



***Deltaplan Erwinia  
Deel C  
Pootaardappelen***

**Nacontrole “Kapjesmethode” versus  
“Vacuümverrijkingsmethode”**

Henk Velvis

## Inhoud

|                                                                                   |          |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>Inleiding.....</b>                                                             | <b>3</b> |
| <b>Uitvoering.....</b>                                                            | <b>3</b> |
| Partijen.....                                                                     | 3        |
| Analyse op Erwinia, met de “kapjesmethode” en de “vacuümverrijkingsmethode” ..... | 3        |
| Proefveld, waarnemingen en oogsten .....                                          | 4        |
| <b>Resultaten.....</b>                                                            | <b>4</b> |
| Besmetting partijen voorjaar .....                                                | 4        |
| De aantasting in het veld .....                                                   | 4        |
| Besmetting van de dochterpartijen .....                                           | 7        |
| <b>Conclusies .....</b>                                                           | <b>7</b> |
| <b>Bijlage. Overzicht van de gegevens. ....</b>                                   | <b>9</b> |

## Inleiding

In het verleden werd de Erwinia-besmetting van een partij aardappelknollen bepaald aan de hand van de besmetting van de navelinden. Tijdens de projecten “Bacterievrije pootgoedteelt” en “Deltaplan Erwinia” werd duidelijk dat knollen ook besmet kunnen zijn in andere delen van de knol, m.n. de schil, zonder dat er sprake is van een besmetting van het navelind. Een analyse op alleen de navelinden zal dus veelal een onderschatting geven van de werkelijke besmetting. Tijdens het Deltaplan Erwinia is een andere methode ontwikkeld, waarbij de hele knol wordt gebruikt. Dit is de zogenaamde “vacuümverrijkingmethode”, waarbij knollen in een plastic zak onder vochtige omstandigheden onder vacuüm worden gebracht. Na incubatie van een aantal dagen bij 25°C wordt in het gevormde rottingsvocht de Erwinia besmetting bepaald. Het bleek dat op deze wijze meestal meer besmetting werd gevonden dan bij de analyse op alleen de navelinden. Voor de routinematige analyse van Erwinia bij de NAK is eveneens gekozen voor het gebruik van méér knolmateriaal dan alleen het navelind. Om praktische redenen is daar echter gekozen voor een methode waarbij het hele basissegment van de knol (kapje) waarin het navelind zich bevindt, wordt gebruikt voor de analyse. Deze methode wordt daarom de “kapjesmethode” genoemd. Wat nog ontbrak was een nacontrole van deze beide methoden in het veld, ofwel geeft één van deze methoden een betere voorspelling van de aantasting (c.q. besmetting) in het veld dan de andere. In 2013 is een veldproef uitgevoerd waarin een aantal partijen met uiteenlopende Erwinia besmettingen is gevolgd in het veld, nadat in het voorjaar zowel met de kapjes- als de vacuümverrijkingmethode de aanvangsbesmetting was bepaald.

## Uitvoering

### *Partijen*

Aan het begin van het jaar is een selectie gemaakt van partijen van HZPC waarin in het najaar van 2012 al een Erwinia bepaling was uitgevoerd. Geprobeerd is aan partijen te komen waarin een range aan besmettingen voorkwam van de belangrijkste Erwinia types van dit moment, *Dickeya* spp. (Ds) en *Pectobacterium wasabiae* (Pwas), voorheen aangeduid als virulente *P. carotovorum* ssp. *carotovorum* (vPcc). Uiteindelijk zijn er van de nog beschikbare partijen 31 uitgekozen. Van elk van deze partijen werd een monster van > 600 knollen opgehaald, 200 voor de analyse op Erwinia en 400 om uit te poten in het veld.

### *Analyse op Erwinia, met de “kapjesmethode” en de “vacuümverrijkingmethode”*

De 200 knollen van elke partij die bestemd waren voor de analyse werden verdeeld over 20 pools van 10. Van elke knol werd eerst het basissegment (“kapje”) gesneden, waarin ook het navelind, met een dikte van 0,5 - 1 cm. De kapjes werden per pool van 10 in Bioreba extractiezakjes met een hamer kapotgeslagen (“gecrusht”) in 5 ml leidingwater. Na ca. 10 minuten uitzakken werd 100 µl van dit extract toegevoegd aan een 1,5 ml epje met 900 µl PEB verrijkingsmedium. Samenstelling van het PEB verrijkingsmedium (Pectate Enrichment Broth): 0,3 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,31 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3 H<sub>2</sub>O; 1,5 g Polygalacturonic acid, sodium salt (Sigma); en 1 l gedemineraliseerd water; pH 7,2. De epjes werden vervolgens gedurende 3 dagen geïncubeerd bij 20°C (“verrijking”). De aldus verrijkte extracten werden ingevroren bij -20°C voor latere DNA-extractie en analyse met Taqman-PCR.

Op dezelfde pools met knollen, waarvan inmiddels de kapjes waren verwijderd, werd de vacuümverrijking-methode toegepast. De pools werden in een plastic zak gedaan (dikte 100 µm) met 50 ml leidingwater. Deze werd vacuüm getrokken in een vacuümmachine van het type Henkova Gastrovac Pro. De zakken werden vervolgens gedurende 7 dagen weggezet bij 25°C. Van

het ontstane rottingsvocht werd 500 µl overgepipetteerd in een 96 well plaat. Ook deze werd eerst ingevroren, om later te worden getoetst met Taqman-PCR.

Bij de analyse-uitslagen van kapjes versus vacuümverrijking kan in de hier toegepaste procedure sprake zijn van verschillende combinaties:

1. “kap + / vac +” : zowel kapjes als vacuümverrijking positief voor dezelfde pool van knollen,
2. “kap + / vac –” : alleen de kapjes positief,
3. “kap - / vac +” : alleen de vacuümverrijking positief,
4. “kap - / vac –”: beide verrijkingsmethodes negatief.

Bij toepassing van alleen de “kapjesmethode” op de partijen knollen zou de uitslag bepaald worden door de combinaties 1 en 2. Bij toepassing van alleen de “vacuümverrijkingsmethode” zou deze bepaald worden door de combinaties 1, 2 en 3, waarbij ervan wordt uitgegaan dat ook combinatie 2 een positieve reactie zal geven bij vacuümverrijking van hele knollen. Voor deze werkwijze is gekozen omdat zo bij beide methodes exact dezelfde pools van knollen worden onderzocht. Het alternatief zou zijn om voor de beide (destructieve) methodes andere pools van knollen te gebruiken, maar dat heeft dan weer als nadeel dat de monsters niet vergelijkbaar zijn.

### *Proefveld, waarnemingen en oogsten*

Met de rest van de knollen werd een proefveld aangelegd op proefboerderij de Kollumerwaard, met van elke partij 2 veldjes van 200 knollen. Pootdatum: 26 april. Het totaal aantal veldjes bedroeg 62. Elk veldje bestond uit 4 rijen van 50 knollen, met een pootafstand van 20 cm. Tussen de veldjes werd in lengterichting een afstand van 0,75 m vrijgehouden. De partijen en herhalingen werden random verdeeld over het proefveld.

Gedurende het seizoen werd regelmatig de aantasting door *Erwinia* beoordeeld.

In het najaar werden uit ieder veldje van de middelste twee rijen ongeveer 20 planten opgerooid.

Van deze planten werd een monster van 100 knollen meegenomen. Dit monster werd verdeeld in 10 pools van 10 knollen. Hierin werd m.b.v. vacuümverrijking (zie boven) de *Erwinia* besmetting bepaald.

## **Resultaten**

### *Besmetting partijen voorjaar*

Uit de analyse van de 31 verzamelde partijen die in het voorjaar is uitgevoerd, bleek dat er inderdaad sprake was van een grote range aan besmettingen (Figuur 1). Voor deze figuur zijn alle besmettingen van de pools van knollen bij elkaar genomen, zowel kapjes als vacuümverrijking en zowel Ds als Pwas.

De besmetting is in de figuren 2 en 3 nader uitgesplitst in *Dickeya* (Ds) en *P. wasabiae* (Pwas) besmettingen, en in besmetting van kapjes en van vacuümverrijking.

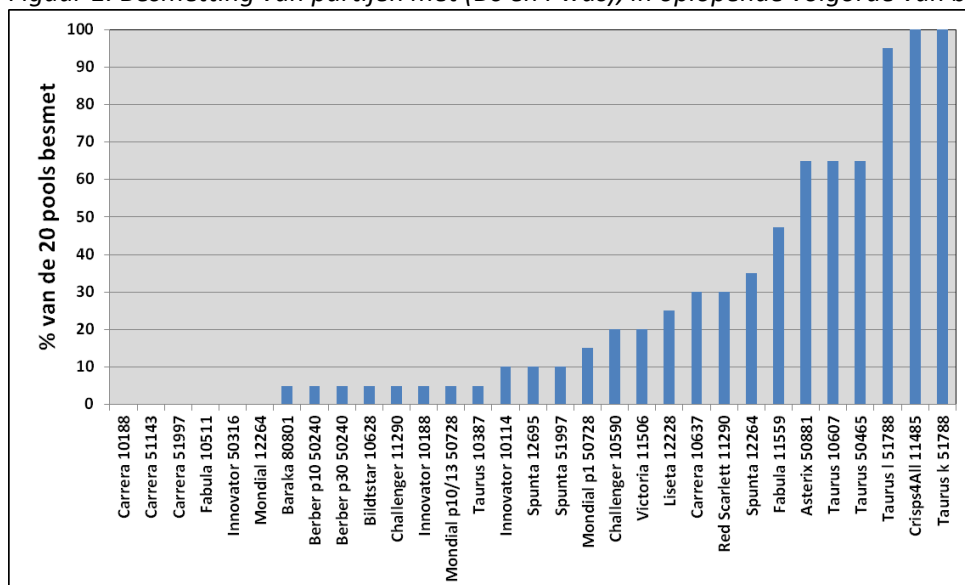
In de figuren zijn de combinaties 1 en 2 (zie boven) samen genomen als “kap + / (vac + of –)” en wordt combinatie 3 (“kap - / vac +”) apart gehanteerd als de door vacuümverrijking aangetoonde extra besmetting boven de kapjesmethode.

Uit deze gegevens valt op te maken dat: a) er meer partijen besmet waren met Pwas dan met Ds, b) er diverse combinaties van beide *Erwinia* types voorkwamen, en c) er bij veel partijen met vacuümverrijking besmetting werd gevonden die niet in de kapjes was aangetoond.

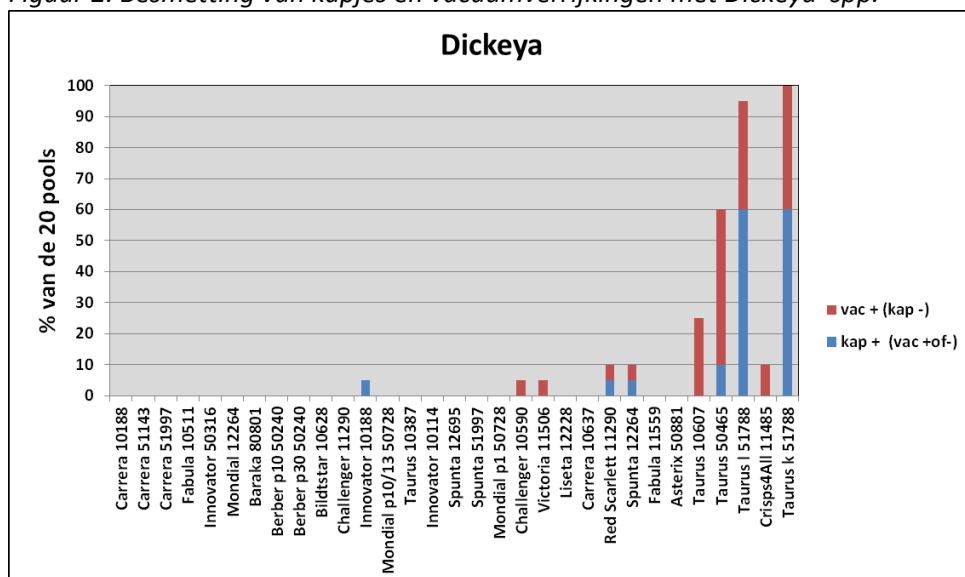
### *De aantasting in het veld*

Het gewas ontwikkelde zich over het algemeen goed. De veldjes lagen in een lange strook van 2 veldjes breed op het perceel. De eerste 6 veldjes vooraan het perceel kwamen vertraagd op,

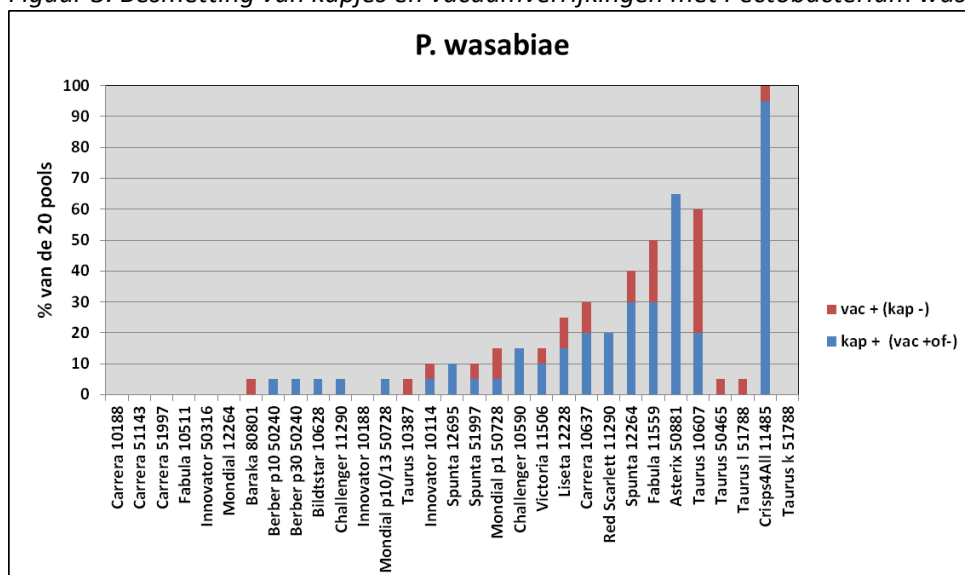
Figuur 1. Besmetting van partijen met (Ds en Pwas), in oplopende volgorde van besmetting..



Figuur 2. Besmetting van kapjes en vacuümverrijkingen met *Dickeya* spp.



Figuur 3. Besmetting van kapjes en vacuümverrijkingen met *Pectobacterium wasabiae*.



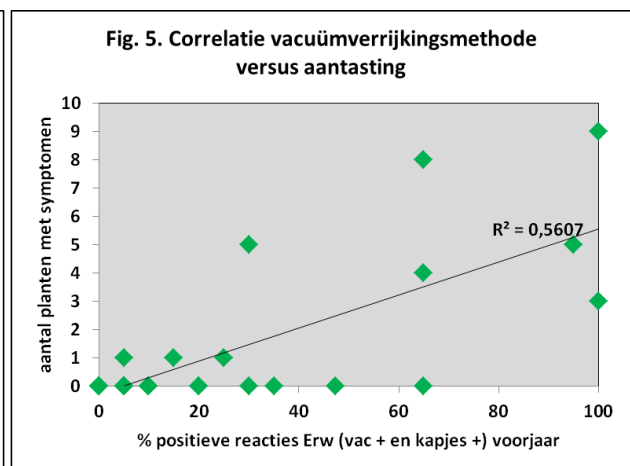
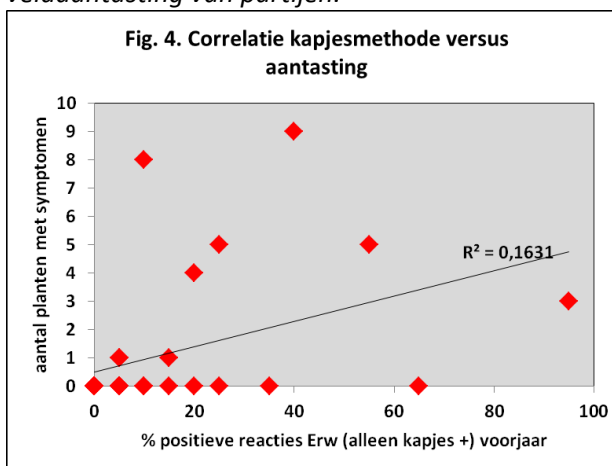
waarschijnlijk doordat er bij de behandeling met bodemherbicide iets misgegaan is. In de loop van de maand juli werden de waarnemingen bemoeilijkt doordat het gewas op veldjes met veel loof plat ging liggen. Begin augustus was er bij meerdere veldjes sprake van aantasting door *Sclerotinia* ("rattenkeutel"), waardoor eveneens de waarnemingen bemoeilijkt werden.

Foto 1. Proefveld Nacontrole op 10 juli 2013



In aanmerking genomen de grote variatie aan *Erwinia* besmettingen in het pootgoed, en de soms ernstige mate van die besmetting, viel de aantasting in het veld nogal tegen. Uiteindelijk werden slechts in 14 van de 62 veldjes (in 9 van de 31 partijen) aangetaste planten gevonden, met een maximum van 6 per veldje. Er kon geen onderscheid gemaakt worden tussen aantasting door Ds of Pwas. De partijen waarin het eerst aantasting optrad waren weliswaar partijen waarvan de poters besmet waren met Pwas, maar de aantallen waren te laag om daar conclusies aan te verbinden voor een onderscheid in aantastingsfase tussen Pwas en Ds. Ondanks de relatief lage aantallen aangetaste planten is getracht de correlatie weer te geven tussen de voorjaarsbesmetting, gemeten met de kapjesmethode en de vacuümverrijkingmethode en de aantasting in het veld (Figuren 4 en 5).

Figuur 4 en 5. Correlatie tussen voorjaarsbesmetting, bepaald met de "kapjesmethode" (alleen de kap +, waarbij vac + of -) of de "vacuümverrijkingmethode" (alle vac +, plus de kap +/vac -), en veldaantasting van partijen.

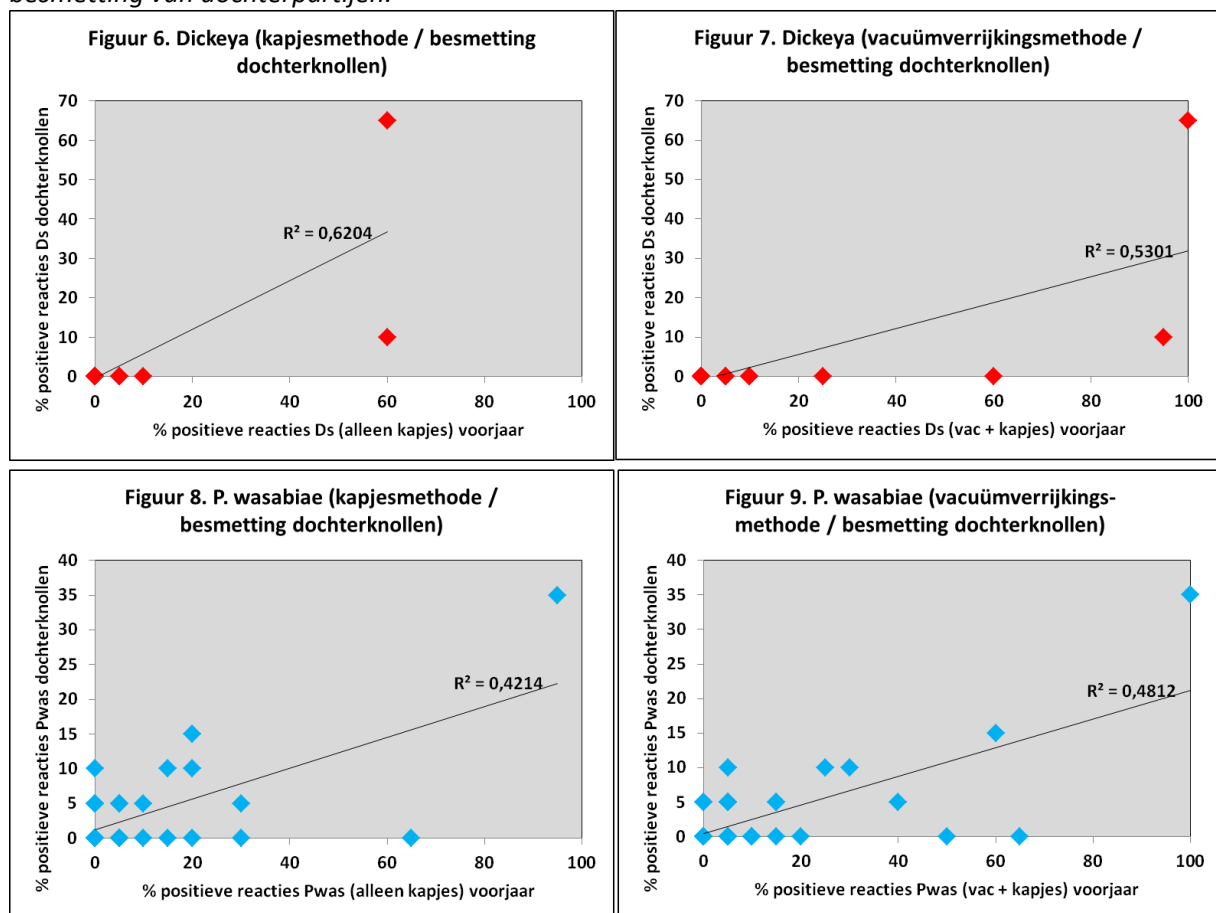


Hoewel de correlatie in beide gevallen laag is, is deze het grootst bij de methode waarbij de hele knol geanalyseerd is. Positief te melden is dat er geen aantasting optrad bij partijen waarin in het voorjaar geen besmetting was aangetoond.

### Besmetting van de dochterpartijen

Het aantal besmettingen van de dochterpartijen was veel lager dan van de uitgangspartijen. In het voorjaar waren 24 van de 31 partijen besmet, in het najaar waren dat er 14. Ook de mate van besmetting was in het voorjaar hoger. Ook hier is getracht de correlatie tussen de verrijkingmethoden en de besmetting van de dochterpartijen weer te geven (Figuren 6 t/m 9). Nu apart voor Ds en Pwas, omdat beide types zowel in moeder- als dochterpartijen bepaald zijn.

Figuren 6 t/m 9. Correlatie tussen voorjaarsbesmetting, bepaald met de “kapjesmethode” (alleen de kap +, waarbij vac + of -) of de “vacuümverrijkingmethode” (alle vac +, plus de kap +/vac -), en besmetting van dochterpartijen.



Bij Ds gaat het maar om twee dochterpartijen waarin besmetting gevonden is. Dat maakt het lastig om betrouwbare correlaties aan te tonen. Bij Pwas gaat het om 9 dochterpartijen met besmetting. Over het geheel genomen lijkt er weinig verschil in voorspellende waarde tussen beide verrijkingmethoden die in het voorjaar gebruikt zijn.

## Conclusies

Uit het onderzoek kan het volgende worden geconcludeerd:

1. Met vacuümverrijking wordt extra besmetting van knollen aangetoond, die met de kapjesmethode niet wordt gevonden.
2. Hoewel de correlatie tussen de gevonden voorjaarsbesmetting en de aantasting vrij laag is, lijkt de vacuümverrijkingmethode een betere voorspelling van de veld aantasting te geven dan de kapjesmethode.
3. Dit gaat niet op voor de besmetting van de dochterpartijen.

In de bijlage wordt een overzicht gegeven van alle resultaten.

## Bijlage. Overzicht van de gegevens.

| Besmetting voorjaar* |                  |      |            |                         |      |            | Aantasting planten**   |        |        | Besmetting dochterknollen* |      |            |
|----------------------|------------------|------|------------|-------------------------|------|------------|------------------------|--------|--------|----------------------------|------|------------|
| Partij               | Kapjes+(vac+of-) |      |            | (Kapjes +) + (vac+kap-) |      |            | Aantal symptoomplanten |        |        | Vacuümverrijking           |      |            |
|                      | Ds               | vPcc | Erw totaal | Ds                      | vPcc | Erw totaal | 2-jul                  | 10-jul | 21-aug | Ds                         | vPcc | Erw totaal |
| Asterix 50881        | 0                | 65   | 65         | 0                       | 65   | 65         | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Baraka 80801         | 0                | 0    | 0          | 0                       | 5    | 5          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 5    | 5          |
| Berber p10 50240     | 0                | 5    | 5          | 0                       | 5    | 5          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Berber p30 50240     | 0                | 5    | 5          | 0                       | 5    | 5          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 5    | 5          |
| Bildtstar 10628      | 0                | 5    | 5          | 0                       | 5    | 5          | 0                      | 0      | 1      | 0                          | 5    | 5          |
| Carrera 10188        | 0                | 0    | 0          | 0                       | 0    | 0          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Carrera 10637        | 0                | 20   | 20         | 0                       | 30   | 30         | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 10   | 10         |
| Carrera 51143        | 0                | 0    | 0          | 0                       | 0    | 0          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Carrera 51997        | 0                | 0    | 0          | 0                       | 0    | 0          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Challenger 10590     | 0                | 15   | 15         | 5                       | 15   | 20         | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Challenger 11290     | 0                | 5    | 5          | 0                       | 5    | 5          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Crisps4All 11485     | 0                | 95   | 95         | 10                      | 100  | 100        | 3                      | 3      | 3      | 0                          | 35   | 35         |
| Fabula 10511         | 0                | 0    | 0          | 0                       | 0    | 0          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 5    | 5          |
| Fabula 11559         | 0                | 30   | 25         | 0                       | 50   | 47         | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Innovator 10114      | 0                | 5    | 5          | 0                       | 10   | 10         | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Innovator 10188      | 5                | 0    | 5          | 5                       | 0    | 5          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Innovator 50316      | 0                | 0    | 0          | 0                       | 0    | 0          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 5    | 5          |
| Liseta 12228         | 0                | 15   | 15         | 0                       | 25   | 25         | 0                      | 0      | 1      | 0                          | 10   | 10         |
| Mondial 12264        | 0                | 0    | 0          | 0                       | 0    | 0          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Mondial p1 50728     | 0                | 5    | 5          | 0                       | 15   | 15         | 1                      | 1      | 1      | 0                          | 5    | 5          |
| Mondial p10/13 50728 | 0                | 5    | 5          | 0                       | 5    | 5          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Red Scarlett 11290   | 5                | 20   | 25         | 10                      | 20   | 30         | 0                      | 1      | 5      | 0                          | 0    | 0          |
| Spunta 12264         | 5                | 30   | 35         | 10                      | 40   | 35         | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 5    | 5          |
| Spunta 12695         | 0                | 10   | 10         | 0                       | 10   | 10         | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Spunta 51997         | 0                | 5    | 5          | 0                       | 10   | 10         | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Taurus 10387         | 0                | 0    | 0          | 0                       | 5    | 5          | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 0    | 0          |
| Taurus 10607         | 0                | 20   | 20         | 25                      | 60   | 65         | 0                      | 0      | 4      | 0                          | 15   | 15         |
| Taurus 50465         | 10               | 0    | 10         | 60                      | 5    | 65         | 0                      | 0      | 8      | 0                          | 0    | 0          |
| Taurus k 51788       | 60               | 0    | 40         | 100                     | 0    | 100        | 0                      | 2      | 9      | 65                         | 0    | 65         |
| Taurus l 51788       | 60               | 0    | 55         | 95                      | 5    | 95         | 0                      | 2      | 5      | 10                         | 10   | 20         |
| Victoria 11506       | 0                | 10   | 10         | 5                       | 15   | 20         | 0                      | 0      | 0      | 0                          | 5    | 5          |

\* Besmetting weergegeven als percentage pools dat positief scoort.

\*\* Gegevens van 3 tijdstippen, tussenliggende weggelaten. Aantal symptoomplanten per partij (400 planten) en niet per veldje.