

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 02 juli 2013
KENMERK CGM/130702-02
ONDERWERP Advies inperking gg-*Xanthomonas campestris* pv *campestris* in combinatie met planten en hommels

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijziging van de vergunning getiteld 'Bestrijding van natrot in de aardappel veroorzaakt door pectinolytische *Erwinia* subspecies door beïnvloeding van het quorum sensing mechanisme', deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de inoculatie van bloemen van koolplanten met genetisch gemodificeerde (gg-) *Xanthomonas campestris* pv *campestris* bacteriestammen. *X. campestris* pv *campestris* veroorzaakt de ziekte 'zwartrot' bij de plantenfamilie *Brassicaceae* en is geclassificeerd als een klasse 2 plantpathogeen.

Na de inoculatie zullen de gg-bacteriën met behulp van hommels naar andere planten in de kas verspreid worden. In de gg-bacteriën zijn plasmiden met fluorescentie- en antibioticumresistentiegenen ingebracht. De werkzaamheden zullen uitgevoerd worden onder PKM-III inperkingsniveau.

De COGEM heeft geen redenen om aan te nemen dat de op de plasmiden aanwezige eigenschappen van invloed zijn op de biologische karakteristieken van de gebruikte *X. campestris* stammen.

Naast de door de aanvrager opgestelde aanvullende inrichtings- en werkvoorschriften, is de COGEM van mening dat aanvullende maatregelen noodzakelijk zijn om uitsleep van gg-bacteriën, al dan niet via de hommels, uit de kas te voorkomen. Tijdens de inoculatie dienen de medewerkers volledig beschermende kleding te dragen (een overall), inclusief schoenhoezen en een haarkapje. Daarnaast dient desinfectie van de werkruimte plaats te vinden met een voor *X. campestris* pv *campestris* gevalideerd middel.

Indien de werkzaamheden onder de hierboven weergegeven voorwaarden worden uitgevoerd, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid dr. W.J. de Kogel niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Verspreiding van genetisch gemodificeerde *X. campestris* pv *campestris* onder koolplanten met behulp van hommels

COGEM advies CGM/130702-02

Inleiding

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over een wijziging van de vergunning getiteld 'Bestrijding van natrot in de aardappel veroorzaakt door pectinolytische *Erwinia* subspecies door beïnvloeding van het quorum sensing mechanisme'. De wijziging is ingediend door de Plant Sciences Group van Wageningen UR en betreft experimenten waarbij *Brassica oleracea* (koolplanten) tijdens de bloei worden besmet met twee genetisch gemodificeerde (gg-) bacteriestammen van de soort *Xanthomonas campestris* pathovar (pv) *campestris*. Met behulp van hommels zal de transmissie van gg-*X. campestris* (pv) *campestris* naar andere koolplanten bestudeerd worden.

De doelen van de experimenten zijn:

- Het localiseren van *X. campestris* pv *campestris* in de hauwtjes en zaden van koolplanten na inoculatie van de bloemen
- Het bestuderen van *X. campestris* pv *campestris* stamvariatie in zaadkolonisatie
- Het bestuderen van de overdracht van *X. campestris* pv *campestris* door hommels
- Het bestuderen van de overdracht van geïnoculeerde naar niet-geïnoculeerde planten door hommels
- Het evalueren van het gebruik van 'green fluorescent protein' (GFP) en 'red fluorescent protein' (RFP) gemerkte *X. campestris* pv *campestris* stammen voor kolonisatiestudies

X. campestris pv *campestris*

X. campestris pv *campestris* is een niet-sporevormende, aerobe, gramnegatieve, staafvormige bacterie die bekend is om zijn pathogene eigenschappen voor *Brassicaceae*, in het bijzonder *B. oleracea* (Kool).^{1,2} De bacterie komt voor in de bodem maar overleeft beter in vergaan plantweefsel dan als vrije cel.³ De door *X. campestris* pv *campestris* veroorzaakte ziekte is bekend onder de naam 'zwart rot', brengt veel economische schade aan koolgewassen toe en komt over de gehele wereld voor, in het bijzonder in warme en vochtige klimaten.^{1,2} Indien 'zwart rot' wordt geconstateerd, betekent dit doorgaans dat het zaad al met de bacterie besmet was.¹ Echter, de ziekte kan ook overgedragen worden door contacttransmissie via bijvoorbeeld medewerkers en insecten, of via besmette planten en plantrestanten, aarde, (irrigatie)water, gereedschap en via wind en aerosolen.^{1,4}

X. campestris pv *campestris* koloniseert het vaatsysteem van de plant en produceert een extracellulair polysaccharide, 'xanthaangom', waardoor de vaatbundels verstopt raken en de bladeren verwelken. Het extracellulaire polysaccharide is eveneens betrokken bij de vorming van virulentiefactoren en een biofilm.¹

Wegens zijn unieke eigenschappen kent xanthaangom vele toepassingen. Het biopolymeer wordt ten behoeve van onder meer de voedsel- en cosmetica-industrie industrieel geproduceerd.²

De aardhommel

Hommels (en bijen) kunnen onderverdeeld worden in solitaire soorten en sociale soorten die in een volk leven. De levenscyclus van deze soorten is verschillend. Doorgaans wordt bij het bestuiven van planten in kassen gebruik gemaakt van de sociale hommelse soort *Bombus terrestris* (aardhommel). Deze soort vormt een volk bestaande uit een koningin, werksters (vrouwtjes) en darren (mannetjes). De koningin maakt een nest dat bestaat uit cellen die zijn opgebouwd uit was, haren en stuifmeel. In een hommelvek dat bestaat uit ongeveer 80 werksters, zal de koningin eitjes leggen en zal het volk in ongeveer 6 weken uitgroeien tot 200-250 werksters. Een sociale hommelse soort broedt niet buiten zijn nest of volk.^{5,6}

De koningin van de aardhommel produceert een feromoon, onder invloed waarvan de ontwikkeling van de ovaria van de werksters onderdrukt wordt. Indien er geen koningin aanwezig is, of indien door ouder worden de invloed van de koningin afneemt (na ongeveer 4-6 weken), ontwikkelen zich bij een aantal van de werksters de ovaria. Zij leggen vervolgens onbevuchte eitjes waaruit zich in ongeveer 24 dagen adulte darren ontwikkelen. Darren foerageren op de nectar van bloemen en overnachten soms in de bloem. Hommelwerksters paren niet, darren paren met jonge koninginnen.^{5,6}

Voorgenomen werkzaamheden

Tijdens de experimenten zullen twee *X. campestris* pv *campestris* stammen en drie verschillende plasmiden gebruikt gaan worden. Het betreft de plasmiden pHc60-GFP, pRZT3-RFP en pUFZ75-GFP. Deze bevatten een GFP- of RFP-selectiemarker, en daarnaast een kanamycine of tetracycline antibioticumresistentie selectiemarker.^{7,8,9}

Bloeiende *B. oleraceae* planten zullen gedurende 4 weken drie keer per week met twee verschillende gg-*X. campestris* pv *campestris* stammen besproeid worden die een verschillend plasmide bevatten (in totaal 6 combinaties). Inoculatie zal plaatsvinden aan de hand van verneveling met een bloemenspuit ('atomizer') en starten bij de eerste bloei. Vanaf het moment dat de eerste inoculatie heeft plaatsgevonden zullen 50 hommels in de werkruimte geïntroduceerd worden. Zodra het totale aantal hommels minder dan 25 wordt, worden 25 nieuwe hommels geïntroduceerd. Hommels zullen in totaal 6 weken in de kasruimte aanwezig zijn. Hierna zullen alle hommels met insecticide afgedood worden.

Voorgenomen inperkingsmaatregelen

Het uitgangsgenotype waarop de genetisch gemodificeerde micro-organismen (ggmo's) zijn gebaseerd, *X. campestris* pv *campestris*, behoort tot pathogeniteitsklasse 2.¹⁰ Handelingen met een gg klasse 2 pathogeen in associatie met planten, dienen conform lid c van bijlage 5.5.2 behorende bij de Regeling GGO plaats te vinden in een PKM-II ruimte.¹¹ De gg-*X. campestris* pv *campestris* stammen zullen door middel van spray-inoculatie op de planten aangebracht worden. Wegens de aerosolvorming dient deze handeling ter voorkoming van aerogene verspreiding uit de kas plaats te

vinden in een PKM-III ruimte, omdat de luchtafvoer van een dergelijke ruimte is voorzien van een HEPA-filter.

Daarnaast zal, omdat bij de experimenten hommels gebruikt gaan worden die mogelijk gecontamineerd zijn met *gg-X. campestris* pv *campestris*, de PKM-III werkruimte voorzien zijn van aanpassingen die de ontsnapping van de hommels voorkomen. De aanvrager stelt voor naast de geldende inrichtings- en werkvoorschriften voor PKM-III werkruimtes, de volgende aanvullende maatregelen en werkvoorschriften te hanteren ten einde een zo goed mogelijke inperking van de *gg-X. campestris* pv *campestris* en besmette hommels te bewerkstelligen:

- In de PKM-III werkruimte bestaat een relatieve luchtvochtigheid van 40% gedurende 4 uur vanaf het moment van inoculatie.
- Tijdens de inoculatie- experimenten worden een mondkapje en beschermende kleding gedragen, inclusief schoenhoezen.
- Na inoculatie zal de medewerker minimaal nog een half uur in de werkruimte verblijven alvorens deze te verlaten.
- De werkruimte mag pas opnieuw betreden worden 24 uur na inoculatie.
- Op dat moment zullen randen van tafels en vloeren volgens de gebruiksvoorschriften worden gedecontamineerd met het desinfectans 'Menno ter Forte'.
- In de PKM-III ruimte is een afritsbaar insectenscherm geplaatst voor de deur naar de sluis om eventuele ontsnapping van hommels te voorkomen.
- Indien een hommel ontsnapt naar de sluis, zal deze met een insecticide worden gedood. De werknemer zal daarbij beschermende kleding en een mondkapje dragen. De sluis zal daarna volgens de gebruiksvoorschriften worden gedecontamineerd met het desinfectans 'Menno ter Forte'.
- Bij aanvang en bij de tussentijdse nieuwe introducties zullen alle hommels (levend en dood) geteld worden.

Na afloop van het gehele experiment:

- zullen alle hommels met insecticide gedood worden
- zullen dode hommels gedesinfecteerd, afgevoerd en vernietigd worden
- zullen grond, potten en plantmateriaal geautoclaveerd worden
- zal de gehele kasruimte en het insectenscherm door middel van verneveling met 'Menno ter Forte' ontsmet worden

- zullen *B. oleraceae* bloemen, hawtjes en zaden geanalyseerd worden op kolonisatie met *gg-X. campestris* pv *campestris*. Deze analyses zullen in een laboratorium onder het daartoe geëigende inperkingsniveau plaatsvinden en vormen geen onderdeel van deze aanvraag.

Eerder COGEM advies

X. campestris pv *campestris* is door de COGEM geclassificeerd als een klasse 2 plantpathogeen.¹⁰ De COGEM heeft nog niet eerder advies uitgebracht over werkzaamheden met *gg-X. campestris* pv *campestris* en nog niet eerder geadviseerd over bestuivingsproeven met hommels in kassen in

associatie met ggm's. Recent heeft de COGEM advies uitgebracht over de inperking van werkzaamheden met (gg-)geleedpotigen.¹²

Overwegingen

Bij handelingen met ggo's onder 'Ingeperkt Gebruik' dienen maatregelen genomen te worden ten einde ontsnapping naar het milieu te voorkomen. In onderhavige aanvraag worden deze maatregelen bepaald door de aard van de toegepaste gg-*X. campestris* pv *campestris* stammen, de aard en het gedrag van de toegepaste hommels en de inrichtings- en werkvoorschriften behorende bij het inperkingsniveau van de werkruimte.

Gg-X. campestris pv *campestris*

In de gg-*X. campestris* pv *campestris* stammen zijn plasmiden ingebracht met fluorescentie- en antibioticumresistentiegenen. De COGEM is niet bekend met wetenschappelijke publicaties waaruit blijkt dat *X. campestris* pv *campestris* pathogeen is voor mens of dier. Daarnaast heeft de COGEM geen redenen om aan te nemen dat de ingebrachte plasmiden van invloed zijn op de biologische eigenschappen van de gebruikte stammen (zoals virulentie, fitness of pathogeniteit), of dat deze de stammen enig voordeel op zullen leveren in het milieu. Wegens de afwezigheid van selectieve antibioticumdruk in het milieu, zal door de aanwezigheid van de plasmiden de overleving van de bacteriën niet verhoogd worden. Daarnaast zal het tot expressie brengen van de fluorescentie-coderende genen de bacteriën energie kosten, wat de groei zal vertragen.

Ter voorkoming van uitsleep door besmette kleding, acht de COGEM tijdens de spray-inoculatie het kledingvoorschrift bestaande uit een mondkapje, passende volledig beschermende kleding (overall) en schoenhoezen, voldoende.

Inperking hommels

Het totale aantal hommels betrokken bij het experiment zal worden bijgehouden door aan het begin, tussentijds bij nieuwe introducties, en aan het eind van het experiment levende, dode en afgedode hommels te tellen. Op deze wijze wordt geïnventariseerd of ontsnapping van hommels uit de PKM-III kas heeft plaatsgevonden.

De COGEM wijst erop dat de aanvrager niet heeft aangegeven met welke hommelssoort de bestuivingsproeven zullen worden uitgevoerd. De COGEM gaat er vanuit dat er gebruik gemaakt zal worden van werksters van de soort *B. terrestris*. Van deze soort wordt standaard gebruik gemaakt in commerciële kassen en is de levenscyclus goed beschreven.

Het is bekend dat werksters van de soort *B. terrestris* doelloos rondvliegen wanneer er in een kas geen nest aanwezig is. De COGEM wijst erop dat in commercieel verkrijgbare hommelnestdozen een koningin, eieren, poppen en larven aanwezig zijn. Zij stelt dat, bij gebruik van een nestdoos, koningin, eieren, poppen en larven voorafgaand aan het experiment uit de doos verwijderd moeten worden opdat een effectieve controle op ontsnapping mogelijk is.

De COGEM is van mening dat, onder het voorbehoud dat bij de bestuiving alléén werksters van de soort *B. terrestris* worden gebruikt, het onwaarschijnlijk is dat na de experimenteerperiode van 6 weken het aantal hommels door aanwas van de populatie van darren is toegenomen. Zij kan dit

echter niet uitsluiten. Daarom dient tijdens het experiment de nestdoos visueel op de aanwezigheid van eieren, poppen en larven geïnspecteerd te worden, en dienen deze verwijderd te worden. Op deze wijze wordt aanwas van de darrenpopulatie tijdens het experiment voorkomen, en wordt daardoor verhinderd dat bij de tellingen de ontsnapping van met *gg-X. campestris* pv *campestris* besmette hommels uit de PKM-III ruimte onopgemerkt blijft.

Tijdens het experiment zullen hommels die foerageren op de nectar bevattende bloemen, in contact komen met *gg-X. campestris* pv *campestris* en de bacterie via hun lichaam en pootjes direct of indirect (in de vorm van besmet stuifmeel) met zich meedragen. Recent heeft de COGEM een advies uitgebracht over de inperking van (gg-)geleedpotigen.¹² Op basis van de inrichtings- en werkvoorschriften voor een PKM-III ruimte,¹³ is in de onderhavige aanvraag het merendeel van de in het COGEM-advies aangegeven opties voor inperking van gg-geleedpotigen gerealiseerd. Aanvullend heeft de aanvrager aangegeven, dat de deur van de werkruimte naar de sluis is voorzien van een afritsbaar insectenscherm.

De COGEM adviseert met betrekking tot de inperking van de hommels aanvullend het volgende kledingvoorschrift in acht te nemen:

- Medewerkers dragen een haarkapje om te voorkomen dat eventueel op het haar aanwezige meeliftende *gg-X. campestris* pv *campestris* gecontamineerde hommels ongemerkt uit de PKM-III ruimte worden meegenomen.

Decontaminatie werkruimte

Voor de inperking van *gg-X. campestris* pv *campestris* is het van belang dat de PKM-III ruimte goed gedesinfecteerd wordt. De aanvrager geeft aan dat als desinfectans het middel 'Menno ter Forte' gebruikt zal worden. Dit middel is een quaternaire ammoniumverbinding en wordt volgens de aanvrager standaard gebruikt bij de desinfectie van vloeroppervlakken. De COGEM wijst erop dat er andere gevalideerde desinfectantia in de handel zijn die mogelijk beter werkzaam zijn tegen gramnegatieve bacteriën zoals benzoëzuur (actieve bestanddeel van het desinfectans 'Mennoclean'), en de combinatie van waterstofperoxide en azijnzuur ('Jet 5', perazijnzuur).^{14,15,16,17}

De toegepaste *gg-X. campestris* pv *campestris* stammen kunnen extracellulaire polysacchariden produceren. Deze polysacchariden bieden bescherming tegen stressvolle omstandigheden zoals uitdroging en spelen een rol bij aanhechting aan oppervlakken.¹⁸ Het is de COGEM niet bekend hoe lang *X. campestris* pv *campestris* in de afwezigheid van voedingsstoffen kan overleven op oppervlakken van bijvoorbeeld tafels of vloeren. Van de verwante soort *X. citri* subsp. *citri* is gerapporteerd dat deze in dergelijke omstandigheden tot 4 dagen kan overleven.¹⁹

De COGEM acht het waarschijnlijk dat er via de aerogene verspreiding van *gg-X. campestris* pv *campestris* (spray-inoculatie en transmissie door hommels) contaminatie optreedt van niet alleen vloeren en randen van tafels, maar ook van andere oppervlakken en voorwerpen zoals tafels, muren, plafonds, deurkrukken en aanwezige apparatuur. Zij beveelt daarom aan om na afloop van het experiment de gehele PKM-III ruimte te desinfecteren met een gevalideerd desinfectans of, indien validatie niet mogelijk is, de ruimte uit te gassen met een middel met bewezen bactericide werking zoals formaldehyde.^{15,16}

Conclusie en advies

De bestuivingsexperimenten van *B. oleraceae* met gg-*X. campestris* pv *campestris* met behulp van hommels zullen uitgevoerd worden onder PKM-III inperking waarbij daarnaast door de aanvrager opgestelde aanvullende voorschriften gehanteerd zullen worden. De COGEM is van mening dat extra aanvullende maatregelen noodzakelijk zijn. Deze maatregelen zijn samengevat:

- medewerkers dragen passende volledig beschermende kleding (overall) inclusief schoenhoezen en haarkapje
- de bestuivingsexperimenten worden uitsluitend met werksters van de hommelssoort *B. terrestris* uitgevoerd
- indien gebruik wordt gemaakt van een nestdoos, dienen voorafgaand aan het experiment koningin, eieren, poppen en larven verwijderd te worden, en dient tijdens het experiment deze nestdoos visueel geïnspecteerd te worden op de aanwezigheid van nieuw geproduceerde eieren, poppen en larven
- desinfectie zal door middel van een voor *X. campestris* pv *campestris* gevalideerd middel uitgevoerd worden.

Indien de werkzaamheden onder de hierboven weergegeven voorwaarden worden uitgevoerd, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Aanvullende opmerking

De aanvrager heeft informatie aangeleverd over de te gebruiken plasmiden pHc60-GFP, pRZT3-RFP en pUFZ75-GFP. De gegevens betreffende pRZT3-RFP en pUFZ75-GFP geven geen inzage in alle op de plasmiden aanwezige coderende genen. De gegevens betreffende pHc60-GFP laten zien dat deze verschillende 'open reading frames' (ORF's) bevatten. Echter, niet van alle ORF's is aangegeven voor welke eiwitten deze coderen. De COGEM heeft geen redenen om aan te nemen dat er op de plasmiden eigenschappen aanwezig zijn die van invloed zijn op de biologische karakteristieken van de gebruikte *X. campestris* pv *campestris* stammen, en die van belang zijn voor de fysieke inperking van deze stammen. De COGEM wijst er echter op dat bij vergunningaanvragen voor 'Ingeperkt Gebruik' alle informatie over de grootte, de functie en de herkomst van de verschillende onderdelen van de te gebruiken transfervector overlegd moeten worden.²⁰

Referenties

1. Vicente JG & Holub EB (2013). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular Plant Pathology* 14(1): 2-18
2. Ya-Wen & Lian-Hui Zhang (2008). Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol Rev* 32: 842-857
3. Schaad NW & White WC (1974). Survival of *Xanthomonas campestris* in soil. *Phytopathology* 64: 1518-1520
4. Roberts SJ *et al.* (2007). Modelling the spread of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* in module-raised *Brassica* transplants. *Plant Pathol* 56: 391-402

5. Alford DV (1975). Bumblebees. Eds Davis-Poynter, London
6. Van der Steen JM (2008). Infection and transmission of *Nosema bombi* in *Bombus terrestris* colonies and its effect on hibernation, mating and colony founding. *Apidologie* 39. DOI: 10.1051/apido:2008006
7. <http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pHC60.htm>
8. Bloemberg GV *et al.* (2000). Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(11): 1170-1176
9. Zhang Y *et al.* (2009). Visualisation of *hrp* gene expression in *Xanthomonas euvesicatoria* in the tomato phyllosphere. *Eur J Plant Pathol* 124: 379-390
10. COGEM (2011). Classificatie pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
11. Bijlage 5 'Inschaling van activiteiten met Genetisch Gemodificeerde Organismen'. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (2010). Ministerie van Infrastructuur en Milieu. <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20regelgeving/Bijlage%205.pdf>. Websitebezoek 1 juli 2013
12. COGEM (2013). Inperkingsmaatregelen voor werkzaamheden met gg-geleedpotigen onder 'ingeperkt gebruik'. COGEM advies CGM/130416-01
13. Bijlage 4 'Fysische inperking: Inrichtings- en werkvoorschriften'. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (2010). Ministerie van Infrastructuur en Milieu. <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20regelgeving/Bijlage%204.pdf>. Websitebezoek 1 juli 2013
14. BVF platform. Desinfectiedatabase. <http://www.falw.vu/dida/search.php?chem=10&cg=X&genus=Xanthomonas&species=23665>. (websitebezoek 28 juni 2013)
15. Groen B & Vermunt A, Groen Agro Control. (2008). Inventarisatie ontsmettings- en reinigingsmiddelen tegen *Clavibacter* in de tomatenteelt.
16. Stijger I & Wubben J (2007). Welk ontsmettingsmiddel te kiezen? *Vakblad voor de bloemisterij* 50: 40-41
17. BC Centre Disease Control Laboratory Services (2003). A guide to selection and use of disinfectants. http://www.bccdc.ca/NR/rdonlyres/EAA94ACF-02A9-4CF0-BE47-3F5817A25669/0/InfectionControl_GF_DisinfectntSelectnGuidelines_nov0503.pdf. (websitebezoek 28 juni 2013)
18. Crossman L & Maxwell Dow J (2004). Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes and infection* 6: 623-629
19. Gottwald T *et al.* (2009). The epidemiological significance of post-packinghouse survival of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* for dissemination of Asiatic citrus canker via infected fruit. *Crop Protection* 28: 508-524
20. Aanvraagformulier Ingeperkt Gebruik Regulier Micro-organismen, onderdeel C6 (2010). Ministerie van Infrastructuur en Milieu. <http://bggo.rivm.nl/Paginas/form.htm>. Website bezoek 1 juli 2013