



# Naar een Erwinia-vrije pootgoedteelt: een literatuurstudie

J.M. van der Wolf







# Naar een Erwinia-vrije pootgoedteelt: een literatuurstudie

J.M. van der Wolf

© 2004 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

## **Plant Research International B.V.**

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen  
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen  
Tel. : 0317 - 47 70 00  
Fax : 0317 - 41 80 94  
E-mail : [post.plant@wur.nl](mailto:post.plant@wur.nl)  
Internet : <http://www.plant.wur.nl>

# Inhoudsopgave

	pagina
Voorwoord	1
Verklarende woordenlijst	3
Samenvatting	5
1. Algemene eigenschappen	9
2. Symptomen	11
3. Overleving	13
4. Verspreiding	15
5. Controle	19
6. Literatuur	27
Bijlage I. Aanbevelingen voor beheersing van Erwinia-infecties	1 p.
Bijlage II. Belangrijke kennisleemtes voor beheersing van bacterieziekten (meest relevante kennisleemtes zijn gemarkeerd)	2 pp.



# Voorwoord

In dit rapport is de (recente) literatuur verwerkt over bacterieziekten in de aardappel, veroorzaakt door *Erwinia*'s. De literatuur van voor 1996 is aan de hand van vijf overzichtsverhalen samengevat. Uit de verwerkte literatuurgegevens is een lijstje praktische aanbevelingen voor pootgoedtelers geëxtraheerd. Verder is ook aangegeven waar nog duidelijke leemtes in onze kennis zitten om tot een betere beheersing van bacterieziekten te komen.

Het rapport kwam tot stand in opdracht van de stuurgroep van het project 'Bacterievrije pootgoedteelt'. Graag wil ik de betrokken financiers (LTO, HPA, NAO, handelshuizen en subsidiegevers) bedanken voor de financiële bijdrage voor het tot stand komen van dit rapport. De werkgroep van voornoemd project en Dr W. Jordi (Plant Research International) dank ik hartelijk voor hun kritische commentaar. De auteur blijft alleen verantwoordelijk voor de inhoud van dit rapport.





# Verklarende woordenlijst

**Anaeroob:** zuurstofarm òf organisme dat in afwezigheid van zuurstof kan groeien

**Bacterieziek:** (hier) ziektesymptomen in de aardappel veroorzaakt door Erwinia's

**Biovar:** een binnen de (onder)soort groep isolaten, geïdentificeerd op basis van biochemische of fysiologische eigenschappen

**Chlorose:** Vergeling doordat het bladgroen geheel of gedeeltelijk wordt afgebroken

**Epifytisch:** aanwezigheid van micro-organisme op de bovengrondse delen van de plant (blad of steel) zonder er voedsel aan te onttrekken

**Fytoalexinen:** laagmoleculaire antimicrobiële verbindingen die door planten wordt gevormd en opgehoopt na blootstelling aan micro-organismen of onder invloed van andere stressfactoren

**Gram-negatief:** Groep van niet-sporenvormende bacteriën die een specifieke dubbele membraan structuur hebben en die na kleuring met een bepaalde kleurstof (Gram-kleuring) ook weer gemakkelijk ontkleuren met alcohol of aceton

**Habitat:** levensruimte van een micro-organisme

**Lesies:** min of meer begrensde verwondingen of weefselbeschadigingen

**Lignificatie:** toename van de hoeveelheid lignine waardoor de plantencelwand harder wordt

**Maceratie:** (hier) desintegratie van plantenweefsel door productie van celwandafbrekende enzymen

**Plantenmetabolieten:** inhoudsstoffen die door de plant worden geproduceerd

**Serogroep:** Binnen de (onder)soort een groep waarvan de individuen serologisch identiek zijn

**Stam:** groep van overeenkomstige isolaten

**Virulentiefactoren:** Factoren die een ziekteverwekker (i.c. Erwinia's) het vermogen geven om ziekteverschijnselen te doen ontstaan



## Samenvatting

De pectinolytische *Erwinia* soorten, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) en *E. chrysanthemi* (Ech) zijn verantwoordelijk voor het ontstaan van de bacterieziekten zwartbenigheid en stengelrot in de aardappel. Uit recent onderzoek is verder gebleken dat ook stammen van *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) zelfstandig ziektesymptomen in de aardappel in Nederland kunnen veroorzaken. Echter, het aandeel van Ecc in de totale schade veroorzaakt door *Erwinia*'s in Nederland is niet bekend.

In deze literatuurstudie wordt ingegaan op de vraag hoe initiële infecties ontstaan, hoe de bacteriepopulaties zich tijdens pootgoedvermeerdering opbouwen en hoe *Erwinia* problemen via teeltmaatregelen en pootgoedontsmetting beheerst kunnen worden.

*Initiële besmetting.* Besmettingen met *Erwinia*'s kunnen al in lage concentratie latent aan het begin van de stammenvermeerdering aanwezig zijn. Ook weefselweekplanten kunnen besmet zijn. Bacteriecellen groeien soms bij controle van het plantmateriaal niet uit in het groeimedium, mogelijk doordat cellen te sterk ingekapseld zijn in het plantenweefsel.

Is het uitgangsmateriaal schoon, dan is initiële besmetting het meest waarschijnlijk vanuit de lucht door neerslag van besmet regen- of irrigatiewater, door gecontamineerde aerosolen of door het gebruik van besmette machines en materialen tijdens teelt, oogst, sortering en opslag. Minder waarschijnlijke infectiebronnen zijn: besmette insecten, besmette gronden, of contactbesmettingen met onkruiden.

Initiële besmettingen vanuit de lucht en door teeltmaatregelen zijn het meest aannemelijk. In oogstperiodes ontstaan er besmette aerosolen door mechanische loofvernietiging van geïnfecteerde gewassen. Deze aerosolen kunnen direct overwaaien naar nabij gelegen percelen. Bij een hoge luchtvochtigheid kunnen aerosolen ook in hogere luchtlagen terecht komen en via regenwater verder gelegen percelen contamineren. *Erwinia*'s zijn dan ook in regenwater en op het loof aangetroffen. Als deze bacteriën de planten (via wonden) binnendringen, kunnen ze rot veroorzaken. De hoge aantallen bacteriën die dan ontstaan, kunnen via de grond dochterknollen infecteren. Ook kunnen epifytische populaties zich tijdens loofvernietiging vermeerderen en via de grond infecties veroorzaken. *Erwinia*'s zijn in hoge dichtheden, tot op een diepte van 10 cm in grond aangetroffen.

Als machines en materialen niet goed ontsmet worden voor gebruik in een schoon gewas bestaat er een grote kans op besmetting. Bij het gebruik van machines tijdens teelt, oogst, sortering en opslag dienen knolbeschadigingen zo veel mogelijk vermeden te worden. *Erwinia*'s overleven vaak maar kort (< 2 dagen) op machines, maar als cellen goed beschermd zijn tegen uitdrogen kunnen ze wel tot 100 dagen overleven.

In aardappelgebieden in Europa en Amerika was tot 15% van alle insecten in aardappelteeltgebieden met *Erwinia*'s besmet, soms met hoge dichtheden van  $10^6$  cellen per insect. *Erwinia*'s overleven niet lang en insecten zijn dan ook slechts gedurende een periode van 2-3 dagen infectieus. In die tijd kunnen ze zich maximaal 20 km tegen de wind in verplaatsen. Ze worden aangetrokken door verse wonden of zelf wonden creëren en zo het loof infecteren. Gemiddeld 5% van de door insecten geïnfecteerde wonden resulteert in stengelrot.

*Erwinia*'s lijken niet lang genoeg in grond te kunnen overleven om in een volggewas in een 1 op 3 of 1 op 4 rotatie teelt initiële besmettingen te kunnen veroorzaken. Een goede beoordeling blijft moeilijk, omdat ook met de beste detectiemethoden de populatiedichtheden slecht te bepalen zijn. In Europa zijn *Erwinia*'s in vrije grond maximaal 9 maanden detecteerbaar. Aanwezigheid van resten van waardplanten kan de overleving bevorderen, zoals gevonden is voor Ech in maïs residuen. Overleving in grond is ook afhankelijk van de temperatuur en vocht. Bij extreme temperaturen van boven de 30 °C en beneden de 0 °C overleven *Erwinia*'s slecht. Eca overleeft beter in waterverzadigde gronden terwijl Ech beter overleeft bij lage vochtcondities.

Besmettingen van landbouwgronden kunnen persisteren via onkruiden of gewassen die als (alternatieve) waardplant van *Erwinia*'s fungeren. Contactbesmettingen van een schoon aardappelgewas met geïnfecteerde onkruiden of landbouwgewassen via de wortels kunnen mogelijk leiden tot initiële besmetting. Ook kunnen de bacteriën vanuit besmette onkruiden, de gronden herkoloniseren. Omdat *Ech* een bredere waardplantenreeks kent dan *Eca*, zal voor dit pathogeen het gevaar van overleving op alternatieve gastheren groter zijn. Aardappelopslag is één van de grootste gevaren, hoewel in de rhizosfeer van opslag weinig *Erwinia*'s gevonden werden. Alleen in de rhizosfeer van *Brassica*'s werden relatief hoge dichtheden *Erwinia*'s aangetroffen.

*Populatie-opbouw.* De verdere opbouw van *Erwinia* populaties in geïnfecteerde partijen vindt vooral plaats vanuit rottende moederknollen tijdens de gewasgroei en vanuit geïnfecteerde gewasresten na vernietiging van loof. Uitbreiding van infecties binnen en tussen partijen vindt met name plaats tijdens (mechanische) oogst, sortering en opslag.

Geïnfecteerde moederknollen zullen met name bij hoge vochtcondities in de grond sterk gaan rotten. Vanuit geïnfecteerde lenticellen of vanuit besmet vaatweefsel aan het naveleinde zal knolrot geïnitieerd worden. De bacteriën banen zich een weg naar de vaatbundels van de knol, stengels en stolonen. Tijdens de gewasgroei vinden veel van de dochterknolinfecties plaats vanuit de stolonen. Een hoog percentage van de knollen is dan ook aan het naveleinde besmet. Er is een positieve relatie gevonden tussen moederknolrot door *Erwinia*'s en het ontstaan van ziektesymptomen in het veld.

De bacteriecellen kunnen ook vanuit de rottende moederknollen via vrij vocht in de grond naar dochterknollen worden getransporteerd. Lenticellen staan onder vochtige omstandigheden open, en vormen een makkelijke invalspoort voor de bacteriecellen.

Bij loofvernietiging kunnen ook symptoomloze geïnfecteerde aardappelplanten hoge dichtheden *Erwinia*'s bevatten van  $10^6$  cellen per gram plantmateriaal. Wanneer er loof op de ruggen blijft liggen, kunnen bij regen de bacteriën de grond inspoelen en zo de dochterknollen infecteren.

De opbouw van *Erwinia* infecties wordt sterk bevorderd tijdens de oogst en sortering. Dochterknollen zullen tijdens oogst- en sorteringshandelingen beschadigd raken en worden geïnfecteerd door rottende (moeder)knollen. Bekend is dat één rotte knol op een oogstmachine 1000 kg pootgoed kan besmetten.

*Beheersing.* Bacterieziekten veroorzaakt door *Erwinia*'s zijn te beheersen door gebruik van snelle vermeerderingstechnieken, door certificering van pootgoed m.b.v. veldinspecties en laboratoriumtoetsen, door via teeltmaatregelen besmetting, populatie-opbouw en verspreiding te voorkomen, door fysische- en chemische ontsmetting van pootgoed, door biologische bestrijding met antagonisten, en door het gebruik van (partieel) resistente rassen. Certificering en het toepassen van de juiste teeltmaatregelen worden als het meest effectief beschouwd.

Voor certificering zijn veldkeuringen essentieel, omdat hiermee een totaal zicht op de kwaliteit van partijen verkregen wordt. Daarnaast moeten bij voorkeur gevoelige, kwantitatieve laboratoriumtoetsen gebruikt worden voor het opsporen van latente infecties. Er is namelijk een verband tussen het infectieniveau en de kans op symptoomontwikkeling, hoewel ziekte-expressie sterk afhankelijk blijft van weerscondities tijdens de teelt.

In de tweede plaats kan met teeltmaatregelen veel problemen voorkomen worden. De volgende maatregelen zijn belangrijk: 1. Het voorkomen van wonden tijdens oogst en sortering, omdat de knollen dan nog kwetsbaar zijn. Essentieel hierbij zijn het laten afharden van knollen en het goed afstellen van machines. 2. Het regelmatig ontsmetten van machines en apparatuur, vooral als men naar een volgende partij gaat. 3. Een goede drainage, zodat er geen anaërobe condities in de grond ontstaan. 4. Zo mogelijk, het afzien van beregening met oppervlaktewater. 5. Beperking van het aantal generaties door gebruik van via snelle vermeerdering verkregen uitgangsmateriaal. 6. Beperking van rijsporen tijdens bestrijding van ziekten en plagen, omdat hierdoor ernstige gewaschade kan ontstaan en bacteriën kunnen versmeren. Verder kan door aanpassing van de bemesting (stikstofgift en calcium) problemen met *Erwinia*'s gereduceerd worden.

Pogingen om pootgoed te ontsmetten met fysische of chemische methoden hebben beperkt succes. Het percentage bacteriezieke planten nam met name door de fysische behandelingen wel af, maar leidde niet tot een volledig bestrijdingseffect. *Erwinia*'s die beschermd worden door knolweefsel, zijn moeilijk te bereiken. Behandelingen waarbij stoom of hitte lucht wordt gebruikt zijn te prefereren boven warm water, omdat hierna de knollen niet teruggedroogd hoeven te worden. Het effect van behandelingen met chemische ontsmettingsmiddelen, inclusief chloorverbindingen, koper en antibiotica, waren bijna altijd teleurstellend. Het gebruik van chemische componenten die het afweersysteem van de plant prikkelen, zoals acetyl salicylzuur, gaven relatief goede bestrijdingsresultaten in kasexperimenten zonder schade aan de knol. Voor toepassing van chemicaliën is een (kostbare) registratie als gewasbeschermingsmiddel verplicht.

Ook het gebruik van biologische bestrijding met antagonisten was beperkt effectief. Tijdens de productie van weefselkweekmateriaal en miniknollen kunnen antagonisten relatief eenvoudig worden geïntroduceerd. Er zijn al antagonisten gevonden die in weefselkweekplanten *Erwinia*'s effectief onderdrukken. Antagonisten die signaalstoffen van *Erwinia*'s kunnen afbreken en zo de productie van virulentiefactoren kunnen voorkomen zijn een nieuwe interessante groep van antagonisten. Antagonisten die naast een bestrijdingseffect ook een groeistimulerend effect hebben, maken toepassing economisch interessant. Vaatkoloniserende bacteriën (endofyten) die tijdens de vermeerdering van knollen meegroeien en die meevermeerderd worden, hebben ook een extra economische waarde. Antagonisten kunnen toegepast worden tijdens het zgn. groenrooien. Met verschillende bacteriën en *Trichoderma* soorten zijn redelijke bestrijdingsresultaten geboekt. Ook voor toepassing van antagonisten is een registratie van het preparaat als gewasbeschermingsmiddel noodzakelijk. Mogelijk dat een therapie waarin fysische, chemische en biologische bestrijdingsmethoden worden gecombineerd de werkzaamheid van de behandelingen verder kan vergroten.

Er zijn wel partieel resistente, maar geen volledig resistente cultivars voor *Erwinia*'s beschikbaar. De schade door *Erwinia*'s bij het gebruik van partieel resistente rassen kan aanzienlijk worden verkleind. De kans dat er via 'klassieke' veredeling volledig resistente rassen zullen worden verkregen is klein, omdat er alleen laat in de selectie, in groot-schalige veldexperimenten, op resistentie getoetst kan worden. Genetische modificatie biedt wel mogelijkheden op resistentie, maar het gebrek aan acceptatie van de consument vormt een belangrijk obstakel bij de introductie van GMO's.



# 1. Algemene eigenschappen

Pectinolytische *Erwinia* soorten zijn verantwoordelijk voor het ontstaan van de bacterieziekten zwartbenigheid en stengelnatrot in de aardappel. Deze ziekten geven grote economische schade zowel bij de pootgoedvermeerdering als in de consumptieteelt.

De verantwoordelijke *Erwinia* soorten zijn recentelijk opnieuw geïnclassificeerd. Tot voor kort werden ze onderscheiden in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca), *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) en *E. chrysanthemi* (Ech). Nu zijn pectinolytische *Erwinia*'s ingedeeld in de genera *Pectobacterium* en *Dickeya* (Gardan *et al.*, 2003; Samson *et al.*, 2004). Eca en Ecc zijn herbenaemd tot resp. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* en *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Ech was al opgedeeld in negen verschillende biovars, die verschilden in hun vermogen specifieke substraten, zoals suikers af te breken. De zeven Ech biovars zijn nu in zes soorten ingedeeld binnen het genus *Dickeya*. In deze studie worden de oude namen nog gebruikt.

*Erwinia*'s komen wereldwijd voor in veel verschillende gewassen, maar de incidentie van ziekteproblemen veroorzaakt door de verschillende soorten verschilt sterk per gebied. De temperatuur speelt hierin een dominante rol. Eca, Ecc en Ech hebben een verschillend temperatuuroptimum. Ech heeft een relatief hoog groei optimum en maximum. Partijen besmet met Ech vormen daarom een extra risico in landen met een (sub)tropisch klimaat.

Eca is serologisch en genetisch weinig divers. In Nederland komt er maar één serogroep van Eca voor (serogroep I). In andere Europese landen is serogroep I in de aardappel ook dominant, maar worden ook andere serogroepen gevonden; in Finland behoort ca. 40% van de Eca stammen niet tot serogroep I. In Australië is Eca serogroep VI uit de aardappel geïsoleerd. Ech is serologisch en genetisch variabel. Er zijn van Ech > 12 serogroepen bekend (Régine Samson, INRA, persoonlijke mededeling). In Nederland zijn uit de aardappel drie verschillende biovars geïsoleerd: biovar 1 (*P. dianthicola*), biovar 5 (*P. chrysanthemi*) en biovar 7 (*P. dianthicola*). Van 34 gekarakteriseerde Nederlandse Ech aardappelstammen werden 23 stammen ingedeeld in biovar 7, zeven stammen in biovar 5 en vier stammen in biovar 1. *P. dianthicola* stammen behoren tot de typische 'koude stammen'. *P. chrysanthemi* komt in verschillende klimaatgebieden voor en wordt geassocieerd met besmetting van composieten, hoewel deze soort in Nederland dus ook aardappels kan infecteren (Janse & Ruissen, 1988; Nassar *et al.*, 1996). Onderzoek met een genetische vingervorming techniek (PCR-RFLP van het *recA* gen) liet zien dat er binnen de Nederlandse Ech isolaten veel genetische variatie bestaat (Waleron *et al.*, 2002). Hiermee moet rekening gehouden worden tijdens ecologisch onderzoek.

Er zijn sterke aanwijzingen dat voor het effectief koloniseren van specifieke habitats, *Erwinia* soorten gedifferentieerd zijn in ecologisch-aangepaste stammen. In de Pemberton Valley in Canada, bleken in bovengrondse delen van de aardappelplant een andere serogroep van Eca te domineren dan in knol en wortelweefsel (De Boer, 1983). Verder bleek een omgevingsvreemde serogroep (SG X) waarmee knollen kunstmatig waren geïnoculeerd in het volgende seizoen door een inheemse serogroep (SG III) te zijn overgroeid. Het is daarom belangrijk bij modelonderzoek naar de epidemiologie van *Erwinia*'s gebruik te maken van ecologisch aangepaste stammen.

Het feit dat in Nederland slechts één serogroep van Eca en Ech voorkomt, zegt nog niets over eventuele genetische variatie in de populaties en een aanpassing van gespecialiseerde vormen in specifieke habitats. Deze specialisatie kan niet worden opgespoord door stengelinoctatie van planten. Alle Nederlandse Ech isolaten, ook die afkomstig zijn uit andere waardplanten dan de aardappel geven bijvoorbeeld na stengelinoctatie van aardappelplanten symptomen (Janse & Ruissen, 1988). Het is opvallend dat Ech in eerste instantie vooral in de zetmeelgebieden gevonden werden, terwijl nu Ech in heel Nederland lijkt voor te komen. Mogelijk heeft dit ook te maken met een adaptatie van stammen.

Recentelijk is een nieuwe subspecies van *Erwinia carotovora* beschreven die zwartbenigheid in de aardappel kan veroorzaken, nl. *E. carotovora* subsp. *brasiliensis* (Ecb) (Duarte *et al.*, 2004). Ecb is nog alleen in Brazilië

aangetroffen en geeft identieke symptomen in de aardappel als de andere pectinolytische *Erwinia*'s. Ecb reageert niet met de antistoffen en primers die specifiek zijn voor Eca.

Bacteriën die levend knolweefsel kunnen laten rotten behoren niet alleen tot de *Erwinia*'s; ook pectinolytische bacteriën uit de genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* en *Flavobacterium* kunnen knolweefsel laten rotten (Perombelon & Kelman, 1980). *Erwinia*'s zijn echter de primaire veroorzakers van symptomen in de bovengrondse delen van de plant.

*Erwinia*'s produceren een scala aan celwand-afbrekende enzymen waarbij de pectine-splitsende enzymen een dominante rol spelen. Van de belangrijkste enzymen worden verschillende vormen (isozymen) geproduceerd. Mogelijk kan hierdoor een specifieke stam onder verschillende omstandigheden en in verschillend type plantmateriaal rot veroorzaken. Genetische veranderingen van *Erwinia*'s treden makkelijk op. Dit zal het introduceren van stabiele resistenties in de aardappel compliceren.

Eca veroorzaakt vooral problemen op de aardappel en sommige bol- en groentegewassen (v.b. *Zantedeschia*'s en witlof). In hoeverre de Eca aardappelisolaten (genetisch) verschillen van isolaten die op andere gewassen gevonden worden, is niet bekend. Ech en Ecc kennen beide zeer veel waardplanten, zowel in gematigde streken als in (sub)tropische gebieden (Perombelon & Kelman, 1980). Ech en Ecc zouden zich daardoor makkelijker op onkruiden kunnen handhaven. Er zijn sterke aanwijzingen dat *Erwinia* stammen waardplant-specifiek zijn en dus de ene plant makkelijker kunnen infecteren en koloniseren dan een andere plant (De Boer, 2003).

*Erwinia*'s zijn Gram-negatieve bacteriën die geen sporen vormen en daardoor temperaturen boven de 60 °C niet kunnen verdragen (Perombelon & Kelman, 1980).

*Erwinia*'s zijn facultatief anaëroob en kunnen zich ook vermeerderen bij een lage zuurstofspanning, zoals wanneer knollen worden bedekt met vrij water. Het afweermecanisme van de plant is dan ernstig verzwakt, waardoor *Erwinia*'s makkelijk binnen kunnen dringen.

Fimbriae (zweepharen), die betrokken zijn bij de beweging van *Erwinia*'s, zijn wel aanwezig bij een hoog percentage van de Ecc en Ech stammen, maar niet bij Eca. Dit kan mogelijk consequenties hebben voor de efficiëntie van de verspreiding van Ecc en Ech in de grond onder vochtige condities.

Ecc en Ech produceren bacteriocinen, antibiotica waarmee (verwante) concurrerende bacteriën kunnen worden uitgeschakeld. Eca produceert dergelijke bacteriocinen niet. Dit zou bij menginfecties van *Erwinia*'s, Ecc en Ech een competitief voordeel kunnen geven.



## 2. Symptomen

Infectie met pectinolytische *Erwinia*'s kan resulteren in een scala aan symptomen. Hoge infectieniveaus kunnen bij hoge vochtcondities in de grond leiden tot 'non-emergence', het afsterven van kiemen en het weggroten van de knol in de grond. Bij opkomst van geïnfecteerde planten wordt vaak een opeenvolging van symptomen waargenomen, die begint met chlorose gevolgd door verwelking van topbladeren, verwelking van stengels, zwartbenigheid en het afsterven van gedeeltes of van de hele plant (Helias *et al.*, 2000a). Op basis van de symptomen kan niet betrouwbaar worden vastgesteld welke soort *Erwinia* hiervoor verantwoordelijk is. Zowel Eca als Ech worden vaak uit planten met zwartbenigheid geïsoleerd. Ech wordt vaker met stengelverwelking geassocieerd. In welke mate Ecc verantwoordelijk is voor het ontstaan van bacterieziekten in Nederland in de praktijk is nog onduidelijk. Met name in (sub)tropische gebieden worden bacterieziekten veel door Ecc en Ech veroorzaakt (Graham *et al.*, 1985).

Ech veroorzaakt bij warm weer en een hoge instraling slaphangende topbladeren, die vaak weer bijtrekken wanneer de temperatuur daalt. Het percentage planten met zichtbare symptomen kunnen dan ook binnen één week sterk fluctueren van 10% (20 juni) tot 2% (27 juni) (De Vries, 1990). Onder warme, natte condities kan er stengelverwelking optreden en andere stengelsymptomen zichtbaar worden. De stengels lijken eerst aan de buitenkant gezond, maar zijn van binnen hol en rot en soms breekt bij de bladoksels het rot naar buiten. Tenslotte knikken stengels op deze plaatsen om en rotten verder. Ook kan er vergeling van de onderste bladeren optreden. Een hoog percentage van de geïnfecteerde planten laat geen uitwendige symptomen zien, maar wel inwendig symptomen. Bij het aansnijden van de stengelbasis worden holle stengels (afbraak van het merg) en een bruinverkleuring van de vaten waargenomen. Dit is onafhankelijk van het ras. Ech kan onder bepaalde condities ook echte zwartbenigheid geven. Knollen tonen necrosen van de vaatbundels en zijn soms rot. In de tropen worden soms lesies halverwege de stengel gevonden, waarboven de stengel afsterft (Turkensteen, 1986). De plant kan lager weer uitgroeien, waardoor het gewas zich herstelt.

In (sub)tropische gebieden kan Ecc zelfstandig zwartbenigheid veroorzaken. In Nederland veroorzaakte Ecc, na vacuïminoculatie, dezelfde uiterlijke symptomen als Ech, alleen zijn de inwendige stengelsymptomen niet zichtbaar (Graham *et al.*, 1985; Van der Wolf *et al.*, 2003; Van der Zouwen *et al.*, 2002). De bruinverkleuring van het vaatstelsel blijft beperkt tot het onderste deel (0-5 cm), maar het merg wordt niet afgebroken. Afhankelijk van de stam en weercondities kan Ecc ook zwartbenigheid veroorzaken (Van der Wolf *et al.*, 2003)

*Symptoomontwikkeling.* Symptoomontwikkeling wordt beïnvloed door cultivar, knolgrootte, onderwatergewicht, beschadiging van de plant, bacteriestam en omgevingsfactoren, waarvan temperatuur, vocht en bodemgesteldheid de belangrijkste zijn. De relatie tussen deze factoren en symptoomexpressie is complex. Hierdoor kan het ziektepercentage bij stammenvermeerdering in opvolgende jaren sterk verschillen. Dochterknollen van planten met vroeg in het seizoen symptomen, geven in het jaar daarna vaak meer bacterieziek dan dochterknollen van symptoomloze planten. Bij planten die laat in het seizoen ziek worden, zijn de percentages gelijk (Perombelon & Kelman, 1980).

Een aardappelknol kan met één of meerdere *Erwinia*'s besmet zijn. Temperatuur is een belangrijke factor die bepaalt welke soort gaat domineren. Het omslagpunt ligt bij 20 °C bodemtemperatuur of 25 °C luchttemperatuur. Daaronder zal Ech zich niet vermeerderen, daarboven Eca niet. Bij menginfecties van Eca of Ech en een specifieke stam van Ecc werd juist een antagonistisch effect van Ecc gevonden, resulterend in minder zieke planten (Perombelon *et al.*, 1989). Dit kan mogelijk komen door de productie van bacteriocinen door Ecc. In welke mate dit afhankelijk is van de Ecc stam is niet bekend. Door het temperatuureffect en competities tussen *Erwinia*'s kunnen er voor partijen pootgoed lokale verschillen zichtbaar worden in symptoomexpressie. Er is een sterke interactie tussen temperatuur en bodemvochtcondities (Perombelon & Kelman, 1980). Zware neerslag zal vaak leiden tot het weggroten van knollen in de grond. Bij matige vochtcondities bepaalt de temperatuur welk *Erwinia* verantwoordelijk is voor symptomen aan de bovengrondse delen van de plant.

Omdat veel van ons pootgoed geëxporteerd wordt, is het belangrijk rekening te houden met de aard van de besmettingen. Besmettingen met Ech zullen tot veel problemen leiden in (sub)tropische gebieden, terwijl Eca in

koele, vochtige klimaten zoals bijv. Schotland veel schade kan geven. Vergelijking van met Eca kunstmatig besmet pootgoed uitgeplant in Israël en Schotland liet zien dat bij een besmetting van 1000 cfu per knol in Israël 12% bacterieziek werd gevonden tegenover 1% in Schotland (Graham *et al.*, 1985). Voor Ech zijn de verschillen nog groter, zoals is gebleken uit vergelijkend onderzoek in Cuba en Nederland (Turkensteen, 1986).

Symptoomexpressie wordt sterk gestimuleerd door anaërobe condities in de grond, waardoor eerst knolrot optreedt, en daarna symptomen aan de bovengrondse delen van de plant zichtbaar worden. Anaërobe condities treden makkelijk op bij sterke neerslag, maar ook bij verslemping van de grond. Vooral bij gronden die gevoelig zijn voor verslemping moet het gebruik van zware machines of een sterke beregening worden afgeraden.

Het niveau van bemesting kan de symptoomexpressie ook beïnvloeden. Zowel te hoge als een te lage stikstofgift kan symptoomexpressie stimuleren (Anoniem, 1989).

Verder blijkt het calciumniveau van invloed te zijn op met name de mate waarin knollen gevoelig zijn voor natrot (Graham *et al.*, 1985; Velvis, 2001). Calcium heeft een direct effect op de gevoeligheid van de middenlamel voor celwandsplitsende enzymen. Verder kan het de biosynthese van fytoalexinen, antimicrobiële plantenmetabolieten, stimuleren. Tenslotte heeft calcium een rol bij de inductie van virulentiegenen, zoals endopolygalacturonasen.

Een hoog calciumgehalte in de schil en middenlamel leidde tot een geringere gevoeligheid voor knolrot door Eca bij toetsing in een mistkamer (McGuire & Kelman, 1984). Dit effect kon ook, maar in mindere mate met andere tweewaardige kationen ( $Mg^{2+}$  en  $Sr^{2+}$ ) verkregen worden, maar niet met éénwaardige kationen. Deze gegevens zijn echter niet gerelateerd aan stengelinfecties. Verder onderzoek liet zien dat de relatie tussen gevoeligheid en calciumgehalte waarschijnlijk complex is. Mogelijk speelt de combinatie van calciumgehalte en droge stofgehalte een belangrijke rol met de vatbaarheid (Tzeng *et al.*, 1990). Er is ook een interactie van calciumgehalte met ras en neerslag gevonden (Bartz *et al.*, 1992; Pagel & Heitefuss, 1989). In ander onderzoek werd geen relatie tussen calciumgehalte in de periderm en de aantasting door Ech gevonden (Cothier & Cullis, 1992).

Grondbewerking met kalk ( $CaSO_4$ ) resulteerde in Schots onderzoek in tragere knolrot en een minder snelle ontwikkeling van bacterieziek (Bain *et al.*, 1996). Dit effect was later in het seizoen niet meer zichtbaar. Dochterknollen bevatten een hoger calcium gehalte en waren minder vatbaar voor knolrot, hoewel dit effect niet consistent was in alle proeven.

Erwinia's hebben buiten de aardappelplant geen sterk competitief vermogen. Om de verspreiding van Erwinia's vanuit rottende moederknollen te beperken lijkt een microbiële verrijking van gronden met organisch materiaal positief te kunnen werken. Hierover zijn geen literatuurgegevens bekend. Compost kan wel met Erwinia's gecontamineerd zijn en dient hierop gecontroleerd te worden (Serfontein *et al.*, 1991).

*Interactie met andere pathogenen.* De incidentie van bacterieziek is sterk gerelateerd met knolbeschadigingen. Verschillende pathogene schimmels zijn in staat de knol te beschadigen waardoor Erwinia's kunnen toeslaan (Graham *et al.*, 1985; Perombelon & Kelman, 1980). Er is bij mij geen onderzoek bekend naar de interactie tussen nematoden en Erwinia's.

In Israël werd meer bacterieziek gevonden met Erwinia-geïnfecteerde knollen (Ecc en Eca) op gronden geïnfecteerd met *Verticillium dahliae* dan op gronden die voor *Verticillium* ontsmet waren met methamnatium. Dit suggereert een interactie tussen deze twee pathogenen. In Amerika werd na coinoculatie van knollen met Eca en *Fusarium sambucinum* significant meer knolrot gevonden dan wanneer de pathogenen afzonderlijk werden geïnoculeerd.

### 3. Overleving

*In en op de knol.* Eca kan op het oppervlak van intacte, ontvelde en beschadigde knollen 222 dagen overleven (De Vries & Van Vuurde, 1993). Echter, op intacte knollen zijn al na twee dagen 99% van de cellen dood, terwijl op ontvelde en beschadigde knollen de populatiedichtheden in de eerste twee dagen juist toenemen. Na 222 dagen overleeft op zowel beschadigde als intacte knollen uiteindelijk slechts een betrekkelijk klein aantal cellen op beschermde plaatsen op of in de knol.

Grote knollen beschadigen makkelijker bij het rooien, inschuren en sorteren en vanuit dit gezichtspunt is het gebruik hiervan dus riskanter (Bus, 1990). Grote knollen zijn ook minder snel weggerot, waardoor ze een groter risico geven op versmering bij oogst en na-oogst handelingen (Ridder & Bus, 1991).

*In in vitro materiaal.* Eca kan onopgemerkt (latent) persisteren in lage aantallen ( $10^2$  -  $10^3$  cellen/ml) in *in vitro* planten geproduceerd van planten die besmet waren met Eca (Grimm & Baumann, 1991; Weber & Schenk, 1988). Weber & Schenk vonden 4 van de 170 onderzochte lijnen natuurlijk besmet met Eca zonder dat groeireductie van de planten of contaminatie van het medium optrad. Er werd geen groei van bacteriën gevonden bij incubatie van het materiaal in een rijk medium gedurende 5 weken. Er werd gespeculeerd dat de cellen gebonden zijn aan plantenweefsel waardoor groei uitblijft. Ook in meristeemweefsel van geïnfecteerde *Kalanchoë* planten heeft men *Erwinia*'s ontdekt (Bech, 1994). Een frequente controle van weefselweekmateriaal met uitplaattechnieken en bijvoorbeeld PCR moet uitsluitend geven over mogelijke infecties.

*In grond.* *Erwinia*'s lijken niet lang genoeg in grond te overleven om in een rotatie van 1 op 3 of 1 op 4 in een volgend gewas besmettingen te kunnen veroorzaken. Echter de detectiemethoden staan slechts analyse van relatief kleine volumes grond toe, terwijl de verdeling van bacteriën niet homogeen is. Zelfs met de beste detectiemethoden ligt de grens op ca. 1000 cfu per gram grond. Ook bij lagere dichtheden kan de bouwvoor enorme aantallen *Erwinia*'s bevatten, die een wortelstelsel, zouden kunnen infecteren. Een goede beoordeling blijft moeilijk. Direct na oogst, zijn percelen waarop aardappels hebben gestaan, vaak besmet, maar het besmettingsniveau neemt in de regel snel af. De maximum gerapporteerde periode van overleving is 9 maanden, maar in de meeste studies werden overlevingsperiodes van weken of enkele maanden gerapporteerd. Het lijkt erop dat grondgebonden inoculum in de (sub)tropen alleen een rol kan spelen in gebieden met twee aardappelgewassen per jaar, zoals in sommige gebieden van Australië.

*Erwinia*'s missen het vermogen om energierijke componenten te produceren, zoals glycogeen, waardoor ze in de grond, waar weinig voedingsstoffen beschikbaar zijn, verhongeren. *Erwinia*'s concurreren ook slecht met andere micro-organismen in de grond. *Erwinia*'s zijn weinig aangetroffen in de rhizosfeer van aardappelplanten, waaruit wellicht blijkt dat herinfecties vanuit grond weinig voorkomen. Overigens werd in de rhizosfeer van kruisbloemigen, tabak en lupines en ook van kasgroenten (komkommer en tomaat) wel regelmatig *Erwinia*'s gevonden. Alleen bij brassica's werden meer bacteriën in de rhizosfeer aangetroffen dan in de vrije grond en werd ook een hoog percentage van de planten (27 – 77%) besmet gevonden (Roozen, 1991a). Mogelijk zijn zeer lage dichtheden (beneden de detectiedrempels) van *Erwinia*'s betrokken bij herinfecties vanuit de grond. In Japans onderzoek konden *Erwinia*'s niet in grond gedetecteerd worden, maar zodra koolbladeren in contact kwamen met de grond vond herbesmetting plaats. Of hier ook besmettingen vanuit de lucht een rol hebben gespeeld, is niet bekend. Er is weinig bekend over de overleving van *Erwinia*'s in diepere grondlagen, waar competitie afwezig is. Tenslotte is niet bekend of *Erwinia*'s ook in een zgn. viable but non culturable (levend, maar niet kweekbaar) toestand voorkomen. Cellen in deze toestand zijn waargenomen bij verwante bacteriën in de groep van de Enterobacteriaceae (*Shigella*, *Salmonella*). Bij het gebruik van detectiemethoden die gebaseerd zijn op het kweken van *Erwinia*'s (uitplaatmethoden) kunnen deze bacteriën mogelijk aan de aandacht ontsnappen.

De overleving is sterk afhankelijk van een combinatie van omgevingsfactoren, waarvan temperatuur en vochtigheid dominant lijken (Perombelon & Kelman, 1980; Roozen, 1990). In Schotland overleefden Ecc en Eca vrij in grond bij 20 °C gedurende 3-6 weken, waarbij Ecc langer overleefde dan Eca. Bij 30 °C en bij temperaturen beneden de 0 °C

was de overleving nog korter. De maximum gerapporteerde periode van overleving is ca. 200 dagen. Ook met gevoelige periode kon, in de herfst geïnfecteerde gronden, vlak voor poten Eca niet meer vrij in de grond gedetecteerd worden. In Australië was in het voorjaar 25% van alle grondmonsters besmet; meer dan 90% van de isolaten was Ecc, 9% was Eca, terwijl Ech slechts incidenteel werd aangetroffen. Eca overleeft beter in water-verzadigde gronden dan in luchtgedroogde gronden.

Voor aardappel isolaten van Ech zijn er geen gegevens bekend over de overleving in gronden (Van der Wolf, 1994). In tropische en subtropische klimaten fluctueerden de overlevingsperiodes voor Ech tussen de 7 dagen en 6 maanden. De overleving van Ech is afhankelijk van temperatuur, vochtigheid en pH. In experimenten met maïs isolaten in Hongarije werd een overlevingsperiode van 38 dagen bij 8 °C, 22 dagen bij 20 °C en 12 dagen bij 30 °C gevonden. Bij extreme temperaturen (< 0 °C, > 30 °C) en bij snelle temperatuurswisselingen werden aanzienlijk kortere overlevingsperiodes gevonden. Voor Ech werden bij lage vochtcondities (30%) juist langere overlevingsperiodes gevonden dan bij hoge vochtcondities (>60%). Ech overleeft langer in neutrale of licht alkalische gronden dan bij een lage pH (4.8), langer in een klei dan in een zandgrond en langer in een minerale grond dan in veenachtige grond. Ech overleefde twee keer zo lang in een steriele dan een niet-steriele grond; hierin wordt de rol van bodemorganismen zichtbaar (predatie en antibiose). Merkwaardig genoeg werd een overlevingsperiode van 12 maanden gevonden in potgrond in de kas. Mogelijk speelt de afwezigheid van sterk fluctuerende omstandigheden hierbij een rol.

De overleving van Ech kan sterk worden bevorderd door de aanwezigheid van resten van waardplanten. Ech overleefde in aanwezigheid van maïs residuen 270 dagen tegenover 90 dagen in vrije grond.

*In compost.* Erwinia's lijken compostering niet te overleven. Bij een juiste wijze van composteren stijgen de temperaturen tot 70 oC. Ecc bleek bij die temperaturen na 15 min al niet meer detecteerbaar (Elorriota *et al.*, 2003).

*In aardappelopslag.* Aardappelopslag, ontstaan door niet geoogste knollen of door achtergebleven botanisch zaad, is een bekende drager van aardappelvirussen. Aangenomen wordt dat ook Erwinia's in aardappelopslag zich langdurig kunnen handhaven, maar hiervoor is weinig wetenschappelijk bewijs. Het kan zijn dat het opslag 'uitzielt' tijdens de vermeerdering. Wel bekend is dat *Erwinia's* slecht overleven in de rhizosfeer van aardappelopslagplanten (Perombelon & Hyman, 1989). Ook de wortels van aardappelopslag bevatten zelden Ecc of Eca. Er is gesuggereerd dat dit komt door de aanwezigheid van antagonistische micro-organismen (Roozen, 1990).

*Alternatieve waardplanten.* Erwinia's zijn vaak geïsoleerd uit de rhizosfeer van onkruiden en gewassen die in rotatie met de aardappel worden geteeld (Graham *et al.*, 1985). Een hoog percentage (>50%) van de onkruidwortels in Schotland en de VS waren besmet, maar de dichtheden zijn over het algemeen laag. Populaties worden tijdens het groeiseizoen opgebouwd, mogelijk door besmettingen via regen en aerosolen, en populaties dalen na de zomer. Met name meerjarige waardplanten kunnen een rol spelen bij de overleving van Erwinia's en initiële besmettingen van schoon stammenmateriaal. In Schotland domineerde Ecc in onkruiden; Eca maakte ca. 8% van de populatie uit.

In Schotland werden alleen bij brassica's meer Erwinia's in de rhizosfeer gevonden dan in de vrije grond. Overleving was ook het best bij brassica's, matig op grassen en granen en het slechts op aardappelopslagplanten en onkruiden. In kasproeven werd wel een betere overleving van *Erwinia's* in de rhizosfeer gevonden van onkruiden dan vrij in de grond (Graham *et al.*, 1985). Er zijn geen gegevens bekend over overleving van Ech in onkruiden of de verspreiding van Ech vanuit onkruiden. Ech heeft een brede waardplantenreeks en het is dus waarschijnlijk dat Ech zich makkelijk kan handhaven in een aantal onkruiden. Verder is het waarschijnlijk dat de overleving afhankelijk zal zijn van de Ech biovar (of soort). In Nederland is Ech is niet gevonden in maïs, maar wel in een aantal siergewassen (Janse & Ruissen, 1988; Perombelon *et al.*, 1988).

## 4. Verspreiding

Erwinia's hebben wonden of natuurlijke openingen nodig om zich te kunnen vestigen in een plant. Wonden kunnen veroorzaakt worden tijdens gewasbeschadigingen tijdens teeltmaatregelen in het veld, bij oogst en sortering, maar ook door hagel, wind, insecten en tijdens vorming van zijwortels (Underberg, 1992). Verder spelen lenticellen die tijdens vochtige periodes open staan een belangrijke rol bij knolinfecties.

*Interne infecties vanuit de (rottende) moederknol.* Als de bewaarcondities niet optimaal zijn, kunnen al tijdens de bewaring *Erwinia* populaties toenemen. Deze populatietoename wordt niet altijd zichtbaar in symptomen. Een snelle droging van natte knollen tijdens de inschuring is essentieel (Kushalappa & Zulfiqar, 2001). Bij hogere temperaturen (16 – 20 °C) kunnen er op natte knollen na 6 uur nieuwe infecties met *Erwinia*'s plaatsvinden.

*Erwinia*'s kunnen vanuit de geïnfecteerde moederknol de vaten direct bereiken en vandaar uit naar de stengel worden getransporteerd (Helias *et al.*, 2000b). Na vacuüm infiltratie van knollen bleek het vaatweefsel van de stengel, onder de zichtbaar aangetaste delen, altijd *Erwinia*'s te bevatten. Stolonen bleken van alle plantendelen het meest frequent geïnfecteerd te zijn. Het vaatweefsel aan het navelende dan ook vaker geïnfecteerd schilweefsel (De Boer, 2002).

Bij lenticelinfecties kunnen de vaten alleen na afbraak van parenchymweefsel bereikt worden. Hiervoor moet de omgevingsfactoren gunstig zijn voor vermenigvuldiging van de bacteriën, zoals anaërobe omstandigheden. Maceratie van het knolweefsel kan alleen bij een hoge dichtheid (> 10<sup>8</sup> cellen/ml) tot stand komen. De bacteriën moeten vervolgens de overgang van knol naar stengel passeren. Er zijn verschillende aanwijzingen dat rasverschillen in gevoeligheid voor *Erwinia*'s gebaseerd zijn op stengelbasisresistentie (Allefs *et al.*, 1996). Mogelijk spelen hierbij lignificatie van plantencellen in het overgangsgebied tussen knol en stengel een rol. Bij sommige rassen vindt wel een makkelijke knolrot plaats, maar worden de bovengrondse delen van de plant niet makkelijk gekoloniseerd. Bacteriecellen kunnen na vacuüminfiltratie van knollen al snel in de stengels worden waargenomen (Allefs *et al.*, 1996). Echter, symptoomexpressie van de bovengrondse delen vindt alleen plaats bij knolrot. Symptoomexpressie van de bovengrondse delen van de plant is afhankelijk van interacties tussen ras, stam en omgevingsfactoren. Overigens verschillen de gemiddelde dichtheden in stengels met en zonder symptomen weinig (Roozen, 1991b). Verder kunnen populaties in één dag met een factor 10<sup>6</sup> toenemen (Roozen, 1991b).

Bacteriecellen kunnen vanuit de stengels via stolonen naar de dochterknollen migreren. Wanneer dit plaatsvindt in het groeiseizoen is niet bekend. In zowel Frans als Canadees onderzoek aan besmettingen met *Eca*, werd een hoger percentage infecties aan het navelende gevonden dan in de schil (lenticel) infecties. Van 108 mengmonsters afkomstig van 4 verschillende partijen werd ca. 53% infecties aan de navelende gevonden en 41% schilinfecties. De monsters waarvan de schil was besmet waren bijna allen ook besmet aan het navelende (De Boer, 2002). Voor Ech, dat als een vaatpathogeen wordt gezien lijkt de interne infectieroute nog waarschijnlijker. Bemonstering van navelende voor controle op *Erwinia*'s samen met toetsen op de bruinrot- en ringrotbacterie lijkt derhalve een bruikbare optie.

*Externe infecties vanuit de rottende moederknol.* *Erwinia*'s kunnen zich vanuit de rottende moederknol via de grond verspreiden en werden 1-3 m van de bron gedetecteerd (Roozen, 1990). De mate van verspreiding is afhankelijk van de hoeveelheid vrij water en dochterknollen lijken alleen bij veel regen via de grond geïnfecteerd te kunnen raken. Interacties met bodemschimmels, zoals schurft, zilverschurft en lakschurft en ook nematoden lijken voor de hand te liggen, maar hierover zijn weinig gegevens bekend.

Er is wel gesuggereerd dat het snijden van pootgoed juist gunstig werkt, omdat hierdoor de moederknol snel wegroet en er met name bij de oogst minder kans op versmering is. Aan de andere kant kan er tijdens het snijden juist versmering van *Erwinia*'s en andere (quarantaine) bacteriën optreden. Bovendien ontstaat er, bij zware infecties, een mogelijk extra risico op uitvallers door rot. Onduidelijk is of voorkiemen van knollen een voordeel kan hebben. Tijdens voorkiemen kunnen de *erwinia*'s zich al vermeerderen. Verder kan er kiembeschadiging en versmering

plaatsvinden tijdens het afkiemen. Een voordeel kan zijn dat symptomen beter zichtbaar worden, zodat er een betere selectie mogelijk wordt. Voorkiemen leidt ook tot een snellere opkomst van het gewas, waardoor mogelijk lage infecties juist minder kans krijgen.

*Via insecten.* Uit onderzoek blijkt dat insecten natuurlijk besmet kunnen zijn met Eca en Ecc en verse wonden kunnen infecteren. Verder maken insecten zelf ook wonden, die invalspoorten kunnen zijn voor infecties vanuit andere bronnen (Roozen, 1990). De betekenis voor (initiële) besmettingen van pootgoed in de Nederlandse praktijk is echter niet bekend. Door na te gaan hoe vaak er stengelrot door bovengrondse infecties optreedt, kan hierin een beter inzicht verkregen worden.

Er zijn geen gegevens over de risico's van transmissie via insecten voor Ech. In aardappelteeltgebieden in zowel Schotland als Colorado was tot 14.5% van de vliegen besmet met *Erwinia*'s (Roozen, 1990) (Anoniem, 1989). In andere studies in Schotland werd tot 6% van de vliegen die gevangen waren bij aardappel afvalhopen besmet met *Erwinia*'s (Anoniem, 1989). In Colorado werd aan het begin van het groeiseizoen vooral Ecc gevonden en aan het einde voor al Eca. Dichtheden van  $2.10^6$  cellen per insect konden worden gemeten direct na besmetting van insecten. Na 48-72 uur werden  $10^3$  cellen per ml gevonden. In deze periode kunnen vliegen zich maximaal 20 km tegen de wind in verplaatsen. Insecten worden door wonden aangetrokken en kunnen deze makkelijk besmetten tot 10 uur na kunstmatige verwonding. Gemiddeld 5% van de door insecten geïnfecteerde wonden resulteerde in aerial stem rot. Beheersing van plaaginsecten zal schade aan het gewas beperken en daarmee het risico van besmetting van bovengrondse delen van de plant. Verder zal insectenbestrijding het risico op transmissie van *Erwinia*'s via besmette insecten doen afnemen.

*Oppervlaktewater.* Besmettingen van het oppervlaktewater kunnen bij irrigatie leiden tot initiële infecties van het gewas. Verder kunnen er m.n. bij golfslag besmette aerosolen ontstaan die tijdens regenbuien percelen kunnen besmetten. Als *Erwinia*'s in contact komen met wondweefsel of natuurlijke openingen van de aardappelplant, zijn onder gunstige condities voor de ziekteverwekker 10 cellen al voldoende voor een infectie (Roozen, 1991b). Rechtstreekse infectie van dochterknollen met besmet water via de grond lijkt minder waarschijnlijk omdat hiervoor  $10^6$  cellen per ml nodig zijn (Roozen, 1991b).

Over de overleving van *Erwinia*'s in oppervlaktewater zijn geen exacte gegevens bekend. Ech kan in steriel gedestilleerd water gedurende een periode van 211 dagen bij 16 °C overleven. Bekend is dat de aanwezigheid van andere micro-organismen de overlevingstijd voor plant pathogene bacteriën reduceert.

Van 1988 tot 1991 is door Van Vuurde en De Vries onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van *Erwinia*'s (Eca en Ech) in oppervlaktewater (sloten) in de IJsselmeerpolders in Nederland (Van Vuurde & De Vries, 1992). In het voorjaar konden geen *Erwinia*'s worden aangetoond. *Erwinia*'s lijken de winter niet te overleven. *Erwinia* populaties beginnen pas toe te nemen in water bij een temperatuur van 10-15 °C. In het najaar werden op de meeste locaties zowel Eca als Ech gevonden. Besmettingen waren niet gerelateerd aan de aanwezigheid van aardappelpercelen. Er zijn geen dichtheden in dit onderzoek bepaald. Een relatief groot aantal sloten was besmet met Ech na een groeiseizoen dat relatief gunstig was voor ziekte-ontwikkeling door Ech. Echter, bij karakterisering van twee Ech-isolaten bleken deze tot biovar 3 te behoren (warmteminnend, niet geassocieerd met aardappelinfecties).

De NAK bemonsterde het beregeningswater van pootgoedtelers die weinig problemen hadden met bacterieziekten en vond in juli 62% van de monsters besmet met Eca en 32% met Ech in een concentratie van  $10^2$  -  $10^3$  bacteriën per ml water (Roozen, 1990). Deze dichtheden komen overeen met die gevonden in oppervlaktewater in Schotland (Graham *et al.*, 1985).

In studies uitgevoerd in het buitenland blijkt Ecc te domineren terwijl Eca 0.6 – 10% van de *Erwinia* populaties uitmaken (Graham *et al.*, 1985). Dichtheden fluctueerden van 1 – 400 cfu per ml (Roozen, 1990). Serogroepen die voorkwamen in het water, kwamen echter niet voor in de stengels van geïnfecteerde planten. Ech is in Australië uit rivierwater geïsoleerd, ver verwijderd van een besmet gewas.

Ook Ech is verschillende malen op verschillende locaties uit meren geïsoleerd, waarvan het water werd gebruikt voor irrigatie (Van der Wolf, 1994). In Japan werd irrigatiewater besmet door geïnfecteerde irisplanten. Het gebruik van

dit water resulteerde in besmetting van rijst. In de Verenigde Staten gaf overhead irrigatie van maïs, met water dat besmet was met Ech, 10% dode planten.

Er zijn gegevens uit Schotland en Zweden dat de wortels van waterplanten *Erwinia's* kunnen bevatten (Graham *et al.*, 1985). In de wortels van meerjarige onkruiden zouden *Erwinia's* tijdens de winter kunnen overleven. In Zweden werd Ech (voor het eerst) ontdekt in bitterzoet (Graham *et al.*, 1985). Verder is gesuggereerd dat *Erwinia's* kunnen overleven op algen en in het sediment van rivieren en meren. Tijdens de temperatuursverhoging in het voorjaar zouden de bacteriën zich weer gaan vermeerderen en vanuit waardplanten en sediment aan het water worden afgegeven.

*Zeewater.* Eca en Ecc zijn ook gevonden in zeewater (Atlantische- en Grote Oceaan). tot minimaal 2 km landinwaarts (Graham *et al.*, 1985). Van de zeewater monsters was 50 – 80% besmet, i.h.a. met lage aantallen. Van de 250 stammen die geïdentificeerd werden, was 6 – 14% Eca, de overigen Ecc. Eca en Ecc zijn tolerant tegen 5% zout (Graham *et al.*, 1985).

*Regenwater.* Van het regenwater verzameld in Oregon (USA) op verschillende tijdstippen en in verschillende maanden was 92 – 100% besmet (Graham *et al.*, 1985). Van de stammen was 25% Eca en 75% Ecc.

*Aerosolen.* Besmette aerosolen kunnen ontstaan bij opspattend (zee)water, bij een (hevige) regenbui waarbij druppels van besmet loof opspatten en bij mechanische loofvernietiging, met name bij een vochtig gewas (Graham *et al.*, 1985; Roozen, 1990). Bij een hoge luchtvochtigheid (99%) kon in Oregon *Erwinia's* in aerosolen worden gedetecteerd, maar niet bij een lage luchtvochtigheid. Bij een luchtvochtigheid van 65% is na 30 min 98% van de populatie afgestorven. Gecontamineerde aerosolen worden dan ook met name gedurende de nacht en ochtend gevonden na regenval en als het weer vochtig en koel is. Besmette aerosolen worden ook gevonden als er geen aardappelgewas in de buurt is. Lage dichtheden bacteriezieke planten in het veld geven al hoge dichtheden bacteriën ( $>10^8$  cellen per ha). Een populatie van  $10^8$  cellen per ha levert bij de bron 100 levende cellen op per m<sup>2</sup>. Op een afstand van meer dan 1000 meter is de dichtheid te verwaarlozen. Eca werd in Oregon verhoudingsgewijs veel in aerosolen gevonden; 56% van de gekarakteriseerde *Erwinia* isolaten was Eca.

*Besmettingen na loofvernietiging.* Uit onderzoek in Nederland is gebleken dat na vacuüm infiltratie van knollen met *Erwinia's*, in symptoomloze planten populatiedichtheden van gemiddeld  $4 \times 10^6$  cellen per gram werden waargenomen (Roozen, 1991a). De dichtheden waren voor Eca en Ech gelijk. Niet geïnoculeerde knollen bevatten  $10 - 10^3$  cellen per gram. Vanuit het gehakselde loof wordt Eca de grond ingeregend en kunnen tot 10 cm diepte worden aangetroffen in dichtheden van  $< 500$  cellen per gram grond. Ech kon in dit onderzoek niet betrouwbaar worden gedetecteerd door aanwezigheid van kruisreacties. Dochterknollen kunnen dus in principe door besmet loof worden geïnfecteerd.

In Engels onderzoek werden ook in dichtheden van  $10^6 - 10^7$  cellen per gram gevonden in een geïnfecteerd gewas na loofklappen (Burgess *et al.*, 1994). In deze studie werden verschillende manieren van loofvernietiging met elkaar vergeleken: spuiten, klappen, een behandeling met zwavelzuur en natuurlijke afsterving. De behandeling met zwavelzuur gaf de laagste dichtheden, maar deze wijze van loofvernietiging is in Nederland niet toegestaan.

Er werden sterke aanwijzingen gevonden dat epifytische (op het blad aanwezige) *Erwinia* populaties een sterke rol speelde bij de populatie-opbouw na loofvernietiging, met name populaties die laag in het gewas voorkomen (Graham *et al.*, 1985). De dichtheden kunnen in de grond na loofvernietiging zo toenemen dat knollen direct geïnfecteerd raken.

Behandeling van het gewas met een bactericide of met een antagonist die zich sterk kan vermenigvuldigen in het geklapt loof vlak voor loofvernietiging kan mogelijk besmettingen reduceren. Belangrijk is dat het vernietigde loof tussen de rijen terecht komt.

*Via machines.* De periode waarin *Erwinia's* overleven op machines varieert van uren tot 100 dagen afhankelijk van de mate waarin de cellen zijn beschermd tegen uitdrogen (Graham *et al.*, 1985; Roozen, 1990). De mate van uitdroging

wordt bepaald door wind, temperatuur en de luchtvochtigheid. De overleving is vaak voldoende om tijdens teeltmaatregelen en oogst het pathogeen te verspreiden.

Bij het poten ontstaan hoge risico's van verspreiding bij gebruik van voorgekiemde aardappelen. De kiemen breken makkelijk af en vormen een ideale ingangspoort voor *Erwinia*'s.

Bij de huidige wijze van ziekte- (*Phytophthora*) en plaagbestrijding wordt per teeltseizoen 4-12 keer met een tractor en spuit door het pootgoedgewas gereden. Daarbij wordt in totaal 10-15% van de planten beschadigd (Turkensteen, 1995). Raken wielen besmet met de bacterie dan wordt deze effectief verspreid.

Tijdens de oogst wordt vaak een hoog percentage (< 25%) van de knollen gekneusd (Perombelon & Kelman, 1980). De aanwezigheid van rotte moederknollen, die vaak niet te vermijden zijn, geven een sterke versmering binnen de beschadigde partijen. Oogst onder zeer droge omstandigheden geeft op de klei harde kluiten, die voor beschadiging kunnen zorgen. Natte omstandigheden leiden tot een sterke versmering. Het sorteren geeft grote risico's, omdat sorteerder moeilijk goed te reinigen zijn en een slechte afstelling al snel verwonding van knollen geeft. Tijdens het sorteren kan één rotte knol van 100 kg aardappelen de helft de knollen met 10.000- 100.000 cellen per knol besmetten.

Tijdens de bewaring zullen lenticellen in de eerste twee weken een dikkere kurklaag vormen, waardoor deze minder doordringbaar worden (Tyner *et al.*, 1997). Ook krijgen knollen meer gelegenheid om af te harden. Het lijkt daarom wenselijk de aardappels pas twee weken na bewaring te sorteren.

*Verspreiding via mest.* *Erwinia*'s zijn wel uit mest geïsoleerd en zou een bron kunnen zijn voor initiële besmettingen (Roozen, 1990). Eca kan bij 4 °C minstens 18 weken en Ech minstens 21 weken in knolweefsel in de rundermengmest overleven (Roozen, 1990). Bij hogere temperaturen en vrij levend in mest zijn overlevingsperiodes korter.



## 5. Controle

Strategieën voor de bestrijding van bacterieziekten veroorzaakt door *Erwinia*'s zijn gebaseerd op het uitsluiten of elimineren van infectiebronnen, het minimaliseren van de kansen op verspreiding van het pathogeen, en het beperken van ziekte-ontwikkeling en schade aan het gewas bij teelt en oogst en bewaring. Hierbij kunnen de volgende controlemaatregelen gebruikt worden: 1. het gebruik van snelle vermeerderingstechnieken om het aantal generaties te beperken, 2. certificering van pootgoed d.m.v. veldinspecties en laboratoriumtoetsen, 3. teeltmaatregelen die introductie en verspreiding tegengaan, 4. fysische- en chemische ontsmetting van pootgoed, 5. biologische bestrijding met antagonisten, en 6. het gebruik van (partieel) resistente rassen. Het gebruik van snelle vermeerderingstechnieken, certificering en het toepassen van de adequate teeltmaatregelen worden als het meest effectief beschouwd.

*Snelle vermeerderingstechnieken.* Gebruik van *in vitro* materiaal en miniknollen voor productie van stammenmateriaal heeft in verschillende landen tot een sterke reductie van bacterieziekten geleid (Graham *et al.*, 1985).

De exacte bijdrage van het gebruik van *in vitro* materiaal is echter moeilijk te bepalen, omdat in dit onderzoek uitsluitend naar het effect op symptoomexpressie en niet naar latente infecties is gekeken. In Schots onderzoek was van vierde jaars stammen, afkomstig van weefselkweekmateriaal slechts ca 0.005% planten symptomatisch. In Amerikaans onderzoek werden in tweede jaars stammen afkomstig uit weefselkweekmateriaal consequent veel minder knollen met bacterieziek gevonden dan van traditionele stammen.

In Colorado werden acht partijen stammen 3 jaar na productie uit *in vitro* materiaal vergeleken met 4 partijen die via klassieke stamselectie waren verkregen. Het percentage partijen besmet met Ecc uit de snelle vermeerdering lagen tussen de 0 en 22% (ca. 2000 stengels bemonsterd). Eca kwam nauwelijks voor. Er werden geen bacteriezieke planten gevonden. De partijen uit de stamselectie waren 11-92% besmet; Eca percentages waren hoger dan 50%. Bacterieziekte incidentie varieerde van 2 tot 18% (Graham *et al.*, 1985). I.h.a. bleef het snelle vermeerderingsmateriaal gedurende 2-3 jaar vrij van bacterieziek.

In Canada werd, na de introductie van *in vitro* vermeerderings technieken, een substantiële verlaging van bacterieziek gevonden. Precieze cijfers zijn niet bekend. Er werd geen vermindering in besmettingen met Ecc gevonden (Graham *et al.*, 1985).

*Certificering.* Omdat moederknolinfecties beschouwd worden als de belangrijkste bron van inoculum is een start van zo schoon mogelijk uitgangsmateriaal essentieel. Bij de productie van schoon pootgoed is een deugdelijke controle op besmettingsniveaus via veldinspecties en laboratoriumtoetsen vereist.

Dit heeft zeker zin omdat er een positieve relatie gevonden is tussen besmettingsniveaus, de symptoomontwikkeling en de besmetting van de dochterknollen (Toth *et al.*, 2003). Knollen van de cultivars Hermes en Morene werden vacuüm geïnfilterd met 0,  $10^3$  (laag),  $10^5$  (matig) en  $10^7$  (hoog) cellen per ml. De ziekte-ontwikkeling en besmettingsniveaus werden gedurende drie opeenvolgende jaren tijdens het groeiseizoen vastgesteld. De ziekte-incidentie was laag bij de lage en matige besmettingen (5-15%) en hoog bij de hoge (30-50%) besmettingen. De besmettingen van de dochterknollen waren relatief hoog bij de matige en hoge concentraties en relatief laag bij de lage concentraties. Gewas dat laat geoogst werd, had substantieel een hoger infectieniveau dan vroeg geoogste gewassen. In dit onderzoek werd met de hand geroid, zodat het effect van versmering op oogstmachines niet is meegenomen.

*Veldinspecties.* Veldinspecties zijn essentieel om besmette partijen te kunnen traceren. Bij laboratoriumtoetsen kan slechts een beperkte steekproef worden geanalyseerd, terwijl bij veldinspecties een groot deel van het gewas snel beoordeeld kan worden. Echter, expressie van de ziekte vindt niet altijd plaats. Ook is er een sterke variatie in symptoomexpressie tijdens het groeiseizoen waardoor een juiste beoordeling wordt bemoeilijkt. Hierdoor worden besmettingen via veldinspecties niet altijd opgespoord of de incidentie van de infecties (zwaar) onderschat.

Een potentieel hulpmiddel voor het detecteren van nog niet zichtbare infecties of het bevestigen van onduidelijke symptomen in het veld is het gebruik van 'laser induced fluorescence' (LIF) (Cervantes-Martinez *et al.*, 2002). Met LIF konden vroegtijdige infecties van *Erwinia*'s in *Agave tequilana* opgespoord worden. Dergelijke technieken zullen niet erg specifiek zullen zijn en geen onderscheid kunnen maken in de reactie van de plant op biotische en abiotische stressfactoren.

*Controle tijdens de bewaring.* Met *Erwinia*-besmette aardappelen produceren tijdens de bewaring (95%, 10 °C) typische vluchtige organische componenten, met o.a. ammonia, trimethylamine, sulfides en een aantal niet gekarakteriseerde alkanen, alkenen en aldehyden. Deze stoffen worden niet geproduceerd in aanwezigheid van andere bacteriesoorten (Costello *et al.*, 1999). In ander onderzoek werden de vluchtige stoffen gevangen in een absorberend materiaal en daarna met gaschromatografie geanalyseerd (Lyew *et al.*, 2001). Al na 24 uur konden er verschillen gemeten worden in de hoeveelheid en samenstelling vluchtige stoffen tussen geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde partijen. M.b.v. een elektronische neus die gevoelig is voor deze specifieke stoffen zou tijdens de bewaring een indruk verkregen kunnen worden van partij-infecties. Het is de vraag of deze technieken iets registreren bij latente infecties.

*Laboratoriumtoets.* Voor het opsporen van latente infecties is de beschikbaarheid van een gevoelige, specifieke en kwantitatieve toets noodzakelijk die op praktijkschaal met grote aantallen monsters betrouwbaar ingezet kan worden.

Bij de NAK worden voor detectie van Eca en Ech nu verrijking-ELISA methoden gebruikt, waarbij de *Erwinia* bacteriën eerst in een semi-selectief vloeibaar groeimedium worden opgehoopt en daarna m.b.v. ELISA worden gedetecteerd (Alarcon *et al.*, 1995). Deze serologische techniek is gebaseerd op antistoffen. In Nederland kan deze betrouwbaar worden ingezet omdat alleen serogroep I van Eca en serogroep O<sub>1</sub> van Ech zijn gedetecteerd (Van Beckhoven *et al.*, 2001).

Door 20 monsters van 10 knollen te toetsen wordt een beeld gekregen van de incidentie van de ziekte in een partij. Echter, dichtheden bacteriën in de knol kunnen zo niet bepaald worden, omdat de mate van verrijking niet gecontroleerd kan worden. Voor een deugdelijke risico-analyse is het wel belangrijk initiële dichtheden te weten, omdat er een relatie is tussen dichtheid en besmetting van de dochterknollen (Toth *et al.*, 2003). Initiële dichtheden kunnen wel bepaald worden met behulp van immunofluorescentie-kolonie kleuring (IFC) (Van Vuurde & Roozen, 1990). IFC heeft ongeveer dezelfde gevoeligheid als een verrijkings-ELISA, maar is duurder omdat meer antistoffen worden gebruikt en een visuele beoordeling van de preparaten nodig is. Een verrijkings-ELISA is i.t.t. IFC goed te automatiseren.

De serologische toetsen kunnen betrouwbaar worden toegepast, zolang we in Nederland maar één serogroep hebben van Eca en Ech. In 2001 is er binnen Plant Research International een uitgebreide survey uitgevoerd. In totaal 206 bacteriezieke planten werden getoetst. Van de 684 isolaten die gekarakteriseerd werden, was globaal 50% Ech, 25% Eca en 25% Ecc (Van Beckhoven *et al.*, 2001). Alle Ech isolaten behoorden tot serogroep O<sub>1</sub>, alle Eca isolaten tot serogroep I. Deze isolaten worden gedetecteerd met de antisera die door de NAK gebruikt worden. In andere Europese landen varieert het percentage serogroep I isolaten van Eca van 60% tot 97%. Een regelmatige controle op de distributie van de serogroepen in Nederland is gewenst.

Als er andere serogroepen van Eca of Ech in Nederland worden geïntroduceerd, of als men ook toetsing op Ecc wenselijk acht, kunnen er specifieke moleculaire technieken, zoals polymerase chain reaction (PCR) gebruikt worden. De kosten van het gebruik zijn hoger dan bij ELISA. Ook is PCR gevoeliger voor vals-positieve reacties door kruisbesmettingen. Tenslotte blijkt de gevoeligheid van de PCR onder praktijk-omstandigheden tegen te vallen, zelfs als ervaren onderzoekers de assay uitvoeren (Helias *et al.*, 2000b).

Voor detectie van alle pectinolytische *Erwinia*'s in de aardappel, is er een PCR ontwikkeld op basis van 16S rDNA sequenties (Toth *et al.*, 1999). Hiermee kon men in *in vitro* planten tussen de  $2 \cdot 10^2$  en  $2 \cdot 10^4$  cellen per microplant aantonen. Voor specifiek Eca zijn er twee PCR assays beschikbaar die beide betrouwbaar de verschillende serologische varianten van Eca kunnen detecteren (Deboer & Ward, 1995; Frechon *et al.*, 1998) Voor Ech is er één

betrouwbare PCR assay beschikbaar (Nassar *et al.*, 1996). Voor *Ecc* is er recentelijk een methode gepubliceerd, deze is nog niet voldoende geëvalueerd (Kang *et al.*, 2003). PCR kan ook gecombineerd worden met een verrijkingssassay (Hyman *et al.*, 1997).

Een nieuwe ontwikkeling in de diagnostiek zijn de zgn. multiplexmethoden, waarmee meerdere pathogenen tegelijk kunnen worden aangetoond. Zo is er al een oligonucleotide array voor de identificatie van verschillende bacteriële pathogenen van de aardappel, inclusief *Erwinia* soorten (Fessehaie *et al.*, 2003). De gevoeligheid van een array-detectiesysteem is nu nog laag ( $> 10^5$  cellen per ml). *Erwinia*'s kunnen alleen gevoelig op een array gedetecteerd worden na een amplificatiereactie.

*Teeltmaatregelen.* Op basis van de epidemiologische gegevens over *Erwinia*'s worden t.a.v. teelt, oogst en bewaring de volgende adviezen gegeven (Anoniem, 1989; Graham *et al.*, 1985); <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/3106.html>):

- Zorg voor bewaarcondities waarbij *Erwinia*'s zich niet verder kunnen vermeerderen.
- Gebruik kleine onbeschadigde knollen die door de NAK zijn gecontroleerd. Kleine knollen rotten eerder weg.
- Voorkom versmering tijdens voorkiemen en poten door het verwijderen van rotte knollen. Bij het voorkiemen krijgen *Erwinia*'s een vlottere start en treedt er eerder ouderdomsresistentie op. Echter tijdens het afkiemen ontstaan er ook wonden die een invalspoort kunnen vormen voor aanwezig inoculum.
- Stel gemechaniseerde werkzaamheden tijdens stammenvermeerdering zo lang mogelijk uit, omdat bekend is dat *Erwinia*'s gemakkelijk met machines versmeerd worden.
- Zorg voor een optimale bemesting. Een hoge stikstofgift leidt tot een 'geil gewas' met een hogere kans op versmering. Onder anaërobe omstandigheden wordt nitraat door *Erwinia*'s gebruikt als oxidator i.p.v. zuurstof en daardoor faciliteert een hoge nitraat concentratie de vermeerdering van *Erwinia*'s (Smid *et al.*, 1993). Een te hoge stikstofgift stimuleert ook de bladgroei sterk en zal de bladnat periode verlengen waardoor bacteriën die vanuit de lucht het blad contamineren meer kans hebben het gewas te infecteren. Een lage stikstofgift maakt het gewas weer zwak en vatbaar voor infecties. Verhoging van de calciumgift kan mogelijk de resistentie van het gewas bevorderen.
- Vermijd anaërobe condities. Probeer verslumping van gronden tegen te gaan. Teel geen pootaardappelen op verdichte percelen. Zorg voor een goede afwatering.
- Overhead irrigatie heeft de voorkeur boven bevoeiingen, omdat dit laatste *Erwinia*'s in de bouwvoor sterk kunnen verspreiden. Irrigeer niet met besmet water. Met overhead irrigatie blijft er een risico bestaan op beschadiging van planten waardoor stengelrot kan optreden.
- Zorg voor een goede controle van onkruiden die als waardplant kunnen fungeren en van aardappelopslag.
- Zorg voor een goede bestrijding van ziekten en plagen, m.n. die een synergistisch effect op *Erwinia* ziekten hebben, zoals *Verticillium* en *Fusarium*.
- Selectie in het gewas wordt zeker later in het seizoen weinig zinvol geacht. Zieke planten vormen het topje van de ijsberg.
- Vermijd schade van het gewas tijdens bespuitingen.
- Zorg dat loof niet op de ruggen komt te liggen bij loofvernietiging.
- Zorg voor een snelle loofvernietiging, omdat dit de opbouw van *Erwinia* populaties in het drogende loof verhindert.
- Laat zo mogelijk de knol drogen en afharden voor de oogst, bijvoorbeeld door twee-fasen oogst. De knollen zullen na drogen op het zwad minder beschadigd worden.
- Oogst bij droog weer i.v.m. versmering op oogstmachines.
- Zorg voor goed afgestelde schone (gedesinfecteerde) oogst- en sorteermachines om verwonding zo veel mogelijk te voorkomen.
- Zorg na oogst voor een goede verdere afharding van de knol en een goede wondheling.

*Fysische behandelingen.* Behandeling van pootgoed met warm water, hete vochtige lucht of met droge hitte zijn de bekendste fysische behandelingsmethoden en gaven in verschillende studies een goed behandelingseffect. Met name hete lucht en stoom zijn interessant, omdat dan de knollen niet teruggedroogd hoeven te worden. Echter dieper liggende knolinfecties kunnen niet worden bereikt zonder de knol te beschadigen. Essentieel is het snel terugdrogen van de knol, om vermeerdering van overblijvende infecties te voorkomen. Apparatuur voor warmwater-

behandeling, ontwikkeld voor bloembollen, kan mogelijk ook voor pootgoed worden gebruikt. Andere interessante fysische methoden zijn behandeling met UV-straling en electronen.

In Schots onderzoek leidde behandeling van pootgoed gedurende 5 min bij 53 °C, gevolgd door een snelle droging al tot een verlaging van het percentage bacterieziek door Eca aan het einde van het groeiseizoen van 63 tot 13%, zonder beschadiging van de knol. De opbrengst nam toe met 30%. Verdere verhoging van de temperatuur resulteerde in kiemschade en een verminderde opbrengst. In ander onderzoek werd bij een behandeling van 10 min bij 55 °C een goed bestrijdingsresultaat gevonden zonder aantasting van kiemkracht (Graham *et al.*, 1985). Bij droge hitte moet pootgoed minstens 30 min bij 60 °C behandeld worden (Graham *et al.*, 1985).

Naast warm water behandeling en droge lucht kan ook stoom voor ontsmetting van pootgoed gebruikt worden. In een opgeschaald systeem waarin 100 knollen gelijktijdig behandeld konden worden gaf behandeling van knollen met stoom van 70 °C bij 2 atmosfeer gedurende 5 seconden een reductie van bacterieziek in het veld van 26 naar 3% (Afek & Orenstein, 2002). Ook voor andere pathogenen zoals *Helminthosporium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium*, *Streptomyces* en *Spongospora* bleek de stoombehandeling effectief. Naast een bactericide of fungicide effect zou de stoombehandeling ook de knolresistentie kunnen verhogen door veranderingen in het niveau van fenolen, coumarinen, ligninen en de enzymatische activiteit in de knol. Een stoombehandeling in combinatie met waterstofperoxide (10% Compound P) gaf ook een sterke reductie van natrot tijdens de bewaring te zien van 26 naar 4% (Afek *et al.*, 1999).

Het is de vraag of warm-water behandeling toepasbaar is voor beheersing van Ech. Een temperatuursbehandeling van Ech in een vloeibaar groeimedium gaf bij 56 °C na 2 min een reductie van 95%, terwijl hetzelfde effect bij Ecc al na 2 min bij 50 °C werd verkregen. Eca was nog gevoeliger voor warmte. Een lange behandelingsduur van pootgoed voor eliminatie van Ech zal zeker leiden tot kiemschade en een slechte opkomst van het gewas.

UV straling bleek effectief bij het voorkomen van bewaarziekten door *Erwinia*'s (Ranganna *et al.*, 1997). Bij een relatief milde dosis, die de kiemkracht van de knollen niet aantastte werd een volledig bestrijdingsresultaat verkregen. De effectiviteit werd vergroot door knollen voor de behandeling 6 uur bij 37 °C te incuberen. In het onderzoek werd echter alleen gewerkt met kunstmatig besmette knollen.

*Chemische middelen.* Ontsmetting van pootgoed met chemische middelen leidt slechts tot een (beperkte) reductie van het percentage bacteriezieke planten. Er zijn chemische middelen bekend die een bacterie-dodende of remmende werking hebben, maar ook middelen die de resistentie van de plant induceren. Het gebruik van natuurlijke gewasbeschermingsmiddelen is een interessante mogelijkheid voor de biologische aardappelteelt. Een voordeel van middelen is, dat men niet afhankelijk van de biologische activiteit van een levend organisme.

Toepassing van Kasugamycine (5%), Hydroxychinoline (8HQ, 0.375%), Mancozeb (20%), Formaldehyde (1%), Streptomycine (0.125%), koperoxychinolaat (2%), Kopersulfaat (1%) toegevoegd aan een middel tegen *Rhizoctonia* (Solacol) tijdens planten in aanwezigheid van rotte knollen gaf geen reductie. Koperoxychloride (1%) werkte wel matig, maar was fytotoxisch (Graham *et al.*, 1985). Vergelijkbare resultaten met koper werden gevonden bij de bestrijding van *Erwinia* natrot in *Zantedeschia* spp. (Gracia-Garza *et al.*, 2002).

Ook in ander Amerikaans onderzoek was het effect van het antibioticum kasugamycine al dan niet in combinatie met gechloreerd water niet of matig effectief voor het reduceren van *natrot* tijdens de bewaring van aardappelknollen (Bartz, 1999).

Behandeling van knollen met koper-houdende producten in Canada gaf geen reductie van bacterieziek (Grazia-Garza *et al.*, 2002). Tijdens de teelt, als het middel via irrigatie werd toegediend, werd wel een bestrijding gevonden, maar ook schade aan het gewas.

Behandeling van knollen met chloor (NaOCl) in dampvorm was alleen effectief na een behandeling van minstens 10 dagen bij hoge concentraties chloor (200 mg/l). Bij die concentraties werd de kieming geremd (Tweddell *et al.*,

2003). In ander onderzoek werd slechts een 40% reductie in verlies door natrot tijdens de bewaring bereikt door behandeling van aardappelknollen met chloorgas (chloordioxide) (Tsai *et al.*, 2001). Chloor reageert snel met organisch materiaal van de knollen, waardoor de effectiviteit wordt gereduceerd (Olsen *et al.*, 2003).

De toepassing van wateroplosbare, geoxideerde teergronden in Zuid-Afrika (oxifulvine zuur met koper of ijzer) bleek sterk anti-bacteriële werking (ook tegen *Erwinia*'s) *in vitro* te hebben (Aveling *et al.*, 1999). De toepasbaarheid op aardappelknollen is niet onderzocht.

Voor bestrijding van *Erwinia*'s in *Agave* werd met succes het bactericide beta-hydroxyethylhydrazine toegepast dat effect heeft op de polyamine biosynthese. In welke mate deze stof ook op aardappelen zal werken is onbekend. *Erwinia*'s blijken gevoelig voor vluchtige terpenen in thijmolie (Basim *et al.*, 2000). Dit is potentieel voor de biologische teelt interessant. Praktische toepassing lijkt ver weg vanwege de hoge kosten van een behandeling. *Erwinia*'s zijn i.t.t. veel andere bacteriën gevoeliger voor thijmolie geëmulgeerd in water dan voor een thijmbehandeling in dampvorm.

Ook waterige extracten van *Allium*, *Euphorbia* en *Piper* soorten bleken actief tegen *Erwinia*'s en zouden voor behandeling van biologisch pootgoed ingezet kunnen worden (Lirio *et al.*, 1998).

Behandeling van pootaardappelen met acetyl salicylzuur (aspirine) gaf m.n. als het pootgoed voor de behandeling beschadigd werd, al bij lage concentraties 0.0125% een goed behandelingsresultaat (Lopez *et al.*, 2001). De behandelingen werden in kasexperimenten beoordeeld. Er werden geen fytotoxische effecten gevonden.

Nog verder weg van een praktijktoepassing ligt het gebruik van bacteriocinen, macromoleculaire toxinen die door *Erwinia* stammen worden gemaakt die zelf ongevoelig zijn voor de toxinen, maar verwante *Erwinia* stammen lyseren en soms ook een bredere groep van plant-geassocieerde bacteriën (Tovkach, 1998a; Tovkach, 1998b). Bacteriocinen zouden kunnen worden geïsoleerd van niet-pathogene *Ecc*'s om daar mee *Eca* en *Ech* te kunnen bestrijden. De productie van bacteriocinen is echter kostbaar, de bewaarbaarheid van het product problematisch. Waarschijnlijk zullen niet alle *Erwinia* stammen zullen gevoelig zijn.

*Biologische bestrijding.* Biologische bestrijding van *Erwinia*'s is in verschillende studies slechts in beperkte mate effectief gebleken. Toepassing van antagonisten wordt verhinderd door de regelgeving. Een registratiedossier dat voor toepassing noodzakelijk is, vraagt een investering van vele miljoenen euro's. Antagonisten die naast een bestrijdingseffect ook op een andere wijze de kwaliteit van het plantmateriaal verbeteren, zoals via groeistimulatie, hebben duidelijk een meerwaarde. Behandelingen met antagonisten kunnen worden uitgevoerd bij snelle vermeerderingstechnieken, voor het poten, maar ook bij groenrooien en inschuren. Echter, voor behandeling van bulk pootgoed is een relatief groot volume antagonisten nodig. Dit zal de behandeling kostbaar maken.

Er zijn antagonisten geïsoleerd waarvan de activiteit is gebaseerd op productie van antibiotica, productie van sideroforen die betrokken zijn bij competitie om ijzer, en het uitschakelen van signaalstoffen die betrokken zijn bij inductie van virulentiefactoren. In het algemeen wordt er geen relatie gevonden tussen *in vitro* en *in vivo* activiteit van antagonisten en de effectiviteit in het veld.

Groenrooien biedt mogelijkheden om antagonisten toe te dienen op een belangrijk tijdstip voor knolinfectie met en de opbouw van *Erwinia*'s (Kastelein *et al.*, 1996; Kastelein *et al.*, 1999). Verschillende bacteriën en *Trichoderma* soorten bleken in staat wonden te beschermen tegen infecties met *Erwinia*'s. Ook toepassing van antagonisten bij het inschuren bleek een redelijke mate van wondbescherming op te leveren.

*Erwinia*'s produceren een aantal virulentiefactoren, zoals pectinolytische enzymen alleen bij het bereiken van een hoge populatiedichtheid (quorum sensing). Deze dichtheid wordt door de bacterieel gedetecteerd door het produceren van specifieke extracellulaire signaalstoffen (homoserine lactonen (HSLs) die gemakkelijk door het milieu kunnen diffunderen. Er verschillende groepen bacteriën gevonden die deze signaalstoffen enzymatisch kunnen afbreken waardoor het infectieproces niet op gang komt (Dong *et al.*, 2001; Uroz *et al.*, 2003). Ook heeft men al *Pseudomonas* bacteriën die in hoge dichtheden in het wortelmilieu van de aardappelplant voorkomen, voorzien van

het erfelijk materiaal dat codeert voor het enzym dat HSLs kan afbreken. Hierdoor werd de plant weerbaar tegen *Erwinia*-infectie (Molina *et al.*, 2003). De behandeling met de *Pseudomonas* bacterie werkte ook nog 2 dagen na toediening van de *Erwinia*'s. Het voordeel van deze benadering is dat er geen selectiedruk op *Erwinia*'s wordt uitgeoefend, omdat de bacterie niet gedood wordt. Hierdoor zal er naar verwachting niet snel resistentie optreden tegen deze enzymen. Inmiddels zijn er homoserine-afbrekende enzymen gevonden in de volgende genera: *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Comamonas*, *Variovarax*, *Pseudomonas* en *Ochrobactrum* (Dong *et al.*, 2001; Uroz *et al.*, 2003). Met isolaten uit de genera *Bacillus*, *Rhodococcus* en *Ochrobactrum* zijn al goede bestrijdingsresultaten geboekt bij de aardappel. Interessant is dat ook de bodembacterie *Bacillus thuringiensis* infecties van *Erwinia*'s in aardappel kon stoppen, omdat voor dit organisme al een toelating voor insectenbestrijding bestaat in Nederland (Dong *et al.*, 2004).

Naast het toedienen van antagonisten die het quorum sensing mechanisme van *Erwinia*'s verstoren, zouden ook gezuiverde producten toegediend kunnen worden. Men heeft bijvoorbeeld chemische analogen van de signaalstoffen gemaakt waarmee het ziekteproces geremd kan worden. Ook zijn er componenten uit een rode alg, *Delisea pulchra* geïsoleerd die het quorum sensing mechanisme blokkeren (Manefield *et al.*, 2001).

Voor bestrijding van *Ecc* in meloen werd een *Pseudomonas fluorescens* geïsoleerd die naast een antagonistische werking ook de totale eiwitconcentratie in de zaailingen verhoogde (El-Hendawy *et al.*, 1998).

In Amerikaans onderzoek bleek behandeling van knollen met een *Bacillus* of *Pseudomonas* de ziekteincidentie sterk te reduceren (Graham *et al.*, 1985).

Voor bestrijding van *Ech* in tomaat werd in kasexperimenten met een niet-gekaracteriseerde bacterie-isolaat een bestrijdingsresultaat van 74% geboekt (Aysan *et al.*, 2003). Getrimde wortels van zaailingen waren eerst geïncubeerd in de antagonist en daarna in een *Ech* suspensie. Het isolaat remde *Ech* nauwelijks *in vitro* en lijkt dus geen antibioticum te produceren.

Een *Bacillus subtilis* stam, die een breedwerkend antibioticum produceerde was in staat infectie met *Erwinia*'s te verhinderen of te reduceren na co-inoculatie van getrimde wortels of in een aardappelschijventoets (Sharga & Lyon, 1998). In onderzoek naar beheersing van (lak)schurft, werd een verbeterd behandelingsresultaat verkregen door de antagonistische *Bacillus subtilis* stam eerst te formuleren in water-oplosbare granules voor behandeling van het pootgoed (Schmiedeknecht *et al.*, 1998). Dit zou ook voor de bestrijding van *Erwinia*'s interessant kunnen zijn.

Aardappelplanten bevatten bacteriën die gespecialiseerd zijn in het koloniseren van het vaatweefsel (endofyten). Met name antagonistische en/of groeistimulerende endofyten die bij stamselectie meevermeerderd kunnen worden zijn potentieel interessant. Indien pootgoed bij vermeerdering niet telkens opnieuw behandeld hoeft te worden, zou de noodzaak van een registratiedossier vermeden kunnen worden. Endofyten zouden relatief eenvoudig aan miniknollen en weefselkweekvloei- of toegevoegd kunnen worden via de voedingsvloei- of het voedingsmedium.

De endofyten die in de aardappel gevonden zijn behoorden tot verschillende bacterieklassen en waren voor een deel niet cultiveerbaar. Infecties met *Erwinia*'s resulteerden in een toename van de diversiteit van de endofyten, mogelijk door beschadiging van plantenweefsel waardoor nutriënten vrijkomen en ingangspoorten voor nieuwe micro-organismen worden gecreëerd (Reiter *et al.*, 2002). Sommigen endofyten beschermden de plant tegen schade door *Eca* (Reiter *et al.*, 2002). In eerder onderzoek was al gevonden dat de meest actieve antagonistische endofyten te vinden zijn op plaatsen waar zich ook het pathogeen bevindt (Sturz *et al.*, 1999). Opvallend was dat geen van deze endofyten *Eca in vitro* remden en dus geen effectieve antibiotica tegen *Eca* lijken te produceren. De beschermende werking zou anders verklaard kunnen worden door competitie om nutriënten, geïnduceerde resistentie of interactie met het quorum sensing mechanisme van het pathogeen. Endofyten kunnen ook ingezet kunnen worden om de moederknol snel te laten weggroten.

*Resistentie*. Er zijn geen cultivars bekend die volledig resistent zijn voor *Erwinia*'s, maar cultivars verschillen wel aanzienlijk in gevoeligheid. Tolerante cultivars zullen in de regel minder schade geven dan vatbare cultivars. Echter, bij veldinspecties worden infecties ook minder snel opgemerkt waardoor ongezien een opbouw van hoge populaties

kan plaatsvinden. Onder condities die gunstig zijn voor symptoom-expressie kan dan toch nog aanzienlijke schade worden veroorzaakt.

De kans dat er via klassieke veredeling een resistentie tegen *Erwinia*'s zal worden verkregen, wordt niet groot geacht. De enige betrouwbare wijze om op resistentie te screenen is in het veld. Er kan dus maar een beperkt aantal nieuwe lijnen worden getoetst. Dit is aan het einde van het veredelingsproces, waardoor kans op het vinden van resistente of tolerante lijnen klein is.

Genetische modificatietechnieken geeft wel mogelijkheden het inbouwen van resistentie tegen *Erwinia*'s. Zo is bijvoorbeeld het gen dat codeert voor een enzym dat de signaalstoffen van *Erwinia*'s afbreekt in tabak ingebouwd. Hierna waren de lijnen in hoge mate resistent. Acceptatie door de consument is een belangrijk probleem bij de introductie van GMO lijnen. In deze literatuurstudie wordt niet verder ingegaan op alle mogelijkheden voor het creëren van resistente GMO's.





## 6. Literatuur

- Afek, U., J. Orenstein & E. Nuriel, 1999.  
Fogging disinfectants inside storage rooms against pathogens of potatoes and sweet potatoes. *Crop Protection* 18, 111-114.
- Afek, U. & J. Orenstein, 2002.  
Disinfecting potato tubers using steam treatments. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 24, 36-39.
- Alarcon, B., M.T. Gorris, M. Cambra & M.M. Lopez, 1995.  
Serological characterization of potato Isolates of *Erwinia-carotovora* subsp *atroseptica* and subsp *carotovora* using polyclonal and monoclonal-antibodies. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 592-602.
- Allefs, J., W. van Dooijeweert, W. Prummel, L.C.P. Keizer & J. Hoogendoorn, 1996.  
Components of partial resistance to potato blackleg caused by pectolytic *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* and *E-chrysanthemi*. *Plant Pathology* 45, 486-496.
- Anoniem, 1989.  
Bacterieziekten bij pootaardappelen. Brochure van de werkgroep Bacterieziekten, 8 pages.
- Aveling, T.A.S., Q. Kritzinger & C.F. Malan, 1999.  
Effect of oxifulvic acid supplemented with copper and/or iron on growth of bacterial and fungal plant pathogens. *South African Journal of Botany* 65, 244-246.
- Aysan, Y., A. Karatas & O. Cinar, 2003.  
Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. *Crop Protection* 22, 807-811.
- Bain, R.A., P. Millard & M.C.M. Perombelon, 1996.  
The resistance of potato plants to *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* in relation to their calcium and magnesium content. *Potato Research* 39, 185-193.
- Bartz, J.A., S.J. Locascio & D.P. Weingartner, 1992.  
Calcium and potassium fertilization of potatoes grown in North Florida .2. Effect on the bacterial soft rot potential in the tubers. *American Potato Journal* 69, 39-50.
- Bartz, J.A., 1999.  
Suppression of bacterial soft rot in potato fibers by application of kasugamycin. *American Journal of Potato Research* 76, 127-136.
- Basim, H., O. Yegen & W. Zeller, 2000.  
Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 107, 279-284.
- Bech, K., 1994.  
Spread of *Erwinia chrysanthemi* in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 141, 285-292.
- Burgess, P.J., J.P. Blakeman & M.C.M. Perombelon, 1994.  
Contamination and subsequent multiplication of soft rot *Erwinia*'s on healthy potato leaves and debris after haulm destruction. *Plant Pathology* 43, 286-299.
- Cervantes-Martinez, J., R. Hernandez, B. Rodriguez-Garay & F. Santacruz-Ruvalcaba, 2002.  
Detection of bacterial infection of agave plants by laser-induced fluorescence. *Applied Optics* 41, 2541-2545.
- Costello, B., P. Evans, R.J. Ewen, H.E. Gunson, N.M. Ratcliffe & P.T.N. Spencer-Phillips, 1999.  
Identification of volatiles generated by potato tubers (*Solanum tuberosum* CV-Maris Piper) infected by *Erwinia carotovora*, *Bacillus polymyxa* and *Arthrobacter* sp. *Plant Pathology* 48, 345-351.
- Cother, E.J. & B.R. Cullis, 1992.  
The Influence of tuber position on periderm calcium content and its relationship to soft rot susceptibility. *Potato Research* 35, 271-277.
- De Boer, S.H., 2002.  
Relative incidence of *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* in stolon end and peridermal tissue of potato tubers in Canada. *Plant Disease* 86, 960-964.

- De Boer, S.H., 2003.  
Characterization of pectolytic *Erwinia*'s as highly sophisticated pathogens of plants. *European Journal of Plant Pathology* 109, 893-899.
- De Vries, P.M., 1990.  
Stengelnatrotskytomen in aardappelplanten. *Aardappelwereld* 4, 15-18.
- De Vries, P.M. & J.W.L. van Vuurde, 1993.  
Overleving van *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* op aardappelootgoed. In *Gewasbescherming*, pp. 103-108.
- De Boer, S.H. & L.J. Ward, 1995.  
PCR Detection of *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology* 85, 854-858.
- Dong, Y.H., L.H. Wang, J.L. Xu, H.B. Zhang, X.F. Zhang & L.H. Zhang, 2001.  
Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411, 813-817.
- Dong, Y.H., X.F. Zhang, J.L. Xu & L.H. Zhang, 2004.  
Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 954-960.
- Duarte, V., S.H. de Boer, L.J. Ward & A.M.R. de Oliveira, 2004.  
Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 96, 535-545.
- El-Hendawy, H.H., I.M. Zeid & Z.K. Mohamed, 1998.  
The biological control of soft rot disease in melon caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* using *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiological Research* 153, 55-60.
- Elorriota, M.A., F. Suarez-Estrella, M.J. Lopez, M.C. Vargas-Garcia & J. Moreno, 2003.  
Survival of phytopathogenic bacteria during waste composting. *Agriculture Ecosystems & Environment* 96, 141-146.
- Frechon, D., P. Exbrayat, V. Helias & other authors, 1998.  
Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers. *Potato Research* 41, 163-173.
- Gardan, L., C. Gouy, R. Christen & R. Samson, 2003.  
Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp nov and *Pectobacterium wasabiae* sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 381-391.
- Gracia-Garza, J.A., T.J. Blom, W. Brown & W. Allen, 2002.  
Pre- and post-plant applications of copper-based compounds to control *Erwinia* soft rot of calla lilies. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 24, 274-280.
- Graham, D.C., M.D. Harrison & (eds), 1985.  
Report of the international conference on potato blackleg disease. 95 pages.
- Grimm, F. & B. Baumann, 1991.  
Studies on the detection of latent contamination of in vitro potato plants by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (Vanhall) Dye. *Potato Research* 34, 47-55.
- Helias, V., D. Andrivon & B. Jouan, 2000a.  
Development of symptoms caused by *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica* under field conditions and their effects on the yield of individual potato plants. *Plant Pathology* 49, 23-32.
- Helias, V., D. Andrivon & B. Jouan, 2000b.  
Internal colonization pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica*. *Plant Pathology* 49, 33-42.
- Hyman, L.J., V. Dewasmes, I.K. Toth & M.C.M. Perombelon, 1997.  
Improved PCR detection sensitivity of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato tuber peel extract by prior enrichment on a selective medium. *Letters in Applied Microbiology* 25, 143-147.
- Janse, J.D. & M.A. Ruissen, 1988.  
Characterization and classification of *Erwinia chrysanthemi* strains from several hosts in the Netherlands. *Phytopathology* 78, 800-808.

- Kang, H.W., S.W. Kwon & S.J. Go, 2003.  
PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology* 52, 127-133.
- Kastelein, P., A. Bouman, A. Mulder, L.J. Turkensteen & J.W.L. van Vuurde, 1996.  
The effect of green crop lifting on the contamination of seed potato tubers by pathogenic *Erwinia* spp. *Potato Research* 39, 31-42.
- Kastelein, P., E.G. Schepel, A. Mulder, L.J. Turkensteen & J.W.L. van Vuurde, 1999.  
Preliminary selection of antagonists of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Van Hall) Dye for application during green crop lifting of seed potato tubers. *Potato Research* 42, 161-171.
- Kushalappa, A.C. & M. Zulfiqar, 2001.  
Effect of wet incubation time and temperature on infection, and of storage time and temperature on soft rot lesion expansion in potatoes inoculated with *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Potato Research* 44, 233-242.
- Lirio, L.G., M.L. Hermano & M.Q. Fontanilla, 1998.  
Antibacterial activity of medicinal plants from the Philippines. *Pharmaceutical Biology* 36, 357-359.
- Lopez, M.M., M.J. Lopez-Lopez, R. Marti, J. Zamora, J. Lopez-Sanchez & R. Beltra, 2001.  
Effect of acetylsalicylic acid on soft rot produced by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in potato tubers under greenhouse conditions. *Potato Research* 44, 197-206.
- Lyew, D., Y. Garipey, G.S.V. Raghavan & A.C. Kushalappa, 2001.  
Changes in volatile production during an infection of potatoes by *Erwinia carotovora*. *Food Research International* 34, 807-813.
- Manefield, M., M. Welch, M. Givskov, G.P.C. Salmond & S. Kjelleberg, 2001.  
Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Fems Microbiology Letters* 205, 131-138.
- McGuire, R.G. & A. Kelman, 1984.  
Reduced severity of *Erwinia* soft rot in potato tubers with increased calcium content. *Phytopathology* 74, 1250-1256.
- Molina, L., F. Constantinescu, L. Michel, C. Reimann, B. Duffy & G. Defago, 2003.  
Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *Fems Microbiology Ecology* 45, 71-81.
- Nassar, A., A. Darrasse, M. Lemattre, A. Kotoujansky, C. Dervin, R. Vedel & Y. Bertheau, 1996.  
Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2228-2235.
- Olsen, N.L., G.E. Kleinkopf & L.K. Woodell, 2003.  
Efficacy of chlorine dioxide for disease control on stored potatoes. *American Journal of Potato Research* 80, 387-395.
- Pagel, W. & R. Heitefuss, 1989.  
Calcium content and cell-wall polygalacturonans in potato tubers of cultivars with different susceptibilities to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35, 11-21.
- Perombelon, M.C.M. & A. Kelman, 1980.  
Ecology of the soft rot *Erwinia*'s. *Annual Review of Phytopathology* 18, 361-387.
- Perombelon, M.C.M., M.M. Lopez, J. Carbonell & L.J. Hyman, 1988.  
Effects of contamination by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* of potato seed tubers and of cultivar resistance on blanking or non-emergence and blackleg development in Valencia, Spain. *Potato Research* 31, 591-599.
- Ranganna, B., A.C. Kushalappa & G.S.V. Raghavan, 1997.  
Ultraviolet irradiance to control dry rot and soft rot of potato in storage. *Canadian Journal of Plant Pathology- Revue Canadienne De Phytopathologie* 19, 30-35.
- Reiter, B., U. Pfeifer, H. Schwab & A. Sessitsch, 2002.  
Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2261-2268.

- Roozen, N.J.M., 1990.  
Besmetting van erwinia-vrij pootgoed vanuit diverse bronnen. Een literatuuroverzicht. Intern rapport PAGV Lelystad, 18 pages.
- Roozen, N.J.M., 1991a.  
Zwartbenigheid in de aardappelteelt; op welke grond te doorgronden. Themaboekje Themadag 'Bodemgebonden plagen en ziekten van aardappelen', PAGV, 22 november 1991, 37-43.
- Roozen, N.J.M., 1991b.  
Identificatie van *Erwinia*-bacteriën in aardappelen. Intern rapport PAGV Lelystad, 58 pages.
- Samson, R., J.B. Legendre, R. Christen, W. Achouak & L. Gardan, 2004.  
Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Brenner *et al.* 1973) Hauben *et al.* 1998 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *D. chrysanthemi* comb. nov. and *D. paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species: *D. dadantii* sp. nov., *D. dianthicola* sp. nov., *D. dieffenbachiae* sp. nov. and *D. zeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, in press.
- Schmiedeknecht, G., H. Bochow & H. Junge, 1998.  
Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 105, 376-386.
- Serfontein, S., C. Logan, A.E. Swanepoel, B.H. Boelema & D.J. Theron, 1991.  
A potato wilt disease in South-Africa caused by *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Pathology* 40, 382-386.
- Sharga, B.M. & G.D. Lyon, 1998.  
*Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 777-783.
- Smid, E.J., A.H. Jansen & C.J. Tuijn, 1993.  
Anaerobic nitrate respiration by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* during potato tuber invasion. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3648-3653.
- Sturz, A.V., B.R. Christie, B.G. Matheson, W.J. Arsenault & N.A. Buchanan, 1999.  
Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathology* 48, 360-369.
- Toth, I.K., L.J. Hyman & J.R. Wood, 1999.  
A one step PCR-based method for the detection of economically important soft rot *Erwinia* species on micropropagated potato plants. *Journal of Applied Microbiology* 87, 158-166.
- Tovkach, F.I., 1998a.  
Biological properties and classification of *Erwinia carotovora* bacteriocins. *Microbiology* 67, 636-642.
- Tovkach, F.I., 1998b.  
Relationship between the lytic activity of macromolecular carotovoricins and bacteriocin sensitivity of producer strains of *Erwinia carotovora*. *Microbiology* 67, 643-648.
- Tsai, L.S., C.C. Huxsoll & G. Robertson, 2001.  
Prevention of potato spoilage during storage by chlorine dioxide. *Journal of Food Science* 66, 472-477.
- Turkensteen, L.J., 1986.  
Verslag van een bezoek aan Cuba naar aanleiding van klachten over pootgoed met stengelnatrot - 15 tot 23 april., 3 pages.
- Turkensteen, L.J., 1995.  
Achtergrond-document over bruinrot. Intern rapport Plant Research International, 13 pages.
- Tyner, D.N., M.J. Hocart, J.H. Lennard & D.C. Graham, 1997.  
Periderm and lenticel characterization in relation to potato cultivar, soil moisture and tuber maturity. *Potato Research* 40, 181-190.
- Tzeng, K.C., R.G. McGuire & A. Kelman, 1990.  
Resistance of tubers from different potato cultivars to soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *American Potato Journal* 67, 287-305.
- Underberg, H.R., 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.

- Uroz, S., C. D'Angelo-Picard, A. Carlier, M. Elasri, C. Sicot, A. Petit, P. Oger, D. Faure & Y. Dessaux, 2003.  
Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology-Sgm* 149, 1981-1989.
- Van Beckhoven, J., R. van Hoof, G. de Raaij, P. Bonants & J.M. van der Wolf, 2001.  
Eindverslag survey naar serogroepen van *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* en *E. chrysanthemi* in aardappel in Nederland. Intern rapport Plant Research International, 18 pages.
- Van der Wolf, J.M., 1994.  
*Erwinia chrysanthemi* as a plant pathogen: a review. In: Evaluation of serological methods for detection of *Erwinia chrysanthemi* in potato peel extracts Thesis, 1-43.
- van der Wolf, J.M., P.S. van der Zouwen, J. van Beckhoven, A.G.C.L. Speksnijder, E.G. de Haan, C.C.A. Boons & G.W. van den Bovenkamp, 2003.  
*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* als primaire veroorzaker van zwartbenigheid in de aardappel. Intern rapport Plant Research International, 38 pages.
- Van der Zouwen, P.S., E.G. de Haan, C.C.A. Boons, G.W. van den Bovenkamp & J.M. van der Wolf, 2002.  
Noodzaak en mogelijkheden voor toetsing in pootaardappelen op *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Intern rapport Plant Research International, 38 pages.
- Van Vuurde, J.W.L. & P.M. de Vries, 1992.  
Detectie van pathogene *Erwinia* spp. van aardappel in oppervlaktewater in de periode 1988 - 1991. IPO-DLO rapport nr. 92-01, 9 pages.
- Van Vuurde, J.W.L. & N.J.M. Roozen, 1990.  
Comparison of immunofluorescence colony-staining in media, selective isolation on pectate medium, Elisa and immunofluorescence cell staining for detection of *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in cattle manure slurry. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96, 75-89.
- Velvis, H., 2001.  
Calcium in aardappel. In *Nota* 89, pp. 22 pages: Plant Research International.
- Waleron, M., K. Waleron, A.J. Podhajska & E. Lojkowska, 2002.  
Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology-Sgm* 148, 583-595.
- Weber, J. & G. Schenk, 1988.  
Symptomlose Ausbreitung des Nassfauleeregers *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (van Hall) Dye an in-vitro Pflanzen der Kartoffel. *Ach Phytopathol Pflanzenschutz* 5, 395-402.



## Bijlage I.

# Aanbevelingen voor beheersing van *Erwinia*-infecties

- Gebruik pootgoed dat door met gevalideerde methoden in het laboratorium is gecontroleerd op *Erwinia* besmetting.
- Gebruik tolerante cultivars.
- Reduceer het aantal generaties tijdens stammenteelt door uit te gaan van miniknollen
- Zorg voor bewaarcondities waarbij *Erwinia*'s zich niet verder kunnen vermeerderen.
- Gebruik kleine onbeschadigde knollen.  
Kleine knollen rotten eerder weg en geven minder versmering tijdens de oogst.
- Snijden van pootgoed leidt tot versmering van bacterieziekten.
- Voorkom versmering tijdens voorkiemen en poten door het verwijderen van rotte knollen. Bij (langdurig) voorkiemen krijgen *Erwinia*'s kans zich te vermenigvuldigen. Verder ontstaan er tijdens het afkiemen ook wonden die een invalspoort kunnen vormen voor aanwezig inoculum. Aan de andere kant krijgen knollen bij voorkiemen een snellere start en treedt er eerder ouderdomsresistentie op.
- Stel gemechaniseerde werkzaamheden tijdens stammenvermeerdering zo lang mogelijk uit, omdat bekend is dat *Erwinia*'s gemakkelijk met machines versmeerd worden.
- Zorg voor een optimale bemesting. Een hoge stikstofgift leidt tot een "geil gewas" met een hogere kans op versmering. Onder anaerobe omstandigheden wordt nitraat door *Erwinia*'s gebruikt als oxidator i.p.v. zuurstof en een hoge nitraat concentratie faciliteert daardoor de vermeerdering van *Erwinia*'s (Smid *et al.*, 1993). Een te hoge stikstofgift stimuleert ook de bladgroei sterk en zal de bladnat periode verlengen waardoor bacteriën die vanuit de lucht het blad contamineren, meer kans krijgen het gewas te infecteren. Een lage stikstofgift maakt het gewas weer zwak en vatbaar voor infecties. Verhoging van de calciumgift kan mogelijk de resistentie van het gewas bevorderen.
- Vermijd anaerobe condities. Probeer verslemping van gronden tegen te gaan. Teel geen pootaardappelen op verdichte percelen. Zorg voor een goede afwatering.
- Overhead irrigatie heeft de voorkeur boven bevoeiingen, omdat dit laatste *Erwinia*'s in de bouwvoor sterk kunnen verspreiden. Irrigeer niet met besmet (oppervlakte-) water. Met overhead irrigatie blijft er een risico bestaan op beschadiging van planten waardoor stengelrot kan optreden.
- Zorg voor een goede controle van aardappelopslag en van onkruiden die als waardplant kunnen fungeren.
- Zorg voor een goede bestrijding van ziekten en plagen, m.n. die een synergistisch effect op *Erwinia* ziekten hebben, zoals *Verticillium* en *Fusarium*.
- Selectie in het gewas wordt, zeker later in het groeiseizoen, weinig zinvol geacht. Zieke planten vormen het topje van de ijsberg.
- Vermijd schade van het gewas tijdens bespuitingen.
- Zorg dat loof niet op de ruggen komt te liggen bij loofvernietiging.
- Zorg voor een snelle loofvernietiging, omdat dit de opbouw van *Erwinia* populaties in het drogende loof verhindert.
- Laat knollen drogen en afharden voor de oogst, bijvoorbeeld door twee-fasen oogst. De knollen zullen na drogen op het zwad minder beschadigd worden.
- Selecteer rotte knollen uit bij oogst en sortering.
- Oogst bij droog weer i.v.m. versmering op oogstmachines.
- Zorg voor goed afgestelde schone (gedesinfecteerde) oogst- en sorteermachines om verwonding en versmering zo veel mogelijk te voorkomen.
- Wees voorzichtig met axiaalrooien. Hiermee kunnen moederknollen kapot gedraaid worden en er bestaat (extra) risico op ontvellingen. Vooral als er onder natte omstandigheden gerooid wordt, is de kans op versmering groot.
- Zorg na oogst voor een goede verdere afharding van de knol en een goede wondheling.





## Bijlage II.

# Belangrijke kennisleemtes voor beheersing van bacterieziekten

(meest relevante kennisleemtes zijn gemarkeerd)

### Initiële besmetting

- *Besmettingsniveaus van weefselkweekmateriaal en miniknollen en de betekenis hiervan in de opbouw van Erwinia besmettingen.*
- *Infectieniveaus van regenwater en aerosolen in Nederland. Het risico's van besmetting van bovengrondse delen van de plant door regenwater of aerosolen. De efficiency waarmee Erwinia's via de vaten van bovengrondse delen naar dochterknollen worden getransporteerd.*
- *De rol van de mechanisatie (gebruik van besmette machines) tijdens verschillende fasen van de oogst.*
- *De rol van epifytische populaties tijdens loofvernietiging. De mogelijkheid om populatie-opbouw na loofvernietiging te voorkomen. Het type loofvernietiging (klappen versus spuiten) op de opbouw van Erwinia populaties.*
- *De rol van gecontamineerd oppervlaktewater. De overleving van Erwinia's in oppervlakte water. De rol die aquatische onkruiden en slib spelen bij het in stand houden van Erwinia's in water.*
- De rol van insecten.
- De aanwezigheid van mogelijk lage aantallen Erwinia's beneden de detectiegrens in grond (ca. 10.000 cfu/g).

### Opbouw populaties

- *De rol van bemesting o.a. overleving van epifytische populaties, rot van de moederknol, de gevoeligheid van dochterknollen voor infecties. De relatie met het droge stofgehalte en met de microbiële achtergrond (schimmels en bacteriën).*
- *De rol van verspreiding door teelthandelingen met machines tijdens gewasgroei.*
- *De rol van de rottende moederknol bij interne infecties via de vaten en verspreiding van Erwinia's via vrij water in de grond. Mogelijkheid om knollen sneller te laten weggroten via teeltmaatregelen (bemesting, beregening). Het raseffect bij moederknolrot.*
- *De zin van selectie, met name vroeg in het seizoen.*
- *Relatie tussen ziekte-incidentie en verschillende (milieu)factoren zoals ras, initiële dichtheden, grondsoort, bodemtemperatuur en neerslag.*
- *Rol van voorkiemen in het vroegtijdig vermeederen van Erwinia's in de kiemende knol en de risico's van beschadiging en versmering tijdens afkiemen en poten.*
- *De beste oogstomstandigheden. Nat weer leidt tot meer versmering, maar harde kluiten kunnen bij droog weer makkelijk leiden tot knolbeschadigingen.*
- *Het kritische moment voor verspreiding van infecties: teelt, oogst, sorteren of inschuren.*

### Controle

- *Noodzaak voor het toetsen op Ecc. Ecc is als enige Erwinia soort uit een hoog percentage planten met typische zwartbenigheidssymptomen in Nederland geïsoleerd. De reële economische schade is niet bekend. Sommige Ecc isolaten hebben na vacuümisotatie van cv. Kondor in 2002 en 2003 bacterieziekten veroorzaakt. Ecc kan i.t.t. Eca en Ech niet serologisch aangetoond worden. Bij een toets op Ecc zal derhalve van uitplaattechnieken of moleculair-biologische technieken gebruik gemaakt moeten worden.*

- *Een gerichte gevalideerde bemonsteringsstrategie, die afgestemd is op pootgoedklasse en mogelijk bestemming.*
- *Een overtuigend bewijs van het nut van een nacontrole d.m.v. een laboratoriumtoets op Erwinia's.*
- *De potentie van componenten die resistentie bij aardappelplanten induceren, zoals chitosan en acetyl salicylzuur.*
- *De mogelijkheden om tijdens oogst en sorteren desinfecterende middelen in te zetten om besmettingen te voorkomen.*
- *De potentie van biologische behandeling, in het bijzonder de toepassing van endofyten tijdens snelle vermeerdering.*
- *Het effect van een integrale aanpak waarin meerdere controle-elementen tijdens teelt en (na)oogst worden gecombineerd.*
- De noodzaak om de virulentie van Erwinia's mee te wegen bij het classificeren van pootgoed na een laboratoriumtoets. Het bestaan van variatie in virulentie zeker. Als virulentie meegewogen moet worden, dienen er goede virulentiemarkers geselecteerd te worden. Speciale aandacht vraagt onderzoek naar de praktische betekenis van de twee onderscheiden "Ech soorten", E. chrysanthemi en E. dianthicola die in Nederland in de aardappel zijn gevonden.
- De rol van andere (pectinolytische) bacteriën in het syndroom "bacterieziek".
- Snelle, betrouwbare goedkope toetsen die geschikt zijn om initiële dichtheden Erwinia's te bepalen, m.n. voor Ecc.
- Betrouwbaarheid van bemonstering van naveleinde, zoals nu wordt toegepast voor bruinrot- en ringrotonderzoek.
- De mogelijkheden voor fysische behandeling van aardappelen, zoals hete vochtige lucht, droge lucht, electronenbehandeling en elektrische velden, om Erwinia-populaties te bestrijden.