

Nederlands onderzoek aan plantpathogene bacteriën in perspectief

Jan van der Wolf¹ en Gé van den Bovenkamp²

¹ Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen, Jan.vanderWolf@wur.nl

² NAK, Postbus 1115, 8300 BC Emmeloord

Ziekten veroorzaakt door plantpathogene bacteriën worden door producenten van uitgangsmateriaal, door telers en door exporteurs gezien als zeer bedreigend. De ziekteverwekker is vaak moeilijk op te sporen, kan zich symptomeloos verspreiden, is in plantmateriaal niet of moeilijk te bestrijden, resistentiebronnen zijn veelal onbekend en de economische schade bij uitbraak is vaak aanzienlijk. Onderzoek aan plantpathogene bacteriën in Nederland kent dan ook een lange historie. In deze schets wordt het belang van dit onderzoek voor het voetlicht gebracht. Er wordt stilgestaan bij het onderzoek uit heden en verleden. Ook worden kennisleemtes en onderzoekswensen geïnventariseerd.

I. Inleiding

Historie fyto bacteriologisch onderzoek in Nederland

Onderzoek aan plantenziekten, veroorzaakt door bacteriën, heeft in Nederland een lange historie. Al in 1880 deed J.H. Wakker, in het laboratorium van de botanicus Hugo de Vries in Amsterdam, als één van de eerste fyto bacteriologen onderzoek aan geelziek in hyacint. Hij isoleerde en kweekte de bacterie *Xanthomonas hyacinthi*, die toen nog beschreven werd als *Bacterium hyacinthi*, tot op reincultuur en voerde er inoculatie-experimenten mee uit. Een andere Nederlandse pionier was C.J.J. van Hall, die in 1902 binnen het Phytopathologisch Laboratorium Willie Commelin Scholten werkzaam was. Hij beschreef o.a. de bacterieziekte bij sering, die veroorzaakt wordt door *Pseudomonas syringae*, en de bacterieziekte zwartbenigheid in aardappel met als veroorzaker *Bacillus atrosepticus* (nu *Pectobacterium atrosepticum*). Daarna kwam het werk in Nederland lange tijd tot stilstand. Pas in de jaren zestig van de vorige eeuw kwam het onderzoek naar plantpathogene bacteriën in beweging toen er bij het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (IPO), een voltijds bacterioloog werd aangesteld (H.P. Maas Geesteranus). Deze hield zich vooral bezig met de ecologie van *Erwinia amylovora*, de veroorzaker van perving, en met (opnieuw!) zwartbenigheid in aardappel (*Pectobacterium* en *Dickeya* spp.). In de jaren zeventig breidde het Nederlandse

fyto bacteriologisch onderzoek zich verder uit. Binnen het IPO werd een seroloog (H. Vrugink) aangesteld die serologische methoden ontwikkelde voor de diagnostiek van plantpathogene bacteriën en die de eerste ELISA voor detectie van plantpathogene bacteriën introduceerde. Ook kwamen er bacteriologen in dienst bij de Plantenziektenkundige Dienst (bacterieziekten met een quarantainestatus), het toenmalige Rijksproefstation voor Zaadonderzoek (onderzoek aan zaadoverdraagbare bacteriën zoals *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* en *P. syringae* pv. *pisi*), het toenmalige Rijksinstituut voor Onderzoek van Bos- en Landschapsbouw “De Dorschkamp” (o.a. ecologisch onderzoek aan *Erwinia salicis* in wilg) en het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek (nu PPO Bloembollen) in Lisse (o.a. onderzoek naar diagnostiek van *Xanthomonas hyacinthi*). In die jaren werd binnen Wageningen Universiteit fundamenteel, epidemiologisch onderzoek verricht aan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in kool en aan *Erwinia amylovora* in appel en peer. Het bacteriologisch onderzoek in Nederland kreeg van 1995 – 2000 een flinke injectie tijdens de uitbraak van bruinrot (*Ralstonia solanacearum*) in de pootaardappelteelt en later, in hetzelfde gewas, van ringrot (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*). De schade door bruinrot liep van 1995 tot 1998 op tot ca. 7 M€ per jaar. Door het snel optimaliseren van detectiemethoden, het identificeren van infectiebronnen (w.o. bitterzoet en opper-

vlaaktewater voor *R. solanacearum*), het integraal toetsen van pootgoed en het nemen van adequate beheersmaatregelen (o.a. beregeningsverbod), konden de besmettingen, onder regie van de PD, al snel worden ingedamd. Zo toetste de NAK, op het hoogtepunt, per jaar ruim 60.000 monsters pootaardappelen met immunofluorescentie-microscopie op bruinrot- en ringrotbacteriën.

Inmiddels is de capaciteit van het wetenschappelijke bacteriologische onderzoek ongeveer gehalveerd t.o.v. die in de jaren zeventig en tachtig van de vorige eeuw! Door fusies en bezuinigingen op het landbouwkundig onderzoek werden bacteriologen, die met pensioen gingen, niet of slechts gedeeltelijk vervangen. Er is geen leerstoelgroep 'fyto bacteriologie' en er zijn geen universitaire docenten meer die zich voltijds met dit onderwerp bezig houden. Dit, terwijl er in het laatste decennium toch grote ziekteproblemen ontstonden door bacterieziekten. De vraag is, hoe bacteriologische kennis en expertise in Nederland kan worden behouden en bij voorkeur kan worden versterkt.

Recente ontwikkelingen

Binnen de, door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) gefinancierde, beleidsondersteunende (BO) programma's wordt nog altijd aandacht besteed aan diagnostiek van plantpathogene bacteriën, met name aan moleculaire technieken. Deze projecten worden voornamelijk uitgevoerd binnen Plant Research International (PRI) en PPO Bloembollen. Onderzoek aan methodiekontwikkeling wordt ook uitgevoerd door de keuringsdiensten (NAK, NAKT en BKD) en door particuliere laboratoria, zoals het Hilbrands Laboratorium voor Bodemziekten en Groen Agro Control. Voor zaadgebonden bacterieziekten heeft, sinds de hiervoor beschreven afname aan bacteriologisch onderzoek bij universiteiten, instituten en proefstations, een concentratie binnen de zaadveredelingsbedrijven (vooral in de tuinbouwsector) plaats gevonden. Een ander, in aanleg privaat initiatief, is het "Deltaplan Erwinia" (aardappel en bloembollen) dat grotendeels door het betrokken bedrijfsleven wordt gefinancierd en dat vooral toegepast onderzoek beoogt. Het Deltaplan Erwinia genereert ook onderzoekcapaciteit bij de betrokken bedrijven. Onderzoek binnen private ondernemingen leidt echter niet noodzakelijkerwijs tot kennis die vrij toegankelijk is. Voeding door, en aansluiting bij, fundamenteel en strategisch wetenschappelijk onderzoek aan de betrokken bacteriën blijft van wezenlijk belang. Binnen de Plantenziektenkundige Dienst con-

centreert de onderzoekaandacht zich, naast bruin- en ringrot, steeds meer op de quarantaine (Q) -organismen *C. michiganensis* pv. *michiganensis* en *X. fragariae*.

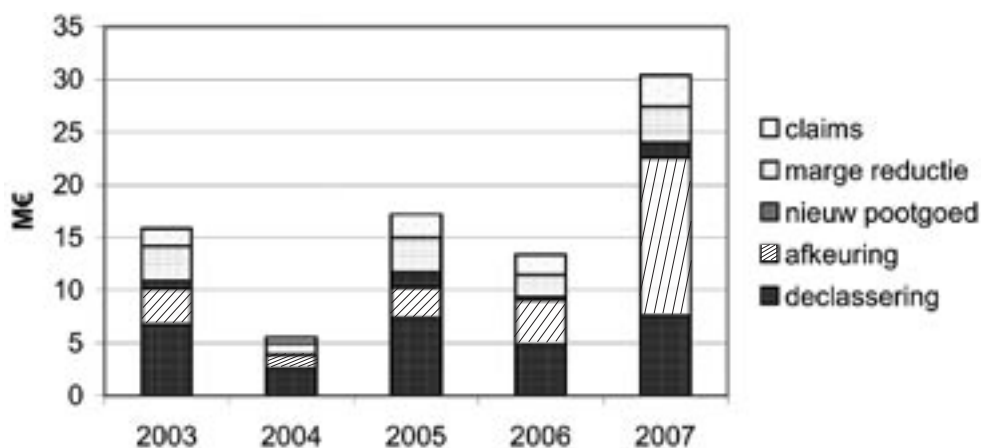
Daarnaast wordt op dit moment door PRI en PPO voor een aantal belangrijke bacteriële ziekteverwekkers ook ecologisch onderzoek verricht, zoals onderzoek aan *Pectobacterium* en *Dickeya* in bloembollen en aardappelen, aan zaadinfectie door *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in koolgewassen en aan *X. fragariae* in aardbei.

Belang van bacteriologisch onderzoek

In uitgangsmateriaal (zaden, bollen, pootgoed, etc) worden, naast virusziekten, bacterieziekten beschouwd als de grootste bedreiging. Bacteriën kunnen immers gedurende langere perioden latent en in lage concentraties in uitgangsmateriaal aanwezig zijn. Detectie van deze lage aantallen is vaak gecompliceerd. Zowel de kleinschalige (binnen de plant) als de grootschalige (in het gewas) verdeling van de ziekteverwekker is in de regel niet homogeen. In besmet zaad bijvoorbeeld, wordt vaak een Poisson-distributie van de betrokken bacteriën gevonden. Dit heeft consequenties voor de bemonstering.

Componenten van plantendelen in te toetsen extracten (saprophytische bacteriën bij uitplaten, bacteriën die kruisreacties veroorzaken in serologische assays, stoffen die PCR- amplificatie hinderen) kunnen storend werken op de detectie van pathogene bacteriën. Ook de genetische en serologische diversiteit van bacteriepopulaties kunnen detectie bemoeilijken, zoals bij *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, een pathogeen met een brede waardplantreeks. Bij ziekteontwikkeling kunnen bacteriën zich snel verspreiden via grondwater, spatwater, aerosolen, insecten en teeltmaatregelen. In Nederland zijn geen gewasbeschermingsmiddelen toegelaten waarmee plantpathogene bacteriën afdoende kunnen worden bestreden. Tenslotte is een aantal pathogene bacteriën als quarantaine-organismen op de A1 en A2 EPP0-lijst geplaatst. Besmettingen met deze organismen kunnen tot verregaande beheersmaatregelen leiden, met alle financiële gevolgen van dien.

Het economisch belang van bacterieziekten voor de Nederlandse land- en tuinbouw is dan ook groot. Alleen al aan ziekten veroorzaakt door *Dickeya* en *Pectobacterium* (Erwinia), in de pootaardappel- en bloembolteelt, wordt per jaar tegenwoordig een verlies geleden van minimaal 25 M€ (Figuur 1). In 2008 veroorzaakte *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, de veroorzaker van bacteriekanker, een miljoenen schade in de tomatenteelt (Anonymus, 2008).



Figuur 1. Geschatte schade in de jaren 2003 tot 2007, veroorzaakt door de ziekten zwartbenigheid en stengelnatrot (*Dickeya* en *Pectobacterium*) in de pootaardappelteelt. Nieuw pootgoed, afkeuring en declassering: schade voor de pootgoedteler; claims en marge reductie: schade voor de handelshuizen (Bron LEI).

De bacterieziekten die op dit moment in de Nederlandse teelten de grootste schade veroorzaken zijn te vinden in Tabel 1.

Verwacht wordt dat de schade als gevolg van bacterieziekten in de toekomst zal toenemen. Door de opwarming van de aarde zal er, naar verwachting, tijdens het groeiseizoen meer en heviger neerslag vallen waardoor ziekteontwikkeling en verspreiding van pathogene bacteriën wordt bevorderd. Verder rukken sommige insecten (cicade-achtigen), die fytoplasma's kunnen overbrengen, verder op naar het noorden. De Nederlandse land- en tuinbouw concentreren zich steeds meer op de kennis- en kapitaalintensieve vermeerdering van uitgangsmateriaal. Een deel van dit uitgangsmateriaal, bijvoorbeeld groentezaden, wordt op wereldschaal in verschillende geografische gebieden geproduceerd, waardoor de kans op introductie van nieuwe bacteriële pathogenen of pathogeenvarianten wordt vergroot.

II. Diagnostiek

Beheersing van bacterieziekten berust tot op heden vooral op preventie. Het gebruik van pathogeenvrij uitgangsmateriaal is één van de belangrijkste elementen binnen een preventiestrategie. Vandaar dat binnen het huidige bacteriologisch onderzoek veel aandacht besteed wordt aan diagnostiek. Het blijft noodzakelijk om via regelmatige surveys introducties van nieuwe pathogenen en pathogeenvarianten op te sporen. Dit geldt in het bijzonder voor quarantaineorganismen. De beschikbaarheid van betrouwbare, betaalbare en efficiënte isolatiemethodieken is daarbij essentieel. Inmiddels zijn er al voor veel pathogene bacteriën op DNA gebaseerde detectiemethoden ontwikkeld. De grootschalige, routinematige toepassing daarvan binnen de keuringssystematiek komt voorzichtig op gang. Er is een sterke behoefte aan snelle methodieken waarmee levende van dode bacteriën

Tabel 1. Belangrijke bacterieziekten in de Nederlandse land- en tuinbouw.

Pathoogeen	Gewas	Status	Ziekte	Schade
<i>Pectobacterium</i> en <i>Dickeya</i>	Aardappel		Zwartbenigheid	17-30 m€/jaar
<i>Pectobacterium</i> en <i>Dickeya</i>	Bloembollen		o.a. snot bij hyacint	Ca. 10 m€/jaar
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Kool		Zwartnervigheid	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Tomaat	A2	Bacteriekanker	1-5 M€(2008)
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Aardbei	A2	Bladvlekkenziekte	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Boomteelt en bloemisterij		Wortelknobbel	
<i>Erwinia amylovora</i>	Fruitteelt	A2	Perenvuur	
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Watermeloen en komkommer		"Fruit blotch"	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	Paardenkastanje		Bloedingsziekte	

kunnen worden onderscheiden. Validatie van methodieken is daarbij een tijdrovende, dure maar onontbeerlijke zaak. Door de Plantenziektenkundige Dienst wordt geëist dat alle, door de keuringsdiensten gebruikte, methodieken een volledige validatie hebben doorlopen op basis van NEN-ISO-normen.

Schadedrempels

Voor veel pathogenen die kwaliteitsziekten kunnen veroorzaken, ontbreekt veelal nog de kennis over schadedrempels. Wat betekent een bepaalde laboratoriumuitslag m.b.t. de verwachte schade? In een aantal gevallen zijn contaminaties van plantmateriaal met ziekteverwekkers nauwelijks uit te sluiten. Contaminaties leiden echter niet altijd tot infecties en infecties niet tot meetbare schade. Kennis over de relaties tussen besmettingsniveaus, omgevingsfactoren en te verwachten schade ontbreekt veelal. *Agrobacterium tumefaciens* en *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* komen bijvoorbeeld vaak in lage dichtheden in de grond voor, maar de kans op het optreden van respectievelijk wortelknobbel of natrot is onbekend.

Bemonstering en extractie

Het gebruik van gevalideerde, betrouwbare bemonsterings- en extractieprotocollen is essentieel voor het aantonen van pathogenen in niet-symptomatisch plantmateriaal. Deze protocollen ontbreken voor een aantal belangrijke pathogenen, inclusief quarantaineorganismen zoals *Erwinia amylovora* en *Xanthomonas fragariae*. Voor andere pathogenen (bijv. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) zijn de bemonsteringstechnieken bewerkelijk en kostbaar. Een goede kennis van de epidemiologie van deze ziekten vormt de basis voor het ontwikkelen van bemonsteringsprotocollen. Dit vraagt vaak onderzoek over verschillende jaren.

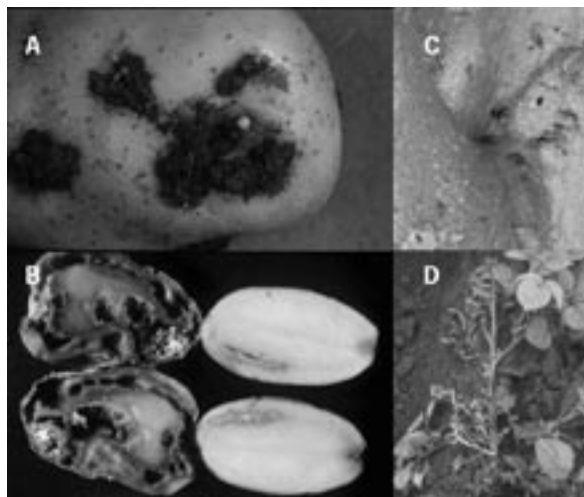
Monitoring van pathoogpopulaties

In de afgelopen decennia is Nederland een aantal malen geconfronteerd met de introductie van nieuwe pathogenen of pathoogvarianten. Daarbij kan gedacht worden aan de ernstige uitbraak van bruinrot (*Ralstonia solanacearum*) in 1995, incidentele besmettingen met ringrot (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*), de verspreiding van de bloedingsziekte (*Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*) in paardenkastanje, maar ook aan de vondst van een nieuwe variant van *Erwinia chrysanthemi* (Dickeya) in 2007 (Figuur 2). Regelmatige surveys, gevolgd door (genetische)

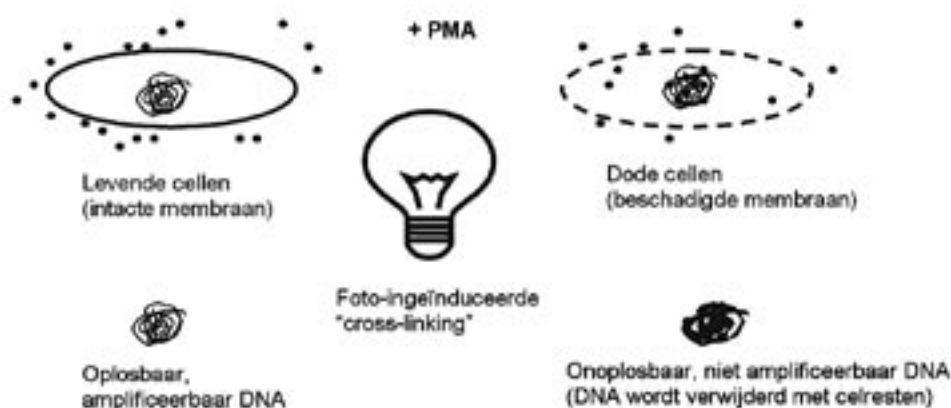
karacterisering van bacteriële pathogenen, blijven noodzakelijk. Voor bacteriesoorten die virulente en avirulente vormen kennen (bijvoorbeeld *E. carotovora* subsp. *carotovora* in de aardappelteelt), dienen merkers voor virulentie ontwikkeld te worden. De beschikbaarheid van goed gevalideerde, internationaal geaccepteerde karakteriseringsmethodieken is bij dit alles van wezenlijk belang.

Gevalideerde detectiemethoden

Keuringsdiensten streven ernaar om voor detectie van plantpathogenen, wanneer betrouwbare serologische toepassingen niet voorhanden zijn, zo veel mogelijk gebruik te maken van (kwantitatieve) TaqMan PCR methoden. Het gebruik van serologische methoden voor bacteriën, zoals cel-kleuring met immunofluorescentie en ELISA, staat regelmatig ter discussie vanwege problemen met specificiteit en soms ook de serologische diversiteit van het te detecteren pathoog. Om de vereiste gevoeligheid te halen moet echter detectie met een TaqMan PCR-methode veelal voorafgegaan worden door een verrijking van de bacterie in of op een groeimedium (Bio-Taqman PCR). Voor controle op het extraheren, detecteren en kwantificeren van pathogene bacteriën zijn betrouwbare interne controles nodig. Gestreefd wordt naar protocollen waarmee verschillende pathogene bacteriën in het monster, al dan niet na verrijking, gelijktijdig



Figuur 2. Introducties van nieuwe ziekteverwekkers: A. *Ralstonia solanacearum* – bruinrot in aardappel (vuile ogen, foto PD), B. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* - ringrot in aardappel (knolrot), C. *Pseudomonas* sp. – bloedingsziekte in (foto werkgroep Aesculaap), D. *Dickeya* sp. – zwartbenigheid aardappel.



Figuur 3. Propidium monoazide (PMA) PCR voor DNA amplificatie van specifiek levende bacteriecellen. PMA is wel in staat om dode cellen met een beschadigde membraan binnen te dringen, maar levende cellen met een intacte membraan niet. PMA hecht zich aan het DNA en wordt met behulp van foto-geïnduceerde cross-linking covalent gebonden aan het DNA. Tijdens de DNA-extractie wordt het PMA-DNA complex met de celresten verwijderd.

gedetecteerd kunnen worden (multiplex PCR, BioPlex PCR) en waarmee dus kosten worden bespaard.

Levend versus dood

Gebruik van PCR kan het detecteren van dode bacteriën niet uitsluiten, zelfs niet als een Bio-PCR protocol wordt toegepast (Schaad *et al.*, 1995). In bepaalde situaties is specifieke detectie van levende cellen gewenst, bijvoorbeeld na een zaadbehandeling met warm water. Er zijn nu moleculaire methoden beschikbaar waarmee detectie van dode cellen in PCR kan worden uitgesloten. Dit kan door, in plaats van DNA, RNA te detecteren. RNA wordt in tegenstelling tot DNA snel afgebroken na celdood (Van der Wolf, 2004). Ook zijn er methoden, zoals PMA-PCR, waarmee selectief het DNA van dode bacteriecellen kan worden verwijderd (zie Figuur 3, Nocker *et al.*, 2007).

Isoleren versus detecteren

Bij keuringsdiensten blijft de vraag bestaan of, zoals nu is voorgeschreven in EPPO-protocollen, isolatie van Q-organismen noodzakelijk is. In sommige gevallen groeit het pathogeen slechts langzaam en wordt het op agarmedia vaak overgroeid door andere micro-organismen. Dit geldt o.a. voor *Xanthomonas fragariae* in aardbei en *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in aardappel. E.e.a. leidt er regelmatig toe dat uit (Bio-) PCR positieve monsters de doelbacterie niet geïsoleerd kan worden. Verbetering van de groeimedia, door deze selectiever te maken, is één mogelijkheid. Een andere oplossing voor dit probleem is mogelijk het gebruik van goed gevalideerde, op DNA-detectie gebaseerde, technie-

ken, die in staat zijn om dode van levende bacteriën te onderscheiden. De betrouwbaarheid zou verder verhoogd kunnen worden door meerdere DNA-sequenties, bij voorkeur virulentiegenen, simultaan aan te tonen. Hiermee ontstaat een hoge mate van zekerheid dat monsters daadwerkelijk besmet zijn met het vitale doelorganisme. Uiteraard kan een dergelijke aanpak niet zonder overleg met, en instemming van, de landen die participeren binnen EPPO.

III. Ontsmetting en sanitatie

Ontsmetting

Bij de beheersing van bacterieziekten blijven er vragen omtrent de effectiviteit van beschikbare bactericiden voor ontsmetting van materialen en machines. De effectiviteit daarvan is sterk afhankelijk van de verontreiniging met organisch materiaal, zoals grond en gewasresten.

Sanitatie

Het ontbreekt aan (toegelaten) bactericiden en antagonisten (inclusief bacteriofagen) voor de bestrijding van plantpathogene bacteriën in en op plantmateriaal. Er is een terugkerende vraag vanuit de sector naar middelen voor sanitatie. Overheid en bedrijfsleven zouden hier gezamenlijk naar moeten kijken. Hierbij moet ook de potentie van middelen, die weerstand tegen bacteriële pathogenen in planten induceren, onderzocht worden. Het voordeel van deze laatste middelen is dat er minder risico is op resistentievorming. In dit type onderzoek moet voortdurend rekening worden gehouden met de commerciële haalbaarheid van toepassing,

omdat voor toelating kostbare registratiedossiers nodig zijn.

IV. Ecologie

Beheersing van bacterieziekten berust, naast gebruik van pathogeenvrij uitgangsmateriaal en sanitatie, ook op het voorkómen van introducties en verspreiding van de ziekteverwekker. Kennis van de ecologie is noodzakelijk voor het ontwikkelen van efficiënte hygiëne- en teeltmaatregelen.

Besmettingsbronnen

Voor een aantal belangrijke, bacteriële ziekteverwekkers is het belang van de verschillende infectiebronnen onbekend. Via kwantitatief ecologisch onderzoek kunnen infectiebronnen worden geïdentificeerd en kan het relatieve belang worden bepaald. Deze gegevens kunnen worden gebruikt in bio-economische modellen (Breukers, 2006). Een dergelijke aanpak is al toegepast om de effectiviteit van maatregelen, die voor beheersing van bruinrot in de aardappelteelt kunnen worden gebruikt, in kaart te brengen. Ook dient er, met het oog op de ontwikkeling van een effectieve bemonsteringssysteem, meer kennis te komen over de verdeling van de ziekteverwekkers in ruimte en tijd (zie II).

Overlevingsstrategieën

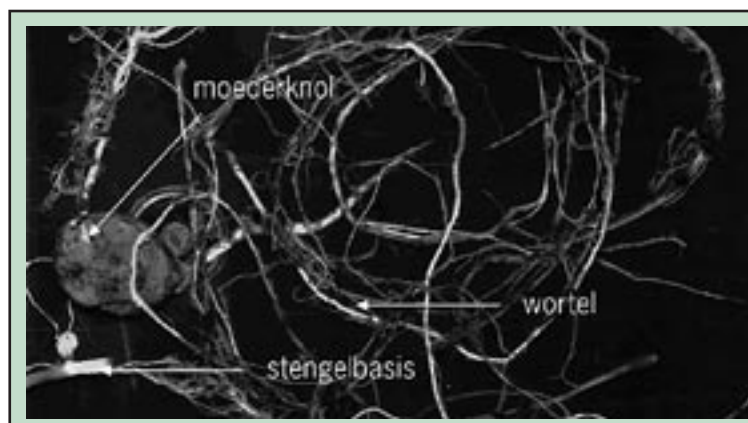
Om (onverwachte) introducties te voorkomen is een goede kennis van overlevingsstrategieën essentieel. Onder andere op het gebied van overleving in gewasresten en in alternatieve waardplanten liggen er vragen. Veel van de economisch belangrijke pathogenen hebben namelijk een brede waardplantenreeks. Ook is onderzoek gewenst naar de aanwezigheid van cellen die wel levend, maar niet kweekbaar zijn ("viable but not culturable"), omdat deze makkelijk gemist kunnen worden in op kweek gebaseerde technieken (Van Overbeek *et al.*, 2004).

Kolonisatie van de waardplant

Dit type studies is nodig om vast te kunnen stellen wanneer en waar sanitatie van plantmateriaal zin heeft. Door de kolonisatie van het pathogeen in vatbare en resistente cultivars te volgen, kunnen basisgegevens worden gegenereerd voor resistentieveredeling. Met fluorescente (GFP) gemerkte bacteriën, in combinatie met UV-microscopie of met confocale laserscanning microscopie, kan de kolonisatie van planten in detail gevolgd worden. De verwachting is dat in de nabije toekomst niet-invasieve technieken beschikbaar komen voor studie naar kolonisatie van de plant met GFP-gemerkte bacteriën (Figuur 4).

V. Plant – pathogeen interacties

Mechanistisch onderzoek naar factoren die van belang zijn voor ziekte-expressie is van belang voor o.a. de resistentieveredeling tegen bacterieziekten en onderzoek naar specifieke bactericiden. Door het uitvoeren van dit type onderzoek is er voor *Pectobacterium atrosepticum* een transcriptiefactor geïdentificeerd die bij overexpressie, via triggering van het resistentiemechanisme, leidt tot resistentie van de waardplant. Een dergelijke benadering zou in theorie bruikbaar kunnen zijn om, bijvoorbeeld via cisgenese, plantmateriaal resistent te maken. Ook zijn er plantenmetabolieten geïdentificeerd die de waardplant kunnen aanzetten tot locale of systemische resistentie tegen bacteriële pathogenen. Recentelijk is zo de rol van azelaïnezuur in *Arabidopsis* vastgesteld. Getracht kan worden dergelijke metabolieten tot overexpressie te brengen. Mechanistisch onderzoek heeft ook geleid tot ontdekking van 'quorum sensing' bij bacteriën. Bij quorum sensing spelen signaalstoffen van de bacterie een rol, waarmee de dichtheid van de eigen populatie wordt gemeten. Pas als de populatiedichtheid hoog genoeg is om de waardplant te kunnen infecteren, gaat



Figuur 4. Kolonisatie van ondergrondse delen van de aardappel met een GFP-gemerkte *Dickeya* sp., zichtbaar gemaakt met een niet-invasieve methode (GFP-screen). Plantendelen geïnfecteerd met GFP-gemerkte *Dickeya* sp. lichten op.

de bacterie over tot expressie van virulentiefactoren. De bacterie blijft zo lange tijd verborgen voor het afweermechanisme van de plant. Quorum sensing speelt ook een belangrijke rol bij vorming van biofilms, waarbinnen bacteriën zich kunnen beschermen tegen ongunstige omstandigheden en bactericiden. Door de signaalstoffen van de ziekteverwekker te inactiveren ('quorum quenching'), kan infectie worden voorkomen, zoals is aangetoond voor *Pectobacterium* in aardappel, of de vorming van biofilms worden verstoord

Mechanistisch onderzoek vraagt een fundamenteel-strategische aanpak en dient binnen, of in samenwerking met, universiteiten uitgevoerd te worden. Op dit moment wordt op beperkte schaal onderzoek gedaan aan (moleculaire) interacties tussen pathogene bacteriën en de plant (rol van bacteriële metaboliëten bij Fytopathologie (WUR), geïnduceerde resistentie bij de Plant-Microbe Interactions groep (Universiteit Utrecht)). Gezien het belang van plantpathogene bacteriën voor de Nederlandse land- en tuinbouw zou dit onderzoeksveld sterk moeten worden uitgebreid. Financiering kan komen vanuit wetenschappelijke fondsen, zoals NWO en STW.

VI. Naar een integrale benadering

Beheersingsstrategieën

Het hiervoor geschetste, noodzakelijke onderzoek naar de ecologische aspecten van plantpathogene bacteriën, plant-pathogeeninteracties, toetsingsprotocollen en mogelijkheden voor ontsmetting en sanitatie moet uiteindelijk resulteren in integrale, ketengerichte en kosteneffectieve beheersingsstrategieën. Samenwerking tussen bèta- en gamma-onderzoekers is hiervoor van groot belang. Onderzoekinstellingen, keuringsdiensten, Plantenziektenkundige Dienst en bedrijfsleven moeten daartoe intensief blijven communiceren en samenwerken. Van dit laatste is het 'Deltaplan Erwinia' een goed voorbeeld. In nieuwe onderzoeksprogramma's moet voldoende budget vrijgemaakt worden om een dergelijke aanpak mogelijk te maken.

Binnen het onderzoek wordt veelal gekeken naar het effect van één maatregel op de beheersing van bacteriële plantenziekten. Echter, een effectieve beheersstrategie vraagt om een integrale benadering waarbij de individuele beheersmaatregelen op elkaar worden afgestemd. Kritische controlepunten moeten worden geïdentificeerd tijdens teelt, oogst en opslag. Via bio-economische modellering moet de effectiviteit en de economische haalbaarheid van (combinaties

van) beheersmaatregelen vaker in kaart worden gebracht, zoals eerder gedaan voor bruinrot in aardappel (Breukers, 2006). De modellen moeten via onderzoek in de praktijk worden geëvalueerd.

Het is daarbij van wezenlijk belang om voldoende fundamenteel onderzoek te blijven genereren ter ondersteuning en voeding van het (toegepaste) onderzoek bij keuringsdiensten, bedrijfsleven, Plantenziektenkundige Dienst etc. Een leerstoel 'fyto bacteriologie' aan de WUR kan bij dit alles een belangrijke vliegwielfunctie vervullen. Net als bij bacteriën, kun je kennis vermenigvuldigen door te delen!

Literatuur

- Anonymus (2008) Miljoenschade door Clavibacter. Groenten en Fruit 62, 11 januari 2008
- Breukers A (2006) Bio-economic modelling of brown rot in the Dutch potato production chain. PhD thesis, Wageningen University, 141 pp
- Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD & Camper AK (2007) Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. Applied and environmental microbiology 73: 5111 – 5117
- Schaad NW, Cheong SS, Tamaki S, Hatziloukas E & Panopoulos NJ (1995) A combined biological amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv *syringae* in bean seed extracts. Phytopathology 85: 243-248
- Van der Wolf JM, Van Beckhoven JRCM, De Haan EG, Van den Bovenkamp GW & Leone GOM (2004) Specific detection of *Ralstonia solanacearum* 16S rRNA sequences by AmpliDet RNA. European Journal of Plant Pathology 110: 25 –33
- Van Overbeek LS, Bergervoet JHW, Jacobs FHH & Van Elsas JD (2004) The low temperature induced viable but nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. Phytopathology 94: 463-469