

Bruinrot bij aardappel

Jaap D. Janse¹, Maria Bergsma-Vlami², Alex van Beuningen², Hans Derks², Henk Hendriks², Nico Horn², Frans Janssen², Jeroen Kavelaars², Annelien Roenhorst², Marjoleine Schoeman², Maarten Steeghs², Napoleon N.S. Tjou-Tam-Sin², Monique Verdel² en Marcel Wenneker³

¹ Afdeling Laboratoriummethoden en Diagnostiek, Nederlandse Algemene Keuringsdienst, Postbus 1115, 8300BC Emmeloord, jjanse@nak.nl

² Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen

³ Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Sector Fruit, Postbus 200, 6670 AE Zetten

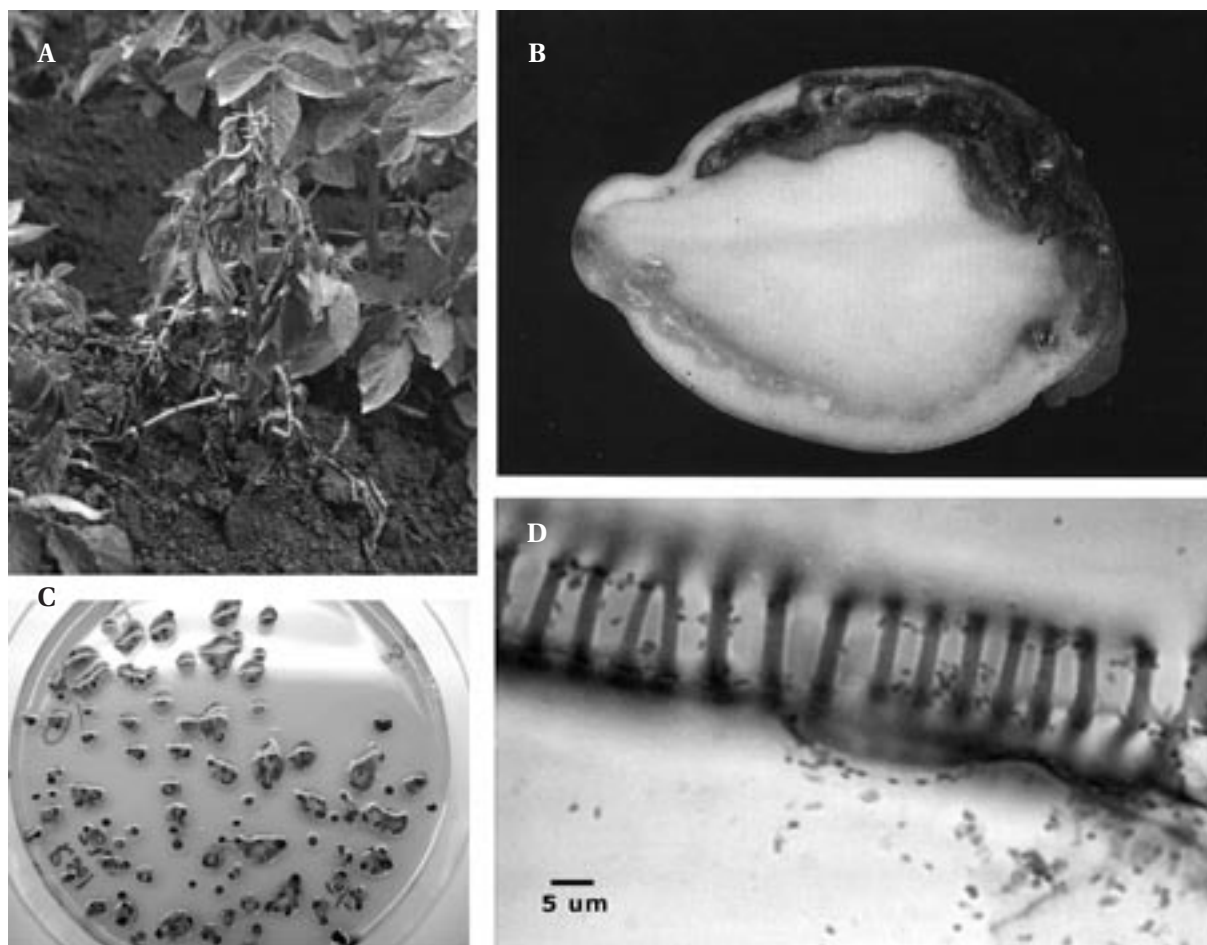
Inleiding

De quarantaineziekte bruinrot van aardappel, veroorzaakt door de bacterie *Ralstonia* (voorheen: *Pseudomonas*) *solanacearum* werd in Nederland voor het eerst met zekerheid aangetroffen in 1992. Het betrof een geïsoleerd geval in Zuid-Nederland dat later verbonden bleek te zijn met al eerder opgetreden besmettingen in België. Echter, door een verband met sluipende oppervlaktewaterbesmetting sluimerde de ziekte vrijwel zeker sinds het eind van de jaren tachtig en kwam tot uitbarsting in 1995. In hetzelfde jaar werd ook oppervlaktewaterbesmetting in Noord-Nederland vastgesteld. Sindsdien is door een grote inspanning van de Plantenziektenkundige Dienst (PD), de Nederlandse Algemene Keuringsdienst (NAK), het bedrijfsleven en het onderzoek (Plant Research International (PRI – voorheen IPO) en Wageningen Universiteit) veel bereikt in de opsporing en uitroeiing/bestrijding door toename van de kennis van diagnostiek en epidemiologie van deze ziekte. Dit artikel geeft een overzicht van de aanpak en het onderzoek sinds de uitbraak van bruinrot in 1995 en werpt een blik vooruit naar toekomstige ontwikkelingen.

De bacterie *Ralstonia solanacearum*

Aan het eind van de 19^e eeuw werd een ernstige verwelkingsziekte (slijmziekte genoemd) beschreven in (sub)tropische streken bij tomaat, tabak, aardappel (Figuur 1A en B), banaan en pinda. De grondlegger van de fyto bacteriologie, de Amerikaan Erwin F. Smith toonde al in 1896 aan dat de veroorzaker een bacterie was, *Bacillus solanacearum* genaamd. In 1914 plaatste Smith deze niet-sporenvormende Gram-negatieve bacterie (Figuur 1D) in het geslacht *Pseudomonas*. Vervolgens werd slijmziekte aangetoond bij zeer veel verschillende waardplanten in (sub)

tropische gebieden. Moraes (1947) beschreef echter in Portugal een vorm van de bacterie die beter aangepast was aan gematigde klimaatstreken (groei optimum van 27°C i.p.v. 35°C). Later werd die vorm ook aangetroffen in andere landen van het Mediterrane gebied, met name in Egypte, en in bergstreken in de tropen. Het bleek dat deze ‘koude’ vorm, en de bacterie die bij banaan voorkwam, goed te onderscheiden waren op basis van pathogeniteit op verschillende waardplanten (indeling in rassen of races) en gebruik van specifieke nutriënten (koolstofbronnen) in het laboratorium (biochemische variëteiten of biovars). De tropische vorm met een zeer grote waardplantenreeks werd door Buddenhagen (1961) ras 1 genoemd (waarvan zich later nog ras 4 en 5 afsplitsten), de vorm gespecialiseerd op banaan en de verwante *Heliconia*, ras 2, en de ‘koude’ vorm met een beperkte waardplantenreeks, voornamelijk *Solanaceae*, ras 3. De ‘koude’ vorm (ras 3) bleek bij de biochemische indeling van Hayward (zie Hayward, 1994) tot biovar 2 (later ook wel 2A genoemd) te behoren, terwijl de andere rassen binnen andere biovars (1, 3-5) vielen. Een speciale biovar (2T) van ras 3 bleek in de Andes voor te komen, en er werd daar in wilde aardappel resistentie gevonden tegen ras 3. Dit ras heeft zich vermoedelijk met de aardappel vanuit de Andes over de wereld is verspreid, wellicht tijdens de tweede wereldoorlog met geallieerde troepen naar het Mediterrane gebied. Ras 3 blijkt genetisch zeer homogeen te zijn. Bij de ontwikkeling van het moleculair-biologisch/taxonomisch onderzoek is verdere verfijning van de diversiteit van de bruinrotbacterie mogelijk gebleken, o.a. op basis van RFLP- en 16S rRNA-analyse en sequentie-analyse van het endonuclease-gen (*egl*) en andere huishoudgenen (Castillo & Greenberg, 2007; Cook & Sequeira, 1994; Fegan & Prior,



Figuur 1.

- A: Symptomen van bruinrot veroorzaakt door de bacterie *Ralstonia solanacearum* in aardappel: sterke verwelking door verstopping en afbraak van het vaatweefsel;
- B: Symptomen van bruinrot in een aardappelknol: lichtbruine vatverkleuring, uit het aangetaste weefstel treedt na aansnijden spontaan vuilwit bacterieslijm naar buiten. Het zwartverkleurde weefsel is secundaire aantasting door andere micro-organismen;
- C: Typische kolonies van de bruinrotbacterie, slijmerig met een diffuse rode kern, door opname van een kleurstof, tetrazoliumchloride, op de selectieve voedingsbodem SMSA 5 dagen na uitplaten;
- D: Kleine roodgekleurde cellen (kleuring volgens Gram) van *Ralstonia solanacearum* in een spiraalvat (kleinste vaatweefsel-onderdeel) van een aardappelknol.

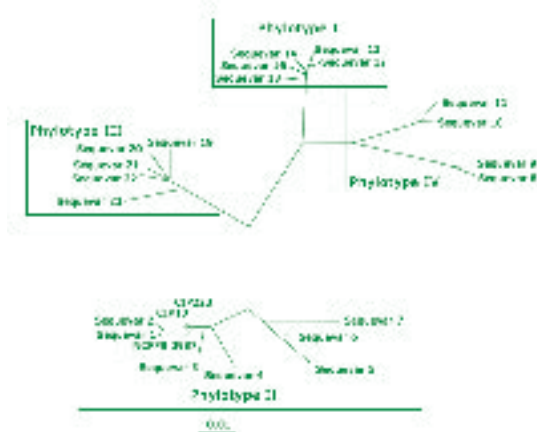
© Janse, 2006

2005, Gabriel *et al.*, 2006; Pingsheng *et al.*, 2007; Poussier *et al.*, 2000) en de bacterie werd in het geslacht *Ralstonia* geplaatst (Yabuuchi *et al.*, 1995). Op basis van de sequentieanalyses worden nu vier zogenaamde 'fylotypen' onderscheiden: fylotype I betreft stammen met een oorsprong in Azië, fylotype II heeft zijn oorsprong op het Amerikaans continent (IIa biovar 2, ras 3 stammen, IIb overige, ook enkele uit Afrika), fylotype III Afrika en fylotype IV Indonesië. Tabel 1 en Figuur 2 geven een overzicht van de huidige indelingen en de complexiteit van deze bacterie. Een nieuwe agressieve vorm met veel waardplanten, waaronder *Anthurium*, *Cucurbitaceae*, *Heliconia* en tomaat werd recent als fylotype II/4NPB (niet pathogeen voor banaan)

beschreven voor Martinique (Wicker *et al.*, 2007). Deze kan een bedreiging vormen voor de Europese kasteelt. De 'koude vorm', die in Nederland en vele landen in West-Europa voorkomt (Janse, 1996), blijkt in deze typering geneticaal homogeen te zijn en tot nu toe altijd *Ralstonia solanacearum* (*Rsol*) ras 3, biovar 2, fylotype II (sequevar 1 en 2) te betreffen.

De eerste vondsten en uitbraak in Nederland in 1995

In de jaren zestig van de vorige eeuw kwam export van vroege aardappelen uit het Middellandse gebied, met name Malta, Cyprus en Egypte, naar West-Europa op gang. Al in 1961 rapporteerden



Figuur 2. Classificering van *Ralstonia solanacearum* in zgn. fylotypen en sequevars (sequentie variëteiten) op basis van partiële sequentie-analyse van het endoglucanase gen. Het balkje stelt 100 nucleotide posities voor. Naar Fegan & Prior, 2000.



Figuur 3. Verzamelen van een monster aardappelknollen voor onderzoek op latente bruinrotinfectie (200 knollen monster) door een inspecteur van de buitendienst van de PD. De inspecteur draagt een wegwerpoverall en overschoenen en handschoenen om eventuele verspreiding van de bacterie te voorkomen. Copyright: NIVAP

ARTIKEL

Tabel 1. Subspecifieke diversiteit van *Ralstonia solanacearum*¹.

Ras	Biovar	RFLP-patroon ²	Fylotype ³	Waardplantenreeks	Voorkomen
1	1	1-7	Iib	Breed	Z. Amerika, VS
1	3	8-14	I	Breed	Vnl. Z.O Azië, Z. Amerika, Australië, China, enkele in VS
1	1 en 2N		IV	Breed	Afrika
1	1, 2, 2N en <i>Ralstonia syzygii</i> van kruidnagel en Blood Disease Bacterium (BDB) van banaan		III		
1	4	11, 15-18, 21-23	I	Breed	Z.O. Azië, China, Australië, enkele ook VS
1	5	19, 20	I	<i>Morus alba</i> (moerbeï)	China
2	1	24, 25, 28	Iib (bananen-variant op Filippijnen IV)	Banaan (<i>Musa</i> spp.), Heliconia	Z. en C. Amerika, Filippijnen
3	2 of 2A	26A, B	Iia	Beperkt	Alle bewoonde continenten
3	2 of 2A	27A,B,C	Iib	Beperkt	Ten westen van Andes: Chili, Colombia
Tussen 1 en 3	2T (2N)	29-33	Iib	Beperkt	Ten oosten van Andes: laag landen Brazilië, Peru
4	4		I	Gember	Australië, China, Hawaii, India, Japan, Mauritius, Z. Azië, India

¹ Voor bevestigende AFLP and PCR-RFLP van deze onderverdelingen, zie Poussier et al. (2000) en Horita et al. (2005).
² Naar Cook and Sequiera (1994).
³ Voor indeling fylotypen en sequevars, zie Figuur 2 en o.a. Fegan & Prior 2005, Castillo & Greenberg, 2007.

het Verenigd Koninkrijk en Duitsland vonden van bruinrot in deze aardappelen, waarover zich overigens niemand erg druk maakte. In 1972 toonde men in Zweden aan dat lokale infecties van bruinrot ontstonden, stroomafwaarts van twee aardappelverwerkende fabrieken die onbehandeld afval loosden in een rivier van waaruit aardappelen berekend werden. Ook toonde men daar aan dat het onkruid bitterzoet (*Solanum dulcamara*) dat langs en in het water groeit, de bacterie in stand hield. In een vierjarig bestrijdingsprogramma (zuivering afval fabriek, bestrijding bitterzoet langs rivier, vier jaar geen aardappelen op besmette percelen en vernietiging besmette aardappelen) werden de ziekte en de bacterie uitgeroeid (Janse, 1996; Persson, 2008). Intussen nam de export van vroege aardappelen uit Egypte, de vondsten van bruinrot in deze aardappelen en de berekening (vanwege meer opbrengst en bestrijding van de schurftbacterie *Streptomyces scabiei*) in West-Europa en ook in Nederland sterk toe. In België leidde dit in 1989 tot een vergelijkbare uitbraak van de ziekte langs een kanaal, stroomafwaarts van een verwerkende industrie. Dit was tevens aanleiding tot een uitbraak in Nederland die werd aangetoond midden in het pootaardappelexportseizoen van 1995 en in verscheidene andere West-Europese landen (Elphinstone *et al.*, 1998; Janse, 1996). Vanwege het risico van besmetting had de PD al pro-actief een detectiemethode voor het aantonen van latente infecties van aardappel ontwikkeld, die binnen de European Plant Protection Organisation (EPPO) en de EU werd aanvaard (Janse, 1988). Bij de uitbraak in Nederland werd een zware infectie in enkele lijnen van het lokale ras Bildtstar vastgesteld, met verspreiding via pootgoed en contact (machines e.d.). Er werd besloten, ook onder verplichting van de Europese Commissie en druk van lidstaten, tot het volledig (integraal) toetsen van al het te verhandelen pootgoed. Hierbij werden in dat jaar door PD, NAK, Naktuinbouw en TNO Zeist in enkele maanden tijd 55.000 monsters getoetst (200 knollenmonsters per elke 25 ton aardappelen), waarbij 94 besmettingen in 24 verschillende cultivars werden gevonden (Figuur 3). Een aantal besmettingen kon niet tot contact of pootgoed worden teruggeleid – hier viel de verdenking op het oppervlaktewater. Deze verdenking kon eind 1995 bevestigd worden door het aantreffen van de bacterie in oppervlaktewater en bitterzoet in verschillende delen van het land (Janse, 1996; Janse *et al.*, 1998).

Integrale toetsing en maatregelenpakket

Om de ziekte terug te dringen als ook om de exportpositie te behouden, wordt al het pootgoed, reeds gedurende een groot aantal



Figuur 4. Verspreiding van *Ralstonia solanacearum* in oppervlaktewater zoals vastgesteld door de jaren heen via monitoring van de PD (1997, 2000 en 2005). Zie verder: tekst.

Copyright: PD

jaren integraal getoetst (200 knollen/25 ton), terwijl ook *surveys* in consumptie- en industrieaardappelen en *monitoring* (opvolgen van gevonden besmettingen) plaats vonden. Deze operatie werd vanaf 1996 uitgevoerd door PD en NAK. Tevens werd een uitgebreide *monitoring* van oppervlaktewater uitgevoerd. Toen in

2004 de ziektedruk in de aardappelkolom behoorlijk verlaagd was, werd in overleg met de EU besloten tot toetsing van een 200 knollenmonster per partij, ongeacht de grootte van de partij. In 2006 werd de integrale toetsing overgedragen aan de NAK, terwijl de PD *monitoring, surveys* en watertoetsing en toetsing van bacteriecultures uit water- en knolmonsters bleef uitvoeren. Deze laatste activiteiten, met uitzondering van de toetsing van cultures uit knolmonsters, zijn sinds 2008 ook overgedragen aan de NAK.

In aanvulling op de integrale toets, vanuit nationale overwegingen en vanuit de EU Bestrijdingsrichtlijn voor bruinrot (Anonymus, 1998 en 2006) werden in grote lijnen de volgende algemene en specifieke maatregelen genomen bij het vinden van bruinrot in knollen of een perceel:

- toetsing op latente infecties van bruinrot in al het geproduceerde pootgoed van een getroffen bedrijf,
- *surveys* in industrie- en consumptie (inclusief import),
- vernietiging van aangetaste partijen door stomen (en vervolgens vervoederen aan varkens), biovergisting met een categorie 3 vergister, tunnelcompostering, verwerken in door de PD erkende verwerkende bedrijven en (incidenteel) diep begraven,
- partijen van een besmet bedrijf waarin geen *Rsol* is aangetoond slechts in kleinverpakking (maximaal 10 kg) direct naar consumentenmarkt of voor verwerking naar de industrie,
- ontsmetting bedrijf en strenge bedrijfs-hygiëne,
- opslagbestrijding besmette percelen en een teeltverbod van vier (bij consump-

tietelt) of vijf jaar (bij teelt pootgoed) op een besmet perceel,

- melding vondsten in Brussel en evt. aan individuele EU-lidstaten,
- irrigatieverbod in bekende en door de PD afgebakende besmette oppervlakte-watergebieden,
- traceringsonderzoek (klonale verwantschap, contact, berekening) na vondsten.

Invloed van maatregelen en toets

Uit Tabel 2 blijkt dat de ziekte de laatste jaren nog slechts sporadisch voorkomt (en men zou terecht kunnen spreken van functionele uitroeiing). Echter, het nog steeds weer vinden van één of enkele gevallen van bruinrot per jaar geeft ook aan dat bij teelt in de directe omgeving van besmet oppervlaktewater een klein risico bestaat dat pootaardappelen onopgemerkt in contact komen met dit water, temeer daar de bacterie nog steeds op grote schaal in het oppervlaktewater voorkomt en hierin waarschijnlijk ook niet uit te roeien is. In 2005 is daarom een algeheel beregeningsverbod voor pootgoed ingesteld. In de laatste jaren zijn enkele zeer lichte besmettingen opgetreden. Enerzijds geeft dit aan dat ook andere factoren, zoals fouten in waterhuishouding rondom percelen, overwaaien beregeningswater van naburige percelen, eventueel vogels, water-toeristen, etc. een rol spelen en er wel degelijk risico op herintroductie vanuit oppervlaktewater blijft bestaan. Anderzijds werd er nooit verspreiding via afspoeling van de bacterie uit besmette velden naar het oppervlaktewater vastgesteld. Het maatregelenpakket is zeer effectief gebleken. Op percelen waar ooit (zware) besmetting werd vastgesteld, is veelal weer één of twee maal aardappelen geteeld. Bedrijven die besmet

Tabel 2. Aantal op bruinrot onderzochte en besmet bevonden aardappelmonsters van 1996-2008.

Categorie	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Integrale bemonstering*	57.500	67.150	59.700	66.800	66.775	63.091	60.928	62.817	60.700	32.524	28.338	22.472	24.823
Aantal besmette monsters	9	30	5	62	34	16	14	7	1	1	1	1	1
% besmette monsters	0,01	0,04	0,01	0,09	0,05	0,03	0,02	0,01	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004
Surveys (incl. tracing)	2.850	4.300	4.100	5.300	4.573	3.463	4.339	2.682	4.965	3.339	2.222	2.880	3.081
Aantal besmette monsters	15	17	137	60	19	10	40	6	1	1	3	1	14
% besmette monsters	0,53	0,39	3,34	1,13	0,4	0,3	0,9	0,22	0,02	0,03	0,14	0,03	0,45
Totaal % besmette monsters	0,04	0,07	0,22	0,17	0,07	0,04	0,08	0,02	0,003	0,006	0,01	0,008	0,05

* Integrale bemonstering = NAK-pootgoed + TBM-pootgoed + kwekersklonen

waren, blijven/bleven opgenomen in het *survey*-programma van de PD. In geen van deze gevallen werd heraanastasting gevonden. Dit is ook een zeer sterke aanwijzing tegen het vóórkomen van zogenaamde 'viable, but non-culturable' of VBNC (levende, maar niet-kweekbare) -vormen van de bacterie die overal in het milieu aanwezig zouden zijn.

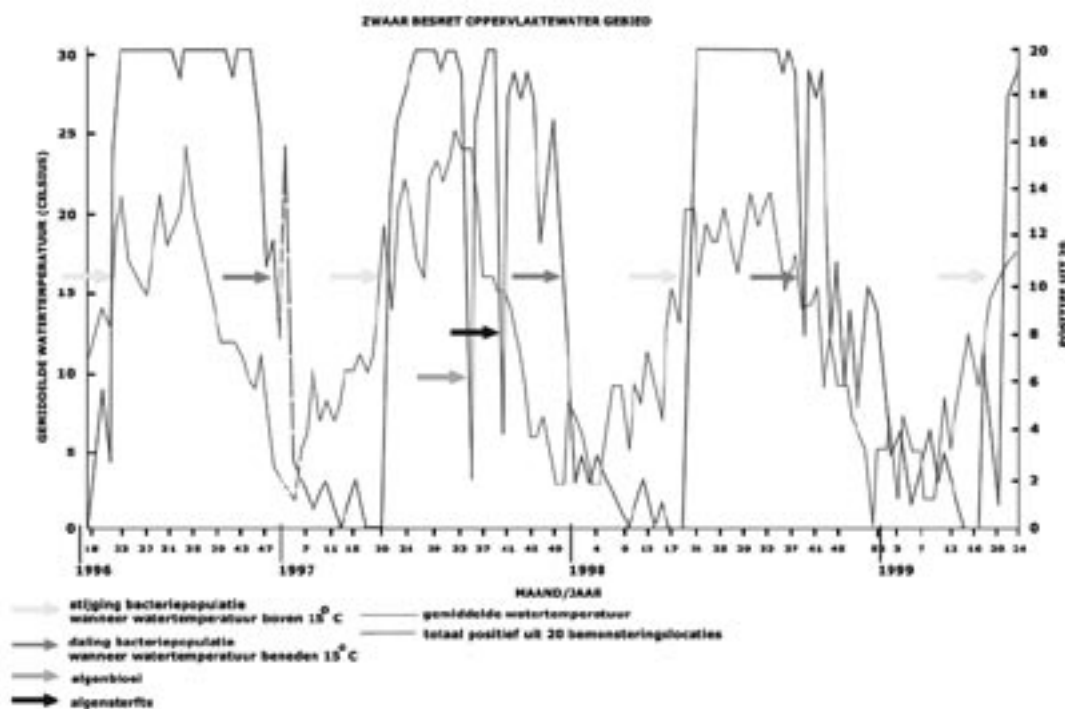
Niet direct duidelijk uit Tabel 2 is het vele werk van de PD-buitendienst. Naast de inspecties en bemonstering, de moeilijke gesprekken met zwaar getroffen telers, de vele bedrijfsbezoeken en de uitgebreide traceringsonderzoeken. Ook noemens- en prijzenswaardig is de grote steun vanuit het georganiseerde bedrijfsleven. Aan het beregeningsverbod, dat in droge zomers een grote impact heeft, zijn uitgebreide discussies vooraf gegaan. Ook de steun bij traceringsonderzoeken van telers en handel, bezoeken aan het buitenland, bereidheid om aanvullende maatregelen te nemen waar het instrumentarium van de overheid tekort schoot (partijen uit de handel nemen) en de inzet voor de Potatopolverzekering hebben het werk voor de PD sterk gefaciliteerd en genomen maatregelen succesvol gemaakt.

Monitoring van oppervlaktewater

Toetsing op het voorkomen van *Rsol* vindt plaats via isolatie op een kunstmatige voedingsbodem (SMSA genoemd) die op basis van een aantal voedingsstoffen en toegevoegde antibiotica selectief is voor de bruinrotbacterie (Figuur 1C). Dit medium heeft het mogelijk gemaakt de bacterie in zeer lage aantallen (10-100 cellen/ml) in oppervlaktewater en andere substraten aan te tonen. Door de jaren heen is de bacterie in een steeds groter gebied in allerlei oppervlaktewatervoren en ook in bitterzoet aangetoond. Sinds 2005 wordt nog slechts aan de rand van besmette gebieden en in nog niet besmette gebieden bemonsterd omdat inperking van besmette gebieden niet aan de orde was. Om deze reden is het percentage besmette monsters afgenomen. De kaartjes van Nederland (Figuur 4) geven een duidelijk beeld van hoe de bacterie zich in de loop van de jaren in een steeds groter gebied heeft weten te vestigen. Tevens werd afvalwater en effluent bemonsterd bij aardappelverwerkende industrieën en stadszuiveringen. De bacterie is overigens nooit in effluent aangetoond.

Diagnostiek

De screening op latente infecties en diagnose van bacteriën, verkregen uit zowel latent als zichtbaar besmet plantenmateriaal, water, grond



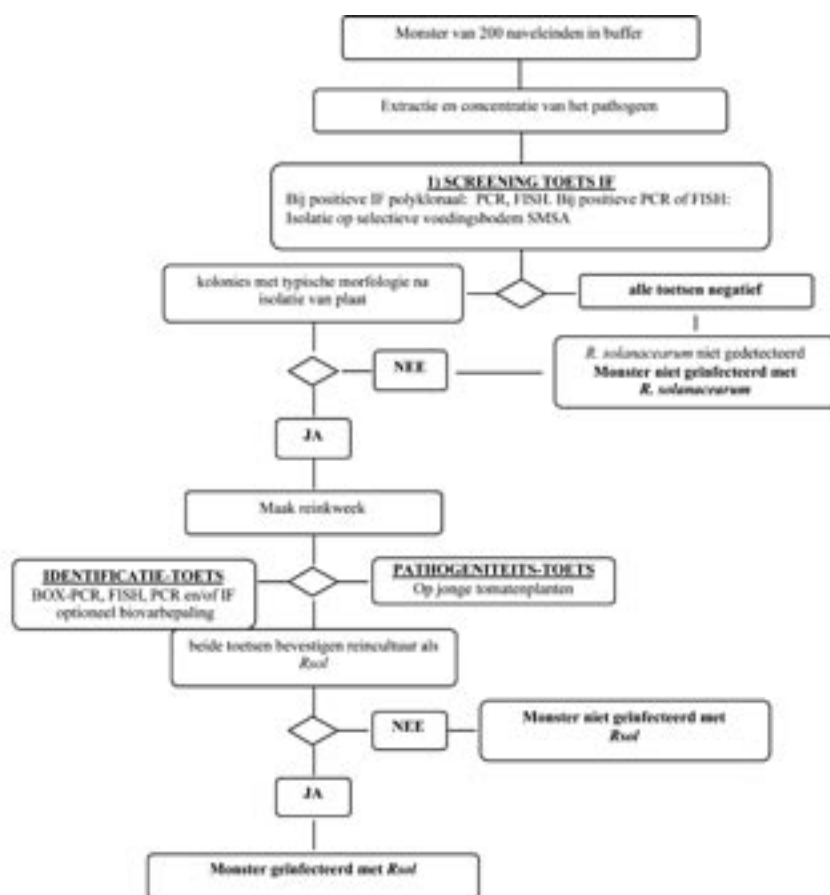
Figuur 5. Aantallen kolonievormende eenheden van *Ralstonia solanacearum* in een zwaar besmet oppervlaktewater gedurende drie seizoenen. De bacterie kon tot aan ijsvorming worden aangetoond, zij het in lage aantallen. In het jaar 1997/98 vond sterke afname van de populatie in de zomer plaats, waarschijnlijk door invloed van sterke algengroei. Copyright: Janse, 2006

en afval, wordt uitgevoerd volgens een standaard EU- toetsmethode vastgelegd in een EU-bestrijdingsrichtlijn (Anonymus, 1998 en 2006). De basis screeningtoets is een serologische toets die gebruik maakt van fluorescentie-microscopie, nl. immunofluorescentie (IF). Bij het vinden van een positieve IF wordt een verplichte aanvullende screeningtoets uitgevoerd die gebruik maakt van een DNA techniek (PCR of fluorescente *in-situ* hybridisatie, FISH). Is deze tweede toets ook positief dan is het monster bruinrot-verdacht en wordt via isolatie op SMSA getracht de bacterie in handen te krijgen. Wanneer typische kolonies worden verkregen worden deze reingekweekt en middels biochemische (vetzuuranalyse, biovarbepaling), serologische (IF) en DNA technieken zoals PCR, rep-PCR (vingerafdrukmethode) of FISH, geïdentificeerd en via kunstmatige inoculatie in jonge tomatenplanten op hun pathogeniteit getoetst. De pathogeniteitstoets is doorslaggevend voor een definitieve diagnose omdat de eerdergenoemde toetsen gevoelig zijn voor storende vals-positieve reacties met andere organismen (zgn. kruisreacties). Het

toetsings- en beslisschema van de EU-methode die ook door PD en NAK worden toegepast is vermeld in Figuur 6.

Enkele resultaten uit het diagnostisch onderzoek

In samenwerking met de leerstoelgroep Microbiologie van de WU werd een 16S rRNA-probe ontwikkeld die werd toegepast in de FISH-toets (Wullings *et al.*, 1998). Deze toets werd opgenomen in het internationale (ring-) onderzoek binnen de EU (Elphinstone *et al.*, 2006) en in de EU-toetsmethode. Verder werd een door het PRI verder ontwikkelde RNA-toets (NASBA) op praktijkwaarde getoetst met een groot aantal praktijkmonsters en een panel van mogelijk kruisreagerende bacteriën. Deze techniek bleek helaas niet betrouwbaar genoeg. De veelbelovende real-time TaqMan PCR (Weller *et al.*, 2000) werd op eenzelfde wijze getoetst. De vermenigvuldiging van eventueel aanwezig DNA van *R. solanacearum* word in deze toets direct vanaf het begin al gemeten door middel van een fluorescerend label aan het DNA. Ten opzichte van conventionele PCR en IF hoeven veel minder



Figuur 6. Schema van de diagnose van een aardappelmonster verdacht van bruinrot (latente infectie) volgens de EU bestrijdingsrichtlijn bruinrot.

handelingen plaats te vinden met een eenzelfde of zelfs hogere betrouwbaarheid. Er wordt nu in internationaal verband geprobeerd deze techniek in de EU-methode op te nemen. Real-time PCR kan dan naast, of als vervanger van, de IF toets worden ingezet. Ook werden commercieel geproduceerde antisera gevalideerd met een panel kruisreagerende bacteriën en een groter aantal positieve en negatieve praktijkmonsters, zodat deze betrouwbaar in de integrale toetsing kon worden ingezet.

Enkele resultaten uit het epidemiologisch onderzoek

In de laatste decennia heeft de PD ook bijgedragen aan het nationale en internationale epidemiologische onderzoek aan de bruinrotbacterie en hierover gepubliceerd. Belangrijke vragen betroffen de overleving van de bacterie op en in diverse substraten (Janse *et al.*, 1998; Wenneker *et al.*, 1998) en de overleving in (natuurlijk) besmette grond op enkele praktijkpercelen. Overleving in grond van meer dan een jaar werd definitief aangetoond. Bij snijmaïs bleken geen (micro-) wortelinfecties voor te komen (van Beuningen *et al.*, 1999). De meeste van deze gegevens kwamen sterk overeen met gegevens van het PRI in microkosmosexperimenten (van Elsland *et al.*, 2000 en 2001). Ook werd voor het eerst uit verwelkende brandnetelplanten (*Urtica dioica*), die met de voeten in sterk besmet oppervlaktewater stonden, *Rsol* geïsoleerd (Wenneker *et al.*, 1999). Deze vondsten waren van belang om te adviseren over gewassen in de rotatie op een besmet perceel.

In samenwerking met Biologische Bedrijfssystemen (WU) werd aangetoond dat *Rsol* zes weken anaerobe vergisting van besmet materiaal in een speciale tank niet overleefde (Termorshuizen *et al.*, 2003). In samenwerking met de zetmeelindustrie werd nagegaan of de bacterie het zuiveringsproces van de fabriek kon overleven. Bacteriën konden wel in het onbehandelde waswater worden aangetoond en in de eerste stappen van de afvalzuivering, maar nooit in het uiteindelijke effluent of vaste eindproduct. Er werden succesvolle proeven gedaan met semi-anaerobe afdoding van de bacterie in het veld onder plastic (biologische grondontsmetting) (Messiha *et al.*, 2007b), waarbij een 93% afdoding werd vastgesteld. Uit het onderzoek bleek verder dat de bacterie in potproeven tenminste 180 dagen overleefde in grond en langer in Nederlands dan in Egyptische gronden en langer in klei- dan in zandgrond (Messiha, 2006, 2006a; Messiha *et al.*, 2007a). Ook werd de overleving in oppervlaktewater in een zwaar, matig en licht besmet

gebied gedurende een periode van drie jaar nauwkeurig in kaart gebracht (Figuur 5). Hierbij bleek de bacterie, wanneer bitterzoet aanwezig was in het zwaar besmette gebied, tot aan ijsvorming in de winter aantoonbaar, terwijl een duidelijke toename in bacterieaantallen te zien was wanneer de temperatuur boven de 15°C kwam (Wenneker *et al.*, 1999).

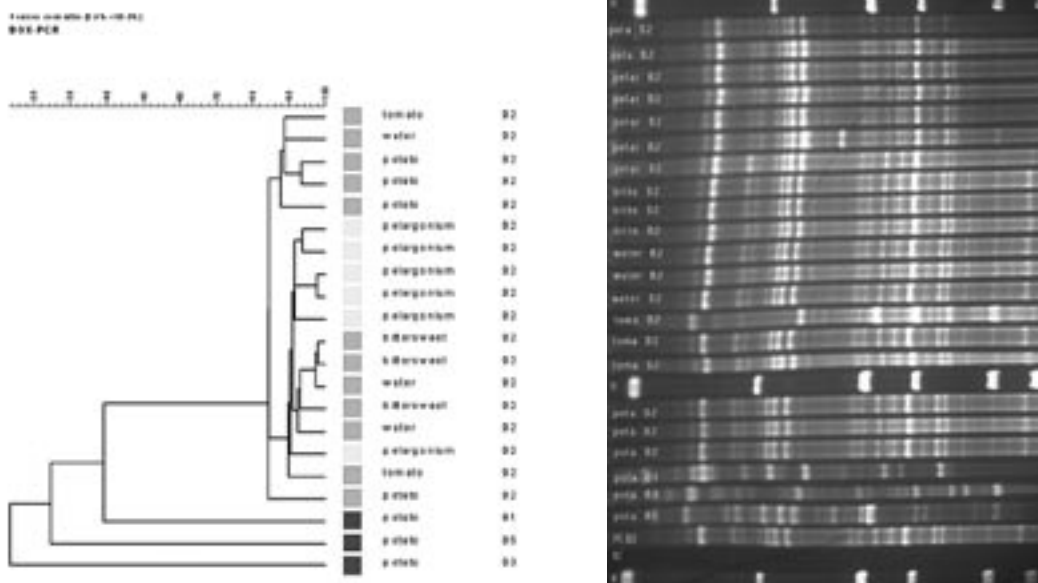
Uitgebreid onderzoek werd verricht naar de statistische betrouwbaarheid van de bemonstering op latente infecties, waarbij werd vastgesteld dat de praktijksituatie de statistische trefkans zeer betrouwbaar benadert (Janse & Wenneker, 2002). Er werd onderzoek gedaan naar de effectiviteit van ontsmettingsmiddelen zoals chloor en waterstofperoxide (H₂O₂) in combinatie met perazijnzuur, om het beregeningswater te ontsmetten. Water behandeld met 100 ppm H₂O₂/perazijnzuur, met behulp van apparatuur vervaardigd door de fa. Brightspark, bleek vrij te zijn van de bruinrotbacterie (van Beuningen *et al.*, 2005). Er is inmiddels een vergunning verleend voor het middel (merknaam Clamarin) voor beregening van consumptieaardappelen en er zal in 2009 een praktijkproef worden uitgevoerd. Verder werden door diverse PD-medewerkers veel (concrete) gegevens aangeleverd voor een bio-economisch model, ontwikkeld om de epidemiologie, schade van bruinrot en het effect van het door Nederland ingevoerde maatregelenpakket te berekenen en ook een kosteneffectieve strategie voor de toekomst te voorspellen (Breukers, 2006; Breukers *et al.*, 2007).

Vondsten van *Ralstonia solanacearum* ras 3 biovar 2 in *Pelargonium*

In 2002 ontving de PD verwelkende planten van *Pelargonium* die bleken te zijn aangetast door *Rsol* ras 3, biovar 2 (Figuur 7). Tegelijkertijd vond deze vaststelling ook plaats in Duitsland, Engeland en België. De productie van stekken op bedrijven in Kenia die besmet oppervlaktewater gebruikten, bleken hieraan debet. Resultaten van dit onderzoek werden internationaal gepresenteerd (Janse *et al.*, 2004b) en de PD en het Central Science Laboratory (CSL, Verenigd Koninkrijk) konden op basis hiervan ook de Amerikaanse PD van advies dienen toen zij vergelijkbare aantastingen van stekken vonden afkomstig uit Kenia en Guatemala in 2003/4.

Internationale problematiek en samenwerking

In de beginjaren van de bruinrot-uitbraak werd in het buitenland, met name de EU, gevreesd dat er veel Nederlands pootgoed besmet zou zijn. Temeer nadat de warme zomers van 1994-1995



Figuur 7. Resultaten van een BOX-PCR-toets (DNA-vingerafdruk in een agarose-gel en bijbehorende analyse-resultaten in het dendrogram) naar de identiteit van *Ralstonia solanacearum* isolaten afkomstig uit *Pelargonium*. In dit onderzoek bleek dat deze isolaten tot biovar 2, ras 3 behoorden, waarop ook andere toetsen (inclusief een waardplantonderzoek) wezen. Zie Janse *et al.*, 2004. Copyright: Janse 2006

en extra beregelingen (achteraf) blijkbaar ook in een aantal van deze lidstaten tot infecties in aardappel hadden geleid. Uiteindelijk werd in veel EU lidstaten vastgesteld dat import van besmette aardappelen uit het Mediterrane gebied en het gebruik van besmet oppervlaktewater waarschijnlijk de hoofdoorzaak vormden en niet Nederlands pootgoed. Er is door de PD heel veel gedaan aan voorlichting, zowel nationaal als internationaal, over het Nederlandse bestrijdingssysteem, zowel in Brussel als op internationale wetenschappelijke bijeenkomsten, maar ook aan telers. Er werd in een groot aantal buitenlandse missies diagnostische expertise geleverd en vermeende besmettingen in Nederlands pootgoed of de nateelt daarvan nader onderzocht. De meeste van deze vermeende besmettingen bleken na gezamenlijk onderzoek ter plaatse, te berusten op niet herleidbare oorzaken of op vals positieve diagnoses. In een aantal gevallen kon ook de oorzaak in het betreffende land gevonden worden. Daarnaast werd de verkregen expertise ingezet bij het opstarten van laboratoria en training van personeel in het buitenland. Verder opereerde de afdeling Bacteriologie van de PD als projectleider in twee vierjarige EU-projecten, met CSL (Verenigd Koninkrijk), het Rijksinstituut voor Plantenziekten (België) en de Franse PD als partners (1996-1999 en 2002-2006). Doel was het opzetten van een duurzaam bruinrot beheerssysteem in Egypte, epidemiologisch

onderzoek en training (Janse *et al.*, 2004a). Er werd een toetslaboratorium ingericht, inclusief een quarantainekas. Daarnaast werd sinds 1997/98 een jaarlijks toetsprogramma van circa 12.000 aardappelmonsters operationeel en werd personeel getraind. Veel energie werd gestoken in wetenschappelijk advies betreffende de opzet en de handhaving van ziektevrije gebieden, zgn. *pest free areas* of PFA's. Dit alles resulteerde in een sterke daling van het aantal intercepties van bruinrot. De bruinrotbacterie werd gedetecteerd in oppervlaktewater in de Nijldelta en in bepaalde onkruiden, zoals *Portulaca oleracea* (wilde postelein) en er werden uitgebreide overlevingsstudies gedaan (Farag *et al.*, 1999; Tomlinson *et al.*, 2009 in druk). Tenslotte werd een voorlichtingspakket ontwikkeld, demonstratieproefvelden aangelegd en lokale en EU-trainingen uitgevoerd, waarbij vier MSc-studenten en een PhD-student succesvol werden opgeleid.

Toekomstige ontwikkelingen op het gebied van toetsing en beleid

Er wordt voorzien dat de al eerder beschreven *real-time* PCR-methode een veelbelovend alternatief (t.o.v. immunofluorescentie) kan zijn voor screening van aardappelextracten. Voorlopige validatiedata geven aan dat *real-time* PCR de bekende herkomsten van de bruinrotbacterie specifiek aantoonst en even gevoelig is. Binnen het EU-project EUPHRESKO waaraan

PD en NAK deelnemen, wordt deze *real-time* PCR-toets in internationaal verband vergeleken met andere technieken. Tevens wordt deze toets, samen met onderzoekers van het CSL, die het protocol ontwikkeld hebben (Weller *et al.*, 2000), volledig gevalideerd. Wanneer de *real-time* PCR toets opgenomen is in de EU-bestrijdingsrichtlijn zal deze techniek door PD en NAK worden ingezet voor de integrale toetsing van aardappelen op bruinrot.

De toekomstige beleidsopgave van de PD zal niet alleen zijn dit quarantaine-organisme te weren en te bestrijden maar ook om een wetenschappelijk draagvlak te creëren dat kritieke processen in de productieketen definieert voor overleving en verspreiding. Het is daarbij van groot belang om voldoende fundamenteel onderzoek te blijven uitvoeren ter ondersteuning van het toegepaste onderzoek. Door aanvullende studies naar knelpunten gerelateerd aan de ecologie en epidemiologie kunnen gewogen beheersmaatregelen worden ontwikkeld die tegen acceptabele kosten door overheid en sector kunnen worden geïmplementeerd.

Samenvattend: lessen die geleerd zijn en advies voor de toekomst

Uit al het onderzoek en het toets- en traceringswerk is naar voren gekomen dat de gulden regels voor bruinrotbestrijding de volgende zijn:

- Onbehandeld oppervlaktewater niet gebruiken
- Uitgaan van gezond, getoetst en gecertificeerd pootgoed
- Goed scheiden van consumptieaardappels en pootgoed op een bedrijf
- Op het eigen bedrijf sorteren en opslaan om versmering te voorkomen
- Strenge bedrijfshygiëne en adequate controle hierop
- Proactief investeren in voorlichting, educatie, ecologische, epidemiologische en diagnostische expertise en een rampenplan
- Compenseren voor schade of mogelijkheid creëren van verzekering van telers tegen bedrijfsoverstijgende schade
- Uitvoeren van regelmatige *surveys* in consumptie- en industrieaardappelen en op waardplanten van *Rsol* in kasgewassen

Dankwoord

De auteurs willen de volgende personen bedanken voor hun bijdrage aan het onderzoek en de bestrijding van bruinrot: Jeroen van de Bildt,

Peggy Gorkink, Joris Voogd, Marco Landman en Mario van Sabben.

Literatuur

- Anonymus (1998) Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum*. Annex II-test scheme for the diagnosis, detection and identification of *Ralstonia solanacearum*. Official Journal of the European Communities L235: 8–39
- Anonymus (2006) Commission Directive 2006/63/EC of 14 July 2006: amending Annexes II to VII to Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Official Journal of the European Communities L206: 36–106
- Breukers A (2006) Bio-economic modelling of brown rot in the Dutch potato production chain. Business Economics Group, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Breukers A, van der Werf W, Mourits M & Lansink AO (2007) Improving cost-effectiveness of brown rot control: the value of bio-economic modelling. EPPO Bulletin/Bulletin OEPP 37: 391–394
- Buddenhagen IW, Sequeira L & Kelman A (1962) Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52, 726
- Castillo JA & Greenberg JT (2007) Evolutionary Dynamics of *Ralstonia solanacearum*. Applied and Environmental Microbiology 73: 1225–1238
- Cook D & Sequeira L (1994). Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: Hayward AC, Hartman GL, eds. Bacterial wilt: the Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK: CAB International: 77–93
- Elphinstone JG, Stanford HM & Stead DE (1998) Survival and transmission of *Ralstonia solanacearum* in aquatic plants of *Solanum dulcamara* and associated surface water in England. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 28: 93–94
- Elphinstone JG, Stead DE, Caffier D, Janse JD, Lopez MM, Mazzucchi U, Müller P, Persson P, Rauscher E, Schiessendoppler E, Sousa Santos M, Stefani E & van Vaerenbergh J (2000) Standardization of methods for detection of *Ralstonia solanacearum* in potato. Bulletin OEPP/EPPO 30: 391–395
- Farag N, Stead DE & Janse JD (1999). *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* race3, biovar2, detected in surface (irrigation) water in Egypt. Journal of Phytopathology 147: 485–487
- Fegan M & Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex - Allen, A. (ed.); Prior, P. (ed.); Hayward, A.C. (ed.), p 449–461

- Gabriel DW, Allen A, Schell M, Denny TP, Greenberg JT, Duan YP, Flores-Cruz Z, Huang Q, Clifford JM, Presting G, González ET, Reddy J, Elphinstone J, Swanson J, Yao J, Mulholland V, Liu L, Farmerie W, Patnaikuni M, Balogh B, Norman D, Alvarez A, Castillo JA, Jones J, Saddler G, Walunas T, Zhukov A & Mikhailova N (2006) Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 69-79
- Hayward AC (1994) Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward AC, Hartman GL, eds. *Bacterial wilt: the Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK: CAB International, 123-135
- Horita K, Tsuchiya A & Ooshiro M (2005) Characteristics of *Ralstonia solanacearum* Biovar N2 Strains in Asia. *Journal of Phytopathology* 153: 209-213
- Janse JD (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO* 18: 343-351
- Janse JD (1996) Potato brown rot in western Europe - history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* 26: 679-695
- Janse JD (2006) *Phytopacteriology - Principles and Practice*. CABI Publishing, Wallingford, UK and Oxford Press, New York, 360 pp
- Janse JD, Araluppan FAX, Schans J, Wenneker M & Westerhuis W (1998) Experiences with bacterial brown rot *Ralstonia solanaceum* biovar 2, race 3 in the Netherlands. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (ed.), *Bacterial wilt disease. Molecular and ecological aspects*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany
- Janse, JD, Dijkstra H, Beuningen AR van, Derks JHJ, Tjou-Tam-Sin NNA & Schoeman-Weerdesteijn ME (2004a) Meerjarig EU-programma betreffende technische assistentie aan Egypte voor de bestrijding van bruinrot (*Ralstonia solanacearum*) bij aardappel . *Gewasbescherming* 35(3): 172-175
- Janse JD, Van den Beld HE, Elphinstone J, Simpkins S, Tjou-TamSin NNA & Van Vaerenbergh J (2004b) Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium* zonale cuttings. *Journal of Plant Pathology* 86: 147-155
- Janse JD & Wenneker M (2002) Possibilities in the avoidance and control of bacterial plant diseases when using pathogen tested (certified) or treated planting material. *Plant Pathology* 51: 523-536 (review article)
- Messiha NAS (2006) Bacterial wilt of potato (*Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2): disease management, pathogen survival and possible eradication. Doctoral Thesis, Wageningen University, 150 pp
- Messiha NAS, van Bruggen AHC, van Diepeningen AD, de Vos OJ, Termorshuizen AJ, Tjou-Tam-Sin NNA & Janse JD (2007a) Potato brown rot incidence and severity under different management and amendment regimes in different soil types. *European Journal of Plant Pathology* ISSN 0929-1873 Print 1573-8469 (published online)
- Messiha NAS, van Diepeningen AD, Wenneker M, van Beuningen AR, Janse JD, Coenen TGC, Termorshuizen AJ, van Bruggen AHC & Blok WJ (2007b) Biological soil disinfestation, a new control method for potato brown rot, caused by *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *European Journal of Plant Pathology* 117: 403-415
- Moraes, MA de (1947) Uma bacteriose vascular da batateira (*Bacterium solanacearum*) E. F. Smith. *Agronomia Lusitana* 9, 277-328 (in het Portugees)
- Persson P (2008) Successful eradication of *Ralstonia solanacearum* from Sweden. *Bulletin OEPP/EPPO* 28, 113-119
- Poussier SD, Trigalet-Demery, P, Vandewalle, Goffinet B, Luisetti J & Trigalet A (2000). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146: 1679-1692
- Pingsheng J, Allen C, Sanchez-Perez A, Yao J, Elphinstone J, Jones JB & Momol MT (2007) New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. *Plant Disease* 91: 195-203
- Termorshuizen AJ, Volker D, Blok WJ, ten Brummeler E, Hartog BJ, Janse JD, Knol W & Wenneker M (2003) Survival of human and plant pathogens during anaerobic mesophilic digestion of vegetable, fruit, and garden waste. *European Journal of Soil Biology* 39: 165-171
- Tomlinson DT, Elphinstone JG, Soliman MY, Hanafy MS, Shoala TM, Abd El-Fatah H, Agag SH, Kamal M, Abd El-Aliem MM, Fawzi FG, Stead DE & Janse JD (2009) Recovery of *Ralstonia solanacearum* from canal water in traditional potato growing areas of Egypt but not from designated Pest Free Areas. *European Journal of Plant Pathology* (in druk)
- Van Beuningen AR, Derks JHJ, Gorkink R, Ronda BHNAM & Janse JD (1999) Field experiment on the sensitivity of potato cultivars and some weeds and *Zea mays* after irrigation with contaminated surface water. *Verslagen en mededelingen Plantenziektenkundige Dienst Wageningen* 200

- (Annual Report Diagnostic Centre 1998): 45-46
- Van Beuningen AR, Tax M, Voogd JGB, van Overbeek LS & Janse JD (2005) Bruinrot bij aardappel: Doorbraak in de preventie van herintroductie als gevolg van beregening en bespuiting Gewasbescherming 36 (6): 248-252
- Van der Tuin WR, Nahumury ET, Spit BE & Janse JD (1996) *Pseudomonas* (*Ralstonia*)*solanacearum* race 1, biovar 4 in *Curcuma longa*. Verslagen en Mededelingen Plantenziektenkundige Dienst 186, 1997, Annual Report 1996, 17
- van Elsas JD, Kastelein P, Bekkum P van, Wolf, JM van der, de Vries PM & van Overbeek LS (2000) Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* 90: 1358-1366
- van Elsas JD, Kastelein P, Vries PM de & Overbeek LS van (2001) Effects of ecological factors on the survival physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 1-13
- Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N & Stead DE (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2853-2858
- Wenneker M, van Beuningen AR, van Nieuwenhuijze AEM & Janse JD, 1998. Overleving van bruinrot en ontsmetting oppervlaktewater: Overleving van de bruinrotbacterie (*Pseudomonas solanacearum*) in en op diverse substraten en de effectiviteit van enkele middelen voor de ontsmetting van oppervlaktewater. *Gewasbescherming* 29, 7-11
- Wenneker M, Verdel MSW, Van Beuningen AR, Derks JHJ & Janse JD (1999) *Ralstonia* (*Pseudomonas*)*solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: first report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology* 105: 307-315
- Wullings BA, Beuningen AR van, Janse JD & Akkermans ADL (1998) Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by Fluorescent In Situ Hybridization with 23S rRNA-Targeted probes. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4546-4554
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud, C, Fegan M & Prior P (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6790-6801
- Yabuuchi, E, Kosako Y, Yano I, Hotta H & Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiological Immunology* 39: 897-904

Beurzen KNPV

Het KNPV-bestuur verleent van tijd tot tijd subsidies om activiteiten mogelijk te maken die passen in de doelstelling van de vereniging.

Randvoorwaarden voor de toekenning:

- indienen gemotiveerd verzoek: wat, met welk doel, welke kosten, wie financiert en wat wordt teruggeleverd (het aanvraagformulier is te downloaden van website www.knpv.org);
- passen binnen de doelstelling van de vereniging, c.q. bevorderen samenwerking en/of kennisuitwisseling op gebied van gewasbescherming;
- ingediend kan worden door individuele personen mits KNPV lid, verenigingen, (KNPV-) werkgroepen en maatschappelijke organisaties;
- de gevraagde financiële bijdrage zou niet logischerwijs door de werkgever betaald moeten worden (om dit te beoordelen inzicht geven in medefinanciering en/of eigen bijdrage);
- er wordt een tastbare tegenprestatie gevraagd, bijvoorbeeld een korte rapportage voor Gewasbescherming (plaatsing ter bepaling van redactie) of een poster op een gewasbeschermingsdag;
- een pre hebben voorstellen die samenwerking tussen de groepen onderzoek, onderwijs, industrie en beleid bevorderen.

Aanvraagformulieren kunt u vinden op www.knpv.org. De aanvraag wordt beoordeeld door een toetsingscommissie.