

Deltaplan Erwinia

Deel C - Pootaardappelen

Eindrapport van het onderzoek 2009 - 2012



PRODUCTSCHAP AKKERBOUW

Nederlandse
Aardappel Organisatie



Het project “Deltaplan Erwinia Deel C pootaardappelen” werd financieel mogelijk gemaakt door de volgende organisaties:



Van Stolkweg 31
Postbus 84102
2508 AC Den Haag
Tel. 070 358 93 31
Fax 070 354 42 90



PRODUCTSCHAP AKKERBOUW

Louis Braillelaan 80
Postbus 908
2700 AX Zoetermeer
Tel. 079 - 368 7007
Fax 079 - 368 7010

Samenstelling projectorganisatie

Stuurgroep

Upt Hiddema	(LTO Werkgroep Pootaardappelen, voorzitter)
Jan Gottschall	(NAO, secretaris)
Erik Greve	(PA, lid)
Jan Hoogland	(LTO, lid)
Daniëlle Kroes	(KAVB, lid)
Hans Schollaart	(EL&I, lid)
Rudolf Visser	(NAO, lid)
Henk van de Woude	(NAO, lid)

Projectcommissie

Jan Hoogland	(LTO, voorzitter)
Henk v.d. Haar	(NAK, secretaris)
Jan Aalbers	(KWS, lid)
Sjefke Allefs	(Agrico, lid)
Tjalling Douma	(Agrico, lid)
Harm Steenhuis	(HZPC, lid)
Jelle Bruin	(LTO, lid)
Henk Folkers	(Averis, lid)
Maurice Kuijlen	(Meijer, lid)
Maria Bergsma-Vlami	(EL&I, lid)
Jan van der Wolf	(WUR-PRI, lid)
Ge van den Bovenkamp	(NAK, lid)
Joop van Doorn	(WUR-PPO, lid)
Doretta Boomsma	(Erwinia Team)
Henk Velvis	(Erwinia Team)
Kees Kristelijn	(Erwinia Team)

De bijdragen in dit verslag zijn tot stand gekomen door medewerking van:

Het Erwinia Team

Doretta Boomsma
Henk Velvis
Kees Kristelijn
Tom van Tent Becking

Erwinia Team
t.a.v. Mevr. Ir. D. Boomsma
Postbus 2
9123 ZR Metslawier
Tel. 0519-244300
Email doretta.boomsma@hzpc.nl

Medewerkers van Plant Research International en Nederlandse Algemene Keuringsdienst

Pieter Kastelein
Patricia van der Zouwen
Marjon Krijger
Marieke Förch
Jan van der Wolf
Robert Czajkowski
Agnieszka Wegierek
Sylwia Jafra
Gé van den Bovenkamp
Eisse de Haan
Luciano Nunes Leite

Plant Research International
t.a.v. Dhr. Dr.ir. J.M. van der Wolf
P.O. Box 69
6700 AB Wageningen
Tel. 0317-480598
Email Jan.vanderWolf@wur.nl

Inhoudsopgave

1. Inleiding	6
2. Detectie en Epidemiologie	8
2.1 Algemeen	8
2.2 De verschillende Erwinia types in de Nederlandse aardappelteelt	8
2.3 Detectiemethoden	8
2.4 Optimalisatie verrijking	9
2.5 Distributie in de knol	11
2.6 Nacontrole	13
2.7 Epidemiologie in het veld	15
2.8 Ontwikkeling Vacuümtoets	19
2.9 Literatuur	24
3. Teelt en Initiële besmetting	25
3.1 Algemeen	25
3.2 Monitoring bij mini-telers	26
3.3 Veldproeven verspreiding Erwinia	32
3.4 Onderzoek naar overleving in zwaar besmette percelen	35
3.5 Conclusies Initiële Besmetting	37
3.6 Literatuur:	38
4. Versmering tijdens de teelt	39
4.1 Algemeen	39
4.2 Besmetting via kiemen	40
4.3 Voorkiemen en poten	42
4.4 Maatsortering	45
4.5 Stikstofbemesting in relatie tot Erwinia expressie in het veld	49
4.6 Verspreiding via contact in het veld	52
4.7 Is selecteren zinvol bij dreigende afkeuring	55
4.8 Loofdoding methoden	59
4.9 Loofdoding monitoring 2012	63
4.10 Fysiologische rijpheid	65
4.11 Monitoring S-telers	68
5. Bewaring	73
5.1 Inleiding	73
5.2 Snelheid van indringen Erwinia in de schil	73
5.3 Reductie van versmeerde Erwinia door zwadrooien	75
5.4 Reductie van Erwinia besmetting door verschillende droogregimes	77
5.5 Conclusies Bewaring	79

6. Kennisoverdracht	80
6.1 Algemeen	80
6.2 Nieuwsbrieven, artikelen en persberichten.....	80
6.3 Symposia en Demodagen.....	81
6.4 Presentaties	81
6.5 Bijeenkomsten buitendienstmedewerkers handelshuizen.....	81
6.6 Telersbijeenkomsten.....	81
6.7 Afsluitende bijeenkomst 12/12/2012	87
7. Onderzoek Plant Research International	88
7.1 Algemeen	88
7.2 Verbetering van het groeimedium voor detectie en isolatie van Dickeya en Pectobacterium soorten	88
7.3 Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum als veroorzaker van bacterieziekte in aardappel: resultaten van laboratorium en kasexperimenten.....	92
7.4 De ontwikkeling van populaties van Dickeya solani en pectobacterium wasabiae na depositie op (beschadigd) aardappelblad.....	97
7.5 Loofbesmettingen met Erwinia's in 1-jarige aardappelstammen: resultaten van een survey in pootgoed teeltgebieden in Noord Nederland	100
8. Evaluatie en aanbevelingen.....	103

1. Inleiding

De bacterieziekte Erwinia is al jaren een bron van grote zorg binnen de aardappelteelt, niet alleen in Nederland maar ook in andere aardappel producerende landen. In 2008 is door het LEI berekend dat de schade, veroorzaakt door deze bacterie, voor Nederland een bedrag van gemiddeld 22 M€ per jaar belooft (Literatuur 1). Waarvan ongeveer 12 M€ ten laste van de boeren komt en 10 M€ ten laste van de handel.

Al in 2005 is op gezamenlijk initiatief van de gehele aardappelpootgoedsector een project gestart waarin nader gekeken zou worden naar de risicofactoren die een rol spelen bij het tot stand komen van de ziekteproblemen in het veld. Dit project, onder de naam 'Bacterievrije pootgoedteelt - een uitdaging!', resulteerde in een eindverslag in 2008, waarin inderdaad een aantal risicofactoren in kaart was gebracht (Literatuur 2). Geconcludeerd werd evenwel dat er nog te weinig inzicht was in de feitelijke rol die deze factoren spelen bij het tot stand komen en uitbreiding van de ziekteverschijnselen in de praktijk. Daarvoor zou een veel nauwkeuriger monitoring op praktijkschaal moeten plaatsvinden. Ook ten aanzien van praktische toepassingen werden aanzetten gegeven, die evenwel op praktijkschaal nader zouden moeten worden onderzocht en getoetst.

Niet alleen in de aardappelteelt maar ook in de bloembollensector is Erwinia een groot probleem. Binnen deze sector heeft vanaf 2004 een onderzoek plaatsgevonden via het, door het Productschap Tuinbouw gefinancierde, project 'Beheersing van Erwinia in bloembolgewassen'.

Op gezamenlijk initiatief vanuit de pootaardappel- en bloembollensector is in 2009 het project 'Deltaplan Erwinia' tot stand gekomen, als voortzetting van de projecten die in de jaren daarvoor waren uitgevoerd. Centrale doelstelling was om te komen tot een substantiële reductie van de economische schade, die voor de pootaardappelsector gemiddeld 50% zou moeten bedragen. Voor de bloembollensector werd geen percentage genoemd.

Het Deltaplan Erwinia werd onderverdeeld in drie onderdelen:

- A. fundamenteel-strategisch onderzoek,
- B. toegepast-wetenschappelijk onderzoek, en
- C. praktijkonderzoek.

De delen A en B zouden moeten worden gefinancierd met overheidsgeld, deel C met geld van de pootaardappelsector (NAO, Productschap Akkerbouw) en van de bloembollensector (Productschap Tuinbouw).

In het voorliggende rapport wordt verslag gedaan van het onderzoek dat gedaan is in het kader van het onderdeel C van de pootaardappelsector.

Deel C is uitgewerkt in een aantal hoofdthema's, te weten *Detectie & Epidemiologie*, *Teelt & Initiële Besmetting*, *Teelt & Versmering*, *Bewaring*, en *Kennisoverdracht*.

De eerste 4 onderzoeksthema's zullen per thema in opeenvolgende hoofdstukken worden behandeld (Hoofdstuk 2 t/m 5). In de loop van vier jaar onderzoek zijn zeer veel gegevens verzameld en duizenden analyses verricht. Omwille van de leesbaarheid is gekozen voor een vorm waarbij de essentie van het verrichte onderzoek wordt gepresenteerd. Dat wil zeggen, dat niet uitvoerig wordt uiteengezet hoe het onderzoek is uitgevoerd of wordt ingegaan op allerlei details van de resultaten. Per thema wordt een aantal conclusies geformuleerd en worden aanbevelingen gedaan voor de praktijk van de pootaardappelteelt.

Het laatstgenoemde thema Kennisoverdracht, beschreven in hoofdstuk 6, omvat een opsomming van de artikelen, persberichten en nieuwsbrieven die zijn verschenen. Daarnaast is een overzicht

gegevens van de bijeenkomsten waaraan een bijdrage is geleverd. Ook staan hierin de vragen die tijdens de telersbijeenkomsten in november naar voren zijn gekomen.

Door Plant Research International is, eveneens in het kader van Deel C, een aantal deelonderzoeken verricht welke in hoofdstuk 7 zijn beschreven.

Het rapport wordt afgesloten met een evaluatie en de formulering van een aantal aanbevelingen in hoofdstuk 8.

Literatuur.

1. Prins, H., en A. Breukers 2008. In de puree? De gevolgen van aantasting door *Erwinia* voor de pootaardappelsector in kaart gebracht. Rapport LEI, Den Haag.
2. Velvis, H. en van der Wolf, J.M. 2008. Project Bacterievrije pootgoedteelt - een uitdaging! 2005 – 2008. Eindrapport van het onderzoek.

2. Detectie en Epidemiologie

2.1 Algemeen

Een kwalificatie die het eerst bij veel telers en andere betrokkenen bij de aardappelteelt opkomt als het gaat om *Erwinia* is “ongrijpbaar”. Achter een dergelijke aanduiding gaat een zeker gevoel van machteloosheid schuil. De opzet van een project als het Deltaplan *Erwinia* is om door onderzoek meer ‘grip’ te krijgen op deze schadelijke bacterie.

Daarvoor is het in de eerste plaats belangrijk te weten met welke types van de *Erwinia* bacterie we te maken hebben. En verder, hoe je de aanwezigheid van de bacterie het best kunt aantonen en wat het ziekteverloop van de verschillende types is in het veld. Dat zijn de onderwerpen die in dit hoofdstuk aan bod komen.

2.2 De verschillende *Erwinia* types in de Nederlandse aardappelteelt

In de Nederlandse aardappelteelt worden drie types *Erwinia* onderscheiden. In het verleden stonden deze te boek onder de Latijnse namen *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (de “zwartbeen” bacterie), *Erwinia chrysanthemi* (de “stengelnatrot” bacterie) en *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (de “bacterienatrot” bacterie). Door middel van onderzoek, dat wereldwijd plaats vindt, is het mogelijk om bacteriën op basis van DNA sequenties beter van elkaar te onderscheiden. Als gevolg hiervan heeft ook binnen de *Erwinia* groep een herindeling plaatsgevonden.

De hiervoor genoemde *Erwinia* typen hebben inmiddels andere namen gekregen, respectievelijk *Pectobacterium atrosepticum* (Pa), *Dickeya* (Ds), waarvan de ondersoorten *dianthicola* en *solani* in Nederland voorkomen, en *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (Pcc). Van de laatste soort is pas de laatste jaren bekend geworden dat bepaalde vertegenwoordigers hiervan ook echt ziekteverschijnselen kunnen geven in het veld (Literatuur 1). Deze worden daarom aangeduid als vPcc, waarbij het v-tje staat voor virulent *). In de loop van dit rapport zullen steeds de afkortingen van de *Erwinia* types worden gebruikt. Om praktische redenen wordt “*Erwinia*” nog steeds als verzamelnaam gebruikt voor de hele groep.

2.3 Detectiemethoden

In het eindrapport van het project ‘Bacterievrij Pootgoedteelt (Literatuur 4) was geconstateerd dat er veelal een discrepantie bestond tussen de tot dan toe meestal toegepaste ELISA methode en de PCR methode voor de bepaling van *Erwinia*. Deze discrepantie werd toegeschreven aan het optreden van vals-positieve reacties bij ELISA. Bovendien kon met ELISA niet het *Erwinia* type vPcc worden aangetoond. In het eerste jaar van het Deltaplan *Erwinia* werd de omslag gemaakt van ELISA naar uitsluitend Taqman PCR. Mede door het verbeteren van de moleculair biologische expertise bij HZPC R&D in Metslawier, waar het onderzoek werd uitgevoerd, kon gebruik worden gemaakt van een multiplex PCR waarbij alle drie *Erwinia* types in één bepaling konden worden geanalyseerd. Om de *Erwinia*’s met PCR te kunnen bepalen, wordt eerst het DNA uit de monsters geëxtraheerd. Voor zowel DNA-extractie als PCR is nu een “high throughput” uitrusting beschikbaar. D.w.z. dat er een groot aantal monsters tegelijk kan worden verwerkt.

2.4 Optimalisatie verrijking

Inleiding

Het aantal *Erwinia* bacteriën in plantenmonsters is, zeker bij latente besmetting, over het algemeen te laag om rechtstreeks te kunnen aantonen. Daarom wordt eerst een verrijking toegepast. Dit houdt in dat extracten van de monsters worden toegevoegd aan een verrijkingsmedium (PEB – pectate enrichment broth) met Na-pectaat als substraat. Dit mengsel wordt gedurende 72 uur onder zuurstofarme omstandigheden geïncubeerd bij 20°C. Na deze verrijking kan in de extracten, eventueel na een periode van invriezen, *Erwinia* worden bepaald.

Omdat de indruk bestond dat de verrijking niet altijd optimaal verliep, is in de loop van het project onderzoek uitgevoerd naar het optimaliseren van het verrijkingsproces. Een deel daarvan is uitgevoerd bij Plant Research International. Daarover wordt elders in dit rapport verslag gedaan.

Doel

Onderzoeken of het gehanteerde proces van verrijking verder geoptimaliseerd kan worden.

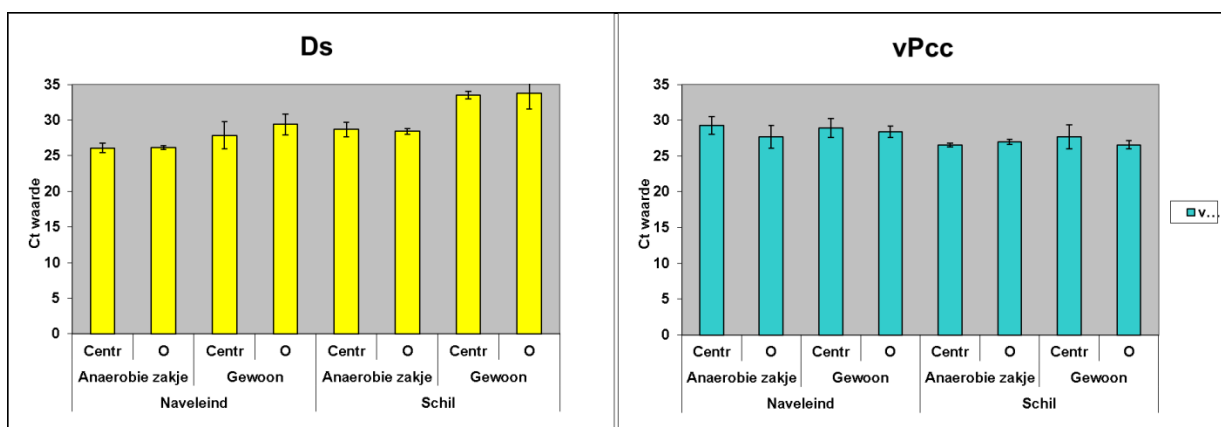
Uitvoering

In het begin van 2011 werd een laboratorium proef uitgevoerd waarbij een aantal details van het verrijkingsproces nader is onderzocht. Geprobeerd is om d.m.v. een centrifugestap een schoner knol- of schilextract te krijgen, waardoor het verrijkingsproces wellicht beter zou verlopen. Verder is geprobeerd de anaërobie tijdens het verrijkingsproces te verbeteren.

De proef werd uitgevoerd met naveleind- en schilextracten waaraan een lage besmetting van Ds of vPcc was toegevoegd. De extracten werden al of niet gecentrifugeerd bij een laag toerental (200xg), en vervolgens in een verhouding van 1 op 9 toegevoegd aan PEB verrijkingsmedium. De verrijking werd uitgevoerd in 96-well verrijkingsplaten. Dit waren platen met 96 'compartimentjes', elk met een inhoud van 1,2 ml. Per well werd 0,85 ml van de verrijkingsmengsels toegevoegd. Een deel van de platen werd dichtgeseald, een ander deel werd in speciale 'anaërobiezakjes' geplaatst (Merck Anaerocult® A mini, met indicatorstrip). De platen werden gedurende 72 u verrijkt bij 20°C.

Resultaten

De resultaten van de PCR, uitgedrukt in Ct waarden zijn weergegeven in de figuren (2.A en 2.B) hieronder. Elk balkje representeert het gemiddelde van 5 bepalingen.



Figuur 2.A: Optimalisatie verrijking (*Dickeya*)

Figuur 2.B: Optimalisatie verrijking (vPcc)

Centr = extract opgeschoond met centrifugestap; O = extract niet opgeschoond; Ct-waarde = meetwaarde PCR (hoe lager de waarde, hoe beter de verrijking). Uitgangsdichtheid was overal 10^3 bacteriën per ml extract.

Conclusie

- *'Opschonen' van het crush-extract* door het inbouwen van een centrifugestap had geen effect op de verrijking.
- *Verbeteren van de anaërobie*. Het incuberen van de extracten in een speciaal 'anaërobie zakje' had een significant verbeterend effect op de verrijking. Dit gold alleen voor Ds en niet voor vPcc. Ook was dit verbeterend effect groter bij schilextract dan bij naveleindextract.
- *Type monster*. Verder was er ook een significant verschil tussen de verrijking in naveleind- of schilextracten. Voor Ds en vPcc was het effect tegengesteld. Bij Ds was er een betere verrijking in de naveleind extracten, bij vPcc was echter juist de verrijking in de schilextracten iets beter.

2.5 Distributie in de knol

Inleiding

Om de aanwezigheid van Erwinia in aardappelknollen te kunnen aantonen is het belangrijk te weten waar de bacterie zich bevindt. Uit onderzoek is gebleken dat de concentratie aan Erwinia bacteriën meestal het hoogst is in het navelend, maar dat er in lagere aantallen ook bacteriën in de schil of in de rest van de knol voorkomen (Literatuur 2 en 3). Dit is de reden dat tot voor kort de detectie van Erwinia plaatsvond op het navelend. Al tijdens het project 'Bacterievrije pootgoedteelt' was geconstateerd dat uit knollen waarbij géén Erwinia in het navelend was aangetoond toch vaak een zieke plant voortkwam (Literatuur 4). Binnen het Deltaplan Erwinia is dit nader onderzocht.

Doel

(1) Vaststellen of Erwinia alleen in het navelende of ook op andere plaatsen in of op de knol aanwezig kan zijn, en (2) of er, als er in het navelende geen besmetting voorkomt, ook geen zieke planten in het veld te verwachten zijn.

Uitvoering

Van een aantal besmette partijen van de rassen Festien, Kondor en Seresta werd de navelend besmetting van individuele knollen bepaald. Vervolgens werd bij de knollen waarin geen navelend besmetting was gevonden onderzocht of er elders in de knollen toch een besmetting aanwezig was. De knollen werden onderverdeeld in schil en in 3 knolsegmenten.

Van elke partij werden bovendien 50 knollen, waarbij geen navelend besmetting was aangetoond, uitgepoot in het veld.

Resultaten

Het bleek dat met name in de schil bij een hoog percentage van de knollen besmetting kon worden aangetoond (Figuur 2.C). Waarschijnlijk gaat het daarbij om een besmetting die vanuit versmering tot stand gekomen is (zie ook Hoofdstuk 5 in dit rapport, over Bewaring). Een bepaling die alleen uitgaat van het navelend zal dus veelal een onderschatting geven van de actuele besmettingssituatie.

Dit is de reden geweest waarom gedurende de rest van het onderzoek steeds een analyse gedaan is op zowel het navelend als een stukje schil van de knollen.

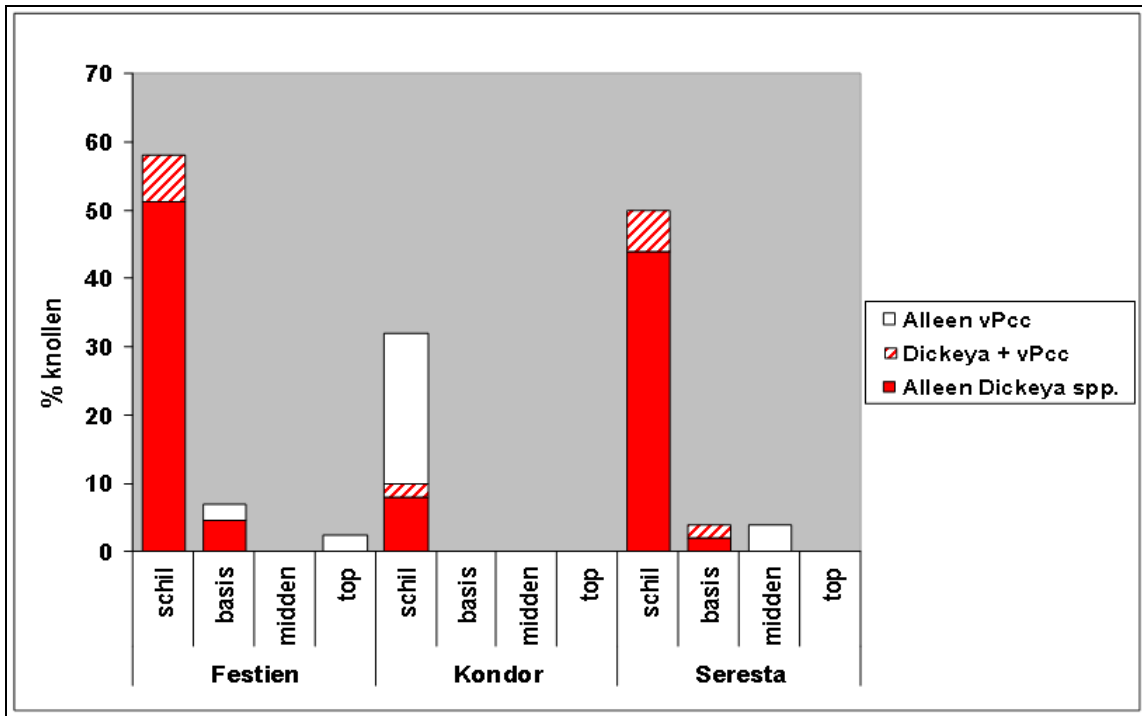
Van de in het veld uitgepote knollen gaf 25, 14 en 16 procent van de partijen Festien, Kondor en Seresta aantasting te zien in het loof.

Conclusie

- Veel knollen in een met Erwinia besmette partij, waarin geen navelend besmetting is aangetoond, blijken toch besmet te zijn, m.n. in de schil.
- Analyse van alleen de navelend besmetting geeft dus een onderschatting van de besmetting van een partij.
- De besmetting die elders in de knol voorkomt kan toch aantasting geven in het veld.

Dit gegeven wordt inmiddels breed onderkend, en is ook bevestigd in onderzoek van anderen.

In de loop van het onderzoek ontstond de indruk dat ondanks het meenemen van een stukje schil in de analyse, toch nog besmettingen gemist werden in de monsters. In een later stadium is daarom een alternatieve methode ontwikkeld, de vacuümtoets (zie onder 2.8).



Figuur 2.C: Besmetting met *Erwinia* in onderdelen van knollen waarbij in het navelende geen besmetting was gevonden.

2.6 Nacontrole

Inleiding

Het is niet altijd duidelijk of een besmetting in het ene jaar ook leidt tot symptoomplanten in het daarop volgende jaar. Bij het beoordelen van partijen op de aanwezigheid van *Erwinia* in het naveleinde en de gevolgen daarvan in de nateelt is het mogelijk dat er sprake is van vals positieve of vals negatieve uitslagen. Om vast te stellen wat de discrepantie tussen de gevonden uitslagen in gemarkeerde, symptoomplanten en symptoomplanten een jaar later in het veld, werden in 2010 en 2011 nacontrole velden aangelegd.

Doel

Vaststellen in hoeverre sprake kan zijn van een onjuiste conclusie ten aanzien van de besmetting als alleen het naveleinde wordt onderzocht.

Uitvoering

In 2010 en 2011 werden nacontrole velden aangelegd. Voor deze nacontrole velden werden onderzochte monsters geselecteerd die in het veld gemarkeerd waren als symptoomplant en waarvan de knollen voor onderzoek waren opgerooid en bewaard.

In 2010 werden uit de beschikbare monsters (de knolopbrengst van individuele planten) een selectie gemaakt waarbij de PCR resultaten leidend waren. In totaal werden in 2010 279 velden aangelegd, waarbij een deel bestond uit velden met knollen van symptoomplanten en een positieve reactie in de knollen, en een deel uit monsters afkomstig van symptoomplanten maar een negatieve reactie in de knollen. Gedurende het groeiseizoen werd wekelijks het ziekteverloop in het veld vastgelegd.

In 2011 werd wederom een nacontrole veld aangelegd. In totaal werden in dit jaar 146 nacontrole veldjes met een wisselende besmetting in de knollen uitgepoot. Vanaf opkomst werd wekelijks vastgesteld in welke velden symptoomplanten voor kwamen.

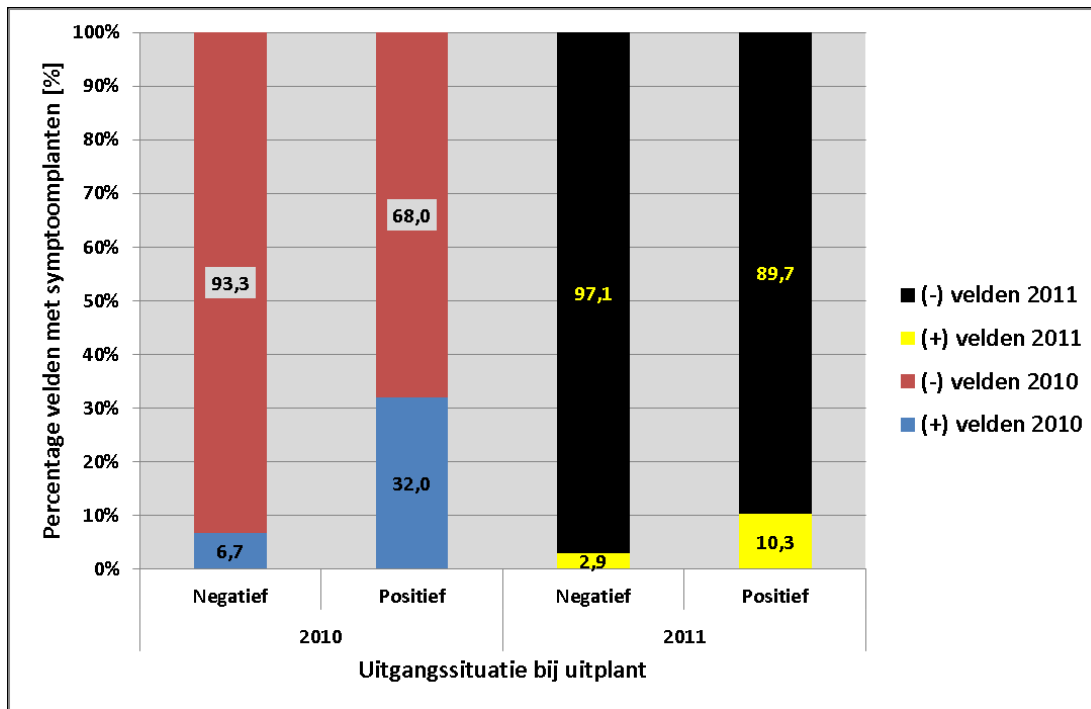
In beide jaren werden monsters geselecteerd waarin (1) geen *Erwinia*, (2) *Pectobacterium atrosepticum*, (3) *Dickeya solani* en/of (4) *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* was aangetoond.

Resultaten

In de jaren 2010 en 2011 werden nacontrole velden aangelegd om vast te stellen of de nateelt van symptoomplanten van resp. oogstjaar 2009 en 2010 ook weer planten laat zien met *Erwinia* symptomen.

Uit de analyse van de waarnemingen wordt duidelijk dat in het proefveld van 2010 in 6,7 % van de velden waarbij in de knollen geen *Erwinia* was aangetoond symptoomplanten voorkwamen. In 2011 was dit bij 2,9 % van de velden het geval. Ook werd duidelijk dat, in zowel 2010 als 2011, in de velden waar knollen waren uitgepoot waarin *Erwinia* was aangetoond, niet alle velden symptoomplanten werden gevonden. Dit was uiteindelijk in 2010 en 2011 in resp. 32 % en 10,3 % wel het geval.

Naast het aandeel gevonden symptoomplanten per veld kan ook een vergelijking gemaakt worden op basis van het aantal knollen dat gebruikt is. In 2010 bleek in 0,98 % van de planten die als "negatief" waren gepoot symptoomplanten voor te komen. In 2011 was dit 0,2 %. Bij de als "positief" gepote knollen kwamen in 2010 en 2011 resp. 4,35 % en 1,7 % symptoomplanten voor. In figuur 2.D zijn de resultaten voor de jaren 2010 en 2011 grafisch weergegeven.



Figuur 2.D: Resultaat van het aantal velden waarin bij uitplant al dan niet (Negatief/positief) *Erwinia* was aangetoond.

Conclusie

- Net als in 2010 liet ook nu weer een deel van de knollen (0,2%), die als “Negatief” waren getest, toch symptomen in het veld zien. Dit aandeel was wel kleiner dan in 2010 toen dit 0,98% was.
- In het als “Positief” uitgeplante knolmateriaal werd bij 1,7% van de planten symptomen gevonden. Dit aandeel is lager dan in 2010 toen het aandeel 4,35% bedroeg.
- In beide jaren worden symptoomplanten gevonden in velden waarvan het knolmateriaal voor het poten niet aantoonbaar besmet was.
- In beide jaren werden, in verhouding, weinig planten met symptomen gevonden, in de planten van de velden die als ziek uitgeplant waren.
- Bovenstaande maakt nogmaals duidelijk dat het binnen het huidige bemonsteringssysteem mogelijk is om symptoomplanten in een als schoon getoetste partij te vinden. Een eventueel aanwezige (latente) besmetting leidt niet altijd tot besmetting van de nateelt.

2.7 Epidemiologie in het veld

Inleiding

In Nederland kennen we verschillende typen "Erwinia" bacteriën die bij de aardappelplant en bij de knollen tot aantasting, rotting, kunnen leiden. De symptomen die hierbij in de plant optreden kunnen per type verschillend zijn. Zo worden soms korte, gedrongen, planten gevonden met of zonder verwelkingsverschijnselen. Ook worden aangetaste stengelvoeten of deels dan wel geheel rottende stengeldelen gevonden. Bij de selectie op bacterie ziek in pootaardappelen is verder opvallend dat soms alleen aan het begin van het selectie seizoen planten met Erwinia symptomen worden gevonden. Ook komt het voor dat in percelen gedurende het gehele seizoen of juist aan het einde van het teeltseizoen, door Erwinia, aangetaste planten moeten worden verwijderd. Er is dan ook behoefte om meer duidelijkheid te krijgen over hoe de verschillende Erwinia typen zich in het veld gedragen, en of er sprake is van interacties tussen de Erwinia typen. Bij interactie kan gedacht worden aan een onderdrukkend, dan wel een versterkend, effect. Om hier meer inzicht in te krijgen werden gedurende 3 jaar veldonderzoek verricht. Het onderzoek werd verricht in samenwerking met Plant Research International (PRI) te Wageningen.

Doel

(1) Meer inzicht krijgen in het verloop van de symptoomontwikkeling van Erwinia in het veld en (2) vaststellen of er sprake is van interacties tussen verschillende Erwinia typen.

Uitvoering

In 2010 werd gestart met 10 verschillende Erwinia typen of combinaties van daarvan. Op basis van de gegevens van 2010 werden in 2011 deels dezelfde en deels andere combinaties gebruikt. Ook in 2012 was dit het geval. De gebruikte Erwinia typen en combinaties in de drie onderzoek jaren zijn in tabel 2.A vermeld.

2010	2011	2012
vPcc 1949		
vPcc 1957	vPcc 1957	
vPcc 1955	vPcc 1955	vPcc 1955
	vPcc 1955 + nvPcc 1948	vPcc 1955 + nvPcc 1948
		vPcc 1955 + vPcc 1949
	vPcc 1957 + nvPcc 1963	
nvPcc 1937		
nvPcc 1948	nvPcc 1948	nvPcc 1948
nvPcc 1963	nvPcc 1963	
Ds 2222	Ds 2222	Ds 2222
Ds 2222 + nvPcc 1937		
Ds 2222 + nvPcc 1963	Ds 2222 + nvPcc 1963	
	Dsikeya 2222 + nvPcc 1948	Ds 2222 + nvPcc 1948
	Ds 2222 + vPcc 1957	
	Ds 2222 + vPcc 1955	Ds 2222 + vPcc 1955
		Ds 2222 + Pa 1987
		Ds 2222 + vPcc 1955 + Pa 1987
		Pa 1987
		Pa 1987 + nvPcc 1948
Water	Water	Water

Tabel 2.A: Gebruikte Erwinia typen en combinaties in de onderzoeks jaren 2010, 2011 en 2012.

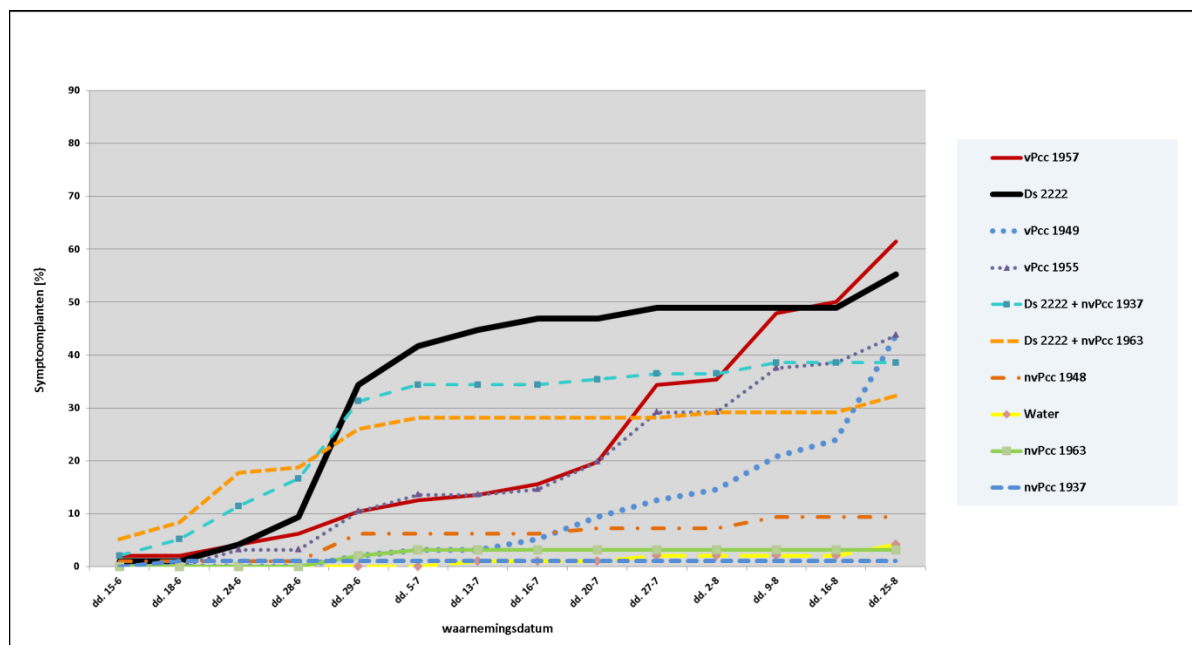
In alle jaren werden miniknollen van het ras Kondor gebruikt. Per object werden 16 knollen in 6 herhalingen gepoot die via vacuüm infiltratie waren besmet, met uitzondering van het controle object (water).

De Erwinia stammen zijn voorgekweekt op grote petrischalen met 1/4TSBA (trypticase soya broth agar). Van deze platen is bacteriemassa geoogst en verdund in leidingwater tot OD-600 waardes van ongeveer 0,13-0,14. Deze basissuspensies (1 liter) zijn in het vacuümvat verder tot 30 liter verdund. Van de basissuspensie is een plaattelling gedaan. Zo kon de actuele dichtheid aan cfu worden bepaald. De uiteindelijk gebruikte concentratie van de bacterie suspensies was circa 10^6 bacteriën per ml. De vacuüm infiltratie in het vacuümvat vond plaats gedurende 20 minuten. In 2010 en 2011 werden plaattellingen verricht om vast te stellen of de gebruikte concentraties juist waren. Na het met de hand poten van de velden werd vervolgens gedurende het groeiseizoen het aantal symptoomplanten per veld vastgesteld. De beoordelingen werden zoveel mogelijk 2x per week uitgevoerd.

Resultaten

In de figuren 2.E t/m 2.G wordt het verloop van het percentage aantasting, cumulatief, tijdens de veldperiode weergegeven. In alle figuren is de legenda zodanig opgemaakt dat deze in volgorde staat van het hoogste naar het laagste percentage symptoomplanten per object op de laatste waarnemingsdatum.

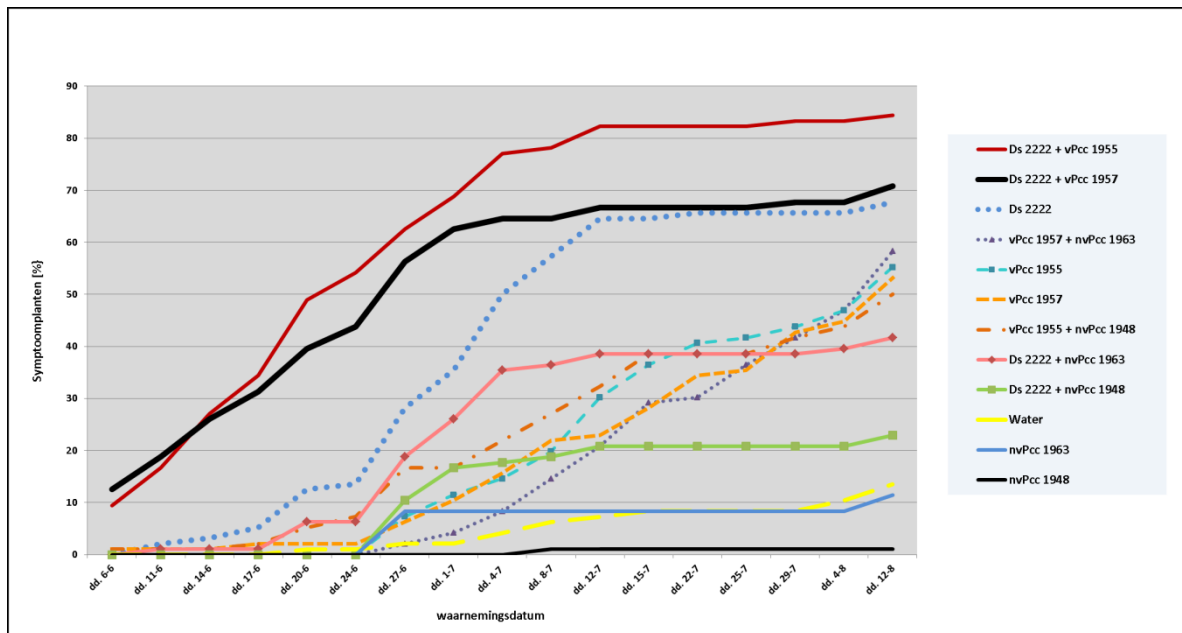
In 2010 viel op dat aan het einde van het seizoen de Erwinia stam vPcc 1957 het hoogste aantal symptoomplanten had, en daarmee de Dickeya stam voorbij streefde. Daarnaast was opvallend dat, daar waar een gezamenlijke besmetting van Dickeya en nvPcc 1937 of nvPcc1963 was aangebracht dat het percentage symptoomplanten achterbleef bij de solo besmetting met Dickeya. Er lijkt hier sprake te zijn van onderdrukking van Dickeya door nvPcc. Het moment van het tonen van symptomen is tussen Dickeya en vPcc erg verschillend. Dickeya lijkt zich vroeg tijdig in het seizoen te openbaren, terwijl de vPcc stammen dit pas veel later in het teeltseizoen laten zien.



Figuur 2.E: Verloop van het percentage symptoomplanten tijdens de veldperiode per behandeling na vacuüm infiltratie [6 herhalingen; 16 knollen per veld; teeltjaar **2010**]

Op basis van de gegevens van 2010 werd in 2011 wederom een interactieproefveld aangelegd. Er werden een aantal nieuwe combinaties aan het onderzoek toegevoegd, waarbij al tijdens de beoordelingen vrij snel duidelijk werd dat de combinatie besmetting met Dickeya en vPcc voor een zeer groot percentage symptoomplanten zorgde. Ook in 2011 werd waargenomen dat het

percentage symptoomplanten bij de combinatie tussen Dickeya en nvPcc lager uitviel dan bij de solo besmetting met Dickeya. Bij een combinatie besmetting met vPcc en nvPcc lijkt dit onderdrukkend effect van de nvPcc niet op te treden.

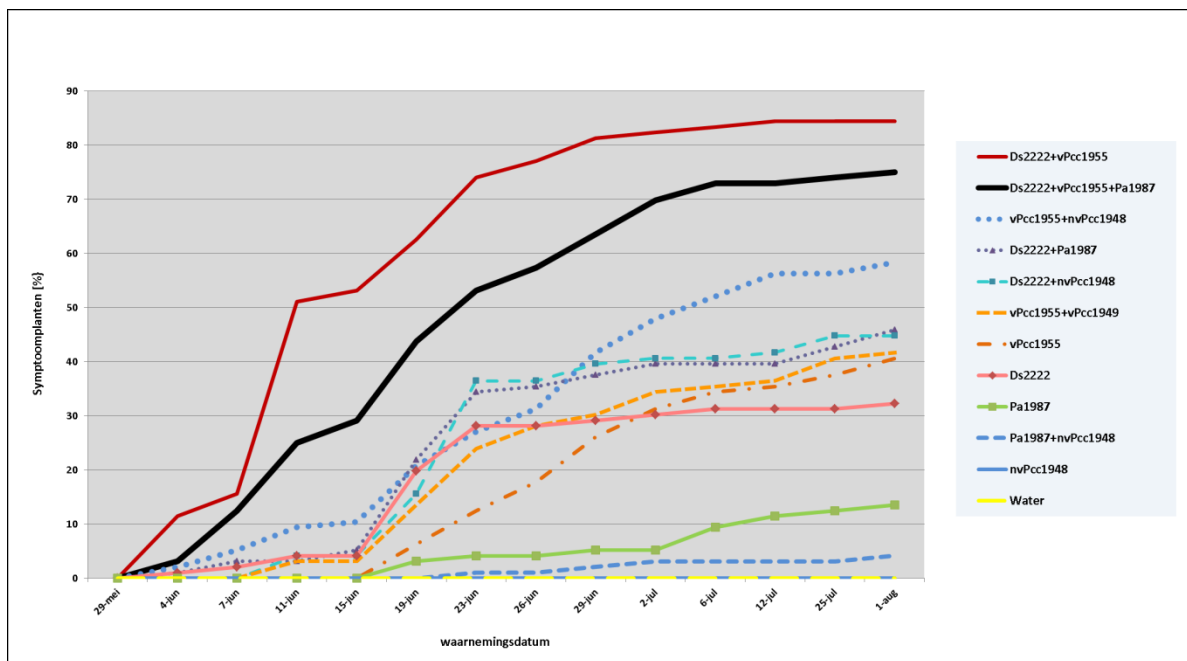


Figuur 2.F: Verloop van het percentage symptoomplanten tijdens de veldperiode per behandeling na vacuüm infiltratie [6 herhalingen; 16 knollen per veld; teeltjaar **2011**]

Ook in 2012 werd het hoogste percentage symptoomplanten gevonden bij de combinatie Dickeya met vPcc. De nieuw toegevoegde combinatie met zowel Dickeya, vPcc als Pa, gaf ook al vroeg veel symptoomplanten te zien. Net als in 2011 gaf de combinatie vPcc met nvPcc geen onderdrukking van de vPcc door nvPcc te zien. Er lijkt eerder sprake van een versterking van de aantasting te zijn. Het aantastingsverloop van zowel Dickeya als ook van vPcc wijkt af van de onderzoek jaren 2010 en 2011.

Conclusie

- In 2010 en 2011 werden de eerste aantastingen gevonden in de objecten waar Dickeya werd gebruikt.
- Het verschil in moment van aantasting tussen Dickeya en vPcc, dat in 2010 werd gevonden, werd in 2011 bevestigd. In 2012 was het verschil minder duidelijk.
- Bij een gecombineerde besmetting van de knollen met Dickeya en vPcc werd in zowel 2011 als 2012 een versnelde en versterkte aantasting van de planten waargenomen.
- Bij de gecombineerde besmetting van Dickeya en nvPcc werden in 2010 en 2011 minder symptoomplanten gevonden. De toevoeging van nvPcc, met name nvPcc1948, leek dus de symptoomexpressie te reduceren. In 2012 werd dit effect niet bevestigd.
- Bij een gecombineerde besmetting van vPcc en nvPcc was in 2011 geen sprake van onderdrukking van de vPcc door nvPcc. Dit werd in 2012 bevestigd.
- Over de jaren heen komen duidelijke effecten op de symptoomexpressie door verschillende Erwinia stammen voor.
- In meerdere jaren kwamen interacties tussen verschillende Erwinia stammen naar voren.
- Het onderzoek jaar 2012 lijkt in meerdere opzichten af te wijken van 2010 en 2011.



Figuur 2.G: Verloop van het percentage symptoomplanten tijdens de veldperiode per behandeling na vacuüm infiltratie [6 herhalingen; 16 knollen per veld; teeltjaar **2012**]

2.8 Ontwikkeling Vacuümtoets

Inleiding

De huidige methode van opsporen van besmettingen met Erwinia in de knol wordt uitgevoerd door het steken van een naveleinde van een knol. Om informatie over de besmettingsgraad van partijen pootaardappelen te krijgen wordt een knolmonster (200 knollen) opgedeeld in een aantal pools. Per pool worden met de huidige werkwijze de naveleinden in een extractie zakje gestopt en verder verwerkt. Uit eerder onderzoek binnen het Erwinia Team is duidelijk geworden dat met het alleen steken van een naveleinde slechts een deel van de aanwezige besmetting kan worden aangetoond (zie onder 2.4).

Aanvullend op het steken van naveleinden is door het Erwinia Team gezocht naar andere typen monsternamen om daarmee een grotere kans te hebben om aanwezige besmettingen ook daadwerkelijk aan te kunnen tonen. Hieruit is het nemen van een schilmonster naar voren gekomen. Door het nemen van een schilmonster kan al een betere uitspraak over de besmettingsgraad van een partij aardappelen worden gedaan. Het is echter duidelijk, dat ook met deze aanvullende monsternamen niet alle aanwezige Erwinia besmettingen aangetoond kunnen worden.

Analoog aan de ontwikkelingen in de bloembollenteelt, waar Erwinia's ook een grote, negatieve, rol spelen, werd in dit onderzoek een verkenning uitgevoerd naar de ontwikkeling van een vacuüm toets. Knolmonsters zouden op een eenvoudige, snelle en goedkope wijze verwerkt moeten kunnen worden, waarbij een grote mate van zekerheid is dat, als er Erwinia in het monster aanwezig is, dit ook daadwerkelijk kan worden aangetoond. De ontwikkeling van de vacuüm toets is in dit onderzoek gebaseerd op het feit, dat Erwinia bacteriën onder zuurstofloze omstandigheden prima kunnen overleven en vermeerderen.

Doel

Het ontwikkelen van een snelle, eenvoudige, betrouwbare en goedkope methode om Erwinia in een knolmonster aan te kunnen tonen.

Uitvoering

De te onderzoeken knollen werden onder vacuüm gebracht, zodat de Erwinia bacteriën alle kans kregen om tot ontwikkeling te komen. Bij de uitvoering werden enkele varianten getoetst om zo vast te stellen wat de meest effectieve werkwijze is en op welke wijze, nog niet eerder aangetoonde Erwinia, toch tot expressie kan worden gebracht. Voor de uitvoering werd, in eerste instantie gebruik gemaakt van aanwezige monsters van het Erwinia Team.

In de oriëntatiefase van dit onderzoek werden verschillende varianten van voorbereiden van de knollen onderzocht. In eerste instantie werd de volgende onderzoek varianten getoetst:

- Gesneden/niet gesneden knollen
- Genavelde/niet genavelde knollen
- Dwars gesneden/in de lengte gesneden
- Met water/zonder water toevoeging
- Extra verrijking in epjes/verrijking in buizen
- Onverrijkte extracten (natuurlijke verrijking)

Voor het onder vacuüm brengen van de monsters werd gebruik gemaakt van een vacuüm machine van het type Henkovic Compact Gastrovac Pro . Dit apparaat was voorzien van de mogelijkheid om de tijdsduur van het vacuüm maken van de monsters te variëren. Ook was dit apparaat voorzien van de mogelijkheid om de seal tijd te variëren.

De toepassing van het onder vacuüm brengen van een knolmonster leek in de oriëntatiefase aan de gestelde doelen te kunnen beantwoorden. Omdat de oriënterende proef echter klein van schaal was, zou een grotere opzet meer duidelijkheid moeten geven over de mogelijkheden van deze werkwijze in de toekomst. Aansluitend op de oriënterende proeven werden vervolgens 10 partijen van telers uit de monitoring (TV-M) verzameld, waarvan de uitslagen bekend waren en die een wisselende besmetting met *Erwinia* hadden laten zien.

Begin 2012 werd een proef ingezet om vast te stellen of de verrijking via de vacuüm toets effect heeft op het type *Erwinia*. De gebruikte *Erwinia* types bij deze proef waren vPcc1957, nvPcc1948, Ds2222 en Pa1987. Zij werden aan knollen van het ras Kondor toegevoegd, die bij eerdere toetsing schoon werden bevonden.

Een verdere optimalisatie van de vacuüm toets werd uitgevoerd door de tijdsduur van de verrijking te onderzoeken. Hiertoe werden de *Erwinia* types vPcc1955, Ds2222 en Pa1987 in de concentraties 10^1 , 10^2 , 10^3 en 10^4 aan knollen van het ras Kondor toegevoegd. Na 1, 2, 4 en 7 dagen werd een monster uit de vacuüm zakken gehaald en onderzocht met een multiplex TaqMan PCR.

Naast de tijdsduur werd ook de hoeveelheid water, die werd toegevoegd bij de te onderzoeken knolmonsters, geoptimaliseerd. In alle oriëntatie proeven werd steeds uitgegaan van 5 ml water per knol. Om vast te stellen of er een relatie bestaat tussen de hoeveelheid water en de maatsortering van de te onderzoeken knollen werden 3 maatsorteringen (28/35, 45/50 en 55/60) onderzocht. Omdat het aantal te onderzoeken knollen in de toekomst zou kunnen variëren werd in deze proef ook direct onderzocht of het aantal knollen in een zak van invloed is op het verrijgingsproces. Daarom werd naast het door het *Erwinia* Team gehanteerde aantal knollen (10 knollen/pool) ook de variant 25 knollen/pool meegenomen. Voor de verwerking van de 25 knollen/pool werden andere zakken gebruikt, namelijk zakken met een afmeting van 40x60 cm.

De vraag of de tijdsduur van verrijking onder vacuüm van invloed is op het aantonen van een aanwezige, natuurlijke besmetting werd separaat onderzocht. Hiertoe werd een partij Desiree met een zeer zware besmetting met *Dickeya solani* bij verschillende tijdsduren van verrijking (4, 7, 9, 11, 14 dagen) in 10 herhalingen onderzocht.

Tenslotte werd een validatie van de vacuümverrijking uitgevoerd op 91 partijen pootaardappelen. Van deze partijen werden zowel navel- als schilmonsters onderzocht. Van alle partijen werd ook een vacuümverrijking ingezet, zodat over een groot aantal partijen duidelijk werd in hoeverre de vacuüm toets werkelijk van toegevoegde waarde zou kunnen zijn.

Resultaten

Tijdens de eerste oriënterende proeven werden verschillende varianten met elkaar vergeleken. De resultaten van deze 1^e oriëntatie gaf te zien dat verrijking onder vacuüm alleen mogelijk is als water aan het monster wordt toegevoegd. Wordt geen water toegevoegd dan ontstaat geen rotting, zodat geen extract uit de plastic zak kan worden gepipetteerd. Tussen knollen waaruit het navelende was verwijderd of volledig intacte knollen werd in het verwerkingsproces geen verschil gevonden.

Doorsnijden van de knollen, met als gedachte dat het proces van rotting kan worden bevorderd, bleek niet van toegevoegde waarde.

Een extra verrijking in PEB of het invoegen van een centrifuge stap bleek geen verbetering van de gevonden Ct-waarden op te leveren.

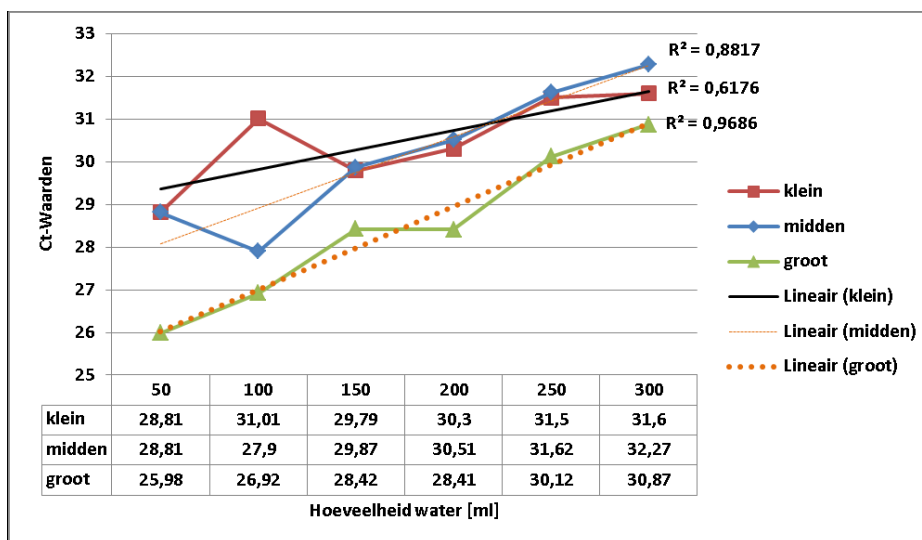
Het onderzoek naar de verrijking van verschillende typen *Erwinia* werd uitgevoerd met Pa1987, Ds2222, vPcc1957 en nvPcc1948 bij een gebruikte concentratie van 10^5 bacteriën. Uit de resultaten werd duidelijk dat het nemen van een extract monster, zonder dat deze nog een extra verrijking in PEB krijgt, en zonder dat de aardappel in de plasticzak worden gecrusht, leidt tot de beste Ct-

waarden bij alle Erwinia types. De gebruikte variant, nvPcc1948 , gaf zoals verwacht in de TaqMan PCR geen uitslag te zien. Tussen het extract monster (2 ml uit de plastic zak) dat in een 2 ml epje werd bewaard, of het extract monster (5ml uit de plasticzak) in een 10 ml Greinerbuis, werd geen verschil in Ct-waarde gevonden. De gevonden Ct-waarden lieten tevens zien dat bij het nemen van meerdere extract monsters uit dezelfde plastic zak een zeer geringe spreiding in de gevonden resultaten laat zien.

De hierboven vermelde Erwinia types werden, met uitzondering van nvPcc1948, ook gebruikt om de verrijking van lage concentraties bacteriën in de loop van de tijd te onderzoeken. Het resultaat liet een duidelijke verbetering zien van de gevonden Ct-waarden bij de uitgevoerde TaqMan PCR bij een toename van de verrijkingsperiode van 1 dag naar 7 dagen. De hoogste toegevoegde concentratie (10^4) gaf, zoals verwacht mocht worden, ook de beste Ct-waarden.

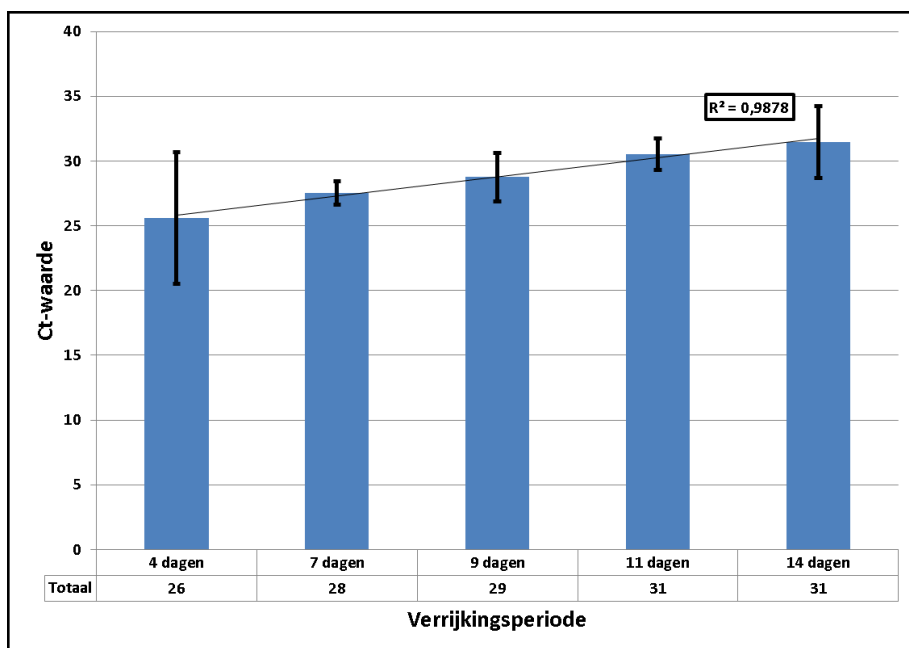
Bij aanvang van het onderzoek naar het gebruik van de vacuüm toets werd gestart met de toevoeging van 5 ml water per knol aan het te verrijken monster. Deze hoeveelheid werd als basis genomen naar aanleiding van een visuele beoordelingen van monsters die met verschillende hoeveelheden water vacuüm werden gezogen. Om echter duidelijkheid te krijgen of dit ook de best mogelijke hoeveelheid is, werd een proef ingezet met verschillende hoeveelheden water bij 3 verschillende maatsorteringen. Het onderzoek werd tevens uitgevoerd bij 2 verschillende hoeveelheden knollen per pool. In figuur 2.H wordt het resultaat voor de pools van 10 knollen weergegeven. Het resultaat voor de pools van 25 knollen was gelijkwaardig aan die van 10 knollen per pool.

Uit figuur 2.H blijkt dat de beste Ct-waarde wordt gevonden bij een hoeveelheid van 5 ml per knol. Ook wordt duidelijk dat het beste resultaat wordt behaald bij de grootste maat knol. Het aantal knollen dat in de verrijking wordt gebruikt blijkt niet van invloed te zijn op het uiteindelijke resultaat.



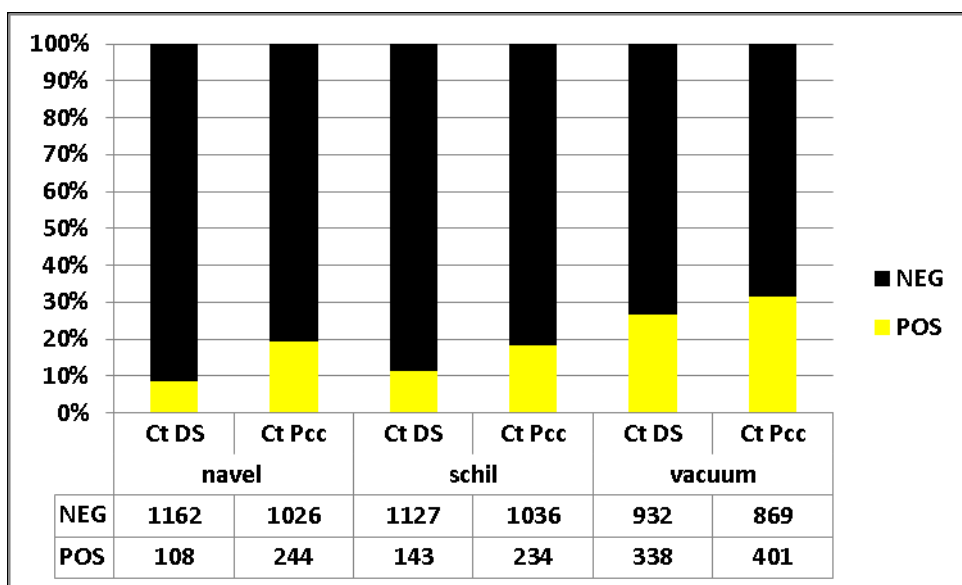
Figuur 2.H: Ct-waarden voor kleine, midden of grote knollen bij verschillende waterhoeveelheden bij een kleine maat zak en 10 knollen per pool.

In figuur 2.I wordt het resultaat weergegeven voor de test waarbij werd gekeken naar de tijdsduur van verrijking. Opvallend is dat de gemiddeld laagste Ct-waarden worden gevonden bij een verrijkingsduur van 4 dagen. Bij deze tijdsduur wordt echter een grote spreiding gevonden, waardoor deze verrijkingsperiode als minder betrouwbaar wordt bestempeld. De kleinste variatie wordt gevonden bij een tijdsduur van 7 dagen verrijken.



Figuur 2.I: Ct-waarden voor *Dickeya solani* na verrijking, bij verschillende tijdsduren in de vacuüm toets

In figuur 2.J wordt het resultaat weergegeven van 91 partijen (1270 sub-samples) pootaardappelen. De partijen aardappelen bestonden uit verschillende rassen en klassen. Op deze partijen werd een vergelijking van navel- en schilextract en vacuüm toets uitgevoerd. Uit figuur 2.J wordt duidelijk dat het aantal positieve reacties voor zowel Ds als vPcc beduidend hoger ligt dan bij de navel- en schilmonsters. Bij 33 van de 91 partijen werd in het navelende geen positieve reactie gevonden. Bij de vacuüm toets werd vervolgens in 16 van de 33 partijen Ds en/of vPcc aangetoond. Omgekeerd werd in 58 partijen, waar in het navelende een besmetting werd aangetoond, in 3 partijen geen besmetting gevonden met de vacuüm toets. Het bleek hierbij steeds te gaan om een aangetoonde minimaal besmetting, 1 -3 van 20 sub-samples, besmet vPcc.



Figuur 2.J: Percentage positieve reacties voor Ds en vPcc bij onderzoek van 91 partijen (totaal 1270 submonsters) pootaardappelen na verwerking van navel- en schilmonsters en de vacuümtoets.

Conclusie

Bij het valideren van de vacuüm toets werden verschillende elementen onderzocht. Op basis van de uitgevoerde onderzoeken kan het volgende worden geconcludeerd:

- Een extra verrijkingstap in PEB, na de natuurlijke verrijking, levert geen meerwaarde op.
- Het toevoegen van PEB aan de natuurlijke verrijking gaf geen meerwaarde te zien.
- Een extra stap in de vorm van het centrifugeren van een extract monster geeft geen verbetering van de Ct-waarden
- Het doorsnijden van de knollen is niet nodig om het rottingsproces te bevorderen.
- Indien aanwezig, kunnen alle 3 typen Erwinia via verrijking in de vacuümtoets worden aangetoond.
- De optimale hoeveelheid water, die moet worden toegevoegd aan het te onderzoeken monster, ligt binnen het traject van 4 tot 10 ml water per knol.
- Het niet toevoegen van water er toe leidt, dat geen rotting optreedt.
- De optimale tijdsduur voor de verrijking is 7 dagen. Bij deze tijdsduur wordt de laagste spreiding in de metingen gevonden met toch goede Ct-waarden.
- Tussen de verwerkte monstergroottes 10 of 25 knollen per pool werden geen noemenswaardige verschillen gevonden, mits de waterhoeveelheid per knol gelijk wordt gehouden.
- Het te verwerken knolmonster bestaat bij voorkeur uit knollen in de maat > 40 mm.
- Een extract monster is een goede afspiegeling van de besmetting die aanwezig is. Indien meerdere monsters uit dezelfde verrijking worden gehaald is sprake van een zeer lage spreiding in de resultaten.
- De verwerking van monsters via de vacuümtoets leidt er toe dat een enorme besparing op arbeid en materiaal kan worden bereikt.
- Het nadeel van de vacuümtoets is dat bij het proces van verrijking geur overlast kan ontstaan. De wijze waarop dit ondervangen kan worden is nog niet duidelijk.
- De meest ideale werkwijze is:
 - Neem een standaard monster van 200 knollen
 - Tel 20 pools van 10 knollen, of 8 pools van 25 knollen, af in plasticzakken met een dikte van 100 µm.
 - De afmeting van de zak is bij voorkeur 33x49 cm. Bij grove knollen kan ook gekozen worden voor zakken van 40x60 cm.
 - Voeg per zak 5 ml water per knol toe
 - Verwerk de zakken in het vacuüm apparaat gedurende 40 seconden
 - Leg de vacuüm getrokken zakken in de bewaring gedurende 7 dagen bij 25 °C
 - Maak na 7 dagen een klein inkeping in de zak en pipetteer extract uit de zak

2.9 Literatuur

1. Haan, E. G. de Haan, T. C. E. M. Dekker-Nooren, G. W. van den Bovenkamp, A. G. C. L. Speksnijder, P. S. van der Zouwen, en J. M. van der Wolf. 2008. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *Eur J Plant Pathol* 122:561–569.
2. De Boer, S. H. 2002. Relative incidence of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in stolon end and peridermal tissue of potato tubers in Canada. *Plant Dis.* 86:960-964.
3. Czajkowski, R., G. J. Grabe, en J. M. van der Wolf. 2009. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *Eur J Plant Pathol* (2009) 125:263–275.
4. Velvis, H. en van der Wolf, J.M. 2008. Project Bacterievrije pootgoedteelt - een uitdaging! 2005 – 2008. Eindrapport van het onderzoek.

3. Teelt en Initiële besmetting

3.1 Algemeen

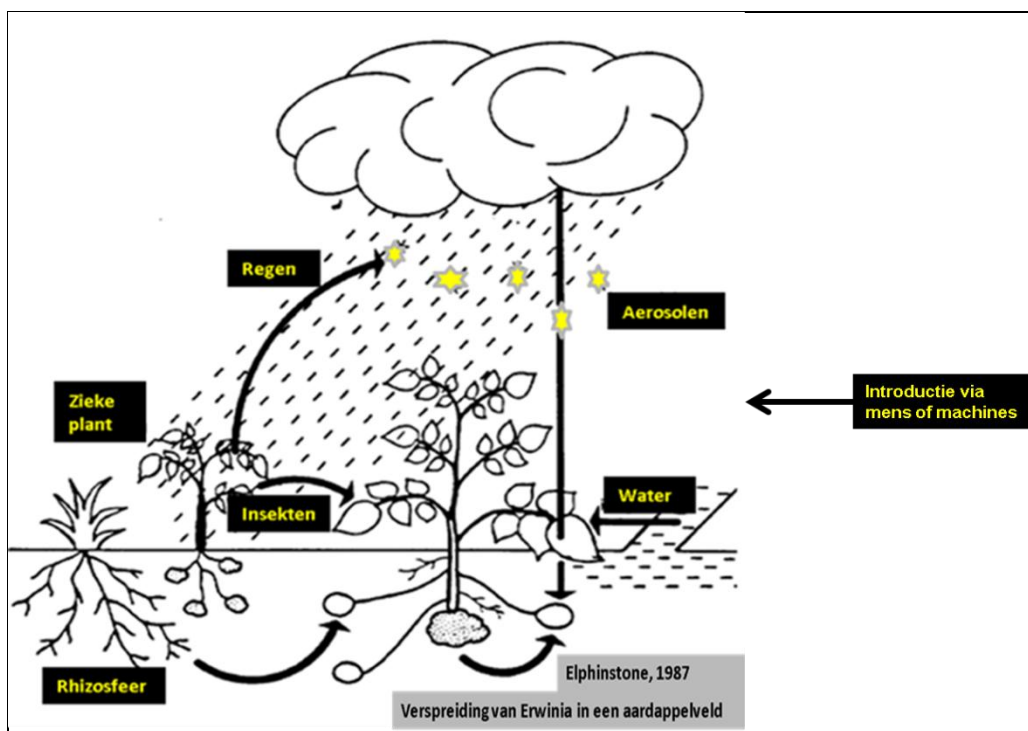
De basis van de pootgoedteelt is de stammenteelt. Elke pootgoedvermeerdering begint weer met een nieuwe eerstejaars stam, die meestal geteeld wordt vanuit miniknollen, en een enkele keer vanuit een traditionele uitgangsstam. Miniknollen worden door de producenten uitvoerig gescreend op allerlei ziektes. Ook binnen het project Bacterievrije Pootgoedteelt (Literatuur 1) is een groot aantal partijen miniknollen onderzocht op *Erwinia*. De conclusie was dat de in Nederland gebruikte partijen miniknollen vrij zijn van *Erwinia*.

Desondanks blijkt in de praktijk dat vaak al in het eerste of tweede jaar van de vermeerdering problemen met *Erwinia* optreden. Eén van de grote vragen is daarom hoe die eerste, initiële, besmetting de teelt binnenkomt. Theoretisch zijn er verschillende wegen waarlangs een *Erwinia* besmetting een schoon gewas kan binnenkomen. Dat kan door overdracht via machines of menselijke betreding, of door transport via grondwater van een besmetting uit een naburig perceel. Het kan ook door overdracht via de lucht, in de vorm van besmettingen in regenwater, in aerosolen (minuscule waterdruppeltjes), of in insecten die een besmetting elders hebben opgepikt. Tot slot is het ook mogelijk dat *Erwinia* op een of andere wijze in de grond overleeft gedurende een vruchtwisselings-periode tussen twee aardappelteelten (zie schema figuur 3.A).

In het Deltaplan *Erwinia* is getracht een beeld te krijgen van de processen die verantwoordelijk zijn voor deze initiële besmetting.

Het onderzoek bestond uit een drietal onderdelen: 1. een vierjarige *Monitoring* bij stammentelers vanuit miniknollen, 2. (mede naar aanleiding van de waarnemingen tijdens de Monitoring) onderzoek in veldproeven naar de verspreiding van *Erwinia*, en 3. overleving in percelen met een zware besmetting met *Erwinia*.

Deze onderdelen worden in de volgende paragrafen besproken. Aan het eind van dit hoofdstuk wordt een aantal conclusies en aanbevelingen geformuleerd ten aanzien van de initiële besmetting.



Figuur 3.A: Mogelijke introductieroutes van *Erwinia* in het veld.

3.2 Monitoring bij mini-telers

Inleiding

In het project Bacterievrije pootgoedteelt was een aantal risicofactoren onderzocht die bij de initiële besmetting een rol zouden kunnen spelen. Ook was bij een aantal mini-telers onderzoek gedaan naar de besmetting van de partijen in de loop van de eerste vier vermeederingsjaren. Geconstateerd werd dat bij veel partijen al vanaf het tweede vermeederingsjaar latente besmetting met *Erwinia* optrad. De conclusie was dat dit onderzoek te globaal was om de mechanismen achter de eerste besmettingen te kunnen achterhalen, en dat daarvoor een nauwkeuriger monitoring van de processen op bedrijfsniveau vereist was. Daaraan is in het Deltaplan *Erwinia* uitvoering gegeven. De methodes voor detectie van *Erwinia* zijn sinds de beëindiging van het eerste project aanzienlijk verbeterd (zie hoofdstuk 2). Behalve dat volledig overgestapt werd van de Elisa methode, waarbij vaak vals positieve reacties optraden, naar de PCR methode, kon ook het *Erwinia* type vPcc in het onderzoek worden meegenomen.

In 2009 is een monitoring gestart van de initiële besmetting met *Erwinia* op een elftal praktijkbedrijven.

Doel

Het doel was na te gaan hoe en wanneer *Erwinia* voor het eerst een schone teelt binnenkomt.

Uitvoering

Gestart werd met partijen miniknollen van de rassen Kondor en Spunta. In 2010 is een tweede lijn gestart bij dezelfde telers. Deze twee jaargangen worden aangeduid als 08V en 09V stammen.

In elk vermeederingsjaar is per stam een proefvak met ongeveer 500 planten gemarkeerd, waaruit de veldmonsters tijdens het groeiseizoen zijn genomen. Uit diverse stadia van de teeltcyclus is een groot aantal monsters verwerkt en op *Erwinia* onderzocht. Een overzicht:

- *Knollen vóór poten.* Monsters van 200 knollen vlak vóór het poten. Van de knollen is t/m 2011 steeds het navelend en een stukje van de schil genomen voor de analyse van *Erwinia*. In 2012 zijn de knollen verwerkt met de vacuüm verrijking (zie hoofdstuk 2).
- *Poten.* Hieronder vallen alle monsters die van de pootmachines zijn genomen: veegmonsters van sponsrollen, snarenbed, transportband, monsters van grond- of kiemrestjes, etc.
- *Onkruiden.* Verzameld gedurende de maand juni. In de wortels van de onkruiden is *Erwinia* bepaald.
- *Grond.* In 2009 en 2010 zijn grondmonsters genomen in uit de ruggen tussen de aardappelplanten. In 2011 en 2012 zijn in plaats daarvan de wortels van aardappelstengels met aanhangende grond onderzocht (rhizosfeer). Deze zijn meegerekend onder de categorie plantdelen in het veld.
- *Plantdelen in het veld.* In 2009 en 2010 zijn gedurende het groeiseizoen stengelmonsters genomen, waarbij *Erwinia* is bepaald in het ondergrondse stengeldeel. Ook in 2011 en 2012 zijn in de weer stengels bemonsterd, maar nu is *Erwinia* afzonderlijk bepaald in blad, ondergrondse stengel en wortelomgeving.
- *Loofklappen.* Hieronder vallen alle monsters die bij het loofklappen zijn genomen. Meestal was dat 'loof prut' uit de binnenkant van de klapper, soms waren het loofresten van tussen de ruggen.
- *Rooien.* Dit zijn alle monsters die bij het rooien zijn genomen. Dat kunnen veegmonsters zijn van verschillende onderdelen van de rooimachine, maar ook rotte moeder- of dochterknollen die tijdens het rooien zijn verzameld.
- *Knollen na het rooien.* Ook in het najaar zijn steeds weer monsters van 200 knollen bij de telers opgehaald, die op dezelfde manier werden verwerkt als de knollen vóór het poten.

- *Bewaren/sorteren/afkiemen.* Hieronder vallen alle monsters die in de winterperiode zijn genomen tijdens bewaren, sorteren, of afkiemen. Veegmonsters van transportbanden, stortbakken, leesbanden, bunkers, monsters van kiemen, sorteergrond of rotte knollen, etc.

Monsters van poot, loofklap- of rooimachines werden veelal door de telers zelf genomen, evenals bij de bewerkingen gedurende de bewaarperiode.

Behalve bovengenoemde monsters, werden door de telers ook incidenteel monsters genomen van regenwater, spuitwater, water tussen ruggen, en veegmonsters van selectiepijpen of banden van sproeimachines. Sommige telers waren zeer actief in het leveren van dergelijke monsters, anderen niet of weinig.

Verder hebben de telers ieder jaar een formulier gekregen waarop zij hun teeltgegevens konden invullen.

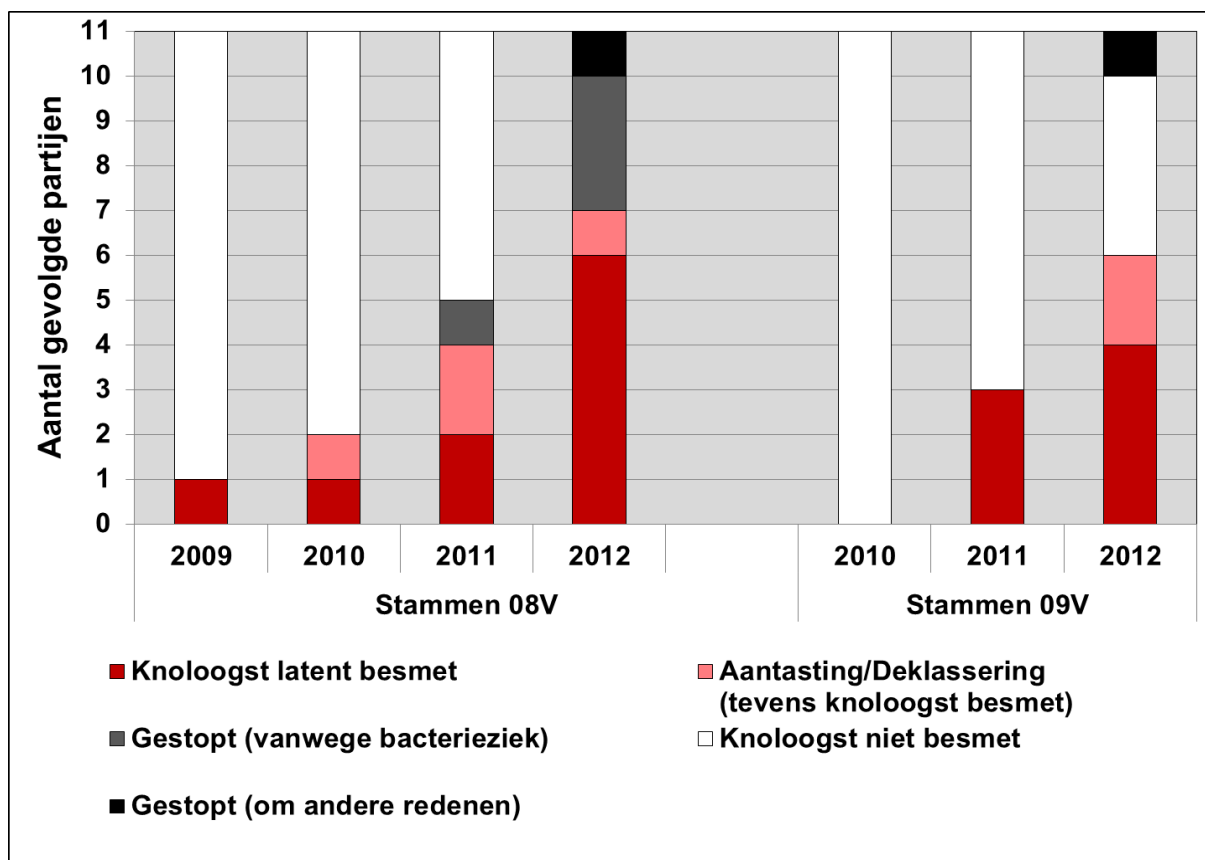
Resultaten

Gedurende de vier jaren die de monitoring geduurd heeft, zijn duizenden monsters geanalyseerd. Ter wille van het overzicht worden de gegevens hier sterk samengevat.

Verloop van de besmettingen

Eerst wordt een overzicht gegeven van het verloop van de besmettingen in de partijen in de vier, respectievelijk drie, veldvermeerderingen van de 08V en 09V stammen. Daarbij is geen onderscheid gemaakt tussen Kondor en Spunta, omdat er geen verschil geconstateerd is in besmettingen van beide rassen.

In figuur 3.B wordt getoond hoe de ontwikkeling was in de besmetting van de dochterknollen na de rooi van de partijen. Daarbij is ook aangegeven bij hoeveel van de partijen aantasting gevonden was in het veld, ten gevolge waarvan de partij werd gedeclasseerd ofwel de vermeerdering gestopt. Bij de 08V stammen werd al in het eerste jaar een besmetting gevonden in één van de partijen. In het tweede jaar werd de eerste veldaantasting gevonden. Na vier veldvermeerderingen waren tien van de elf partijen hetzij latent besmet, hetzij aangetast in het veld en daarom uit de roulatie genomen. Met één partij is gestopt zonder dat er aantasting of besmetting in de knollen was gevonden. Wel werden ook hier in andere monsters tijdens de teeltcyclus besmettingen aangetoond.



Figuur 3.B: Besmetting van knolmonsters (najaar) met *Erwinia* bij de 11 gevolgde telers, in de 08V en 09V partijen van Kondor en Spunta.

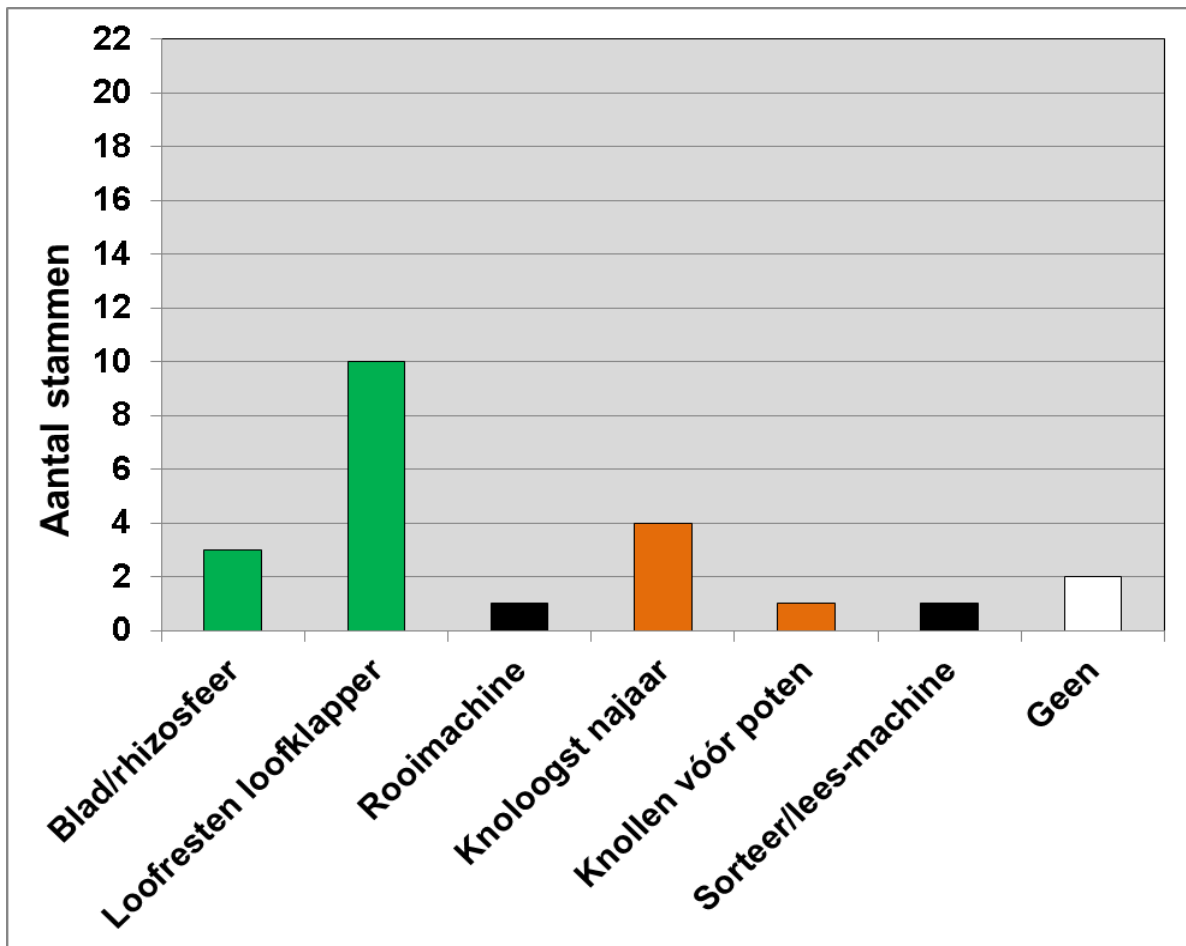
Bij de 09V stammen was de trend dezelfde als bij de 08V. Hier traden in het tweede jaar de eerste latente besmettingen op. In het derde jaar waren vier partijen latent besmet en was bij twee andere partijen aantasting geconstateerd in het veld. Ook bij de 09V stammen is met één partij gestopt om andere redenen dan bacterieziekte.

Van de verschillende *Erwinia* types kwam vPcc verreweg het meest voor. In 41% van de besmette partijen dochterknollen werd alleen vPcc gevonden, en eveneens in 41% van de partijen een combinatie van vPcc met *Dickeya* (Ds). Besmetting met alleen Ds kwam ook enkele keren voor (12%), maar Pa werd slechts bij één partij in combinatie met vPcc gevonden (6%).

De snelheid waarmee de vitrostammen besmet raken tijdens de eerste veldvermeerderingen is verontrustend te noemen.

De eerste besmettingen

De kernvraag bij de initiële besmetting is waar de besmetting de teelt is binnengekomen. In figuur 3.C is weergegeven in welke monsters de allereerste besmettingen zijn aangetroffen. De gegevens zijn samengevat voor beide jaargangen en rassen over de hele periode van monitoring.



Figuur 3.C: *Overzicht van monsters waarin de eerste besmetting met Erwinia is gevonden tijdens de monitoring van 08V en 09V stammen van Kondor en Spunta.*

De helft van de eerste besmettingen is gevonden in monsters van loofresten uit de loofklapper. Al in het eerste vermeerderingsjaar van de 08V stammen, werd bij zes van de zeven telers die het loof geklapt hebben, besmetting aangetoond in loofklapmonsters. Bij de 09V stammen werden de eerste besmettingen gevonden in het tweede vermeerderingsjaar, in blad- en rhizosfeermonsters, in loofklapmonsters, en in de dochterknollen. Blad-, stengel- en rhizosfeermonsters zijn pas in de laatste twee jaren van de monitoring afzonderlijk onderzocht. In de eerste twee jaren werden alleen monsters van de ondergrondse stengel genomen. Het aandeel van blad- en rhizosfeerbesmettingen kan dus kan dus onderschat zijn.

Een aantal keren werd de eerste besmetting aangetoond in de dochterknollen of in het knolmonster van vóór het poten, en incidenteel in monsters van de rooimachine of tijdens het sorteren.

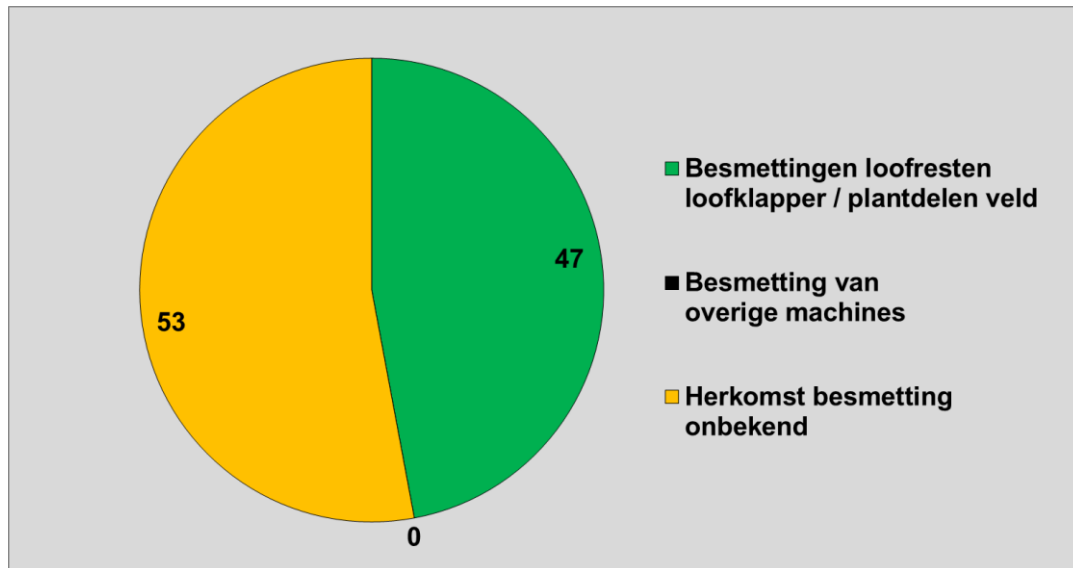
In de overige monsters uit het veld of van machines en selectiepijpen e.d. is geen besmetting gevonden. Wel werd in twee van de achtenzeventig (2,6 %) ontvangen regenwatermonsters een besmetting met Ds aangetoond. Deze monsters zijn niet direct te relateren aan de gevolgde stammen, omdat ze veelal afkomstig waren uit regenmeters bij de boerderij. Eén van de besmette regenwatermonsters werd opgevangen bij de locatie van waaruit het onderzoek plaatsvond (HZPC R&D - Metslawier).

Herkomst van de besmettingen

Getracht is om uit het besmettingspatroon van de gevolgde stammen te achterhalen of de gevonden knolbesmettingen te herleiden zijn tot in het voortraject gevonden besmettingen (figuur 3.D).

In 47 % van de gevallen was er een verband te leggen met de besmettingen die aangetroffen zijn in loofresten uit loofklappers of besmettingen van planten (blad/rhizosfeer) in het veld. Hoewel er enkele besmettingen zijn gevonden op rooi- of sorteermachines, kon hieruit bij geen van de partijen de knolbesmetting verklaard worden. Meestal betrof het rot knolmateriaal van moeder- of dochterknollen. Dat betekent dat de besmetting al in de partij aanwezig was, en niet afkomstig van de machines zelf.

Bij 53 % van de knolbesmettingen kon geen oorzakelijk verband worden gevonden met besmettingen in het voortraject. Deels kan dit komen doordat gewerkt wordt met steekproeven, of doordat monsters niet genomen zijn. Met name bij de monsters die door de telers zelf genomen moesten worden, kwam dit nogal eens voor.



Figuur 3.D: Besmettingen in de teeltcyclus waartoe de besmettingen van de partijen dochterknollen te herleiden zijn.

Wat betreft de vele besmette loofklapmonsters in het eerste jaar van de 08V stammen, is bij de betreffende telers navraag gedaan over hoe men met de klapper het veld is ingegaan. Drie van de zes telers waren met een schone droge klapper in de eerstejaars stammen begonnen. Twee van de zes hadden eerst een E- respectievelijk A-stam geklapt en vervolgens de klapper met een hogedrukspuit schoongespoten en ontsmet (1 van de 2). Eén teler had eerst enkele 2^e en 3^e-jaars geklapt en nadien de klapper niet schoongespoten. De analysegegevens met aanvullende informatie wijzen erop dat in de meeste gevallen de besmetting al in het loof van de 1^e-jaars stammen aanwezig moet zijn geweest en niet met de loofklapper zelf het veld is binnengebracht.

Teeltgegevens

De teeltgegevens die door de telers geleverd zijn, gaven geen nadere aanknopingspunten voor het optreden van de eerste (initiële) besmettingen. In feite raakten bijna alle partijen besmet met Erwinia. Er kon dus geen onderscheid gemaakt worden tussen een groep telers die geen problemen had en een groep die wel problemen had. Wel is gekeken of er verband was tussen de teeltmaatregelen, met name op een aantal cruciale punten, en het tijdstip waarop de eerste besmettingen zijn gevonden. Ook daaruit kon geen duidelijk patroon worden afgeleid.

Conclusie

Uit de Monitoring kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- In de loop van de eerste vermeerderingsjaren vanaf miniknollen nam de besmetting van de dochterpartijen snel toe.
- De eerste besmettingen werden meestal gevonden in monsters van loofresten uit loofklappers.
- De eerste introductie van de besmettingen konden niet worden toegeschreven aan de gebruikte machines.
- Bij ongeveer de helft van de besmettingen in de dochterknollen was er een verband aan te wijzen met de eerder gevonden besmettingen in m.n. monsters van geklapte loofresten.
- De overige knolbesmettingen konden niet worden herleid tot eerdere besmettingen in het voortraject.

3.3 Veldproeven verspreiding Erwinia

Inleiding

De resultaten van de monitoring, met name waar het de veelvuldige besmetting van loofresten uit loofklappers betreft, waren aanleiding voor het uitvoeren van aanvullend veldonderzoek waarin de verspreiding van Erwinia nader werd bestudeerd. Dit werd uitgevoerd in de jaren 2011 en 2012 op een proefveld in Munnekezijl. Daarnaast is in 2010 een proef uitgevoerd, waarbij luchtmonsters zijn genomen tijdens het loofklappen.

Doel

Onderzoek naar de manier waarop Erwinia zich in het veld verspreidt vanuit een besmettingsbron.

Uitvoering veldproeven verspreiding

In beide jaren werd het proefveld werd aangelegd met een twaalfstal sub-veldjes. Elk sub-veldje bestond uit 11 rijen van 6 meter. In de middelste rij werden met Erwinia besmette knollen gepoot. Bij 6 veldjes werden de knollen besmet met de streptomycine resistente Ds stam, bij de andere 6 met een vPcc stam. De knollen werden besmet d.m.v. vacuïminfiltratie met een bacteriesuspensie met een dichtheid van 10^7 bacteriën per ml. In de overige tien rijen van de veldjes werden miniknollen gepoot.

Per veldje werden 2 insectenvangbakjes geplaatst (zie foto 3.A). In 2012 werden daarnaast ook vangbakjes geplaatst die afgedekt waren met insectengaas. Deze waren bedoeld voor de opvang van regenwater en aerosolen.

Gedurende het groeiseizoen werden om de twee weken monsters genomen van blad en grond uit 2^e en 4^e rij vanaf besmette rij, ter weerszijden hiervan. Op één van de monstertijdstippen in 2012 zijn ook monsters van de ondergrondse stengel genomen. Tussen de sub-veldjes in werden laarzen, selectiepijpen en grondboor steeds ontsmet.

De inhoud van de insecten- en aerosolenbakjes werd 1 (2011) of 2 (2012) keer per week bemonsterd. De insecten werden afgevangen op insectengaas en vervolgens verrijkt in PEB. Van de inhoud van de aerosolenbakjes werd 50 ml gecentrifugeerd, waarna de pellet eveneens verrijkt werd in PEB.



Foto 3.A: Proefveld Verspreiding van Erwinia 2011.

Het loof van de veldjes werd begin augustus doodgespoten. Een aantal weken na het doodspuiten werden ook dochterknollen geoogst. Van naveleind en schilmonsters werd een verrijking ingezet.

Alle verrijkte monsters zijn vervolgens geanalyseerd met PCR op de verschillende Erwinia types.

Uitvoering proef luchtmonsters

In 2010 werden in één van de loofvernietigingsproefvelden luchtmonsters genomen tijdens het loofklappen. In de sub-veldjes van dit proefveld bevonden zich besmette stroken, waarin met Ds of vPcc behandelde knollen waren gepoot. De luchtmonsters werden tijdens het klappen van deze stroken genomen op een afstand van ongeveer twee meter vanaf het te klappen gedeelte. De luchtmonsters werden via een slang, met aan het eind een trechter bevestigd, met een vacuümpomp aangezogen en door een incubatiefles met PEB verrijkingsmedium geleid. Na een aanzuigperiode van 5 minuten werden de incubatieflessen afgesloten en op het lab geïncubeerd bij 25°C. Na verrijking werden de suspensies onderzocht op Erwinia.

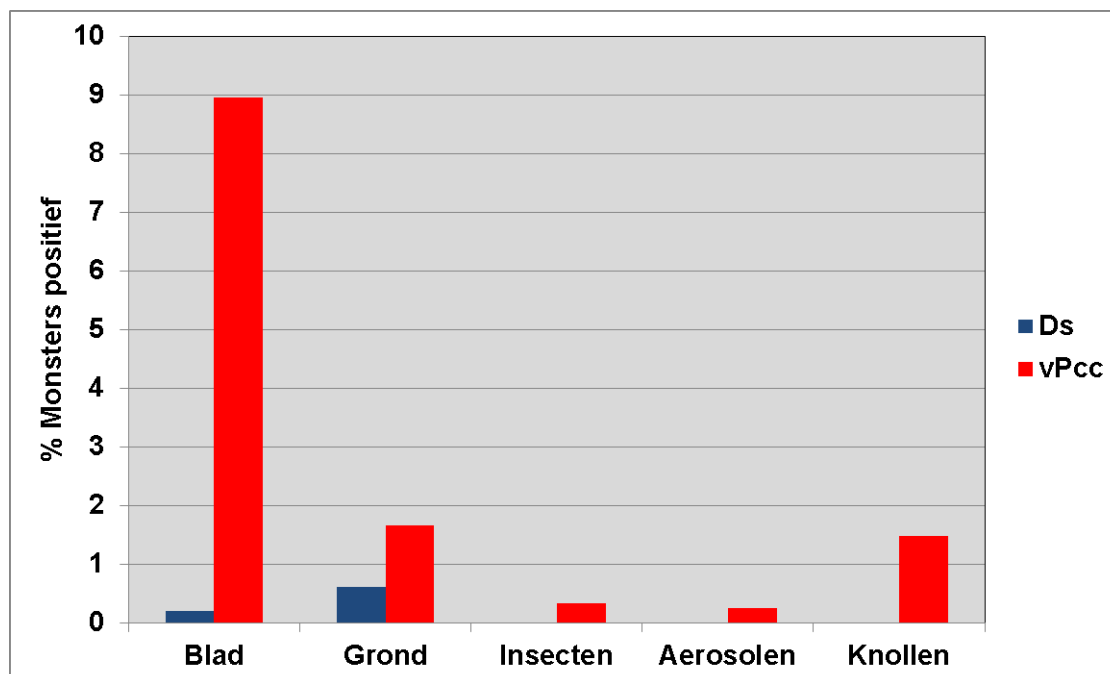
Resultaten veldproeven verspreiding

Ter wille van het overzicht zijn de uitkomsten van alle bemonsteringen over de twee onderzoek jaren in één figuur samengevat (figuur 3.E). Daaruit blijkt dat m.n. in de bladmonsters vaak besmetting met vPcc werd aangetroffen. De besmetting nam toe in de loop van het groeiseizoen. In de eenmalig genomen stengelmonsters kon geen vPcc worden aangetoond, hoewel de bladbesmetting bij dezelfde bemonstering rond de 20% lag. Bladbesmetting met Ds werd slechts een enkele keer gevonden.

Grondmonsters waren veel minder frequent met vPcc besmet dan bladmonsters.

Ook in de insecten- en aerosolenbakjes werd incidenteel vPcc aangetoond.

Aan het eind van het seizoen kon een lichte besmetting met vPcc in de dochterknollen worden teruggevonden.



Figuur 3.E: *Besmetting van monsters met Ds of vPcc op enkele rijen afstand van een besmette rij (samenvatting van alle bemonsteringen in 2011 en 2012).*

Resultaten proef luchtmonsters

Bij de luchtmonsters die tijdens het loofklappen genomen zijn kon zowel voor Ds als vPcc in 1 van de vier herhalingen het betreffende Erwinia type ook in het luchtmonster worden aangetoond. Dat betekent dat er tijdens zo'n turbulente fase in het gewas via de lucht transport van Erwinia van de ene plek naar de andere kan plaatsvinden. Dit geldt zowel voor Ds als vPcc.

Conclusie

Uit de onderzoeken naar verspreiding van Erwinia in het veld kan het volgende worden geconcludeerd:

- De frequente besmetting met vPcc van vooral bladmonsters en de besmetting die in insecten- en aerosolenbakje werd aangetroffen, wijzen erop dat de verspreiding m.n. via de lucht heeft plaatsgevonden. Voor Ds is dit niet duidelijk.
- Het onderzoek van luchtmonsters laat zien dat transport van besmettingen via de lucht kan plaatsvinden. Dit geldt zowel voor vPcc als Ds.
- Niet zeker is of de verspreiding is toe te schrijven aan insecten, aerosolen of eventueel stofdeeltjes als dragers van de besmetting. Daarvoor is nauwkeuriger onderzoek vereist.

3.4 Onderzoek naar overleving in zwaar besmette percelen

Inleiding

Een belangrijke vraag is nog steeds of Erwinia, in een perceel dat zwaar besmet geweest is met de bacterie, kan overleven in de grond, of via wortels van onkruiden of tussengewassen. Onderzoek heeft tot nu toe niet kunnen aantonen dat Erwinia in staat is in het veld te overwinteren.

Gedurende de jaren 2009 t/m 2011 is op een aantal percelen, waarop in het daaraan voorafgaande jaar zwaar met Erwinia besmette partijen aardappels hadden gestaan, onderzocht of de bacterie zich in de grond of op onkruiden en volggewas had gehandhaafd.

Doel

Bepalen of Erwinia in het veld overleeft nadat er een besmette partij aardappelen op heeft gestaan.

Uitvoering

In totaal zijn gedurende de onderzoeksperiode 8 percelen onderzocht, twee in 2009 en drie in elk van de beide jaren daarna. Gedurende het seizoen zijn monsters genomen van het volggewas, van onkruiden en van de grond. Bij het volggewas en de onkruiden werd de besmetting met Erwinia bepaald in de wortels, inclusief aanhangende grond. Van de wortels werden crush-extracten gemaakt in water, en hiermee werd een verrijking ingezet in PEB. De grondmonsters werden met een grondboor (guts) gestoken uit de bouwvoor. Een schudextract hiervan in water werd gecentrifugeerd, en vervolgens werd de pellet verrijkt in PEB.

In de drie percelen van 2011 werden tussen het volggewas bovendien 50 miniknollen gepoot, verspreid over het perceel. De planten bleven klein, maar toch konden er aan het eind van het seizoen stengelmonsters en dochterknolletjes worden geoogst. Ook hierin werd Erwinia bepaald.

Resultaten

In de wortelmonsters van volggewassen en de grondmonsters is geen enkele keer *Erwinia* aangetroffen (Tabel 3.A). Bij de onkruidmonsters werd alleen in het wintertarwe perceel van 2010 incidenteel een besmetting met *Ds* gevonden. Dit was een perceel waarop ook veel aardappelopslag planten aanwezig waren, die veelvuldig besmet waren met *Ds*. Het vermoeden bestaat dat de besmetting hier via het grondwater overgebracht is naar de onkruidwortels.

Opvallend is de *vPcc* besmetting die gevonden is in de mini-planten in het bietenperceel van 2011. Gezien de ligging van het perceel kon dit niet worden toegeschreven aan transport via het grondwater vanuit een naburig perceel. De (weinige) opslagplanten die in het perceel gevonden werden, waren niet besmet. Overleving in de grond zelf lijkt niet waarschijnlijk, omdat noch in de grondmonsters, noch in de wortelmonsters van de bieten en de onkruiden een besmetting is gevonden. Het meest waarschijnlijke is dat ook hier de besmetting via de lucht tot stand gekomen is.

Conclusie

Uit de onderzoeken naar de overleving van *Erwinia* in het veld kan het volgende worden geconcludeerd:

- Introductie van *Erwinia* door overleving van de bacterie in het perceel gedurende de voorafgaande vruchtwisselings-periode, in grond of via tussengewassen en onkruiden, is niet waarschijnlijk.
- De overleving via aardappelopslag blijft een punt van aandacht.

Jaar	Volggewas	Volggewas			Grond			Onkruiden			Aardappelopslag			Mini-planten		
		Pa	Ds	vPcc	Pa	Ds	vPcc	Pa	Ds	vPcc	Pa	Ds	vPcc	Pa	Ds	vPcc
2009	Gras	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	Mais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
2010	Gras	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	Kool	0	0	0	0	0	0	0	0	0						
	Wintertarwe	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	35	5			
2011	Mais	0	0	0	0	0	0	0	0	0				0	0	0
	Kool	0	0	0	0	0	0	0	0	0				0	0	0
	Suikerbiet	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15

■ = *Dickeya* (Ds) ■ = *vPcc* 0 = geen *Erwinia*

Tabel 3.A: Besmetting met *Erwinia* in percelen waarop in het voorafgaande jaar een zwaar met *Erwinia* besmette partij aardappelen had gestaan (de cijfers geven het percentage analyses met een positieve uitslag aan).

3.5 Conclusies Initiële Besmetting

Het onderzoek dat uitgevoerd is naar de oorzaken van de initiële besmetting brengt ons tot de volgende conclusies:

1. In de eerste vier veldvermeerderingen vanuit miniknollen vindt een snelle introductie en opbouw van de Erwinia besmetting plaats.
2. De eerste introductie van Erwinia in een schoon perceel is niet evident toe te schrijven aan besmette machines. Ook de vele besmettingen die in loofklapmonsters zijn gevonden kunnen niet aan introductie door de loofklapmachine zelf worden toegeschreven.
3. Waarnemingen van de Monitoring en van het flankerend onderzoek naar verspreiding van Erwinia wijzen op introductie m.n. via de lucht. Of insecten dan wel aerosolen of andere deeltjes hierin de vectoren zijn, kan niet met zekerheid worden gezegd. Hiervoor is nader onderzoek nodig.
4. In een aantal gevallen is de herkomst van de besmetting nog steeds niet duidelijk.
5. Introductie van Erwinia door overleving van de bacterie in het perceel gedurende de voorafgaande vruchtwisselings-periode, in grond of via tussengewassen en onkruiden, is niet waarschijnlijk. De overleving via aardappelopslag blijft een punt van aandacht.

De conclusies betreffende de eerste introductie via de lucht stemmen overeen met die van internationaal onderzoek (Literatuur 2 t/m 13). In een aanvullend onderzoek door Plant Research International kon het optreden van bladbesmettingen met pathogene Erwinia's in eerstejaars veldvermeerderingen nog niet worden bevestigd (zie elders in dit rapport).

3.6 Literatuur:

1. Velvis, H. en van der Wolf, J.M. 2008. Project Bacterievrije pootgoedteelt - een uitdaging! 2005 – 2008. Eindrapport van het onderzoek.
2. Graham, D.C. and M.D. Harrison (1975). Potential spread of *Erwinia* spp. in aerosols. *Phytopathology* 65: 739-741.
3. Graham, D.C. (1976). Re-infection by *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al. in potato stocks derived from stem cuttings. *EPPO Bull.* 6 (4) : 243-245.
4. Graham, D.C., C.E. Quinn, and M.D. Harrison (1976). Recurrence of soft rot coliform bacterial infections in potato stem cuttings : an epidemiological study on the central nuclear stock production farm in Scotland 1976-74. *Potato Res.* 19: 3-20.
5. Harrison, M.D., C.E. Quinn, I. Ann Sells, and D.C. Graham. 1977. Waste potato dumps as sources of insects contaminated with soft rot coliform bacteria in relation to recontamination of pathogen-free potato stocks. *Potato Res.* 20:37-52.
6. Harrison, M.D. 1980. Aerosol dissemination of bacterial plant pathogens. *Annales of the New York Academy of Sciences*, 353: 94-104.
7. Kloepper, J.W., M.D. Harrison, and J.W. Brewer. 1979. The association of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and *Erwinia carotovora* var. *carotovora* with insects in Colorado. *Am. Potato J.* 56:351-361.
8. Kloepper, J. W., Brewer, J. W. & Harrison, M. 1981. Insect transmission of *Erwinia carotovora* var. *carotovora* and *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* to potato plants in the field. *Am. Potato J.* 58, 165–175.
9. Molina, J.J., M.D. Harrison, and J.W. Brewer. 1974. Transmission of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* by *Drosophila melanogaster*. I. Acquisition and transmission of the bacteria. *Am. Potato J.* 51:245-250.
10. Perombelon, M.C.M., R. Lowe, and E.M. Ballantine. 1976. Contamination by *Erwinia carotovora* of seed potato stocks of stem cutting origin in the process of multiplication. *Potato Res.* 19:335-347.
11. Perombelon, M.C.M., R. A. Fox and R. Lowe. 1979. Dispersion of *Erwinia carotovora* in aerosols produced by the pulverization of potato haulm prior to harvest. *Phytopath. Z.*, 94: 249-260.
12. Perombelon, M.C.M., R. Lowe, C.E. Quinn, and I. Ann Sells. 1980. Contamination of pathogen-free potato stocks by *Erwinia carotovora* during multiplication: result of a six-year monitoring study. *Potato Res.* 23: 413-425.
13. Quinn, C.E., I. Ann Sells, and D. C. Graham. 1980. Soft Rot *Erwinia* Bacteria in the atmospheric bacterial aerosol. *Journal of Applied Bacteriology*, 49: 175-181.

4. Versmering tijdens de teelt

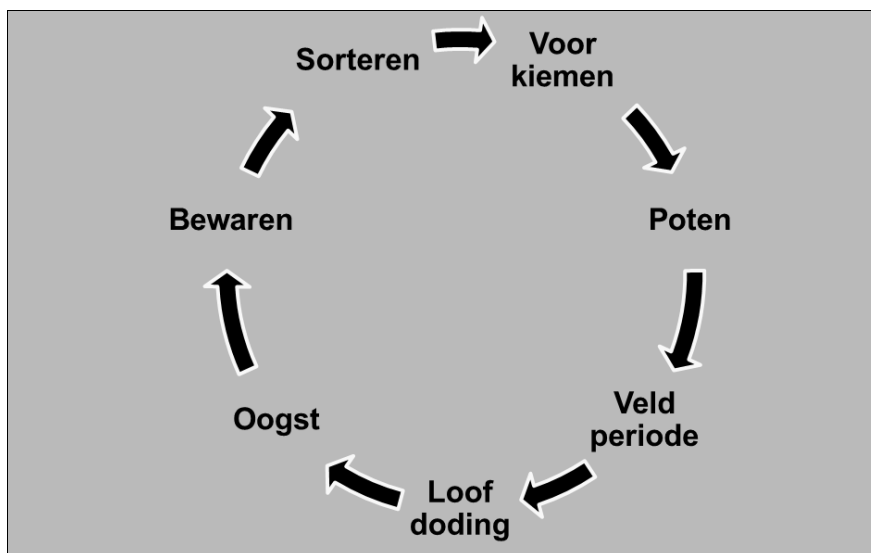
4.1 Algemeen

Binnen het thema “Versmering tijdens de teelt” wordt het onderzoek, dat in de periode 2009 – 2012 is uitgevoerd, gepresenteerd dat gericht was op het vinden van de meest kritische momenten binnen de teelt waar de meeste versmering optreedt.

Aan het begin van het onderzoek is vastgesteld dat de versmering grotendeels terug te herleiden is tot momenten waarbij de aardappelen “in beweging” zijn. Deze momenten zijn weergegeven in de teeltcyclus (figuur 4.A).

Indien een partij pootaardappelen een eerste besmetting heeft opgelopen, zoals in hoofdstuk 3 omschreven, moet worden voorkomen dat deze besmetting zich verder door de partij, of in het veld, verspreidt. Om preventie maatregelen te kunnen nemen zal eerst duidelijk moeten zijn wanneer de grootste kans op versmering optreedt.

Omdat zeer veel factoren een rol kunnen spelen bij de versmering is gekozen om een aantal deelonderzoeken te formuleren die in eerste instantie van grote invloed lijken te zijn.



Figuur 4.A: Momenten in de teeltcyclus waar een partij pootaardappelen besmet kan raken.

Naast verschillende onderzoeken op proefveldniveau is tevens een monitoring opgezet bij bedrijven die jaarlijks S-materiaal aankopen en dit vervolgens 1 of 2 jaar natelen en afleveren in de klasse E of A. Ook bij deze monitoring is gebruik gemaakt van de in figuur 4.A weergegeven teeltcyclus. Door het onderzoek uit te voeren bij telers kan, op praktijkschaal, worden vastgesteld waar de grootste knelpunten liggen als het gaat om de versmering.

4.2 Besmetting via kiemen

Inleiding

Bij aanvang van het project "Deltaplan Erwinia" zijn de gevaren van versmering van Erwinia binnen de teelt op diverse momenten in de teeltcyclus in kaart gebracht. Momenten waarbij voor pootaardappelen grote risico's op versmering van Erwinia binnen een partij, maar ook tussen partijen aardappelen onderling, bestaan. Eén van de momenten waarop de focus tijdens het onderzoek in de projectperiode werd gelegd, was het moment waarop de aardappel gekiemd is. Bewerking van gekiemd product kan op verschillende momenten aan de orde zijn, namelijk (1) bij een vroegtijdige kieming in de herfst/winter bij het sorteren, (2) bij voorkiemen van het uitgangsmateriaal en (3) bij het poten. De vraag die opdoemt is wat de effecten zijn van gekiemde pootaardappelen op de verspreiding van Erwinia. Immers, daar waar kiemen op de knollen zitten ontstaat schade aan de knol op het moment dat een kiem afbreekt. Enerzijds ontstaat hiermee een invalspoort voor aanwezige bacteriën, maar anderzijds zou ook een besmette kiem voor versmering kunnen zorgen. Dit laatste punt, de aanwezigheid van Erwinia in kiemen, was onderdeel van dit onderzoek.

Doel

Het onderzoek moet antwoord geven op de vraag in hoeverre kiemen van (latent) besmette knollen voor verspreiding van Erwinia kunnen zorgen.

Uitvoering

In het voorjaar van 2009 werd een 1^e proef (TV-VP-09-02) opgezet. Het materiaal dat hiervoor werd gebruikt was afkomstig uit een onderzoek van 3x180 knollen van de rassen Festien, Seresta en Kondor, die individueel werden onderzocht op besmetting in het navelende. Na toetsing met ELISA werden 65 knollen, waarvan een positieve reactie in het navelende werd gevonden, van het ras Festien en 14 knollen van het ras Seresta, voorgekiemd in een klimaatcel bij 20 °C en een RLV van 95%. Nadat de kiemen voldoende ontwikkeld waren werden deze met een steriel scalpelmes afgesneden en opgevangen in een BIOREBA zakje. Na toevoeging van 5 ml water per zakje werden de kiemen gecrusht en werd het extract gehomogeniseerd. Vervolgens werd 160 µl in een epje met 1440 µl PEB gepipetteerd. De monsters werden daarna gedurende 3 dagen bij 20 °C bewaard en vervolgens ingevroren. Van het zo ontstane verrijkte extract werd vervolgens DNA geïsoleerd en geanalyseerd met behulp van Taqman PCR.

Nadat de kiemen van de knollen waren geoogst werden de knollen wederom in de klimaatcel gezet om een 2^e keer te gaan kiemen. De geoogste kiemen werden op dezelfde manier verwerkt als bij de 1^e oogst.

Op 29 mei 2009 werd een 2^e proef (TV-VP-09-03) ingezet. 50 Knollen per ras van de rassen Festien, Seresta en Diamant werden voorgekiemd bij 20 °C en een RLV van 95%. De knollen van de rassen Festien en Seresta waren afkomstig uit dezelfde partijen die ook gebruikt zijn voor de eerste proef. Het verschil met de eerst uitgevoerde proef was dat de knollen nu niet vóór het voorkiemen werden genaveld, maar dat dit pas bij de eerste oogst van de kiemen plaats vond. Hiermee werd voorkomen, dat processen in het vaatbundelsysteem, die bij het voorkiemen een rol spelen, werden verstoord.

Op 29 juni 2009 werden de kiemen voor het eerst geoogst. Ook werd op dat moment het navelende verwijderd. Op 20 juli werden de kiemen van de knollen het ras Festien voor de tweede keer geoogst. De knollen van de rassen Seresta en Diamant waren dusdanig versleten, dat er geen kiemen meer groeiden. De verwerking van de kiem- en navelmonsters vond op dezelfde wijze plaats als bij de 1^e proef.

In het voorjaar van 2011 werd opnieuw een kiemproef (DK-11-01) ingezet. Uit drie afgekeurde partijen pootaardappelen (1 partij Seresta en 2 partijen Kondor) werden 30 knollen per partij op voorkiem trays in de klimaatcel geplaatst bij 20 °C en 95% RLV. Nadat de kiemen een lengte hadden bereikt van ca. 2-3 cm werden de kiemmonsters genomen. De verwerking van de monsters staat bij TV-VP-09-02 beschreven. Evenals in 2009 werden de knollen na de monsternamen teruggeplaatst in

de klimaatcel om ze opnieuw te laten kiemen. De kiemen die zo ontstonden zijn vervolgens ook weer geogst en verwerkt. In deze proef werd niet alleen naar de besmetting van de kiemen gekeken, maar ook naar de besmetting die in de kiembodems kan worden aangetoond. Na het verwijderen van de kiemen werd vervolgens, met de aardappelboor waarmee ook het naveleinde wordt gestoken, de kiembodem verwijderd en onderzocht. Met deze werkwijze kan meer inzicht worden verkregen in de aanwezigheid van Erwinia in de kiembodem in relatie tot aanwezigheid van Erwinia in het naveleinde en de aanwezigheid van Erwinia in de kiemen.

Resultaten

De resultaten van de genomen monsters staan in het onderstaande per proef weergegeven.

Resultaat TV-VP-09-02:

- Op T1 werden slechts 2 van de 109 kiemmonsters positief bevonden voor Ds. Bij 6 monsters was de Ct-waarde (voor Ds) te hoog.
- Op T2 werd in 15 van de 142 kiemmonsters een positieve reactie gevonden.
- In de, in het begin negatieve knollen, werd op T2 in 29 % (4 knollen) van de monsters toch Ds in de kiemen gevonden en was 14 % (2 knollen) rot.
- In totaal werden 251 kiemen geogst waarvan 17 besmet → 6,7 % van de kiemen was besmet

Resultaat TV-VP-09-03:

- Op T1 werden slechts 7 van de 500 kiemmonsters positief bevonden voor Ds, vPcc of Pa.
- Op T2 konden alleen nog kiemen geogst worden van het ras Festien. In 1 van de 52 kiemen werd een positieve reactie gevonden.
- Bij alle monsternames samen werden 8 positieve reacties in kiemmonsters gevonden. Hiervan werd 6 gevonden bij knollen die in het naveleinde negatief scoorden.
- In totaal werden 552 kiemen geogst waarvan 8 besmet → 1,4 % van de kiemen was besmet.

Resultaat DK-11-01:

- Op T1 werden slechts 2 van de 180 kiemmonsters positief bevonden voor Ds of vPcc.
- Op T2 werden slechts 2 van de 184 kiemmonsters positief bevonden voor Ds.
- In totaal werden 364 kiemen geogst waarvan 4 besmet → 1,1 % van de kiemen was besmet.

Conclusie

- In alle uitgevoerde proeven werden in meer of mindere mate besmette kiemen aangetroffen. De mate van besmetting ligt overwegend tussen 1 en 2 %.
- Monstername van de kiembodem maakt een groter aantal besmettingen zichtbaar dan het onderzoeken van de kiemen. Dit geldt zowel voor de kiembodems van het spruiteinde als voor de kiembodems uit het middendeel van de knol.
- In alle proeven werden positieve reacties in de kiemen gevonden bij knollen waar in het naveleinde geen besmetting werd vastgesteld.

4.3 Voorkiemen en poten

Inleiding

Voor het poten worden verschillende systemen gehanteerd om de aardappelen, na het sorteren, te bewaren en voor te bereiden op het teeltseizoen. Op sommige bedrijven wordt het materiaal voorgekiemd in kiembakken, andere bedrijven kiezen voor het systeem van voorkiemzakken of bewaring in kisten waarbij deze regelmatig worden gedraaid. Ook wordt het systeem van koud bewaren gehanteerd, waarbij de aardappelen vlak voor het poten uit de bewaring worden gehaald en worden opgewarmd. De keuze van het systeem van voorkiemen wordt meestal ingegeven door de mogelijkheden die een bedrijf heeft om aardappelen te bewaren (bedrijfsstructuur), of door de ervaringen die er zijn met bepaalde rassen (ras effect).

Aangenomen wordt dat de methode van voorkiemen effect heeft op het, bij de oogst, aanwezig zijn van moederknollen. Deze kunnen tot problemen, versmering, leiden bij het rooien.

In dit onderzoek werd gekeken naar effecten van 4 verschillende systemen van voorkiemen om vast te stellen of de gebruikte methode invloed heeft op enerzijds de opkomst, en anderzijds op het tot expressie komen van Erwinia in het veld. Om het effect van de voorkiemmethode op de moederknollen vast te stellen werden individuele planten geroid.

Doel

Vaststellen wat de effecten met betrekking tot Erwinia zijn van verschillende voorkiemmethoden zijn op (1) de opkomst, (2) de expressie van zieke planten in het veld, en (3) de moederknollen bij het rooien.

Uitvoering

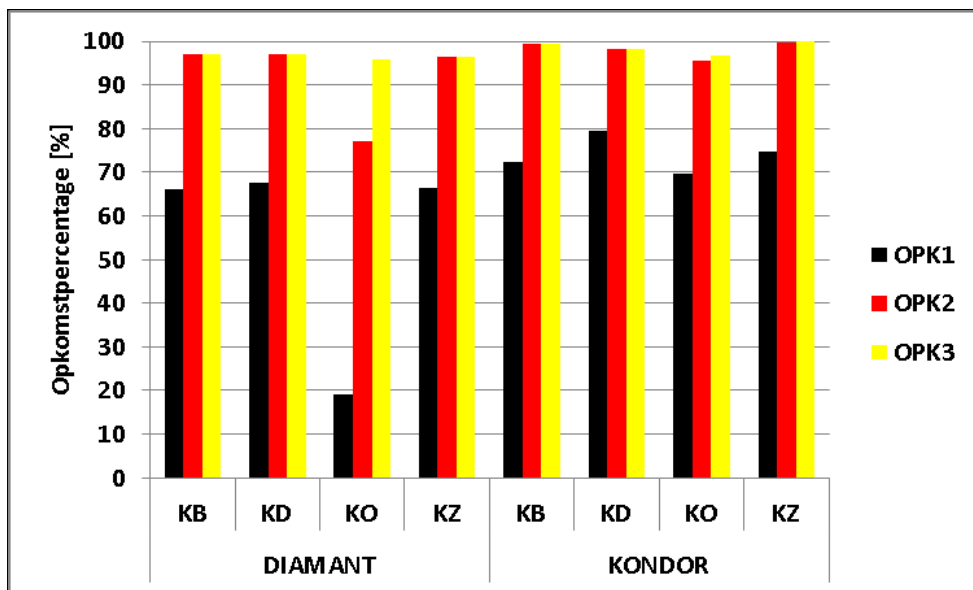
Op kleigrond werd een proefveld aangelegd met verschillende methoden van voorkiemen. De objecten kiembakken (KB), kiemzakken (KZ), kisten draaien (KD) en koud bewaren (KO) werden aangelegd. Materiaal van de rassen Kondor en Diamant, met een natuurlijke besmetting, werd als uitgangsmateriaal genomen. Het proefveld werd als een volledig gewarde blokkenproef in 4 herhalingen met een halfautomatische pootmachine uitgepoot. Per veld werden 280 knollen gepoot. De snelheid van opkomst werd gescoord en vervolgens werd wekelijks het aantal visueel zichtbaar aangetaste planten geteld en gemarkeerd. Na de loofvernietiging, via volvelds doodspuiten, werden uit ieder veld 5 willekeurig gekozen planten geoogst. Van deze planten werd vastgesteld in hoeverre de moederknollen nog aanwezig waren.

Resultaten

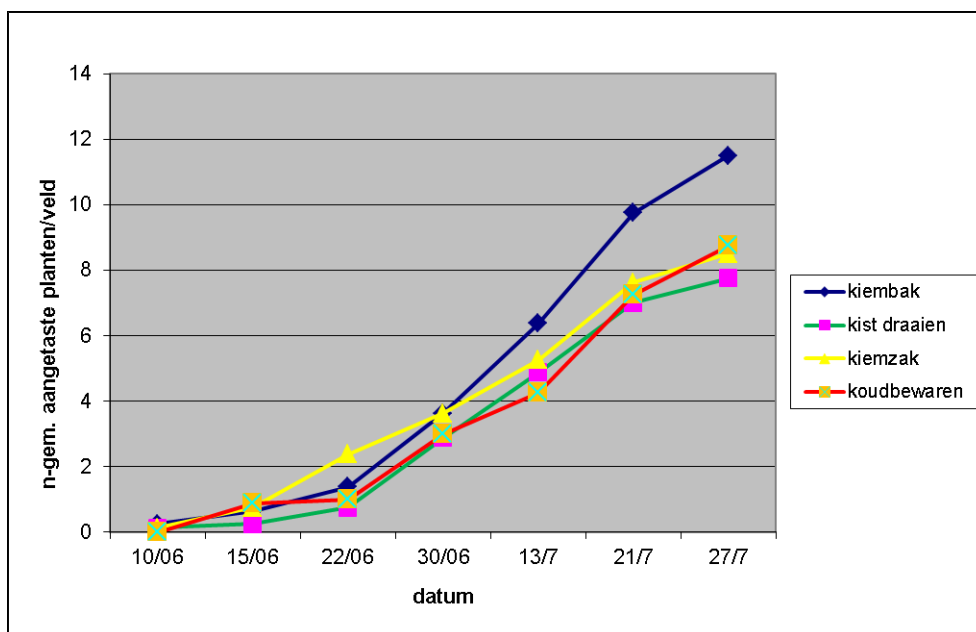
De opkomst (figuur 4.B) werd op 3 tijdstippen beoordeeld. Bij het ras Diamant viel een duidelijk trage opkomst van het object KO op. Ook bij de 2e opkomststelling bleef het aantal planten nog iets achter bij dit object. Bij de 3^e beoordeling bleek dat alle planten waren opgekomen.

Vanaf opkomst werd op 7 data het aantal symptoomplanten per veld vastgesteld. Het verloop van de aantasting per behandeling is in figuur 4.C weergegeven. Statistische analyse van de gegevens geeft aan dat er geen verschillen tussen de behandelingen zijn.

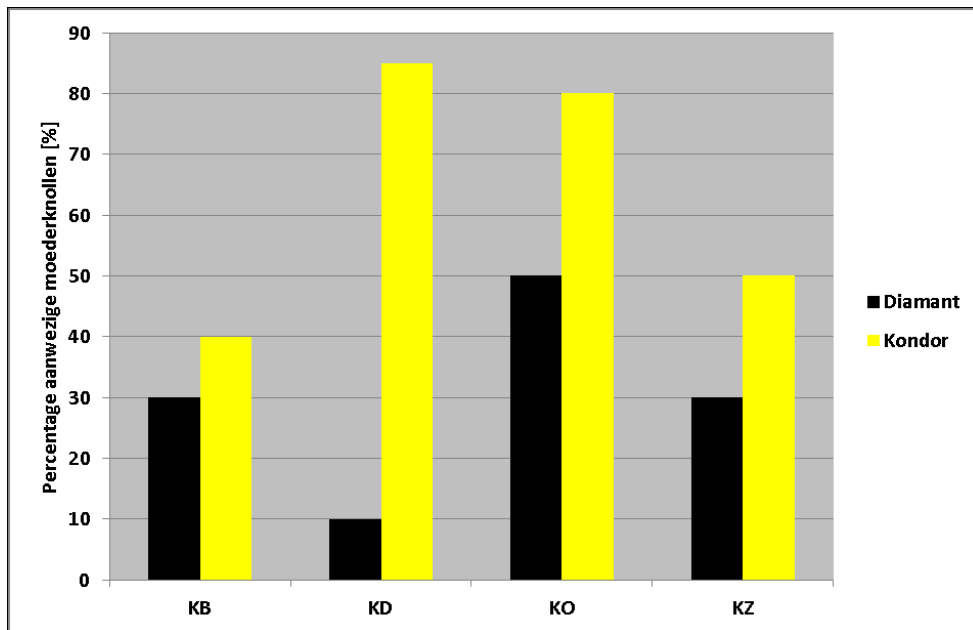
De geoogste planten werden beoordeeld op de aanwezigheid van moederknollen. De resultaten zijn in figuur 4.D weergegeven. Uit de resultaten blijkt dat er geen verschil in aantal moederknollen wordt gevonden tussen kiembakken en kiemzakken. Bij het object koud bewaren worden statistisch betrouwbaar meer moederknollen gevonden. Bij het object kistendraaien wordt een tegengesteld beeld gevonden voor de rassen Diamant en Kondor. Dit zou er op kunnen duiden dat het aantal moederknollen bij dit systeem per ras verschillend zou kunnen zijn.



Figuur 4.B: Opkomstpercentage op 3 tijdstippen bij de rassen Diamant en Kondor bij de voorkiemmethoden kiembakken (KB), kistendraaien (KD), koud bewaren (KO) en kiemzakken (KZ).



Figuur 4.C: Ontwikkeling van het ziekteverloop in het veld bij de rassen Diamant en Kondor bij de voorkiemmethoden kiembakken (KB), kistendraaien (KD), koud bewaren (KO) en kiemzakken (KZ).



Figuur 4.D: Percentage aanwezige moederknollen bij de rassen Diamant en Kondor bij de voorkiemmethoden kiembakken (KB), kistendraaien (KD), koud bewaren (KO) en kiemzakken (KZ).

Conclusie

- Alleen bij het ras Diamant bleef de opkomst bij de behandeling koud bewaren (KO) in het begin, betrouwbaar verschillend, achter. Dit was ook op tijdstip 2 het geval. Op tijdstip 3 was het verschil niet meer aanwezig. Het aantal opgekomen planten werd door de behandelingen niet beïnvloed.
- Het aantastingsverloop gedurende het groeiseizoen was voor alle objecten gelijk. Er werden geen betrouwbare verschillen gevonden tussen de objecten.
- Er werd een betrouwbaar verschil gevonden bij de rassen Diamant en Kondor tussen de objecten kiembakken (KB) en kiemzakken (KZ) en het object koud bewaren (KO). Bij koud bewaren waren meer moederknollen aanwezig bij de oogst. Bij het object kistendraaien (KD) werd voor de beide rassen een afwijkend beeld gevonden. Bij het ras Diamant werd in dit object het laagste aantal moederknollen gevonden, terwijl bij Kondor juist het hoogste aantal moederknollen werd aangetroffen.

4.4 Maatsortering

Inleiding

De maatsortering die gebruikt wordt bij het poten is in de praktijk vaak een discussie punt, omdat zowel een kleine als een grote maat ieder voordelen kan hebben. Bij het gebruik van een kleine potermaat is tijdens de teelt een kleine moederknol aanwezig, wat een voordeel kan hebben als het gaat om versmering. Een nadeel van een kleine maat kan zijn, dat zich een plant ontwikkelt die in de begin fase van de veldperiode niet de nodige weerstand tegen weersinvloeden heeft. Voor een grote potermaat is juist het nadeel dat vaker moederknollen aanwezig zijn en blijven, waardoor gemakkelijker versmering optreedt. Een grote maat geeft over het algemeen wel een plant die zich in het begin van de veldperiode goed kan ontwikkelen.

Naast teelt technische voor- c.q. nadelen is een veel gehoorde opmerking in de praktijk dat bij het gebruik van een kleine maat minder Erwinia planten worden gevonden. Dit zou te verklaren kunnen zijn door 2 factoren, namelijk dat grote knollen sneller en meer beschadigd kunnen raken en/of dat bij het gebruik van een kleine maat het niet opvalt dat ergen een plant mist die weg is gevallen door een aantasting van Erwinia. Met dit onderzoek wordt ingegaan op het effect van een kleine of grote knolmaat op het tot expressie komen van Erwinia uit, van nature besmette, knollen.

Doel

Bepalen of de gebruikte potermaat van invloed is op het moment van expressie van Erwinia tijdens de veldperiode

Uitvoering

In maart 2011 werden, voor een proefveld op kleigrond, 3 partijen (Kondor, Kuroda en Seresta), uitgezocht waarin, na screening, , een verschillend niveau natuurlijke besmetting in de knollen aanwezig was. De knollen werden in 2 klassen ingedeeld, namelijk klein (25/35 mm) en groot (45/60 mm). De proef werd opgezet als gewarde blokkenproef en aangelegd in 6 herhalingen. Per veld werden, verdeeld over 4 rijen, op 20 april 48 knollen gepoot op een plantafstand van 25 cm. Naast een proefveld op kleigrond werd eveneens een proefveld op zandgrond aangelegd. Hiervoor werden 2 partijen (Seresta en Sante) uitgezocht. De opzet was dezelfde als die bij de proef op kleigrond. Per veld werden, verdeeld over 4 rijen, op 21 april 100 knollen gepoot op een plantafstand van 33 cm.

In het voorjaar van 2012 werden 3 partijen (Desiree, Kondor en Merano), uitgezocht waarin, na screening, een voldoende geachte natuurlijke besmetting in de knollen aanwezig was. De knollen werden in 2 klassen ingedeeld, namelijk klein (28/35 mm) en groot (50/60 mm). De proef werd opgezet als gewarde blokkenproef en aangelegd in 4 herhalingen. Per veld werden, verdeeld over 4 rijen, op 30 april 100 knollen gepoot op een plantafstand van 33 cm.

In beide jaren werden de velden gedurende het groeiseizoen, vanaf opkomst, gemonitord op aanwezigheid van planten met Erwinia symptomen. Planten waarvan, visueel, werd bepaald dat ze aangetast waren door Erwinia werden gemarkeerd met een piket en voorzien van een label met daarop de datum van eerste symptomen. Er werd geen onderscheid gemaakt tussen planten met verwelking en/of planten waarvan plantendelen rottingsverschijnselen gaven.

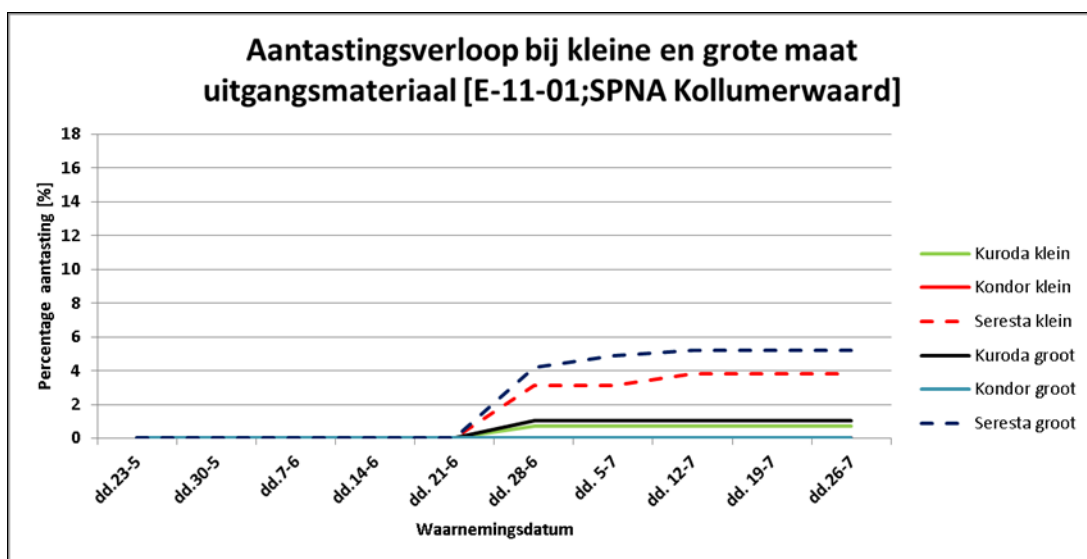
Resultaten

Het gebruikte uitgangsmateriaal werd beide jaren, in het voorjaar, getoetst op de bruikbaarheid voor deze beproeving (tabel 4.1). Monsters van 200 knollen werden, in 20 pools van 10 knollen, onderzocht op besmetting in het navelende en/of schil met *Dickeya* sp. (Ds) en/of virulente *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (vPcc). In alle gevallen bleken voldoende positieve knollen aanwezig om te gebruiken in de proef. Het ras Merano, dat in 2012 werd gebruikt, werd niet meer separaat onderzocht. Uit eerdere testen was namelijk al gebleken dat hier sprake was van een besmetting van de partij met zowel Ds als ook vPcc.

Poolnr	Naveleinde		Schil		Naveleinde		Schil		Naveleinde		Schil		Naveleinde		Schil		Klein		Groot		Klein		Groot		
	Ds	vPcc	Ds	vPcc	Ds	vPcc	Ds	vPcc	Ds	vPcc	Ds	vPcc	Ds	vPcc	Ds	vPcc	Ds	vPcc	Ds	vPcc	Ds	vPcc	Ds	vPcc	Ds
1	27,36	32,29	29,24	undet	undet	38,04	undet	undet	undet	29,29	undet	30,35	undet	29,75	33,15	26,48	31,65	38,28	29,44	undet	35,24	undet	undet	undet	
2	30,01	29,88	26,59	33,41	34,19	undet	35,06	undet	undet	29,87	undet	31,85	undet	27,17	undet	30,55	32,25	undet	28,61	undet	33,50	undet	undet	undet	
3	33,38	33,52	26,65	undet	undet	34,43	35,50	undet	undet	27,84	undet	31,91	36,40	24,74	31,88	28,12	30,37	undet	27,20	undet	undet	undet	undet	undet	
4	23,31	undet	34,51	33,60	37,65	undet	undet	undet	undet	30,63	undet	30,31	undet	27,71	undet	27,70	28,28	undet	25,53	undet	undet	undet	undet	undet	
5	undet	undet	30,99	undet	39,14	undet	37,45	undet	undet	31,75	undet	31,98	35,95	34,30	31,65	28,22	32,06	undet	28,79	36,26	undet	undet	undet	undet	
6	33,28	26,85	29,93	undet	undet	undet	undet	undet	undet	31,11	undet	31,76	36,07	34,02	undet	28,41	29,68	undet	25,54	37,49	undet	undet	undet	undet	
7	38,22	34,99	30,22	undet	36,97	undet	undet	undet	undet	28,32	undet	30,55	undet	30,46	undet	30,30	28,45	undet	28,93	undet	undet	undet	undet	undet	
8	undet	undet	33,69	34,85	26,89	undet	undet	undet	undet	31,50	undet	30,62	undet	30,43	33,87	27,94	29,04	undet	25,67	undet	31,55	undet	undet	undet	
9	29,09	35,82	31,30	undet	undet	undet	undet	undet	undet	27,17	undet	27,53	undet	29,16	undet	undet	29,77	undet	27,84	undet	35,53	undet	undet	undet	
10	37,60	35,84	31,78	undet	undet	undet	35,94	undet	undet	28,62	undet	28,72	33,47	27,97	33,73	26,43	29,53	undet	29,09	undet	undet	undet	undet	undet	
11	31,06	34,21	30,39	undet	undet	undet	undet	undet	undet	25,21	undet	32,84	undet	25,79	32,25	29,04	30,91	undet	27,90	undet	undet	undet	undet	undet	
12	32,02	33,54	30,37	undet	undet	undet	undet	undet	undet	27,67	undet	32,97	34,71	26,48	undet	27,99	31,44	undet	29,04	undet	undet	undet	undet	undet	
13	33,45	26,08	29,48	undet	30,75	undet	undet	undet	undet	33,07	undet	30,79	undet	26,94	34,06	30,47	29,30	undet	undet	undet	30,93	undet	30,91	37,74	
14	27,75	31,32	31,48	undet	undet	undet	undet	undet	undet	25,87	undet	30,14	29,50	25,35	35,88	23,32	28,80	undet	27,49	undet	undet	undet	undet	undet	
15	undet	31,94	26,89	undet	33,37	undet	31,95	undet	undet	27,33	undet	31,03	undet	24,47	undet	28,32	29,53	undet	27,79	undet	28,74	undet	31,98	undet	
16	32,35	35,39	28,18	undet	undet	undet	undet	undet	undet	28,79	undet	29,89	undet	25,78	32,99	27,30	29,70	undet	29,34	undet	32,48	undet	33,43	undet	
17	35,59	33,81	26,23	undet	undet	undet	undet	undet	undet	28,31	undet	29,67	undet	27,36	33,50	26,93	29,08	39,92	32,36	undet	34,55	undet	31,49	undet	
18	29,69	31,69	27,83	undet	undet	undet	35,10	28,48	undet	28,40	undet	32,70	undet	25,09	31,35	28,14	29,73	undet	35,17	undet	32,72	undet	32,13	undet	
19	34,26	29,50	30,74	undet	24,97	undet	27,31	undet	undet	31,21	undet	29,65	undet	27,49	33,35	30,13	29,54	36,95	30,02	undet	undet	undet	33,30	undet	
20	28,95	25,80	30,71	34,46	28,26	undet	undet	undet	undet	28,03	undet	37,42	undet	24,58	35,69	29,37	28,90	undet	29,45	undet	undet	undet	34,99	undet	
INCID	11,3%	17,3%	100%	2,2%	3,5%	0,5%	1,0%	0,5%	0%	100%	0%	100%	1,6%	100%	7,7%	25,9%	100%	0,5%	20,6%	1,0%	5%	0%	5%	0,5%	

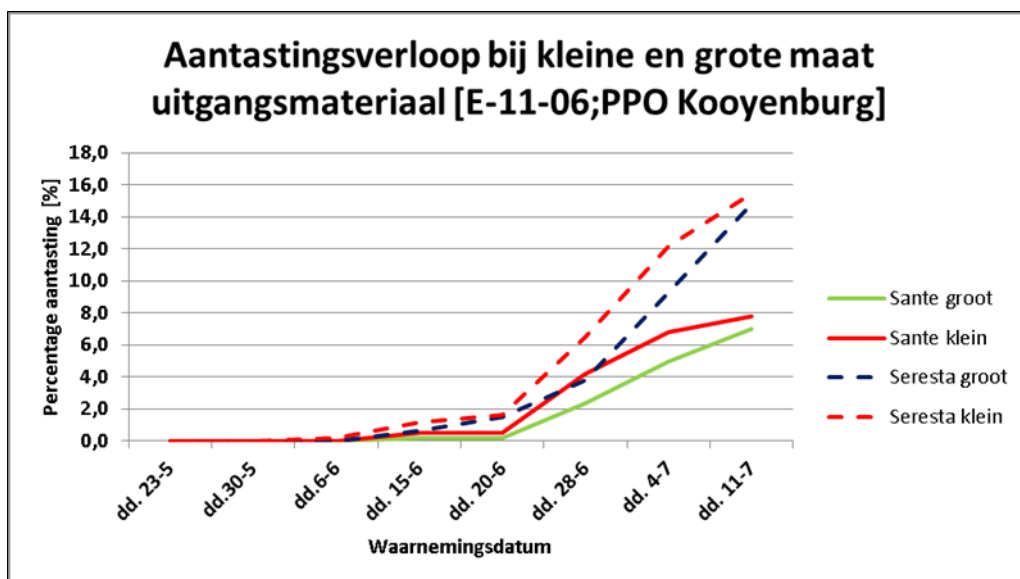
Tabel 4.1: Vaststellen besmetting van het gebruikte uitgangsmateriaal voor de maatsortering proeven in de jaren 2011 en 2012 (positieve uitslagen zijn geel gemarkeerd)

Gedurende het teeltseizoen werd wekelijks gescoord op aanwezigheid van planten met Erwinia symptomen. Hiermee werd de ontwikkeling van de aantasting in beeld gebracht. In figuur 4.E t/m 4.G zijn de resultaten van de waarnemingen weergegeven.



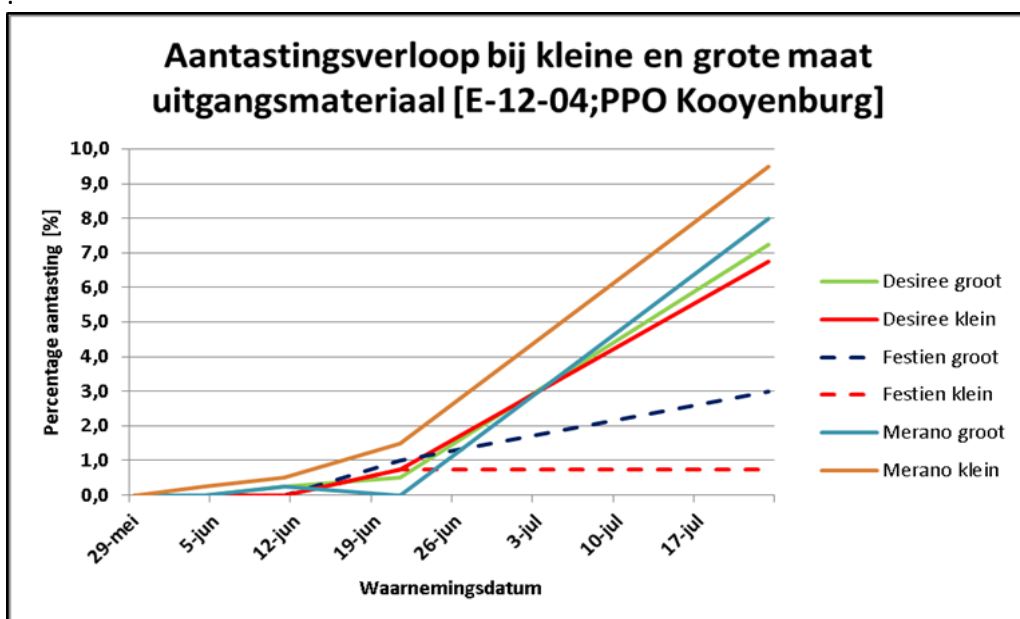
Figuur 4.E: Aantastingsverloop bij het gebruik van een kleine en een grote pootgoedmaat als uitgangsmateriaal [E-11-01; SPNA Kollumerwaard]

Zoals op basis van de voorscreening van de partijen viel te verwachten werd in het ras Seresta meer aantasting gevonden dan in de rassen Kuroda en Kondor. Tussen de gebruikte maatsorteringen werden geen betrouwbare verschillen gevonden. Het aantal gevonden symptoomplanten was bij alle gebruikte partijen laag, ondanks de gevonden hoge besmetting in het uitgangsmateriaal.



Figuur 4.F: Aantastingsverloop, planten met *Erwinia* symptomen, per waarnemingsdatum bij de rassen Sante en Seresta [E-11-06, Kooyenburg 2011]

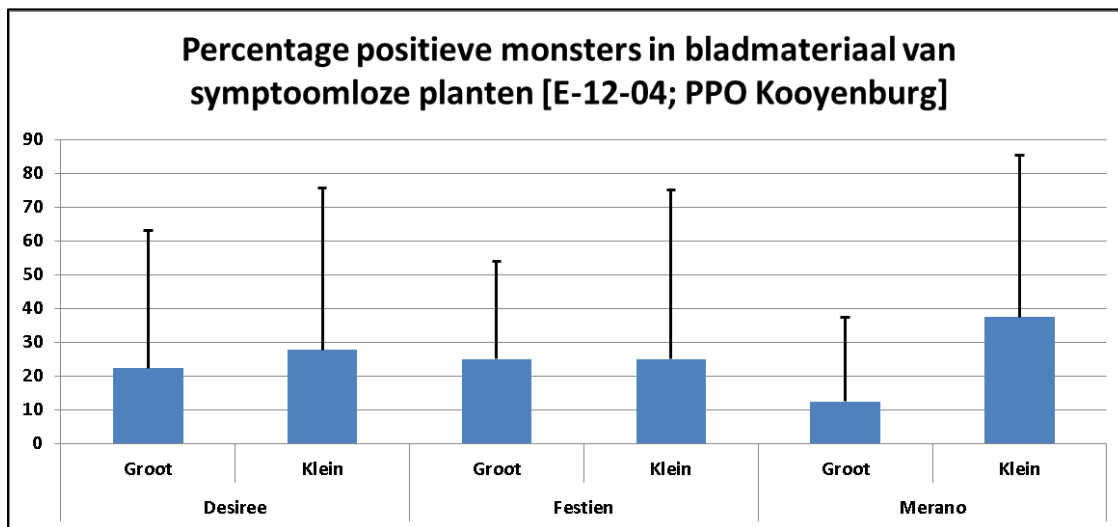
Het aantal symptoomplanten dat tijdens het groeiseizoen van 2011 in het proefveld op zandgrond werd gevonden was beduidend hoger dan in de proef op de kleigrond. Dit kan afgemeten worden aan het ras Seresta aangezien het materiaal van dit ras op beide locaties afkomstig was van dezelfde partij pootaardappelen. Er was een duidelijk verschil te zien in aantal symptoomplanten tussen de beide rassen.



Figuur 4.G: Aantastingsverloop, planten met *Erwinia* symptomen, per waarnemingsdatum bij de rassen Desiree, Festien en Merano [E-12-04, PPO Kooyenburg]

Het percentage symptoomplanten dat in 2012 in het proefveld op zandgrond werd gevonden lag op een lager niveau dan in 2011. Wel werd ook in dit proefveld een verschil gevonden tussen de gebruikte partijen pootaardappelen. Het aantal symptoomplanten bij het ras Festien was duidelijk lager dan bij de rassen Desiree en Festien.

Op 11 juni 2012 werd van ieder veld een dubbel bladmonster genomen van de planten die op dat moment geen Erwinia symptomen te zien gaven. Er werd blad van circa 50 planten verzameld in een plasticzak. De monsters werden nog dezelfde dag verwerkt. Na het vaststellen van het gewicht van het monster werd 50 ml PEB aan de plasticzak toegevoegd. De bladmonsters werden vervolgens vacuüm gezogen en gedurende 7 dagen bij 25 °C weggezet. Na deze verrijksperiode werd een extract uit de plasticzak gehaald voor DNA isolatie en PCR. Het aantal positieve monsters staat in figuur 4.H weergegeven. Opvallend hierbij is dat ondanks dat geen symptomen aanwezig waren, toch een aanwezige Erwinia besmetting in het blad kon worden aangetoond. Tussen de grote en kleine maat werd geen betrouwbaar verschil gevonden.



Figuur 4.H: Percentage positieve monsters in bladmateriaal van symptoomloze planten [E-12-04, PPO Kooyenburg]

Conclusie

In de jaren 2011 en 2012 werden totaal 3 proefvelden met besmette partijen op zand- en/of kleigrond aangelegd om te bepalen of de maatsortering van invloed is op het moment van expressie van Erwinia in het veld

De resultaten laten zien dat:

- in de proefvelden geen significante verschillen in expressie werden gevonden tussen de gebruikte grote en kleine maatsortering
- het aantal symptoomplanten bij het ras Seresta in 2011 op zandgrond ca. 10 % hoger ligt dan op het proefveld op de kleigrond. Het uitgangsmateriaal was op beide proefvelden afkomstig van dezelfde partij poot aardappelen
- het besmettingsniveau van het gebruikte uitgangsmateriaal bepalend is voor het aantal symptoomplanten dat in het veld wordt gevonden. Een hoge uitgangsbesmetting geeft een hoger aantal symptoomplanten.
- Ondanks dat geen symptomen aanwezig zijn een besmetting met een bladmonster kan worden aangetoond.

4.5 Stikstofbemesting in relatie tot Erwinia expressie in het veld.

Inleiding

In 2005 is onderzocht of er een relatie is tussen de stikstofbemesting en het tot uiting komen van een aanwezige (latente) Erwinia aantasting. Door diverse omstandigheden is het onderzoek niet naar tevredenheid verlopen, het is echter een interessant gegeven voor nader onderzoek. Dit wordt versterkt door de uitslagen van een door de NAK gehouden enquête onder telers die de laatste 3 teeltjaren "bacterievrij" zijn gebleven. Deze telers gaven aan te streven naar schrale gewassen.

Onduidelijk is wat de oorzaak is van minder problemen met Erwinia,

- of de lagere bemesting leidt tot versnelde degeneratie van de moederknol, wat bij het rooien voor minder versmering zorgt,
- of dat er geen maskering van zieke planten optreedt waardoor zieke planten tijdens de selectie sneller herkend en verwijderd worden.

Uit een literatuurstudie van Van der Wolf (PRI-Wageningen) komt naar voren dat met name stikstof, calcium en organische bemesting een positief, dan wel negatief, effect op Erwinia kan hebben. De focus in dit onderzoek ligt op de stikstofbemesting. Voor de stikstofbemesting geldt, dat deze de veldexpressie van Erwinia bij zowel hoge als lage giften zou kunnen stimuleren. Het lijkt er dan ook op dat de hoogte van de N-bemesting effect heeft op een verdere toename van die besmetting tijdens de teelt, de oogst, bewaring en verdere nateelt van de partij aardappelen.

In de jaren 2009 en 2010 werden proefvelden aangelegd met verschillende bemestingsniveaus. Knolmateriaal van symptoomloze planten van deze proefvelden werd in resp. 2010 en 2011 na geteeld.

Doel

Vaststellen (1) in hoeverre er sprake is van expressie in relatie tot de hoogte van de stikstofgift, en (2) in hoeverre er sprake is geweest van maskering door de bemesting.

Uitvoering

In zowel 2009 als in 2010 werd er voor gekozen om plantmateriaal te gebruiken dat een zekere mate van natuurlijke Erwinia besmetting heeft. Een aantal "besmette" partijen werd onderzocht en op basis van de gevonden aantasting in de aardappelen werden in beide jaren 2 partijen uitgekozen van de rassen Festien en Seresta. Er werd voor gekozen om een proefveld aan te leggen op een locatie (PPO-Kooyenburg) waar van nature in het voorjaar weinig N-mineraal in de bodem aanwezig is en niet veel mineralisatie gedurende het groeiseizoen te verwachten is.

De bemesting werd op 4 verschillende N-niveaus uitgevoerd, te weten 0 %, 50 %, 100 % en 150 % van de geadviseerde hoeveelheid. Het proefveld werd als een blokkenproef in 4 herhalingen aangelegd met in 2009 240 knollen per veld en in 2010 192 knollen per veld. In 2009 werden alle planten binnen het veld beoordeeld, terwijl in 2010 alleen de middelste 2 rijen (96 knollen) in het onderzoek zijn betrokken.

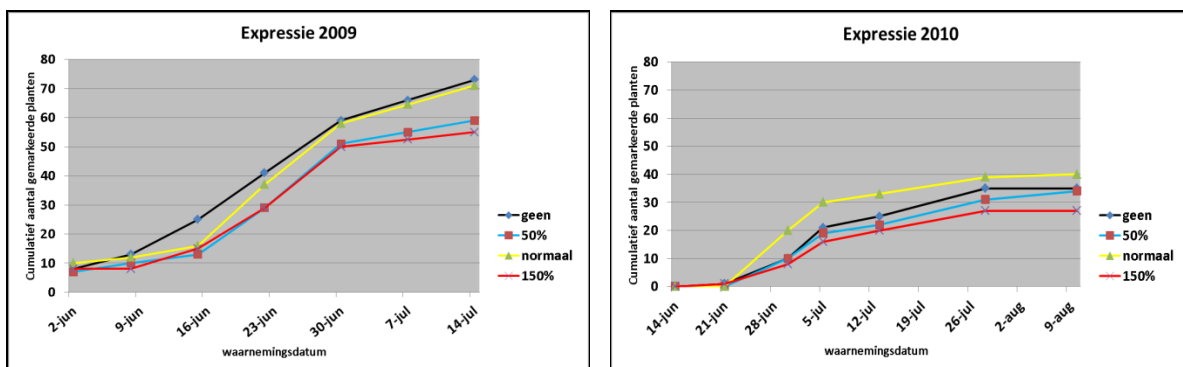
Tijdens het groeiseizoen werd in beide jaren vastgesteld of het tot uiting komen van Erwinia beïnvloed werd door het niveau van de bemesting. Hiertoe werden de proefvelden wekelijks beoordeeld op de aanwezigheid van symptoomplanten. Deze planten werden gemarkeerd en voorzien van een datumlabel.

Van planten, waarin geen symptomen werden waargenomen, werden knollen geoogst die als nateelt werden uitgepoot. In deze nateeltproeven in resp. 2010 en 2011 werd wekelijks een beoordeling op aanwezigheid van symptoomplanten uitgevoerd. De veldgrootte was in beide jaren steeds 4 rijen breed en 12 planten lang. Van ieder veld in resp. 2009 en 2010 werden in het nateelt jaar 4 velden uitgepoot.

Na de loofddoding werden van niet gemarkeerde planten knolmonsters verzameld. Deze knolmonsters waren enerzijds bedoeld voor uitplant in het volgende jaar, en anderzijds om vast te stellen of er geen verschil in besmetting zat tussen de verschillende bemestingstrappen.

Resultaten

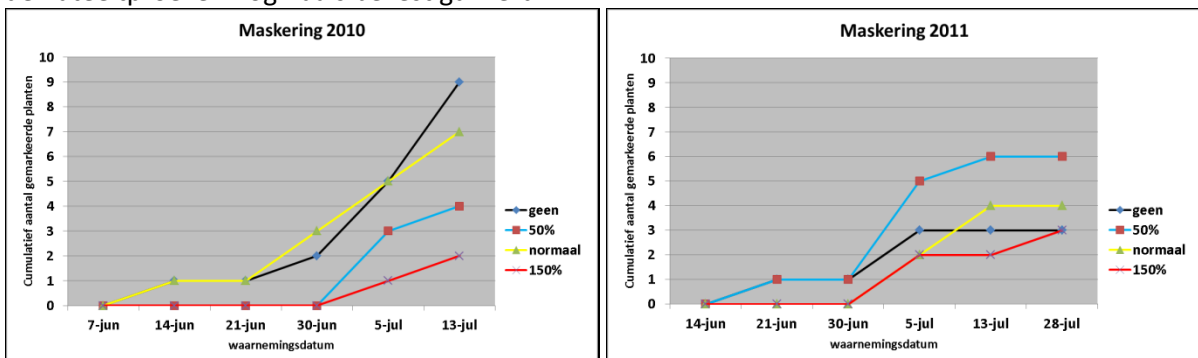
Op een aantal momenten tijdens de teelt werden de velden beoordeeld. Er werd beoordeeld op symptomen als verwelking, slappe koppen en/of zichtbaar aangetaste stengeldelen. Planten die kenmerken van aantasting vertoonden werden gemarkeerd. In figuur 4.I en 4.J staat het aantal planten vermeld, dat aantastingsverschijnselen (Expressie) vertoonde per waarnemingsdatum en per onderzoek variant in de jaren 2009 en 2010. In beide jaren kwamen ca. 5 % symptoomplanten in het veld tot uiting. Analyse van het aantal gescoorde symptoomplanten gaf aan dat geen sprake was van statistisch betrouwbare verschillen tussen de bemestingstrappen. De gegevens leidden in beide onderzoeks jaren tot hetzelfde eindresultaat.



Figuur 4.I en: Cumulatief aantal gemarkeerde planten voor de rassen Festien en Seresta in de
 Figuur 4.J jaren 2009 en 2010

In 2010 resp. 2011 werd de nateelt uitgepoot om vast te stellen of sprake is geweest van maskering. In figuur 4.K en 4.L is het resultaat van de beoordelingen op symptoomplanten weergegeven voor de nateelt van de jaren 2009 en 2010. Opvallend hierbij is dat het aantal symptoomplanten in de nateelt in beide jaren erg laag is. Dat het aantal planten, dat wordt gevonden in de nateelt, zo laag is geeft al aan dat geen effect van maskering wordt gevonden. Ook de statistische analyse van de gevonden resultaten geeft aan dat er geen betrouwbare verschillen worden gevonden tussen de verschillende bemestings trappen.

Analyse van knolmonsters uit de verschillende bemestingstrappen van symptoomloze planten gaf ook al aan dat slechts sporadisch positieve besmettingen werden gevonden in de knollen, hetgeen in de nateeltproeven nogmaals bevestigd werd.



Figuur 4.K en: Cumulatief aantal gemarkeerde planten voor de rassen Festien en Seresta in de
 Figuur 4.L nateelt jaren 2010 en 2011

Conclusie

- In 2009 (symptoomexpressie) zijn geen verschillen in aantal symptoomplanten tussen de verschillende bemestingsniveau 's gevonden. Ook in 2010 (maskeringseffect) was dit niet het geval.
- Er zijn in de geoogste knolmonsters van de uitplant 2009 geen betrouwbare verschillen gevonden tussen de verschillende bemestingsniveau 's. Ook in de knolmonsters die werden genomen na de teelt in 2010 werden geen verschillen in besmetting met Erwinia aangetoond.
- In 2010 (symptoomexpressie) en 2011 (maskeringseffect) werden geen betrouwbare verschillen in aantal symptoomplanten tussen de objecten gevonden.
- In de geoogste knolmonsters in 2010 en 2011 werden geen significante verschillen in besmetting van de nateelt gevonden.

4.6 Verspreiding via contact in het veld

Inleiding

Bij de teelt van pootaardappelen komen in de veldperiode diverse situaties voor, die aan verspreiding van *Erwinia* tussen zieke en gezonde planten zouden kunnen bijdragen. Hierbij kan een onderscheid gemaakt worden tussen invloeden die niet beheersbaar zijn (b.v. wind, insecten) en beheersbare factoren (b.v. spuitsporen, selectie).

In 2009 is gestart met het in kaart brengen van de mogelijke momenten van versmering in het veld. Het onderzoek naar de effecten van mechanische contacten op de verspreiding van *Erwinia* werd op proefveldniveau aangelegd. Als vervolg op het in 2009 uitgevoerde onderzoek werd in 2010 wederom een proefveld, met daarin de verschillende mechanische contacten die tijdens de teelt plaats kunnen vinden, aangelegd.

Doel

Vaststellen welke mechanische contacten, die door de teler zijn te beïnvloeden, een bijdrage aan het overdragen van *Erwinia* leveren.

Uitvoering

In 2009 en 2010 werd een blokkenproef met 2 rassen, 4 objecten en 4 herhalingen aangelegd op de Proefboerderij Kollumerwaard te Munnekezijl.

In deze proefvelden werden de rassen Desiree en Saline uitgeplant, 2 rassen die duidelijk van elkaar verschillen in loofgroei en loofsterkte. Desiree is een ras met stevig en weelderig loof. Saline heeft juist tegenover gestelde eigenschappen.

Als objecten werden aangelegd een controle (CO), handmatige selectie (HS), selectiekar (SE) en beschadiging door een trekker (TR). In ieder veld (4 rijen breed en 20 meter lang) werd een besmette strook uitgeplant. Deze bestond uit aardappelen van het ras Kondor welke via vacuüm infiltratie werden besmet met de streptomycine resistente *Dickeya solani* (IPO2222) bacterie. Gedurende het groeiseizoen werden op verschillende data bladmonsters verzameld, nadat de selecteur, selectiekar of trekker door de plots waren gegaan. Steeds werd op de afstanden 0, 1 en 10 meter van de besmette strook een monster genomen.

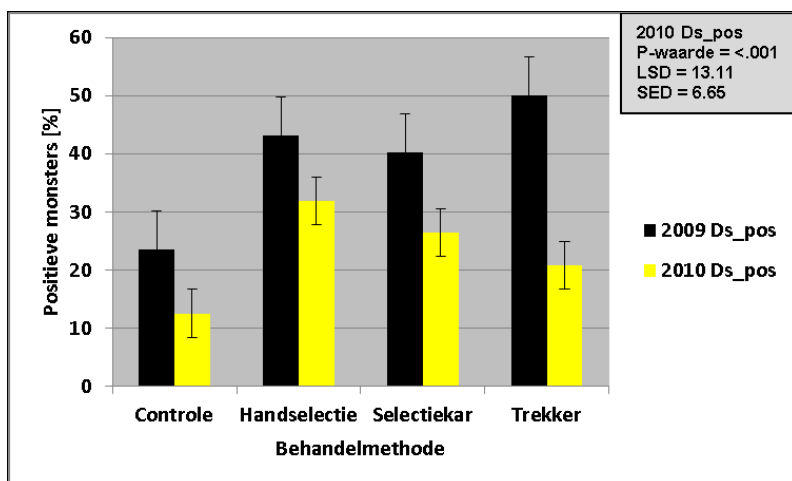
Resultaten

In beide jaren werd tussen de beide rassen, die erg verschillen in loof type geen verschil aangetroffen in besmetting van het loof door de drie objecten. De resultaten van de beide rassen zijn vervolgens samengevoegd en geanalyseerd met GENSTAT versie 13.

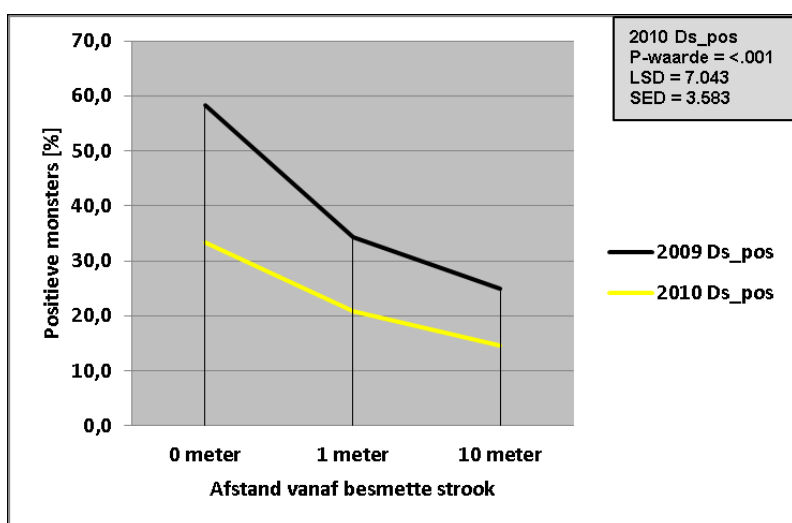
Uit de data analyse komt naar voren dat er een betrouwbare verschil is tussen de controle en de overige objecten. Tussen de objecten handselectie, selectiekar en trekker werd geen verschil gevonden in versmering via het blad (figuur 4.M)

De bladmonsters werden op 3 verschillende plaatsen in de plots verzameld, namelijk op 0, 1 en 10 meter van de besmette strook. Vanuit de besmette strook (=0 meter) blijkt dat de versmering tot zeker 10 meter plaats vindt (figuur 4.N). De gevonden gegevens voor de beide jaren komen sterk overeen. Wel wordt een niveau verschil gevonden. In 2009 werden duidelijk meer positieve reacties in het blad aangetroffen dan in 2010.

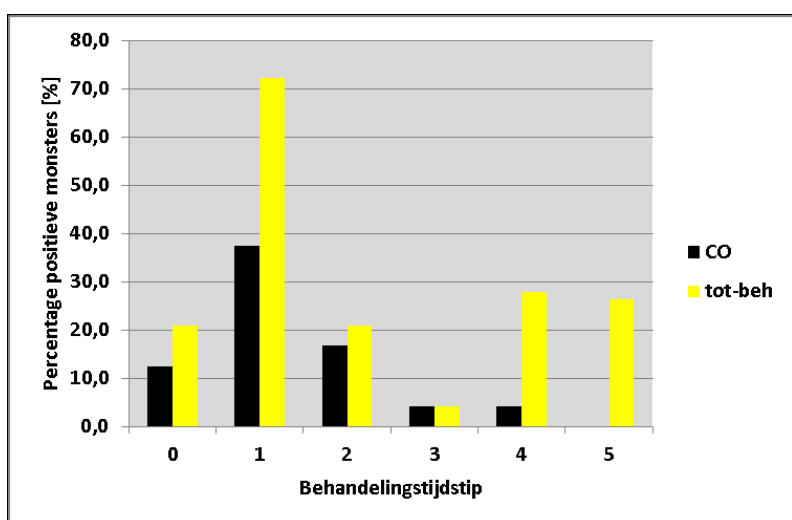
Bij de vergelijking van de monsternames over de verschillende tijdstippen heen (figuur 4.O) valt op dat de meeste positieve monsters in het begin (T1) en het einde (T4 en T5) werden gevonden



Figuur 4.M: Percentage positieve bladmonsters bij de behandelingen Controle, Handselectie, Selectiekar en Trekker in de jaren 2009 en 2010.



Figuur 4.N: Percentage positieve reacties op de afstand 0, 1 en 10 meter van de aangelegde besmette strook in de jaren 2009 en 2010.



Figuur 4.O: Percentage positieve reacties op de zes verschillende tijdstippen waarop bladmonsters werden genomen op de afstanden 0, 1 en 10 meter in de jaren 2009 en 2010.

Conclusie

- Het loof type lijkt niet bepalend voor de mate waarin versmering optreedt. Het slappere, hangende, loof van het ras Saline blijkt even gevoelig voor versmering als het stevige rechtopstaande ras Desiree.
- De methode waarmee schade aan de planten wordt aangebracht en een aanwezige Erwinia besmetting in het loof kan worden versmeerd, of dit nu gewoon lopend, met de selectiekar of met de trekker is, heeft geen invloed op de mate van versmering.
- Er lijkt enig verschil te zijn in het tijdstip waarop de meeste versmering plaats vindt. De meeste besmette bladmonsters werden gevonden op tijdstip 1, dat wil zeggen in een jong fris gewas waarbij de planten elkaar tussen de ruggen net raakten.

4.7 Is selecteren zinvol bij dreigende afkeuring

Inleiding

Tijdens de veldperiode wordt de kwaliteit van het pootgoed visueel beoordeeld op aanwezige afwijkingen zoals vermenging, mutant, virus- en Erwinia besmetting. Deze afwijkingen worden door de selecteur tijdens een aantal selectie rondes verwijderd.

Bij een aantasting door Erwinia is echter vaak de vraag of het verstandig is om via selectie een perceel schoon te willen selecteren. Wellicht is een betere strategie om het perceel met rust te laten en via een extra bemesting voor een goede consumptie opbrengst te gaan. De gedachte hierachter is dat niet alle planten symptomen geven en toch besmet kunnen zijn, waardoor de selecteur dus constant voor verdere versmering in het perceel zorgdraagt. Ook is het zeer goed mogelijk dat in de loop van het teeltseizoen steeds weer nieuwe, aangetaste, planten worden gevonden. Het is dan de vraag of een perceel wel "schoon" te selecteren is.

In de jaren 2009, 2010 en 2011 is dit op een aantal praktijkpercelen onderwerp van onderzoek geweest.

Doel

Bepalen of het mogelijk is om via continu selecteren een eindproduct te oogsten welke niet aantoonbaar besmet is met Erwinia.

Uitvoering

In 2009 werd al bij de eerste keuring een perceel Kondor S in St. Maarten afgekeurd. Een strook van 12 rijen breed en 60 meter lang werd gemarkeerd en, in tegenstelling tot de rest van het perceel, niet extra bemest (foto 4.A).

De gemarkeerde strook werd als volgt ingevuld:

- Blok 1: Wekelijks selecteren
- Blok 2: 1x selecteren bij aanvang selectie en daarna niets meer doen
- Blok 3: Markeren van planten met symptomen van Erwinia aantasting
- Blok 4: Niet speciaal gemarkeerd, maar betreft een verzamelmonster van uit de rest van het perceel dat doorgegroeid is als consumptie

Op 10 juni werden de eerste planten gemarkeerd in Blok 3. Op 18 juni werden de Blokken 1 en 2 volledig opgeschoond. Blok 1 werd vervolgens continu geselecteerd, waarbij alle verdachte planten werden verwijderd. In Blok 3 werden wekelijks planten gemarkeerd met een stok en datumlabel.



Foto 4.A: *Gemarkeerd blok, en daarin de gemarkeerde zieke planten, op een afgekeurd perceel poot aardappelen in St. Maarten [2009].*

In 2010 werd in Oude-Niedorp al bij de eerste keuring een perceel Kondor S afgekeurd. Het betrof stammenmateriaal (op het perceel stonden zowel 2^e, 3^e als 4^e-jaars stammen) waarin zeer veel aangetaste planten werden gevonden. Een strook van 9 rijen breed en 40 meter lang werd gemarkeerd waarin op dezelfde wijze als in 2009 blokken werden aangelegd. Ook hier werd één blok continu geselecteerd, één blok 1x geselecteerd, één blok gebruikt om te markeren en de rest van het perceel ontving een overbemesting.

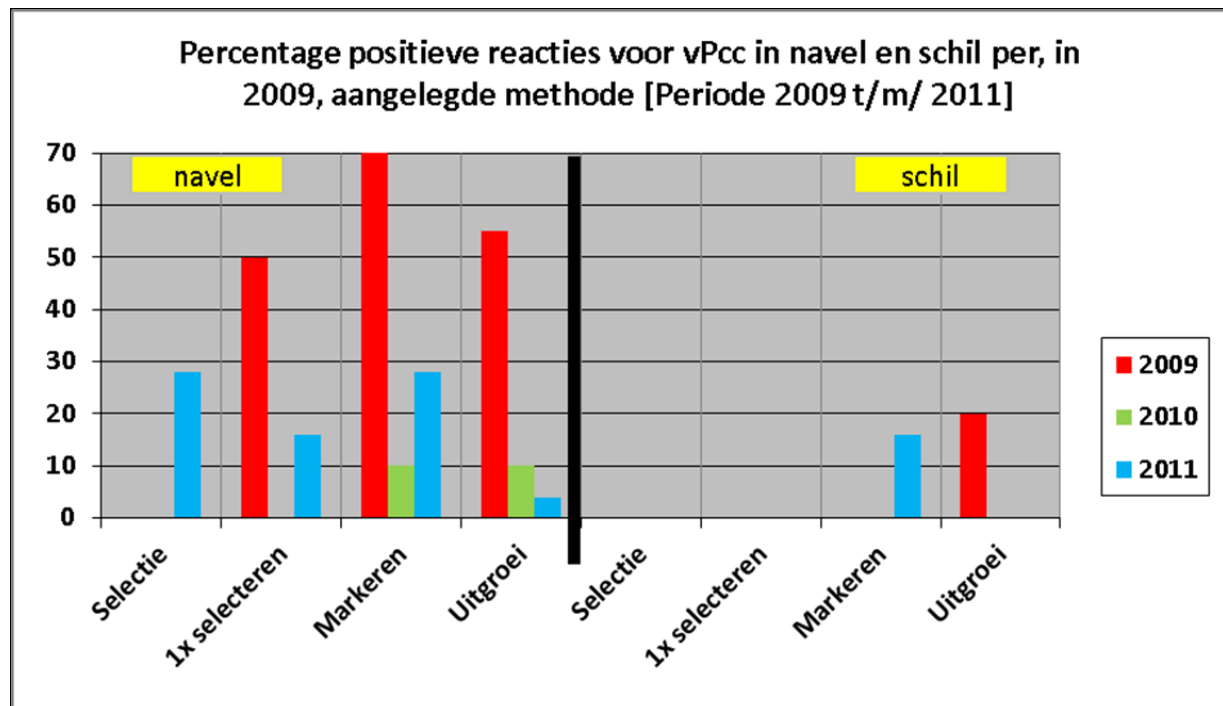
Op dezelfde wijze als in Oude-Niedorp werd ook in de Westhoek (Fr.) een proefveld in het ras Spunta uitgezet. Het betrof hier een aangekochte partij S, waarin vanaf de 1^e keuring regelmatig Erwinia planten werden gevonden en uiteindelijk afgekeurd. In overleg met de teler werd op 9 juli een strook van 12 rijen breed en 50 meter lang gemarkeerd.

In 2011 werden, op dezelfde wijze als in 2009 en 2010, in 3 percelen blokken met Selecteren, 1x Selecteren, Markeren en/of Consumptieteelt aangelegd. In Oldehove werd dit gedaan in een perceel Carlita dat na de 2^e keuring werd teruggezet in klasse. In Firdgum (Fr.) werden blokken uitgezet in een gedeclasseerd perceel Anosta. In dit perceel was al veel geselecteerd, maar dit bleek niet voldoende te zijn voor het behoud van de klasse. Ook in Drijber (Dr.) werden blokken uitgezet in een perceel afgekeurde Kondor S. Dit perceel was, t.o.v. de andere percelen in 2011, zeer zwaar besmet wat zich uitte in veel symptoomplanten.

Resultaten

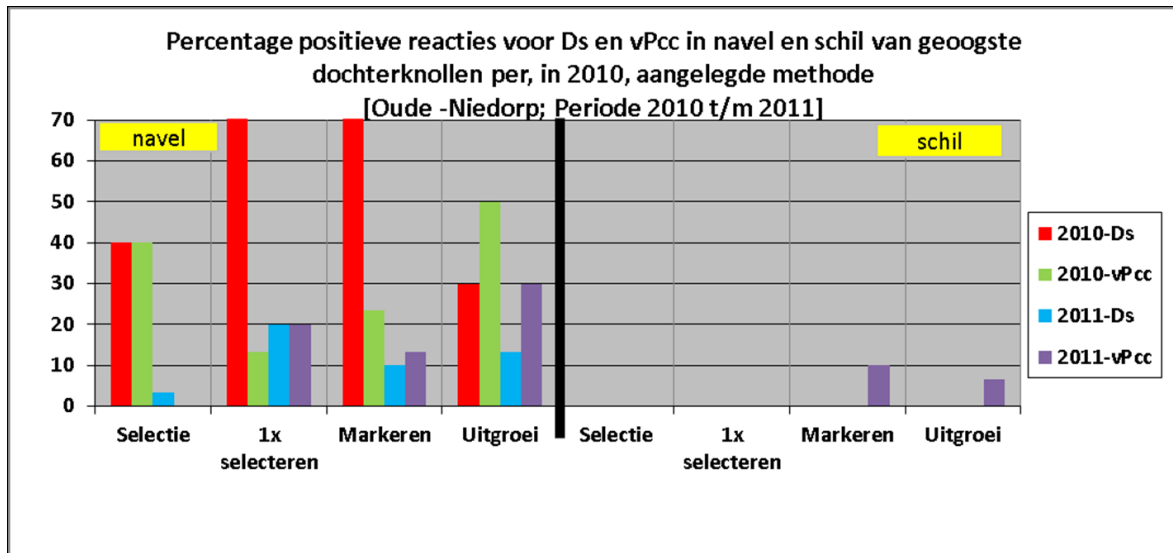
Zoals in het hoofdstuk uitvoering al aangegeven zijn diverse percelen in de praktijk gevolgd waar bij de inzet was om met selecteren een perceel schoon te krijgen, waarbij niet alleen geen planten met Erwinia meer te vinden zijn, maar ook in de nateelt geen Erwinia in de dochterknollen wordt gevonden.

In het proefveld in St. Maarten in 2009 werd verrassender wijs vastgesteld dat in de geoogste knollen van het object Selecteren geen Erwinia kon worden aangetoond. Dit ondanks een aantastingspercentage van ca. 80 % van de planten. Om vast te stellen of dit effect ook in de nateelt tot uiting zou komen werd het materiaal in 2010 en 2011 na geteeld op een controleveld. Bij deze nateelt werden alle bewerkingen handmatig uitgevoerd om invloeden door mechanisatie uit te sluiten. In 2011 werd voor het eerst weer een besmetting van het navelende met vPcc gevonden.



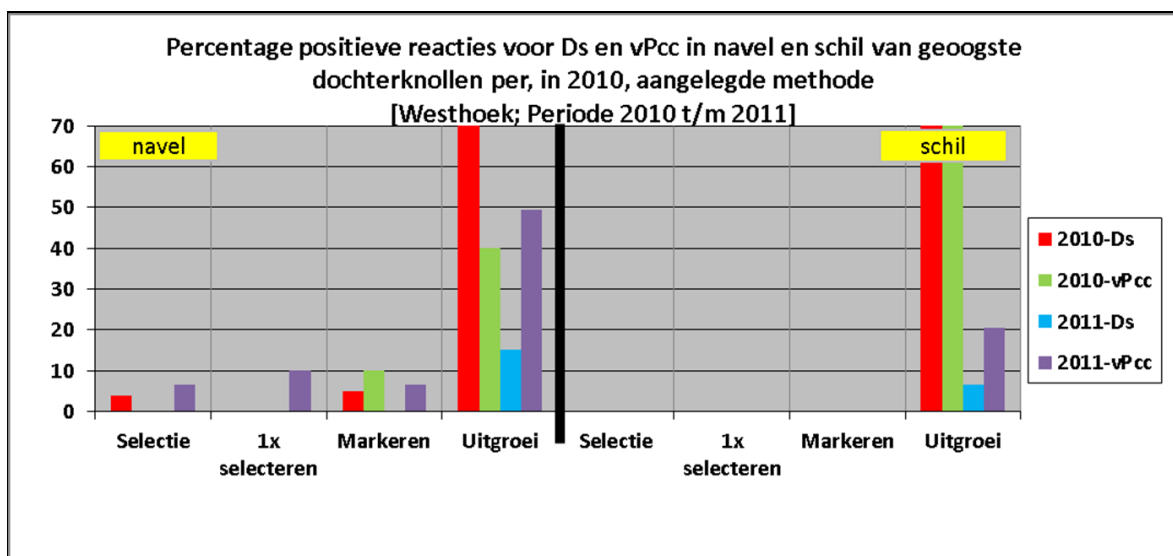
Figuur 4.P: Resultaat voor navel en schil besmetting van de (na)teelt van het proefveld dat in 2009 werd aangelegd in St. Maarten.

In 2010 werd in Oude-Niedorp een proefveld aangelegd die, wat betreft ras en aantal symptoomplanten, goed vergelijkbaar was met het proefveld in 2009. Ook hier werd op sommige plaatsen een aantasting van 80 – 100% gescoord. Bij de selectie werden al regelmatig rotte dochterknollen aangetroffen. Het resultaat van alle selectie inspanningen werd in dit proefveld niet beloond met een schone nateelt. In de nateelt van 2010 werden in 2011 in het veld in alle objecten, m.u.v. Selectie, symptoomplanten (1,2 – 2,8 %) gevonden. Opvallend is de lage besmetting in 2011 in de nateelt van het selectieblok. Bij de analyse van monsters werd zowel Ds als vPcc gevonden.



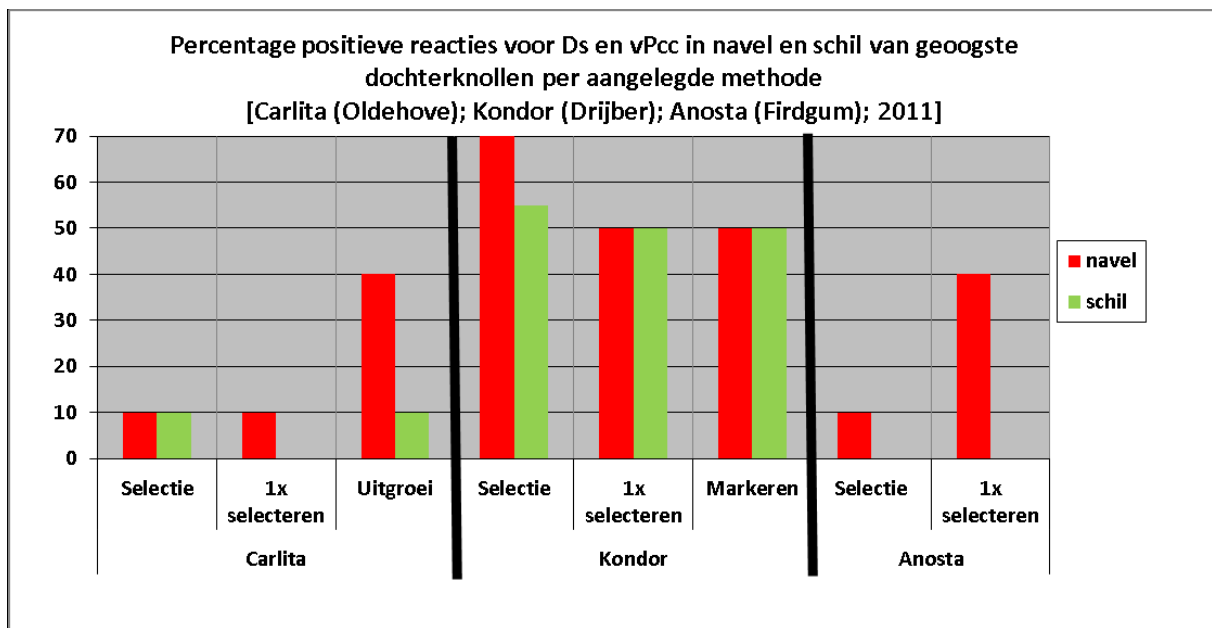
Figuur 4.Q: Resultaat voor navel en schil besmetting van de (na)teelt van het proefveld dat in 2010 werd aangelegd in Oude-Niedorp.

Het proefveld in de Westhoek in 2010 kenmerkte zich door een relatief laag aantal symptoomplanten (1,9 %) in het veld. Toch bleek in het knolmateriaal dat was uitgegroeid een hoge besmetting met Erwinia aanwezig te zijn. In 2011 werd materiaal uit de verschillende blokken op een nacontrole veld na geteeld. Opvallend genoeg werd ook in deze nateelt in de nateelt van het selectie object geen symptoomplanten voor te komen. In de overige blokken werden een variërend aantal symptoomplanten waargenomen (0,4 - 2,4 %). Analyse van monsters gaf aan dat zowel Ds als vPcc werd gevonden.



Figuur 4.R: Resultaat voor navel en schil besmetting van de (na)teelt van het proefveld dat in 2010 werd aangelegd in Westhoek.

In 2011 werden blokken uitgezet in 3 verschillende percelen. Helaas konden niet alle blokken in alle velden worden aangelegd, die ook in eerdere onderzoek jaren werden gebruikt. In het perceel Carlita werd een laag aantastingspercentage (0,21 %) gevonden. Bij analyse van de genomen monsters werd in dit veld voornamelijk Ds gevonden en sporadisch ook vPcc. Bij het perceel Kondor werd een hoger aantal symptoomplanten gevonden, namelijk 6,25 %. De besmetting bestond hier hoofdzakelijk uit vPcc, aangevuld met enkele Ds besmettingen. De besmetting in navel en schil was in dit veld bij alle objecten van gelijke omvang. In het perceel Anosta werd een zeer laag aantal symptoomplanten (0,01 %) gevonden. De gevonden besmetting bestond hoofdzakelijk uit Ds, aangevuld met enkele vPcc besmette monsters.



Figuur 4.S: Resultaat voor navel en schil besmetting van de 3 aangelegde proefvelden in praktijkpercelen in 2011

Conclusie

- In 2009 werd na continu selectie in de geogste dochterknollen geen enkel positief monster gevonden. Bij de overige methoden (1x selectie, markeren en consumptieteelt) werd in de nateelt tot 70 % vPcc positieve monsters aangetroffen. Ds was niet aantoonbaar aanwezig
- Het perceel in 2009 was een perceel met een hoog aantal symptoomplanten
- Het perceel in Oude Niedorp in 2010 was vergelijkbaar qua aantal symptoomplanten.
- De gevonden resultaten bij een hoog aantal symptoomplanten was in 2010 afwijkend van de resultaten 2009. In 2010 werden ook in de geogste knollen van het blok "continu selectie" positieve reacties gevonden van zowel Ds als vPcc
- Het perceel in de Westhoek was een perceel met zeer weinig symptoomplanten.
- In 2011 werd in 3 praktijk percelen met problemen verschillende niveaus van besmetting aangetroffen. Het leidde in 2011 in geen van de gevallen tot een nateelt waarin geen Erwinia meer werd aangetoond.
- In de nateelt van in 2009 en 2010 geogste knollen werden in vrijwel alle gevallen symptoomplanten, dan wel besmette dochterknollen gevonden.
- Het selecteren tot de laatste plant met symptomen is verwijderd heeft in de jaren 2010 en 2011 niet tot partijen geleid die niet meer met Erwinia besmet waren. Dit was in 2009 wel het geval, maar ook in deze nateelt werd in de 2^e nateelt weer Erwinia aangetroffen.

4.8 Loofdoding methoden

Inleiding

Het onderzoek naar de effecten van versmering bij loofdoding staat al langer in de belangstelling. In het project “Bacterievrije- pootgoedteelt, een uitdaging” was dit reeds onderdeel van het onderzoek. In aansluiting op het uitgevoerde onderzoek werd in 2009 een vervolg gestart, waarbij de wijze van loofdoding centraal stond. Daarnaast werd een proef aangelegd om de effecten van loofdoding op de dynamiek van de moederknol vast te stellen. De proef met de verschillende methoden bleek na analyse geen betrouwbare verschillen op te leveren tussen de verschillende objecten. Dit werd veroorzaakt doordat vrijwel alle monsters positief bevonden werden, zelfs de Controle velden waarin geen *Erwinia* in was aangebracht. In de proef waarin de moederknoldynamiek vastgesteld zou worden bleken bij de loofvernietiging geen moederknollen meer aanwezig te zijn.

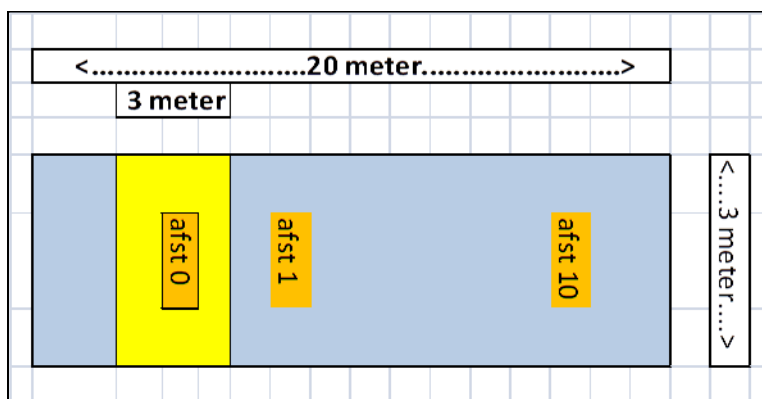
Aangezien tijdens de monitoring bij stammen- en S-telers veel positieve monsters werden gevonden tijdens de loofvernietiging, waarbij veelal ook *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum* (vPcc) werd aangetroffen, is besloten een andere opzet te kiezen. De aandacht hierbij werd dus verlegd van de wijze van loofvernietiging, naar de verspreiding van *Dickeya sp.* (Ds) en vPcc tijdens de veel gebruikte loofvernietigingsmethode, het loofklappen.

Doel

Vaststellen wat het effect is van loofvernietiging op de versmering van *Dickeya sp.* (Ds) en *Pectobacterium carotovorum ssp. carotovorum* (vPcc).

Uitvoering

In eerder onderzoek naar loofvernietiging werd vaak pootgoed van de klasse S gebruikt. Om er zeker van te zijn dat er geen effecten zijn van *Erwinia*, welke van nature in een partij aanwezig zou kunnen zijn, werd besloten de proeven aan te leggen met miniknollen (2010: Milano; 2011: Aviron). Er werd gebruik gemaakt van de opzet, zoals in figuur 4.T is aangegeven. Hierbij is “afst 0” de besmette strook waarin knollen werden gepoot die besmet waren.



Figuur 4.T: Schematische weergave van de velden binnen het proefveld en de plaats van monsternamen. De gehanteerde rijrichting is van links naar rechts.

Vijf dagen voordat zou worden begonnen met de aanleg van de objecten, waarbij het loof geklapt zou gaan worden, werd het loof van de objecten met de combinatie spuiten en vervolgens klappen doodgespoten. Beide jaren werd dit uitgevoerd door een bespuiting met 3 liter Reglone per hectare. Vervolgens werden alle objecten 5 dagen aangelegd, met uitzondering van het object spuiten en klappen na 2 weken. De omstandigheden in 2010 waren ideaal om tot versmering te komen. Het regende vrijwel de gehele dag, waardoor de omstandigheden verre van ideaal waren. Het proefveld werd echter toch aangelegd aangezien de weersvoorspellingen niet op korte termijn een verbetering

van de omstandigheden te zien gaven. De meteorologische gegevens van de dag waarop de loofdoding grotendeels werd uitgevoerd staat in tabel 4.2 vermeld.

datum	T-gem	T-max	T-min	neerslag	RV-min	w.snelh
17-08-10	15,7	19,2	13,7	5,4	97	1,6
01-08-11	15,4	19,6	12,8	0	79	2,4

Tabel 4.2: Meteorologische gegevens van de datums waarop de loofdoding werd uitgevoerd. [2010 en 2011]

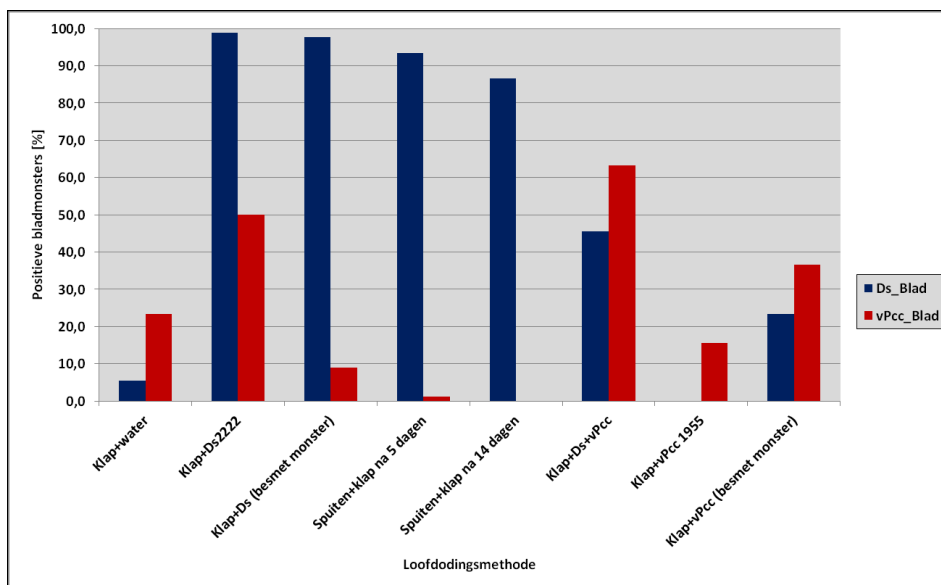
Direct na het klappen werden, van iedere afstand (0, 1 en 10 meter), 10 mengmonsters blad in plastic zakken verzameld. Het object spuiten en klappen werd op respectievelijk 5 of 14 dagen geklapt, waarna ook daar de monsters werden genomen. Na ieder veld werd de loofklapper gereinigd en ontsmet om cross-contaminatie te via de machine voorkomen. De monsters werden nog dezelfde dag in het lab verwerkt.

Aan de bladmonsters werd 250 ml water toegevoegd. Vervolgens werd het blad handmatig in de plasticzak gemengd met het water. Hieruit werd 10 ml extract in een Greiner 12 ml buis gepipetteerd. Deze buizen werden gedurende 15 minuten bij een hoog toerental gecentrifugeerd en vervolgens afgegoten. Aan de pellet werd vervolgens 10 ml PEB toegevoegd. Vervolgens werden de buizen in een stoof gedurende 72 uur bij 20 °C weggezet. Na 72 uur werden de buizen bij -20 °C ingevroren. Uit de buizen werd materiaal gehaald dat gebruikt werd voor DNA-extractie en Taqman-PCR meting.

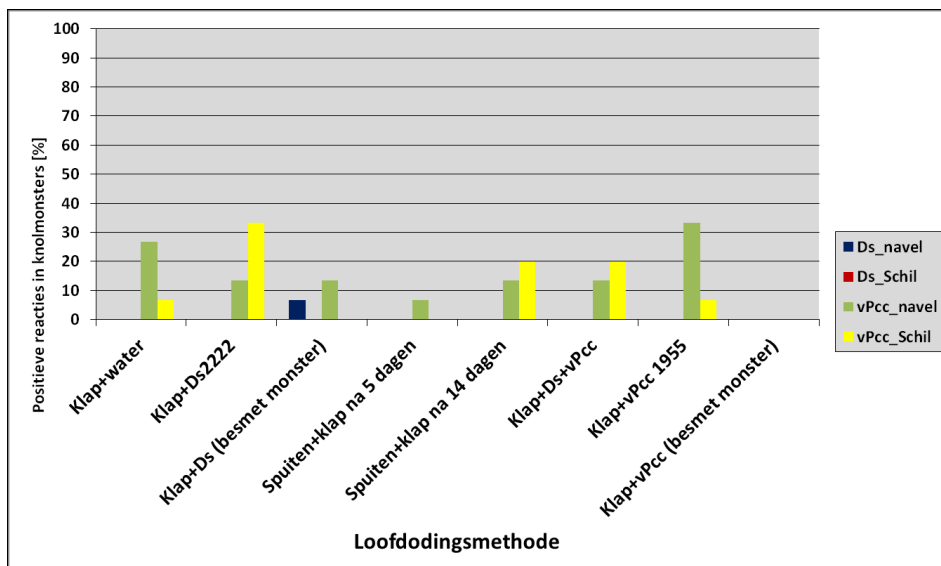
Nadat het loof goed was afgestorven werd een knolmonster gerooid van 100 knollen per veld. Voor dit monster werden 10 planten geoogst op circa 1 meter afstand van de besmette strook. De knollen werden vervolgens onderzocht op aanwezigheid van *Erwinia* in de schil.

Resultaten

De resultaten van het onderzoek in 2010 laten zien dat als de omstandigheden niet optimaal zijn om loof te klappen (nat gewas en continu lichte regen tijdens het klappen), dat de besmettingen die in het blad worden gevonden groot kunnen zijn (figuur 4.U). Dat dit ook kan leiden tot besmettingen in de knollen wordt in 2010 duidelijk (figuur 4.V)



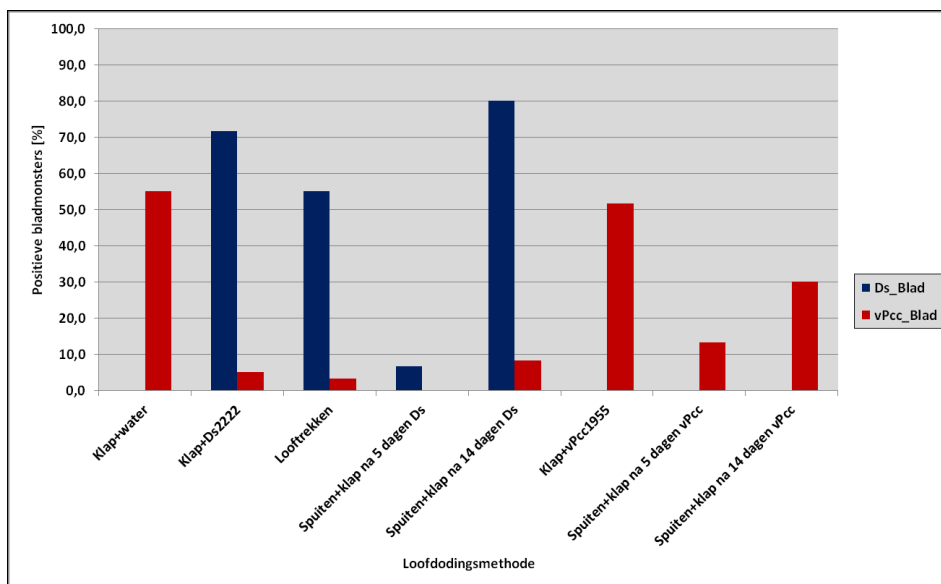
Figuur 4.U: Percentage positieve bladmonsters bij verschillende methoden van loofdoding [TV-L-10-01; 2010]



Figuur 4.V: Percentage positieve knolmonsters (navel en schil) bij verschillende methoden van loofdoding [TV-L-10-01; 2010]

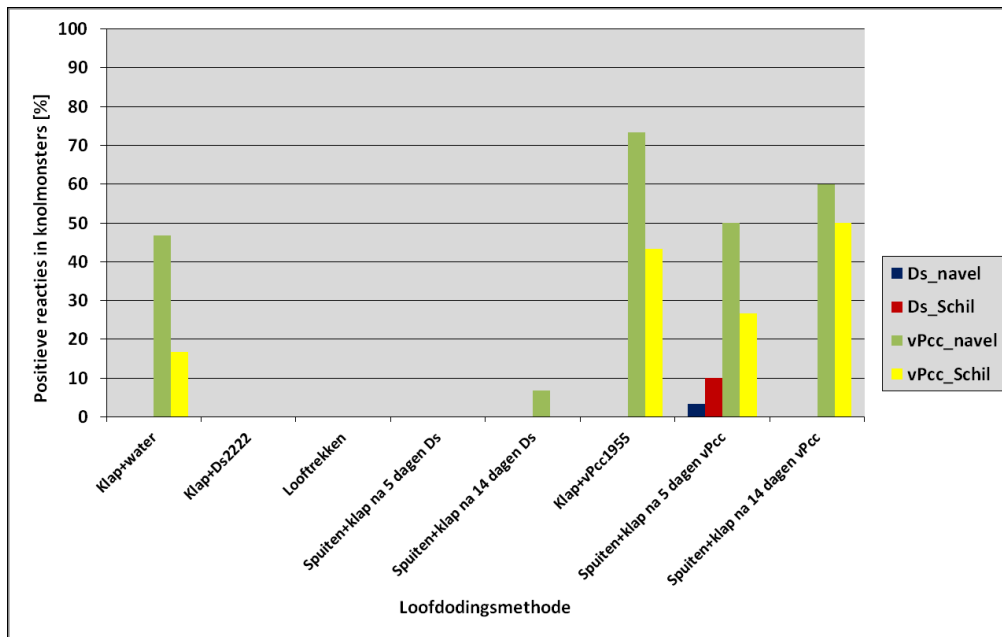
In het onderzoek van 2010 komt naar voren dat een hoge besmetting bij de loofdoding met Ds niet automatisch tot meer besmette knollen leidt. Het is echter wel duidelijk dat als een risico vermeden kan worden dit uiteraard de voorkeur dient te krijgen. Opvallend bij de resultaten van de navel- en schilmonsters is de besmetting met vPcc die wordt gevonden, terwijl een Ds besmetting zelden wordt aangetroffen.

In 2011 werd het onderzoek van 2010 herhaald, echter nu meer gericht op het effect van spuiten en klappen ten opzichte van klappen en spuiten. Ook het object Looftrekken werd nu meegenomen, dit mede naar aanleiding van vragen van telers. Bij zowel de objecten met Ds als met vPcc waar 5 dagen voor het klappen was gespoten, werd de laagste besmetting in het blad gevonden (figuur 4.W).



Figuur 4.W: Percentage positieve bladmonsters bij verschillende methoden van loofdoding [TV-L-11-01; 2011]

Net als in 2010 werden enkele weken na de loofdoding monsters verzameld uit de strook op 1 meter afstand van de besmette strook. Deze knolmonsters werden onderzocht op aanwezigheid van *Erwinia* in het navelende of in de schil (figuur 4.X)



Figuur 4.X: *Percentage positieve knolmonsters (navel en schil) bij verschillende methoden van loofdoding [TV-L-11-01; 2011]*

Conclusie

- In 2010 werd het proefveld aangelegd onder zeer vochtige, mistige, omstandigheden. In 2011 was het juist het tegenovergestelde, namelijk zonnig en drogend weer.
- Zowel in 2010 als in 2011 werd *Dickeya* in het blad teruggevonden. Bij de ideale omstandigheden in 2011 werd de laagste besmetting gevonden in het object waarbij 5 dagen na volveldsspuiten werd geklapt.
- Ook voor vPcc werd de laagste besmetting in het blad in het object volveldsspuiten en na 5 dagen klappen gevonden.
- Bij looftrekken werd evenveel besmet blad gevonden als bij het object klappen en spuiten.
- Volveldsspuiten gevolgd met klappen na 5 dagen geeft de laagste besmetting in het blad en is daarmee de loofdodingsmethode met het laagste risico op verdere besmetting van de te oogsten knollen.
- In 2010 werd geen *Dickeya* in de knollen gevonden met uitzondering van het object waarbij van nature besmet materiaal was gebruikt. Wel werd in alle objecten vPcc in de navel en/of de schil aangetroffen, ook daar waar *Dickeya* het doelorganisme was.
- Zowel in 2010 als in 2011 werd in de knollen van de watercontrole vPcc gevonden. Hiervoor is geen verklaring gevonden. De enige plausible verklaring zou kunnen zijn dat hier een infectie wordt gevonden die van buitenaf is gekomen (Initiële besmetting)
- In 2011 werd in alle objecten waar vPcc het doelorganisme was vPcc in navelende en schil aangetroffen, waarbij de laagste besmetting werd aangetroffen bij het object volveldsspuiten en na 5 dagen klappen.

4.9 Loofdoding monitoring 2012

Inleiding

Binnen het Deltaplan Erwinia is in de periode 2009 – 2011 aandacht besteed aan de gevolgen van loofdoding op de introductie en/of verspreiding van de Erwinia bacterie. Bij monsternames vlak voor en vlak na loofklappen werd in proefvelden vastgesteld, dat via het loofklappen, loof van zieke planten, voor verspreiding van Erwinia kan zorgen.

Tijdens de monitoring op praktijkbedrijven waar de teelt van miniknollen in de loop van de tijd werd gevolgd, werden regelmatig besmette bladmonsters aangetroffen. Op basis van het uitsluiten van andere factoren is de veronderstelling nu dat de Erwinia bacterie via vectoren als insecten en aerosolen in een schoon perceel zijn intrede kan doen.

Ook tijdens de monitoring van bedrijven die S-materiaal aankopen werden regelmatig positieve bladmonsters gevonden in percelen waarin geen Erwinia zieke planten werden gevonden, en waar in het uitgangsmateriaal ook geen aantoonbare besmetting aanwezig was.

In een in 2011 gestarte proef werd vastgesteld, dat loof, na loofklappen, tot zeker 3 weken na loofdoding nog steeds levende bacterie kan bevatten. De Erwinia bacterie werd bij monstername in deze proef zowel in de stengel als ook in het tussen de rijen liggende blad aangetroffen.

Doel

Vaststellen of afstervend loof, na de loofvernietiging, nog een potentiële bron van versmering kan zijn.

Uitvoering

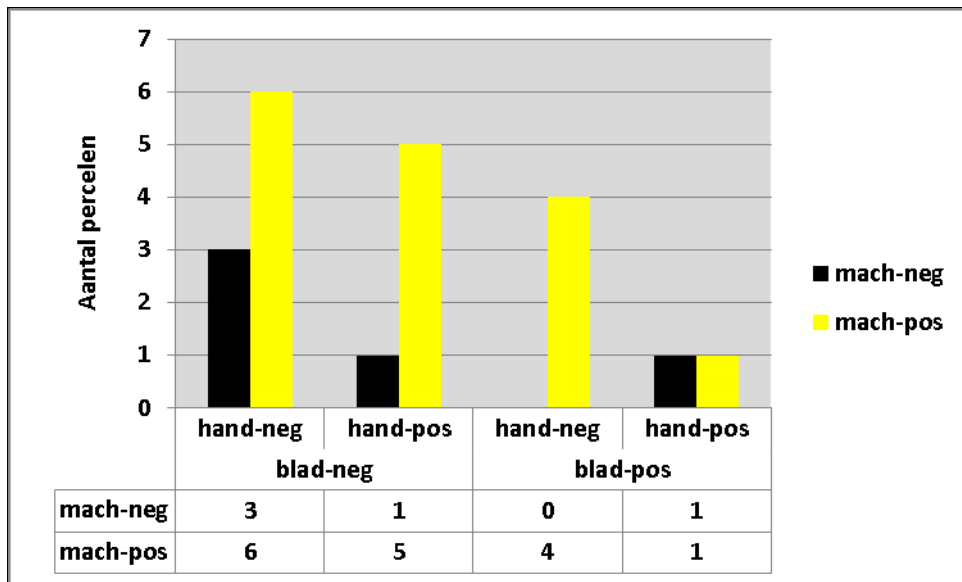
Van 22 percelen werd, na de loofvernietiging via loofklappen, blad- en stengelmateriaal verzameld. Tijdens het nemen van de bladmonsters werd tevens een knolmonster van 100 knollen genomen op de plek waar ook het loofmateriaal verzameld werd. Van ieder perceel werden op deze wijze 2 blad- en knolmonsters verzameld. Na het inschuren werd vervolgens een monster van 200 knollen uit de partij genomen.

De bemonsterde percelen bevonden zich in verschillende teeltgebieden, namelijk in de provincies Groningen, Friesland, Flevoland, Noord-Holland, Noord-Brabant en Gelderland. De percelen hadden alle de klasse S of SE

De genomen monsters werden allemaal verwerkt met de vacuümtoets. Aan de bladmonsters werd 100 ml PEB toegevoegd, terwijl aan de knollen 50 ml water per 10 knollen werd toegevoegd. De monsters werden vervolgens, na het vacumeren, gedurende 7 dagen bij 25 °C bewaard. Na deze verrijkingperiode werd een extract uit de monsters gehaald, waarop vervolgens na DNA isolatie een TaqMan-PCR werd uitgevoerd.

Resultaten

Van de in 1^e instantie aanwezige 22 percelen zijn in de analyse van de resultaten uiteindelijk 21 percelen meegenomen. Van het perceel dat niet is meegenomen werden geen knollen na de oogst ontvangen. Van ieder perceel werd aan de hand van 2 bladmonsters (blad), 2 met de hand gerooide knolmonsters van ieder 100 knollen (hand) en 1 monster van 200 knollen na het inschuren (mach). Het resultaat in figuur 4.Y laat zien dat bij 15 percelen geen loofbesmetting werd aangetroffen. Na de oogst van deze percelen werd bij 5 percelen geen besmetting in de knollen aangetoond, terwijl dit bij 10 percelen wel het geval was. Bij 6 percelen werd Erwinia in het loof aangetoond. In slechts 1 perceel werd vervolgens in de knollen geen Erwinia aangetoond.



Figuur 4.Y: Aantal percelen onderverdeeld in percelen waarbij het bladmonster negatief of positief was en de daarbij behorende uitslagen voor hand- en machinaal rooien.

Conclusie

- 60% van de percelen, waar in het blad geen Erwinia besmetting werd gevonden, bleek bij het met de hand rooien niet besmet te zijn. De overige 40% bleek al een knolbesmetting te hebben.
- 67% van de percelen, waar in het blad wel Erwinia werd gevonden, bleek bij het met de hand rooien nog schoon te zijn. De monsters van deze percelen bleken na het inschuren wel allemaal een Erwinia besmetting te hebben.
- Bij de bemonstering bleek slechts 14,3 % van de percelen bij geen enkele bemonstering een positieve reactie te geven.
- In 28,6% van de percelen werd een positieve reactie in het blad, dat tussen de ruggen lag na het loofklappen, gevonden.

4.10 Fysiologische rijpheid

Inleiding

Vanuit de praktijk kwamen regelmatig vragen binnen of, en welk, effect er bestaat tussen de gevoeligheid van de geproduceerde knollen voor *Erwinia* besmetting en de fysiologische rijpheid op het moment van loofdoding.

Telers duiden dit aan als een perceel dat mooi afgerijpt is versus een perceel dat ze “slachten”. De fysiologische gesteldheid van een plant, en de ontwikkelingsfase waarin deze zich bevindt, kan van invloed zijn op een aantal processen die de opname van *Erwinia* bacteriën kan beïnvloeden.

Om meer inzicht te krijgen in de effecten van de hoogte van de stikstofbemesting in relatie tot de verspreiding van *Erwinia* bij de loofdoding, werden in 2011 en 2012 proefvelden aangelegd op zandgrond.

Doel

Door het nemen van verschillende monsters vaststellen of de afrijping van een gewas van invloed is op de uiteindelijke besmetting van de knollen.

Uitvoering

In beide jaren (2011 en 2012) werd een proef aangelegd met 3 bemestingstrappen (50 % – 100 % – 150 %) in 4 herhalingen. De loofvernietiging vond in 2011 plaats vinden via loofklappen, waarbij de loofklapper door een, met *Dickeya*, besmette strook reed. Als uitplant werden 2 verschillende rassen gebruikt (miniknollen).

In 2012 werd de opzet iets gewijzigd, namelijk daar waar het de methode van loofdoding betrof.

Gezien de ervaringen met de verschillende methoden van loofvernietiging in de jaren 2010 en 2011 werd besloten om naast het loofklappen en spuiten, ook de methode spuiten en klappen aan te leggen. De velden werden aangelegd met miniknollen van het ras Festien.

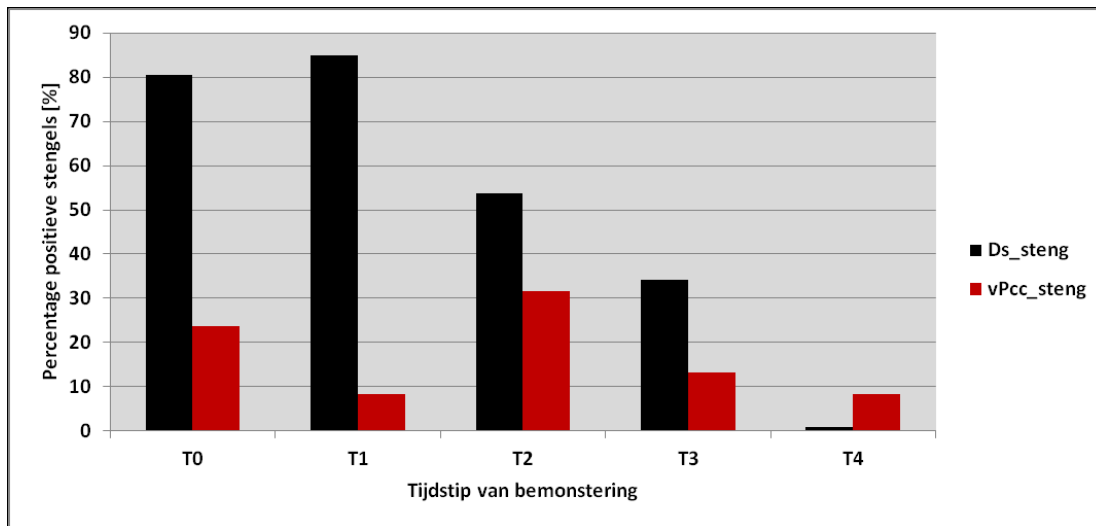
Direct na de loofvernietiging werden uit ieder veld 5 planten geoogst. Van iedere plant werd stengel- en knolmateriaal verwerkt. Op T0 werd het bovenste deel van de stengel, het deel van de stengel waar de loofklapper de plant heeft geraakt, onderzocht. In de daarop volgende weken werd steeds een lager deel van de stengel onderzocht. Op T2 t/m T4 werd een ondergronds deel van de stengel onderzocht. In 2012 werd de aan de plantenwortels hangende grond verzameld om de besmetting van de rhizosfeer vast te stellen. Tijdens de wekelijkse bemonsteringen werden ook bladmonsters tussen de ruggen vandaan verzameld. Op T0 was dit dus vers gehakseld loof, maar naarmate de tijd voortschreed werd de monsternamen steeds moeilijker en kon in sommige velden slechts geringe hoeveelheden blad gevonden worden.

De geoogste knollen werden per plant verwerkt. In 2011 werd dit gedaan door de besmetting in de navel en schil vast te stellen. In 2012 werd dit ook gedaan, maar werd het onderzoek uitgebreid door de knollen, nadat het navel- en schilmonster was genomen, via vacuüm verrijking nog verder te onderzoeken.

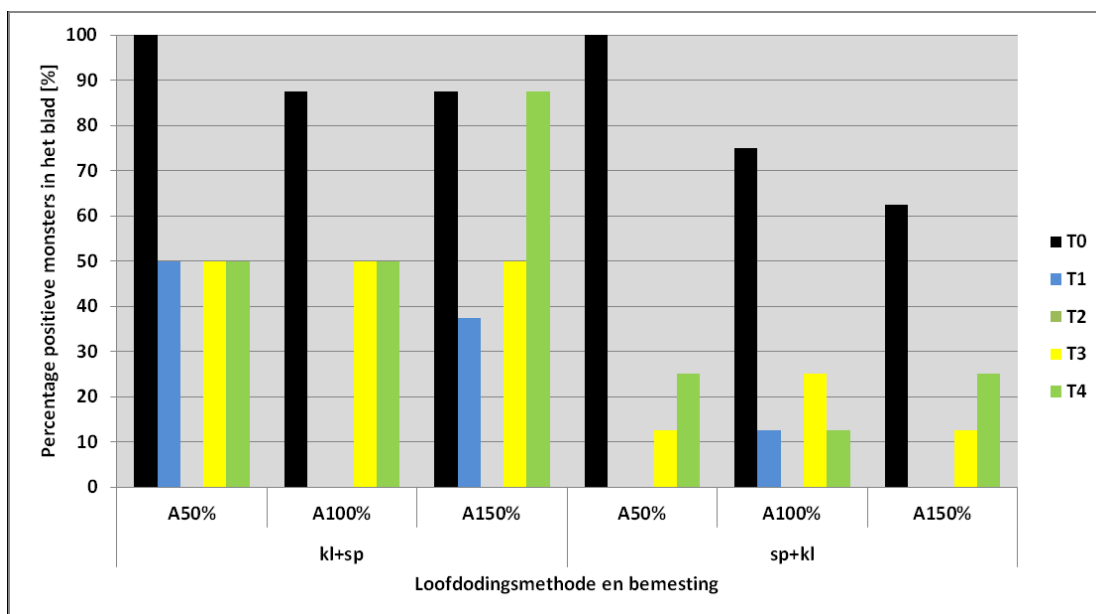
Resultaten

Nadat de loofdoding via loofklappen was uitgevoerd (T0) werden 5 planten per veld geoogst. Dit werd vervolgens 4 weken (in 2011 3 weken) lang (T1 t/m T4) herhaald. Bij de stengels werden van alle stengels per plant een deel onderzocht. De resultaten (figuur 4.Z) laten zien dat op T0 en T1 ongeveer 80 – 90 % van de stengels besmet is, en dat vervolgens de besmetting wel afneemt, maar zelfs 4 weken na de loofdoding nog levende bacterie wordt aangetroffen in de stengel.

In de bladmonsters die werden genomen tussen de ruggen bleken, na de loofdoding, nog een gehele tijd *Dickeya* bacteriën aantoonbaar aanwezig (figuur 4.AA). Opvallend was dat op T2 geen enkel positief monster werd gevonden. Hiervoor is geen verklaring gevonden. In 2012 blijkt de methode van loofdoding een belangrijke rol te spelen. In de objecten “ Klappen en Spuiten” wordt beduidend meer, en langer, *Dickeya* gevonden dan in de behandeling “ Spuiten en Klappen” .



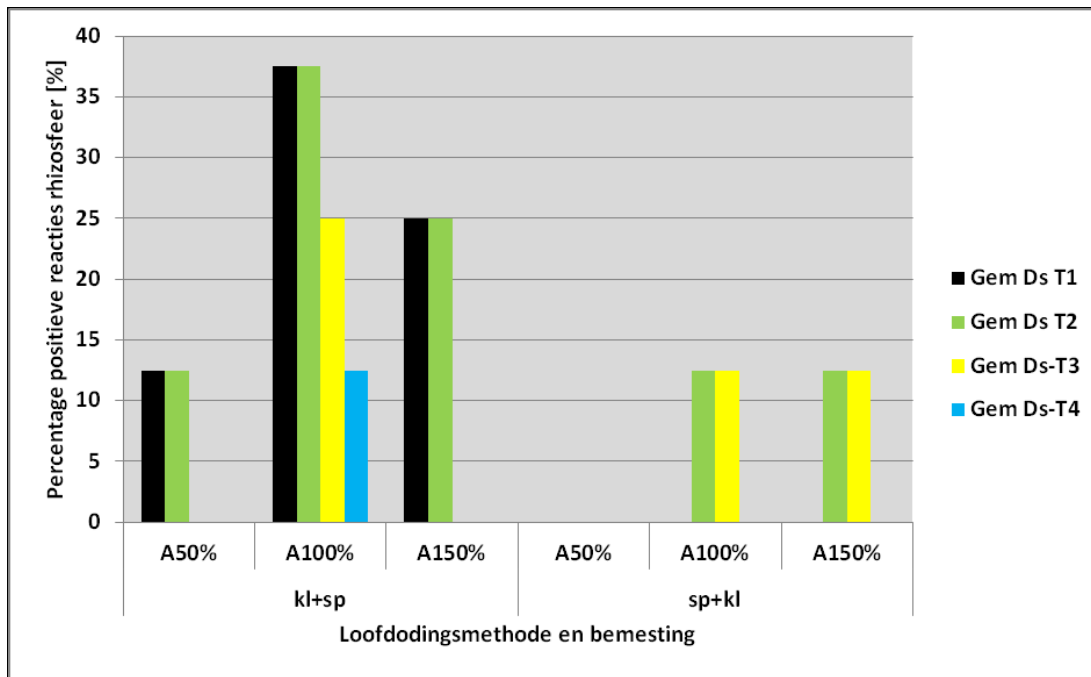
Figuur 4.Z: Verloop van het percentage positieve stengels dat werd gevonden na de loofdoding in 2011 en 2012 in de loop van de tijd.



Figuur 4.AA: Verloop van het percentage, voor *Dickeya*, positieve bladmonsters dat werd gevonden na de loofdoding in de loop van de tijd 2012

In 2012 was de planning in eerste instantie om grondmonsters te nemen, zodat vastgesteld zou kunnen worden of *Erwinia* via de grond zou kunnen worden verspreid. Omdat op T0 bleek dat dit onevenredig veel tijd in beslag zou nemen werd besloten om vanaf T1 t/m T4 rhizosfeer monsters te nemen. Van de geogste planten werd grond van de wortels afgeschud. Deze grond, met soms nog een enkele wortelrest werd onderzocht. Uit de resultaten (figuur 4.BB) blijkt dat vooral bij het klappen en spuiten veel positieve rhizosfeer reacties worden gevonden. Bij het spuiten en klappen is dit alleen het geval op tijdstip T2 en T3. Op T0 bleken alle genomen grondmonsters positief te zijn. De analyse van de knollen liet in beide jaren zien dat sporadisch positieve reacties worden gevonden in de navel en/of schil. Dit kan bij gunstige omstandigheden uiteraard het begin van een latente besmetting leiden.

Bij de analyse van de gevonden gegevens in de jaren 2011 en 2012 komt naar voren dat, over alle genomen monsters gezien, bij een bemesting van 50 % van de geadviseerde hoeveelheid minder positieve reacties van het doelorganisme, *Dickeya*, worden gevonden dan bij een hogere bemesting.



Figuur 4.BB: Verloop van het percentage, voor *Dickeya*, positieve rhizosfeermonsters dat werd gevonden na de loofdoding in de loop van de tijd 2012

Conclusie

- In het grootste deel van de bladmonsters werd een besmetting van Ds en/of vPcc teruggevonden. In de bladmonsters werd tot 4 weken na loofdoding nog een groot aantal besmette monsters gevonden.
- In het begin na de loofdoding, tussen T0 en T1, blijft de besmetting vrij constant en neemt daarna af.
- In de stengeldelen werd tot 4 weken na loofdoding, dus in al afgestorven loof, nog Ds en/of vPcc aangetroffen.
- Bij meerdere typen monsters blijkt in het object "Sputten en Klappen" minder besmettingen voor te komen dan bij "Klappen en Sputten". Dit is een bevestiging van de resultaten van diverse loofdodingsonderzoeken die binnen het Deltaplan *Erwinia* zijn uitgevoerd.
- De besmetting van knollen beperkt zich tot een sporadische besmetting in het navelende en/of schil. Indien deze besmetting zich in de partij vestigt kan dit voor een eerste latente besmetting zorgen.
- Over alle monsters gezien werd het laagste aantal besmette monsters gevonden bij een 50% bemesting.

4.11 Monitoring S-telers

Inleiding

Het is al jaren een gespreksthema dat bedrijven die S-materiaal van dezelfde uitgangsstam ontvangen, grote verschillen in Erwinia besmetting in het eindproduct laten zien bij het verder vermeerderen van de pootaardappelen.

De reden van de verschillen is vaak niet duidelijk. Is er sprake van een bedrijfsprobleem of wordt een aanwezige latente besmetting bij het ene bedrijf zichtbaar en bij het andere niet. De oorzaken hiervan kunnen ook een andere oorsprong hebben, zoals grondsoort, rotatie, weersinvloeden, etc.. Om meer inzicht in de oorzaken van de verschillen te krijgen werd in 2009 gestart met twintig bedrijven waar de teelt van een aantal partijen S-materiaal werd gevolgd.

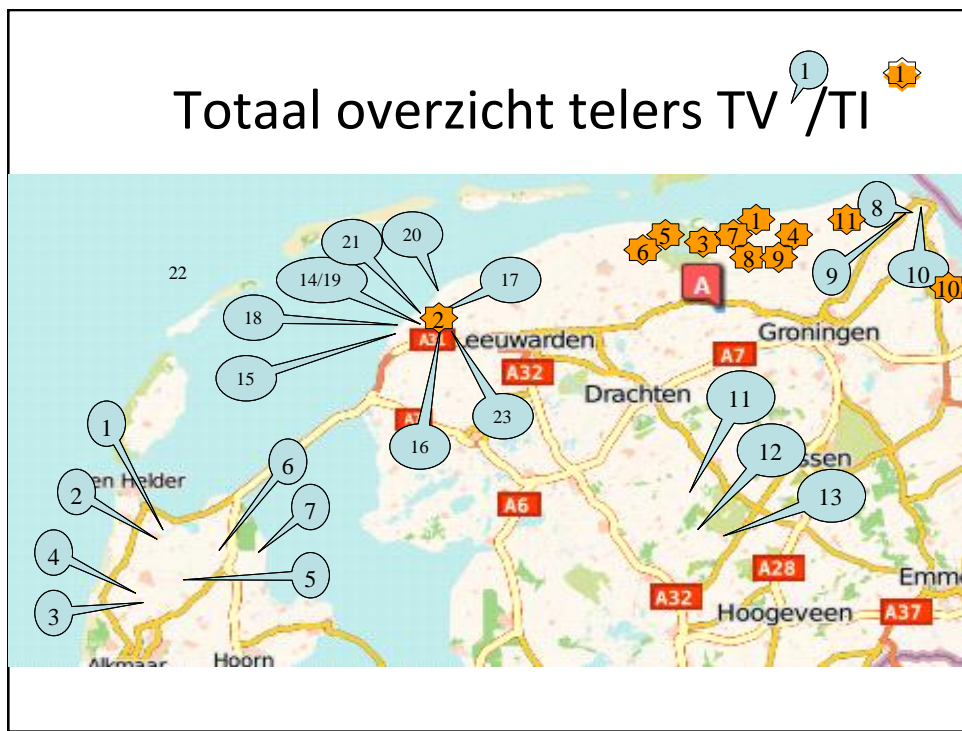
Doel

Meer inzicht krijgen in de effecten die een rol spelen bij de toename van een Erwinia besmetting in aangekocht S-materiaal

Uitvoering en resultaat

In 2009 werd gestart met een monitoring bij telers die jaarlijks een nieuwe partij S-materiaal van de rassen Spunta of Kondor aankopen voor vermeerdering.

2 Partijen Kondor van verschillende stammentelers en 1 partij Spunta werden gedurende de teelt gevolgd op totaal 20 bedrijven. De bedrijven lagen verspreid over de provincies Groningen, Friesland, Drenthe en Noord-Holland. In figuur 4.CC is de geografische spreiding aangegeven.



Figuur 4.CC: Overzicht van de locaties waar de monitoring voor de onderdelen TV-M en TV-I in 2009 plaats vond.

Analyse van het uitgangsmateriaal door zowel de handelsbedrijven als door ons gaven aan dat er in het uitgeleverde materiaal geen aantoonbare besmetting aanwezig was.

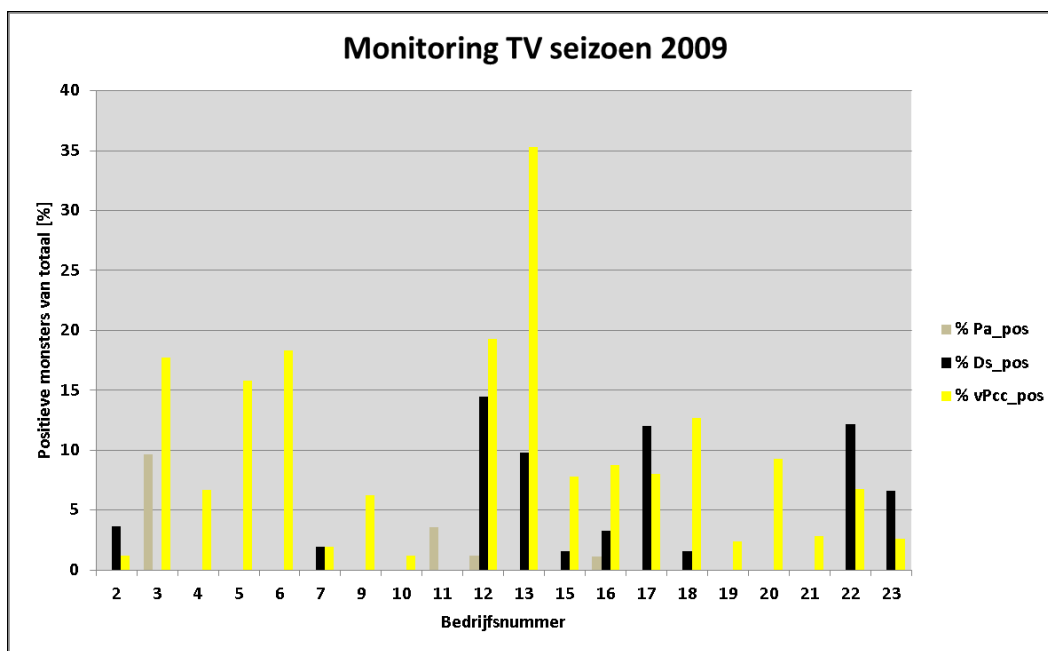
Een eerste monsternamen (knolmonster) werd uitgevoerd nadat de telers het materiaal hadden ontvangen. Vervolgens werd in samenwerking met de telers bemonsterd tijdens het poten, in het veld, bij de loofvernietiging en bij het rooien.

De telers werden voorzien van een nood kit met daarin materiaal om monsters te verzamelen en een uitleg van de gewenste monsternamen per periode. In totaal werden op deze wijze bijna 1400 monsters verzameld. De monsters werden onderzocht allemaal met PCR. De besmettingen bestonden hoofdzakelijk uit *Dickeya solani* (Ds) en/of virulente *Pectobacterium carotovorum* sp. *carotovorum* (vPcc).

De uitkomsten van het 1^e jaar (2009) geven een beeld te zien dat:

- na ontvangst van het uitgangsmateriaal al enkele positieve monsters (vPcc) werden gevonden. De reden van deze besmettingen was niet te achterhalen. Wellicht dat hier sprake is geweest van b.v. vervuilde fust of overstorten.
- bij het poten verschillende monsters van de pootmachine en kiem-/grondresten positief waren. Monsters van de schuimrubberrol en snaren van snarenbed pootmachines en de aanwezige restanten van kiemen en grond in de voorraadbak waren boven gemiddeld positief (vPcc).
- op 2 bedrijven monsters van stengels positief waren (1 positieve reactie voor Ds en 3 voor vPcc).
- 70 % van de monsters rond loofvernietiging besmet waren met Ds en/of vPcc. Positieve reacties werden gevonden in materiaal van 10 van de 11 bedrijven waar materiaal werd verzameld.
- knolmonsters genomen tussen loofvernietiging en oogst, op 4 van de 14 bedrijven waar een monster is genomen, een positieve reactie gaven voor Ds en/of vPcc
- ruim 21 % van de monsters van na het rooien besmet waren. Op 15 bedrijven werd een monster genomen. Na analyse van de monsters bleek er op slechts 3 bedrijven geen positieve monsters te zijn gevonden.

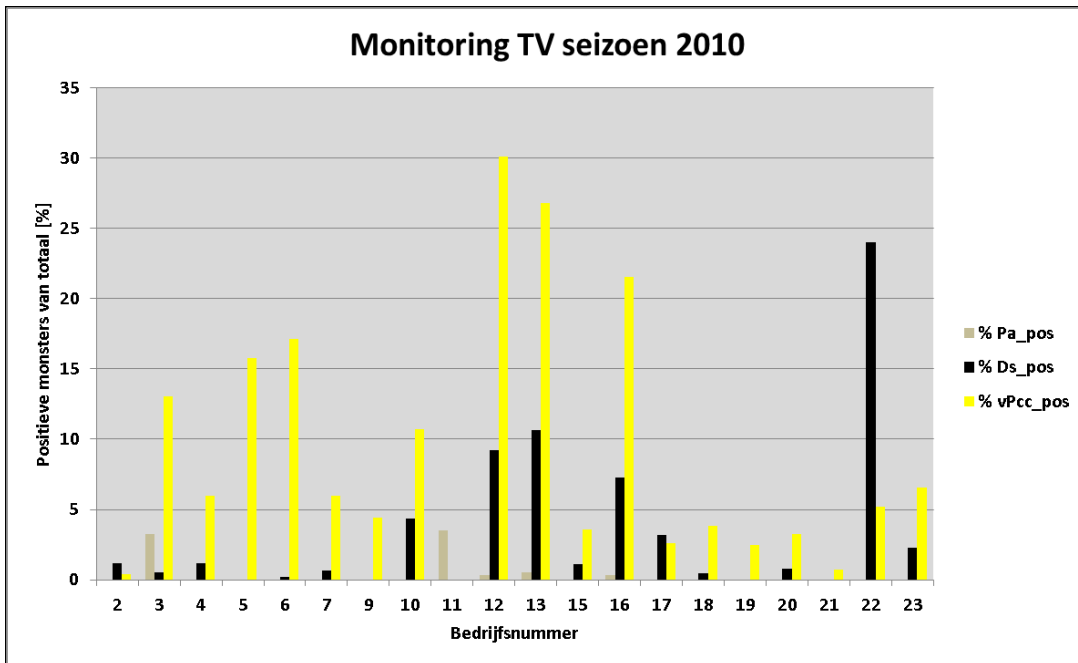
Tussen de bedrijven, die van hetzelfde uitgangsmateriaal werden voorzien, blijken grote verschillen voor te komen in aantal besmette monsters dat tijdens de teeltcyclus wordt gevonden. Deze verschillen zijn weergegeven in figuur 4.DD.



Figuur 4.DD: Overzicht van het percentage positieve monsters per bedrijf in het jaar 2009

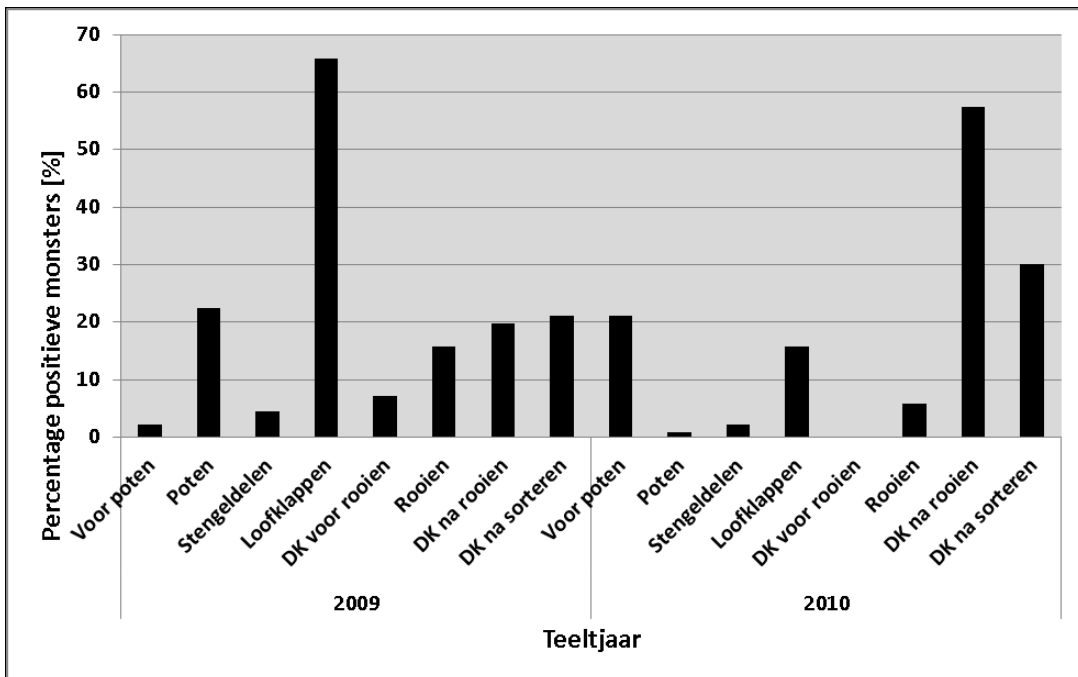
In 2010 werden de partijen verder gevolgd en werden opnieuw monsters genomen tijdens verschillende momenten in de teelt. Tijdens deze teeltperiode werden in totaal bijna 4700 monsters verzameld. Ook dit jaar kwamen weer grote verschillen tussen de bedrijven voor. Opvallend is dat een aantal bedrijven die in 2009 weinig positieve monsters te zien gaven, ook in 2010 weer tot de betere bedrijven behoren. De bedrijven die in 2009 slecht scoorden, met een hoog percentage

positieve reacties, bleken ook in 2010 slecht te scoren. Er is dus duidelijk sprake van een bedrijfseffect. Het percentage positieve monsters per bedrijf in 2010 is in figuur 4.EE weergegeven.



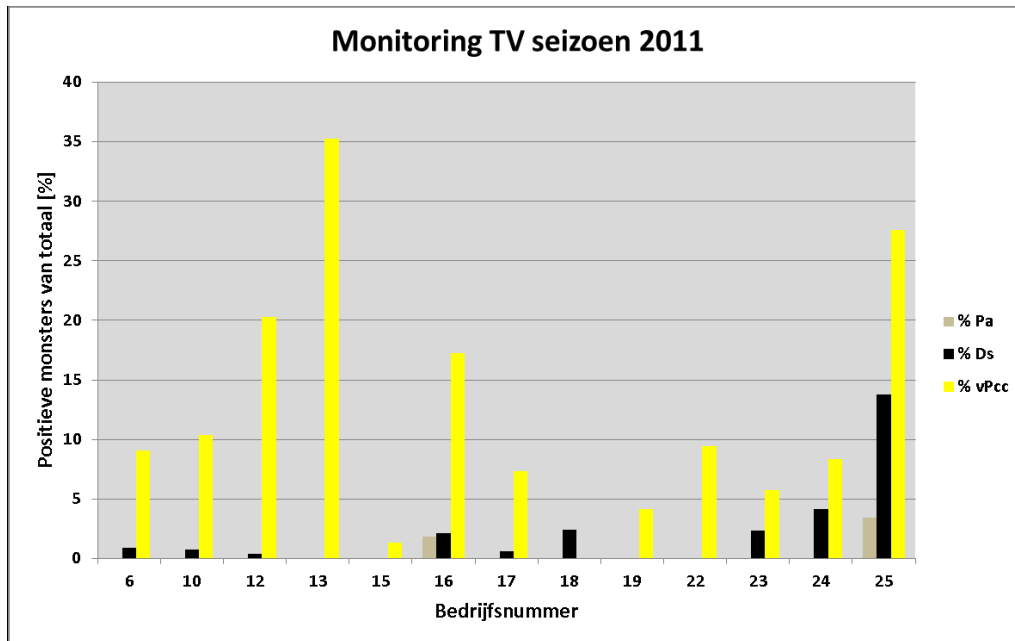
Figuur 4.EE: Overzicht van het percentage positieve monsters per bedrijf in het jaar 2010

Als een overzicht (figuur 4.FF) wordt gemaakt van de momenten waarop de positieve reacties worden gevonden dan blijkt dit vooral in 2009 bij de loofdding en bij de geogste dochterknollen in 2010 te zijn. In 2010 was het aantal positieve reacties duidelijk lager dan in 2009. De oorzaak hiervan is dat veel deelnemers aan de monitoring in 2010 het loofklappen achterwege hebben gelaten en overgegaan zijn tot volveldsspuiten.

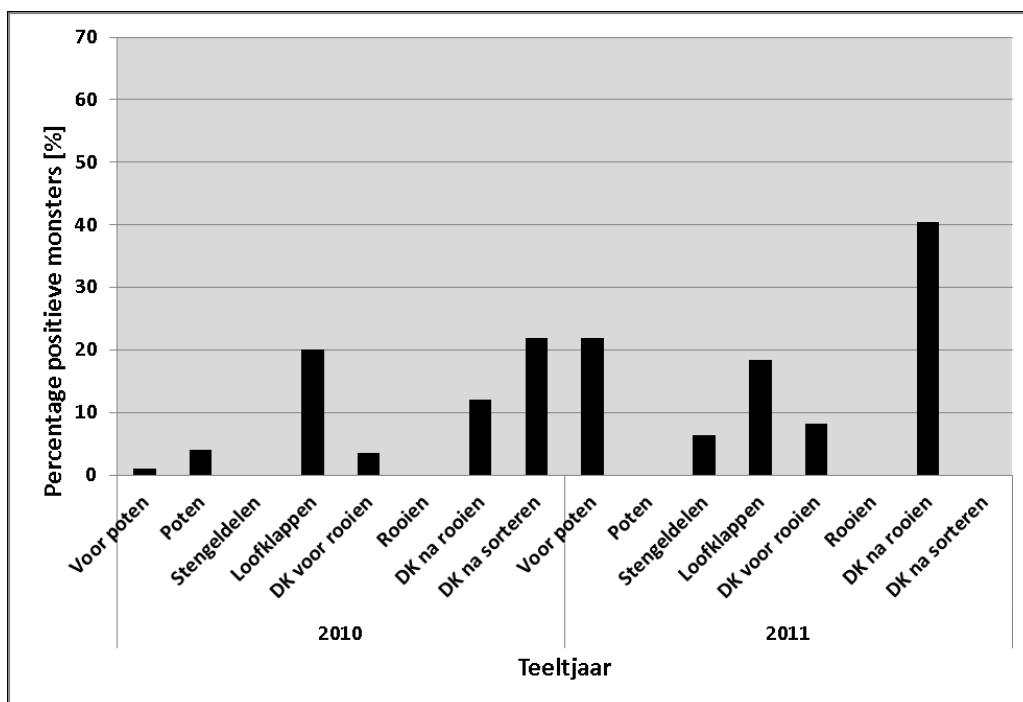


Figuur 4.FF: Overzicht van het percentage positieve monsters per bemonsteringstijdstip van het in 2009 aangekochte S materiaal gedurende de teeltjaren 2009 en 2010.

In 2010 en 2011 werd op een aantal van de deelnemende bedrijven nogmaals gestart met S-materiaal van de rassen Spunta en Kondor. Doordat niet alle deelnemende bedrijven materiaal van dezelfde stam ontvingen, nam het aantal deelnemers af. Wel werden enkele nieuwe telers toegevoegd om daar de monitoring op gelijke wijze uit te voeren. Deze bedrijven bevonden zich in dezelfde regio als de bedrijven 12 en 13 en telen, net als deze bedrijven, op zandgrond. Opvallend is hierbij dat ook deze bedrijven op zandgrond een hoger aantal positieve reacties gedurende de teelt laten zien. Ook in het bemonsteringsjaar 2011 (figuur 4.GG) werd zichtbaar dat sommige bedrijven een probleem met Erwinia hebben en andere bedrijven niet tot nauwelijks.

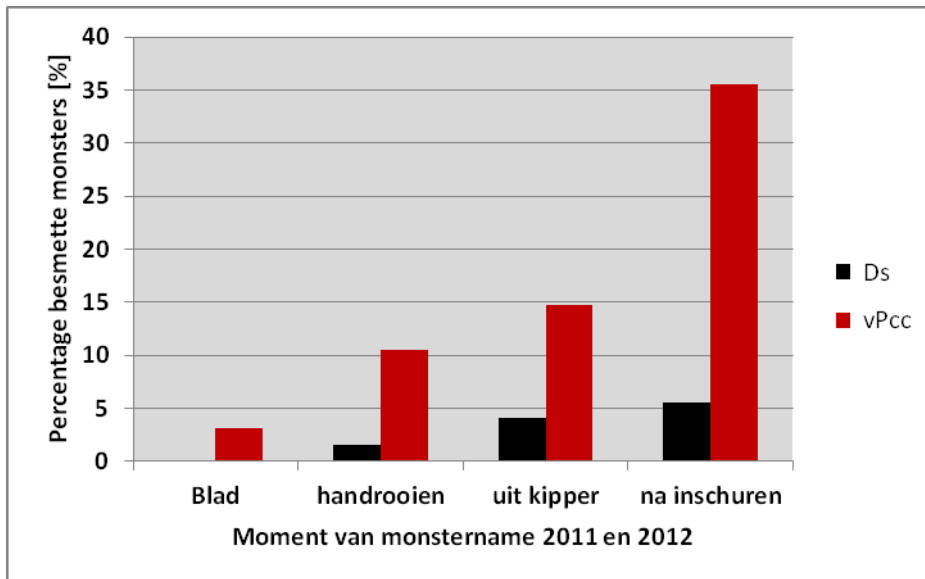


Figuur 4.GG: Overzicht van het percentage positieve monsters per bedrijf in het jaar 2011



Figuur 4.HH: Overzicht van het percentage positieve monsters per bemonsteringstijdstip van het in 2010 aangekochte S materiaal gedurende de teeltjaren 2010 en 2011.

In het teeltseizoen 2012 werden, als afronding van het monitoringstraject, nog slechts 6 percelen gevolgd. Van deze percelen werden bladmonsters genomen in de laatste week van juni. Daarnaast werden knolmonsters verzameld van zowel voor het rooien (met de hand gerooid), uit de kipper en na het inschuren. Deze opzet was gelijk aan de opzet van 2011, waarbij ook in 2012 het accent van de monsternamen lag op de periode rond het rooien. In beide jaren kwam naar voren dat de besmetting van knollen tijdens het rooiproces zeer snel kan toenemen. Zo werd bij het met de hand rooien regelmatig geen besmetting gevonden, waarna een eerste toename in het monster vanuit de kipper werd aangetoond. Na het inschuren werd vervolgens nog een verdere toename van het aantal positieve reacties gevonden. De toename van *Dickeya* lijkt daarbij minder snel toe te nemen dan bij *vPcc* (figuur 4.II).



Figuur 4.II: Overzicht van het percentage positieve monsters van blad en stengeldelen of knollen per bemonsteringsmoment in de jaren 2011 en 2012

Conclusie

- De monitoring in de periode 2009 t/m 2012 heeft laten zien dat er een duidelijk verschil zit in de bedrijven in hoe de besmetting van partijen toeneemt. Enkele bedrijven zijn in staat om, met het zelfde uitgangsmateriaal, na 2 vermeederingsjaren partijen af te leveren waarin nauwelijks *Erwinia* te vinden is. Andere bedrijven leveren uit hetzelfde uitgangsmateriaal partijen af die zwaar besmet zijn.
- Bij het poten werden over het algemeen weinig besmette monsters gevonden. Monsters van de sponzen van snarenbed pootmachines bleken vaak wel met *Erwinia* besmet.
- In de stengel-/b laddelen die werden verzameld kon sporadisch *Erwinia* worden aangetoond.
- Het belangrijkste versmeringsmoment lijkt, indien deze via loofklappen wordt uitgevoerd, de loofvernietiging te zijn.
- De toename van de besmetting van partijen na de loofvernietiging is zorgelijk. In veel partijen wordt bij het met de hand rooien weinig tot geen besmetting gevonden. Na het rooien neemt de besmetting al snel toe, waarna bij het inschuren duidelijk een verdere versmering plaatsvindt.
- De toename van de besmetting met *Dickeya* tijdens het oogstproces lijkt minder snel te gaan dan de toename van *vPcc*. De toename van de besmetting in de oogstperiode kan een factor 5 tot 6 bedragen.

5. Bewaring

5.1 Inleiding

Na de oogst van de aardappelen treedt er een periode aan waarin de knollen bewaard worden op de boerderij. Tijdens het project 'Bacterievrije pootgoedteelt' is aandacht besteedt aan de invloed van de wijze van bewaring op de aantasting door *Erwinia* in het daarop volgende seizoen. In het Deltaplan *Erwinia* (deel C) is de focus gelegd op wat er gebeurt met *Erwinia* tijdens de bewaarperiode, d.w.z. na de fase van oogsten, transport en inschuren.

Versmering van *Erwinia* tijdens deze fase is één van de oorzaken van de toename van het bacterieprobleem in de pootgoedteelt (zie hoofdstuk 4). Deze kan optreden bij aanwezigheid van met *Erwinia* besmette moeder- of dochterknollen. Door die versmering raken andere, tot dan toe nog niet geïnfecteerde, knollen uitwendig besmet met de bacterie. De vraag die bij het onderdeel Bewaring centraal staat is hoe deze uitwendige versmering door bepaalde maatregelen kan worden gereduceerd en verdere uitbreiding kan worden voorkomen. Daartoe zijn diverse proeven uitgevoerd.

5.2 Snelheid van indringen *Erwinia* in de schil

Inleiding

Een eerste vraag die gesteld kan worden wanneer schone aardappelknollen door versmering besmet raken met *Erwinia*, is hoeveel tijd er is om deze besmetting weer kwijt te raken. In een laboratoriumproef is onderzocht hoe snel een uitwendige besmetting met de bacterie de schil binnendringt. Omdat al tijdens het rooien versmering kan optreden, is het onderzoek uitgevoerd met knollen die circa 3 weken na de loofdoding met de hand waren gerooid..

Doel

Nagaan hoe snel een uitwendige besmetting met *Erwinia* de knol binnendringt.

Uitvoering

Pas gerooid knollen van het ras Milano werden gedompeld in een suspensie van een streptomycine resistente stam van *Dickeya*, met een dichtheid van ongeveer 10^8 bacteriën per ml. De gedompelde knollen zijn vochtig bewaard bij 4°C.

Een aantal knollen is direct na behandeling ontsmet of geforceerd gedroogd. Bij het ontsmetten werden de knollen eerst grondig afgespoeld met water, daarna gedurende 5 minuten ontsmet in een ontsmettingsbad met 1% Na-hypochloriet (1/4 bleek), en vervolgens opnieuw grondig schoongewassen. Bij het geforceerd drogen werden de knollen direct na behandeling voor een ventilator geplaatst. De knollen waren binnen 1 uur droog. In een schilextract van de knollen werd, door middel van een plaattelling op een kweekmedium met streptomycine, het aantal levende Ds bacteriën bepaald.

De ontsmetting werd op een aantal tijdstippen herhaald, waarbij steeds een aantal van de vochtig bewaarde knollen werd ontsmet. De droogbehandeling is eenmalig uitgevoerd.

Resultaten

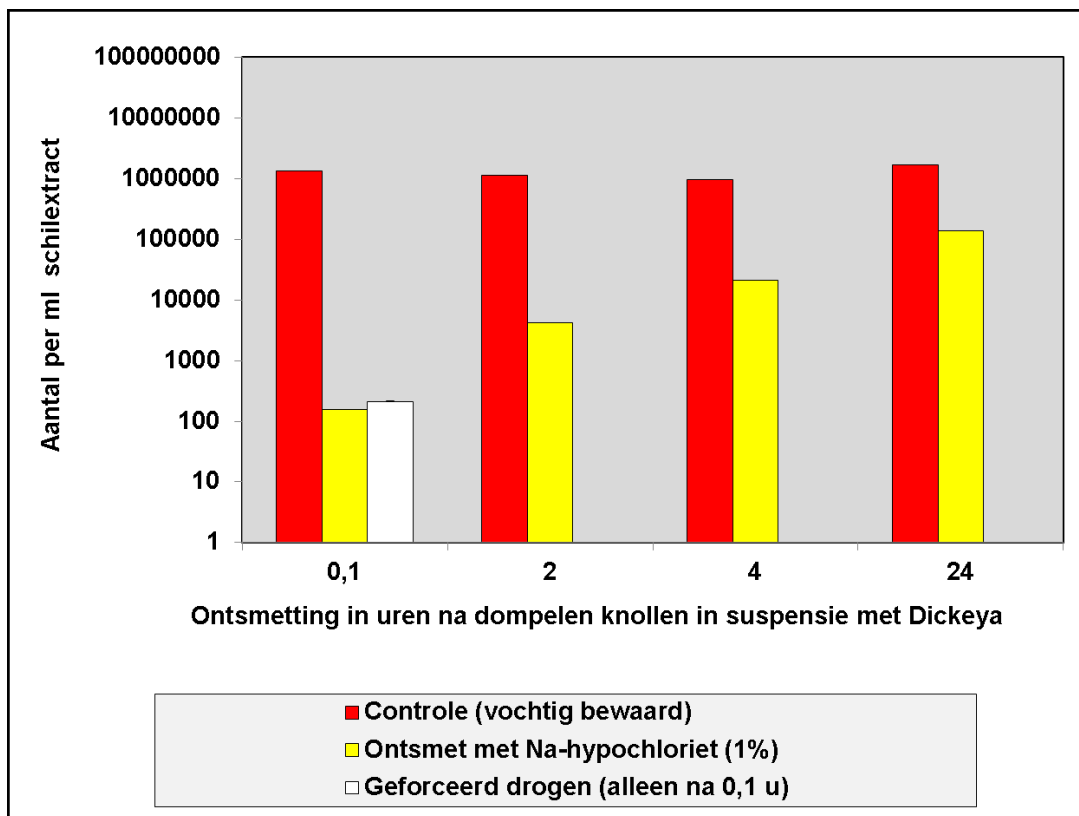
De uitkomsten van de plaattellingen zijn samengevat in Figuur 5.A op de volgende bladzijde.. Het aantal Ds bacteriën bij de vochtig bewaarde controles bleef gedurende de proef constant rond de 10^6 per ml schilextract. Ontsmetten met 1% Na-hypochloriet of geforceerd drogen direct na het dompelen had een sterk reducerend effect. Uitwendig aanwezige bacteriën worden daarmee gedood. In de schil werd op dat moment al een aantal van ongeveer 10^2 bacteriën per ml schilextract geteld. Dat wil zeggen dat er al direct na dompelen bacteriën de schil binnengedrongen zijn.

Naarmate langer gewacht werd met ontsmetten, nam het aantal Ds bacteriën in de schil sterk toe tot rond de 10^5 per ml schilextract bij de behandeling na 24 uur.

Er is een vergelijkbare proef uitgevoerd waarbij de knollen niet in een suspensie werden gedompeld, maar waarbij er een smeer van rot knolmateriaal met Ds op de knollen werd aangebracht. De resultaten worden niet getoond, maar deze kwamen overeen met de hier beschreven proef.

Conclusie

- Door ontsmetten of drogen na het optreden van een uitwendige besmetting van pas gerooide knollen met Dickeya worden niet alle bacteriën gedood.
- Al binnen enkele minuten zijn er bacteriën de schil binnengedrongen en dan onbereikbaar voor de ontsmetting.
- Naarmate langer gewacht wordt met ontsmetten, neemt het aantal bacteriën in de schil snel toe.
- Onder vochtige omstandigheden neemt het aantal Ds bacteriën op de schil niet af gedurende een periode van tenminste 24 uur.



Figuur 5.A: *Effect van ontsmetten of drogen op de opname van Dickeya in de aardappelschil.*

5.3 Reductie van versmeerde Erwinia door zwadrooien

Inleiding

Eén van de manieren waarop in de praktijk getracht wordt om de versmering te beperken is de twee-fasen rooi, waarbij de knollen met een voorraadrooier worden opgerooid en daarbij in dezelfde werkgang in het zwad gelegd worden. Na enige tijd drogen en verder afharden worden de knollen in een tweede werkgang met een rooimachine opgeladen.

Tot nu toe is niet onderzocht wat in werkelijkheid het effect van deze rooimethode is op de overleving van Erwinia. In een veldproef is hier nader onderzoek naar gedaan.

Doel

Nagaan of door toepassing van zwadrooien de effecten van een versmering al tijdens het rooien kunnen worden gereduceerd.

Uitvoering

Deze proef werd uitgevoerd in een proefveld met een eerstejaars vermeerdering uit miniknollen van het ras Renate. Ongeveer drie weken na het klappen en spuiten van het gewas werden de knollen met een voorraadrooier opgerooid en in het zwad gelegd. Direct na het rooien is een aantal knollen gedompeld in suspensies van rotte knolresten met de Erwinia types Ds (streptomycine resistent) of vPcc, en daarna weer in zwad gelegd.

De rotte knolresten waren afkomstig van knolschijven die 5 dagen vóór het uitvoeren van de proef geïnoculeerd waren met de toets stammen van beide Erwinia 's.

Op een aantal tijdstippen is, in twee herhalingen, een telling gedaan van het aantal Erwinia bacteriën op de schil. Per telling zijn stukjes schil van $\pm 4 \text{ cm}^2$ van 5 knollen gepoold tot één schilmonster. Elk schilmonster werd in een extractiezakje gecrushed in 5 ml water. Van het crush extract werd een verdunningsreeks gemaakt in PBS buffer, waarbij het extract bij iedere verdunning met een factor 10 verder verdund werd.

Met de verdunningen van de Ds veldjes werd een directe plaattelling gedaan op een kweek medium met streptomycine, met die van de vPcc veldjes een indirecte telling, via het verrijken van de verdunningen. Bij de plaattelling wordt van elke verdunning 100 μl uitgestreken op een kweekplaat. Bij de indirecte telling wordt van elke verdunning 100 μl verrijkt in PEB verrijkingsmedium. Na 3 dagen konden op de telplaten de Ds kolonies worden geteld. Uit de verrijkte verdunningen werd DNA geëxtraheerd, waarop vervolgens een PCR is uitgevoerd.

Na 31 dagen werden de resterende knollen uit het veld meegenomen en gedurende de winterperiode droog bewaard bij 4°C. In het daarop volgende jaar is een aantal van deze knollen uitgepoot in het veld om na te gaan of de versmering, na het zwaddrogen en de daarop volgende bewaring, nog tot problemen zou kunnen leiden.

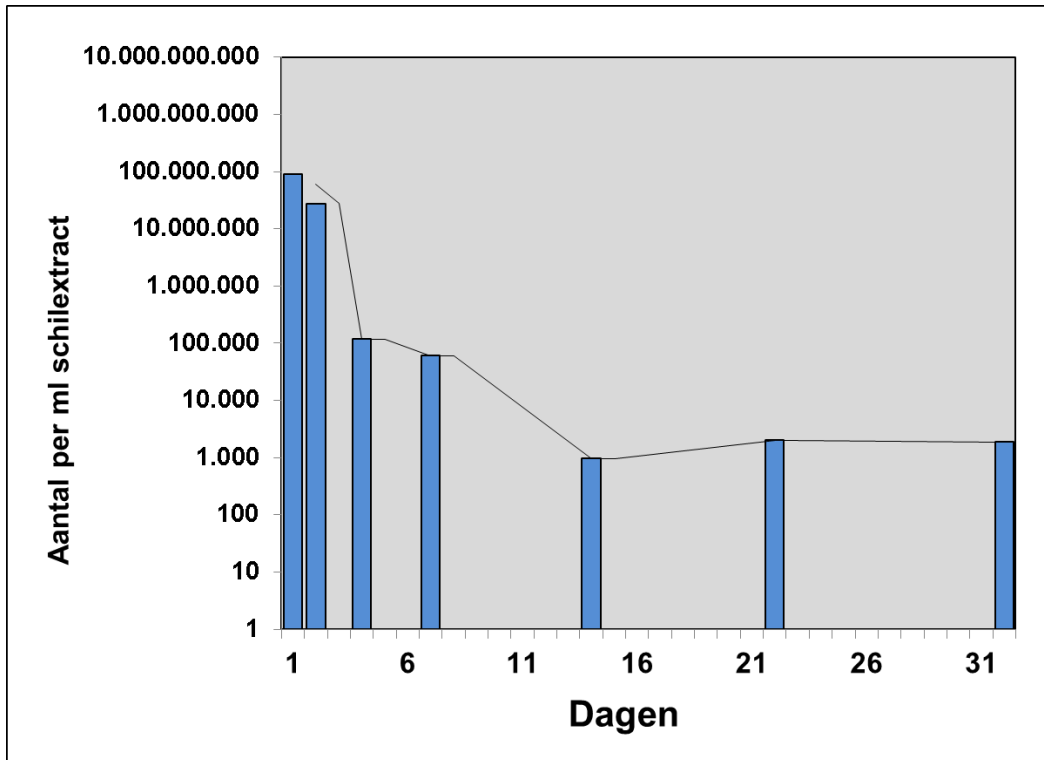
Resultaten

De omstandigheden waaronder de knollen met de voorraadrooien in het zwad werden gerooid waren niet optimaal voor een snelle droging. Het was een dag met een hoge luchtvochtigheid, waarop zo nu en dan wat regen viel. Na 1 dag was het aantal Ds bacteriën op de schil in logwaarden gerekend slechts licht afgenomen, maar in absolute waarden met 70% (figuur 5.B). In de dagen daarna konden de knollen aan de lucht drogen. Het aantal bacteriën nam in de eerste twee weken af tot ongeveer 10^3 per ml schilextract. In absolute getallen is dit een afname van 99,999 %. Vervolgens bleef het aantal constant op dit niveau, tot het eind van de proef in het veld. Voor vPcc was het verloop vergelijkbaar met dat van Ds. Deze gegevens worden hier niet getoond.

Van de knollen die in het volgende voorjaar werden uitgepoot leverden respectievelijk 25% en 37% een aangetaste plant op voor de met Ds en met vPcc behandelde knollen. Controle planten die niet met Erwinia behandeld waren gaven geen aantasting te zien.

Conclusie

- Door drogen in het zwad wordt een uitwendige besmetting sterk gereduceerd.
- Een klein deel van de besmetting neemt ook bij langer laten drogen niet verder meer af. Waarschijnlijk zijn dit bacteriën die de knol via de schil zijn binnengedrongen.
- De resterende besmetting kan in het daaropvolgende jaar tot problemen leiden.



Figuur 5.2: Afname van *Ds* op de schil na rooien in het zwad.

5.4 Reductie van *Erwinia* besmetting door verschillende droogregimes

Inleiding

In de voorgaande proeven is gebleken dat *Erwinia* vrij snel de schil van pas gerooide knollen kan binnendringen. In de praktijk worden de knollen na rooien veelal overgebracht in kisten, en daarna gedurende een bepaalde periode geventileerd. Onderzocht is of met een goed ventileregime een door uitwendige versmering ontstane schilbesmetting met *Erwinia* kan worden geëlimineerd dan wel tot een minimum gereduceerd.

Doel

Nagaan of een eenmaal opgetreden versmering door verschillende droogregimes tijdens de bewaring kan worden geëlimineerd.

Uitvoering

In dit onderzoek werd nagebootst wat er gebeurt wanneer een partij aardappelen, met daarin een versmeringsbron van *Erwinia*, blootgesteld wordt aan verschillende droogregimes. Een partij met de hand gerooide knollen van een eerstejaars stam (cv. Aviron) werd opgeslagen in kratten. Per krat werd een versmeringsbron aangebracht in de vorm van een netzak met knollen die gedompeld waren in een suspensie van rotte knolresten met Ds.

De kratten met knollen werden blootgesteld aan de volgende ventilatieregimes: geen ventilatie, één uur per dag ventileren, en continu ventileren. Elke behandeling werd in drievoud ingezet. De ventilatie werd uitgevoerd d.m.v. een ventilator die vóór de kratten werd geplaatst. De bewaartemperatuur werd gedurende de proef geleidelijk teruggebracht van 20°C naar 4°C.

Na drie maanden werd de proef afgebroken. In de knollen rondom de versmeringsbron werd de mate van schilbesmetting bepaald. Per krat werd van 160 knollen een stukje schil van ca. 4 cm² bemonsterd; deze werden in pools van 4 verwerkt. Van de pools werden crush extracten gemaakt in water, die vervolgens verrijkt werden in PEB verrijkingsmedium. Vervolgens werd met PCR de besmetting bepaald.

De rest van de knollen werd gedurende de winterperiode droog bewaard bij 4°C bewaard. Ook hiervan werd in het erop volgende jaar een aantal uitgepoot in het veld.

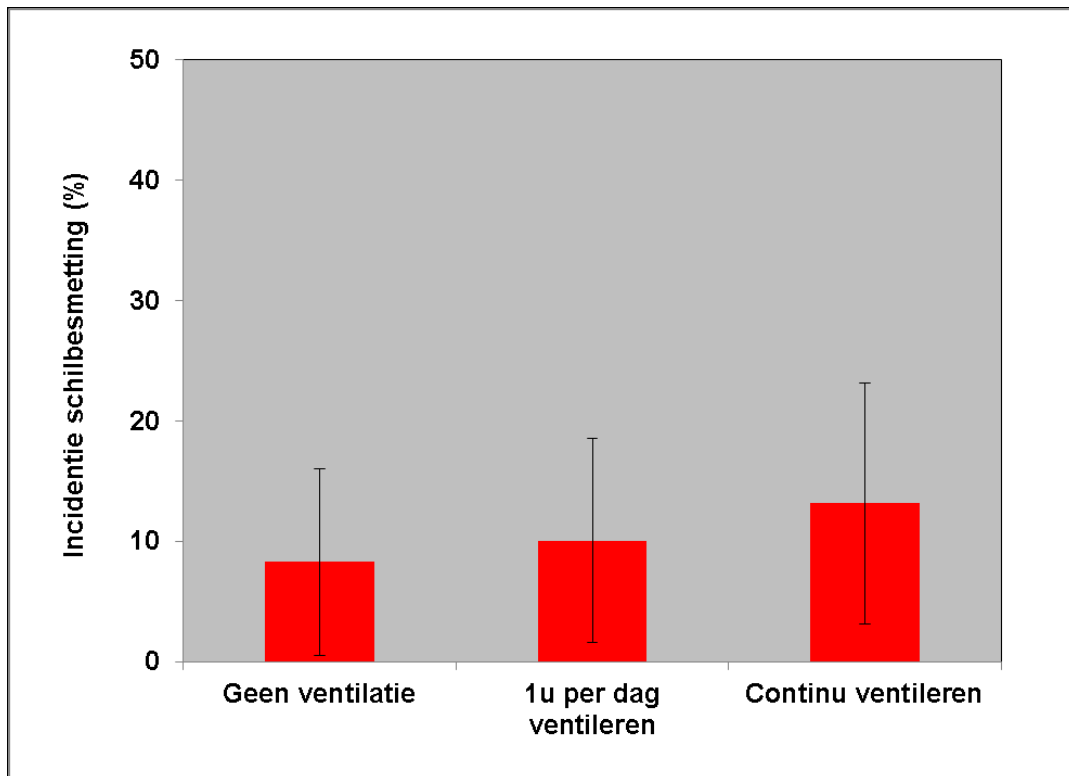
Resultaten

Uit het aantal positieve reacties per 40 pools van 4 schilstukjes is de incidentie berekend van het aantal knollen dat een schilbesmetting heeft met Ds. Na toepassing van de verschillende ventilatiesystemen gedurende drie maanden bleek er geen statistisch verschil te zijn tussen de besmettingsincidenties (figuur 5.C). Dat wil zeggen dat de door versmering ontstane schilbesmetting niet kon worden weg gedroogd, ook niet door continu te ventileren.

De knollen van de besmettingsbron waren na drie maand grotendeels weggerot. Bij de behandelingen 'geen ventilatie' en '1 u per dag ventileren' had de rot zich uitgebreid tot de knollen onder de besmettingsbron (foto 5.A). Bij 'continu ventileren' was dit niet het geval. De rotte knollen zijn niet meegenomen bij de bepaling van de schilbesmetting.



Foto 5.A: *Uitbreiding van rot onder een besmettingsbron*



Figuur 5.C: *Effect verschillende droogregimes op schilbesmetting met Erwinia (Dickeya) na uitwendige versmering. Situatie na 3 maand.*

De uitpoot van de verschillende behandelingen in het volgende jaar gaf maar enkele aangetaste planten te zien. Van de dochterknollen bleek echter toch gemiddeld 13% geïnfecteerd met Ds, zonder betrouwbaar verschil tussen de behandelingen. Dat betekent dat ook hier de besmetting ook in het jaar erop nog steeds in de partij aanwezig was.

Conclusies

- Een schilbesmetting met Ds die ontstaan is door versmering kan niet door langdurig ventileren worden weg gedroogd.
- Door goed te ventileren kan wel een verdere uitbreiding van de versmering worden voorkomen.

5.5 Conclusies Bewaring

Het onderzoek t.a.v. de Bewaring was gericht op de mogelijke beheersing of reductie van de Erwinia besmetting in de periode vanaf oogst en inschuren. Hieruit vallen de volgende conclusies te trekken:

1. Erwinia dringt na versmering snel de schil van pas gerooide knollen binnen.
2. Bij snel ontsmetten of drogen (ook in het zwad) wordt de uitwendig aanwezige besmetting sterk gereduceerd.
3. Drogen of ontsmetten heeft geen effect op het aantal reeds in de schil opgenomen bacteriën.
4. In het volgende teeltseizoen manifesteert de versmering zich nog steeds door aantasting of latente besmetting in het veld.
5. Onder vochtige omstandigheden blijft ook de uitwendige besmetting nog langere tijd hoog, en kan rot zich uitbreiden.

6. Kennisoverdracht

6.1 Algemeen

Tijdens de eerste 3 jaren van het project werd de aandacht hoofdzakelijk op de uitvoering van proeven en de monitoring bij bedrijven gelegd. In het laatste jaar werd meer aandacht besteed aan het naar buiten brengen van de gevonden resultaten. In de beginperiode werden de gevonden resultaten dan ook voornamelijk via nieuwsbrieven, persberichten en artikelen gepubliceerd. In 2012 werd meer aandacht aan het presenteren van de resultaten besteed. Dit kreeg zijn hoogtepunt in de maand november tijdens een tournee door Nederland waar de resultaten aan geïnteresseerde aardappeltelers werden gepresenteerd. Tijdens deze presentaties werden door de telers vele vragen gesteld, vragen die ook in dit hoofdstuk zijn terug te vinden.

6.2 Nieuwsbrieven, artikelen en persberichten

Er zijn tijdens de looptijd van het project diverse nieuwsbrieven verspreid en artikelen en persberichten in tijdschriften verschenen. Hieronder wordt een overzicht gegeven.

Nieuwsbrieven (via website Kennisakker en naar NAO leden):

- Oktober 2009. Nieuwsbrief Deltaplan Erwinia, Deel C Aardappel. Volume 1, editie 1.
- Juli 2010. Nieuwsbrief Deltaplan Erwinia, Deel C Aardappel. Volume 1, editie 2.
- Maart 2011. Nieuwsbrief Deltaplan Erwinia, Deel C Aardappel. Volume 1, editie 3.
- April 2012. Nieuwsbrief Deltaplan Erwinia, Deel C Aardappel. Volume 1, editie 4.

Persberichten (in tijdschriften, via website Kennisakker, Agriholland en handelshuizen):

- April 2012. Erwinia, voorkomen is beter
- Juli 2012. Risico op verspreiding Erwinia bij loofklappen.

Artikelen

Aardappelwereld:

- Aardappelwereld magazine, mei 2012, nummer 5, blz. 18-23. Komen de eerste besmettingen van Erwinia uit de lucht vallen?
- Aardappelwereld magazine, juni 2012, nummer 6, blz. 33. Voorkom versmering Erwinia tijdens selectie.
- Aardappelwereld magazine, juli 2012, nummer 7, blz. 29. Loofklappen als verspreidingsbron Erwinia.
- Aardappelwereld magazine, augustus 2012, nummer 8, blz. 57. In twee fasen rooien beperkt Erwinia alleen als de knollen drogen.
- Aardappelwereld magazine, september 2012, nummer 9, blz. 39. Sorteren versmeringsbron Erwinia.

Boerderij:

- Boerderij, 94 – no. 35, 2 juni 2009, blz. E2 – E4. Erwinia-puzzel niet compleet.
- Boerderij, 95 – no. 27, 7 april 2010, blz. E8 – E10. Erwinia bacterie blijft nog ongrijpbaar.
- Boerderij, 96 – no. 23, 8 maart 2011, blz. 34 - 37. Op safe spelen met Erwinia.
- Boerderij, 97 – no. 31, 2 mei 2012. Loofklapper aan de ketting.

6.3 Symposia en Demodagen

Erwinia dag Wageningen

- 14 oktober 2009. Presentatie over project 2005-2008 en plannen Deltaplan Erwinia Deel C.

Europese Erwinia symposia

- 9 en 10 november 2010. Dickeya Meeting Nederland (Emmeloord). Presentatie: Cooperative efforts of Dutch Potato Business and Research to tackle the 'Erwinia' (mainly Dickeya) problems in seed potato production.
- 12 en 13 april 2012. Dickeya Meeting Frankrijk (Rennes). Presentatie: What is the role of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in causing potato blackleg in Europe ?
- 5 en 6 november 2012: Euphresco Erwinia Meeting België (Gent). Presentatie: Update Dutch Deltaplan Erwinia.

Aardappeldemodag Westmaas

- Tijdens de aardappeldemodag op 22 augustus 2012 was het Erwinia Team aanwezig met een stand en een demonstratieveld. Bezoekers werden geïnformeerd over de resultaten van het project, ziektesymptomen werden in het veld gedemonstreerd en er werd gewezen op de telersbijeenkomsten in november 2012.

6.4 Presentaties

- 2 november 2009. Pootaardappelacademie Friesland. Presentatie resultaten project 2005-2008.
- 10 februari 2010. Presentatie voor Beratungsring für Kartoffelbau Westküste e.V. in Karolinenkoog.
- 7 december 2010. Presentatie op de Kartoffeltag in Bad Bevensen.
- 13 december 2010. Pootaardappelacademie Friesland. Presentatie voor Expertisegroep Erwinia.
- 7 februari 2011. Pootaardappelacademie Friesland. Presentatie resultaten 2010.
- 17 februari 2011. Agriboard Noord-Holland. Presentatie resultaten 2010.
- 28 februari 2011. Pootaardappelacademie Friesland. Presentatie resultaten 2010.
- 14 november 2011. Pootaardappelacademie Groningen/Friesland. Workshop Erwinia op afsluitende bijeenkomst.
- 11 oktober 2012. Wageningen Potato Centre. Presentatie risicofactoren.

6.5 Bijeenkomsten buitendienstmedewerkers handelshuizen

In juni en september 2012 zijn samenvattende presentaties gehouden op bijeenkomsten van buitendienstmedewerkers van verschillende handelshuizen.

- 21 mei 2012. Joure. HZPC
- 30 mei 2012. Emmeloord. Agrico
- 4 juni 2012. Emmeloord. STET
- 26 juni 2012. Emmeloord. TPC, AGF-Fresh en Schaap-Holland.
- 28 september 2012. Medemblik. Agroplant Holland.

6.6 Telersbijeenkomsten

In 2012 stond de hele maand november in het teken van telersbijeenkomsten door heel Nederland. In deze bijeenkomsten werd een uitgebreid overzicht gepresenteerd van de resultaten en conclusies van de verschillende thema's van het Deltaplan Deel C. Elk thema werd vervolgens afgesloten met een aantal mogelijke oplossingsrichtingen en/of aanbevelingen waarmee de pootaardappelteelt op termijn minder problemen met Erwinia zou kunnen krijgen. In figuur 6.A zijn de locaties en data van de verschillende bijeenkomsten weergegeven. In tabel 6.A wordt onder andere een overzicht gegeven van het aantal bezoekers per bijeenkomst.



Figuur 6.A: Overzicht van de data en locaties waar in november 2012 bijeenkomsten werden georganiseerd door het Erwinia Team

Datum	Plaats	Voorzitter	Notulist	Aantal
5-11-2012	St. Annaparochie	Jan Hoogland (LTO)	Tom v Tent Becking (Erw.team)	68
6-11-2012	Uithuizen	Teun de Jong (NAV)	Henk Folkers (Averis)	57
8-11-2012	Wieringerwerf	Tjalling Douma (Agrico)	Tjalling Douma (Agrico)	63
12-11-2012	Emmeloord	Jelle Bruin (LTO)	Harm Steenhuis (HZPC)	55
13-11-2012	Axel	Willem in 't Anker (Meijer)	Jürgen Maerman (Meijer)	41
14-11-2012	Kruisland	Kees Gomerens (LTO)	Maurice Kuijlen (Meijer)	32
14-11-2012	Vredepeel	Kees Kristelijns (Erw. team)	Henk Velvis (Erw.team)	13
15-11-2012	Schagen	Teun de Jong (NAV)	Tjalling Douma (Agrico)	10
19-11-2012	Eenrum	Peter Berghuis (LTO)	Gerard Bovee (KWS)	31
20-11-2012	Holwerd	Upt Hiddema (LTO)	Doretta Boomsma (Erw.team)	24
21-11-2012	Texel	Harm Steenhuis (HZPC)	Harm Steenhuis (HZPC)	25
22-11-2012	Swifterbant	Harm Steenhuis (HZPC)	Harm Steenhuis (HZPC)	19
26-11-2012	Westerbork	Henk Folkers (Averis)	Henk Folkers (Averis)	6
27-11-2012	Toldijk	Bert Sloetjes (LTO)	Henk Folkers (Averis)	16
28-11-2012	Creil	Kees Kristelijns (Erw. team)	Doretta Boomsma (Erw.team)	42
			TOTAAL	502

Tabel 6.1: Overzicht van de data en plaats van de bijeenkomsten, de voorzitter en de notulist van de bijeenkomst en het aantal bezoekers.

Vragen en discussiepunten telersbijeenkomsten

Naar aanleiding van de gepresenteerde resultaten, conclusies en aanbevelingen zijn op alle locaties diverse vragen en discussiepunten naar voren gekomen. De vragen die direct beantwoord konden worden, doordat daar binnen Deel C onderzoek naar was gedaan, zijn hieronder per deelgebied van het onderzoek weergegeven. De vragen waar niet direct een antwoord op te geven was of waar mogelijk nog vervolgonderzoek voor nodig is zijn *cursief* weergegeven.

Detectie

- Wat is de betrouwbaarheid van de toets van de NAK?
- Gebruikt de NAK of andere instanties ook de vacuümtoets?
- Waarop is de detectiegrens bij de PCR gebaseerd; kan 1 bacterie worden gemeten?
- Toon je meer *Dickeya* aan met de vacuümtoets?
- Wat zijn de kosten van de vacuümtoets?
- Is een 0 ook echt een 0?
- Er wordt als toets monster 200 knollen per partij genomen. Kunnen we niet beter meer monsters toetsen. Welke monstergrootte geeft een betrouwbaar beeld?
- Zit de ene soort *Erwinia* meer in de schil dan de andere?
- *Wat is beste moment om Erwinia aan te tonen in je partij?*

Epidemiologie

- Wat zijn de symptomen van vPcc; zijn die specifiek en in het veld te herkennen?
- Speelt behalve tijd ook temperatuur een rol bij de expressie van *Erwinia* in het veld?
- Is er meer expressie van *Erwinia* bij hoge temperaturen, en is dat *Erwinia* soort afhankelijk?
- Wat is het verband tussen 1 zieke plant en latente besmetting?
- Heeft de verdringing van Ds door vPcc te maken met klimaatverandering; wat is de reden dat vPcc zo op komt zetten?
- Is er een verband met navelendrot en *Erwinia*?
- Wat is de correlatie tussen de toets en expressie in het veld?
- Zijn bepaalde stammen van *Erwinia* agressiever geworden; de Schotten beweren dat?
- Heeft vPcc een meer grillig en explosiever verloop ten aanzien van de symptoomexpressie dan *Dickeya*?
- Vindt opname via wortels plaats?
- Komt *Erwinia* alleen in stengel voor of in gehele plant?
- *Geeft een open gewas minder Erwinia problemen doordat het sneller kan drogen?*
- *Symptoomexpressie komt in sommige rassen vaak heel laat, is dat dan per definitie vPcc?*
- *Kan teeltvervroeging helpen in relatie tot het voorkomen van besmetting met vPcc?*
- *Speelt vroegheid van een ras een rol bij symptoomexpressie?*
- *Waar is de barrière in de plant wat bepaalt dat bacterie latent blijft of tot expressie komt?*
- *Kunnen we een latente besmetting kwijtraken?*

Initiële besmetting

- Monitoring
- Hoe weet je zeker dat miniknollen schoon zijn?
- NAK gegevens: er zijn zowel miniknolteilers als traditionele stammentelers die schoon zijn. Het is dus vooral een kwestie van vakmanschap
- Integrale toetsing NAK 23-34% besmet, rest schoon. In monitoring Deltaplan slechts 23% schoon. Hoe is dit verschil te verklaren?
- Kunnen we niet beter sneller afkappen in plaats van 6-7 jaar door te telen? En hoe kort moet het afkapsysteem dan zijn? 3-4 veldgeneraties?
- *Is de nateelt vanuit traditionele stammen niet sterker dan vanuit miniknollen, namelijk nateelt vanuit miniknollen 1e en 2^e jaar jonger en langer groen.*

- *Nateelt vanuit traditionele stamselectie heeft een betere weerbaarheid. Miniknollen niet overbemesten en vroeg rooien. Beide teelten vragen eigen eisen.*
- **Verspreiding**
 - *Hoe zit het met de overleving op opslagplanten?*
 - *Is de kans op besmetting via de lucht kleiner bij droog weer?*
 - *Hoe zit het met beregenen in verband met aerosolen? Is beregenen wel verstandig in verband met het verspreiden van Erwinia?*
 - *Hoe zit het met zwarte nachtschade in verband met overleving op onkruiden?*
 - *Welke insecten brengen Erwinia over?*
 - *Geven aerosolen meer besmetting dan insecten?*
 - *Welke insecticiden kun je het beste gebruiken om insecten te doden?*
 - *Hoe zouden we ruimtelijke scheiding tussen stammenteelt en overige teelt moeten realiseren?*
 - *Hoe breed moet de ruimtelijke scheiding zijn; hoe groot moet het vrije gebied zijn?*
 - *Heeft ruimtelijke scheiding zin als je het basismateriaal echt gaat scheiden van de rest?*
 - *Kan spuiten met minerale olie bijdrage aan reductie/voorkomen Erwinia?*
 - *Besmetting via lucht; over welke afstand?*
 - *Erwinia komt uit de lucht vallen: hoe kan het dat 10 percelen die naast elkaar staan niet alle 10 besmet zijn?*
 - *Verspreiding via regen. Regen valt overal. Ook bij schone bedrijven. Hoe zit dit?*
 - *In Schotland is de rotatie ruimer dan in NL; heeft dat effect omdat zij beweren geen Dickeya te hebben?*

Versmering

- **Voorkiemmethode en poten**
 - *Rasverschillen bij kistendraaien in relatie tot moederknollen. In praktijk rasverschillen op moederknollen niet duidelijk. Wel jaarverschillen over rassen heen.*
 - *Opmerking: we kunnen beter kiembakken draaien.*
 - *Is het verschil in ras effect (moederknollen) met betrekking tot kistendraaien meerdere keren in het onderzoek vastgesteld?*
 - *Opmerkelijk dat Erwinia in kiemen geen probleem is. Hoe zit het dan met versmering door kiembreuk in combinatie met vocht?*
- **Monitoring**
 - *Is de invloed van de hoeveelheid lucht, water en dichtheid van de rug op de kans op Erwinia onderzocht?*
 - *Wat is de invloed van de structuur van de grond?*
 - *Wat zijn de kenmerken van de schone bedrijven; wat hebben de 'schone' telers anders gedaan dan de 'vieze'. Moeten we niet veel meer kijken naar bedrijven die geen Erwinia hebben?*
 - *Is er in de biologische teelt meer of minder problemen met Erwinia?*
 - *Is er een relatie tussen percentage humus en Erwinia problemen, namelijk op zand meer problemen?*
- **Ras gevoeligheid**
 - *Zijn er in de veredeling stappen te zetten richting Erwinia resistentie c.q. tolerantie?*
 - *Zijn rassen met hoog OWG of met ronde knollen minder gevoelig?*
 - *Zijn er rasverschillen ten aanzien van Erwinia gevoeligheid; kunnen hierover NAK gegevens van de-classificatie van rassen over jaren geen informatie geven?*
 - *Door welke factoren worden verschillen in ras gevoeligheid bepaald?*
 - *Zijn er rasverschillen in schilbesmetting en rasverschillen in late besmettingen (vPcc)?*

- Selectie
 - Beter geen selectie uitvoeren, maar uit perceel blijven
 - Verspreiding door contact: dus niet meer selecteren of althans tot minimum beperken?
 - Moet in verband met versmering de keurmeester niet alleen eindkeuring uitvoeren in plaats van tussentijdse veldkeuringen?
 - Er is altijd wel een moment dat gewas nat is, wanneer dan wel selecteren?

- Loofdoding
 - Aardappelloof 1 ha is 24.000 liter water. Is dit het gemiddelde?
 - Opmerking: Loofklappen geeft veel loof tussen de ruggen. Bij natte en anaerobe omstandigheden, welke ideaal zijn voor bacterie, is dit een bron van besmetting?.
 - Hoe is de toename van *Dickeya solani* na 14 dagen spuiten en klappen te verklaren?
 - Bij volveldsspuiten is stengel na 5-7 dagen nog steeds groen, dus toch nog steeds bron van besmetting
 - Komt de loofbesmetting bij loofklappen ook bij de knol?
 - Komt er op dor/dood loof nog wel *Erwinia* voor?
 - Hoe lang kan *Erwinia* overleven na loofklappen?
 - Geeft loofbranden of looftrekken dezelfde problemen als loofklappen?
 - Waar is er gemeten; tussen de ruggen?
 - Wordt er in Schotland ook gebruik gemaakt van loofklappen?
 - Wat is het verband tussen loofbesmetting en besmetting van de nateelt?
 - Zijn er geen middelen om besmetting tijdens het klappen af te doden?
 - Maakt het loofklappen ook uit als het gebeurt op gespoten of afgebrand gewas?
 - Kunnen we niet beter het loof testen voor rooi in plaats van de dochterknollen na rooi?
 - Is transport van *Erwinia* uit plantenresten naar de wortels mogelijk?
 - Loofklappen en gelijktijdig looftrekken is dat geen optie?
 - *Is het moment van loofdoding van invloed op de besmetting van de partij?*
 - *Hoe snel gaat Erwinia van lucht naar blad naar knol?*
 - *Is het verstandig om bladmateriaal af te voeren naar de kopakker om verspreiding te voorkomen?*

- Rooien
 - Wordt besmetting op rooimachines met name op rooimat gevonden?
 - Kan de moederknol ook natuurlijke besmetting veroorzaken?
 - Is een rotte dochterknol altijd met *Erwinia* besmet?
 - Waardoor verrot een moederknol, door *Erwinia* of door meerdere bacteriën?
 - Zit *Erwinia* misschien in de grond?
 - Verstoren wij het bodemleven (bacteriën in de grond) misschien te veel, zodat *Erwinia* er daardoor wel in kan overleven?
 - Zijn er bacteriën die *Erwinia* "opvreten"?
 - *Geeft rechtstreeks rooien in kisten minder problemen dan rooien in de kipper?*
 - *Is er verband tussen tijdstip van loofvernietiging en rooien, met andere woorden het lang laten zitten van de knollen heeft dat een positief effect?*

Bewaring

- Ontsmetting en overleving
 - Hoe groot is de overlevingskans van *Erwinia* op machines, bijvoorbeeld op metaal?
 - Kan bacterie op hout overleven, bijvoorbeeld kisten?
 - Kan het helpen om ontsmettingsmiddelen op de rooimachine te vernevelen?
 - Welke middelen zijn toegestaan bij de ontsmetting van kisten?
 - Werkt een ozonbehandeling ook tegen *Erwinia*?
 - Kun je niet beter pootgoed vlak voor poten ontsmetten, bijvoorbeeld warm maken zoals met bloembollen wordt gedaan?

- Chemie in de zin van directe ontsmetting van pootgoed is dat geen oplossing?
- Als je ontsmet met Halamid opgelost in water is dus vocht, dan zou je toch in principe weer moeten wachten tot alles weer goed droog is om weer verder te kunnen?
- Zwadrooien
 - Bij zwadrooien toch goede ervaring met minder beschadiging en goed drogen?
 - Komt het effect van zwadrooien door het drogen of door de UV straling van de zon?
 - *Heeft de mate van afharding invloed op binnendringen van bacterie?*
 - *Hoe lang moet je wachten met oprapen bij zwadrooien?*
- Drogen en temperatuur
 - Wat is de invloed van de bewaartemperatuur op versmering en overleving?
 - Drukt koud bewaren niet het percentage besmetting in het veld; sterft de bacterie dan niet af?
 - Partijen moeten niet meer in koeling, dit geeft teveel kans op condens
 - Drogen met behulp van een mechanische koeling is dat voldoende?
 - *Kan via de luchtcirculatie verspreiding van de bacterie optreden, dat wil zeggen moet het uitgangsmateriaal separaat van de productie partijen worden bewaard?*
 - *Als de partij nat is heb je dan meer versmering bij ventilatie?*
 - *Kan niet beter Ca-poeder bij het rooien aan knollen worden toegevoegd om het vocht op te nemen?*
- Sorteren
 - Een bruto partij met grond neemt meer vocht op, of “zweet” minder dan een netto partij.
 - Is het nu beter om eigen materiaal in het voorjaar te sorteren of in het najaar?

Algemeen

- Vervolg project
 - Komt er nog een vervolg op het Deltaplan om de adviezen te testen?
 - *Kan er een berekening worden gemaakt met alle bekende besmettingsfactoren en dan een soort van risicomodel laten zien?*
 - *Stel je stopt 100 knollen in een veld met 1 besmette knol ertussen. Zou je dan met verschillende teeltsystemen kunnen bepalen wat de opbouw van de latente besmetting wordt?*
- Andere sectoren en export
 - Wat kunnen we leren vanuit de bloembollensector?
 - Hoe groot is het probleem buiten de EU met het Nederlands pootgoed inzake Erwinia?
- Plantafweer en bestrijding
 - *Wat is het effect van afweer bevorderende producten op Erwinia besmetting?*
 - *Waarom zetten we niet meer in op antagonisten?*
 - *Wordt er nog meer onderzoek gedaan aan bacteriofagen?*
 - *Is er wel eens onderzoek gedaan naar weerbaarheid van knol of weerbaarheid van de plant? Kijk naar ervaring met bijvoorbeeld Agria uit sterke stam.*
 - *Opmerking: Weerbaarheid is genetisch bepaald en kan met bepaalde producten getriggerd worden (onderzoek PRI).*

➤ Vroeger

- Voorheen was het bacterieprobleem minder groot, terwijl we nu schoner werken, in meer afgerijpt gewas, minder rooibeschattingen. Waarom dan nu toch meer Erwinia problemen?
- Komt het dat de bacterie toeneemt omdat we geen metaalhoudende gewasbeschermingsmiddelen tegen fytoftora meer gebruiken?

➤ Consumptietelers

Consumptietelers hebben het gevoel dat ze de problemen van de pootgoedtelers op hun bordje geschoven krijgen. Men voelt zich het 'afvalputje' van de pootgoedtelers. De beste partijen gaan naar het buitenland en de slechte partijen komen in Nederland bij de consumptietelers terecht.

Conclusie

Uit de vragen en discussiepunten van de telersbijeenkomsten kunnen drie belangrijke conclusies worden getrokken. Ten eerste was de reactie dat de resultaten grotendeels een bevestiging waren van hetgeen men al wist of vermoedde, en heeft het bij telers (heel belangrijk!) een groter bewustzijn van de hoofdrisicofactoren in alle stappen van de teelt opgeleverd. Ten tweede werd regelmatig over een "eyeopener" gesproken, dat wil zeggen dat de resultaten verrassend waren bijvoorbeeld in het geval van initiële besmetting vanuit de lucht, versmering via selectie en loofdoding, en het effect van zwadrooien en snelle binnendringen van de bacterie in de schil. Ten derde is duidelijk naar voren gekomen dat alle puzzelstukjes nog niet op zijn plaats liggen en dat er nog steeds openstaande onderzoeksvragen zijn, bijvoorbeeld op het gebied van epidemiologie, weerbaarheid, verspreiding en bewaring.

6.7 Afsluitende bijeenkomst 12/12/2012

Op woensdag 12 december 2012 werd een gezamenlijke bijeenkomst van de bloembollen- en aardappelsector gehouden en werd ingegaan op de hoofdlijnen van het onderzoek Deltaplan Deel C van de afgelopen 4 jaren en de plannen voor een vervolgonderzoek. De uitnodigingen werden verstuurd namens de financiers van deel C van beide sectoren, namelijk NAO, PA, KAVB en PT. Naast vertegenwoordigers van de genoemde financiers, werden uitnodigingen verzonden aan vertegenwoordigers van LTO, NAV, ELI, WUR/PRI, NAK, BKD, nVWA en de pers.

7. Onderzoek Plant Research International

7.1 Algemeen

In de projectperiode 2009 – 2012 van het Deltaplan Erwinia is door Plant Research International (PRI) een aantal onderzoeken uitgevoerd.

Zo werd aandacht besteed aan het verbeteren van het groeimedium voor verrijking van *Dickeya* en *Pectobacterium*, door het toevoegen van bepaalde antibiotica.

De opmars van Erwinia soorten die behoren tot de groep van virulente *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (vPcc) in de praktijk zorgde voor veel deelvragen waarop nog geen antwoord was gevonden. Dit leidde tot onderzoek naar een snelle bioassay om de virulentie van Pcc en *Dickeya* stammen te bepalen. Ook de interactie tussen vPcc en niet virulente (nv) Pcc en *Dickeya* stammen werd daarbij onderzocht.

Binnen het praktijkonderzoek was geconcludeerd dat met name besmetting van aardappelblad via de lucht een belangrijke oorzaak van initiële besmetting zou kunnen zijn (hoofdstuk 3). In aansluiting hierop werd door PRI een proef uitgevoerd om vast te stellen op welke wijze de bacterie via het blad de plant kan binnendringen, en of na opname in het blad een verdere vermeerdering van bacteriën plaatsvindt. Hierbij aansluitend werd een survey van bladmonsters van 1^e-jaars miniknolstammen in Noord-Nederland uitgevoerd.

7.2 Verbetering van het groeimedium voor detectie en isolatie van *Dickeya* en *Pectobacterium* soorten

Inleiding

Voor detectie van *Dickeya* en *Pectobacterium* (Erwinia) soorten wordt gebruik gemaakt van het groeimedium pectate enrichment broth (PEB). De plantenextracten worden aan PEB toegevoegd, waarna de monsters onder lage zuurstofspanning drie dagen worden geïncubeerd bij kamertemperatuur. Deze omstandigheden zijn gunstig voor de vermeerdering (verrijking) van de ziekteverwekkers. Na de verrijking wordt een PCR analyse uitgevoerd. Echter de verrijking verloopt niet altijd optimaal, mogelijk door de groei van en competitie met andere micro-organismen. Voor isolatie van Erwinia soorten wordt het medium CVP gebruikt. Ook op dit medium vindt competitie met andere micro-organismen plaats waardoor isolatie wordt bemoeilijkt.

Doel

Verbeteren van het medium PEB en CVP door toevoeging van selectieve stoffen (antibiotica), zodat selectieve groei van Erwinia's wordt bevorderd.

Uitvoering

Selectie antagonisten. Uit 75 extracten werden in totaal 363 bacteriën geïsoleerd die op voedingsbodems werden getoetst op hun vermogen de groei van *D. solani*, *P. wasabiae* of *P. atrosepticum* te belemmeren. De bacteriën werden met 16S rDNA sequentie-analyse op naam gebracht. Remming van *D. solani* door de antagonisten werd vastgesteld door co-inoculatie van *Dickeya* en antagonisten in PEB (initiële concentratie 10⁴ cellen/ml). Na 48 uur incubatie onder lage zuurstofspanning werd de uitgroei bepaald m.b.v. DAS-ELISA.

Selectie antibiotica. Vervolgens is gekeken welke antibiotica in staat waren de antagonisten te onderdrukken. De 'minimal inhibitory concentration' (MIC) waarde voor *D. solani* en *P. atrosepticum* in een algemeen groeimedium (10% TSB) werd bepaald. Een hoge MIC waarde (≥ 32) voor *D. solani* en *P. atrosepticum* werd gevonden voor de volgende antibiotica: sulfamethoxazole, fusidic acid en vancomycine. Vervolgens werd de MIC waarde voor een selectie van de antagonisten in dit groeimedium vastgesteld. Toevoeging van sulfamethoxazole in een hoge concentratie van 64 of 128 $\mu\text{g/ml}$ aan 10% TSB leidde tot een reductie van de groei van een hoog percentage van de antagonisten, terwijl *Dickeya* en *Pectobacterium* niet werden geremd. Daarnaast is onderzoek gedaan aan de gevoeligheid van *Pectobacterium* en *Dickeya* soorten voor crystal violet en bacitracine.

Evaluatie toevoeging van antibiotica aan het PEB-medium. De toevoeging van sulfamethoxazole en crystal violet aan het PEB werd geëvalueerd onder lage zuurstofspanning met steriele aardappelextracten en met praktijkmonsters waaraan bekende dichtheden van verschillende *Dickeya* en *Pectobacterium* soorten waren toegevoegd.

Resultaten

Selectie van antagonisten

In totaal 137 van de 363 isolaten was in staat tenminste één van de drie "Erwinia's" (*D. solani*, *D. dianthicola* en *P. atrosepticum*) te remmen op 10% TSBA. *D. dianthicola* werd veel vaker geremd dan *D. solani* en *P. atrosepticum*. *D. solani* lijkt dus ongevoeliger voor groeiremming dan *D. dianthicola*. Dit kan mogelijk mee verklaren waarom *D. solani* nu veel vaker wordt gevonden.

Relatief vaak werden isolaten gekarakteriseerd binnen de groep van *Pseudomonas*, *Serratia* en *Pantoea*. Zeven isolaten werden ook gecontroleerd op hun vermogen om in PEB onder anaerobe omstandigheden *D. solani* te remmen. Twee van de zeven getoetste isolaten, nl. *Serratia plymuthica* H37T en *Pseudomonas* sp. H14K6 waren relatief effectief in het onderdrukken van zowel *D. solani* en *D. dianthicola*. *Pseudomonas* sp. 6T14 gaf alleen groeiremming van *D. dianthicola*. Sommige isolaten leken groeistimulerend te werken voor *D. solani*. Bewezen is dus, dat er antagonisten zijn die in PEB, *Dickeya* spp. kunnen remmen in hun groei.

Selectie van antibiotica

D. solani en *P. atrosepticum* waren relatief ongevoelig voor sulfamethoxazole (64, 128 $\mu\text{g/ml}$), fusidic acid (64, 128 $\mu\text{g/ml}$) en vancomycine (Tabel 7.1). Vervolgens werd de gevoeligheid van een aantal antagonistische bacteriestammen voor erythromycin (2 en 4 $\mu\text{g/ml}$), sulfamethoxazole (64 en 128 $\mu\text{g/ml}$), Penicillin G (0.25 en 0.5 $\mu\text{g/ml}$) Piperacillin (0.125 en 0.25 $\mu\text{g/ml}$), Apromycin (64 en 128 $\mu\text{g/ml}$), Clindamycin (2 en 4 $\mu\text{g/ml}$), Fusidic acid (16 en 32 $\mu\text{g/ml}$), Vancomycin (64 en 128 $\mu\text{g/ml}$) en Kanamycin (0.25 en 05 $\mu\text{g/ml}$) in TSBA bepaald voor: *Acetobacter* (2x), *Pseudomonas* (3x), *Serratia* (2x), *Delftia* (1x), *Pantoea* (1x), *Klebsiella* (1x). De meeste antagonisten werden bij 128 $\mu\text{g/ml}$ sulfamethoxazole sterk geremd in hun groei maar niet afgedood. Bij deze concentratie werd geen remming van *Dickeya* en *Pectobacterium* geconstateerd.

Na 24 uur is de remming als gevolg van de toevoeging van sulfamethoxazole voor vrijwel alle antagonisten zichtbaar. Na 48 uur is bij 33% van de stammen de remming nog steeds zichtbaar. De andere antibiotica hadden betrekkelijk weinig effect.

De gevoeligheid voor 128 $\mu\text{g/ml}$ sulfamethoxazole werd voor een breder panel van antagonistische bacteriestammen bepaald in 10% TSBA: *Enterobacter* (2x), *Pseudomonas* (27x), *Serratia* (6x), *Pantoea* (10x), *Klebsiella* (1x), *Acinetobacter* (1x), *Delftia* (2x), *Rahnella* (1x), niet-geïdentificeerd (1x) voor 128 $\mu\text{g/ml}$ sulfamethoxazole. De meeste antagonisten worden bij 128 $\mu\text{g/ml}$ sulfamethoxazole sterk geremd in hun groei maar niet afgedood.

Tabel 7.1: Minimum inhibitory concentrations (MIC-waarden in µg/ml) voor *D. solani* (2222) en *P. atrosepticum* (161) voor verschillende antibiotica in 10% TSB

Antibioticum	<i>D. solani</i>	<i>P. atrosepticum</i>
Sulfamethoxazole	256	256
Tobramycin	0.125	<0.125
Penicillin G	0.5	0.5
Piperacillin	0.25	0.25
Fusidic acid	32	64
Ofloxacin	<0.125	<0.125
Vancomycin	128	128
Ceftazidime	<0.125	<0.125
Apramycin	4	1
Clindamycin HCL	4	8
Thrimethoprim	1	8
Doxycycline HCL	<0.125	<0.125
Minocycline HCL	<0.125	0.25
Ticarcillin	<0.125	0.125
Kanamycin	2	1
Erythromycin	4	32

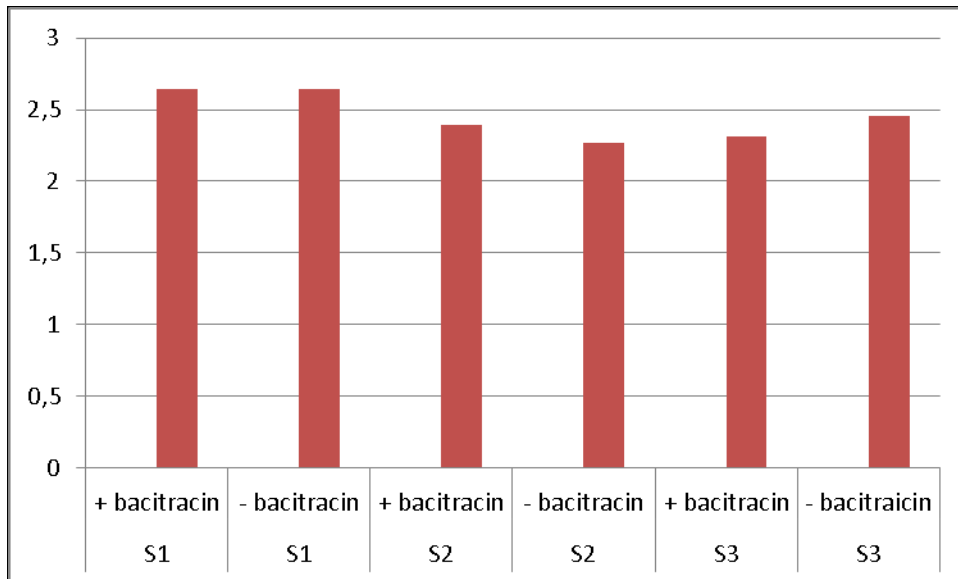
Evaluatie van geselecteerde antibiotica

Crystal violet wordt standaard toegevoegd aan een vast voedingsmedium (CVP) voor *Erwinia*'s. De groei van *Pectobacterium* en *Dickeya* werd daarom geëvalueerd in het vloeibare PEB medium waaraan sulfamethoxazole en/of crystal violet werd toegevoegd. PEB is een veel armer medium dan 10% TSB. Om de groei van de *Erwinia*'s wat te bevorderen werd ook een steriel knolextract aan PEB toegevoegd. Terwijl toevoeging van 128 µg/ml sulfamethoxazole aan 10% TSBA geen groeiremming gaf van *Erwinia*'s, resulteerde toevoeging aan PEB gaf wel in groeiremming van beide bacteriën in PEB, zelfs in een lage concentratie van 32 µg/ml. Crystal violet gaf al bij een concentratie hoger dan 8 µg/ml groeiremming. Een combinatie van beide stoffen resulteerde in een zeer sterke groeireductie. Het effect van de toevoeging van 32 µg/ml sulfamethoxazole of 8 µg/ml crystal violet op de groei van *D. dianthicola*, *D. solani*, *P. atrosepticum* en *P. wasabiae* werd ook bepaald in 3 verschillende niet-steriele aardappelextracten (Kondor, Agria en Konsul). Van de bacteriën werden 10 of 100 cellen per putje toegevoegd. Er werd 3 dagen geïncubeerd onder lager zuurstofspanning. Toevoeging van antibiotica aan PEB leidde bij geaddeerde monsters bijna altijd tot hogere Ct waarden in een TaqMan assay t.o.v. PEB zonder toevoegingen. Dit duidt op een remming van de groei van *Erwinia*'s in aanwezigheid van de antibiotica. Met name *P. wasabiae* bleek gevoelig voor beide antibiotica.

Effect van bacitracine

In 2012 werden aanvullende proeven gedaan met bacitracine. *Dickeya* en *Pectobacterium* stammen behorende tot verschillende soorten werden in het vloeibare medium TSB getoetst op groei in aanwezigheid van oplopende concentraties bacitracine (64 – 1024 µg/ml), nl. *D. dianthicola* 2114, *D. chrysanthemi* 2118, *D. dadantii* 2120, *D. dieffenbachia* 2125, *D. paradisiaca* 2127, *D. zea* 2131, *D. solani* 2222, *P. atrosepticum* 161, *P. atrosepticum* 1948, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 3536, *P. c. subsp. carotovorum* 1957, *P. wasabiae* 3538 en *P. wasabiae* 1297. Ook werden twee Grampositieve bacteriën getoetst, nl. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 542 en *Bacillus megaterium* 3533, en twee antagonistische bacteriën, nl. *Serratia plymuthica* 3160 en *Delftia* sp. 3548. De groei van deze stammen in 10% TSB werd niet geremd tot een concentratie van 512 µg/ml bacitracine. *S. plymuthica* en *Delftia* werden ook niet geremd 512 µg/ml bacitracine, maar de groei van de Grampositieve *Clavibacter* en *Bacillus* stammen was sterk vertraagd (resultaten niet getoond).

Daarna werd de groei van 5 verschillende *Erwinia* soorten bepaald op een vast CVP medium waaraan een concentratie van 500 µg/ml bacitracine was toegevoegd. Er werd geen groeiremming geconstateerd. Tenslotte werd dit medium geëvalueerd met een *Erwinia*-vrij stengelextract en 3 symptomatische stengels. De recovery van *Erwinia*'s en van de overige bacteriën op CVP werd bepaald. Er werd geen verbetering gevonden in de recovery van *P. atrosepticum*, *P. wasabiae*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *D. solani* en *P. c.* subsp. *brasiliensis* bij uitplaten van stengelextracten op het CVP medium in aanwezigheid van 500 µg/ml bacitracine. Ook leidde toevoeging aan CVP niet tot een hogere recovery bij het uitplaten van natuurlijk-besmette monsters (Figuur 7.A). Het effect van bacitracine op verrijking in het vloeibare PEB medium moet nog worden bepaald.



Figuur 7.A: Effect van toevoeging van bacitracine aan CVP op de aantallen *Erwinia* bacteriën gedetecteerd in monsters (S1, S2, S3) van stengels met zwartbeensymptomen

Conclusies en aanbevelingen

De Gram-negatieve bacteriën behorend tot het geslacht *Pectobacterium* en *Dickeya* zijn in omstandigheden die gunstig zijn voor de groei van de bacterie (veel nutriënten, veel zuurstof) in hoge mate resistent tegen de antibiotica sulfamethoxazole en crystal violet. Deze antibiotica zijn met name geschikt om de groei van Gram-positieve bacteriën te onderdrukken. Echter onder stress condities, bij een lage zuurstofspanning en een gebrek aan nutriënten geven deze antibiotica toch bij lage concentraties al groeiremming. Er wordt geadviseerd PEB zonder deze antibiotica te blijven gebruiken.

Erwinia's zijn ook tot een zeer hoge concentratie (>500 µg/ml) ongevoelig voor bacitracine en dit leek bruikbaar voor verbetering van groeimedia. Echter, toevoeging van bacitracine aan het CVP medium had geen positief effect op de recovery van *Erwinia*'s; de aantallen niet cavity (putjes) vormende bacteriën bleef bij toevoeging van bacitracine even hoog. Op CVP worden Gram-positieve bacteriën al geremd door de aanwezigheid van crystal violet in het medium. Toevoeging van bacitracine heeft dan weinig zin. Er wordt nog een verrijkingsexperiment gedaan met PEB waaraan plantenextracten zijn toegevoegd. Aan PEB wordt nu nog geen antibiotica toegevoegd waarmee de Gram-positieve bacteriën worden geremd.

7.3 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* als veroorzaker van bacterieziek in aardappel: resultaten van laboratorium en kasexperimenten

Inleiding

De laatste jaren worden in symptomatische planten in toenemende mate *Pectobacterium* stammen gevonden, waarvan men tot voor kort aannam dat deze behoorde tot een groep van virulente *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (vPcc) stammen. Deze stammen kunnen met genetische technieken (PCR en rep-PCR) en in veldexperimenten onderscheiden worden van niet virulente *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (nvPcc) stammen. De correlatie tussen de resultaten met genetische technieken en de virulentie in het veld is in de praktijk niet 100%. Niet alle vPcc stammen veroorzaken symptomen en nvPcc stammen zijn soms in ziek materiaal te vinden.

Er is behoefte aan meer kennis over de virulente en niet-virulente Pcc groepen. Een snelle bioassay is gewenst om te bepalen of een Pcc stam ziekte kan veroorzaken in het veld. Er is ook kennis nodig over de interactie tussen Pcc en *Dickeya* bij het ontstaan van menginfecties.

Inmiddels is duidelijk geworden dat de vPcc stammen vallen binnen de soort *Pectobacterium wasabiae* (niet gepubliceerde gegevens).

Doelen

1. Onderzoeken of de virulentie van *Pectobacterium* en *Dickeya* stammen (snel) bepaald kan worden met laboratorium- (aardappelschijventoets) of kasexperimenten, waarbij ook gekeken wordt naar de plantkoloniserende eigenschappen van nvPcc en vPcc.
2. Onderzoek doen naar de interactie van nvPcc en *Dickeya* in plantmateriaal

Uitvoering

Gebruikte bacteriestammen. Vier vPcc stammen (nrs 1949, 1955, 1957 en 1962) werden gebruikt die in veldexperimenten bacterieziek gaven, en drie nvPcc stammen (nrs 1937, 1963 en 1953) die geen symptomen gaven. Om de bacteriën in de planten goed te kunnen volgen werden er een aantal stammen met GFP gemerkt. Van de GFP-gemerkte stammen werd vastgesteld dat ze dezelfde groei-eigenschappen hebben als de ouderstammen.

Aardappelschijventoets. Aardappelschijven (cv. Agria) werden geïnoculeerd met bacteriën en twee dagen onder vochtige condities geïncubeerd, waarna de diameter van de rottende zone werd bepaald.

Competitie tussen nvPcc en Dickeya op aardappelschijven. De aardappelschijven (cv. Agria) werden geïnoculeerd met nvPcc, met *D. solani* of met beide pathogenen. Schijven behandeld met water dienden als negatieve controle. Na incubatie van de schijven werd het rot verdund en uitgeplaat, waarna de identiteit van de kolonies werd vastgesteld met PCR (kolonie-PCR). Ook werden de monsters verrijkt, het DNA werd uit het extract gezuiverd en geanalyseerd met PCR (enrichment PCR).

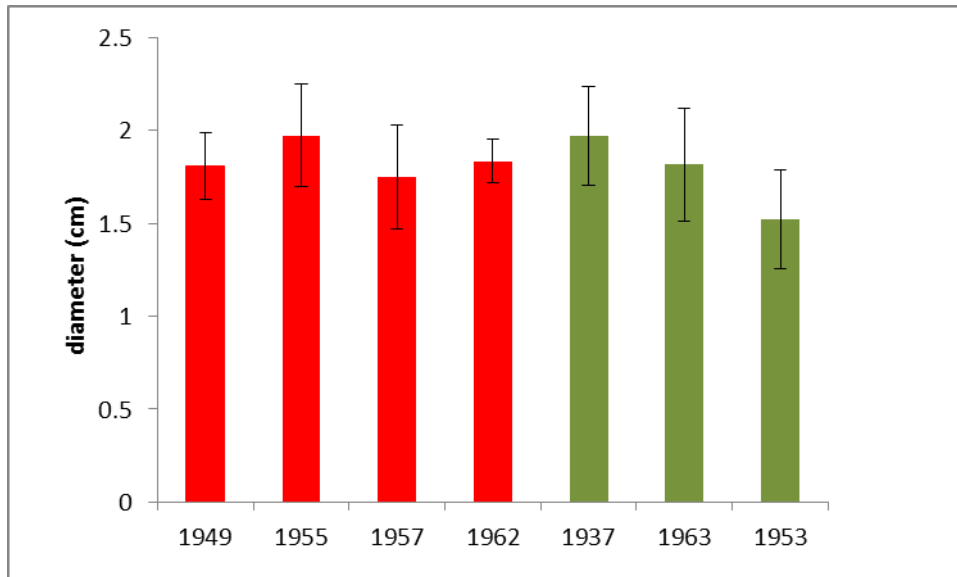
Kas- en veldexperimenten. Kasexperimenten werden gedaan waarbij de knollen, de wortels of de stengels werden geïnoculeerd. In 2010 werden de planten gedurende 6-8 weken bij 28 °C (knolinoculatie) opgekweekt, in 2011 bij 23 °C (stengel- of wortelinoculatie). Symptoomontwikkeling werd wekelijks beoordeeld. Aan het einde van het experiment werd de aanwezigheid van de bacteriën in de stengels vastgesteld m.b.v. kolonie-PCR en verrijking in PEB medium en PCR (enrichment-PCR). Voor een selectie van de symptomatische planten werd de aanwezigheid van GFP-gemerkte bacteriën vastgesteld in het stengelweefsel m.b.v. UV microscopie. De experimenten werden onafhankelijk van elkaar herhaald.

Tenslotte werden er in 2010, aan het einde van veldexperimenten in de Kollumerwaard stengels geanalyseerd m.b.v. kolonie-PCR en enrichment-PCR, van planten waarvan de knollen waren geïnoculeerd met mengsels van nvPcc en *Dickeya*.

Resultaten

Knolmaceratie

Het vermogen van vPcc stammen om aardappelschijven te laten rotten verschilde niet significant van die van de nvPcc stammen (Figuur 7.B). Beide groepen stammen zijn pectinolytisch en kunnen zachtrot in de bewaring veroorzaken.



Figuur 7.B: Vermogen van virulente Pcc stammen (1949, 1955, 1957 en 1962) en niet virulente stammen (1937, 1963 en 1948) om aardappelschijven te laten rotten (n=9)

Inoculatie van aardappelschijven met *D. solani* resulteerde in dezelfde mate van rot als co-inoculatie met *D. solani* en nvPcc of met vPcc stammen (resultaten niet getoond). Er werd dus geen synergistisch (versterkend) of antagonistisch effect gevonden van de nvPcc of vPcc stammen op knolrot veroorzaakt door *D. solani* en vice versa.

Behandeling	Kolonie-PCR (n=9)		Verrijgings PCR (n=6)	
	PCR Dickeya	PCR Pectobacterium	PCR Dickeya	PCR Pectobacterium
Dickeya	9	0	6	0
nvPcc 1937	0	9	0	6
nvPcc 1963	0	9	0	6
Dickeya + nvPcc 1937	0	9	5	6
Dickeya + nvPcc 1963	0	9	5	5

Tabel 7.2: Competitie van nvPcc en Dickeya op aardappelschijven bij co-inoculatie bepaald door uitplaten en kolonie-PCR of met een verrijgings PCR

Aardappelschijven werden geïnoculeerd met *D. solani*, met nvPcc stam 1937 of 1963 of met een mengsel van *D. solani* en één van beide nvPcc stammen (in gelijke dichtheden gemengd). In alle gevallen ontstond er rot. Het rot werd uitgeplaat op CVP waarna per monster 3 individuele kolonies werden getoetst (kolonie-PCR). Als er met een mengsel van beide bacteriën werd geïnoculeerd, kreeg nvPcc de overhand en zijn alle getoetste kolonies nvPcc (Tabel 7.2). Als het rot rechtstreeks in de PCR werd getoetst, na extractie van het DNA, werd een reactie in de PCR assay voor *D. solani* en *Pectobacterium* spp. gevonden. *D. solani* was dus nog wel in lage dichtheden aanwezig.

Kasexperimenten

Bij 28 °C leidde knolinoculatie met *D. solani* (positieve controle) tot een hoog percentage niet-gekiemde knollen en een hoog percentage planten met symptomen (Tabel 7.3). De aanwezigheid van nvPcc tijdens co-inoculatie resulteerde in een verlaging van het aantal aangetaste planten; met name het percentage niet-gekiemde knollen daalde sterk. Het percentage aangetaste planten was bij inoculatie met vPcc en de nvPcc stammen laag (2.1-6.7%). Als met een mengsel van *Dickeya* en nvPcc werd geïnoculeerd werden beide bacteriën zowel in planten met als zonder symptomen gevonden (Tabel 7.4). Regelmatig kwamen beide pathogenen gezamenlijk in dezelfde planten voor, ook in planten met symptomen. De aanwezigheid van de GFP gemerkte vPcc 1994 en nvPcc 1937 werd ook bevestigd m.b.v. een UV stereomicroscop.

		Percentages				
		Aantal Planten	Symptomen	Niet-gekiemd	Totaal aangetast	Stengels positief uitplaten
1994	Virulent	48	2.1	3.3	5.4	13.3
1957	Virulent	48	2.1	0.0	2.1	2.1
1937	non-virulent	60	6.7	0.0	6.7	18.3
1963	non-virulent	24	4.2	0.0	4.2	25.0
Water		24	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Dickeya</i>		36	44.4	33.3	77.7	27.8
<i>Dickeya</i> +1937		24	58.3	12.5	60.8	Zie Tabel 3
<i>Dickeya</i> +1963		24	37.5	0.0	37.5	Zie Tabel 3

Tabel 7.3: *Samenvatting van de resultaten van de kasexperimenten met vPcc en nvPcc stammen. De resultaten van de GFP- en de wild type stam (wt) zijn samengevoegd.*

Tabel 7.4: Resultaten kolonie-PCR en enrichment-PCR kasproeven met mengsels van *Dickeya* en nvPcc stammen.

Percentage		Aantal planten getoetst	Waarvan met symptomen	<i>Dickeya</i> PCR positief	<i>Pectobacterium</i> PCR positief
Behandeling					
Experiment 1					
Dickeya+nvPcc1937	Kolonie-PCR*	7	7	5	0
	Enrichment PCR			5	3
Dickeya+nvPcc1963	Kolonie-PCR	5	0	0	12
	Enrichment PCR			0	4
Experiment 2					
Dickeya+nvPcc1937	Kolonie-PCR	9	7	2	7
	Enrichment PCR			5	3
Dickeya+nvPcc1963	Kolonie-PCR	12	9	9	9
	Enrichment PCR			10	12

*Per plant werden 3 kolonies getoetst. De plant werd positief gerekend in PCR als één van de kolonies positief was

Bij planten geïnoculeerd in de stengels werd gekeken naar de gemiddelde lengte van de uitwendige of inwendige symptomen tussen de behandelingen (Tabel 7.5). Voor de inwendige symptomen was alleen de lengte van de lesies voor *D. solani* significant groter dan voor de vPcc en nvPcc stammen. Na stengelinoctulatie kon *D. solani* in de stolonen van twee planten gevonden worden, waarvan één plant met symptomen, en in één plant geïnoculeerd met vPcc 1955. Na wortelinoctulatie werden de stengels geanalyseerd m.b.v. enrichment TaqMan assays. Er werden alleen na inoculatie met *D. solani* 2 van de 20 planten positief gevonden, waarvan 1 plant met symptomen, en 1 van de 20 planten geïnoculeerd met vPcc stam 1955.

Behandeling		Uitwendige symptomen (lengte in mm.)		Inwendige symptomen (lengte in mm)	
1949	vPcc	6.4	Ns	21.9	a
1955	vPcc	2.8	Ns	20.0	a
1957	vPcc	2.2	Ns	3.3	a
1937	nvPcc	13.0	Ns	42.9	a
1948	nvPcc	12.3	Ns	29.4	a
1963	nvPcc	10.2	Ns	14.0	a
2254	<i>D. solani</i>	12.1	Ns	101.1	b
	Water	4.4	Ns	4.1	a

Tabel 7.5: Lengte van de uitwendige en inwendige symptomen van stengels, geïnoculeerd met vPcc, nvPcc of met *D. solani*. Ns = niet significant ($P=0.05$), behandelingen met eenzelfde letter (a of b) zijn niet significant verschillend van elkaar ($P=0.05$)

Veldexperimenten

Ook werden er symptomatische stengels vanuit het veld geanalyseerd m.b.v. een verrijgings-PCR en kolonie-PCR. Deze kwamen van planten die met *D. solani* en nvPcc1937 (n=12) of met *D. solani* en nvPcc1963 (n=6) waren geïnoculeerd. In de kolonie-PCR werd in sommige planten *Dickeya* en andere planten nvPcc gevonden. In de verrijgings-PCR werden ook monsters gevonden die met beide pathogenen waren besmet.

Conclusies en aanbevelingen

Uit de resultaten blijkt dat in aardappelschijventoetsen en kasexperimenten waarbij planten werden geïnoculeerd via knollen, wortels of stengels, vPcc- niet onderscheiden kan worden van nvPcc stammen. Om de virulentie van stammen betrouwbaar te kunnen bepalen, moeten veldexperimenten worden uitgevoerd, bij voorkeur gedurende 2 of 3 seizoenen.

Inmiddels is duidelijk dat vPcc identiek is aan *P. wasabiae*, terwijl nvPcc stammen echte *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* stammen zijn. Er zijn inmiddels verschillende TaqMan assays ontwikkeld waarmee *P. wasabiae* kan worden aangetoond.

D. solani reageert in het algemeen agressiever dan vPcc en nvPcc, zowel bij 23 °C als bij 28 °C. Bij 28 °C, werd na vacuüm-inoculatie van knollen met *D. solani*, een veel hogere ziekte-incidentie gevonden dan met vPcc of nvPcc. Bij 23 °C werd na stengelinoctatie veel grotere inwendige lesies in de stengels gevonden dan na inoculatie met vPcc of nvPcc. Ook werd na stengelinoctatie *D. solani* vaker in de stolonen gevonden en na wortelinoctatie vaker in de stengels. *D. solani* lijkt de planten efficiënter te koloniseren.

Uit de competitie experimenten blijkt dat nvPcc, *D. solani* op aardappelschijven verdringt. In het ontstane rot wordt vooral nvPcc gevonden. Als het rot rechtstreeks in de PCR wordt getoetst, wordt een reactie in PCR assays gevonden waaruit blijkt dat (het DNA van) *D. solani* nog aanwezig is. De resultaten zijn in lijn met veldexperimenten bij HZPC waarbij inoculatie van knollen met *D. solani* en nvPcc leidt tot een reductie van het aantal bacterie-zieke planten in het veld.

Als knollen worden geïnoculeerd met zowel *D. solani* en nvPcc, kunnen beide organismen in de stengels worden teruggevonden, soms als menginfectie en soms als enkele infectie, in zowel planten met als zonder symptomen. Dit werd zowel in het veld als in de kas geconstateerd. Bij analyses en herisolaties vanuit planten met symptomen is dus niet onmiddellijk duidelijk wie de veroorzaker van de ziekte is, en kan nvPcc ten onrechte aangezien kan worden als de veroorzaker van bacterieziekte. Virulentieproeven in het veld moeten uitsluitel geven.

7.4 De ontwikkeling van populaties van *Dickeya solani* en *Pectobacterium wasabiae* na depositie op (beschadigd) aardappelblad

Inleiding

Al in de eerste cycli in de vermeerdering van basispootgoed uitgaande van miniknollen worden *Dickeya* ssp. en *Pectobacterium* soorten aangetroffen in het loof bij loofvernietiging. Miniknollen worden geacht Erwinia-vrij te zijn, de besmetting kan daarom niet uit het uitgangsmateriaal komen. Er moeten andere besmettingsbronnen zijn. De grond kan als besmettingsbron worden uitgesloten. De pathogenen kunnen mogelijk wel via aerosolen, spatwater, regenwater, machines of insecten overgebracht worden uit naburige percelen met aangetaste aardappelplanten.

Doel

De proef heeft tot doel na te gaan of besmetting van bladeren vanuit de lucht kan leiden tot een opbouw van populaties van *Dickeya* en *Pectobacterium*. Deze bladbesmettingen kunnen mogelijk leiden tot infectie van het pootgoed.

Uitvoering

In een kas werd een potproef in vier herhalingen uitgevoerd bij een temperatuur van 23°C. Vier weken na opkomst werden de planten in een vochtige kamer geplaatst. De volgende dag werden volledig ontwikkelde bladeren aan de hoofdstengels van de planten licht beschadigd met een zachte tandenborstel. Planten waarbij de bladeren niet werden beschadigd werden gebruikt als controles op het effect van de verwonding. Direct na verwonding werden boven- en onderzijden van de bladeren tot afdruipen verneveld met water of een waterige suspensie met 10^2 , 10^4 of 10^6 kve/ml van met GFP-gemerkte stammen van *D. solani* of *P. wasabiae* en de planten teruggezet in de vochtige kamer. De volgende dag werden de vochtige kamers afgebroken. Wekelijks werden de planten bekeken op het verschijnen van ziektesymptomen.

Om de dichtheden van in de bladeren binnengedrongen bacteriepopulaties te kunnen bepalen, zijn direct na inoculatie en op dag 1, 21 en 35 bladeren bemonsterd. Voor analyses, werd een deel van de bladmonsters uitwendig ontsmet. De overige monsters werden niet ontsmet, om de totale (in- en uitwendige) dichtheden te kunnen bepalen. De extracten werden na gietplaten geanalyseerd m.b.v. UV microscopie.

Resultaten

Direct na inoculeren konden de pathogenen niet of nauwelijks worden gedetecteerd in of op het blad (Tabel 7.6). Eén dag na inoculatie waren de dichtheden van *D. solani* toegenomen en kon de bacterie wel aangetoond worden, ook in extracten van uitwendig ontsmette bladeren, zelfs bij de laagste inoculumdichtheid. Dat wil zeggen dat *D. solani* al binnen 1 dag na depositie op het blad was binnengedrongen. In de periode tussen dag 1 en dag 21 na inoculatie nam niet alleen het aantal monsters met inwendig besmette bladeren toe, maar ook de dichtheden van de inwendige populaties van *D. solani* (figuur 7.C). Na 21 dagen begonnen de bladeren af te sterven, mogelijk als gevolg van mangaangebrek. Ook extracten van afgestorven bladeren waren (zwaar) besmet met *D. solani*.

Bij de laagste inoculumdichtheid (10^2 kve/ml) van *P. wasabiae* traden tijdens de duur van het experiment geen infecties op (Tabel 7.6). Na inoculatie met een dichtheid van 10^4 kve/ml werd *P. wasabiae* alleen gedetecteerd in extracten van niet-ontsmette bladeren. Inwendige besmettingen traden wel op na inoculatie met de hoogste inoculumdichtheid van 10^6 kve/ml (figuur 7.C). Net als bij *D. solani* kon *P. wasabiae* worden aangetoond in pas afgestorven bladeren.

Inwendige infecties werden ook in niet-beschadigde blad gevonden, na 35 dagen in dichtheden van 1000 kve/gram blad, voor zowel *D. solani* als *P. wasabiae* (resultaat niet getoond).

Geïnfecteerd bladweefsel is 1 dag na inoculatie ingebed in een agar medium en na incubatie bekeken met microscopische technieken (Figuur 7.D). De microscoopbeelden gaven de indruk dat de bacterie naar binnen ging via de huidmondjes en zich aan de onderzijde in het bladmoes vermenigvuldigde.

Tabel 7.6: Verloop van de aantallen aardappelbladeren waarbij na beschadiging en inoculatie met *Dickeya solani* of *P. wasabiae* een besmetting werd aangetoond.

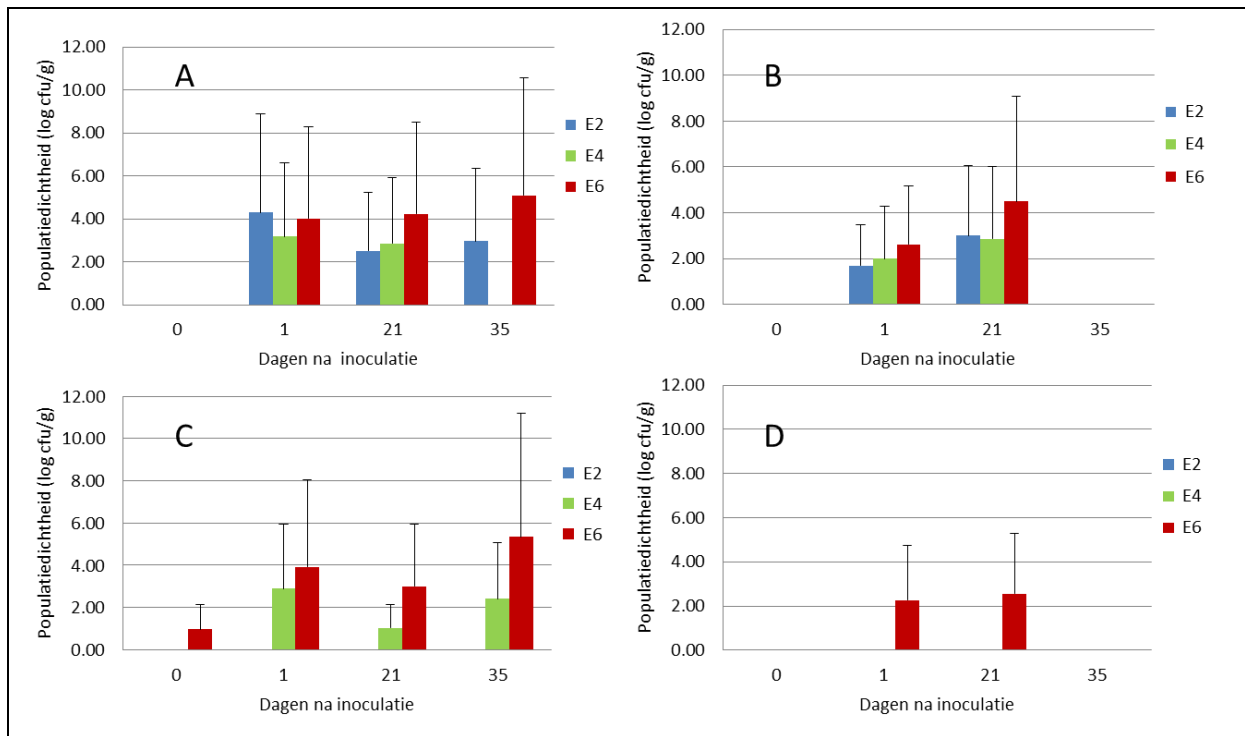
Tijdstip	In- en uitwendig besmet			Inwendig besmet		
	E2	E4	E6	E2	E4	E6
<i>D. solani</i>						
Dag 0	0/3 ¹	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Dag 1	1/4	2/4	3/4	2/4	1/4	3/4
Dag 21	3/4	4/4	4/4	3/4	2/4	4/4
Dag 35	1/7	0/7	7/9	—	—	—
<i>P. wasabiae</i>						
Dag 0	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
Dag 1	0/4	4/4	4/4	0/4	0/4	2/4
Dag 21	0/4	2/4	3/4	0/4	0/4	3/4
Dag 35	0/7	2/7	8/10	—	—	—

¹ het cijfer voor de schuine streep betreft het aantal besmette bladeren, het cijfer erachter het aantal onderzochte bladeren

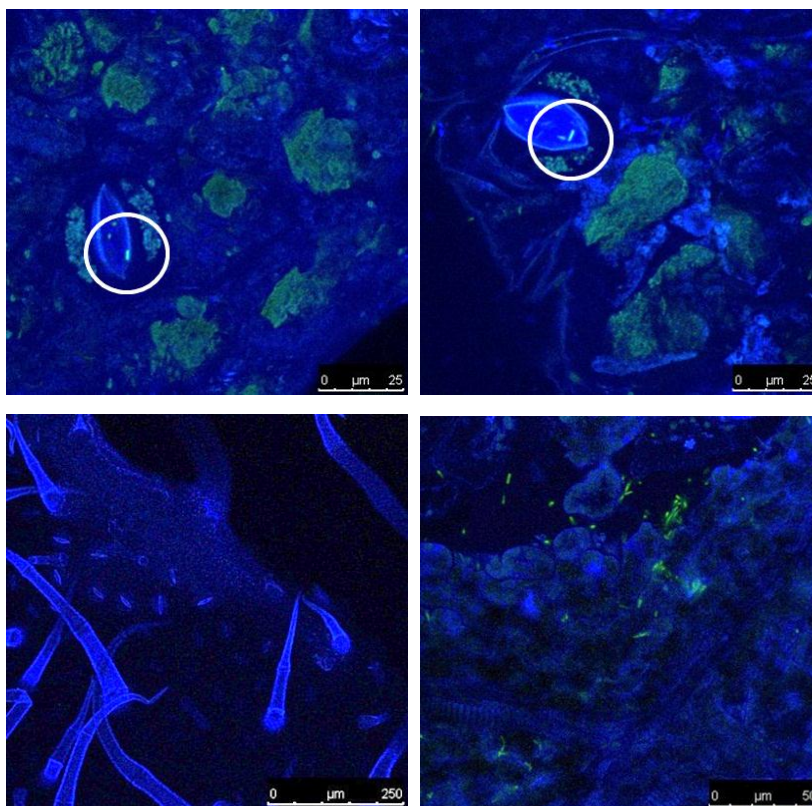
Conclusies en discussie

Deze kasproef toont aan dat bij hoge luchtvochtigheid cellen van *D. solani* en *P. wasabiae*, na depositie op aardappelbladeren met lichte beschadigingen, snel (al na één dag) in aantal toenemen en de bladeren kunnen infecteren. Beschadiging lijkt daarbij niet nodig, want er werden incidenteel ook inwendige infecties in onbeschadigd blad gevonden. Vijfendertig dagen na inoculatie werd gemiddeld 100.000 kve per gram bladmateriaal gevonden, maar de dichtheden per blad varieerden sterk. *D. solani* lijkt het inwendige blad efficiënter te besmetten dan *P. wasabiae*. Lage dichtheden van *D. solani* resulteerden namelijk al in infecties en er werden 35 DPI hogere dichtheden in de bladextracten gevonden.

Deze proef wijst er op dat als inoculum via aerosolen, spatwater, regenwater, machines of insecten op nat loof terecht komt, infecties van loof makkelijk kunnen ontstaan. De bacteriën kunnen mogelijk via het vaatsysteem in de ondergrondse delen van de plant terecht komen. De bacteriën kunnen ook vanuit het loof met regen- of irrigatiewater in de grond lekken en zo resulteren in infecties van dochterknollen. Loofinfecties kunnen bij loofvernietiging (klappen) ook leiden tot besmette aerosolen waarmee de bacteriën kunnen worden verspreid.



Figuur 7.C: Ontwikkeling van de in- en uitwendige populaties (A) en de inwendige populaties (B) van *D. solani* en van de in- en uitwendige populaties (C) en de inwendige populaties (D) van *P. wasabiae* na inoculatie van beschadigde aardappelbladeren. E2: 10^2 kve/ml inoculum; E4: 10^4 kve/ml inoculum; E6: 10^6 kve/ml inoculum.



Figuur 7.D. Bovenste twee figuren: Groen gemerkte bacteriecellen in de huidmondjes aan de onderzijde van een blad (T=1). Beneden links: afwezigheid van cellen aan de bovenzijde van het blad (bladharen zijn zichtbaar). Beneden rechts: aanwezigheid van bacteriecellen in het bladmoes aan de onderkant van het blad.

7.5 Loofbesmettingen met *Erwinia*'s in 1-jarige aardappelstammen: resultaten van een survey in pootgoed teeltgebieden in Noord Nederland

Inleiding

Al in de eerste cycli in de vermeerdering van basispootgoed, uitgaande van miniknollen, worden in de naoogst besmettingen met *Dickeya* ssp. en *Pectobacterium* ssp. gevonden. Miniknollen zijn *Erwinia*-vrij, er moeten dus andere besmettingsbronnen zijn. Zieke planten op percelen in de buurt zijn mogelijke besmettingsbronnen. Bij regenval komen de pathogenen als aerosolen in de lucht en kunnen dan door de wind over enkele honderden meters getransporteerd worden. Wanneer deze aerosolen op het loof van aardappelplanten terechtkomen, kunnen zij het bladoppervlak koloniseren en uiteindelijk infecteren. Daarnaast kunnen cellen van de *Erwinia*-populaties uit het blad, tijdens regenval, afspoelen naar de bodem en via het bodemvocht knollen koloniseren en infecteren.

Doel

Onderzoeken of *Erwinia* bacteriën, m.n. *Dickeya solani*, *Pectobacterium wasabiae* en *P. atrosepticum* voorkomen op bladeren van aardappelplanten gegroeid uit (pathogeen-vrije) miniknollen. Op deze wijze wordt inzicht verkregen in de mogelijke rol van initiële besmettingen van pootgoed via loofinfecties.

Uitvoering

Medio juli 2012 werd het loof van in totaal 19 percelen van miniknollen op 16 bedrijven verspreid over de Noordwestelijke - en Noordelijke Zeeklei bemonsterd voor onderzoek op besmetting met *Erwinia*-soorten. Er werden 14 verschillende aardappelrassen bemonsterd (Tabel 7.7). Bij de aanplant Kondor 1 is het loof niet doodgespoten. Hierdoor was het mogelijk deze een tweede keer te bemonsteren, namelijk 2 á 3 weken na loofvernietiging. Op 5 verschillende plekken per aanplant werd van 20 planten halverwege stengelhoogte een blad geplukt. De 5 porties van 20 bladeren per aanplant werden apart getransporteerd en verder verwerkt.

Bij elke portie bladeren werden eerst de op de bladeren aanwezige bacteriecellen eraf gewassen door de bladeren in buffer te schudden. Na afgieten van de wasbuffer werden bladextracten gemaakt door de bladeren kapot te slaan in extractie-zakjes met buffer. Wasbuffer en bladextract werden uitgeplaat en gebruikt voor het inoculeren van verrijkingsmedium. Kolonies en het geïncubeerde verrijkingsmedium werden geïdentificeerd met TaqMan-toetsen specifiek voor de verschillende *Dickeya* en *Pectobacterium* soorten en twee conventionele PCR assays voor *Pectobacterium*-soorten.

Resultaten

De resultaten van de toetsen (generieke TaqMan-toets voor *Erwinia*'s en de soort specifieke TaqMan-toetsen voor *P. atrosepticum*, *P. wasabiae* en *D. solani*) zijn samengevat in Tabel 7.7. In de monsters uit vier aanplanten (Crips4all 1, Jaerla, Kondor 1 en Spunta 2) werd geen besmetting met *Erwinia* aangetoond.

Bij de andere aanplanten bleek het loof wel besmet met *Erwinia*'s. De uitslagen van de soort specifieke TaqMan-toetsen voor *P. atrosepticum*, *P. wasabiae* en *D. solani* voor de *Erwinia*-positieve monsters waren negatief. Er zijn dus geen aanwijzingen gevonden voor bladbesmettingen met deze pathogenen.

Slechts 8 isolaten afkomstig van de aanplanten Kondor 4, Picasso, Rudolph en Vd Werf v1271-1274 gaven een positieve reactie in de generieke TaqMan voor *Erwinia*'s. Geen van deze isolaten gaf een positieve reactie in de TaqMan-toets voor *P. wasabiae*. Van drie isolaten (de twee isolaten van aanplant Picasso en het isolaat van aanplant Rudolph) kon bovendien worden vastgesteld dat geen *P. atrosepticum* is geïsoleerd.

Een selectie van 16 monsters is ook getoetst in twee conventionele PCR assays. De eerste assay werd uitgevoerd met Y1/Y2 primers, waarmee alle *Pectobacterium* soorten worden aangetoond behalve

Pectobacterium wasabiae. Alle monsters gaven een positieve reactie in deze assay. Van de 8 getoetste isolaten gaven er 3 een reactie. De tweede assay was met primers die specifiek zijn voor *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; één stam reageerde met deze primers.

Tabel 7.7: Analyse van bladmonsters¹ van planten gegroeid uit miniknollen aanplant.

	Wasbuffer					Bladextract				
	TaqMan ²				DLCVP ³	TaqMan ²				DLCVP ³
	<i>Erwinia</i> sp.	<i>P. atrosepticum</i>	<i>P. wasabiae</i>	<i>D. solani</i>		<i>Erwinia</i> sp.	<i>P. atrosepticum</i>	<i>P. wasabiae</i>	<i>D. solani</i>	
Agata	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0
Arsenal	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Atlantis	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Crips4all 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Crips4all 2	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Diamant	4	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Festien	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0
Jaerla	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kondor 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kondor 2	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Kondor 3	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Kondor 4	3	0	0	0	2 ⁴	0	0	0	0	1 ⁴
Maranca	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Picasso	5	0	0	0	2 ⁵	5	0	0	0	0
Rodeo	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Rudolph	4	0	0	0	0	4	0	0	0	1 ⁵
Spunta 1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spunta 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
v1271-1274	1	0	0	0	0	3	0	0	0	2 ⁴

¹ Per aanplant zijn 5 monsters onderzocht. Elk monster is een portie van 20 bladeren.

² Aantal monsters met positieve reacties in de generieke TaqMan voor *Erwinia*'s (*Erwinia* sp.) en de soort specifieke TaqMan-toetsen voor *P. atrosepticum*, *P. wasabiae* en *D. solani*.

³ Aantal *Erwinia*-isolaten dat is verkregen na uitplaten op DLCVP.

⁴ *Erwinia* sp.; geen *P. wasabiae*.

⁵ *Erwinia* sp.; geen *P. atrosepticum* en geen *P. wasabiae*.

Conclusies en aanbevelingen

In 16 van de 20 aanplanten werden 'Erwinia's' gedetecteerd. Echter, in geen van de monsters werden besmettingen met *P. atrosepticum*, *P. wasabiae* en *Dickeya spp.* gevonden, de soorten die in Nederland bacterieziek veroorzaken. Er werden zelfs geen infecties gevonden in bladmateriaal van planten die lange tijd dichtbij besmette planten hebben gestaan (monster "Rudolph"). Met de conventionele PCR assays is aannemelijk gemaakt dat *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in sommige bladmonsters aanwezig was. Deze bacterie kan wel zachtrot in knollen (tijdens de bewaring) veroorzaken, maar geen zwartbenigheid of stengelnatrot in het veld. De positieve- en negatieve controles in de toetsen gaven aan dat de toetsen goed zijn uitgevoerd. Er zijn dus uit dit onderzoek, waarin 2000 bladeren zijn getoetst, geen aanwijzingen verkregen dat pootgoedbesmettingen veroorzaakt kunnen worden door infecties vanuit de lucht. Niet uitgesloten is dat er te weinig bladmateriaal is verzameld om de rol van bladinfecties betrouwbaar te kunnen aantonen. Voor *Dickeya solani* is aangetoond, dat lage dichtheden reeds infectie van het blad kunnen veroorzaken.

8. Evaluatie en aanbevelingen

Uit het onderzoek dat in het kader van het Deltaplan Erwinia (deel C) is gedaan komt de ernst van de Erwinia problematiek in al zijn scherpste naar voren. De besmettingen met Erwinia duiken op vanaf de eerstejaars stammen t/m de eindfase van de pootgoed vermeerdering. Bij vrijwel elk onderdeel van de teeltcyclus vallen risicovolle handelingen aan te wijzen, die tot verergering van het probleem leiden.

We geven een aantal contouren weer uit het onderzoek, die de ernst van de Erwinia problemen onderstrepen:

- Al bij de eerstejaars stammen wordt besmetting gevonden, met name in monsters uit loofklappers.
- Tijdens de eerste 4 jaren van de stammenteelt vindt een verontrustend snelle opbouw plaats van de besmettingen in de dochterpartijen.
- Waarschijnlijk komen veel van de eerste besmettingen tot stand via de lucht. Met name voor het, momenteel, meest voorkomende Erwinia type vPcc (*P. wasabiae*) lijkt dit op te gaan.
- Tijdens de selectie kan een besmetting gemakkelijk over een perceel verspreid worden, zowel bij handselectie, met de selectiekar, als met de banden van een trekker waarmee door het veld wordt gereden.
- Loofklappen is een groot risico:
 - Door het klappen zelf wordt de besmetting over tenminste 10 m versmeerd.
 - Het geklapt gewas is één gigantische invalspoort voor besmettingen.
 - In de geklapt loofresten tussen de ruggen kan Erwinia weken in leven blijven en voor verdere besmettingen zorgen.
 - Zowel in de Monitoring van mini-telers, als in de Monitoring van S-telers, is een verband gevonden tussen besmette loofklapmonsters en de besmettingen die uiteindelijk in de dochterpartijen werden gevonden.
- Bij machinaal oogsten vindt een behoorlijke uitbreiding van de besmetting plaats. Bij de Monitoring van S-telers bleek dat de besmetting in de periode van rooien, transport en inschuren met een factor 5 tot 6 kan toenemen.
- Van de versmeerde Erwinia kan weliswaar een groot deel worden geëlimineerd door zo snel mogelijk na rooien te drogen, bijvoorbeeld door in het zwad te rooien. Er kan echter niet voorkomen worden dat een deel van de besmetting al in de knol (schil) wordt opgenomen, en niet meer door drogen tijdens de bewaarperiode te verwijderen is.

Samenvattend kan gesteld worden dat elke fout die gemaakt wordt gedurende de teelt, genadeloos wordt afgestraft door Erwinia.

Het is daarom van het grootste belang dat alle maatregelen genomen worden in alle stadia van de teelt, die de risico's van introductie of verspreiding van de bacterie tot een minimum kunnen beperken. Om tot de ten doel gestelde reductie van 50% van de economische schade te komen, is er niet één of zijn er niet enkele maatregelen aan te geven waardoor dit bereikt kan worden. Gezien de breedheid van de problemen zal alleen een samenhangend pakket aan maatregelen soelaas kunnen bieden. Daarmee zullen ook ingrijpende keuzes voor de inrichting van de hele pootgoedsector onder ogen moeten worden gezien.

In de hoofdstukken hiervoor zijn bij de verschillende hoofdthema's al diverse conclusies geformuleerd. Op basis hiervan komt het onderzoeksteam tot de volgende aanbevelingen :

- Overwogen moet worden de pootgoedvermeerdering te beperken tot maximaal 4 veldgeneraties
- Er zou een ruimtelijke scheiding moeten komen tussen het schone uitgangsmateriaal (tenminste 1^e – 3^e generatie) en de overige aardappelteelt. Een optie hierbij zou het aanwijzen van gespecialiseerde bedrijven voor deze basisteelt kunnen zijn. Op deze wijze kan het risico op verspreiding van besmette naar schone partijen / percelen worden beperkt.
- Partijen zouden vanaf de 1^e veldgeneratie moeten worden getoetst, waarbij van partijen met een latente besmetting consequent afscheid wordt genomen. (Meten = weten !)
- Voor de stammenteelt moeten optimale productieomstandigheden worden gehanteerd:
 - Gericht op aantallen, niet op kilo's
 - Optimale bemesting, niet alleen NPK, maar ook andere (micro) elementen.
- Kiem de poters voor, met name met het oog op vroegere afsterving van de moederknollen.
- Kies het beste voorkiemsysteem in overleg met het handelshuis. De beste keuze kan per ras verschillend zijn.
- Voorkom bij iedere bewerking kiembreuk.
- Hanteer een verminderde N-gift.
- Selecteer alleen vroeg in het seizoen en alleen onder droge omstandigheden. Blijf daarna uit de percelen waar niets te selecteren valt.
- Leg speciale spuitpaden aan. Voorkom op die manier "watergangen", waardoor de bacterie zich over grotere afstanden kan verspreiden.
- Ga niet loofklappen. Spuit het loof dood, en ga bij Phoma-gevoelige rassen pas na 5 tot 7 dagen klappen.
- Rooi indien mogelijk in twee fasen, waarbij de knollen voldoende tijd krijgen om te drogen en af te harden.
- Rooi zonder beschadiging en bij voorkeur direct in kisten
- Overwogen moet worden onderzoek te laten doen naar geheel nieuwe rooisystemen, waarbij de versmering sterk kan worden gereduceerd.
- Zorg ervoor dat het product direct na het inschuren gedroogd wordt en ook droog blijft. Condensvorming moet te allen tijde voorkomen worden..
- Ga bij het sorteren eerst lezen en dan sorteren
- Bedrijfshygiëne is in alle stadia essentieel!

Uiteraard is dit slechts een opsomming van de meest gewenste maatregelen. Veel zal afhangen van de zorgvuldigheid waarmee de teler met de teelt omgaat, en of hij (of zij) zich bewust is van het risico dat bij elke stap van de teeltcyclus wordt gelopen.

Belangrijk op dit punt is wat de reacties van de telers zelf waren op de resultaten van het onderzoek. Enerzijds werd aangegeven dat de resultaten een bevestiging waren van hetgeen men al wist of vermoedde, en heeft het bij telers (heel belangrijk!) een groter bewustzijn van de hoofdtrisicofactoren in alle stappen van de teelt opgeleverd. Anderzijds was een aantal resultaten verrassend en bestaat behoefte aan vervolgonderzoek om nog beter grip te krijgen op het Erwinia probleem.

Het volledig uitbannen van Erwinia zal een illusie blijken, maar het onderzoeksteam van het Deltaplan Erwinia is er van overtuigd dat een aanzienlijke vermindering van de problemen mogelijk is.