

**ONDERZOEK NAAR BACTERIEZIEKTEN VEROORZAAKT DOOR ERWINIA SPP.,  
BIJ POOTAARDAPPELEN**

Stand van zaken

Prioriteiten

Werkgroep "Onderzoek Knolziekten-bacterieziekten"

Lelystad, december 1995



## INHOUD

Voorwoord . . . . .	2
1. Inleiding . . . . .	3
2. Ecologie en epidemiologie . . . . .	3
2.1 Besmettingsbronnen . . . . .	3
2.2 Directe besmetting . . . . .	4
2.3 Opbouw bacteriepopulatie in knol en plant . . . . .	6
2.4 Factoren van belang voor de populatie-ontwikkeling in verband met symptoomexpressie . . . . .	6
3. Diagnostiek . . . . .	8
4. Detectiemethoden . . . . .	9
4.1 Productie en kwaliteitsonderzoek van antisera . . . . .	9
4.2 Productie en kwaliteitsonderzoek van primers en probes . . . . .	10
4.3 Routinematige detectiemethoden . . . . .	10
5. Veredeling op resistentie . . . . .	14
6. Preventie en bestrijding van bacterieziekten . . . . .	15
6.1 Preventie . . . . .	15
6.2 Bestrijding . . . . .	15
7. Samenvatting van de onderzoeksbehoefte op het terrein van de bestrijding van <i>Erwinia</i> spp. . . . .	18
Bijlage 1. Verklaring van gebruikte termen . . . . .	19

## VOORWOORD

Bacterieziekten veroorzaakt door *Erwinia* spp. vormen nog steeds een belangrijk probleem bij de pootaardappelteelt. De laatste twee decennia is veel onderzoek naar deze ziekten verricht. Dit heeft veel kennis en ondermeer een aantal bruikbare detectiemethoden opgeleverd. Toch zijn er nog steeds belangrijke leemten in onze kennis, met name voor wat betreft de ecologie van deze bacterieziekten. Ook op het terrein van de routinematige detectie is een verdere vervolmaking van methoden gewenst.

Dit was aanleiding voor de Werkgroep Onderzoek Knolziekten-Bacterieziekten om een in 1989 opgestelde nota over zowel praktijkgerelateerde- als onderzoeksaspecten van zwartbenigheid en stengelnatrot te herzien. In deze nota zijn zoveel mogelijke prioriteiten voor het onderzoek naar deze bacterieziekten aangegeven.

Met deze nota wil de werkgroep relevante beleidsorganen van zowel Overheid als bedrijfsleven informeren over de stand van zaken met betrekking tot het onderzoek aan *Erwinia* spp. Tevens kan dit stuk als een leidraad dienen bij het stellen van onderzoeksprioriteiten.

C.D. van Loon  
Voorzitter

## 1. Inleiding

Zwartbenigheid en stengelnatrot, veroorzaakt door *Erwinia* spp. behoren tot de belangrijkste kwaliteitsziekten in de Nederlandse pootaardappelteelt. Dit blijkt uit gegevens van de NAK over déklassering van pootaardappelen bij de veld- en partijkeuring.

Ondanks veel onderzoek, hier en elders in de wereld, is het nog steeds niet gelukt om deze ziekten beheersbaar te maken.

In deze notitie, die een herziene versie is van een in 1989 tot stand gekomen stuk, zal in het kort worden aangegeven welke aspecten van deze ziekten nog om nadere opheldering vragen. Daarbij zal worden aangeduid in hoeverre deze aspecten reeds in onderzoek zijn of nog moeten worden aangepakt. Verder zal worden aangegeven of de verschillende aspecten meer fundamenteel (FO) dan wel praktijkgericht (PO) onderzoek vragen en welke prioriteit eraan moet worden toegekend.

## 2. Ecologie en Epidemiologie

### 2.1 Besmettingsbronnen

Langzamerhand kennen we een groot aantal besmettingsbronnen (\*) voor de bacterieziekten zwartbenigheid en stengelnatrot. Hoewel algemeen wordt aangenomen, dat de meeste besmettingen in een partij worden veroorzaakt door bacteriën, die uit de poter komen, weten we echter nog te weinig van de kwantitatieve betekenis van de verschillende bronnen. Voor een effectieve bestrijding is deze kennis echter van essentieel belang.

#### 2.1.1 Herbesmetting uitgangsmateriaal.

In dit kader past ook het probleem dat 'schoon' uitgangsmateriaal bij sommige telers wel en bij andere niet besmet raakt. Onderzoek in de vorm van een enquête door de voormalige keuringsdienst Noordzeepolders van de NAK naar dit fenomeen heeft (slechts) een beperkt aantal aanknopingspunten opgeleverd. Zo bleek in de nateelt van uitgangsmateriaal met veel zware beschadigingen, meer bacterieziek voor te komen dan in die van onbeschadigde partijen. Hetzelfde gold voor partijen waarbij rot in het uitgangsmateriaal was gevonden. Verder bleek er een relatie te zijn tussen de potermaat en het voorkomen van bacterieziekten in de nateelt. Hoe groter de potermaat des te hoger was het percentage klasseverlagingen.

(\*) Volgens "Lijst van gewasbeschermingskundige termen" Gewasbescherming 16 (december 1985) Supplement nr. 1 en ABC Biotechnologie 1994, TNO-Biotechnologie, Zeist)

## 2.2 Directe besmetting

### 2.2.1 *Rotte moederknollen*

Bacteriën uit rotte moederknollen kunnen zowel dochterknollen als knollen van gezonde omringende planten besmetten. Er zijn aanwijzingen dat er minder besmetting van de dochterknollen optreedt naarmate de moederknollen eerder wegrotten. Waarschijnlijk is het beter als moederknollen tijdens het groeiseizoen niet wegrotten, maar indrogen (mummies worden), waarna zij bij het oogsten kunnen worden verwijderd.

Het PAGV heeft nagegaan of het wegrotten van moederknollen kan worden beïnvloed. Daarbij is gebleken, dat moederknollen van vroegrijpe rassen als regel eerder wegrotten dan die van late rassen. Verder bleken kunstmatig met pathogene *Erwinia* bacteriën besmette knollen eerder weg te rotten dan gezonde knollen, maar was er geen verschil in tijdstip van wegrotten tussen grote en kleine knollen. De effecten van fysiologische leeftijd van het pootgoed en van knolbehandeling tegen *Rhizoctonia* waren beperkt. Verder PO heeft een lage prioriteit.

### 2.2.2 *Zieke planten in het veld*

Uit besmette poters, maar ook door besmetting tijdens de groeiperiode, kunnen zieke planten in het veld voorkomen. Vanuit deze besmettingsbronnen kunnen als volgt gezonde planten worden besmet:

#### - Aerosols

In het buitenland is aangetoond, dat bacteriën zich vanuit aangetaste planten via aerosols kunnen verspreiden. Niet bekend is echter over welke afstanden dit mogelijk is. In de Nederlandse situatie, met als regel slechts een zeer beperkt aantal zieke planten per ha, lijkt verspreiding via aerosols echter slechts een geringe rol te spelen. In ons land is hieraan nog geen onderzoek gedaan. Op dit moment heeft dit onderzoek een lage prioriteit (FO i.s.m.PO).

#### - Selectie en sporeisporen

Het is niet ondenkbaar, dat de mens tijdens de selectie en bij het uitvoeren van bespuitingen met bestrijdingsmiddelen, met behulp van rijdend materieel, bacteriën van zieke naar gezonde planten kan verspreiden. Het lijkt echter een ondergeschikte besmettingsbron. Op dit moment heeft dit onderzoek een lage prioriteit (PO).

#### - Insekten

Aangenomen mag worden, dat insekten *Erwinia*-bacteriën kunnen overbrengen op gezonde planten. Waarschijnlijk is deze besmettingsbron echter kwantitatief van weinig betekenis. Op dit moment heeft onderzoek hiernaar (FO) een lage prioriteit.

### 2.2.3 Grond/Onkruiden/Tussenwaardplanten

Er zijn aanwijzingen dat *Erwinia* spp. in het veld, in plantenresten en opslag van planten, kunnen overleven en daardoor gezond pootgoed kunnen besmetten. Vooral voor de teelt van hoogwaardig materiaal is het van het grootste belang om de risico's hiervan op verschillende grondsoorten te kennen. Onkruiden en tussenwaardplanten kunnen hierbij een rol spelen. Zo is gevonden, dat kool (Eca) en ook maïs en witlof (Ech) waarschijnlijk als tussenwaardplant kunnen fungeren voor *Erwinia* spp.

Thans gebeurt hieraan weinig onderzoek. Meer onderzoek is evenwel noodzakelijk om na te gaan of genoemde gewassen en bepaalde onkruiden wel aanvaardbaar zijn als voorvrucht voor de teelt van hoogwaardig pootgoed. Hieraan wordt een hoge prioriteit toegekend. (PO i.s.m. FO)

### 2.2.4 Water

Uit de literatuur is bekend, dat *Erwinia*-bacteriën in oppervlaktewater kunnen voorkomen. Ook in Nederland is door IPO-DLO in aardappelteeltgebieden incidenteel *E. atroseptica* en *E. chrysanthemi* (biovar 3) uit slotwater geïsoleerd. Dit was overigens hoofdzakelijk het geval aan het eind of na de groeiperiode.

Daar een belangrijk deel van het pootaardappelareaal een of meer keren per seizoen wordt beregend met hoofdzakelijk oppervlaktewater is niettemin meer kennis over de rol van deze potentiële besmettingsbron gewenst. Door behalve oppervlaktewater ook drainwater te onderzoeken, kan worden nagegaan of bacteriën via de grond in het oppervlaktewater terecht kunnen komen. Aan dit onderzoek wordt lage prioriteit toegekend (PO i.s.m. FO)

### 2.2.5 Mest

Via voeraardappelen kunnen bacteriën in dierlijke mest terecht komen. Uit onderzoek van IPO-DLO en PAGV is gebleken, dat Eca en Ech bij een mesttemperatuur van 4°C tenminste 4 maanden in leven kunnen blijven. Bij een mesttemperatuur van 10-15°C waren deze bacteriën na 2-3 maanden nauwelijks meer detecteerbaar. Daar mest als regel in het najaar voorafgaand aan de pootgoedteelt wordt uitgereden, lijkt dit geen besmettingsbron van betekenis.

### 2.2.6 Machines en werktuigen bij het poten, loofvernietigen, oogsten en sorteren.

De laatste jaren is onderzoek verricht naar de rol van machines en werktuigen als besmettingsbron van *Erwinia*-bacteriën. Daarbij is ondermeer duidelijk geworden, dat poot- en rooimachines een belangrijke besmettingsbron kunnen zijn. Daarom is het schoonmaken van machines voor ze naar een ander

perceel gaan gewenst. Daarnaast vormen knolbeschadigingen een invalspoort voor infectie. Dit geldt met name voor vleeswonden en rooierslag (bruisse) zoals Amerikaans onderzoek heeft aangetoond. Laboratoriumonderzoek van IPO-DLO heeft aangetoond dat *Erwinia*-bacteriën ook op ontveld knoloppervlak kunnen overleven. Uit veldonderzoek van IPO-DLO naar het effect van groen-rooien op de verspreiding van bacterieziekten valt af te leiden dat ontvelingen geen belangrijke invalspoort voor *Erwinia* spp. vormen. Gebleken is dat het rooien in twee fasen, dat wil zeggen met een veldperiode van enkele uren, de besmetting bij het rooien kan verminderen.

De rol van lenticellen voor een eventuele infectie van de knol tijdens het rooien is beperkt. Met het loofklappen kunnen bacteriën worden verspreid. Deze kunnen zich in het geklapte loof snel vermeerderen. Met behulp van regenwater kunnen de bacteriën vervolgens de knollen bereiken en deze infecteren, (Eca) zoals uit PAGV-onderzoek is gebleken.

Het is bekend dat tijdens het sorteren besmetting van gezonde knollen kan plaatsvinden, als rotte knollen in een partij aanwezig zijn. Dit houdt overigens in, dat besmetting en infectie via oppervlakkige beschadigingen (kiembreuk) bij het sorteren kan plaatsvinden.

Voorlopig is voldoende geïnventariseerd welke besmettingsbronnen bij mechanisatie van de teelt optreden. Verder onderzoek (PO) heeft dan ook een lage prioriteit.

## 2.3 Opbouw bacteriepopulatie in knol en plant

### 2.3.1 Wanneer infectie(\*)

Het is nog onvoldoende bekend onder welke omstandigheden een besmetting tot een infectie leidt en welke factoren hierop van invloed zijn. Temperatuur, vocht (bewaar- en bodemomstandigheden) en de fysiologische toestand van knol en plant (open of gesloten lenticellen, aanwezigheid van beschadigingen) spelen hierbij waarschijnlijk een rol. Thans gebeurt hieraan nog weinig onderzoek, terwijl onderzoek hiernaar een hoge prioriteit heeft (FO).

## 2.4 Factoren van belang voor de populatieontwikkeling in verband met symptoomexpressie

Aangenomen wordt, dat *Erwinia* spp. pas tot symptoomexpressie in plant en knol komen als er een zeker minimum aantal bacteriën aanwezig is. Op basis van onderzoek en praktijkproeven in binnen- en buitenland is geen besmettingsdrempel aan te geven waarbeneden geen symptomen meer optreden. Een drempel van  $10^3$  cfu per ml lijkt voor de praktijk een redelijke drempel. In Nederland zal een besmetting lager dan  $10^5$  zelden tot symptomen leiden (Wel

zijn na vacuüminfiltratie van  $10^3$  cfu Ech per ml in Cuba symptomen gevonden).

Eén vitale bacterie op de juiste plaats in de knol en bij de juiste ecologische condities kan een latente besmetting tot gevolg hebben. Het is onvoldoende bekend hoe en in welke mate verschillende factoren de opbouw van een bacteriepopulatie bepalen in een knol die met een of enkele bacteriën is besmet.

Onderzoek hiernaar heeft prioriteit (FO).

- Bewaartemperatuur/voorkiemen

Het is belangrijk om de rol te kennen die de bewaartemperatuur, eventueel in combinatie met voorkiemen, speelt bij de opbouw van de bacteriepopulatie in de moederknol en de eventuele infectie van de daaruit groeiende planten. Gebleken is dat een warme bewaring en voorkiemen een vervroeging van het optreden van symptomen kunnen geven. Niet duidelijk is of hierdoor ook de besmetting van de dochterknollen toeneemt.

Voortzetting van dit onderzoek verdient hoge prioriteit (FO i.s.m.PO).

- Beregening

Er zijn aanwijzingen dat kunstmatige beregening, behalve via besmet beregeningswater, de populatie-opbouw van *Erwinia* spp. gunstig kan beïnvloeden door beschadiging van planten en het dichtslaan van de grond. Als gevolg van beregenen kan het aantal planten met symptomen van een *Erwinia*-aantasting toenemen, zoals PAGV-onderzoek heeft aangetoond. Dit lijkt vooral op te treden als beregening leidt tot verslemping en daardoor zuurstofarme omstandigheden in de bouwvoor. Daarnaast kan beregening stengelbreuk veroorzaken, waardoor een infectiepoort voor *Erwinia*-bacteriën ontstaat. Onderzoek hiernaar heeft een lage prioriteit (PO).

- Effect van selectie

Het lijkt aannemelijk dat een vroege selectie op bacteriezieke planten in pootgoedpercelen de populatie-ontwikkeling van *Erwinia* in de partij kan afremmen. Late selectie zou de populatie-ontwikkeling kunnen bevorderen, ook al vanwege beschadiging als gevolg van het lopen door het gewas. Bovendien kunnen, zo is uit PAGV-onderzoek gebleken, dan ook buurplanten besmet worden. Nader onderzoek heeft prioriteit (PO).

- Grondsoort

Op slempgevoelige gronden lijkt een hoger percentage planten bacteriezieke symptomen te tonen dan op niet slempgevoelige gronden. Dit is met name het geval na overvloedige regenval, al dan niet in combinatie met kunstmatige beregening.



- Maat pootgoed

Onderzoek op het PAGV heeft aangetoond, dat gebruik van grof pootgoed tot een hoger percentage planten met symptomen leidt dan fijn pootgoed. Bovendien worden de symptomen bij grof pootgoed eerder zichtbaar. De met behulp van ELISA vastgestelde besmettingsgraad van beide groepen knollen was hierbij gelijk. Het is de vraag of ook de dochterknollen van het grove pootgoed in sterkere mate zijn besmet dan die van het fijne pootgoed (PO). Lage prioriteit!

- Snijden van pootgoed

Het snijden van pootgoed is uit een oogpunt van verspreiding van bacterieziekten erg riskant. Zelfs bij het continu ontsmetten van de messen van de snijmachine kan na het passeren van *Erwinia*-rotte knollen besmetting optreden van gezonde knollen. Snijden van uitgangsmateriaal voor de pootgoedteelt wordt dan ook ontraden.

- Wassen van pootgoed

Het wassen van pootgoed houdt eveneens risico's in voor de verspreiding van bacterieziekten. Toevoeging van ontsmettingsmiddelen als bijvoorbeeld calciumhypochloriet kan dit gevaar beperken. Daarbij is het verder van het allergrootste belang dat de pootaardappelen na het wassen grondig worden gedroogd.

Verder onderzoek (PO) heeft een lage prioriteit

### 3. Diagnostiek(\*)

#### Eigenschappen *Erwinia* spp. en identificatiemethoden

Regelmatig herhaald onderzoek naar de eigenschappen (m.n. virulentie en serotype) van de in Nederland voorkomende stammen van *Erwinia* spp. is van groot belang voor alle in het overzicht genoemde richtingen van onderzoek. Hierbij dient met name gedacht te worden aan het opsporen van *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc)- stammen met een verhoogde pathogeniteit(\*) en van andere serotypen(\*) van *Erwinia chrysanthemi* (Ech) en *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca). De antisera moeten immers alle in Nederland aanwezige serotypen meenemen.

Bij NAK/IPO-onderzoek van een groot aantal stammen zijn tot nu toe in Nederland van Eca geen andere serotypen gevonden.

Verder dient ook het screenen van nieuw beschikbaar gekomen antisera, uit eigen land of buitenland, op mogelijke kruisreacties plaats te vinden. Hetzelfde geldt voor primers (\*) en probes (\*) bij gebruikmaking van moleculair biologische methoden. Verder is onderzoek nodig om na te gaan of primers en probes alle genotypen van het pathogeen meenemen.

Voor wat betreft identificatie van pathogene *Erwinia* spp. vormt de vetzuur-analyse een goede en snelle methode (binnen 48 uur, in vergelijking met 10 - 14 dagen bij toepassing van conventionele identificatiemethoden). In hun vetzuurpatroon afwijkende stammen van Ech zijn nu ook in de op de PD aanwezige bibliotheek opgenomen. In verband met de export naar warme landen, waar Ech reeds aanwezig kan zijn, zou onderzoek naar de restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) noodzakelijk kunnen zijn om het pathogeen te 'fingerprinten'. Dit maakt het mogelijk om de herkomst van de ziekteverwekker vast te stellen.

Een regelmatige inventarisatie van serotypen (FO) heeft hoge prioriteit; onderzoek naar RFLP's (FO) heeft een lage prioriteit.

#### 4. Detectiemethoden(\*)

##### 4.1 Productie en kwaliteitsonderzoek van antisera

De kwaliteit van een bepaald antiserum dient te worden onderzocht in relatie tot de serologische detectiemethode waarvoor het bedoeld is. Een belangrijk aspect hierbij is het toetsen van de specificiteit. Hierbij wordt vooral onderzoek gedaan naar het risico van een vals-positieve reactie met 'kruisreagerende'(\*) micro-organismen vanuit het aardappel-extract. Immunofluorescentie koloniekleurings (IFC) is een belangrijke techniek gebleken voor het selectief opsporen en isoleren van kruisreageerders. Door vergelijkend biochemisch onderzoek van kruisreageerders en de doelbacterie kan de aanwezigheid van typische antigene determinanten(\*) voor een bepaald pathogeen onderzocht worden. Productie van monoklonale antilichamen(\*) (Mab) tegen deze antigene determinanten zou een belangrijke bijdrage kunnen vormen voor het verbeteren van de specificiteit en reproduceerbaarheid van serologische toetsen. De kans dat voor elke doelbacterie een typische antigene determinant kan worden geselecteerd, waarmee Mab bovendien voldoende reactief zijn, is vrij klein. Zelfs bij een positief resultaat blijft er een vrij grote kans bestaan dat vroeg of laat toch een kruisreagerend micro-organisme wordt gevonden.

Het onderzoek naar antisera voor een betrouwbare detectie van Eca en Ech heeft zich gericht op de productie van monoclonalen tegen antigene determinanten van de celwand (Ech) en antigene determinanten op pectinolytische exo-enzymen (Ech).

Behalve de in IPO-DLO geproduceerde monoclonalen worden ook enkele elders geproduceerde monoclonalen (Berteau, Frankrijk; De Boer, Canada; Perombelon, Schotland; Cambra, Spanje) op specificiteit onderzocht. Het kwaliteitsonderzoek richt zich op stammen van de homologe en van de bekende

kruisreagerende bacteriën.

Voor Eca zijn drie verschillende typen antigene determinanten van de celwand gevonden. De kruisreageerders hebben ieder maar één antigene determinant gemeen met Eca. Voor een minimale kans op een vals-positief resultaat in ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) wordt geadviseerd om simultaan te toetsen met twee monospecifieke antisera gericht tegen twee verschillende antigene determinanten van de doelbacterie waarvoor geen of weinig kruisreacties zijn gevonden. De kans dat beide antigene determinanten gelijktijdig op een kruisreageerder voorkomen zal statistisch gezien uiterst klein zijn. Deze methode biedt voor Eca goede mogelijkheden en wordt door de NAK op praktijkschaal uitgetest.

Daarnaast is oriënterend onderzoek gedaan ter verificatie van ELISA-positieve monsters met behulp van SDS-PAGE (SDS-Poly-acryde gel electroforese) en PCR.

Prioriteit (FO).

#### 4.2 Productie en kwaliteitsonderzoek van primers(\*) en probes(\*)

'Gene probes' lijken vooral een belangrijke rol te kunnen gaan spelen voor de identificatie van stammen en het bevestigen van resultaten verkregen met andere toetsen. De perspectieven voor toepassing voor routinematig detectieonderzoek zijn nog onduidelijk.

De met antisera tegen Eca en Ech kruisreagerende bacteriën blijken in PCR (Polymerase chain reaction) geen kruisreactie te geven met primers tegen Eca en Ech.

Verder onderzoek zal vooral gericht dienen te zijn op het inzetbaar maken van door derden ontwikkelde primers voor Eca en Ech voor de praktijk, bv. in verificatie procedures gekoppeld aan bijvoorbeeld IFC of ELISA. Daarnaast is verder onderzoek naar de inzetbaarheid van 'gene probes' voor screeningsdoeleinden noodzakelijk.

Dit onderzoek heeft prioriteit (FO).

#### 4.3 Routinematige detectiemethoden

Voor routinematig onderzoek van pootaardappelen op besmetting met bacterieziekten (*Erwinia* spp.) in het kader van de NAK-keuring worden de volgende eisen aan de detectiemethode gesteld:

- bruikbaar voor detectie van alle Eca en Ech stammen, die de aardappel als waardplant in Nederland kunnen benutten.  
Wanneer dit niet mogelijk blijkt is een systeem acceptabel waarbij alle stammen, die in Nederland de aardappel als waardplant benutten, worden

gedetecteerd.

Beide vereisten vragen om toetsing van grote aantallen (recent geïsoleerde) isolaten.

- een onderzoekstelsel dat de kans op het optreden van vals-positieve reacties (kruisreacties) aantoonbaar uitsluit; een combinatie van twee methodieken, die beiden een geheel ander onderdeel van de bacterie detecteren.

Iedere methodiek kent vals-positieve en vals-negatieve uitslagen. Een combinatie van twee, zo verschillend mogelijke, methodieken kan met name de kans op een vals-positieve reactie verminderen. Op grond van dit uitgangspunt zou een combinatie van een serologische methode (ELISA) met een methode die gebruik maakt van gene probes (DNA-hybridisatie, PCR) de beste keuze zijn.

Echter, omdat met name PCR volgens de huidige stand van onderzoek nog niet in aanmerking komt (bedrijfszekerheid, betaalbaarheid) is het verstandig om voorlopig nog te streven naar een combinatie van twee serologische technieken, gebruik makend van twee (monoclonale) antisera die met een andere antigene determinant van de bacterie reageren.

Voorlopig blijven de gedachten dan ook uitgaan naar een screening met behulp van ELISA, gevolgd door een tweede serologische toets ter bevestiging van de positief gevonden knollen, of naar twee gelijktijdig uitgevoerde ELISA's in het zelfde sap. Een andere optie is een ophoping met de Malthus, gevolgd door toetsing van het ophopingsmedium met twee verschillende methodieken.

**Verder onderzoek naar de toepasbaarheid van DNA-hybridisatie en PCR voor verificatie heeft een hoge prioriteit (FO en PO).**

- een reproduceerbaar onderzoekstelsel met een hoge diagnostische gevoeligheid en een hoge diagnostische specificiteit.

Waar men de voorkeur aan geeft is afhankelijk van de positie welke men, t.o.v. het te keuren produkt, inneemt (producent of ontvanger). Dat de NAK een zo hoog mogelijke diagnostische gevoeligheid, binnen bepaalde grenzen, belangrijker vindt dan een hoge diagnostische specificiteit komt omdat:

- het kwaliteitsziekten en geen quarantaineziekte betreft
  - een in het laboratorium gemiste besmetting, het volgende jaar, toch veelal weer tijdens de veldkeuring kan worden opgemerkt.
- een stelsel gebaseerd op de detectie van levende bacteriën.

Een belangrijke vraag is in hoeverre de fysiologische staat van het pathogeen (en de wijze van bewaren/behandelen van de knol voorafgaande

aan toetsen) en de interferentie van abiotische- (remstoffen) en biotische factoren (saprofyten) van invloed zijn op de gevoeligheid van het onderzoekstelsel.

Onderzoek (FO) hiernaar heeft een hoge prioriteit.

- een gevoeligheid van  $10^3$  cfu per knol (Perombelon, in lit.)

In de praktijk wordt dit vaak vertaald als  $10^3$  cfu per ml schilsap. Een belangrijke vraag is of de gevoeligheid van bestaande (serologische) methodieken verhoogd kan worden door toepassing van immunoconcentratie of een (strept)avidine-biotine systeem.

Onderzoek (FO) hiernaar heeft een hoge prioriteit.

- een serologische component van de methodiek moet bij voorkeur gebaseerd zijn op gebruik van een monoclonaal antiserum (kwaliteit en verkrijgbaarheid in de tijd gewaarborgd).
- er dient een onderbouwde duidelijkheid te bestaan over de trefkans bij een bepaalde monstergrootte.
- toetsing dient uit te monden in een semi-quantitatieve uitspraak ten aanzien van het onderzochte monster (hoeveel knollen van het onderzochte monster zijn besmet?).
- er dient, ten behoeve van een beoordeling van het onderzoekstelsel, een validatiemethode aanwezig te zijn.
- uitslagen moeten, steekproefsgewijs, gecontroleerd kunnen worden met behulp van bijvoorbeeld uitplaten/IFC plus vetzuur-analyse, IFC-PCR of IMI-WB (Immunomagnetische concentratie gevolgd door Western blotting)
- het onderzoekstelsel dient aan de volgende eisen te voldoen:
  - routinematig toepasbaar op grote aantallen monsters;
  - uitvoerbaar binnen een routine-laboratorium;
  - betaalbaar.

De nu op routineschaal gebruikte ELISA is uiterst geschikt voor het verwerken van grote aantallen monsters. De relatie van de toetsuitslagen met symptomen in het veld na uitpoten is in een aantal gevallen niet duidelijk. Dit heeft enerzijds te maken met het niet tot expressie komen van het ziektebeeld in besmet materiaal en het feit dat momenteel alleen wordt getoetst op Eca en niet op Ech. In het veld is geen betrouwbaar onderscheid tussen Eca en Ech symptomen mogelijk. Anderzijds kunnen ook beperkingen in de toetsmogelijkheid hieraan debet zijn, waardoor mogelijk vals-negatieve ELISA-uitslagen kunnen vóórkomen.

Een vals-positieve ELISA uitslag wordt mogelijk veroorzaakt door:

- de sterke invloed van klimaat, weer en teeltcondities op de mate van symptoomexpressie (symptoomloze infectie, dus schijnbaar vals positieve reactie);
- een vals-positieve reactie met een kruisreagerend micro-organisme in het aardappelextract;
- het percentage vitale cellen kan op het moment van poten sterk afgenomen zijn (zelfs nul) doordat na contaminatie Eca of Ech zich niet in een geschikte niche van de knol kan vestigen. ELISA toont echter zowel levende als dode cellen aan.
- kruiscontaminatie bij verwerking.

Een vals-negatieve ELISA uitslag wordt mogelijk veroorzaakt door:

- De betrekkelijk geringe gevoeligheid van ELISA (ca  $10^6$  cellen per ml). Bij besmettingen met een nog relatief groot aantal vitale bacteriën op het moment van poten (gunstige niches) en/of gunstige milieuomstandigheden voor uitbreiding van het pathogeen kunnen toch symptomen optreden.
- het voorkomen van serotypen die niet met het homologe antiserum reageren (de aanwezigheid hiervan is in Nederland voor Eca en Ech (nog) niet aangetoond, maar wel vanuit het buitenland bekend).
- het feit dat niet wordt onderzocht op Ech of Ecc (het kan niet worden uitgesloten dat bepaalde Ecc stammen pathogeen zijn).
- monsternamen, monstergrootte en monsterinteractie.

Teneinde ELISA en andere serologische detectiemethoden naar waarde te kunnen schatten en beter inzetbaar voor de praktijk te maken, is het noodzakelijk vergelijkend onderzoek te doen met methoden waarmee het pathogeen geïsoleerd en 100% betrouwbaar geïdentificeerd kan worden. Een betrouwbaarder toetsresultaat kan worden verwacht met behulp van screening van het materiaal met een voldoende gevoelige serologische routinetoets, gevolgd door bevestiging van de serologisch positieve monster via speciale isolatie en identificatie.

Een apart probleem vormt de monstergrootte bij het knol-onderzoek.

Momenteel hanteert de NAK een systeem waarbij van alle S-waardige stammen (handelswaardig als S), en alle partijen van de (handels-)klasse SE, 24 knollen worden onderzocht. Wordt een bepaalde besmetting aangetroffen dan worden opnieuw 72 knollen onderzocht, waarbij (per 24 knollen) de zelfde norm wordt gehanteerd.

De te kiezen monstergrootte wordt bepaald door de keuze van het percentage besmette knollen dat men met een bepaalde betrouwbaarheid wil kunnen detecteren. Verder speelt een rol of men een methodiek hanteert die alleen levende bacteriën detecteert of ook versmering met dode bacteriën. In het

laatste geval zal men een kleiner monster kunnen kiezen. En tot slot is er het economische aspect.

Door de NAK wordt onderzoek uitgevoerd naar de optimale monstergrootte behorende bij een bepaalde toetsmethodiek.

#### Nieuwe detectiemethoden

Nieuwe methoden om kweekbare Eca of Ech cellen aan te tonen, gebaseerd op verrijking in selectieve media, zijn in ontwikkeling (geleidbaarheidsmetingen met behulp van Malthus, pectaatlyase detectie). Onderzoek naar de optimalisering en evaluatie van deze methoden loopt nog.

IFC in combinatie met isolatie/identificatie of met PCR blijkt goede perspectieven te bieden voor betrouwbare verificatie van het monster. Voor bevestiging van ELISA is immunomagnetische concentratie van 'oplosbaar' antigeen gevolgd door Western blotting (IMI-WB) bruikbaar. Onderzoek (FO) naar op de praktijk afgestemde optimale procedures is nodig en heeft prioriteit.

De praktijk heeft aangegeven behoefte te hebben aan een snelle identificatiemethode die in het veld een (voorlopige) uitspraak kan doen over de aanwezigheid van *Erwinia* spp. Gelet op ervaringen met testkits en de stand van zaken betreffende beschikbare technologie wordt de slagingskans voor een dergelijke methode gering geacht. Onderzoek (FO) heeft daarom lage prioriteit.

#### 5. Veredeling op resistentie

Veredeling op (partiële) resistentie tegen *Erwinia*-bacterieziekten lijkt in principe mogelijk, daar er verschillen in vatbaarheid tussen rassen zijn geconstateerd. Zo is er een interessante partiële resistentie tegen *Erwinia* gevonden in onder meer *S. brevidens*. Voor een effectieve resistentie moet zowel de knol als de stengel resistent zijn. Een noodzakelijk hulpmiddel bij de veredeling is een deugdelijke toetsmethode. Hoewel er talrijke toetsmethoden in omloop zijn, is de bruikbaarheid hiervan in het algemeen beperkt. Recent onderzoek op CPRO-DLO heeft weliswaar tot enkele praktisch bruikbare methoden geleid, maar deze vergen een zodanig tijdsbeslag dat ze niet in een vroeg stadium van de veredeling als selectiemiddel kunnen worden gebruikt. Verder onderzoek (FO) is daarom nodig en heeft prioriteit. Enkele aardappelkweekbedrijven werken aan de ontwikkeling van (partieel) resistente rassen.

## 6. Preventie en bestrijding van bacterieziekten

### 6.1 Preventie

Door het ontbreken van mogelijkheden voor bestrijding van bacterieziekten in het veld dient het accent te liggen op het ontwikkelen van strategieën voor: 1. het verkrijgen van zo schoon mogelijk uitgangsmateriaal (zie detectie) en 2. bedrijfshygiëne.

#### 6.1.1 *Schoon uitgangsmateriaal*

Voor het verkrijgen van zo schoon mogelijk uitgangsmateriaal zijn betrouwbare detectiemethoden essentieel. Hiermee moet in de eerste plaats het basispootgoed (stammen, S en SE) worden getoetst. Een andere methode om de mate van besmetting van zowel basis- als gebruikspootgoed te beperken is wellicht het verkorten van de vermeerderingscyclus met behulp van snelle vermeerderingstechnieken. Gebruik van in-vitroplantjes en mini-knollen lijken hiervoor het meest in aanmerking te komen. Hiermee kan men in 4-5 jaar gebruikspootgoed produceren tegen ca 8 á 9 jaar bij de traditionele vermeerdering op basis van stammen. In de praktijk is tot nu toe echter nog niet gebleken dat snelle vermeerdering van pootgoed de Erwinia-situatie verbetert.

#### 6.1.2 *Bedrijfshygiëne*

Bedrijfshygiëne vormt de basis van een goede preventieve bestrijding. Voor wat betreft het pootgoed zijn handelingen als het voor het poten verwijderen van rotte knollen en het vermijden van kiembreuk bijzonder belangrijk. Werktuigen die tijdens het groeiseizoen in aanraking komen met pootaardappelpflanzen, zoals bijvoorbeeld looftrekkers dienen schoon op het veld te komen. Het verwijderen van moederknollen - zo mogelijk al op de rooimachine - en het beperken van beschadiging tijdens de oogst kunnen een belangrijke bijdrage leveren aan een preventieve bestrijding. Ook sorteerapparatuur, in het bijzonder de zeven, moeten zo mogelijk worden gereinigd alvorens een volgende partij wordt gesorteerd. Een goede bedrijfshygiëne is verder vereist bij handelingen als snijden en wassen van pootaardappelen. (Zie ook de brochure 'Bedrijfshygiëne: basis voor een gezonde pootaardappelteelt').

### 6.2 Bestrijding

#### 6.2.1 *Warmwaterontsmetting van pootgoed*

Warmwaterbehandeling van pootgoed lijkt bij de geringe besmettingsniveaus



in Nederland niet zinvol.

### 6.2.2 Chemische ontsmetting

Onderzoek naar bactericiden (andere dan antibiotica) om verspreiding van deze pathogenen van besmette knollen naar gezond pootgoed te voorkomen, bijvoorbeeld bij wassen van het pootgoed, heeft aangetoond dat er geen 100% werkzame middelen beschikbaar zijn. Wel kunnen stoffen als calciumhypochloriet, chloordioxide en perazijnzuur de knolinfectie met *Erwinia* spp. met ca 50% reduceren.

Bij nog lopend onderzoek, waarbij wordt nagewassen met een 1% calciumhypochlorietoplossing bleek dit middel het optreden van *Erwinia*-rotte knollen met 80% te beperken.

Daar het wassen van pootaardappelen de komende jaren zal toenemen blijft aandacht voor effectieve ontsmettingsmiddelen gewenst. Verder onderzoek is echter pas zinvol als er bruikbaar lijkende ontsmettingsmiddelen worden aangeboden. (PO - prioriteit).

### 6.2.3 Biologische bestrijding

Bacterisatie van pootgoed met antagonistische bacteriën (onder ander siderofoor producerende fluorescerende *Pseudomonas* soorten) hebben tot nu toe wisselende resultaten opgeleverd. Het nuttig effect dat hierdoor ontstaat lijkt, afhankelijk van de omgevingsfactoren, maar van betrekkelijk korte duur te zijn.

In Schotland wordt onderzoek gedaan naar de mogelijkheden genetisch gemanipuleerde niet-pathogene *Erwinia* spp. te gebruiken om door competitie een verlaging van de voor het pathogeen beschikbare niches te verkrijgen. Het nuttig effect van deze antagonisten zal sterk afhangen van de mogelijkheid zich voldoende lang actief in het milieu in stand te houden. De aanwezigheid van een geschikt substraat speelt hierbij een belangrijke rol. Absolute bestrijding kan hierbij niet worden verwacht, maar een verhoging van het ziekteverend karakter van pootgoed en grond kan een interessante optie zijn om de bacterie langer beneden een bepaalde drempel te houden.

Onderzoek naar mogelijkheden om *Erwinia* spp. te bestrijden met antagonisten (schimmels, bacteriën) in combinatie met groenrooien en weer onderdekken vindt thans plaats op IPO-DLO. Effectieve antagonisten zouden wellicht ook bij het poten en bij het inschuren van een op de gebruikelijke wijze geogst produkt kunnen worden toegepast om (poot)aardappelen in geval van knolbeschadiging tegen een *Erwinia*-besmetting te beschermen.

Bij IPO-DLO wordt verder onderzoek gedaan naar de mogelijkheid om het ziekteverende vermogen van grond te verhogen door met antagonisten verrijkte mest aan de bouwvoor toe te dienen. Hierbij kunnen de antagonisten, met een voor hen geschikt substraat, efficiënt door de bouwvoor verdeeld worden. Vanuit deze voedselrijke niches kan over een veel langere periode antagonistische activiteit verwacht worden, bijvoorbeeld om de infectiedruk

vanuit rotte moederknollen te beperken en voor het initiëren van een beschermende microflora op knol- en worteloppervlak. De eerste resultaten met antagonisten tegen *Rhizoctonia* in mestkorrels lijken veelbelovend. Er is nog geen onderzoek gedaan met antagonisten tegen bacterien.

In 1995 is op IPO-DLO onderzoek gestart naar de mogelijkheid om voortplantingsmateriaal (zaden, knollen, stekken) te inoculeren met zich in de plant vestigende antagonisten tegen pathogenen. Hierbij wordt ook aandacht besteed aan directe groeistimulatie van de plant. Deze zogenaamde endofyten zijn mogelijk tijdens de hele groeifase van de plant actief.

Onderzoek (FO en PO) naar de mogelijkheden van behandeling van pootgoed met antagonisten verdient een hoge prioriteit.

#### 6.2.4 *Selectie*

Het verwijderen van zieke planten, inclusief moeder- en dochterknollen, kan - zolang het gewas niet gesloten is - verspreiding tegengaan. Het grootste risico, de infectie van dochterknollen vanuit rotte moederknollen van symptoomloos geïnfecteerde planten, wordt hiermee niet weggenomen.

7. Samenvatting van de onderzoeksbehoefte op het terrein van de bestrijding van bacterieziekten

Hieronder volgt een overzicht van aandachtsvelden, waarvan nog onvoldoende kennis beschikbaar is.

Onderwerp	FO of PO	Hoge Prior.	Lage Prior.
Het tijdstip van weggroten van moederknollen	PO		x
Verspreiding bacterieziekten via aerosols	FO/PO		x
Verspeiding via selectie en sproeisporen	PO		x
Verspreiding bacterieziekten via insecten	FO		x
Rol tussenwaardplanten als besmettingsbron	PO/FO	x	
Rol beregeningswater als besmettingsbron	PO/FO		x
Rol machines en werktuigen als besmettingsbron	PO		x
Factoren en omstandigheden nodig voor infectie	FO	x	
Factoren die populatie-opbouw bepalen	FO		x
Effect bewaartemp./voorkiemen op popul.ontw.	FO/PO	x	
Effect berekening	PO		x
Effect selectie bact.zieke pl.op popul.ontw.	PO		x
Effect potermaat op besmetting dochterknollen	PO		x
Effect wassen van pootgoed	PO		x
Regelmatige inventarisatie van serotypen	FO	x	
Onderzoek naar RFLP's	FO		x
Onderzoek naar virulente stammen Ecc.	PO/FO		x
Onderzoek inzetbaarheid 'gene probes'	FO		x
Onderzoek toepasbaarheid DNA-hybridisatie/PCR	FO/PO	x	
Effect fysiologische staat pathogeen op gevoeligheid onderzoekstelsel	FO	x	
Onderzoek ter verhoging van gevoeligheid van bestaande serologische technieken	FO	x	
Onderzoek naar op praktisch afgestemde optimale procedures bij combin. van detectiemethoden	FO		x
Ontwikkeling van een veldidentificatiemethode	FO		x
Ontwikkeling van voor de veredeling bruikbare toetsmethoden			x
Onderzoek naar chemische ontsmetting tegen bacterieziekten	PO		x
Toepassing antagonist bij bestrijding	FO/PO	x	

Bijlage 1. Verklaring van gebruikte termen\*\*

Antigeen:	lichaamsvreemde stof, meestal eiwit of polysaccharide, die eenmaal terechtgekomen in de bloedbaan van een gewerveld dier, daarin eiwitten (antilichamen) doet ontstaan, die met de lichaamsvreemde stof specifiek reageren.
Antigene determinant:	moleculaire structuur met antigene werking aan het oppervlak van voor een meestal gewerveld dier lichaamsvreemde stof.
Antilichaam:	eiwit gevormd na infectie van een gewerveld dier of na inspuiting ervan met antigeen en specifiek reagerend met het antigeen.
Besmetten:	het al of niet opzettelijk in aanraking brengen of "verontreinigen" van planten, grond, ruimten, kleding, gereedschap en dergelijke met een parasiet (meestal ziekteverwekkend organisme of virus) of ander schadelijk agens en het hiermee overbrengen van een parasiet.
Detectie:	opsporing van een bekende ziekteverwekker of parasiet.
Diagnostiek:	herkenning van ziekten en beschadigingen aan de hand van de voorgeschiedenis en van de karakteristieke symptomen en zoveel mogelijk op grond van de veroorzaker of oorzaak.
Infecteren:	het op of in de waard belanden van een pathogeen en daar tot enigerlei parasitaire activiteit overgaand.
Kruisreactie:	reactie tussen verwante, maar niet identieke stoffen.
Pathogeen:	1. (zn.) Ziekteverwekker; Organisme of virus dat in staat is ziekte te verwekken; 2. (bn.) Ziekteverwekkend; in staat ziekte te verwekken.
Pathogenese:	de opeenvolging van processen die leiden tot ziekte, vanaf het eerste contact tussen ziekteverwekker en waard en de volledige ontwikkeling van het ziektebeeld (syndroom).
Pathogeniteit:	algeheel ziekteverwekkend (ziekmakend) vermogen van biotische of abiotische factor.
Primer:	kort stuk DNA of RNA fungerend als aangrijpingspunt voor het enzym DNA-polymerase bij de start van de synthese van een deoxynucleotide streng.
Probe:	klein fragment gemerkt DNA of RNA dat kan binden aan fragmenten van doel-DNA of -RNA met complementaire sequenties.
Serotype:	binnen de soort een groep waarvan de individuen serologisch identiek zijn.
Virulentie:	vermogen van een pathogeen om ziekteverschijnselen te doen ontstaan.

\*\* Volgens "Lijst van gewasbeschermingskundige termen" Gewasbescherming 16 (december 1985) Supplement nr. 1 en ABC Biotechnologie 1994, TNO-Biotechnologie, Zeist