespecialiseerde bedrijven, Ruvoma BV in Montfoort en Van Acht Koel- en Vriesopslag in Sint-Oedenrode, worden uitgevoerd. In december 2011 is door de Aardbeicommissie van NAK-Tuinbouw besloten om de behandeling zichtbaar te maken en vanaf 1 januari 2013 te vermelden op het Elite certificaat

Een aangepaste CATT met een 40 °C fase blijkt niet alleen tegen aardbeimijt werkzaam te zijn maar ook tegen de plantparasitaire aaltjes *P. penetrans* en *M. hapla* (Van Kruistum et al., 2011), hier verder aangeduid als Nema-CATT.

De omstandigheden waaronder CATT wordt uitgevoerd, worden gekenmerkt door warmte, vocht en luchtbeweging. Omstandigheden die mogelijk gunstig zijn voor de expressie en verspreiding van *Xanthomonas fragariae*. *Xanthomonas* is een quarantaine organisme. Indien de bacterie wordt aangetroffen in de plantopkweek dan moet het gewas worden geruimd. Het is duidelijk dat alle mogelijke maatregelen getroffen moeten worden om verspreiding van *Xanthomonas* te voorkomen.

Op verzoek van de aardbeiplantenkwekers vertegenwoordigd door NAK-Tuinbouw en Plantum is in 2013 onderzoek gedaan naar het risico op verspreiding van *Xanthomonas* tijdens CATT. Uit het onderzoek kwam naar voren dat de kans op verspreiding van *Xanthomonas fragariae* klein is (Evenhuis et al., 2014). In deze proeven werd gewerkt met plantmateriaal dat na inoculatie direct een CATT onderging. In wezen werd daarmee de behandeling gesimuleerd wanneer die in het najaar zou worden uitgevoerd met plantmateriaal dat rechtstreeks van het veld komt. In de praktijk wordt CATT veelal in het voorjaar uitgevoerd. Daarbij wordt plantmateriaal, dat vrijwel rechtstreeks uit de koelcel komt, behandeld. In opdracht van de Stichting Aardbei Onderzoek is een experiment uitgevoerd waarbij gekeken is naar de eventuele verspreiding van *Xanthomonas* tijdens een in het voorjaar uitgevoerde CATT.

De uitvoering vond plaats bij Wageningen UR onderdelen PRI, Unifarm en FBR onder vergunning TRCPD / 2009 / 1974. In het onderzoek gebruikt, *Xanthomonas*-geïnfecteerd plantmateriaal werd opgekweekt in PKM-II kassen van Unifarm, de behandeling van het plantmateriaal werd uitgevoerd in de CATT faciliteiten van FBR en de monsters werden verwerkt in ML-II labs van PRI. Na afloop van het experiment is al het plantmateriaal vernietigd.

2 Materiaal en methoden

2.1 Plantmateriaal

In de herfst van 2014 is buiten opgekweekt A+ plantmateriaal geïnoculeerd met *X. fragariae* om te dienen als infectiebron tijdens de CATT. Echter de inoculaties sloegen niet aan, dat wil zeggen er ontstonden geen symptomen. Als alternatief werd gebruik gemaakt van aardbeiplanten (Elsanta), in potgrond opgekweekt in de kas. Deze werden geïnoculeerd (Figuur 1). Inoculatie vond plaats door een *Xanthomonas*-suspensie op en onder de bladeren van individuele planten te vernevelen of door de bladeren van bundels planten te dompelen in *Xanthomonas*-suspensie. Inoculatie door vernevelen vond plaats op drie verschillende tijdstippen. Groepen planten werden vier weken, twee weken of één week voor verpakking t.b.v. frigo bewaring geïnoculeerd. Eén á 2 dagen voor deze verpakking werden de bladeren van nog een andere groep planten gedompeld in een *Xanthomonas*-suspensie. Op deze wijze werden er vier niveaus van infectiedruk gecreëerd. Voor de vergelijking met eerder onderzoek werd een deel van het plantmateriaal niet in de koude bewaring gezet, maar buiten gehouden tot hun inoculatie twee weken voor de CATT.

- A = gezonde frigoplanten: niet geïnoculeerd, geen CATT (25 kasplanten en 50 A+ planten)
- B = frigoplanten met latente infecties: geïnfecteerd plantmateriaal 1 week na inoculatie in de koeling, Nema-CATT (25 kasplanten; inoculatie op 11/11)
- C = frigoplanten met vroege symptomen van bladplekkenziekte: geïnfecteerd plantmateriaal 2 weken na inoculatie in de koeling, Nema-CATT (25 kasplanten; inoculatie op 5/11)
- D = frigoplanten met gevorderde symptomen van bladplekkenziekte: geïnfecteerd plantmateriaal ±4 weken na inoculatie in de koeling, Nema-CATT (25 kasplanten; inoculatie 7/10)
- E = frigoplanten met uitwendige besmetting: plantmateriaal gedompeld in *Xanthomonas*-suspensie en de dag daarna in de koeling, Nema-CATT (50 A+ planten; besmetting 2/12)
- F = frigoplanten met vroege symptomen van bladplekkenziekte: geïnfecteerd plantmateriaal 2 weken na inoculatie in de koeling, aardbeimijt CATT (25 kasplanten; inoculatie op 5/11); het plantmateriaal is hetzelfde als van C
- G = wachtbedplanten met vroege symptomen van bladplekkenziekte: geen frigo, geïnfecteerd plantmateriaal 2 weken na inoculatie, Nema-CATT (50 A+ planten warm zetten in december, inoculatie 9/1)
- H = wachtbedplanten met vroege symptomen van bladplekkenziekte: geen frigo, geïnfecteerd plantmateriaal 2 weken na inoculatie, aardbeimijt CATT (50 A+ planten, inoculatie 9/1); het plantmateriaal is hetzelfde als van G

Bovenstaand al dan niet met *Xanthomonas* geïnfecteerd of besmet plantmateriaal diende als bron voor infecties voor buiten opgekweekt A+ plantmateriaal dat diende als doelplanten. Het terugsnoeien van de bronplanten werd beperkter gedaan dan in de praktijk, om een maximale risico-situatie te creëren. Het uitgangspunt hierbij was zoveel mogelijk symptomatisch blad te sparen om tijdens de uitvoering van de CATT een 'worst case' scenario neer te zetten, voordat de behandelingen werden uitgevoerd. De doelplanten werden direct vanuit het A+ veld in de frigo-bewaring geplaatst.



Figuur 1. Planten met gevorderde symptomen (zwaar necrotisch), vroeg symptomatisch en latent geïnfecteerd, gebruikt voor de proeven.

2.2 CATT

CATT kan op 2 manieren worden uitgevoerd. De eerste methode (tegen aardbeimijt) die al in de praktijk wordt toegepast, is een behandelduur van 48 uur bij 35°C, een hoge relatieve luchtvochtigheid en 50% CO₂. Het risico op verspreiding van *Xanthomonas fragariae* tijdens de aardbeimijt CATT is al in eerdere experimenten onderzocht. Daarna is er een methode (zowel tegen aardbeimijt als tegen aaltjes) ontwikkeld waarbij de planten blootgesteld worden aan 20 uur 35°C gevolgd door 20 uur 40°C, eveneens bij hoge RV en 50 % CO₂. In de proeven is grotendeels gebruik gemaakt van de nieuwe CATT methode (CATT 35/40). De eerste methode (CATT 35) is daarnaast als referentie voor een beperkt aantal objecten meegenomen. Om de situatie in de praktijk na te bootsen is de CATT niet direct gestart bij 35°C, maar begonnen met 25°C. Na het inzetten van de planten is vervolgens de temperatuur omhoog gegaan.

Om luchtbeweging te simuleren zijn de CATT kamers uitgerust met een ventilator, waaraan ook nog een vernevelaar is toegevoegd om vrij vocht te creëren (Figuur 2).

De CATT methode is uitgevoerd in de onderzoeksfaciliteit van FBR (Figuur 3). De proef werd ingezet op 20 januari 2015. Achterin de CATT kamers werden eerst de vangplaten, potjes met bacteriesuspensie (Figuur 4) en de platen met bacterieslijm geplaatst. In het midden van de CATT kamers werden bundels van 15 doelplanten geplaatst. Tot slot werden de, afhankelijk van het aantal beschikbare planten, bundeltjes van 5 – 15 bronplanten voorin de kamer neergezet. Voor plaatsing in de CATT kamer waren de bronplanten vochtig gemaakt door water met een plantenspuit over de bladeren te vernevelen. De ventilatoren en vernevelaars werden voor de bronplanten bevestigd. Op 22 januari werd de behandeling beëindigd.

Met uitzondering van de categorie A bronplanten (gezonde frigoplanten) waren er twee CATT kamers beschikbaar per categorie bronplant.



Figuur 2. CATT kamer met op de voorgrond een ventilator en een vernevelaar.



Figuur 3. CATT kamers gebruikt bij de uitvoering van de proeven.



Figuur 4. Xanthomonas suspensie gebruikt voor de overleving tijdens CATT.

2.3 Monsters

Tijdens de uitvoering van de proef werden diverse monsters genomen. Tabel 1 geeft een overzicht van de op *Xanthomonas* getoetste zaken. De bemonstering van lucht vond plaats met vangplaten (aerosol vangplaat) en door geleiding van de lucht door wasflessen (aerosol suspensie Figuur 5). In tegenstelling tot de proeven in 2013 werden de wasflessen nu buiten de CATT faciliteit geplaatst in plaats van er in. Verder werd gekeken naar overleving van *Xanthomonas* in waterige suspensie (*Xanthomonas*-suspensie) en op voedingsbodem (*Xanthomonas*-slijm). Om eventuele verspreiding vast te stellen werd ook van bronplanten druipend water opgevangen (lekwater) en niet besmet plantmateriaal (doelplanten) in de CATT kamers gebracht. De geïnfecteerde of besmette bronplanten werden voor in de CATT kamer geplaatst in de luchtstroom van de ventilator. De doelplanten stonden midden in de CATT kamer achter de bronplanten met een ruimte van ongeveer 10 cm tussen bron- en doelplanten. De overleving van *Xanthomonas* in een suspensie is getoetst onder zowel CATT- als laboratorium-omstandigheden.

Tabel 1. Monsters getoetst op aanwezigheid van Xanthomonas

omschrijving	Voor CATT	na CATT 35	na CATT 35/40	Natoets	Voor frigo	Geen CATT
bronplant A (niet geïnoculeerd)	2			6	3	2
bronplant B (latent, 1 wk) ¹	2		2	6	3	
bronplant C (vroeg ziek, 2 wkn) ²	2		2	2	3	
bronplant D (bladvlekken, 4 wkn) ³	2		2	6	3	
bronplant E (besmet, 1 d) ⁴	2		2	6	3	
bronplant F (vroeg ziek, 2 wkn) ²		2		2		
bronplant G (besmet + vroeg ziek, 2 wkn) ⁵	2		2	5		
bronplant H (besmet + vroeg ziek, 2 wkn) ⁵		2		5		
aerosol vangplaat		6	8			
aerosol suspensie	1	4	12			
lekwater		1	1	2		
wand CATT kamer	5	2	3			
doelplant	7	8	20	47		3
<i>Xanthomonas</i> -slijm	3	2	4			3
<i>Xanthomonas</i> -suspensie	3	2	4			3

¹ bronplanten met latente infecties, geïnoculeerd 1 week voor de frigo periode

² bronplanten met water soaked lesions (vroeg symptomen van infectie), geïnoculeerd 2 weken voor de frigo periode

³ bronplanten met typische bladvlekken en slijmvorming, geïnoculeerd 4 weken voor de frigo periode

⁴ bronplanten uitwendig besmet door ze 1 dag voor de frigo periode te dompelen in een *Xanthomonas*-suspensie

⁵ bronplant met water soaked lesions (vroeg symptomen van infectie), geen frigo periode gehad, geïnoculeerd 2 weken voor de CATT

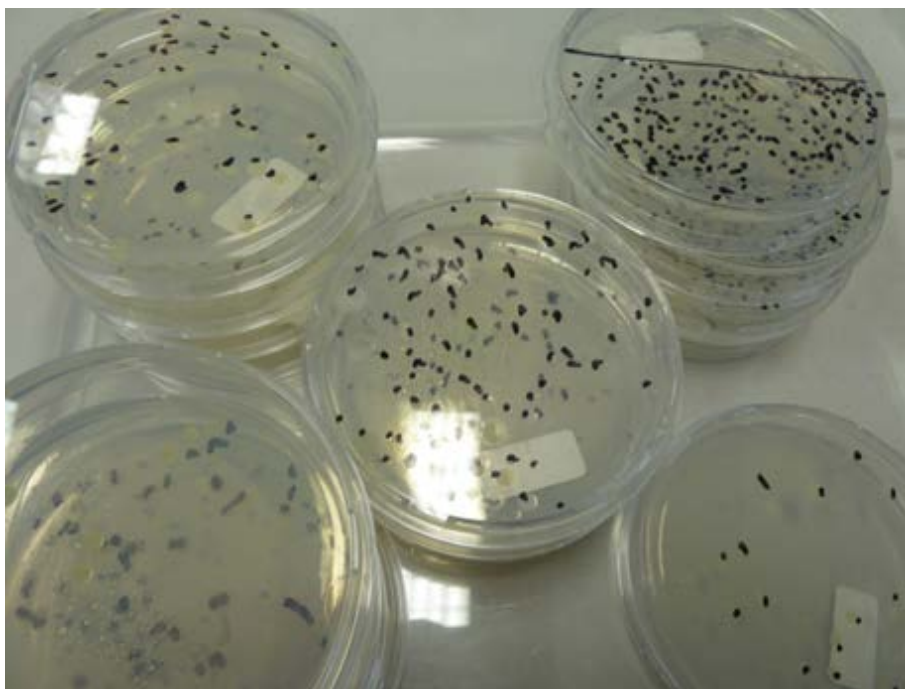


Figuur 5. Wasflessen, gebruikt om Xanthomonas in aerosolen in de lucht te detecteren.

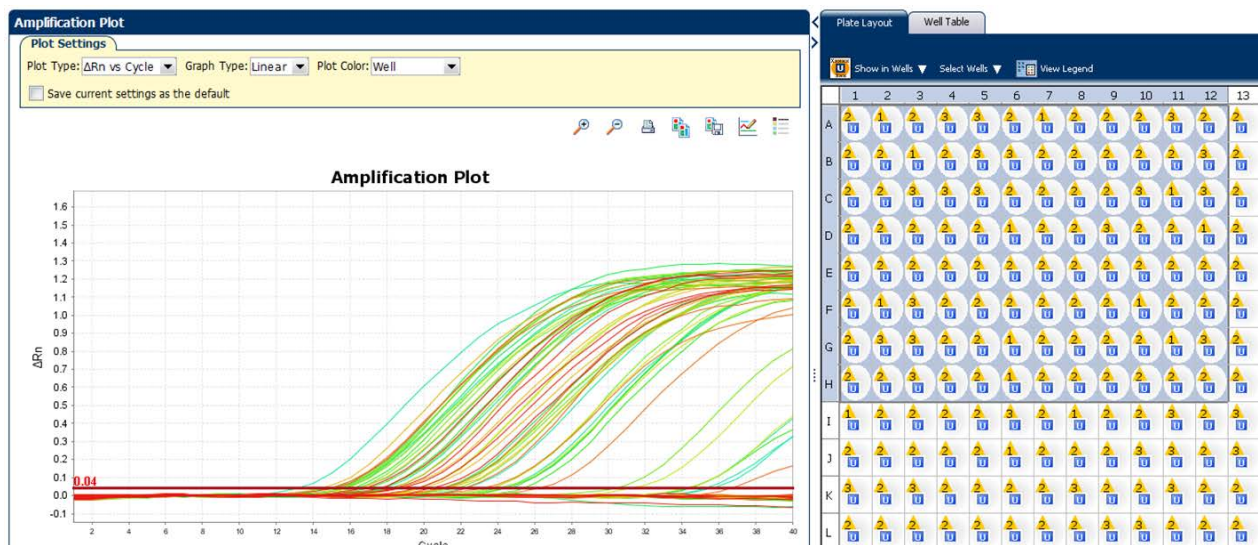
2.4 Monsterverwerking voor en na CATT

Van het bacterieslijm op de voedingsbodems (Xanthomonas-slijm) werd eerst een suspensie gemaakt met een dichtheid gelijk aan die van Xanthomonas-suspensies. Van de bacterieslijm-suspensies, Xanthomonas-suspensies, opgevangen lekwater en water van wasflessen werd 0.1 ml onverdund, 1:100 en 1:10000 verdund monster uitgeplaat op gemodificeerd R2A medium. Direct voor en direct na de CATT zijn mengmonsters bestaande uit elk 3 bron- of doelplanten verwerkt. Van deze monsters werden verdunningsreeksen van plantextracten uitgeplaat op gemodificeerd R2A medium. De extracten werden verkregen door de planten in BIOREBA extractiezakken met buffer tot moes te slaan. Van extracten van bronplanten werd 0.1 ml onverdund, 1:100 en 1:10000 verdund monster uitgeplaat. Bij doelplanten werd onverdund en 1:100 verdund monster uitgeplaat. Aan een deel van de opgewerkte monsters van de verschillende bemonsterde zaken werd verse Xanthomonas-suspensie toegevoegd ter controle op het uitplaten (Xanthomonas controle).

De platen werden 1 week geïncubeerd bij 25°C. Na incubatie werden de platen gescreend op aanwezigheid van Xanthomonas kolonies. Aan de hand van tellingen (Figuur 6) van Xanthomonas-achtige kolonies in geschikte zones van de platen werden de dichtheden van Xanthomonas in de monsters geschat. De uitplaatmethode is semi-kwantitatief en toont alleen levende cellen van bacteriën aan. Na het tellen werden de platen afgespoeld voor analyse met een Taqman-PCR assay. De analyse met TaqMan-PCR is nodig ter bevestiging van de aan- of afwezigheid van kolonies van Xanthomonas (Figuur 7). De combinatie uitplaten en Taqman-PCR assay wordt aangeduid als Bio-TaqMan.



Figuur 6. Platen met Xanthomonas-achtige kolonies geteld en gemarkeerd.



Figuur 7. Bio-TaqMan curves, de curves die voor de detectiegrens op lopen geven aan dat het monster besmet is met *Xanthomonas*.

2.5 Natoets

Per object werd een deel van de bron- en doelplanten na de gecontroleerde begassing en temperatuur behandeling (CATT) nog 3 weken verzorgd in een kas met een temperatuur van 20°C en een relatieve luchtvochtigheid van 75%. Deze klimaatomstandigheden zijn gunstig voor de ontwikkeling van *Xanthomonas* en de verzorgingsduur is lang genoeg om *Xanthomonas* tot expressie te laten komen na een infectie. Na afloop van de 3 weken werden de planten beoordeeld op aanwezigheid van symptomen van *Xanthomonas* en werd van elke plant een verdunningsreeks van plantextract uitgeplaat op gemodificeerd R2A medium. Op deze wijze werd getoetst of infectie van de doelplanten plaats heeft gevonden tijdens de CATT behandeling. Daarnaast werd getoetst of de geïnoculeerde bronplanten nog steeds besmet waren met *X. fragariae* na CATT.

3 Resultaten

3.1 Luchtmonsters

Tabel 2 laat zien dat er geen *Xanthomonas*-kolonies werden waargenomen op de aerosol vangplaten die achter in de CATT kamers stonden. Bij de Nema-CATT (CATT35/40) werd echter bij 1 van de 14 vangplaten in de Bio-TaqMan een positieve reactie gevonden rond de detectiegrens. Het betreft een aerosol vangplaat in een CATT kamer met frigoplanten met vroege symptomen van bladvlekkenziekte als bronplanten (object C).

Daarentegen werd *Xanthomonas* niet aangetoond in de lucht die tijdens de uitvoering van de CATT door de wasflessen werd geleid. Werd aan een aerosol-suspensie uit wasflessen vers *Xanthomonas*-suspensie toegevoegd dan werden wel kolonies van de bacterie waargenomen. Na uitplaten van deze aerosol-suspensies was de uitslag van de Bio-TaqMan positief.

Tabel 2. Overleving van Xanthomonas in lucht, waargenomen op vangplaat of in de wasfles

	CATT 35		CATT 35/40	
	Uitplaten ¹	Bio-TaqMan	Uitplaten	Bio-TaqMan
Vangplaten in CATT kamers	0	negatief	0	1 positief (14) ^{2,3}
Wasfles negatieve controle	0	negatief	0	negatief
Wasflessen van CATT kamers	0	negatief	0	negatief

¹ Aantal kolonievormende cellen van *Xanthomonas* per plaat (vangplaat) of ml water (wasfles)

² Tussen haakjes het totaal aantal platen

³ Positief, maar op de detectiegrens

3.2 Xanthomonas-suspensies en bacterieslijm

Zoals verwacht overleefde de bacterie in Xanthomonas-suspensies de duur van de behandeling wanneer deze buiten de CATT kamer werden gehouden (Tabel 3, Xf bij 20°C). Bij 20°C nam het aantal levende cellen wel enigszins af. In de CATT kamer overleefde Xanthomonas in waterige suspensies beide warmtebehandelingen, dit in tegenstelling tot de CATT proeven in 2013. Bij 1 van de 2 suspensies in de aardbeimijt CATT (CATT35) was er wel wat overleving, maar de dichtheid was laag na 48 uur. Bij Nema-CATT(CATT 35/40) werd slechts 1 atypische kolonie op de plaat waargenomen na 48 uur. In dit geval gaf de Bio-TaqMan een positief signaal, zodat er vanuit moet worden gegaan dat een enkele Xanthomonas-cel de behandeling heeft overleefd, of zijn er toch dode cellen gedetecteerd.

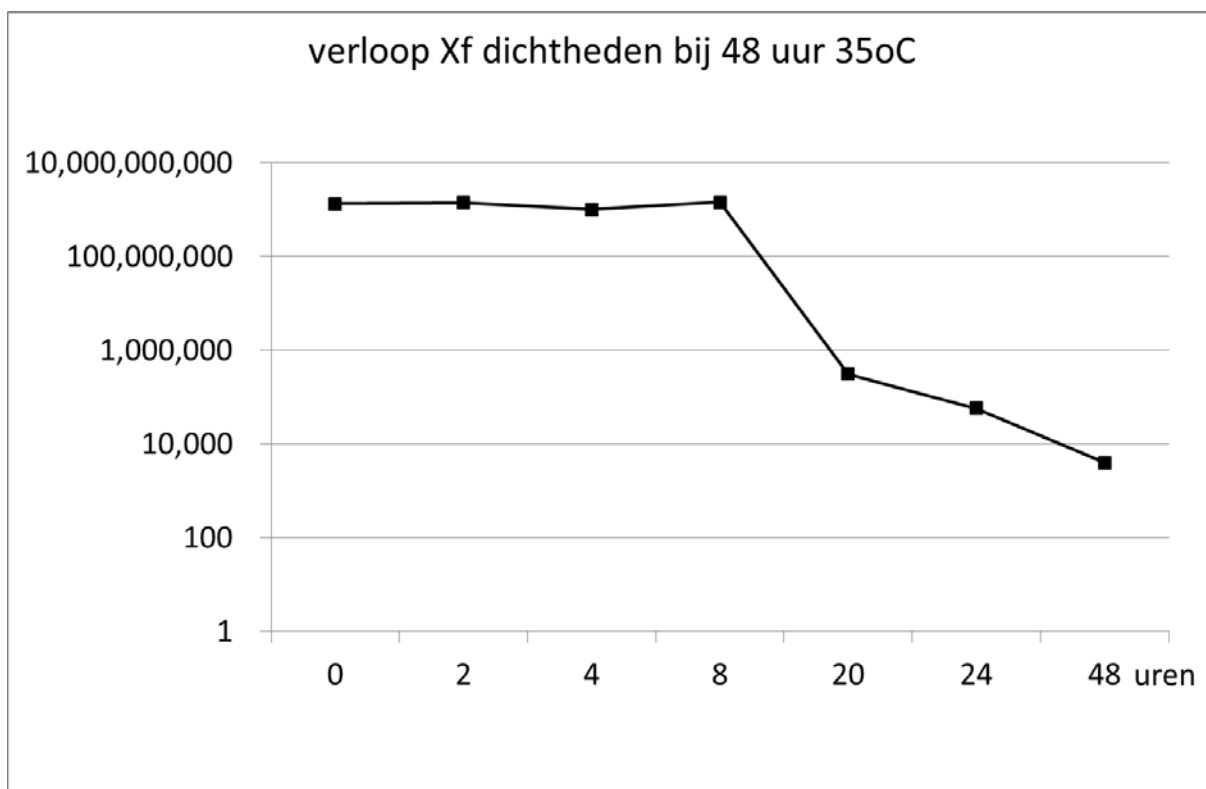
Naast Xanthomonas-suspensies werden ook agarplaten met slijmerige groei van *X. fragariae* aan de CATT onderworpen. De afname op platen was minder sterk dan de afname in een suspensie. Mogelijk dat warmte overdracht in een waterige suspensie beter was dan in bacterieslijm, waardoor een verschil in afname kan worden verklaard.

Tabel 3. Overleving van Xanthomonas in waterige suspensie, bij verschillende warmte behandelingen.

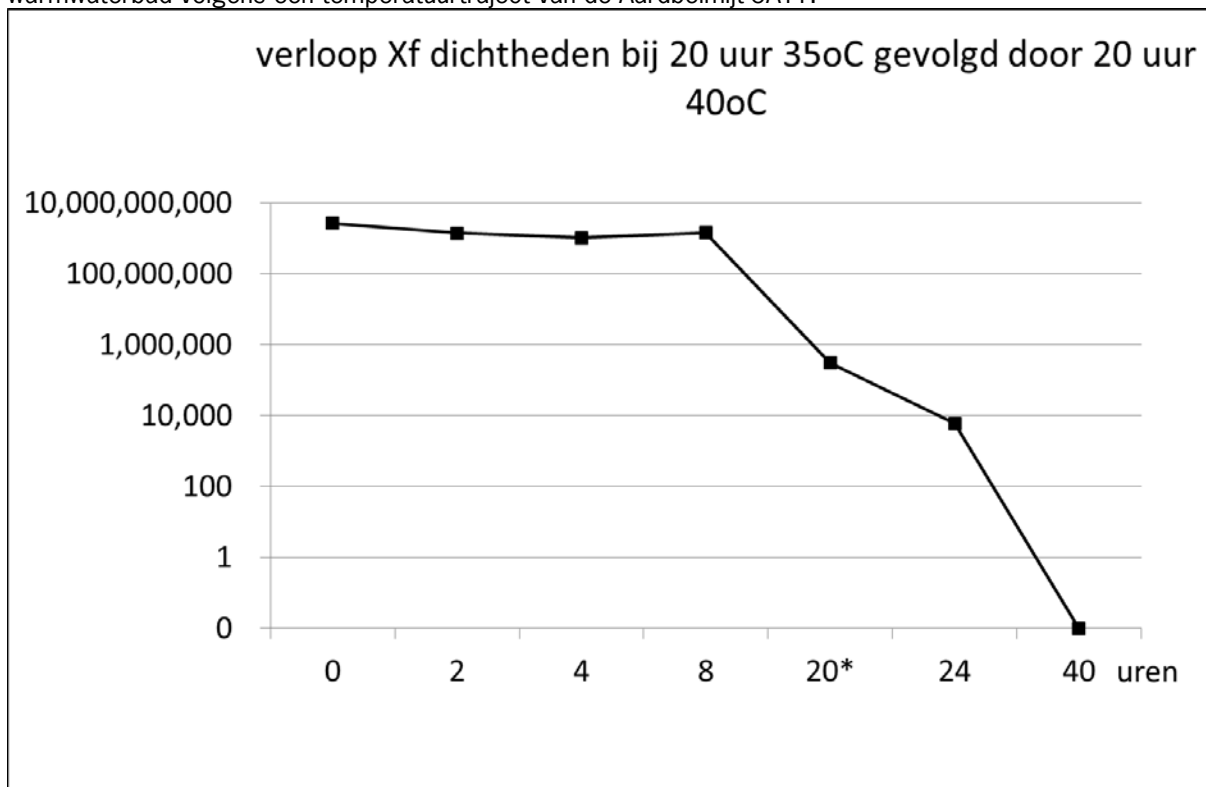
	suspensie		bacterieslijm	
	Uitplaten ¹	Bio-TaqMan	Uitplaten ¹	Bio-TaqMan
Xf voor CATT	$3.6 \cdot 10^8$	positief	$1.8 \cdot 10^8$	positief
Xf bij 20 °C	$2.5 \cdot 10^8$	positief	$1.2 \cdot 10^8$	positief
XF na CATT 35	$1.0 \cdot 10^6$	positief	$1.9 \cdot 10^7$	positief
Xf na CATT 35/40	0	positief	$1.1 \cdot 10^4$	positief

¹ Schatting aantal kolonievormende cellen van Xanthomonas per ml suspensie

Onder laboratorium omstandigheden werd gekeken naar afname van de bacteriedichtheid in een waterig suspensie. Dit werd uitgevoerd in een warm waterbad zonder controlled atmosphere (CA) condities. Gedurende de eerste 8 uur was er nauwelijks een afname van de bacteriepopulatie (Figuur 8 & Figuur 9). In de daarop volgende tijd daalde het aantal vitale cellen zeer sterk. Deze daling was bij 40°C sterker dan bij 35°C.



Figuur 8. Overleving van Xanthomonas bacterie (log10 (kolonie vormende eenheden +1)) in suspensie in een warmwaterbad volgens een temperatuurtraject van de Aardbeimijt-CATT.



Figuur 9. Overleving van Xanthomonas bacterie (log10 (kolonie vormende eenheden +1)) in suspensie in een warmwaterbad volgens een temperatuurtraject van de Nema-CATT.

3.3 Lekwater

Tijdens de proef werd in alle kamers condenswater gevormd op het glas. Figuur 10 laat condensvorming op de ruit van een CATT kamer zien. In 2 van de 14 CATT kamers werd zoveel condens gevormd op de bronplanten dat er onder de planten lekwater kon worden opgevangen. Mogelijk dat het ontbreken van lekwater onder de andere bronplanten te maken heeft met het vasthouden van het condenswater door de wortelkluit van deze planten. Lekwater werd aangetroffen in object E (planten een dag voor de frigo-bewaring gedompeld in een *Xanthomonas*-suspensie) en object H (planten 2 weken voor de uitvoering van de CATT geïnoculeerd). Directe TaqMan analyse liet zien dat er Xf bacteriën in het water aanwezig waren. Na uitplaten van het lekwater van de planten van object H groeiden bacteriekolonies uit die leken op kolonies van Xf, echter de Bio-TaqMan bleek negatief. Na inoculatie van aardbeiplanten met lekwater van beide objecten werd geen symptoomontwikkeling waargenomen. De Bio-TaqMan toets op dit plantmateriaal bleek eveneens negatief. Daar de directe TaqMan analyse geen onderscheid maakt tussen levende en dode cellen, suggereren de analyse resultaten dat de in het lekwater aanwezig bacteriën mogelijk niet vitaal waren.

Opvallend was dat de met water bespoten negatieve controle planten, ondanks het symptoomvrij blijven, een positieve uitslag gaven in de Bio-TaqMan toets. Wanneer werd geïnoculeerd met *Xanthomonas*-suspensie, dat met hetzelfde water was bereid, werden de planten wel zichtbaar ziek en kon dit ook in Bio-TaqMan worden aangetoond (Tabel 4). De positieve uitslag bij de negatieve controle planten is te verklaren door aan te nemen dat er in de kas secundaire verspreiding van *Xanthomonas* is opgetreden van de zieke positieve controle plant naar de er naast staande gezonde negatieve controle planten.

Tabel 4. Aanwezigheid van Xanthomonas in lekwater opgevangen onder de bronplanten.

	Lekwater		Nateelt	
	direct TaqMan	Bio-TaqMan	Symptoom	Bio-TaqMan
Lekwater object E	positief	negatief	geen	negatief
Lekwater object H	positief	negatief	geen	negatief
Water			geen	positief ¹
Water + <i>Xanthomonas</i>			ja	positief

¹ Zeer lage CT waarde



Figuur 10. Condens op de ruit van de CATT kamer.

3.4 Aardbeiplanten

In de proef zijn twee categorieën aardbeiplanten gebruikt. Bronplanten (planten die dienst deden als bron van *Xanthomonas*) en doelplanten (planten die dienst deden als vangplant voor eventueel in de lucht vrijgekomen cellen van *Xanthomonas*). Voor de productie van bronplanten zijn deels met *Xanthomonas* geïnfecteerde kasplanten gebruikt en A+ plantmateriaal dat bij aanvang van de proef vrij was van *Xanthomonas*. Dat wil zeggen dat bij een monster van deze planten met de Bio-TaqMan geen *Xanthomonas* werd aangetroffen.

De als bron gebruikte kasplanten waren forser dan normale A+ planten. De kasplanten moesten worden gebruikt omdat de in tunnels geïnoculeerde A+ planten geen symptomen van bladvlekkenziekte vertoonden. De bronplanten waren bij het uithalen aan het eind van de behandeling goed vochtig. Daarentegen waren de doelplanten die achter de bronplanten stonden opvallend droog.

De bladeren van de planten van object G en H hadden duidelijk zichtbare schade van de CATT. Eén dag na oppotten t.b.v. de natoets hingen de bladeren slap en waren deels bruin-zwart verkleurd.

3.4.1 Latent geïnfecteerde frigoplanten (B)

Het latent geïnfecteerde plantmateriaal vertoonde 1 week na inoculatie nog geen symptomen van bladvlekkenziekte. Wel kon aangetoond worden dat de bronplanten geïnfecteerd waren met *Xanthomonas*. Na de Nema-CATT was er een behoorlijke afname van *Xanthomonas* te zien. In de nateelteelt kwamen symptomen tot expressie en nam de *Xanthomonas*-dichtheid behoorlijk toe in de bronplanten. Bij de doelplanten werd geen *Xanthomonas* besmetting aangetroffen (Tabel 5).

Tabel 5. Xanthomonas op latent geïnfecteerde aardbeiplanten voor en na de Nema-CATT en de bijbehorende doelplanten.

	Uitplaten ¹	Bio-TaqMan	Symptoom
Bronplanten, vooraf	$5.9 \cdot 10^9$	positief	-
Bronplanten, na CATT 35/40	$1.4 \cdot 10^5$	positief	-
Bronplant na CATT + nateelt	$0.7 \cdot 10^8$	positief	WSL ²
Doelplanten, na CATT 35/40	0	negatief	-
Doelplant na CATT + nateelt	0	negatief	-

¹ Schatting aantal kolonievormende cellen van *Xanthomonas* per gram weefsel

² Water soaked lesions, kleine donker groene vlekjes alsof het weefsel verzadigd is met water

3.4.2 Frigoplanten met vroege symptomen (C en F)

Het zieke plantmateriaal vertoonde 2 weken na inoculatie volop roodbruine vlekken en zgn. 'water soaked lesions' (vroege symptomen van bladvlekkenziekte). Dit geeft aan dat de inoculatie was geslaagd. Net als bij de latent geïnfecteerde planten groeiden kort voor de CATT op met plantextract van zieke planten beënte R2A-platen beduidend hogere aantallen *Xanthomonas*-achtige kolonies uit dan na de CATT. In de nateelt van de bronplanten nam de *Xanthomonas*-dichtheid echter weer sterk toe (Tabel 6 en 7). Bij de doelplanten werd geen besmetting met *Xanthomonas* aangetroffen. Niet direct na de behandeling, en ook niet in de nateelt.

Tabel 6. Xanthomonas op zieke aardbeiplanten voor en na de Nema-CATT en de bijbehorende doelplanten.

	Uitplaten ¹	Bio-TaqMan	Symptoom
Bronplanten, vooraf	$1.8 \cdot 10^{10}$	positief	WSL ²
Bronplanten, na CATT 35/40	$3.1 \cdot 10^5$	positief	WSL
Bronplant na CATT + nateelt	$1.1 \cdot 10^8$	positief	Necrose
Doelplanten, na CATT 35/40	0	negatief	-
Doelplant na CATT + nateelt	0	negatief	-

¹) Schatting aantal kolonievormende cellen van *Xanthomonas* per gram weefsel

²) WSL = water soaked lesions

Tabel 7. Xanthomonas op zieke aardbeiplanten voor en na de Aardbeimijt-CATT en de bijbehorende doelplanten.

	Uitplaten ¹	Bio-TaqMan	Symptoom
Bronplanten, vooraf	$1.8 \cdot 10^{10}$	positief	WSL ³
Bronplanten, na CATT 35	$9.5 \cdot 10^6$	positief	WSL
Bronplant na CATT + nateelt	$8.1 \cdot 10^7$	positief	Necrose
Doelplanten, na CATT 35	0	negatief	-
Doelplant na CATT + nateelt	0	negatief ²	-

¹) Schatting aantal kolonievormende cellen van *Xanthomonas* per gram weefsel

²) Bij één monster lag de uitslag van de TaqMan-PCR assay op de detectiegrens

³) WSL = water soaked lesions

3.4.3 Uitwendig besmette frigoplanten (E)

De bedoeling van het dompelen van planten kort voor de frigo bewaring was het verkrijgen van planten waarop *Xanthomonas* oppervlakkig aanwezig was. Ondanks de oppervlakkige aanwezigheid van *Xanthomonas*, overleefde de bacterie de omstandigheden tijdens CATT, echter kon dit niet direct na de behandeling vastgesteld worden, maar wel in de nateelt (Tabel 8). Bij de doelplanten werd geen *Xanthomonas* besmetting aangetoond.

Tabel 8. Xanthomonas op besmette aardbeiplanten voor en na de Nema-CATT en de bijbehorende doelplanten.

	Uitplaten ¹	Bio-TaqMan
Bronplanten, vooraf	$1.6 \cdot 10^8$	positief
Bronplanten, na CATT 35/40	-	negatief
Bronplant na CATT + nateelt	$1.9 \cdot 10^5$	positief
Doelplanten, na CATT 35/40	-	negatief
Doelplant na CATT + nateelt	-	negatief

¹) Schatting aantal kolonievormende cellen van *Xanthomonas* per gram weefsel

3.4.4 Frigoplanten met gevorderde symptomen (D)

Object D gaat uit van symptomatisch plantmateriaal dat lange tijd voor de CATT geïnfecteerd is geraakt met *Xanthomonas*. Tijdens de CATT is er een afname van de mate van besmetting. Er kon geen *Xanthomonas* aangetoond worden in de doel planten direct na afloop van de behandeling. In de nateelt werd geen symptoomontwikkeling gezien, en ook de Bio-TaqMan bleef negatief. In de nateelt ontstonden er vanuit de “water soaked lesions” necrotische vlekken, maar er werd geen toename in de dichtheid bacteriecellen gevonden.

Tabel 9. Xanthomonas op besmette aardbeiplanten voor en na de Nema-CATT en de bijbehorende doelplanten.

	CATT 40	Object D	
	Uitplaten ¹	Bio-TaqMan	Symptoom
Bron vooraf	$2.5 * 10^{10}$	positief	WSL
Bron na CATT 35/40	$1.6 * 10^7$	positief	WSL
Bron na CATT + teelt	$2.4 * 10^7$	positief	necrose
Doel na CATT 35/40	0	negatief	geen
Doel na CATT + teelt	0	negatief	geen

¹ Schatting aantal kolonievormende cellen van *Xanthomonas* per gram weefsel

² Tussen haakjes het aantal bemonsterde doelplanten

3.4.5 Planten met vroege symptomen, geen frigo (G & H)

Objecten G en H gaan uit van symptomatisch plantmateriaal die in de herfst behandeld worden. In tegenstelling tot C en F waren deze planten niet blootgesteld aan een koude behandeling. Tijdens de CATT behandelingen is er een afname van de mate van besmetting. Direct na de aardbeimijt CATT werd in object H *Xanthomonas* aangetroffen op 2 doelplanten. Echter bij de nateeltplanten kon het pathogeen niet worden aangetoond met de Bio-TaqMan. In de nateelt werd evenmin symptoomontwikkeling gezien. In de nateelt van de doelplanten van de CATT 35/40 bleek de Bio-TaqMan bij één van de monsters positief met een CT-waarde dicht bij de detectiegrens. Symptomen werden niet waargenomen.

Tabel 10. Xanthomonas op besmette aardbeiplanten voor en na CATT en de bijbehorende doelplanten.

	CATT 35/40	Object G			CATT 35	Object H	
	Uitplaten ¹	Bio-TaqMan	Symp.		Uitplaten	Bio-TaqMan	Symp.
Bron vooraf	$3.7 * 10^9$	positief	WSL		-	-	-
Bron na CATT	$9.7 * 10^6$	positief	WSL		$3.6 * 10^7$	positief	WSL
Bron na CATT + teelt	$9.5 * 10^7$	positief	necrose		$3.9 * 10^8$	positief	WSL
Doel na CATT	0	negatief	geen		0	2 pos. (8) ²	geen
Doel na CATT + teelt	0	1 pos. (6)	geen		0	negatief	geen

¹ Schatting aantal kolonievormende cellen van *Xanthomonas* per gram weefsel

² Tussen haakjes het aantal monsters

4 Discussie en conclusies

4.1 Discussie

Om het risico op verspreiding van *Xanthomonas* tijdens CATT te onderzoeken is een proef uitgevoerd, waarbij gekeken werd naar de verspreiding van het pathogeen tijdens CATT omstandigheden. In tegenstelling tot 2 eerdere proeven zijn de besmette planten in deze proef wel een aantal weken bewaard bij -1,5 °C. Ter vergelijking met vorige proeven zijn er 2 objecten toegevoegd die niet in de frigo-cel hebben gestaan. Om de praktijksituatie zo veel mogelijk te benaderen zijn de voor de proef benodigde planten buiten opgekweekt. Een deel van deze planten is vervolgens geïnoculeerd met *Xanthomonas fragariae* om dienst te doen als infectiebron. Echter de planten lieten na inoculatie geen symptomen zien. Om de proeven toch te kunnen uitvoeren, is er voor gekozen om voor een deel van de infectiebronnen gebruik te maken van aardbeiplanten opgekweekt in de kas. Door op verschillende tijdstippen voor de frigo bewaring te inoculeren werd plantmateriaal verkregen met verschillende niveaus van ziektedruk. Omdat symptomatisch zieke planten hoogst infectieus zijn, geven deze een maximale risico op verspreiding van *Xanthomonas* (Kastelein et al., 2014). Onder voor de ziekteontwikkeling gunstige omstandigheden in de kas vertonen aardbeiplanten 2 weken na inoculatie vroege symptomen van bladvlekkenziekte. Na 4 weken is de mate van symptoomexpressie en besmetting nog veel hoger. Daarom werden de planten die voor het hoogste niveau van infectiedruk moesten zorgen, 4 weken voorafgaand aan de frigo bewaring geïnoculeerd met *Xanthomonas*. Daarnaast werd plantmateriaal 1 week voor de frigo bewaring geïnoculeerd om een latente infectie te simuleren. Verwacht wordt dat het risico op verspreiding bij een dergelijke partij lager ligt dan bij symptomatische planten. Tenslotte werden 1 á 2 dagen voor de frigo bewaring planten in *Xanthomonas*-suspensie gedoopt om de waarschijnlijk laagste infectiedruk te creëren van een uitwendig besmetting door versmering. Met deze 4 manieren van inoculatie werden situaties nagebootst waarbij geïnfecteerd of besmet plantmateriaal in het voorjaar een CATT ondergaat. Daarnaast zijn 2 weken voor de uitvoering van de CATT planten geïnoculeerd die niet in een vriescel werden bewaard. Hiermee zijn geïnfecteerde planten verkregen waarbij werd nagebootst dat plantmateriaal in het najaar van het veld komt en direct een CATT ondergaat.

Het latent geïnfecteerde materiaal bevatte, gelet op de kolonie tellingen, zeer veel cellen van *Xanthomonas*. Hier en daar werd een enkele lesie al waargenomen. Bij de frigo-planten met vroege symptomen (object C en F) en de wachtbedplanten met vroege symptomen (de objecten G en H) werden volop lesies waargenomen. Bij de frigo-planten met gevorderde symptomen van bladvlekkenziekte (object D) was er sprake van vele lesies en necrotisch blad materiaal. Een deel van de objecten werd bewaard bij -1,5 °C een ander deel werd niet bewaard. Deze laatste planten (objecten G en H) werden later geïnoculeerd om een vergelijkbare uitgangssituatie te krijgen met objecten C en F. Voor het invriezen werden de planten opgeschoond door het terugknippen van het bladmateriaal.

In de proefopzet is er voor gekozen om vooral te werken met de Nema-CATT (35°C gedurende 20 uur, gevolgd door 20 uur 40°C). Ter vergelijking met eerdere proeven werd ook beperkt getoetst bij de Aardbeimijt-CATT (48 uur 35°C). Verondersteld werd dat *Xanthomonas* zich mogelijk tijdens de behandeling zou verspreiden via aerosolen door de lucht, via spatwater naar buurplanten of via doorlekken van besmet condenswater naar beneden.

4.1.1 Verspreiding door de lucht

Om luchtverspreiding via aerosolen vast te stellen werd de lucht uit de CATT kamer door een wasfles geleid om eventueel in de lucht aanwezige cellen van *Xanthomonas* in water in suspensie te brengen. In voorgaande proeven (Evenhuis et al., 2014) werden de wasflessen in de CATT kamer gezet. Op deze wijze werd het water op dezelfde manier verwarmd als de aardbeiplanten. In beide voorgaande proeven kon geen verspreiding van *Xanthomonas* worden vastgesteld via aerosolen. In deze proef werden de wasflessen buiten de CATT kamer opgesteld. De watertemperatuur in de wasfles bleef daarmee op ongeveer 20°C. Bij deze temperatuur kan *Xanthomonas* goed overleven. Voor de nieuwe aanpak is gekozen om de kans op het aantonen van verspreiding zo groot mogelijk te maken.

In de wasflessen werd geen *Xanthomonas* aangetoond. Dit suggereert dat er geen verspreiding van *Xanthomonas* via aerosolen heeft plaats gevonden. Opgemerkt moet worden dat na uitplaten van het waswater niet alleen geen *Xanthomonas* uitgroeide, maar ook zeer weinig andere micro-organismen op de R2A-platen werden aangetroffen. Door de aanpassing van de methode was de slang langer dan bij de voorgaande experimenten. Doordat de doorstroomsnelheid dezelfde was al bij de voorgaande proeven, kan niet worden uitgesloten dat er depositie van micro-organismen in de slang heeft plaatsgevonden met als mogelijk gevolg dat er minder micro-organismen in het water van de wasfles zijn terechtgekomen.

Naast wasflessen werd ook gekeken naar depositie van *Xanthomonas* in aerosolen of spatwater op vangplaten met gemodificeerd R2A medium. Op de platen groeiden verschillende schimmels en bacteriën. Op het oog werden geen *Xanthomonas* kolonies waargenomen. Bij de Aardbeimijt-CATT werd dan ook in de Bio-TaqMan geen *Xanthomonas* aangetoond. Echter bij de nieuwe Nema-CATT gaf op 1 van de 8 schalen de Bio-TaqMan een positieve uitslag dicht bij de detectielimiet. De positieve vangplaat, afkomstig uit één van de CATT kamers van object C (met symptomatische planten als infectiebron), suggereert dat er toch verspreiding van *Xanthomonas* heeft plaats gevonden tijdens de behandeling. Opmerkelijk is dan wel dat dit waargenomen werd bij de nieuwe CATT waarvan op voorhand werd verwacht dat deze minder gunstig zou zijn voor *Xanthomonas* dan de aardbeimijt CATT. Overigens kunnen dode cellen ook met een Bio-TaqMan worden aangetoond, en is het dus niet helemaal uit te sluiten dat het om niet vitale *Xanthomonas* gaat.

4.1.2 Lekwater

In de proef kwam condens voor op het glas. Daardoor kan verwacht worden dat de planten ook erg nat zijn geworden. Echter, niet in alle objecten werd lekwater aangetroffen. Mogelijk had dit te maken met het feit dat een deel van de bronplanten relatief grote, in potgrond opgekweekte aardbeiplanten waren. Qua grootte lagen ze dicht bij een trayplant dan bij een A+ plant. Het lekwater werd mogelijk geabsorbeerd door de wortelkruit en kwam daardoor niet in de opvangbak. In twee gevallen (de objecten E en H) werd wel lekwater opgevangen. Het lekwater bij object E (frigoplanten met uitwendige besmetting, Nema-CATT) is afkomstig van plantmateriaal dat een dag voor de CATT in een *Xanthomonas*-suspensie was gedompeld. Het water van object G (wachtbedplanten met vroege symptomen, Nema-CATT) is afkomstig van materiaal met water soaked lesions en geen frigo behandeling heeft gehad. Met name in G en in mindere mate bij E is er sprake van een risicosituatie. Uit eerder onderzoek (p.m. Van der Wolf) is gebleken dat *Xanthomonas* in zeer lage dichtheid al een infectie van aardbeiplanten kan veroorzaken.

Met de directe TaqMan werd een positieve uitslag verkregen. Dit suggereert dat cellen van *Xanthomonas* met het lekwater naar beneden zijn gesijpeld. Werd getoetst in een Bio-TaqMan en door inoculatie van lekwater op aardbeiplanten dan werd in beide gevallen geen *Xanthomonas* aangetoond. Dit suggereert dat de in het lekwater gevonden cellen van *Xanthomonas* niet vitaal waren. Met de directe TaqMan wordt namelijk geen onderscheid gemaakt tussen dood en levend materiaal. In Bio-TaqMan worden positieve reacties voornamelijk veroorzaakt door levende cellen. Geconcludeerd kan worden dat *Xanthomonas* met lekwater kan doorsijpelen, echter het is sterk de vraag of daarmee ook een infectie van gezonde aardbeiplanten kan worden verkregen tijdens CATT. Gezien de resultaten van de Bio-TaqMan en de inoculatie van aardbeiplanten lijkt de kans daarop zeer klein.

4.1.3 Overleving in suspensie en op plaat

Werd *Xanthomonas* op plaat met groeimedium in de CATT gezet dan werd de bacterie niet gedood. Wel

was er een duidelijke afname te zien in het aantal vitale cellen. Deze afname was sterker (99.99%) bij de nieuwe Nema-CATT dan bij de aardbeimijt CATT (>90%). Bij onbehandelde platen was de afname slechts 30%. Dit geeft aan dat de omstandigheden tijdens de CATT niet gunstig zijn voor overleving van *Xanthomonas*.

Overleving van *Xanthomonas* in suspensie werd niet gevonden bij de nieuwe CATT. Bij de aardbeimijt CATT was er wel overleving, maar het aantal vitale cellen was zeer sterk gedaald. Wanneer bij *Xanthomonas* suspensies het temperatuur-verloop van de twee types CATT werd nagebootst in een warmwaterbad was de eerste 8 uur nauwelijks sprake van een afname van de populatiedichtheid. Bij de Nema-CATT (20 uur 35°C gevolgd door 20 uur 40°C) was de afname vervolgens sterker dan bij de Aardbeimijt-CATT. Het eindresultaat was vergelijkbaar met de monsters die in een CATT kamer was behandeld. Dit wijst er op dat de afsterving vooral een resultaat was van de hoge temperatuur en minder of niet van de verhoogde CO₂ concentratie.

4.1.4 Verspreiding van *Xanthomonas* tijdens CATT

Uit de proef komt naar voren dat wanneer door *Xanthomonas* geïnfecteerd en besmet plantmateriaal een CATT ondergaat de bacterie na afloop nog niet dood is. Wel is het zo dat na CATT een duidelijke afname van de *Xanthomonas* populatie werd waargenomen, waar in de onbehandelde planten over het algemeen geen daling te zien was. Dit geeft wederom aan dat de CATT condities niet bij uitstek gunstig zijn voor *Xanthomonas*. Echter, de populaties kunnen, bij gunstige omstandigheden voor de ontwikkeling van de ziekte, zich wel weer herstellen. Mogelijk kan een CATT behandeling wel leiden tot een uitstel van de symptoomexpressie.

In dit onderzoek werden planten die één week voor de frigo-bewaring waren geïnoculeerd, aangeduid als latent geïnfecteerd. Symptomen op het bladmateriaal waren nog niet zichtbaar. Planten die vlak voor de frigo periode werden gedompeld in een *Xanthomonas*-suspensie, werden beschouwd als laag infectieus omdat de bacterie vooral oppervlakkig aanwezig was op de planten. Daar de nateelt van deze uitwendig besmette planten latent geïnfecteerd was, blijkt de tijd tussen het dompelen in inoculum en de uitvoering van de CATT echter wel lang genoeg te zijn voor *Xanthomonas* om bladeren binnen te dringen. Bij deze twee laagste niveaus van infectiedruk (latent geïnfecteerd & uitwendig besmet) werd geen verspreiding van *Xanthomonas* waargenomen naar doelplanten. Ook in de natoets in de kas werd geen aantasting waargenomen of *Xanthomonas* gedetecteerd bij de doelplanten van deze infectiebronnen.

Bij de zieke planten die twee weken voor de frigo-bewaring of de CATT met *Xanthomonas* werden geïnoculeerd (objecten C en F), waren wel vroege symptomen van bladplekkenziekte zichtbaar op het blad. Hoewel het grootste deel van het blad terug geknipt werd voor de CATT, bleef er nog zichtbaar geïnfecteerd bladmateriaal over dat behandeld werd. Bij de doelplanten die tijdens de Nema-CATT aan dit hoge niveau van infectiedruk waren blootgesteld, werd geen besmetting van de planten vastgesteld. Ook in de natoets werd de bacterie niet aangetroffen en werden evenmin symptomen waargenomen. In deze proef werd ook symptomatisch materiaal gebruikt dat 4 weken voor de frigo-bewaring werd geïnoculeerd (objecten D). Direct na de CATT werden geen aanwijzingen gevonden voor verspreiding van *Xanthomonas* naar de doelplanten.

Echter de positieve uitslag van de Bio-TaqMan bij de vangplaat achter in de CATT kamers van deze objecten en bij de nateelt van één van de doelplanten van object C lijkt er op te wijzen dat *Xanthomonas* tijdens de Nema-CATT via de lucht verspreid wordt.

Ter vergelijking met eerdere proeven waarbij plantmateriaal twee weken voor CATT werd geïnoculeerd, zijn in deze proef de objecten F (frigoplanten met vroege symptomen) en H (wachtbedplanten met vroege symptomen) behandeld met de CATT tegen aardbeimijten. Bij object F kon direct na de CATT geen verspreiding worden aangetoond. Hoewel in de nateelt geen symptomatische planten werden gevonden, was de Bio-TaqMan bij één van de nateeltplanten positief. In object H werd direct na de CATT wel een positieve Bio-TaqMan reactie gevonden, dit is in overeenstemming met de resultaten uit 2013-2014 (Evenhuis, et al., 2014) waar ook in 1 geval een positieve reactie op de detectiegrens werd waargenomen. In de natoets werd geen *Xanthomonas* aangetoond. Deze waarnemingen geven aan dat verspreiding van *Xanthomonas* tijdens de CATT niet geheel uit te sluiten is. Daar geen van de nateeltplanten symptomen ontwikkelden lijken de risico's van deze verspreiding via de lucht gering.

Uit de resultaten lijkt naar voren te komen dat alleen bij aanwezigheid van symptomatische planten er een kleine kans op verspreiding is naar buurplanten. Daarnaast lijkt er bij symptomatische planten een kans op besmetting met *Xanthomonas* via lekwater. In de praktijk zitten de planten in plastic folie in kisten (Figuur 11), wat het doorlekken beperkt naar kisten met plantmateriaal die zich lager in de stapel bevinden.



Figuur 11. Pallet met aardbeiplanten klaar voor CATT.

4.2 Conclusies en aanbevelingen

- Bij latent geïnfecteerde aardbeiplanten en bij uitwendig besmette planten kon tijdens CATT geen verspreiding naar de buurplanten worden aangetoond. Dit suggereert dat in een partij zonder symptomatische planten het risico op verspreiding van *Xanthomonas* nagenoeg afwezig is.
- Bij symptomatisch plantmateriaal als bron, zonder frigo periode, werd bij doelplanten positieve Bio-TaqMan waarden gevonden bij zowel de Aardbeimijt-CATT (48 uur 35°C) en de Nema-CATT (20 uur 35°C gevolgd door 20 uur 40°C). In de nateelt kwamen de planten echter niet tot symptoomexpressie en er werd geen *Xanthomonas* waargenomen op de voor de Bio-TaqMan gebruikte platen voor het opkweken van de bacterie. Dit geeft aan dat hoewel verspreiding tijdens CATT niet geheel uit te sluiten is, het risico op infectie van *Xanthomonas*-vrije buurplanten zeer klein lijkt.
- Er zijn aanwijzingen gevonden dat bij CATT van symptomatisch plantmateriaal verspreiding van *Xanthomonas* door de lucht kan plaatsvinden. De gevolgen van deze verspreiding lijken gering. De risico's hiervan voor de praktijk worden als zeer gering ingeschat.
- *Xanthomonas* in water overleeft de Aardbeimijt-CATT (48 uur bij 35°C) wel, i.t.t. eerdere experimenten, echter er was wel sprake van een zeer sterke afname van de populatiedichtheid. *Xanthomonas* in water overleeft de Nema-CATT (20 uur 35°C gevolgd door 20 uur 40°C) niet, terwijl de bacterie wel in leven blijft gedurende 48 uur bij kamertemperatuur. In een waterige suspensie was er gedurende de eerste 8 uur van de warmtebehandeling nauwelijks een afname van de *Xanthomonas* dichtheid. Dit geeft aan dat de omstandigheden tijdens CATT weliswaar niet gunstig zijn voor *Xanthomonas*, maar de overleving is wel lang genoeg om theoretisch een secundaire infectie te kunnen veroorzaken.
- Op agarmedium overleeft *Xanthomonas* beide behandelingen, waarbij de dichtheid levende bacteriën bij de Nema-CATT sterker afneemt dan bij de Aardbeimijt-CATT. Dit geeft wederom aan dat de omstandigheden tijdens CATT niet gunstig zijn voor de bacterie.
- In lekwater werd een positieve reactie verkregen bij de directe TaqMan. Hoewel uit eerder onderzoek was gebleken dat *Xanthomonas* al bij lage dichtheden aardbeiplanten kan infecteren, gaf inoculatie met lekwater geen infectie. Omdat de positieve controle wel ziek werd, lijkt het er op dat de *Xanthomonas* in het lekwater dood was.
- Tijdens de CATT neemt de mate van *Xanthomonas* besmetting van geïnoculeerd plantmateriaal af, echter onder voor *Xanthomonas* gunstige omstandigheden nam de mate van besmetting weer toe. De omstandigheden tijdens de Aardbeimijt- en Nema-CATT zijn niet dermate ongunstig voor *Xanthomonas* dat de bacterie in het plantmateriaal volledig gedood wordt.
- In de VS wordt plantmateriaal gedompeld in warm water om de planten te ontdoen van *Xanthomonas*. Dompelen heeft echter zo z'n beperkingen, zoals versmeren van micro-organismen en het terugdrogen van plantmateriaal. Het zou interessant zijn een haalbaarheidsstudie uit te voeren naar mogelijkheden om de CATT geschikt te maken voor behandeling van plantmateriaal tegen *Xanthomonas*.

Literatuur

- Evenhuis, A, Van der Wolf, J.M., Kastelein, P, Krijger M., Mendes, O., Van Tongeren, C. Van der Zouwen, P. Otma, E., Van Kruistum, G. & Verschoor, J. 2014. Risico op verspreiding van *Xanthomonas* tijdens CATT, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Business Unit AGV, 17 p.
- Kastelein, P, Krijger, M., Czajkowski, R., Van der Zouwen, P.S., Van der Schoor, R., Jalink, H. en Van der Wolf, J.M.. Development of *Xanthomonas fragariae* populations and disease progression in strawberry plants after spray-inoculation of leaves. Plant Pathology Volume 63 (2) 255–263.
- Van Kruistum, G.; Hoek, J.; Verschoor, J.; 2011. CATT behandeling aardbei(moeder)planten tegen plantparasitaire nematoden. Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Business Unit AGV, 17 p.

