

# Ringrot in de aardappel

J.M. van der Wolf

Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (IPO) Postbus 9060, 6700 GW Wageningen

## Ringrot in Nederland

Dit voorjaar werd voor het eerst in Nederland, op een bedrijf vlakbij de Duitse grens, de quarantaineziekte ringrot in aardappelknollen vastgesteld. Ringrot wordt veroorzaakt door *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms), een Grampositieve bacterie. Al snel rees de vraag, wat deze introductie voor de Nederlandse aardappelsector kan betekenen. Bekend is dat veel landen, zowel binnen als buiten Europa, hun grenzen afsluiten voor landen met ringrot problemen. De ziekte komt vaak in latente vorm voor en met het steekproefsgewijs bemonsteren van partijen kan nooit een volledige garantie gegeven worden dat pootgoed vrij is van ringrot. Hoewel intensieve uitroeiingsprogramma's de directe schade als gevolg van ringrot in verschillende landen sterk hebben gereduceerd, is geen enkel land waar ringrot zich deze eeuw gevestigd heeft, echt helemaal vrijgekomen van de ziekte. In dit artikel wordt ingegaan op de biologie van het pathogeen en de mogelijkheden de ziekte te beheersen. Ook wordt een overzicht gegeven van een EU-FAIR project dat in maart is gestart, en dat tot doel heeft meer inzicht te krijgen in de epidemiologie van de ringrotbacterie.

## Verspreidingsgebied

De ziekte en ziekteverwekker zijn aan het begin van deze eeuw voor het eerst beschreven in Duitsland (Spieckerman & Kotthoff, 1914). Het is nog altijd een vraag waar Cms vandaan komt, omdat in het genen centrum van de aardappel in Zuid-Amerika de ziekte niet lijkt voor te komen. Inmiddels is de ziekte ver-

spreid over veel verschillende landen in Europa, Azië, Afrika, Noord- en Zuid-Amerika (Tabel 1). Van directe betekenis voor de Nederlandse landbouw zijn de infecties die in Duitsland in 1999 op tientallen verschillende bedrijven zijn gevonden, waarvan vele dicht tegen de Nederlandse grens. De ziekte kan op drie manieren schade veroorzaken: (1) door directe opbrengstverliezen tijdens de teelt en gedurende de opslag, (2) door afkeuring van partijen als gevolg van de slechte kwaliteit of vanwege vastgestelde tolerantieniveaus, (3) door verlies van exportmarkten of door gebrek aan mogelijkheden nieuwe markten te openen als direct gevolg van de angst van importerende landen ringrot te introduceren. Het verlies van markten veroorzaakt in de hoogwaardige aardappelteelten in Europa en Noord-Amerika, waar intensief getoetst wordt, de belangrijkste schadepost. In de jaren '40 en '50 was de directe schade als gevolg van ringrot-infecties nog aanzienlijk. Het ontbreken van adequate laboratoriumtoetsen en de mechanische verspreiding via het gebruik van 'picker planters' (machines die m.b.v. een metalen pen de knollen in de grond brachten) en de gewoonte om pootgoed te snijden, waren hiervoor de belangrijkste oorzaken.

## Ziektesymptomen

Cms is een vaatpathogeen, dat verwelking van de bovengrondse delen van de plant kan veroorzaken, welke als regel begint bij de onderste bladeren. Aangetaste planten vertonen verbleking en vergeling van het bladgroen tussen de nerven en aan de bladranden. Opvallend is het opwaarts rollen van de bladranden om de middennerf van deze bladeren. De knollen worden als regel via de stolonen geïnfecteerd, waarna rot kan ontstaan vanuit de vaatbundeling. Bij een voortschrijdende infectie ontstaat er een geel zacht kaasachtig materiaal in het vaatweefsel van de knol (Fig. 1A). Nog later wordt het geelverkleurde weefsel donkerder, waarbij het knolweefsel desintegreert (Fig. 1B). In dit stadium zijn op de schil soms scheuren te zien die aan de randen roodbruin kleuren. De symptomen zijn echter divers, afhankelijk van de aardappelcultivar en omgevingsfactoren, verschijnen bijna nooit tegelijk en kunnen ook door andere ziekteverwekkers worden veroorzaakt, zodat een correcte diagnose op basis van symptomen moeilijk is. Vaak verschijnen de symptomen pas laat in het groeiseizoen, wat mogelijk samenhangt met de langzame vermeerdering van het pathogeen.

ARTIKEL

Tabel 1. Verspreiding van Cms over landen in de verschillende werelddelen

Werelddeel	Land
Europa	België, Tsjechië, Denemarken, Finland, Duitsland, Noorwegen, Polen, Rusland, Slowakije, Spanje, Zweden, Oekraïne, Nederland
Azië	Afghanistan, China, Japan, Cambodja, Kazakstan, Korea, Nepal, Siberië, Taiwan, Oezbekistan
Afrika	Algerije
Noord-Amerika	Canada, Verenigde Staten
Centraal en Zuid-Amerika	Argentinië, Costa Rica, Panama, Peru en Venezuela

## Overleving

Het ecologisch gedrag van Cms verschilt belangrijk van dat van *Ralstonia solanacearum*, de veroorzaker van bruinrot. Terwijl *R. solanacearum* goed in water overleeft, lijkt Cms dit slecht te doen. Ook in grond lijkt Cms zich moeilijk te handhaven. Slechts onder koele droge condities (< 0 °C, verwelkingspunt), werd in een leemgrond een relatief lange overlevingsduur van 9 maanden gevonden (Nelson, 1979). Bij 20 °C en veldcapaciteit overleefde Cms in dezelfde grond slechts 6 dagen. De bruinrot bacterie persisteert juist beter onder hogere bodemtemperaturen (15 – 20 °C). Cms wordt dan ook vooral in landen met een gematigd of koel klimaat gevonden terwijl *R. solanacearum* juist meer in warmere klimaten voorkomt. Overigens kan een infectie met Cms ook in landen met een warmer klimaat, zoals Ita-

## Verspreiding

De voornaamste wijze van verspreiding van Cms is via besmet pootgoed. In gemechaniseerde teelten kunnen machines gecontamineerd raken waarna via contactbesmetting de bacterie verder in het pootgoed verspreid wordt. Voor besmetting zijn wonden nodig, hoewel er ook aanwijzingen zijn dat Cms via de ogen de knol kan penetreren. In modelstudies werd aangetoond dat Cms via insecten als de coloradokever en de groene perzikluivrij makkelijk overgedragen kan worden van zieke naar gezonde planten (Christie et al., 1991). Over een mogelijke transmissie via nematoden is niets bekend.

## Virulentiefactoren

Er is nog relatief weinig bekend over virulentiefactoren van Cms, omdat

van materialen en spelen EPS mogelijk ook een rol bij adsorptie van Cms aan de celwand van waardplanten.

## Bestrijding

Voor bestrijding van Cms in geïnfecteerd plantenmateriaal zijn geen effectieve methoden voorhanden. Met antagonistische bacteriën werd in twee verschillende studies slechts een beperkte reductie van het aantal ringrot zieke planten bereikt (De la Cruz et al., 1992; Garmard & De Boer, 1995). Er zijn wel verschillende chemische- en fysische methoden beschikbaar waarmee de bacterie op besmet gereedschap en oppervlakten van bewaarfaciliteiten effectief geëlimineerd kan worden. Door gebruik te maken van tolerante aardappelcultivars kan symptoomvorming en schade gereduceerd worden, maar volledig resistente cultivars zijn niet bekend. Met het gebruik van de tolerante cultivars dient men voorzichtig te zijn, omdat hierdoor de bacterie zich ongemerkt verder kan verspreiden.

## EU-maatregelen

Binnen de Europese Unie en in Noord-Amerika zijn strategieën voor beheersing van ringrot gebaseerd op (1) het opsporen van Cms in met name pootgoed en het vaststellen van de omvang van de verspreiding, (2) voorkomen van verdere verspreiding door isolatie van besmette materialen, waaronder machines en plantmateriaal en (3) het nemen maatregelen om de ziekte uit te roeien (Anonymous, 1993). Binnen deze beheersingsmaatregelen valt ook een verbod op de teelt van aardappelen gedurende drie tot vier jaar, afhankelijk van de verdere maatregelen die genomen worden.

## Detectie en identificatie

Voor het opsporen van Cms zijn betrouwbare detectiemethoden onmisbaar. Cms groeit vanuit plantenextracten slechts langzaam op voedingsbodems en wordt makkelijk door snel groeiende saprofytische bacteriën overwoerd. Isola-

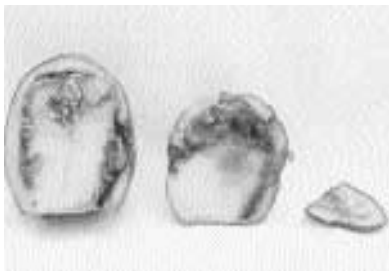


Fig. 1. A, Knolinfectie met *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. De vaatbundelring bevat een grote hoeveelheid van een zachte kaasachtige substantie. B, Vergevoerde knolinfectie, waarbij de vaatbundelring zwart verkleurd is, mogelijk als gevolg van secundaire infecties door andere bacteriën.

lië, tot ernstige symptoomontwikkeling leiden (Mazzucchi et al., 1982). Cms wordt wel een biotrofe ziekteverwekker genoemd, omdat deze in microbiële complexe substraten buiten de waardplant zich zo slecht kan handhaven. Slechts onder koele droge condities, bij een lage microbiële activiteit, zoals op de oppervlaktes van materialen, wordt een lange overlevingsduur van Cms gevonden (Nelson & Kozub, 1990). Op materialen, zoals metaal, steen en katoen kan Cms wel jaren overleven, terwijl *R. solanacearum* maximaal enkele weken op deze materialen overleeft. Cms kan makkelijk uit deze rusttoestand weer geactiveerd worden.

geschikte vectoren voor integratie van genetisch materiaal in het genoom van Cms, zoals transposons, ontbreken. Wel is er een plasmidevector gegenereerd, op basis van het replicatie-origine van pCS1, een plasmide dat van nature in veel Cms stammen voorkomt, dat kan dienen als kloneringsvector. Uit genetisch onderzoek is duidelijk geworden dat de extracellulaire enzymen amylase en cellulase, een belangrijke rol spelen in het ziekteproces (Metzler et al., 1997). Amylase-negatieve mutanten zijn minder virulent dan wild-type stammen, terwijl cellulase-negatieve mutanten avirulent zijn. Verder spelen de extracellulaire polysacchariden (EPS) een rol bij de overleving van Cms op oppervlaktes

tie van het pathogeen direct uit aardappelweefsel is daarom vaak onmogelijk. Voor isolatie worden daarom de extracten eerst in een aubergineplant gebracht via stengel-inoculatie. Deze plant fungeert als 'verrijkmingsmedium' en Cms kan in de regel vanuit symptomatische aubergineplanten makkelijk geïsoleerd worden. Deze wijze van detecteren kost weken, is duur en bewerkelijk. Voor routinematige detectie wordt veelal, net als voor de bruinrot bacterie, gebruik gemaakt van immunofluorescentie celkleuring (IF), een serologische methode. Echter, met IF kunnen dichtheden lager dan 10.000 cellen per ml plantenextract niet aangetoond worden, terwijl in latent-geïnfecteerde planten lagere dichtheden kunnen voorkomen. IF-positieve resultaten dienen verder bevestigd te worden met andere technieken, omdat ook commercieel beschikbare monoklonale antistoffen vals-positieve reacties met kruisreagerende bacteriën in IF niet uitsluiten. Binnen diverse EU-programma's wordt onderzocht of met amplificatiemethoden als PCR en NASBA, lagere dichtheden van Cms betrouwbaar kunnen worden aangetoond. Wanneer de bacterie is geïsoleerd, kan deze met behulp van een pathogeniteitstoets, vetzuuranalyse en met genetische vingervorming methoden als rep-PCR nader gekarakteriseerd worden. Aangetoond is dat Cms genetisch een relatief homogene groep is, waardoor karakterisering met deze vingervorming technieken een grote mate van betrouwbaarheid kent.

### EU-project aangaande de epidemiologie van ringrot

Veel kennis over de ecologie van Cms is gebaseerd op ervaringen uit de praktijk, en is niet goed onderbouwd door wetenschappelijk onderzoek. Voor het verkrijgen van aanvullende wetenschappelijke informatie over het ecologisch gedrag van Cms werd in februari 1999 gestart met het EU FAIR-project 'Epidemiological studies for control of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, the causative agent of

bacterial ring rot in potato' (PL98-4366). In dit project, dat gecoördineerd wordt door Nederland, wordt samengewerkt met onderzoekers van Engeland, Finland, Denemarken en Duitsland. In het eerste jaar worden de gereedschappen verzameld voor het uitvoeren van gedetailleerd epidemiologisch onderzoek. Dit omvat onderzoek naar de diversiteit in verband met de selectie van een representatief panel van stammen, de selectie van antibioticum-resistente stammen om de bacterie makkelijk vanuit complexe substraten te kunnen isoleren en de constructie van stammen die gemerkt zijn met 'green fluorescent protein', voor *in situ* detectie van Cms in plantenmateriaal. Verder wordt aandacht besteed aan methoden voor detectie van Cms in grond, plantenmateriaal en water, zoals PCR-amplificatie, NASBA en immunofluorescentie koloniekleurings. Met fluorescente probes worden amplificatieproducten binnen gesloten systemen 'on line' gedetecteerd, om contaminaties zo veel mogelijk te voorkomen (Fig. 2). In de drie jaren daarna worden gecombineerde veldstudies en potproeven uitgevoerd om meer inzicht te krijgen in de overleving en verspreiding van Cms in grond, oppervlaktewater, akkeronkruiden, rotatiegewassen en op landbouwmachines. Ook de kolonisatie van de aardappelplant door Cms zal worden bestudeerd. Een bijzonder element in het project is onderzoek naar de mogelijkheid van Cms om voor te komen in een levende, maar niet cultiveerbare toestand (zgn. 'viable but non-culturable cells' (VBNC)). Dit is belangrijk in verband met onderzoek naar de overleving van Cms en in diagnostische assays, gebaseerd op de cultiveerbaarheid van de bacterie. Uiteindelijk wordt de informatie verzameld en vertaald tot praktische aanbevelingen voor beheersing van de ziekte, bedoeld voor telers, koepelorganisaties, plantenziektenkundige diensten en beleidsmedewerkers binnen de landbouw.

### Literatuur

Anonymous, 1993. Council Directive 93/85/

EEC on the control of potato ring rot. Offi-

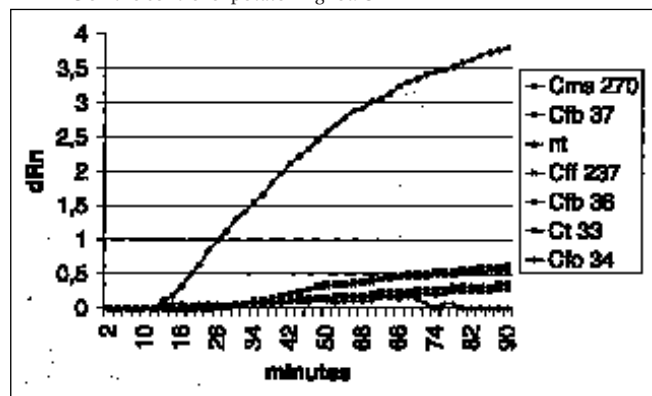


Fig 2. Specifieke reactie van *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) met AmpliDet RNA. De waarden van verwante bacteriesoorten (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff), *C. f. pv. oortii* (Cfo), *C. f. pv. betae* (Cfb) en *C. tritici* (Ct) komen niet boven die van de 'no template' (nt) controle uit. Tijdens de AmpliDet RNA worden specifieke 16S rRNA sequenties isotherm vermenvuldigd, terwijl amplificatieproducten in een gesloten systeem met een 'molecular beacon' d.m.v. fluorometrie 'real time' worden gedetecteerd. Een 'molecular beacon' fluoresceert wanneer deze hybridiseert met gevormde amplificatieproducten.

cial Journal of the European Communities No L. 259/1-25.

- Christie, R.D., Sumalde, A.C., Schulz, J.T. & Gudmestad, N.C. 1991. Insect transmission of the bacterial ring rot pathogen. *American Potato Journal* 68: 363-372.
- De la Cruz, A.R., Poplawsky, A.R. & Wiese, M.V. 1992. Biological suppression of potato ring rot by fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1986-1991.
- Gamard, P. & De Boer, S.H., 1995. Evaluation of antagonistic bacteria for suppression of bacterial ring rot of potato. *European Journal of Plant Pathology* 101: 519-525.
- Metzler, M.C., Laine, M.J. & De Boer, S.H., 1997. The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. *FEMS Microbiology Letters* 150: 1-8.
- Mazzucchi, U., Bazzi, C. & McKenzie, A.R., 1982. Transmission of *Corynebacterium sepedonicum* from latently infected seed potatoes in the Po valley. *Phytopathologia Mediterranea* 21: 116-117.
- Nelson, G.A. 1979. Persistence of *Corynebacterium sepedonicum* in soil and in buried potato stems. *American Potato Journal* 56: 71-77.
- Nelson, G.A. & Kozub, G.C., 1990. Survival of *Corynebacterium sepedonicum* at freezing and at wide fluctuations between freezing and above-freezing temperatures. *American Potato Journal* 67: 625-631.
- Spieckermann, A. & Kotthoff, P. 1914. Untersuchungen über die Kartoffelpflanze und ihre Krankheiten. 1. Die Bakterienringfäule der Kartoffelpflanze. *Landwirtschaftliche Jahrbücher* 64, 659-732.

ARTIKEL