

Project Bacterievrije pootgoedteelt - een uitdaging!

2005 - 2008

Eindrapport van het onderzoek

Henk Velvis en Jan van der Wolf

December 2008



Het project 'Bacterievrije pootgoedteelt - een uitdaging!' werd financieel mogelijk gemaakt door de volgende organisaties:

Hoofd Productschap Akkerbouw



Interpolis Agro



Landbouw Innovatie Noord-Brabant



Nederlandse Aardappel Organisatie



Provincie Flevoland



Rabobank



Samenwerkingsverband Noord-Nederland
(Compassubsidie Uitvoeringsprogramma
Innovatie Landbouw Noord-Nederland)



Inhoudsopgave

	blz.
1. Inleiding	4
2. Initiële besmetting	5
2.1 Uitgangsmateriaal	5
2.2 Oorzaken initiële besmetting	5
2.3 Risicofactoren voor initiële besmetting	6
2.3.1 Overleving van Erwinia in grond	7
2.3.2 Introductie via loofbeschadiging	7
2.3.3 Introductie via de wortels	8
2.4 Conclusies Initiële besmetting	9
3. Populatieopbouw	10
3.1 Ontwikkeling van de ziekte bij verschillende aanvangsbesmettingen	10
3.2 Dynamiek van moederknolrot	11
3.3 Looftrekken versus loofklappen	13
3.4 Verspreiding van besmette naar schone planten in het veld	13
3.5 Versmering via loofdoding	14
3.6 Versmering via rooimachines	15
3.7 Overleving van Erwinia op de knol na versmering	16
3.8 Invloed van bewaaromstandigheden	18
3.9 Conclusies Populatieopbouw	19
4. Bestrijding	21
4.1 Ontsmetting	21
4.2 Sanitatie	22
4.3 Conclusies Bestrijding	23
5. Detectie	24
5.1 Methoden	24
5.2 Discrepanties tussen ELISA en PCR	24
5.3 Voorspellende waarde van de Erwinia toets	25
5.4 Conclusies Detectie	26
6. Samenvatting en aanbevelingen	28
7. Rapporten vooronderzoek project	31

1. Inleiding

In 2005 is op initiatief van de aardappelpootgoedsector een project gestart onder de prikkelende titel 'Bacterievrije pootgoedteelt - een uitdaging!'. Achtergrond waren de toenemende problemen met bacterieziek, oftewel Erwinia, tijdens de vermeerdering van het basispootgoed. Voorafgaand aan dit project was een literatuurstudie verricht omtrent de hele Erwinia problematiek (van der Wolf, 2004). Verder was er in 2004 een enquête gehouden onder een groot aantal pootgoedtelers, waarin getracht werd een beeld te krijgen van de oorzaken van de relatief ernstige problemen met bacterieziek die zich hadden voorgedaan in 2003 (Aalbers, Douma en Meuffels, 2004). Als vervolg hierop werd een sectorbreed project geëntameerd, met als doel meer inzicht te krijgen in en beheersen van de Erwinia problemen tijdens de teelt van pootgoed, en het meetbaar en inzetbaar maken van de resultaten van het onderzoek voor de praktijk. Als subdoelen werden geformuleerd: (1) beter inzicht te krijgen in de oorzaak van initiële besmettingen van schoon pootgoed, (2) beter inzicht te krijgen in de populatieopbouw en symptoomexpressie van de bacterie, (3) de mogelijkheden te onderzoeken van pootgoedontsmetting of bescherming hiervan met antagonistische bacteriën, en (4) de systematiek voor keuring en laboratoriumtoetsen te evalueren en verbeteren.

Voor de uitvoering van het project werd één full-time onderzoeker aangesteld, met als standplaats het laboratorium van HZPC-Research in Metslawier. Een klein deel van het project, met name v.w.b. toetsontwikkeling, werd uitbesteed aan Plant Research International (PRI) te Wageningen.

In dit rapport wordt een verslag in hoofdlijnen geboden van het uitgevoerde onderzoek. Als leidraad gelden de hierboven genoemde subdoelen, afgekort: *Initiële besmetting*, *Populatieopbouw*, *Bestrijding*, en *Detectie*. Het rapport wordt afgesloten met een samenvatting van de resultaten en aanbevelingen voor verder onderzoek. De lezer die slechts een "helicopter-view" over de resultaten van het project wil, zij verwezen naar het hoofdstuk *Samenvatting en aanbevelingen* aan het eind.

Voor de verschillende Erwinia types worden in dit rapport de oude benamingen gebruikt. We onderscheiden drie types: *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (afgekort Eca), *Erwinia chrysanthemi* (afgekort Ech), en *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (afgekort Ecc). De eerste twee gelden als de veroorzakers van zwartbenigheid en stengelnatrot, de derde als veroorzaker van knolnatrot. Zeer recent is aangetoond dat ook bepaalde Ecc stammen zwartbeen verschijnselen kunnen veroorzaken. Het onderzoek is m.n. gefocused geweest op Ech, omdat dit in de laatste decennia de in Nederland meest voorkomende Erwinia soort gebleken is.

2. Initiële besmetting

Op een bepaald moment tijdens de vermeerdering van het basispootgoed, de stammenteelt, raakt pootgoed voor het eerst besmet met *Erwinia* bacteriën. De vragen waar het onderzoek voor gesteld was waren: a. zit de besmetting al in het uitgangsmateriaal, b. zo nee, waar komt de bacterie dan vandaan en wat zijn de oorzaken van en risicofactoren op introductie tijdens vermeerdering.

2.1 Uitgangsmateriaal.

Als uitgangsmateriaal voor de stammenteelt worden de laatste jaren meestal miniknollen gebruikt. Door een aantal telers wordt ook nog steeds de traditionele stammenvermeerdering toegepast, waarbij uitgegaan wordt van één plant die getrokken wordt uit een schone meerderejaars stam.

In de vier achtereenvolgende jaren van het onderzoek is per jaar in een 25- tot 30-tal partijen miniknollen van verschillende rassen de besmetting met *Erwinia* bepaald. De eerste drie jaren zijn deze partijen alleen onderzocht op Eca en Ech, het laatste jaar ook op Ecc. De eerste twee *Erwinia* types kunnen met serologische methoden worden aangetoond, de laatste alleen met PCR (voor een korte beschrijving van methoden zie 5.1). In de partijen mini's werd geen *Erwinia* aangetroffen.

In 2006 is van totaal 165 uitgangsstammen van drie rassen, Desiree, Kondor en Spunta, afkomstig van veertien traditionele stammentelers eveneens *Erwinia* bepaald (Eca en Ech). Ook hierin kon geen besmetting worden gevonden.

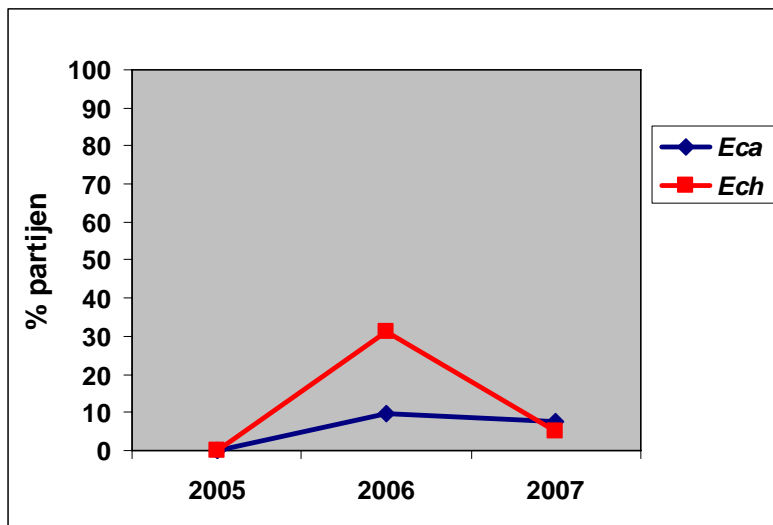
Op basis van dit onderzoek wordt geconcludeerd dat het uitgangsmateriaal schoon is.

2.2 Oorzaken initiële besmetting.

In 2005 is een onderzoek gestart bij ruim vijftig telers die in dat jaar miniknollen van de rassen Desiree, Kondor en Spunta hadden gepoot (04V stammen). De bedoeling was om na te gaan welke teeltomstandigheden of teelthandelingen in de praktijk van de pootgoedteelt bepalend zouden kunnen zijn voor de eerste infectie met *Erwinia*. Van drie veldvermeerderingen zijn knollen onderzocht op besmetting met *Erwinia* (Eca en Ech). Verder ontvingen de telers elk jaar een formulier waarop ze een groot aantal teeltgegevens over het betreffende jaar konden invullen. Helaas werden de formulieren niet altijd door de telers weer ingeleverd, of ontbraken er diverse gegevens. Ook werd in diverse gevallen geen knolmonster ontvangen, soms omdat de partij al was afgevoerd vanwege afkeuring op bacterie, hoewel gevraagd was om juist ook dan een monster te leveren.

Monsters werden in eerste instantie geanalyseerd met de verrijkings-ELISA methode, en vervolgens nagecheckt met PCR (zie 5.2). In Figuur 1 is het verloop van het aantal partijen met *Erwinia* besmetting weergegeven.

Figuur 1. Verloop van het aantal partijen met *Erwinia* besmetting van drie veldvermeerderingen van vitro stammen.



In het eerste jaar werd nog geen besmetting aangetoond. In de oogst van de tweede veldvermeerdering is bij eenendertig procent van de onderzochte partijen besmetting met Ech gevonden. Het daarop volgende jaar lag dit veel lager, op vijf procent. Voor Eca waren de percentages respectievelijk tien en acht procent. Bij de derde veldvermeerdering waren het overigens niet steeds dezelfde telers waar een besmetting werd gevonden als bij de tweede veldvermeerdering. Een statistische analyse van de besmettings- en teeltgegevens over de tweede veldvermeerdering leverde geen significante factoren op die de waargenomen eerste besmetting in dat jaar zouden kunnen verklaren.

Uit de resultaten val het volgende te concluderen: (a) al vroeg in de vermeerdering vanuit miniknollen wordt bij een aanzienlijk aantal partijen besmetting met *Erwinia* gevonden, (b) het verloop is grillig, (c) er zijn nog geen factoren gevonden die bepalend waren voor de eerste besmetting, (d) om de oorzaken van initiële infectie te achterhalen is een veel nauwkeuriger monitoring op de bedrijven noodzakelijk dan nu kon worden gerealiseerd.

2.3 Risicofactoren voor initiële besmetting.

Er is een aantal invalspoorten denkbaar waardoor *Erwinia* een schoon gewas zou kunnen binnenkomen. Enkele voor de hand liggende en veelgenoemde zijn in het project nader onderzocht. Zo wordt regelmatig de vraag gesteld of *Erwinia* in de grond kan overleven. Verder wordt vaak genoemd de versleping van infectie vanuit een besmet perceel naar een schoon perceel. Dat zou kunnen via machines/voertuigen, via kleding of schoeisel, of zelfs via overwaaiende aerosolen (minuscule waterdruppeltjes). De vraag is of dergelijke introducties daadwerkelijk kunnen leiden tot besmetting van het gewas en van de dochterpartij.

2.3.1 Overleving van Erwinia in grond

In het verleden is aangetoond dat *Erwinia* die in een waterige suspensie aan grond wordt toegevoegd, slechts een aantal weken kan overleven. Niet bekend is hoe het staat met de overleving in gewasresten waarin *Erwinia* zich wellicht in beschermde niches zou kunnen handhaven. In 2007 en 2008 is onderzocht of overleving in loofresten gedurende langere tijd optreedt. Netzakjes met natuurlijk besmette stengelfragmenten werden ingegraven in het veld. Vervolgens werden deze op verschillende tijdstippen weer opgegraven en onderzocht op besmetting met *Erwinia*. Het bleek dat de dichtheid aan *Erwinia* gedurende de winterperiode geleidelijk afnam. In het voorjaar konden met IFC echter geen levende *Erwinia* bacteriën in de stengelfragmenten meer worden aangetoond (voor een korte beschrijving van de IFC methode zie 5.1).

In een parallelle proef werden stengelresten die besmet waren met antibioticum-resistente merkerstammen van Eca en Ech, en stengelresten met een natuurlijke *Erwinia* besmetting vóór de winter in aardappelruggen ingegraven. In het voorjaar daarop werden miniknollen in de ruggen gepoot. Vervolgens werd het gewas beoordeeld op aantasting, en werden gerooide dochterknollen geanalyseerd op besmetting met *Erwinia*. Aantasting werd niet gevonden. Wel bleken de dochterknollen van enkele planten in het gedeelte waar natuurlijk besmette resten waren ondergegraven besmet met Ech. Overleving van *Erwinia* gedurende één winterperiode kan dus niet worden uitgesloten. Overleving gedurende een hele vruchtwisselingsperiode lijkt echter zeer onwaarschijnlijk.

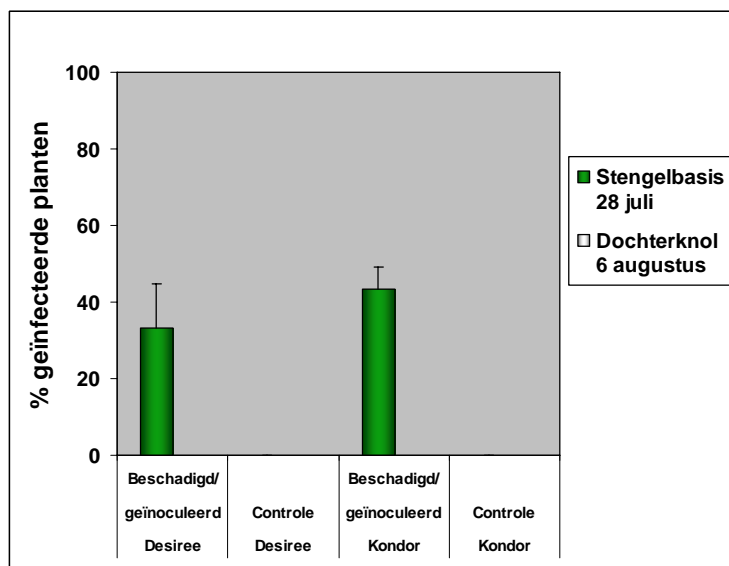
2.3.2 Introductie via loofbeschadiging.

In de jaren 2006, 2007 en 2008 zijn proeven uitgevoerd waarin is onderzocht of een infectie van *Erwinia* via beschadiging van het loof tijdens de gewasgroei, de plant en ook de dochterknollen zou kunnen besmetten. In het eerste jaar werd het loof beschadigd met een mechanische loofbeschadiger, en vervolgens werd *Erwinia*, een nalidixine-resistente stam van Ech, over het verwonde weefsel verneveld. De bacterie kon later niet worden aangetoond in stengelbasis of dochterknollen van de planten (rassen Desiree en Kondor). De weersomstandigheden tijdens de behandeling en daarna waren echter zeer warm en droog. In het tweede jaar werd de bacterie aangebracht op het wondvlak van geknakte stengels van dezelfde rassen. Transport naar de stengelbasis kon wel worden aangetoond, maar niet naar de dochterknollen. Ook in de controleveldjes bleek veel infectie van vooral de dochterknollen aanwezig. Niet uit te sluiten viel dat er transport via de grond van de behandelde naar de controle veldjes had plaatsgevonden. De proef werd daarom in 2008 nogmaals op dezelfde manier herhaald, maar nu met partijen miniknollen als pootgoed, en met een ruimtelijke scheiding van behandelde en controle veldjes. Ook nu kon wel transport naar de stengelbasis maar niet naar de dochterknollen worden aangetoond (Figuur 2). In twee kasproeven bij PRI in Wageningen waarbij stengels werden geïnfecteerd met een Ech stam die gemerkt was met

een groen fluorescerend label (gfp-mutant), werd echter behalve in de stengelbasis ook besmetting van stolonen en dochterknollen gevonden.

Uit dit onderzoek wordt geconcludeerd dat besmetting via loofbeschadiging tijdens het groeiseizoen een reëel risico is, dat zoveel mogelijk moet worden vermeden.

Figuur 2. Besmetting van stengelbasis en dochterknollen na infectie met Erwinia via de beschadigde stengel.

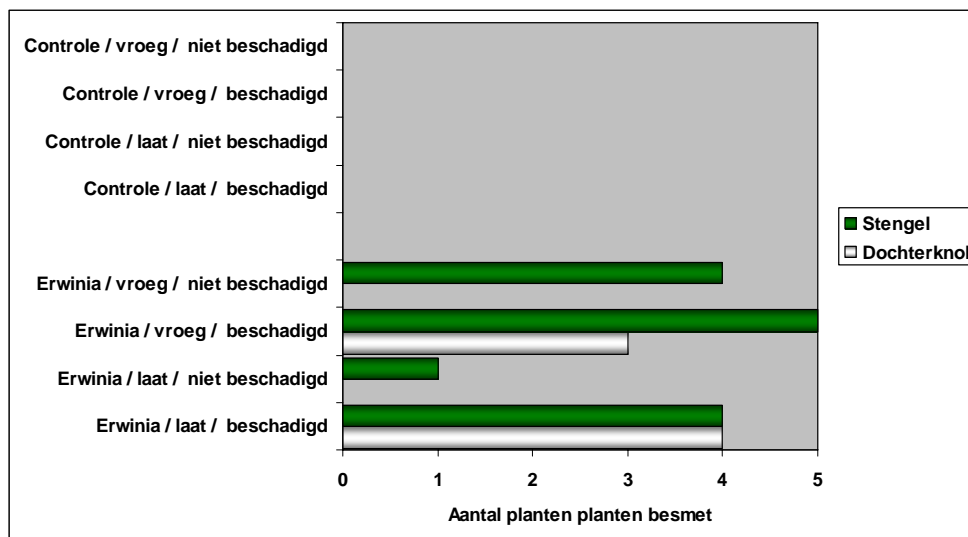


2.3.3 Introductie via de wortels

Het risico op infectie van schone planten via het wortelstelsel is onderzocht in een kasproef in 2008. Aardappelplanten werden opgekweekt uit miniknollen (Kondor). Besmetting met *Erwinia* werd uitgevoerd door de grond onder de pot op twee tijdstippen te infiltreren met een streptomycine-resistente stam van Ech. De behandeling vond plaats vóór en tijdens de knolvorming, respectievelijk 22 en 48 dagen na poten ('vroeg' en 'laat'). De wortelstelsels werden bij deze behandelingen al of niet beschadigd. Vervolgens werd 75 dagen na het poten de inwendige infectie van bovengrondse stengels en dochterknollen met Ech bepaald. In controles zonder *Erwinia* behandeling kon geen besmetting van stengels of knollen worden aangetroffen (Figuur 3). In de wel met Ech behandelde potten trad bij beide behandelstippen besmetting van de bovengrondse stengel op. Bij beschadigd meer dan bij niet beschadigd, en bij vroeg meer dan bij laat. Bij de vroeg behandelde waren er enkele planten met duidelijke ziektesymptomen. Besmetting van dochterknollen werd alleen bij de beschadigde planten gevonden. Ook de resultaten van deze proef werden bevestigd in een onderzoek bij PRI met een reeks planten uit de kasproef bij HZPC-Research, waarin de grond werd besmet met de gfp-mutant van Ech. De fluorescerende bacteriën waren zichtbaar aanwezig (microscopisch) binnen in wortels en stengels van planten waarvan de wortelstelsels niet beschadigd waren.

Uit deze experimenten blijkt dat de infectie van de plant door *Erwinia* weliswaar sneller plaatsvindt na beschadiging van het wortelstelsel, maar dat er ook zonder beschadiging kolonisatie van de plant optreedt. Dat betekent dat er ook in het veld een reëel risico bestaat op infectie van planten via de wortels, hetzij vanuit besmette buurplanten, hetzij via besmettingen die op andere wijze in het bodemvocht terechtkomen.

*Figuur 3. Infectie van de aardappelplant met *Erwinia chrysanthemi* via het wortelstelsel, al of niet na beschadiging van de wortels*



2.4 Conclusies Initiële besmetting

Samenvattend kunnen uit het onderzoek naar initiële besmetting de volgende conclusies worden getrokken:

- In partijen miniknollen en in uitgangsstammen voor de traditionele stammenteelt kon geen besmetting met *Erwinia* worden aangetoond.
- Al in de tweede veldvermeerdering vanuit miniknollen treden veelvuldig besmettingen met *Erwinia* op.
- De oorzaken van deze vroege besmetting konden nog niet worden achterhaald.
- *Erwinia* blijkt in stengelresten langer te kunnen overleven in grond dan aanvankelijk gedacht. Overleving gedurende een hele vruchtwisselingsperiode is echter uiterst onwaarschijnlijk.
- Uit veld- en kasexperimenten blijkt dat schone aardappelplanten via stengel- en wortelbeschadigingen besmet kunnen raken met *Erwinia*. *Erwinia* is zelfs in staat onbeschadigde wortels binnen te dringen. Nader onderzoek moet uitwijzen of dit ook in de praktijk invalspoorten zijn waardoor initiële infecties tot stand komen.

3. Populatieopbouw

Als een partij eenmaal latent besmet geraakt is met *Erwinia*, kan de ernst van de bacterieziekte zich vervolgens zodanig uitbreiden dat de partij in het volgende jaar of het jaar daarop moet worden afgekeurd. Deze uitbreiding van de bacteriepopulatie kan door verschillende factoren worden beïnvloed. Wat is het effect van de (latente) besmettingsgraad van de poter op de aantasting en op het proces van moederknolrot? Vindt tijdens de gewasgroei uitbreiding van besmette naar schone planten plaats? Leidt een laat proces van moederknolrot tot meer problemen in het volgend seizoen? Kun je het gewas laten 'uitzielen'? In wat voor mate zorgt versmering vanuit besmet loof of rotte (moeder)knollen bij loofvernietiging en rooien tot vergroting van het probleem? Wat is de invloed van bewaaromstandigheden? Wat is het effect van stikstofbemesting en stadium van afrijping? Dit zijn vragen die, wellicht aangevuld met nog andere, de toename van het bacterieprobleem raken. Een aantal van deze vragen is gedurende het project in veldproeven onderzocht. Daarbij moesten keuzes worden gemaakt. De invloed van stikstofbemesting en afrijping heeft nog onvoldoende aandacht gehad. De verschillende experimenten worden hieronder beschreven.

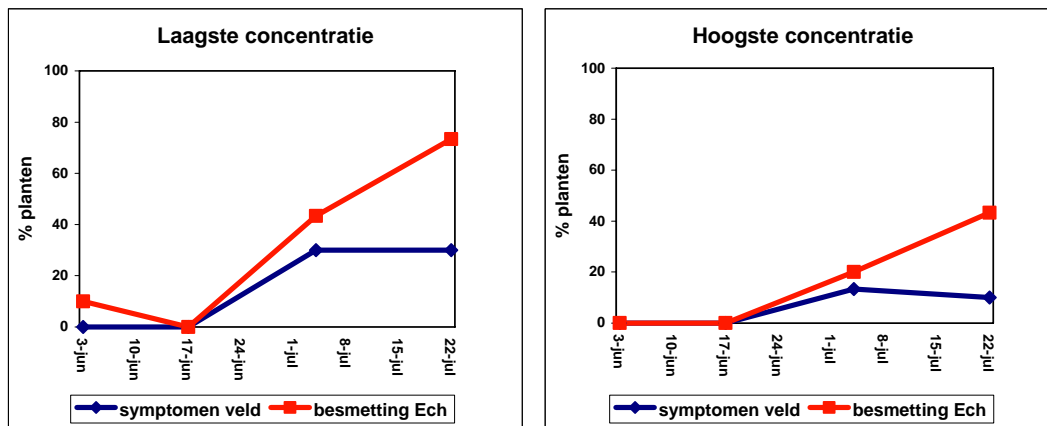
3.1 Ontwikkeling van de ziekte bij verschillende aanvangsbesmettingen.

In de eerste twee jaren van het project is onderzoek gedaan naar het infectieproces en het verloop van de moederknolrot bij verschillende niveaus van aanvangsbesmetting op de poter. Verschillende aanvangsbesmettingen werden verkregen door de poters via vacuïminfiltratie te infecteren met verschillende dichtheden van antibioticumresistente stammen van *Erwinia*. De aantasting en de mate van besmetting van de planten werd gedurende het seizoen intensief gevolgd. In het eerste jaar werd de proef uitgevoerd met één aardappelras (Kondor) en twee *Erwinia* stammen (Eca en Ech), in het tweede jaar met twee aardappelrassen (Desiree en Kondor) en één *Erwinia* stam (Ech).

In beide jaren bleek de aantasting pas goed op gang te komen na een periode met zeer warm weer. De ernst van de aantasting en de mate van besmetting van de planten leek voor Ech niet afhankelijk van de concentratie van de bacterie op de poter. In het eerste jaar lagen deze bij de laagste poterbesmetting zelfs hoger (figuur 4). Bij de met Eca behandelde planten gaf in dat jaar de hoogste poterbesmetting wel de meeste aantasting en besmetting.

Opvallend was het grote verschil tussen het aantal planten dat in het veld symptomen van bacterieziek liet zien en het aantal dat intern besmet bleek met de bacterie. Ook is gekeken naar de verdeling van de bacteriën over stengels, stolonen en dochterknollen. Hieruit bleek dat de stolonen en dochterknollen van de besmette planten al kort na aanleg geïnfecteerd raakten.

Figuur 4. Verloop van de aantasting en besmetting van Kondor planten in 2005, bij twee verschillende concentraties van poterbesmetting met Ech (vacuïminfiltratie)



De snelheid van weggroten van de moederknollen verschilde in het eerste jaar niet tussen behandelde planten en controles zonder Erwinia. In het tweede jaar trad er bij de hoogste concentraties wel wat meer rot op dan bij de controles, maar verliep het rottingsproces van de moederknollen (Kondor) ook veel trager dan in het eerste jaar.

Samengevat: (a) er is een groot verschil tussen aantal symptoomplanten en het aantal dat daadwerkelijk besmet is, (b) de mate van besmetting lijkt voor Ech meer te worden bepaald door voor Erwinia gunstige omstandigheden dan door de besmettingsgraad van de poter, voor Eca speelt de besmettingsgraad wel een rol, (c) de besmetting verspreidt zich al in een vroeg stadium naar de dochterknollen, (d) de snelheid van moederknolrot hangt sterk af van de klimatologische omstandigheden; besmetting met Erwinia had alleen in één van de twee jaren een licht effect op de snelheid van weggroten.

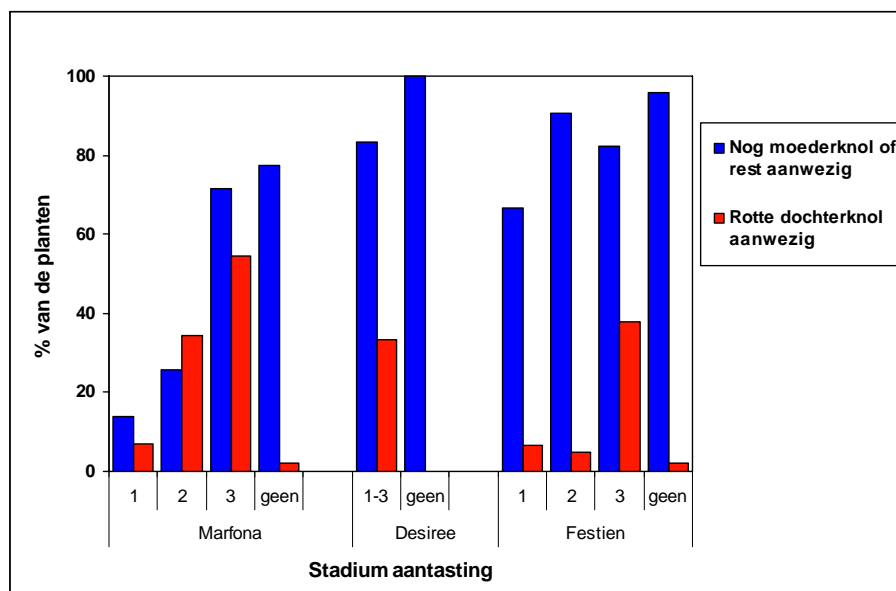
3.2 Dynamiek van moederknolrot

In de voorgaande proeven kon geen duidelijk effect van de besmetting met Erwinia op de moederknolrot worden gevonden. In de twee daaropvolgende jaren is veldonderzoek gedaan met een aantal natuurlijk besmette partijen pootaardappelen. In een deel van de poters is in het voorjaar de Erwinia besmetting van individuele knollen bepaald. De partijen zijn uitgepoot in het veld. Vervolgens zijn de aangetaste planten gemarkeerd op stadium van aantasting. Bij de rooi is van deze planten en van een aantal niet aangetaste planten de mate van weggroten van de moederknollen bepaald. Ook is bij de planten uit de individueel onderzochte poters vlak voor doodspuiten de besmetting van stengels en moederknollen met Erwinia bepaald.

In het eerste jaar kon vanwege zware Phytophthora aantasting geen reeks met stadia van Erwinia aantasting worden vastgesteld. De hier gepresenteerde gegevens hebben m.n. betrekking op het tweede jaar. De proef is in dat jaar uitgevoerd met besmette partijen van de rassen Desiree, Festien en Marfona. In Figuur 5 is het percentage teruggevonden

moederknollen weergegeven per stadium waarin de eerste aantasting van de planten was geconstateerd. De stadia waren als volgt: (1) van opkomst tot 20 juni, (2) 20 juni - 16 juli, en (3) 16 - 30 juli. Op 30 juli is het gewas volvelds doodgespoten. Ook is het percentage planten vermeld waarbij rotte dochterknollen werden gevonden.

Figuur 5. Teruggevonden moederknollen bij planten met verschillende stadia van aantasting, en planten waarbij rotte dochterknollen werden gevonden.



Duidelijk is de trend dat bij vroegere tijdstippen van aantasting de moederknol eerder verdwenen is (Marfona en Festien). Bij Desiree waren er te weinig aangetaste planten om in stadia in te delen. Wat verder opvalt is dat bij latere tijdstippen van aantasting ook meer rotte dochterknollen worden gevonden. Dit zou veroorzaakt kunnen zijn doordat bij zeer vroeg aangetaste stengels nog geen of weinig dochterknollen gevormd waren.

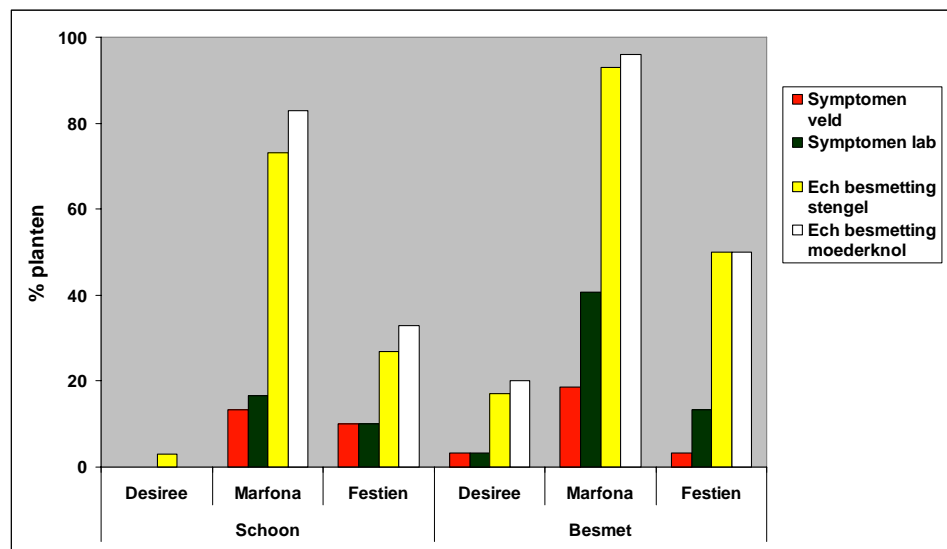
Van de planten waarvan de besmetting in de poter individueel bepaald is, werd de aantasting eveneens geregistreerd en is vervolgens vlak voor het doodspuiten de besmetting van stengels en moederknollen bepaald. De poters waarin geen *Erwinia* was aangetoond waren ruimtelijk gescheiden van de besmette poters uitgepoot. Al tijdens de beoordeling van het gewas bleken in de "schone" blokken toch veel aangetaste planten voor te komen. En ook bij de analyse van de besmetting van stengels en moederknollen bleek dat zowel in de besmette als in de "schone" blokken veel planten en moederknollen besmet waren (Figuur 6).

Bij de rooi in augustus bleek een nog hoger percentage van de teruggevonden moederknollen besmet met *Erwinia* dan vlak voor doodspuiten, ook bij planten waarbij geen aantasting was geconstateerd.

Uit dit onderzoek wordt geconcludeerd dat: (a) bij vroege aantasting de moederknol eerder is weggerot, (b) hoe later de aantasting hoe meer rotte dochterknollen, (c) ook hier is het aantal planten met latente besmetting weer veel hoger dan het aantal planten met symptomen, (d)

planten uit poters waarbij in het naveleind geen Erwinia was aangetoond, blijken toch vaak besmet; we missen kennelijk iets bij de analyse.

Figuur 6. Ziektesymptomen en latente besmetting van stengels en moederknollen in blokken met planten uit "schone" en "besmette" poters.



3.3 Loof trekken versus loofklappen

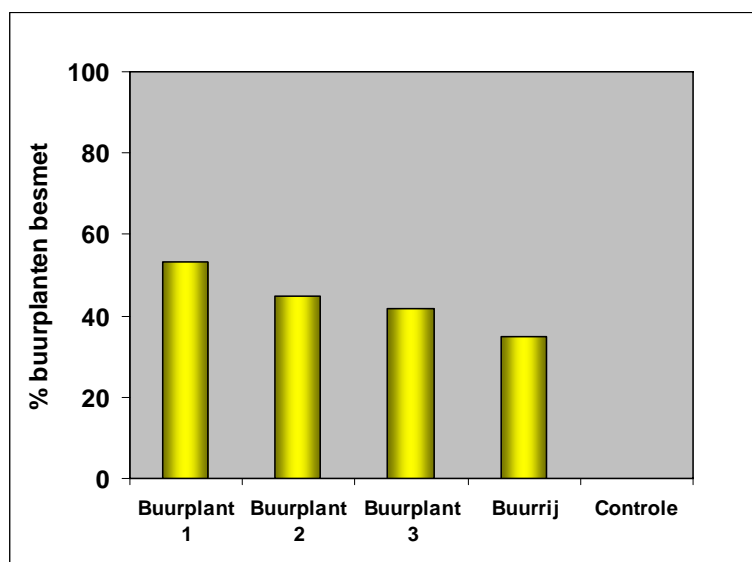
Collega's van Agrico hebben in 2008 een praktijkproef uitgevoerd waarbij gekeken is naar het verschil in effect van loofklappen en loof trekken in een perceel Diamant op de toestand van de moederknol op twee rootijdstippen. Bij loof trekken werden de moederknollen meer uit elkaar getrokken en waren eerder verdwenen dan bij klappen. Bij klappen bleef de rug intact en bleef het contact tussen rotte moederknol en dochterknollen langer gehandhaafd. Loof trekken lijkt daarom gunstiger om rotte moederknollen kwijt te raken. Verder onderzoek is nodig.

3.4 Verspreiding van besmette naar schone planten in het veld

In 2007 is een veldproef uitgevoerd waarin gekeken is naar de verspreiding van Erwinia van besmette planten naar genabuurde schone planten. Planten waarvan de poter vacuüm geïnfilteerd was met Erwinia (Ech) werden afgewisseld met planten uit miniknollen. Van een aantal planten met duidelijke symptomen werden in augustus de buurplanten geroid. Op de dochterknollen hiervan werd de aanwezigheid van Erwinia bepaald. Het bleek dat Erwinia tot op de derde buurplant in dezelfde rij en ook op de buurplant in de rug ernaast kon worden aangetoond (Figuur 7). Aanvankelijk was het de bedoeling om dit proces bij een natte en een droge variant te bestuderen. Dat kon vanwege de te natte zomer niet worden gerealiseerd.

Uit deze proef blijkt dat een besmetting met *Erwinia* zich al tijdens het groeiseizoen kan uitbreiden over het perceel.

Figuur 7. Besmetting met Erwinia (Ech) op de schil van buurplanten van door Erwinia aangetaste planten in het veld.



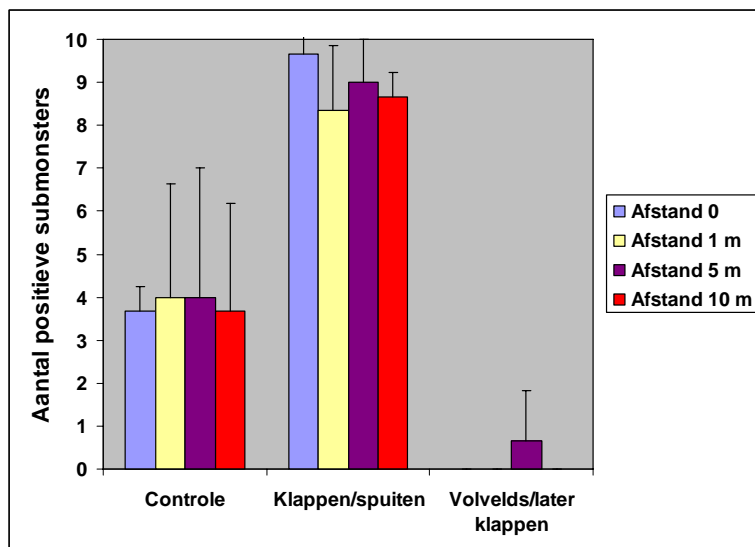
3.5 Versmering via loofdoding

De mate van versmering van *Erwinia* bij loofdoding werd bestudeerd in een veldproef, waarbij een met *Erwinia* (*Ech*) besmette strook planten was aangebracht. De proef is uitgevoerd met een moedwillig aangebrachte strook met *Ech* vacuüm geïnfiltreerde poters in een perceel Desiree S pootgoed. De proef werd aangelegd met de varianten (1) klappen/spuiten zonder besmette strook (Controle), (2) klappen/spuiten mét besmette strook (KS), en (3) volvelds spuiten / na 2 weken klappen, eveneens mét besmette strook. Met de loofklapper werd eerst door de besmette strook gereden. Vervolgens werden direct na het klappen monsters van loofresten genomen op verschillende afstanden achter deze strook. Het doodspuiten bij de Controle en de KS varianten gebeurde direct na het nemen van de geklapte loofmonsters. In de loofresten werd *Erwinia* bepaald. Drie weken na klappen / spuiten werden ook knolmonsters genomen achter de besmette strook, om te bepalen of er inspoeling van *Erwinia* had plaatsgevonden.

De uitkomsten van de analyses laten zien dat ook het loof van de Controles niet vrij was van *Erwinia* (Figuur 8). Niettemin lag de besmetting in de KS variant wel significant hoger. Monsters zijn genomen tot een afstand van tien meter achter de besmette strook. Er lijkt geen afname van besmetting in dit traject plaats te vinden. In de resten van het veertien dagen na spuiten geklapte loof werd slechts sporadisch besmetting aangetoond. Dat betekent dat de besmetting in het doodgespoten loof in die periode drastisch afgenomen is.

Op de schil en in de navelinden van gerooide knollen op 1 meter achter de besmette strook kon geen verhoging van de Erwinia besmetting in vergelijking met de Controle worden gevonden.

Figuur 8. Besmetting van loofresten na loofklappen op verschillende afstanden achter een met Erwinia (Ech) besmette strook.



De proef was zo aangelegd dat op een deel van het veld na klappen en spuiten extra kon worden berekend om inspoeling te bevorderen. Door het natte weer in de periode na klappen kon dit verschil tussen nat / droog niet worden gerealiseerd.

Uit de proef valt te concluderen: (a) dat er een aanzienlijke versmering van Erwinia plaatsvindt door loofklappen, tot tenminste 10 meter achter een strook met besmette planten, (b) er bij klappen veertien dagen na volvelds spuiten weinig Erwinia meer in de loofresten wordt gevonden, en versmering daarmee wordt voorkomen, (c) dat inspoeling vanuit de versmeerde loofresten naar de dochterknollen niet kon worden aangetoond.

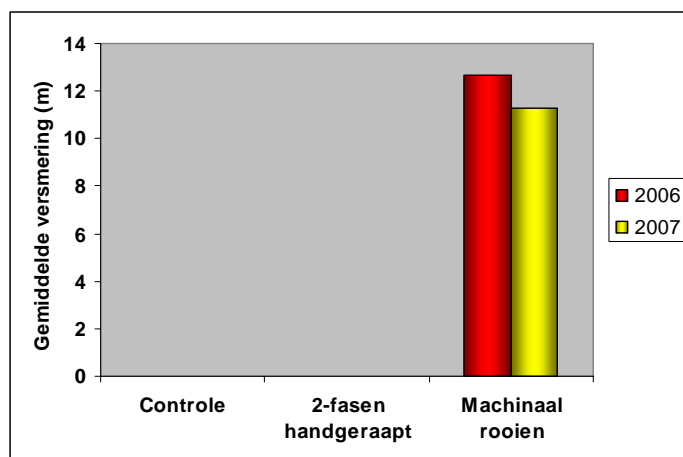
3.6 Versmering via rooimachines

In het tweede en derde jaar van het project is onderzoek gedaan naar de versmering die optreedt bij het rooien. In deze proeven werd vlak voor het rooien een strook met rotte Erwinia knollen aangebracht in een perceel Agria's. De knollen waren vooraf rot gemaakt met een antibioticumresistente stam van Ech. Met rooimachines werd door de besmette strook heengeroid, en op een aantal afstanden achter de besmette strook werden gerooide knollen bemonsterd. De volgende verschillende rooimethoden werden toegepast: (1) handmatig rooien, (2) 2-fasen rooi, waarbij met een voorraadrooier werd opgeroid en vervolgens na een uur drogen met de hand geraapt, (3) 2-fasen rooi, waarbij in de tweede fase machinaal werd geraapt met een axiaalrooier (alleen in 2006), (4) een rooimachine met zeefband, (5) rooimachine met axiaalset, (6) idem, maar nu met toepassing van een ontsmetting op de

rooiband (vernevelen van halamid met een rugspuit, alleen in 2007). De uitwendige besmetting met *Erwinia* werd bepaald in schudextracten van de knollen.

De afstanden waarop versmering met *Erwinia* werd aangetoond varieerden nogal. Bij de handmatig gerooide en bij de 2-fasen rooi met handmatig rapen werd in beide jaren geen versmering geconstateerd (Figuur 9). Bij alle varianten waarin machinaal werd gerooid trad versmering op, zonder duidelijk verschil tussen rooimachines. Ook de toegepaste ontsmetting had geen effect. Gemiddeld werd tot 10 - 12 meter achter de strook met rotte knollen besmetting met *Erwinia* gevonden. In het eerste jaar zelfs met een uitschieter van 80 meter bij één van de herhalingen.

Figuur 9. Versmering van Erwinia (Ech) bij verschillende rooimethoden.



Uit de proeven met versmering via rooimethoden kan worden geconcludeerd dat: (a) er door machinaal rooien een aanzienlijke versmering van *Erwinia* optreedt, tot gemiddeld meer dan tien meter achter een 'haard' met rotte knollen, (b) het niet veel uitmaakt wat voor soort rooimachine gebruikt wordt, (c) de enige uitzondering hierop is het oprooien met een voorraadrooier en vervolgens na drogen handmatig rapen, waarmee de kans op versmering behoorlijk kan worden gereduceerd, (d) ontsmetten via vernevelen van een ontsmettingsmiddel op de rooimachine weinig zin lijkt te hebben.

3.7 Overleving van *Erwinia* op de knol na versmering

In de proeven met versmering via rooimethoden is aangetoond dat *Erwinia* tijdens machinaal rooien over een behoorlijke afstand kan worden versmeerd. In aanvullend onderzoek is gekeken naar de handhaving van *Erwinia* op of in de schil van de aardappelknollen.

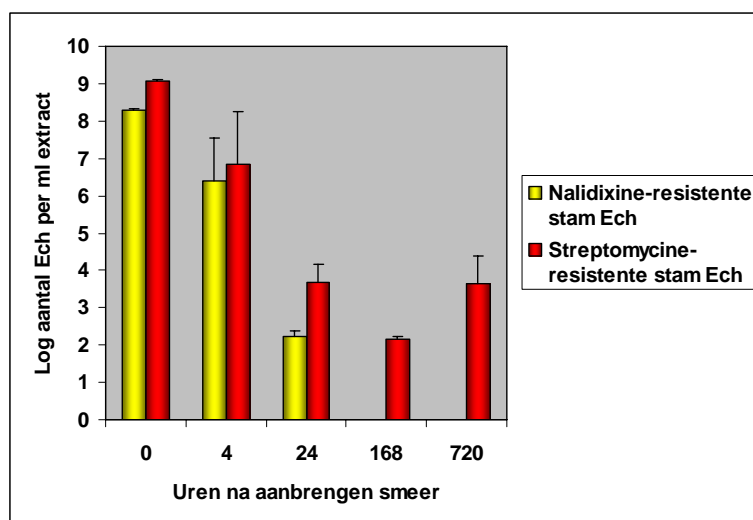
In 2007 is een experiment ingezet waarbij de schil van pasgerooiden knollen (Desiree) al of niet werd beschadigd en de knollen vervolgens gedompeld in een suspensie van de nalidixine-resistente stam van *Ech* die ook in de voorgaande proeven meestal gebruikt was. De knollen werden bij lage of hoge luchtvochtigheid in de bewaring gezet. Dezelfde behandelingen werden ook uitgevoerd op knollen die zes weken lang in de bewaring waren

gezet om verder af te harden. In het voorjaar, vlak vóór het poten, kon op de schil slechts zeer incidenteel nog levende *Erwinia* worden aangetoond. De knollen zijn uitgepoot in het veld. Tijdens het groeiseizoen werd geen aantasting geconstateerd. In de nateelt werd slechts bij één van de herhalingen een besmetting met Ech gevonden. De conclusie uit deze proef is dat (de gebruikte stam van) Ech slechts incidenteel de bewaring heeft overleefd en zich ook in de nateelt handhaaft. Over effect van beschadiging en vochttoestand tijdens bewaring kan (nog) geen uitspraak worden gedaan.

In 2008 is een proef uitgevoerd waarbij rot knolweefsel op de schil van aardappelknollen werd aangebracht. Onderzocht werd hoe lang *Erwinia*, na drogen van deze smeer van rot knolmateriaal, op de schil overleeft. Rot knolmateriaal werd geproduceerd m.b.v. twee antibioticum-resistente stammen van Ech, de in voorgaande proeven veelal gebruikte nalidixine-resistente stam en een nieuwe streptomycine-resistente stam die ook gebruikt werd in de proef met infectie via wortelbeschadiging (zie 2.3.5). De overleving werd bepaald middels tellingen op een selectief medium met de antibiotica.

Het aantal *Erwinia*'s in de gedroogde smeer neemt na drogen drastisch af (Figuur 10). De nalidixine-resistente stam wordt nog tot 24 uur aangetoond, daarna niet meer. De streptomycine-resistente stam blijkt zich na één maand (720 uur) te hebben gehandhaafd op het aantal dat ook na 24 uur werd geteld.

Figuur 10. Overleving van *Erwinia* (Ech, 2 stammen) in rot knolmateriaal op schil.



Ook bij het rotmaken van het knolmateriaal vertoonde de streptomycine-resistente stam een sterkere aantasting dan de nalidixine-resistente stam.

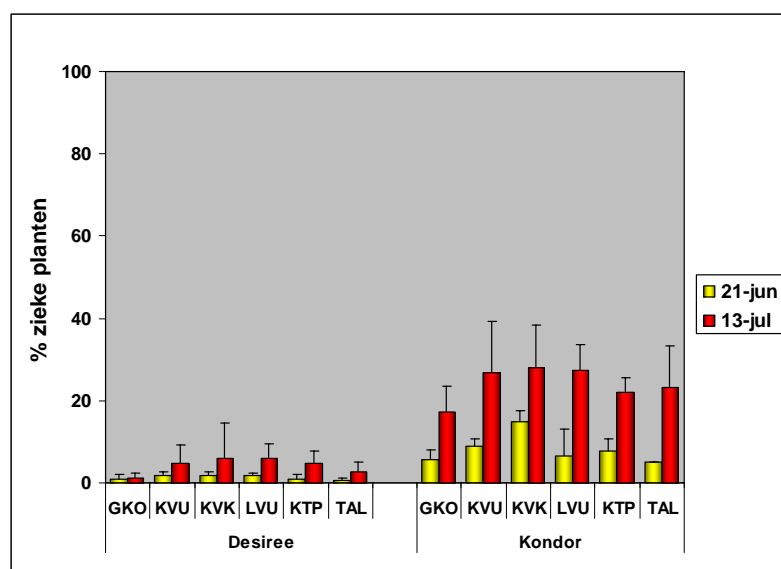
Uit deze proeven naar overleving worden de volgende (voorlopige) conclusies getrokken: (a) er blijkt een verschil in virulentie en overlevingskracht bij de twee gebruikte antibioticum-resistente stammen van Ech, (b) de minder virulente stam, aangebracht als suspensie, overleefde de winterperiode slechts incidenteel op beschadigde of niet-beschadigde schil van aardappelknollen, maar werd toch ook incidenteel nog teruggevonden in de nateelt, (c) in een

smeer van rot knolmateriaal op schil overleefde de nalidixine-resistente stam na drogen maximaal 2 dagen, de streptomycine-resistente stam handhaafde zich tot tenminste 1 maand, (d) om meer helderheid te krijgen over de overleving van versmeerde *Erwinia* gedurende opslag en bewaring is nader onderzoek met stammen van verschillende virulentie nodig.

3.8 Invloed van bewaaromstandigheden

In twee jaren is onderzoek gedaan naar de invloed van verschillende bewaaromstandigheden gedurende de winterbewaring op de bacterieproblemen in het daaropvolgende seizoen. Beide keren is het onderzoek uitgevoerd met natuurlijk besmette partijen van de rassen Desiree en Kondor. Submonsters van deze partijen zijn bewaard onder de volgende omstandigheden: (1) geen koeling, afgekiemd voor poten (code GKO), (2) gekoeld, vroeg eruit en in het donker gezet, afgekiemd voor poten (code KVV), (3) gekoeld, vroeg eruit en in het licht voorgekiemd (alleen in het tweede jaar, code KVK), (4) laat in de koeling, vroeg eruit in donker gezet, afgekiemd voor poten (code LVU), (5) gekoeld tot poten (code KTP), (6) talent behandeling (code TAL). Door partijen niet mechanisch te koelen, vroeg uit de koeling te halen, of tot het poten in de koeling (of talent) te bewaren, werd een verschillende mate van fysiologische veroudering gesimuleerd. De partijen werden in het voorjaar erop uitgepoot in het veld en beoordeeld op aantasting. In Figuur 11 worden de aantastingscijfers voor het jaar 2007 weergegeven.

Figuur 11. Effect van verschillende bewaaromstandigheden op de aantasting door Erwinia.



In beide jaren kon geen significante effecten van de verschillende bewaaromstandigheden op de veldaantasting worden gevonden. Alleen de in het licht voorgekiemde Kondors waren bij de eerste waarneming in juni 2007 significant meer aangetast dan de overige behandelingen. Ook in de dochterpartijen werd geen significant verschil in besmetting met *Erwinia* gevonden.

De conclusie uit deze proeven is dat: (a) er geen effect kon worden aangetoond van door diverse bewaarregimes gecreëerde verschillen in fysiologische veroudering op het optreden van *Erwinia* aantasting in het jaar erop, (b) het in het licht laten voorkiemen een eerdere manifestatie van de aantasting lijkt te bevorderen.

3.9 Conclusies Populatieopbouw.

Samenvattend kunnen uit het onderzoek naar de opbouw en uitbreiding van de *Erwinia* populatie volgende conclusies worden getrokken:

- *Besmettingsverloop in het veld.* Er is een groot verschil tussen latente besmetting en aantal symptoomplanten in het veld. De mate van aantasting wordt meer bepaald door voor *Erwinia* gunstige klimatologische omstandigheden dan door de besmettingsgraad van de poter. Al in een vroeg stadium is de besmetting in de nieuwe dochterknollen terug te vinden. Vanuit aangetaste planten (en moederknollen) kan de besmetting zich via het grondwater uitbreiden tot tenminste de derde buurplant in dezelfde rug en ook naar de genabuurde rug.
- *Dynamiek moederknolrot.* Bij een vroeg optreden van aantastingssymptomen is de moederknol eerder weggerot. Het blijkt dat bij latere aantasting ook meer rotte dochterknollen worden gevonden. Moederknollen in een perceel met aantasting kunnen bij de rooi veelvuldig besmet zijn met *Erwinia*, veel meer dan op grond van het aantal aangetaste planten zou worden verwacht.
- *Looftrekken.* Looftrekken lijkt gunstiger dan klappen om rotte moederknollen kwijt te raken.
- *Versmering via loofdoding.* Door loofklappen kan *Erwinia*, aanwezig in het geklapt loof, worden versmeerd over een afstand van tenminste 10 meter. Door volvelds te spuiten en veertien dagen later te klappen kan versmering worden voorkomen. Inspoeling vanuit de versmeerde loofresten naar dochterknollen kon niet worden aangetoond.
- *Versmering via rooimethoden.* Door machinaal rooien wordt *Erwinia* vanuit een haard met rotte knollen tot gemiddeld 10 - 12 meter versmeerd over de gerooide partij. Het maakt niet uit wat voor soort rooimachine er gebruikt wordt. Alleen met tweefasen rooien, waarbij met een voorraadrooier wordt opgerooid en vervolgens na drogen handmatig geraapt, wordt de kans op versmering behoorlijk gereduceerd. Ontsmetten via vernevelen van een ontsmettingsmiddel op de rooimachine lijkt weinig zin te hebben.
- Aanwezige *Erwinia* in versmeerde knolresten kan zich, ook na drogen, tot tenminste een maand na drogen op de knollen handhaven. Dat is langer dan tot nu toe werd aangenomen. Handhaving van de bacterie tot na de winter en in de nateelt het jaar erop kon in een ander experiment met een andere, en waarschijnlijk minder virulente, *Erwinia* stam slechts incidenteel worden aangetoond. Dit vereist verder onderzoek.

- *Effect van bewaaromstandigheden.* Er kon geen effect worden aangetoond van door diverse bewaarregimes gecreëerde verschillen in fysiologische veroudering op het optreden van Erwinia aantasting in het jaar erop bij partijen met een natuurlijke besmetting met Erwinia. Door voorkiemen van het pootgoed in het licht lijkt een eerdere manifestatie van de aantasting te worden bevorderd.

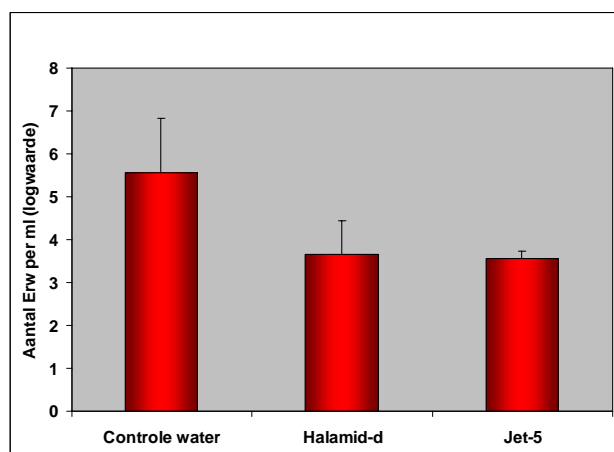
4. Bestrijding

Voor de beheersing van de bacterieziek problemen moet Preventie met een hoofdletter worden geschreven. Daaronder vallen alle teelt- en beheersmaatregelen die genomen kunnen worden om de initiële besmetting met en verdere uitbreiding van *Erwinia* in de pootgoedteelt tot een minimum te reduceren. Het onderzoek binnen dit project, zoals dat t.a.v. deze aandachtsgebieden hierboven is beschreven, kan daar bouwstenen voor aandragen. Naast preventie is ook bestrijding van reeds aanwezige besmettingen een item. Hier valt te onderscheiden tussen *ontsmetten*, van b.v. machines en materialen waarop besmetting voorkomt, en *sanitatie* van plant materiaal dat in- of uitwendig met de bacterie besmet is. M.n. in het laatste jaar van het project is hieraan aandacht besteed.

4.1 Ontsmetting

Een onderzoek is verricht naar beschikbare ontsmettingsmiddelen die wettelijk zijn toegelaten. Diverse middelen hebben een andere productnaam maar dezelfde werkzame stof. En selectie van deze middelen is getest op de groeiremming van *Erwinia*. Al deze middelen gaven een maximale remming van de bacteriegroei op vaste en in vloeibare media bij de adviesdosering, de meeste zelfs al bij 1/10 van de adviesdosering. Met twee van de middelen die al bij lage dosering een maximaal effect van groeiremming gaven, t.w. Halamid-d en Jet-5, is onderzoek gedaan naar het effect van behandeling van met *Erwinia* besmette oppervlaktes. De middelen werden in de praktijkdosering verneveld over het oppervlak van PVC plaatjes, waarop een smeer van *Erwinia* bacteriën was aangebracht. Hiervoor werd de nalidixine-resistente stam van Ech gebruikt. Na een kwartier inwerken werden de plaatjes te drogen gezet. Na drogen werd het aantal overlevende *Erwinia* bacteriën geteld op een selectief medium met het antibioticum. In Figuur 12 is de situatie van drie uur na de behandeling weergegeven.

Figuur 12. Het effect van ontsmetting met Halamid-d en Jet-5 van met een Erwinia smeer besmette PVC plaatjes (situatie 3 uur na behandeling).



Hieruit blijkt dat er weliswaar doding van bacteriën heeft plaatsgevonden, maar dat er nog te veel levende bacteriën overblijven. Voor een effectieve ontsmetting is maximale doding vereist. Waarschijnlijk dringt het middel bij het sproeien onvoldoende in de smeer door. Vervolgens is daarom ook een variant van de proef uitgevoerd waarbij het middel niet over de PVC plaatjes werd verneveld, maar waarbij de bacteriesmeer op de plaatjes direct in het middel werd gesuspendeerd. Hiermee bleek wel een maximale doding te worden bereikt. De conclusies uit deze experimenten zijn, dat: (a) ontsmetten van materiaal dat besmet is met een smeer van Erwinia door vernevelen van ontsmettingsmiddelen over het oppervlak, onvoldoende effectief is, (b) direct contact tussen middel en bacteriën nodig is om maximale ontsmetting te bewerkstelligen.

4.2 Sanitatie

Bij aardappelplanten die latent besmet zijn met Erwinia, zit de bacterie binnen in de plant of de knol. Bestrijding met extern werkende ontsmettingsmiddelen heeft dan weinig zin. In 2007 is in een oriënterende proef een aantal natuurlijk besmette partijen poters met diverse ontsmettingsmiddelen behandeld. De middelen hadden geen effect op de Erwinia besmetting in de navelinden. Alleen een warm water behandeling bleek een reducerend effect te hebben, maar na uitpoten bleek ook de kiemkracht van de knollen te zijn aangetast. Reductie van aantallen bacteriën in de poter alleen is bovendien niet voldoende omdat, zoals aangetoond, niet zo zeer de concentratie in de poter maar vooral de klimatologische omstandigheden de uitbraak van bacterieziek bepalen.

Verhoging van de fysiologische weerstand van de plant of verhoging van de interne weerstand door het stimuleren van de endofytische antagonistpopulatie is in het project niet aan de orde geweest. Dit vereist eerst nog vrij veel fundamenteel en specialistisch onderzoek voordat praktische toepassing in het vizier komt.

Ontsmetting heeft vooral zin op die momenten dat schone knollen uitwendig besmet raken met Erwinia, d.w.z. in versmeringssituaties. De laatste tijd verschijnen er regelmatig berichten in de vakbladen dat ozon een veelbelovend middel zou zijn voor de bestrijding van Erwinia in partijen besmette knollen. Hiernaar is in het laatste jaar van het project onderzoek gedaan.

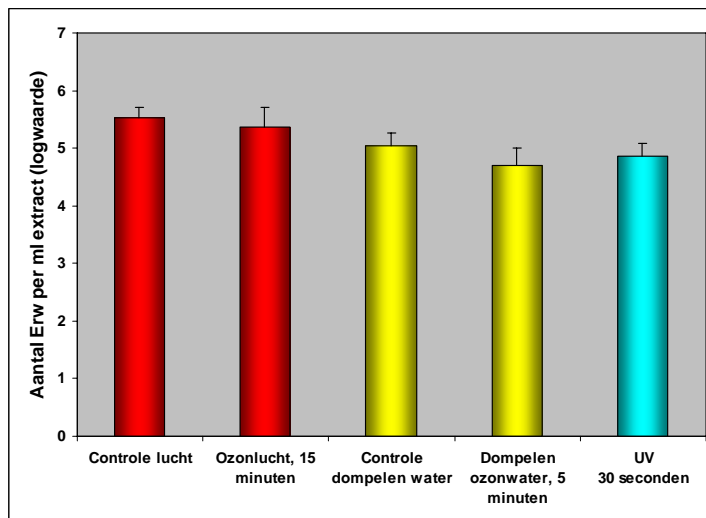
Aardappelknollen zijn eerst uitwendig besmet met Erwinia door dompelen in een suspensie met de nalidixine-resistente stam van Ech. Meteen na besmetten hebben de knollen een ozonbehandeling ondergaan, uitgevoerd door het bedrijf Agrozone te Eerbeek. De knollen zijn behandeld in ozonlucht (1000 ppm) met een hoge luchtvochtigheid en door dompelen in ozonwater (1,6/1,7 mg/l, 950 redox), gedurende verschillende behandelzeiten. Ook is een behandeling met UV toegevoegd.

Direct na behandeling zijn de aantallen Erwinia's geteld m.b.v. de IFC techniek (zie 5.1).

De resultaten van de langste behandelzeiten zijn in Figuur 13 weergegeven, vergeleken met controles zonder ozon. Hieruit blijkt dat de behandelingen met ozonlucht en het dompelen in

ozonwater nauwelijks effect gehad hebben op het aantal levende *Erwinia* bacteriën op de schil. Hetzelfde geldt voor de UV-behandeling.

Figuur 13. Effect van ozon en UV op de doding van *Erwinia chrysanthemi* op de schil van aardappelknollen



Uit dit experiment met ozon en UV wordt geconcludeerd dat behandelingen met ozonlucht, dompelen in ozonwater, en kortdurende bestraling met UV, vrijwel geen effect hebben op het aantal levende *Erwinia* bacteriën op de aardappelschil. In dit geval was ook nog sprake van een diffuse film van bacteriën op het schiloppervlak. Bij versmering van rotte knolresten wordt het nog moeilijker.

4.3 Conclusies Bestrijding

Samenvattend kunnen n.a.v. de uitgevoerde experimenten op het gebied van ontsmetting en sanitatie de volgende conclusies worden getrokken:

- Ontsmetting van het oppervlak van met *Erwinia* besmette materialen of machines door het vernevelen van ontsmettingsmiddelen is te weinig effectief.
- Gezien de mogelijk lange overleving van *Erwinia* in versmeerde knolresten, ook na drogen (zie onder 3.7), is het beter deze eerst grondig van materialen/machines af te spuiten en daarna een ontsmetting toe te passen danwel met geforceerde (liefst hete) lucht te drogen.
- Ontsmetting van het oppervlak van met *Erwinia* besmette aardappelknollen met ozon of UV heeft vrijwel geen effect. Niet uit te sluiten is dat (veel) langere behandelzeiten meer effect sorteren.

5. Detectie

5.1 Methoden

Voor de detectie van de Erwinia types zijn verschillende methoden beschikbaar die onder te verdelen zijn in serologische en DNA-moleculaire methoden, meestal gecombineerd met voorafgaande verrijking van Erwinia in een semi-selectief pectaat medium.

Een kwantitatieve serologische methode is IFC (immunofluorescence colony counting), waarbij Erwinia kolonies voorgekweekt worden in een selectieve voedingsbodem met pectaat. De Erwinia kolonies worden gekleurd met antistoffen die gelabeld zijn met een fluorescerende kleurstof, en vervolgens geteld onder een microscoop met UV-belichting. Kolonies van Eca en Ech kunnen hiermee specifiek geteld worden. In de loop van het project is de IFC voor m.n. Ech verder geoptimaliseerd. Voor Ecc zijn momenteel geen antisera beschikbaar. Deze methode vereist nogal wat expertise met de microscopische herkenning van de kolonies.

Tijdens het project zijn met deze methode diverse tellingen uitgevoerd bij PRI.

De meest toegepaste serologische methode is de ELISA. Deze is niet kwantitatief. Erwinia, aanwezig in extracten van plantmateriaal, wordt meestal eerst onder zuurstofarme omstandigheden verrijkt in een vloeibaar pectaat medium (verrijkings-ELISA). Vervolgens wordt de aanwezigheid van Erwinia m.b.v. enzym-gelabelde antistoffen aangetoond in ELISA-platen. De kleuromslag die optreedt wordt gemeten met een speciale plate-reader. Ook hier geldt dat voor Ecc nog geen antisera beschikbaar zijn.

Steeds meer wordt de PCR-methode toegepast, gebaseerd op stukjes DNA in het genoom van de bacterie, die m.b.v. 'primers' worden vermeerderd (PCR = polymerase chain reaction). Het product kan zichtbaar gemaakt worden met gel-electroforese. Ook kan het ontstaan van het PCR-product tijdens het proces gemeten worden met real-time PCR. Daarvoor zijn behalve de primers ook speciale fluorescerende probes nodig. Deze laatste PCR-methode is, naast verrijkings-ELISA, tijdens het project toegepast bij het onderzoek op HZPC-Research. Voor de bepaling van Eca en Ech zijn al langer specifieke primer-probe sets beschikbaar. Recent zijn, los van het Erwinia-project, ook primers en probes ontwikkeld die specifiek zijn voor een groep pathogene Ecc's. Verder wordt er gewerkt aan een multiplex PCR, waarin alle drie Erwinia types in één keer kunnen worden gedetecteerd.

Uit een proef waarbij Erwinia (Ech) in verschillende hoeveelheden aan miniknolextract werd toegevoegd en vervolgens verrijkt, bleek dat de bacterie met PCR en ELISA vanaf een aantal van 10 - 100 bacteriën per ml kon worden aangetoond.

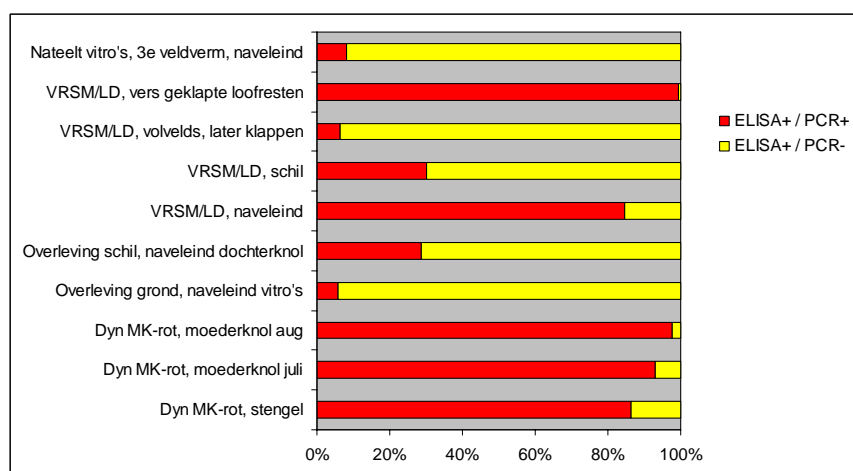
5.2 Discrepanties tussen ELISA en PCR.

Tijdens het project is regelmatig een soms forse discrepantie gevonden tussen de ELISA en de PCR uitkomsten. Vaak konden de uitslagen van ELISA niet bevestigd worden met een PCR op de verrijkte extracten. In het derde projectjaar is een vergelijkend onderzoek gedaan

tussen de labs van HZPC, NAK en PRI, met een tiental partijen aardappelknollen, waarvan drie besmet. De uitkomsten voor ELISA en PCR bij de drie labs kwamen daarbij redelijk goed overeen. Ook werden de ELISA uitkomsten goed gedekt door de PCR.

Desondanks werd ook in het laatste projectjaar weer veel discrepantie tussen beide methodes gevonden. Dit wordt gedemonstreerd in Figuur 14, waarin van diverse veldmonsters het percentage ELISA-positieve monsters dat ook met PCR positief scoorde is uitgezet.

Figuur 14. Overeenkomst tussen ELISA en PCR voor Erwinia chrysanthemi van diverse verrijkte monsters van de proefvelden in 2008.



Uit deze figuur blijkt dat het kennelijk nogal wat uitmaakt wat voor type monster gebruikt is. Bij stengels, vers geklapt loofresten en rotte moederknollen is er meestal een goede overeenkomst tussen beide methoden. Bij naveleinden, schilmonsters en loofresten die na doodspuiten en afsterven zijn geklapt, is er veelal een groot verschil. De indruk bestaat dat er bij deze monsters tijdens de verrijkingstap andere dan Erwinia bacteriën verrijkt worden, die een vals positieve reactie geven in ELISA.

In het onderzoek worden alleen die monsters positief gerekend die met beide methoden positief bevonden zijn. De real-time PCR die toegepast is, werd eerst op specificiteit getest met een groot aantal Erwinia isolaten. Een dubbelcheck met PCR op een aantal van de extracten door andere laboratoria gaf evenwel niet steeds dezelfde resultaten. Dat wil zeggen dat er ook op het punt van DNA-extractie en PCR protocollen nog een verdere optimalisatie en onderlinge afstemming moet plaatsvinden.

5.3 Voorspellende waarde van de Erwinia toets.

In 2005 zijn door de verschillende handelshuizen circa veertig stammen van vijf rassen als S/SE uitgezet bij honderd telers. In het voorjaar van 2005 is van al deze partijen de besmettingsincidentie getoetst door de NAK. Gedurende het seizoen werden de teeltgegevens van deze partijen bijgehouden. In Tabel 1 is samengevat hoeveel partijen

gedurende het seizoen per categorie op bacterie in klasse werd verlaagd, in relatie tot de uitkomsten van de toets die in het voorjaar was gedaan. De toetsuitkomsten worden voor het gemak ingedeeld in categorieën van 0, 1, en 2% besmettingsincidentie, waarbij besmettingen met de Erwinia types Eca en Ech zijn samengevoegd. De toets gaf in het voorjaar van 2005 alleen lage uitkomsten, er waren geen partijen met besmettingsincidenties boven de 2%.

Tabel 1. Verlaging van partijen in 2005, in relatie tot de Erwinia toets in het voorjaar

Besmettingsincidentie poter	Totaal partijen	Verlaagd	% verlaagd
0%	73	7	9,6
1%	21	3	14,3
2%	6	3	50,0
Som	100	13	13,0

Uit deze cijfers valt te concluderen dat: (a) als er in de toets geen Erwinia wordt aangetoond, dit geen garantie is dat er geen problemen met bacterieziek ontstaan, (b) de kans op problemen toeneemt naarmate de besmettingsincidentie hoger wordt.

Deze conclusies sporen met gegevens van de NAK. Een toets wordt altijd uitgevoerd in een steekproef uit een grote partij aardappelknollen. Een garantie van 100% dat een partij schoon is, valt op basis van een steekproef nooit te geven, hoe groot het monster ook is. De toets moet worden gehanteerd als één van de hulpmiddelen bij de beoordeling van partijen pootaardappelen, m.n. bij de keuze of met een partij moet worden verder geteeld. Onder die voorwaarde blijft het laten uitvoeren van een toets waardevol.

5.4 Conclusies Detectie

Samengevat worden t.a.v. detectie van Erwinia de volgende conclusies geformuleerd:

- Met verrijkings-ELISA en -PCR zijn er gevoelige detectiemethoden beschikbaar waarmee in principe aantallen vanaf 10 - 100 Erwinia bacteriën per ml extract kunnen worden aangetoond.
- PCR heeft als voordeel dat daarmee alle drie types (pathogene) Erwinia's kunnen worden aangetoond, mogelijk binnenkort zelfs in één bepaling.
- In praktijkmonsters zijn tijdens het onderzoek vaak discrepanties tussen de ELISA- en PCR-uitkomsten gevonden. Nader onderzoek is nodig naar de mogelijke verrijking van in ELISA vals positief reagerende bacteriën in het gebruikte verrijkingsmedium.
- Tussen verschillende laboratoria geven ook de toegepaste PCR methoden niet altijd dezelfde uitkomst. Een verdere optimalisatie van de methode en afstemming tussen de diverse laboratoria is nodig.
- Uit het onderzoek bleek dat planten uit individuele knollen van besmette partijen, waarbij in het naveleind geen Erwinia was aangetoond, veelal toch latent besmet

bleken en aangetast raakten (zie 3.2). Ook de wijze van monstername moet daarom nader worden onderzocht.

- Uitvoering van een toets op *Erwinia* in het pootgoed blijft zinvol, ook al is het niet aantonen van de bacterie in een steekproefmonster geen garantie dat er in het veld geen bacterieziekte gaat optreden. De toets is een goed hulpmiddel bij de keuze of met een partij moet worden verder geteeld. Verdere optimalisaties van de detectie zullen de waarde van de toets alleen maar doen toenemen.

6. Samenvatting en aanbevelingen

In 2005 is een vierjarig project onder de titel "Bacterievrije pootgoedteelt - een uitdaging" gestart. Het doel van het project was tweeledig, (a) meer inzicht krijgen in en beheersen van de Erwinia problemen in de pootgoedteelt, (b) het meetbaar en inzetbaar maken van de resultaten van het onderzoek voor de praktijk.

Overzien we wat na vier jaar onderzoek bereikt is, dan is de samenvattende conclusie dat er, via gerichte experimenten, vooral inzicht is verkregen in verschillende factoren die de problematiek bepalen. Concrete oplossingen zijn veelal nog niet gevonden. Wel vallen er uit het onderzoek aanzetten te geven voor verder onderzoek op praktijkschaal en toepassingen in praktijksituaties. Deze inzichten c.q. aanzetten worden hieronder in hoofdlijn uitgewerkt voor de verschillende aandachtsgebieden: *Initiële besmetting*, *Populatieopbouw*, *Bestrijding* en *Detectie*.

Initiële besmetting.

- In het *uitgangsmateriaal* voor de stammenteelt, miniknollen en traditionele stammen, kon tot nu toe geen besmetting worden aangetoond.
- *Initiële besmetting in de praktijk*. Uit een onderzoek naar de teelt vanuit miniknollen bij een groot aantal telers bleek dat in veel partijen al na twee veldvermeerderingen latente besmetting met Erwinia optrad. Het onderzoek bleek achteraf te globaal om de mechanismen achter deze eerste infecties te kunnen achterhalen. *Een nauwkeuriger monitoring van de processen op bedrijfsniveau is daarvoor vereist.*
- Wel is d.m.v. veld en kasexperimenten een aantal *risicofactoren* in kaart gebracht die bij een eerste infectie een rol zouden kunnen spelen. Infectie door Erwinia bacteriën die in de grond achterblijven blijkt vooralsnog erg onwaarschijnlijk. Een schoon gewas kan wel van buitenaf besmet raken via beschadigde stengels, en ook via al of niet beschadigde wortels. Besmettingen die, op wat voor manier dan ook, in een perceel terecht zijn gekomen, kunnen bovendien via grondwater verder over het perceel verspreid worden. *In praktijkonderzoek moet nader onderzocht worden of deze risicofactoren daadwerkelijk als invalspoort voor de eerste besmettingen in de teelt fungeren, en wat de oorsprong is van deze besmettingen. Vandaaruit kunnen teeltgerichte maatregelen worden genomen om deze risico's tot een minimum te beperken.*

Populatieopbouw.

- *Besmettingsverloop*. Als de bacterie eenmaal latent in de partij aanwezig is, dan kan de besmetting zich daarna verder uitbreiden. Uit het onderzoek blijkt dat het uitbreken van de bacterieziek-verschijnselen veelal meer afhangt van de

klimatologische omstandigheden dan van de concentratie van de bacterie in de poter. Is de plant besmet, dan raken ook de dochterknollen al in een vroeg stadium geïnfecteerd. Het aantal planten dat latent besmet is, is vaak veel groter dan het aantal planten dat de symptomen laat zien. Een visuele beoordeling van een aardappelgewas geeft daarom altijd een onderschatting van de werkelijke besmetting. *Bekeken dient te worden of dit consequenties moet hebben voor de keuring van partijen.* Vanuit een aangetaste plant kan een besmetting zich gemakkelijk via het grondwater verder over het perceel uitbreiden.

- *Moederknollen.* Hoe vroeger het stadium van aantasting, hoe eerder de moederknol blijkt te zijn weggerot. Restanten van moederknollen in een besmet perceel blijken bij de rooi nog zeer vaak besmet met *Erwinia*, en vormen zo een bron voor versmering tijdens het rooien. Maatregelen die gericht zijn op het eerder doen verdwijnen van de moederknol verdienen daarom aanbeveling. In het onderzoek is aangetoond dat in het licht voorkiemen van poters de manifestatie van de aantasting vervoegt, en daarmee ook het weggroten van de moederknol. Verder bracht het onderzoek naar voren dat een vroege aantasting ook leidt tot minder rotte dochterknollen bij de rooi. Loof trekken, vervolgens, lijkt een uiteentrekken en eerder verdwijnen van de moederknol te bevorderen. *In praktijkproeven met combinaties van maatregelen om moeder- en dochterknollen vroegtijdig te laten weggroten moet worden onderzocht of hierdoor inderdaad de risico's op versmering tijdens de oogst kunnen worden gereduceerd.*
- *Versmering.* Door loofklappen wordt een *Erwinia* besmetting versmeerd over het perceel, maar een verhoogde infectie van de dochterpartij daardoor kon niet worden aangetoond. Door het loof eerst dood te spuiten en pas later te klappen lijkt deze versmering grotendeels te voorkomen. *De rol van loofdoding bij versmering moet verder worden onderzocht, waarbij ook andere manieren van loofdoding (b.v. loof trekken) moeten worden meegenomen.*
Het onderzoek heeft aangetoond dat een *Erwinia* besmetting bij machinaal rooien tot gemiddeld meer dan tien meter over de partij versmeerd wordt. Door te rooien met een voorraadrooier en vervolgens handmatig te rapen wordt dit voorkomen. *Erwinia* blijkt in versmeerde rotte knolresten, zelfs na drogen, tot tenminste één maand te kunnen overleven. Dat is langer dan tot nu toe gedacht. *Toekomstig onderzoek zal zich moeten richten op (a) minimaliseren van de versmering tijdens het rooien en (b) methoden om Erwinia in achtergebleven resten en op de schil in het traject na rooien z.s.m. uit te schakelen door desinfectie, geforceerd drogen, etc.*
- *Bewaring.* Door het bewaren van partijen besmette aardappelen onder verschillende omstandigheden wat betreft koelen, afkiemen, talentbehandeling, etc, is getracht verschillen in fysiologische ouderdom te creëren. Het bleek dat deze verschillen geen effect hadden op de bacterie aantasting in het daaropvolgende seizoen. *In*

vervolgonderzoek moet worden geïnventariseerd hoe de bestaande praktijk van bewaren er uitziet in relatie tot de uitbreiding van de bacterieproblemen.

Bestrijding.

- *Ontsmetting.* Uit het onderzoek is gebleken dat ontsmetten van materialen waarop versmeerde resten van Erwinia aanwezig zijn, d.m.v. vernevelen van ontsmettingsmiddelen, onvoldoende effectief is. Voor een goede afdoding blijkt direct contact tussen middel en bacterie essentieel. *Vervolgonderzoek moet uitwijzen hoe machines en materialen in de praktijksituatie het best bacterievrij gemaakt kunnen worden.*
- *Sanitatie.* Ontsmetting van aardappelknollen met een Erwinia besmetting op de schil door behandelen met ozonlucht, door dompelen in ozonwater, of door bestraling met UV bleek niet effectief. *Er is nader onderzoek nodig naar andere methoden / middelen waarmee oppervlakkige besmettingen met Erwinia tijdens of na versmeringssituaties op partijen aardappelknollen kunnen worden geëlimineerd. Daarbij moet vooral gelet worden op bestrijding van infecties in rotte knolresten of besmette loofresten.*

Detectie.

- *Detectiemethoden.* Momenteel zijn gevoelige detectiemethoden voor de bepaling van Erwinia beschikbaar waarmee, na verrijking van de aardappelmonsters, lage aantallen bacteriën kunnen worden aangetoond. Deze zijn te onderscheiden in serologische (ELISA, IFC) en DNA-moleculaire (PCR) methoden. Van de drie types pathogene Erwinia's kunnen er maar twee met ELISA of IFC worden gedetecteerd, met PCR is het sinds kort mogelijk om alle drie types te detecteren.
- *Problemen.* Tijdens het project is gebleken dat er regelmatig discrepanties bestaan tussen de ELISA- en de PCR-methode. Deze worden m.n. geweten aan het optreden van vals positieve reacties in bepaalde monsters. *Verdere optimalisatie van de detectietechnieken is nodig.*
- *Toetsen.* Uit onderzoek is gebleken dat het niet aantonen van Erwinia in het pootgoed geen garantie is dat er geen bacterieziek problemen ontstaan. Dit is inherent aan steekproeven. De kans op problemen neemt wel toe naarmate de besmettingsincidentie hoger wordt. Toetsen blijft een zinvol hulpmiddel om risicopartijen te kunnen uitselcteren.

7. Rapporten vooronderzoek project

Aalbers, J., T. Douma, en G.J.H.M Meuffels, 2004. "Bacterievrije pootgoedteelt - een uitdaging". Resultaten enquête onder pootgoedtelers. Februari 2004-Juni 2004. Intern rapport.

Van der Wolf, J.M. 2004. Naar een Erwinia-vrije pootgoedteelt, een literatuurstudie. Rapport 82, Plant Research International, Wageningen, 32 pag.