



Deltaplan Erwinia
Deel C
Pootaardappelen

**Veldproef Effect van minerale olie
op loofbesmettingen met Erwinia**

Henk Velvis

Inhoud

Inleiding	3
Uitvoering	3
Aanleg proefveld.....	3
Behandeling met minerale olie.....	4
Monstername blad.....	4
Verwerking bladmonsters.....	4
Monstername insectenbakjes.....	5
Knolmonsters.....	5
Detectie van Erwinia.....	5
Resultaten en conclusies	5
Analyse-uitkomsten van bladmonsters, insecten bakjes en dochterknollen.....	5
Bijlage. Proefveldschema veldproef Minerale Olie (FO-MO-13), 't Kompas, Valthermond.	7

Inleiding

Uit het onderzoek dat in het kader van het Deltaplan Erwinia gedaan is naar de verspreiding van Erwinia, is geconcludeerd dat Erwinia vanuit zieke planten via de lucht verspreid kan worden naar schone planten (zie Eindrapport Deltaplan Erwinia, 2012). Dat gebeurt mogelijk door insecten. Tijdens de telervergaderingen van november 2012, waarin de resultaten van het Deltaplan werden gepresenteerd, kwam regelmatig de vraag naar voren wat het effect is van bespuitingen met minerale olie op deze verspreiding van Erwinia. Enerzijds worden hierdoor de mogelijk als vector dienende insecten gedood, maar anderzijds wordt hierdoor ook het loof natter, wat weer gunstig is voor de verspreiding van Erwinia. Besloten is om in 2013 een veldproef uit te voeren, waarin dit nader onderzocht wordt.

De globale opzet van de veldproef is om in veldjes met miniknollen een besmettingshaard van met Erwinia besmette planten aan te brengen, van waaruit er verspreiding via de lucht kan plaatsvinden. Een deel van de veldjes wordt behandeld met minerale olie, een ander deel niet. Gedurende het seizoen wordt regelmatig de bladbesmetting van de planten uit de miniknollen bepaald.

Uitvoering

Aanleg proefveld. Het proefveld werd aangelegd op proefboerderij 't Kompas (PPO) te Valthermond, met een twaalftal sub-veldjes van 6 meter lang en 12 rijen breed. De sub-veldjes lagen in twee banen van 6 veldjes, met in de lengterichting steeds een ruimte van twee meter tussen de veldjes. Tussen de banen lag een buffer van 4 rijen, waarvan de middelste 2 beplant waren met aardappelen van het proefbedrijf. Een schema van het proefveld is opgenomen als bijlage bij dit verslag.

In de middelste 2 rijen van elk sub- veldje werden met Erwinia besmette knollen gepoot (cv Kondor). De knollen waren vlak voor het poten vacuüm geïnfiltreerd met een mix van twee Erwinia soorten: de streptomycine resistente stam *Dickeya* sp. 2222 en een virulente stam van *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*, vPcc 1955. Laatstgenoemde soort wordt tegenwoordig ingedeeld bij *Pectobacterium wasabiae*. Van enkele Kondor knollen werd na behandeling de schilbesmetting bepaald. Van 2 knollen werden schilmonster gesneden, 5 stukjes van ca. 5 cm². Deze werden gecrusht in 5 ml water. Na uitzakken werd een verdunningsreeks gemaakt in PBS buffer t/m een verdunning van 10⁻⁶. Van elke verdunning werd 160 µl toegevoegd aan 1440 µl PEB in een epje van 2 ml. De epjes werden vervolgens gedurende 3 dg geïncubeerd bij 20°C ("verrijking"). Samenstelling

Proefveld met tafeltjes voor insectenvangbakjes



van het PEB verrijkingsmedium (Pectate Enrichment Broth): 0,3 g MgSO₄·7H₂O; 1,0 g (NH₄)₂SO₄; 1,31 g K₂HPO₄·3 H₂O; 1,5 g Polygalacturonic acid, sodium salt (Sigma); en 1 l gedemineraliseerd water; pH 7,2. In de verrijkte monsters werd m.b.v. Taqman PCR de besmetting bepaald, en aan de hand van de verdunningsreeks omgerekend naar de dichtheid van de Erwinia's in het schilextract. Voor Ds 2222 was dit 3 x 10⁵ en voor vPcc 1955 3 x 10⁶ bacteriën per ml schilextract.

In de overige tien rijen van de veldjes werden miniknollen gepoot van het ras Voyager. Vooraf werd gecontroleerd of er in deze partij miniknollen besmetting met Erwinia aanwezig was. Dat gebeurde m.b.v. de vacuümverrijkingmethode. Twintig pools van 10 miniknollen werden in plastic zakken met 50 ml water vacuümgetrokken en gedurende 7 dagen geïncubeerd bij 25 °C. In het extract werd vervolgens met Taqman PCR de besmetting met Erwinia bepaald. Er werd geen besmetting aangetoond.

In de veldjes die niet behandeld werden met minerale olie, werden insectenvangbakjes geplaatst op speciaal daarvoor vervaardigde tafeltjes. Als vangbakjes werden plastic cocktailbakjes gebruikt, waarvan de bodem geel geleverd was.

Behandeling met minerale olie. Na opkomst van het gewas werd het gewas van de betreffende veldjes t/m de laatste oogst op 3 september wekelijks bespoten met een dosering van 7,5 l/ha minerale olie + pyrethroïde. Na regen of dauw was duidelijk te zien dat het blad bij de veldjes met minerale olie behandeling langer nat bleef dan in de onbehandelde veldjes (zie foto's hieronder).

Verskil in vochtigheid van het loof na een regenperiode. Links in een veldje met minerale olie behandeling, rechts in een onbehandeld veldje.



Monstername blad. Gedurende het groeiseizoen werden 5 keer bladmonsters genomen, steeds twee per sub-veldje. Waarvan één (mengmonster) van de rijen 2 en 3 en de ander (eveneens een mengmonster) van de rijen 10 en 11. Beide monsters dus op een afstand van 3 en 4 rijen afstand vanaf de besmette rijen, ter weerszijden hiervan (zie proefveldschema).

De werkvolgorde was bij elk veldje steeds van buiten naar binnen, om het risico van het zelf overbrengen van besmetting te voorkomen. In de lengte van een rijen werden bladmonsters geknipt van ongeveer tien planten per rij. Per plant werden ca. 3 blaadjes van een samengesteld blad geknipt, zowel van de bovenste bladeren als van die aan de zijkant van de planten. Bladeren die contact hadden met de grond werden vermeden.

Verwerking bladmonsters. De bladmonsters werden eerst gewogen. Na toevoegen van 100 ml leidingwater werden de monsters gedurende 1 u op een schudder geplaatst. Vervolgens werden de blaadjes nog een keer intensief 'uitgeknepen' in het water. Met het extract werd als volgt een verdunningsreeks gemaakt:

- 11,1 ml van het extract werd overgebracht in centrifugebuisje van 12 ml (met schroefdop).
- Dit werd nog twee keer 1 : 10 als volgt verdund (eveneens in 12 ml buisjes): van het eerste extract werd 1,1 ml toegevoegd aan 9,9 ml ¼ Ringers (Oxoid, BR0052G); na homogeniseren werd daarvan weer 1 ml toegevoegd aan 9 ml ¼ Ringers.
- Alle buisjes werden vervolgens gecentrifugeerd bij 4000xg.

- Na voorzichtig afgieten van het supernatant werden de pellets aangevuld met 10 ml PEB verrijkmingsmedium.
- De buisjes werden afgesloten en gedurende 3 dagen geïncubeerd bij 25°C. Daarna werden ze ingevroren bij -20°C, om later te worden getoetst op Erwinia.

In Tabel 1 zijn de gewichten van de bladmonsters vermeld.

Tabel 1. Gewichten bladmonsters.

Monsterdatum	Gewicht	Stdv
26-jun	76,5	11,8
10-jul	119,1	15,3
24-jul	84,0	9,6
31-jul	150,5	31,0
12-aug	168,6	27,3

Monsternamen insectenbakjes. Vanaf de opkomst van het gewas werden de opvangbakjes wekelijks bemonsterd. De geleegde bakjes werden steeds weer gevuld met ¼ Ringers, en bij warm weer tussentijds met leidingwater aangevuld ter compensatie van de verdamping.

Bij de bemonstering in het veld werd de inhoud van de insectenbakjes overgebracht in monsterflessen en meegenomen naar het lab. Daar werden insecten en andere deeltjes die in de bakjes aanwezig waren opgevangen op een stukje insectengaas van 8 bij 8 cm. Het gaasje werd vervolgens opgerold en in een 12 ml buisje met schroefdop gedaan. Het buisje werd aangevuld met PEB verrijkmingsmedium en daarna afgesloten en gedurende 3 dagen geïncubeerd bij 25°C.

Knolmonsters. Op 3 september werden knollen geoogst uit dezelfde rijen als waarvan de bladmonsters waren genomen. Van zowel de rijen 2 en 3 als de rijen 10 en 11 werden 24 planten opgestoken, en hiervan een mengmonster van 100 knollen verzameld. De knollen werden in pools van 10 knollen verwerkt met de vacuümverrijkmingsmethode (zie boven).

Detectie van Erwinia. In alle verrijkte extracten van de blad-, insecten- en knolmonsters werd m.b.v. Taqman PCR de besmetting met Erwinia bepaald.

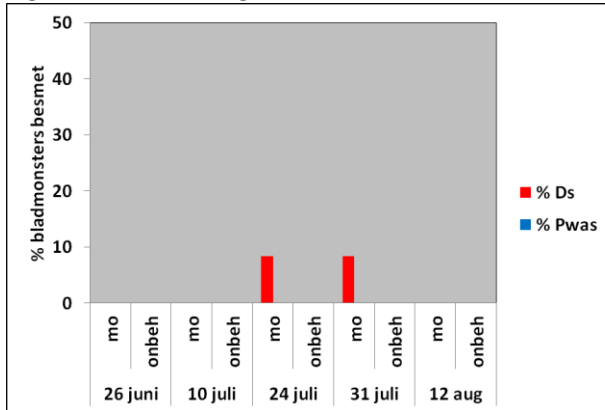
Resultaten en conclusies

Analyse-uitkomsten van bladmonsters, insecten bakjes en dochterknollen.

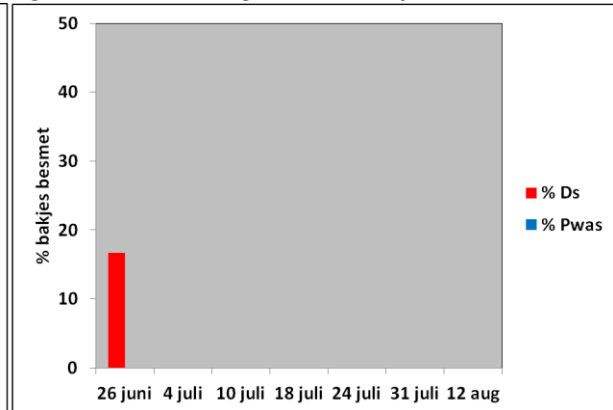
De uitkomsten van de bladmonsters en de insectenbakjes zijn weergegeven in de figuren 1 en 2. In alle 120 bladmonsters die gedurende het seizoen genomen zijn is slechts twee keer een besmetting met *Dickeya* aangetoond. Deze besmettingen werden gevonden in veldjes die behandeld waren met minerale olie, bij de 3^e en 4^e bemonstering. Ook in de insectenbakjes werd één keer een besmetting met *Dickeya* gevonden. Deze bakjes waren opgesteld in de onbehandelde veldjes. Dit duidt erop dat er wel enige verspreiding via de lucht heeft plaatsgevonden. Maar het aantal besmettingen is te laag om hier conclusies aan te verbinden.

Ook in de knolmonsters is bij één onbehandeld veldje besmetting met *Dickeya* gevonden. In vergelijkbare proeven in 2011 en 2012 (zonder behandelingen met minerale olie), waarin de verspreiding via de lucht werd onderzocht, werd veel vaker Erwinia in de bladmonsters gevonden. Toen betrof het m.n. besmettingen met *P. wasabiae* (vPcc). (Zie Eindrapport Deltaplan Erwinia, 2012) Helaas kan op basis van deze veldproef in 2013 dus nog geen uitspraak worden gedaan over het effect van behandeling met minerale olie op de verspreiding van Erwinia.

Figuur 1. Besmetting bladmonsters.



Figuur 2. Besmetting insectenbakjes.



(mo = veldjes behandeld met minerale olie)

Bijlage. Proefveldschema veldproef Minerale Olie (FO-MO-13), 't Kompas, Valthermond.

12 veldjes van 12 rijen; middelste 2 rijen met Erwinia besmette poters (ras: Kondor); overige rijen miniknollen (ras: Voyager)
 Pootafstand: 20 cm; per rij van 6 meter 30 planten.

		rijen																									
m	pl	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3 m																											
6 m	30 planten							vPec1955 en Ds 2222								V 142					vPec1955 en Ds 2222						
2 m																											
6 m	30 planten							vPec1955 en Ds 2222								V 141					vPec1955 en Ds 2222						
2 m																											
6 m	30 planten							vPec1955 en Ds 2222								V 140					vPec1955 en Ds 2222						
2 m																											
6 m	30 planten							vPec1955 en Ds 2222								V 139					vPec1955 en Ds 2222						
2 m																											
6 m	30 planten							vPec1955 en Ds 2222								V 138					vPec1955 en Ds 2222						
2 m																											
6 m	30 planten							vPec1955 en Ds 2222								V 137					vPec1955 en Ds 2222						
3 m																											

- onbehandeld
- minerale olie
- met Erwinia besmette rijen (2 types: Pwas (vPcc) 1955 en Dickeya solani 2222)