

Effectieve kolonisatie van aardappelplanten door *Dickeya*-soorten (*Erwinia chrysanthemi*)

Jan van der Wolf, Robert Czajkowski en Henk Velvis

PRI Bio-interacties en Plantgezondheid

De bacterieziekten zwartbenigheid en stengelnatrot, veroorzaakt door *Pectobacterium* en *Dickeya* (*Erwinia*)-soorten, berokkenen grote schade aan de pootaardappelteelt. Bij PRI en HZPC wordt onderzoek verricht naar de verspreiding van deze pathogenen tijdens teelt- en (na) oogst. Het was al bekend dat er bij aanwezigheid van rotte knollen, tijdens oogst en na oogst, versmering van pootgoed kan plaatsvinden. Getracht is de vraag te beantwoorden hoe verspreiding tijdens de teelt kan plaatsvinden, zowel via boven- als via ondergrondse delen van de plant.

Van bovengronds naar ondergronds

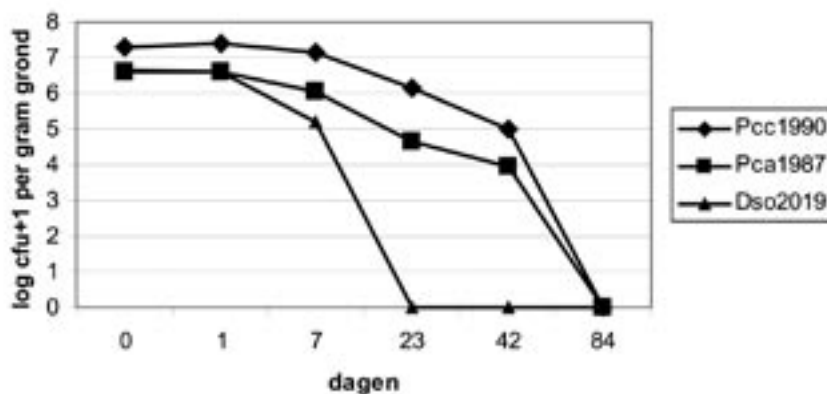
Hoewel introductie van *Erwinia* via natuurlijke openingen (stomata) in blad en stengel niet uitgesloten kan worden, is voor een effectieve besmetting van het aardappelloof beschadiging nodig. Besmetting van verwond loof kan plaatsvinden tijdens teeltwerkzaamheden, zoals het spuiten met gewasbeschermingsmiddelen. Machines kunnen in aanraking komen met systemisch geïnfecteerde planten waarna het inoculum verder wordt verspreid via verwonde stengels of bladeren. Loof kan ook besmet raken door dieren en mensen die door het gewas lopen en de bacterie verspreiden via vacht, kleding of schoeisel. De vraag is of besmet loof vervolgens kan resulteren in besmette knollen. In principe zijn er twee routes voorstelbaar. De eerste route is via de grond als de bacteriën uit loofresten lekken. Dit kan tijdens de gewasgroei, of ook na loofvernietiging als besmette loofresten boven de dochterknollen blijven liggen. De tweede route is via systemische verspreiding vanuit het loof via stengels, wortels en stolonen naar de dochterknollen. Aangenomen wordt, dat een neerwaartse beweging van de bacterie tegen de sapstroom van de plant in, onwaarschijnlijk is.

Binnen PPO heeft Nicolien Roozen onderzoek uitgevoerd naar het risico vanuit besmet loof. Zij vond dat in aardappelplanten, symptomeloos besmet met *Pectobacterium atrosepticum* en *Dickeya dianthicola*, hoge dichtheden van gemiddeld 10^6 bacteriën per ml extract aanwezig waren. Dit kwam overeen met onderzoek dat eerder in Schotland uitgevoerd is (Burgess *et al.*, 1994).

Als dit loof werd uitgespreid op de grond boven pathogeen-vrije knollen en er daarna kunstmatig werd berekend, kon *P. atrosepticum* in de knollen worden aangetoond in een dichtheid van ca. 100 cellen per knol, ook als de knollen wat dieper in de grond lagen (Roozen, niet gepubliceerd). *D. dianthicola* kon echter niet worden teruggevonden in de knollen. Uit recent onderzoek binnen PRI is gebleken dat *Dickeya* spp.-populaties sneller afsterven in grond dan *Pectobacterium* spp. (Figuur 1). Mogelijk is dat een verklaring. Besmetting van aardappelplanten vanuit besmet loof via inspoeling in grond lijkt dus wel mogelijk voor *Pectobacterium* spp., maar is niet aangetoond voor *Dickeya* spp.

Binnen PRI en HZPC is onderzoek gedaan naar neerwaarts transport van de bacterie, vanuit besmet loof, naar de ondergrondse delen van de plant. In een kas werden planten opgekweekt tot het stadium dat er stolonen (ondergrondse stengels) gevormd werden. Drie stengels van elke plant werden geïnoculeerd met een GFP-gemerkte stam van *Dickeya* sp. via injectie met een besmette pipetpunt. De wond werd met plastic folie afgedekt om uitdrogen te voorkomen. De planten werden dertig dagen gekweekt en daarna m.b.v. uitplaten, UV-microscopie en confocale laser scanning-microscopie geanalyseerd op *Dickeya*-besmetting. Om de bacterie in plantendelen goed terug te kunnen vinden m.b.v. microscopie werden plantendelen eerst ingebed in een agarmedium en geïncubeerd gedurende twee dagen bij 27 °C. Hierbij vermeerderde *Dickeya* zich in het plantenweefsel, zodat niet

ARTIKEL



Figuur 1. Overleving van spontane antibioticum-resistente stammen van *Dickeya* sp. (*Dso* 2019), *Pectobacterium atrosepticum* (*Pca* 1987) en *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc* 1990) in grond.

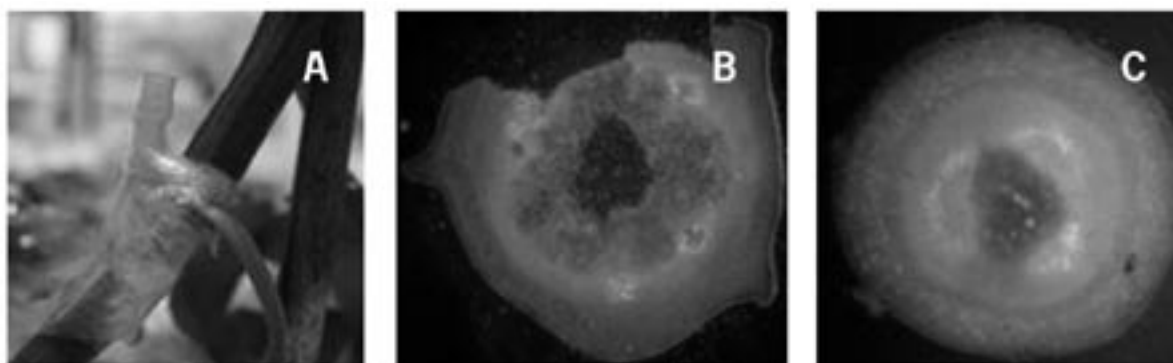
invasief de besmettingen in de plantendelen getraceerd konden worden. De bacterie werd met uitplaten en microscopie in alle plantendelen teruggevonden: in de stengel, wortels, stolonen en dochterknollen (Figuur 2). Een identiek experiment in het veld met een antibioticumresistente mutant van *D. dianthicola* (uitgevoerd bij HZPC) toonde aan dat de bacterie zich wel vanuit de wond naar de stengelbasis kon bewegen, maar niet tot in de ondergrondse delen van de plant. Mogelijk is dit een effect van de gekozen stam. Ook in andere (veld-) experimenten werden grote verschillen in virulentie tussen stammen van *Dickeya* waargenomen. Vanuit besmette bladeren kon *Dickeya* sp. wel de stengel, maar niet de ondergrondse delen van de plant bereiken.

Verspreiding ondergronds

Van *P. atrosepticum* is bekend dat deze zich vanuit rotte knollen kan verspreiden via vrij water tot een afstand van een tot drie meter (Harrison & Brewer, 1982). Onderzoek van HZPC in het veld

liet zien dat *Dickeya* zich vanuit besmette knollen tot tenminste een meter kan verplaatsen (afstand van drie planten) binnen een rij en ook naar buurplanten in een volgende rij. De bacteriën kunnen knollen infecteren via wonden, of lenticellen die met nat weer openstaan. Het was niet bekend of de bacteriën in staat zijn wortels te penetreren en ook niet of ze, vanuit die wortels, andere delen van de plant, inclusief de dochterknollen, systemisch kunnen infecteren.

In kasexperimenten met een GFP-gemarkeerde stam van *Dickeya* sp., werd gevonden dat inoculatie van grond, waarin aardappelplanten werden gekweekt, al na één dag resulteerde in systemische infectie van de wortels. Het maakte nauwelijks uit of planten werden geïnoculeerd met een beschadigd wortelstelsel (ca. 30% verwijderd met een mes) of met een intact wortelstelsel. Na vijftien dagen werd de bacterie in de stengels teruggevonden en na dertig dagen werden planten met zwartbenigheid waargenomen. De bacterie kon na dertig dagen ook getraceerd worden in stolonen en in het navelende van dochterknollen (Tabel 1). *Dickeya* sp.



Figuur 2. Systemische infectie van aardappelplanten door GFP-gemarkeerde stam van *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*) na stengelinoeculatie (A). De GFP gemerkte bacteriën zijn terug te vinden in vaatbundels van stengels (B) en stolonen (C).

Tabel 1. Systemische infectie van aardappelplanten door een GFP-gemerkte stam van *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*) vanuit geïnfecteerde gronden (percentage inwendig geïnfecteerde monsters).

Tijd na inoculatie (dagen) ¹	Wortels	Stolonen	Dochterknollen
1	17		
15	42	13	13
30	75	50	38

¹ Planten hadden eerste stolonen gevormd (ca. 10 cm hoog) toen potgrond werd geïnfecteerd met de bacterie

is dus uitstekend in staat om wortels binnen te dringen en van daaruit de planten te koloniseren. Aangenomen wordt, dat de bacteriën vooral tijdens de vorming van laterale wortels, waarbij natuurlijke openingen ontstaan, naar binnen dringen. Dit is in het verleden waargenomen bij planten *in vitro* werden opgekweekt (Underberg, 1992).

Besmettingen aan de navelinden die ontstaan bij systemische infecties zijn lastig via knolbehandelingen, zoals desinfectie met bactericiden of fysische methoden, te elimineren. Daarom moet onderzocht worden hoe efficiënt bacterie-infecties, na planten van pootgoed, vanuit navelinden verlopen t.o.v. infecties in het periderm (o.a. lenticellen).

Naar behandeling van pootgoed

In een volgende fase van het onderzoek zal gekeken worden naar de mogelijkheid om pootgoed te beschermen met antagonisten. Vanuit pootgoed zijn diverse soorten antagonisten geïsoleerd die *in vitro* en op aardappelknolschijven effectief de groei van *Dickeya* afremmen of ook de bacteriën doden. Momenteel wordt onder-

zoek gedaan naar de effectiviteit van antagonisten om systemische infecties van *Dickeya* vanuit de knol naar stengel te voorkomen.

Dit onderzoek wordt gefinancierd vanuit het beleidsondersteunende onderzoeksprogramma van het Ministerie van LNV. Robert Czajkowski werkt sinds 1 februari 2009 verder aan het onderzoek met een PhD-beurs van STW (nr. 10306)

Literatuur

- Burgess PJ, Blakeman JP & Perombelon MCM (1994) Contamination and subsequent multiplication of soft rot *Erwinias* on healthy potato leaves and debris after haulm destruction Plant Pathology 43, 286-299
- Harrison MD & Brewer JW (1982) Field dispersal of soft rot bacteria In: Phytopathogenic Prokaryotes, Vol 2, ed. Mount, MS & Lacy, GH, pp 31-53 New York: Academic Press
- Underberg HR (1992) Ecological model studies on the colonization patterns and population dynamics of *Erwinia chrysanthemi* Burkholder, Mc Fadden and Dimock 1953 in the rhizosphere of potato In: Facultät für Biologie, pp 117 Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen