

***Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*,**  
**de veroorzaker van ringrot in de aardappel:**  
**een literatuurstudie**

**J.M. van der Wolf**

*Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (Wageningen UR), Postbus 9060, 6700  
GW Wageningen, tel. 0317-476024, fax 0317-410113,  
E-mail [J.M.vanderWolf@ipo.wag-ur.nl](mailto:J.M.vanderWolf@ipo.wag-ur.nl)*

## Inhoud

	Voorwoord	4
	Samenvatting	6
1.	Introductie	9
2.	<i>Symptomen</i>	10
2.1.	Symptomen aan de knol	10
2.2.	Symptomen aan de bovengrondse delen	11
2.3.	Factoren van invloed op de ziekte-ontwikkeling	11
2.3.1.	Inoculatiemethode	11
2.3.2.	Buitemperatuur	11
2.3.3.	Vochtgehalte in de grond	12
2.3.4.	Grondtemperatuur	12
2.3.5.	Licht input	12
2.3.6.	Grondsamenstelling	12
2.3.7.	Variabiliteit Cms-stam	13
2.3.8.	Inoculumconcentratie	14
2.3.9.	Cultivar	14
2.3.10.	Microbiële populatie	15
3.	Economische schade	15
4.	Virulentiefactoren	17
5.	Verspreiding	18
5.1.	Pootgoed	18
5.2.	In de grond	19
5.3.	Insecten en nematoden	20
6.	Overleving	21
6.1.	Materialen	21
6.2.	Grond	21
6.3.	Tijdens bewaring	23
6.4.	Aardappelopslag	24
6.5.	Onkruiden en rotatiegewassen	24
7.	Verspreiding in de aardappelplant	26
8.	Bestrijding	27
8.1.	Introductie	27
8.2.	Biologische bestrijding	28
8.3.	Chemische bestrijding	28
8.4.	Fysische bestrijding	30
8.5.	Resistentie	31
8.6.	Schoon uitgangsmateriaal	31
9	Identificatie	33

10.	Detectie	35
10.1.	Introductie	35
10.2.	Bemonstering	35
10.2.1.	Individuele knollen vs. mengmonsters	35
10.2.2.	Stengel vs. knol	35
10.2.3.	Aantal monsters	36
10.2.4.	Bemonsteringsstrategie	36
10.2.5.	Extractiemethoden	37
10.3.	Visuele inspectie	37
10.4.	Uitplaatmethoden	38
10.5.	UV-licht	39
10.6.	Gram-kleuring	39
10.7.	Serologische methoden	40
10.7.1.	Antistoffen	40
10.7.2.	Agglutinatie	41
10.7.3.	Immunofluorescentie cel-kleuring	42
10.7.4.	ELISA	42
10.7.5.	Evaluatie van IF en ELISA	43
10.7.6.	Immunofluorescentie-koloniekleuring	44
10.7.7.	Immuno-isolatie	45
10.8.	Bioassays	46
10.9	Moleculair-biologische detectiemethoden	47
10.9.1.	Primers en probes	47
10.9.2.	DNA-hybridisatie	48
10.9.3.	Polymerase kettingreactie	48
10.9.4.	Fluorescence in situ hybridisatie	50
11.	Toepassing van detectie- en beheersingsmaatregelen binnen de EU en in Canada	52
11.1	Binnen de EU	52
11.2	In Canada	54
12.	Conclusies voor de praktijk	56
13.	Inventarisatie onderzoeksvragen	57
	Literatuur	59

## Voorwoord

Na alle perikelen rond de introductie van de bacterieziekte bruinrot in 1994, werd in het voorjaar van 1999 voor het eerst in Nederland, op een bedrijf vlak bij de Duitse grens, de quarantaine ziekte ringrot vastgesteld. Onmiddellijk rees de vraag, wat de introductie van deze nieuwe bacterieziekte voor Nederland, als pootgoed-exporterende natie, kan betekenen.

Bekend is dat veel landen, zowel binnen als buiten Europa, hun grenzen op slot houden voor de import van pootgoed vanuit landen met een ringrot verleden. Men acht het risico op introductie van de ziekte te groot. De ziekte komt vaak in latente vorm voor, en bij het steekproefsgewijs bemonsteren van pootgoed kan nooit een volledige garantie van ringrot-vrij gegeven worden. Hoewel intensieve eradicatieprogramma's de directe schade als gevolg van ringrot sterk hebben gereduceerd, is geen enkel land waar ringrot zich deze eeuw gevestigd heeft, echt helemaal vrijgekomen van de ziekte. Vestiging van de ziekte in Nederland kan derhalve zeer schadelijk zijn.

Deze literatuurstudie moet gezien worden in het licht van de recente gebeurtenissen. In opdracht van het Hoofdproductschap Akkerbouw zijn de belangrijkste feiten uit de wetenschappelijke literatuur over ringrot samengevat om een beeld te krijgen over de aard van de ziekteverwekker, de (potentiële) ernst van de schade en de verschillende mogelijkheden de ziekte te beheersen. Daarbij is uitvoerig aandacht besteed aan de verschillende methoden die tegenwoordig beschikbaar zijn voor detectie van de ziekteverwekker, omdat controle van pootgoed nog altijd de meest effectieve beheersmaatregel is.

Voor gegevens over de overleving en verspreiding in het aardappelecosysteem, moest vaak teruggerepen worden op literatuur die tussen 1935 en 1955 gepubliceerd was, aangezien de laatste 40 jaar hiernaar nauwelijks meer onderzoek is gedaan.

De auteur dankt het Hoofdproductschap Akkerbouw in Den Haag voor de subsidie waardoor deze studie mogelijk werd gemaakt. Ook werd een financiële ondersteuning ontvangen van de Europese Commissie (FAIR project PL98-4366). De Europese Commissie draagt overigens geen enkele verantwoordelijkheid voor de inhoud van de studie en deze studie geeft op geen enkele wijze de inzichten van de Commissie weer.

Bijzondere dank is verder verschuldigd aan ringrot specialist Dr. S.H. de Boer (Charlottetown) voor de vele informatie die hij mij tijdens een werkbezoek aan Canada geboden heeft. Verder werd niet-gepubliceerde informatie in deze studie verwerkt van Dr. Mansfeld-Giese (Slagelse, Denemarken) en Dr. D.E. Stead (York, Engeland).

# ***Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, de veroorzaker van ringrot in de aardappel: een literatuurstudie**

## **Samenvatting**

*De ziekte.* *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) is een vaatpathogeen dat de ziekte ringrot in de aardappel veroorzaakt, een ziekte gekenmerkt door verwelking van de plant en rot van de knollen. De symptomen worden in het veld vaak aan het einde van het groeiseizoen pas zichtbaar. Symptoomvorming wordt in de eerste plaats sterk beïnvloed door de aardappelcultivar. Omgevingsfactoren die de ontwikkeling van de ziekte gunstig beïnvloeden zijn: een relatief hoge lucht- en bodemtemperatuur, een hoog vochtgehalte van de grond en een lage licht input. De samenstelling van de grond en de microbiële populatie in de plant (endofyten, vaatpathogenen) zijn ook van invloed op de ziekte-ontwikkeling.

De ziekte komt voor in 31 landen verspreid over vijf continenten, maar wordt voornamelijk gevonden in koele klimaatstreken op het noordelijk halfrond. Cms kan op 3 manieren schade veroorzaken; (1) door directe opbrengstverliezen tijdens de teelt en gedurende de opslag, (2) door afkeuring van partijen als gevolg van slechte kwaliteit of vanwege vastgestelde toleranties, (3) door verlies van exportmarkten of door gebrek aan moeilijkheden nieuwe markten te openen. Vooral in Noord-Amerika is in deze eeuw de schade veroorzaakt door Cms zeer groot geweest. Binnen de EU is Cms een quarantaine-ziekte, die incidenteel problemen veroorzaakt in Duitsland en de Scandinavische landen. Nederland is dankzij een nauwgezet quarantaine-beleid tot 1999 gevrijwaard geweest van de ziekte. In 1999 werd op één bedrijf, dichtbij de Duitse grens, een besmet bedrijf gevonden.

*Verspreiding en overleving.* Cms kan over grote afstanden worden verspreid via besmet pootgoed. Cms kan ook worden verspreid door besmette gereedschappen en machines in gemechaniseerde teelten. Er zijn geen aanwijzingen dat Cms tijdens de teelt makkelijk van plant naar plant kan worden overgebracht. Slechts wanneer wortelstelsels van planten direct met elkaar contact maken, lijkt een overdracht in een lage frequentie te kunnen voorkomen. Sommige insecten, zoals de coloradokever en de groene perzikluis zijn in staat om de bacterie over te dragen van een zieke naar gezonde plant, maar de betekenis in de epidemiologie van Cms lijkt gering. In de plant wordt Cms vanuit besmette knollen via houtvaten in door de vaatbundels getransporteerd naar de stengel en via stolonen naar nieuw gevormde dochterknollen. Cms kan in

zeer hoge dichtheden ( $> 10^{10}$  cellen per g) in het vaatweefsel voorkomen, maar ook in symptoomloos materiaal in zeer lage dichtheden.

Op droge oppervlakten van gereedschappen en opslagruimtes kan Cms lang persisteren ( $> 2$  jaar). In de grond lijkt Cms weinig persistent; onder constant koude en droge condities, die optimaal zijn voor overleving, kan de bacterie slechts negen maanden overleven. Over overleving in water is niets bekend. In de aardappelknol kan de bacterie zowel tijdens de opslag als in het veld (aardappelopslag) makkelijk overleven.

Naast de aardappel, zijn de tomaat en diverse *Solanum* soorten, waaronder *S. melongena* (aubergine), geïdentificeerd als gastheren van Cms. Cms lijkt ook symptoomloos aanwezig te kunnen zijn in bietenzaad. In de praktijk geeft Cms alleen schade in de aardappel.

*Virulentie-eigenschappen.* In het epidemiologie spelen de extracellulaire polysacchariden (EPS) die door Cms geproduceerd worden een belangrijke rol. Waarschijnlijk vormen ze bij langdurige bewaring op oppervlakten van dragermaterialen het reservevoedsel en heeft EPS een beschermende rol tijdens bewaring. Mogelijk spelen ze in het ziekteproces ook een rol bij adsorptie van Cms aan de celwand van waardplanten. Verder zijn er verschillende enzymen, zoals het zetmeel-splitsende enzym amylase en het cellulose-splitsende enzym cellulase, geïdentificeerd als virulentiefactoren.

*Bestrijding.* Voor bestrijding van Cms in plantmateriaal zijn geen effectieve methoden voorhanden. Met antagonistische bacteriën wordt een slechts een gedeeltelijke reductie van het aantal ringrot-zieke planten bereikt. Er zijn wel verschillende chemische en fysische methoden beschikbaar waarmee effectief de bacterie op besmet gereedschap en oppervlakten van bewaarfaciliteiten geëlimineerd kan worden. Er zijn wel tolerante aardappelcultivars bekend maar geen volledig-resistente cultivars. Met het gebruik van de tolerante cultivars dient men voorzichtig te zijn, omdat hiermee de bacterie ongemerkt verspreid kan worden.

*Detectie en identificatie.* De ziekte kan goed beheerst worden door gebruik te maken van schoon pootgoed. Visuele veldinspecties zijn onvoldoende, omdat Cms vaak latent in symptoomloos materiaal aanwezig is. Het gebruik van gevalideerde detectie- en identificatiemethoden is voor een betrouwbare keuring van pootgoed essentieel.

Detectie van Cms, een Gram-positieve bacterie, wordt bemoeilijkt door de trage groei op agar media, waardoor isolatie direct uit geïnfecteerd plantenweefsel vaak niet mogelijk is. Voor een eerste screening van plantenmateriaal op aanwezigheid van Cms wordt derhalve vaak gebruik

gemaakt van serologische technieken, zoals agglutinatie, ELISA en immunofluorescentie cel-kleuring (IF) waarvoor polyklonale- en monoklonale antistoffen beschikbaar zijn. Geen enkele van de ontwikkelde antistoffen zijn helemaal vrij van kruisreacties.. Vooral IF en ELISA worden veel gebruikt in keuringsprogramma's, waarbij IF (iets) beter scoort op gevoeligheid en specificiteit en ELISA beter geschikt is voor het verwerken van grote aantallen monsters. Voor ecologisch onderzoek aan Cms zijn ook een immunofluorescentie kolonie-kleuring (IFC) en een immunoïsolatie ontwikkeld Monsters die in de screeningsmethoden positief scoren, worden of direct beschouwd als besmet of worden nader geanalyseerd door plantenextracten in te spuiten in indicatorplanten als aubergine of tomaat. Vaak leidt dit tot selectieve ophoping van de bacterie. Symptomen op deze indicatorplanten zijn niet altijd typisch en worden soms gemaskeerd worden door aanwezigheid van andere microorganismen in de extracten.

De laatste 10 jaar zijn een scala aan moleculair-biologische detectiemethoden beschikbaar gekomen, gebaseerd op specifieke detectie van nucleïezuren (DNA/RNA), d.m.v. hybridisatiereacties. PCR geniet van deze methodes de meeste bekendheid. Een aantal van de ontwikkelde PCR-reacties hebben hoge specificiteit en geven onder optimale omstandigheden een zeer hoge gevoeligheid. Efficiënte en robuuste DNA-extractiemethoden en betrouwbare controles zijn nodig voor betrouwbaar gebruik van PCR in de praktijk. Recentelijk is ook een methode ontwikkeld waarbij de Cms cellen gefixeerd aan microscoopglasjes gekleurd worden met fluorescente oligonucleotiden (FISH), die specifiek RNA-moleculen aantonen. Deze methode kan in principe gecombineerd worden met de IF-kleuring, waardoor een betrouwbaardere uitslag verkregen kan worden.

Cms kan als reincultuur betrouwbaar geïdentificeerd worden met een combinatie van serologische, biochemische en moleculair-biologische methoden, hoewel in de praktijk de pathogeniteitstoets nog vaak een doorslaggevende rol speelt.

## 1. Introductie

Ringrot wordt veroorzaakt door de plantpathogene bacterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann & Kotthoff, 1914) Davis et al., 1984 (Cms). De ziekte ringrot werd voor het eerst gemeld in Duitsland door Appel (1906). Spieckermann (1913) introduceerde de naam "Bacterienringfäule" voor de ziekte, terwijl de ziekteverwekker voor het eerst in 1918 werd beschreven (Spieckerman & Kotthoff, 1918). Het pathogeen heeft de laatste 80 jaar de volgende namen gehad: *Corynebacterium sepedonicum*, *Bacterium sepedonicum*, *Aplanobacter sepedonicum*, *Phytomonas sepedonica*, *Mycobacterium sepedonicum* en *Pseudobacter sepedonicum*. *Sepedon* is het Griekse woord voor rot en de naam *sepedonicus* betekent dan ook letterlijk: veroorzaker van rot.

Tabel 1. *Clavibacter* soorten en geassocieerde ziekten

Naam bacterie	Waardplant	Naam ziekte <sup>#</sup>	Symptomen	Referentie
<i>Michiganensis</i> subgroup				
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	alfalfa	bacterieverwelkingsziekte	verwelking en dwerggroei	Vidivar (1982)
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	tomaat, paprika	bacteriekanker	verwelking en vruchtvlekken	Vidivar (1982)
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	maïs	'Goss's wilt'	verwelking en bladnecrose	Vidivar (1982)
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	aardappel	ringrot	verwelking en knolrot	Vidivar (1982)
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i>	tarwe	'Leaf spot'	bladvlekken	
Gumming pathogens of grasses				
<i>Clavibacter iranicus</i>	tarwe		bladvlekken, geel bacterieslijm van bladeren en aar	Vidivar (1982)
<i>Clavibacter rathayi</i>	grassen		geel bacterieslijm van bladeren en aar	Vidivar (1982)
<i>Clavibacter toxicus</i>	raaigras	'Yellow slime disease'	geel bacterieslijm van aar,	Riley et al. (1988)
<i>Clavibacter tritici</i>	granen en grassen	'Tundu disease'	geel bacterieslijm van bladeren en aar	Vidivar (1982)
Xylem limited vascular pathogens				
<i>Clavibacter xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i>	Bermuda gras		dwerggroei	Davis et al. (1984)
<i>Clavibacter xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	suikerriet	'Ratoon stunt'	dwerggroei	Davis et al. (1984)

<sup>#</sup> Voor verschillende ziekten werd geen Nederlandse naam gevonden

Cms is Gram-positief en lijkt morfologisch en biochemisch sterk op andere Gram-positieve *Clavibacter michiganensis* subspecies die plantenziekten kunnen veroorzaken (tabel 1). Cms heeft een celwand die hoofdzakelijk peptidoglycan bevat, gebaseerd op diaminobutyric acid. Cms heeft een hoog G/C gehalte van c. 70%. De bacterie is pleomorfe, licht knotsvormig en ongeveer 0.5x1.0 µm groot. Cms wordt vaak waargenomen in L- of V-formaties als gevolg van een 'bending division'. Onder sommige condities worden coccoïde vormen gevonden, maar bij het kweken van deze vorming vindt reversie tot de korte staafjes plaats (Slack, 1986). De Boer vond deze coccoïde vormen net name in verse isolaten uit aubergines (pers. com.). De bacterie is strikt



aëroob, maar groeit ook onder aërobe condities slechts langzaam; kolonies worden pas na 5 dagen zichtbaar en blijven klein. De kolonies hebben een crème of lichtgele kleur, zijn glad en vaak mucoïde. De bacterie vormt geen sporen (ruststructuren) en kan geen hoge temperaturen doorstaan.

## **2. Symptomen**

### **2.1. Symptomen aan de knol**

De eerste symptomen zijn een zekere mate van glazigheid en doorzichtigheid van het weefsel rond de vaatbundelring, zonder dat er nog een verweking van het weefsel optreedt. De vasculaire bundel aan het naveleinde kan donkerder gekleurd zijn dan normaal. Daarna kan een geelverkleuring van het vaatbundelweefsel optreden. Wanneer bij een gevorderde infectie de knollen gesneden worden en er bij het snijden druk op het knolweefsel wordt uitgeoefend, verschijnen op de vaatbundel kleine pareltjes, die uit een melkwit bacterieslijm bestaan. Wordt de druk op de knol opgeheven, dan zakt een deel van het slijm weer terug in de vaatring. Nog later in komt er een zacht kaasachtig materiaal uit de vaten. Het geelverkleurde weefsel kan gedeeltelijk of geheel bruin worden, waarbij het vaatbundelweefsel desintegreert, donker kleurt en uiteindelijk verdwijnt (Fig. 1A). In dat stadium zijn op de schil soms scheuren te zien die roodbruin zijn aan de randen (Fig. 1B). Secundaire infecties met andere bacteriën en schimmels kunnen de typische ringrot symptomen maskeren.

Fig. 1. Met ringrot aangetaste knollen



A



B

### **2.2. Symptomen aan de bovengrondse delen**

De bovengrondse delen laten vaak eerst een vergeling en verwelking zien van de onderste bladeren. Aangetaste planten vertonen verbleking en vergeling van het bladgroen tussen de nerven en aan de bladranden. Later verdrogen en verdorren de bladeren. Opvallend is het

opwaarts rollen van de bladranden om de middennerf van vooral het laagste blad. Afhankelijk van het ras kan bovendien als eerste symptomen het kort blijven van één of meer stengels voorkomen (dwerggroei). Bij het doorsnijden van de stengelbasis van sterk aangetaste planten blijkt deze bij knippen een slijmerige massa af te scheiden. Genoemde symptomen verschijnen bijna nooit tegelijk en kunnen ook door andere ziekteverwekkers worden veroorzaakt, zodat verwarring zeer goed mogelijk is.

### **2.3. Factoren van invloed op de ziekte-ontwikkeling**

*2.3.1. Inoculatiemethoden.* Veel onderzoek naar de ziekte-ontwikkeling is uitgevoerd met kunstmatig besmette knollen. Er zijn verschillende methoden beproefd om symptomen op te wekken, die effectief bleken, zolang de bacterie maar in het vaatsysteem van de plant werd gebracht. Dykstra (1942) vond relatief vroeg in het groeiseizoen symptomen wanneer spruiten met de bacterie werden geïnjecteerd, waarbij vervolgens de overige spruiten werden verwijderd. Ook vacuuminfiltratie van gesneden knollen (DeBoer & Hall, 1996) en het injiceren van de vaatbundel van intacte knollen (Mansfeld-Giese, 1997) of van de ogen (Starr, 1947b) geven goede resultaten. Onderdempelen van gesneden knollen in een suspensie van Cms, zonder toepassing van vacuüm, is pas na een incubatie van 60 min net zo effectief als inoculatie van ogen (Starr, 1947b).

*2.3.2. Buitentemperatuur.* Terwijl lage temperaturen gunstig zijn voor de overleving van Cms, zijn relatief hoge luchttemperaturen bevorderlijk voor het ontstaan van ziektesymptomen. Eddins (1939) vond in kasexperimenten bij 22 – 35 °C een snellere ontwikkeling van symptomen dan bij 16 –18 °C en 4 °C. Ook experimenten in klimaatkasten wezen uit dat een temperatuurregime van 24 °C overdag en 's nachts, sneller verwelking gaf dan een regime van 24 °C overdag en 5 °C 's nachts (Bishop & Slack, 1982). Er werd na 45 dagen echter geen verschil in celdichtheden in de stengels gevonden. Veldproeven in de V.S. gaven aanwijzingen dat m.n. een hoge temperatuur in augustus belangrijk is voor een snelle ontwikkeling van symptomen (geciteerd in Manzer et al. (1987), niet gepubliceerde gegevens). Ringrotsymptomen verschijnen relatief laat in het groeiseizoen. In Nederland, waar pootaardappelen vroeg geoogst worden i.v.m. risico's van virusoverdracht zal in het pootgoed de ziekte niet makkelijk waarneembaar zijn.

*2.3.3. Vochtgehalte in de grond.* Een vijfvoudige beregening van een perceel aardappelen gaf in Wyoming (VS) een snellere symptoomvorming dan een niet-beregend perceel. Het percentage

planten met ringrot symptomen aan het einde van het groeiseizoen was in één veldexperiment wel (2 tot 3 maal) hoger, maar in een andere veldexperiment niet hoger (Dykstra, 1941). Mogelijk dat bij irrigatie Cms snel, met het vocht door het vaatsysteem van de plant getransporteerd wordt.

*2.3.4. Grondtemperatuur.* Ziekte-ontwikkeling wordt bevorderd door een relatief hoge bodemtemperatuur. Geïnoculeerde knollen, geplant in gronden die op een constante temperatuur gehouden werden van 16, 19, 21, 25, 28, 31 en 34 °C, gaven het snelst bij 25 °C symptomen te zien (Logsdon, 1967). Sherf (1944) vond echter de snelste symptoomontwikkeling bij een grondtemperatuur van 18 – 22 °C; bij 26 en 30 °C werd juist een vertraagde ziekteontwikkeling geconstateerd. Mogelijk is er enige variatie in de natuurlijke populatie Cms en worden bacteriecellen die het best aangepast zijn aan een bepaalde temperatuur uitgeselecteerd.

Bij vroeg planten werden veel later in het groeiseizoen ringrotsymptomen waargenomen dan bij laat planten. Gedeeltelijk kan dit verklaard worden uit de tijd die nodig is voor kieming van de knollen bij een lage (bodem)temperatuur (Dykstra, 1942).

*2.3.5. Licht input.* Bij een hoge totale lichtinput van 103 W.cm<sup>2</sup>.uur in een klimaatkast verliep de symptoomontwikkeling minder dan bij lagere lichtinput van 45 en 74 W.cm<sup>2</sup>.uur (Nelson & Kozub, 1983). Wellicht houdt dit verband met het feit dat de symptoomontwikkeling pas laat in het seizoen op gang komt

*2.3.6. Grondsamenstelling.* Abiotische factoren in de grond, zoals de mineralensamenstelling, hebben een invloed op de ziekte-ontwikkeling, maar hoe deze interacties verlopen is nog onduidelijk. Hoge concentraties fosfor en met name stikstof lijken de resistentie van de aardappelplant negatief te beïnvloeden (Rojalin, 1935; Lachance & Genereux, 1963). Er is geen onderzoek gedaan naar de invloed van biotische factoren op de symptoomontwikkeling. Het is echter bekend dat de grondsamenstelling direct de samenstelling van de endofytenpopulatie in de aardappel beïnvloed (Sturz et al., 1997). De endofytenpopulatie met name die in de houtvaten, kan een directe invloed hebben op het ziekteverloop (zie 8.2.).

*2.3.7. Variabiliteit Cms stam.* Dykstra (1942) heeft de virulentie van individuele stammen afkomstig uit verschillende delen van de VS bepaald. Daarnaast werden rotte knollen uit verschillende delen van de VS verzameld en gebruikt voor inoculatie van Cms-vrije knollen van een niet-nader gespecificeerde cultivar. Er werden geen verschillen gevonden in virulentie tussen de verschillende stammen of knollen van verschillende herkomst. Bishop & Slack (1987) vonden

echter wel verschillen en noteerden zelfs een interactie tussen Cms stam en cultivar. Eén van de twee gebruikte stammen gaf een kortere latentietijd en gaf een sterkere dwerggroei in cv. Russet Burbank dan de andere stam, maar niet in cv. Kathadin of cv. Norland.

Opvallend is dat fenotypisch, zoals in verschijningsvorm op platen en in virulentie-eigenschappen Cms behoorlijk variabel kan zijn, terwijl genetisch het een homogene groep lijkt te vormen. Zo wordt bij analyse van polymorfismen op basis van restrictieënzymfragmenten afkomstig van repeterende sequenties, weinig variatie gevonden (Mogen et al., 1990).

Naast stammen die op de platen mucoïde (slijmvormend) zijn, zijn er ook niet-mucoïde stammen bekend, die minder EPS produceren (Bishop et al., 1988; Nissinen et al., 1997). Een niet-mucoïde stam direct geïsoleerd uit natuurlijk besmet materiaal, was identiek aan mucoïde stammen met betrekking tot latentieperiode in aubergine en aardappel en de populatiedichtheid in aardappelstengels aan het eind van het groeiseizoen (Bishop et al., 1988). Echter een spontane niet-mucoïde mutant, geselecteerd van een mucoïde stam, bleek wel verminderd virulent te zijn. Het is nog steeds niet zeker of de niet-mucoïde stammen in natuurlijk geïnfecteerde aardappel-extracten voorkomen, of een gevolg zijn van de groei op het agarmedium. Het is opvallend dat soms niet-mucoïde stammen werden verkregen van aardappelplanten met atypische symptomen (Baer & Gudmestad, 1993).

De aanwezigheid van niet-mucoïde cellen in monstermateriaal zou onderzocht kunnen worden met koper phthalocyanine, dat specifiek EPS van Cms precipiteert en daardoor alleen mucoïde cellen zal agglutineren (Lewosz & Pastuszewska, 1995). Door de agglutinatie worden de mucoïde cellen afgedood. De niet-mucoïde cellen blijven in het supernatant achter en kunnen uitgeplaat worden. Een niet-mucoïde stam blijft niet-mucoïde, wanneer deze in een aardappelplant wordt gebracht (Baer & Gudmestad, 1993).

*2.3.8. Inoculumconcentratie.* Er wordt in het algemeen een positieve correlatie gevonden tussen inoculumdichtheid en de mate van symptoomontwikkeling. Inoculatie van knollen van cv. Russet Burbank met 30 of 3 cfu (kolonievormende eenheden = aantal kweekbare cellen) per knol leidde nergens tot detecteerbare (latente) infecties van planten met Cms (Nelson, 1982). Bij inoculatie met 300 cfu werden detecteerbare latente infecties gevonden, maar geen planten met symptomen. Boven de 3000 cfu en hoger werden naast latente infecties ook planten met ringrotsymptomen gevonden. Franc (1999) volgde de ziekte-ontwikkeling in niet-gesneden aardappelen geïnjecteerd in de knol met verschillende hoeveelheden cellen. Bij minder dan 100 cellen per knol bleef symptoomexpressie maximaal 3 generaties uit. De Boer et al. (1992) vond bij een lage inoculum doses aan het einde van het groeiseizoen lagere dichtheden dan bij een

hoge inoculum doses. Zij suggereerden dat een interactie met andere endofytische organismen in de plant de ziekteontwikkeling negatief zou beïnvloeden. Tenslotte is Cms een langzaam groeiend, niet beweeglijk organisme dat relatief zwak competitief is. Er is ook wel gesuggereerd dat in een volgroeide aardappelplant Cms zich minder snel vermenigvuldigt dan in jonge planten (Van Varenbergh & Stead, niet gepubliceerd).

*2.3.9. Cultivar.* De ziekteontwikkeling is sterk afhankelijk van de cultivar (Sletten, 1985; De Boer & McCann, 1990; De Boer et al., 1992). Sletten vond een significante interactie tussen cultivar en symptoomexpressie bij veldexperimenten met de cultivars Ostara, Laila, Kerrs Pink en Pimpernel. Cv. Laila was tolerant en gaf, i.t.t. de andere cultivars bij infectie geen reductie in het aantal knollen te zien. De Boer & McCann (1990) vonden bij een vergelijking van de cultivars Red Pontiac, Russet Burbank, Desiree en Rose Gold, grote verschillen in de mate van symptoomexpressie. De laatste twee genoemde cultivars waren zeer gevoelig en de eerste was relatief tolerant. Er werd een sterke positieve correlatie tussen de mate van knol – en stengelsymptomen gevonden. Verder bleek dat aan het einde van het groeiseizoen de dichtheden van Cms in de stengel voor de verschillende cultivars weinig verschilden (c.  $10^{10}$  cellen/g), maar in de knol was de dichtheid afhankelijk van de cultivar ( $10^2$  –  $10^8$  cellen/g).

*2.3.10. Microbiële populatie.* Aanwezigheid van endofytische micro-organismen in het vaatstelsel of secundaire pathogenen in symptomatisch weefsel kan van invloed zijn op de symptoomexpressie. Zo werd bij coinoculatie van Cms met pectinolytische *Erwinia* sp. de ontwikkeling van ringrot geremd (Dykstra, 1942; Sherf, 1944, DeBoer, pers. com.). Andere bacteriën, zoals *Bacillus subtilis*, *B. mesentericus* en een *Pseudomonas* sp., lieten juist een verhoging van het percentage ringrot in knollen zien (Dykstra, 1942). De Boer (pers. com.) heeft 3 achtereenvolgende jaren partijen gesneden aardappelen geïnoculeerd via vacuüm infiltratie met mengsels van  $10^6$  cellen per ml Cms en *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, de veroorzaker van zwartbenigheid, in concentraties van 0,  $10^4$ ,  $10^6$  en  $10^8$  cellen per ml. Daarna werden de knollen in het veld uitgepoot. In alle jaren kreeg hij significant minder ringrot bij hoge dan bij lage concentratie Eca. De Boer suggereerde dat bij hoge concentraties Eca de moederknol al is weggerot voordat Cms de kans krijgt de stengel binnen te dringen. In dit verband wees De Boer op het belang van het vaatweefsel dat zich in de overgang van knol naar stengel bevindt. Wanneer hier als gevolg van wondreacties callusvorming optreedt, wordt verdere verspreiding van pathogenen tegen gegaan. Mogelijk kan de onderzoek naar de anatomie hiervan een aangrijpingspunt zijn bij resistentieveredeling. In knollen met lichte ringrot symptomen wordt bijna

uitsluitend Cms geïsoleerd. Wanneer rot zich verder ontwikkelt, worden zeer frequent erwinia's geïsoleerd en wordt isolatie van Cms steeds moeilijker (Ark, 1946). In onderzoek van voor 1955 werd i.p.v. reïncultures vaak rot van rotte knollen als inoculum gebruikt. Het rot van knollen bevat in de regel naast Cms ook andere bacteriën en de aanwezigheid hiervan kunnen de resultaten beïnvloed hebben. Bovendien werd op deze wijze nooit met bekende inoculumconcentraties gewerkt.

### **3. Economische schade**

Rapporten van besmettingen met Cms komen nu uit 31 landen verspreid over vijf continenten (tabel 2) (bron, Stead & Wilson, 1996). De ziekte is nooit in het werelddeel Australië gevonden. De eerste melding uit Europa (Duitsland) stamt uit 1906. De eerste melding van ringrot in Noord-Amerika komt uit Quebec in 1931. In 1940 werd de ziekte in alle belangrijke aardappelproducerende provincies in Canada en de VS gevonden. In Europa komt de ziekte m.n. in de Scandinavische landen voor. Recentelijk werden ook weer verschillende uitbraken in Duitsland gemeld. In 1999 werd voor het eerst ringrot in Nederland gevonden op een bedrijf dicht bij de Duitse grens. Recentelijk zijn er binnen de EU twee lidstaten (Zweden en Finland) bijgekomen met een ringrot-historie. Hierdoor neemt het risico van de verspreiding van de ziekte binnen de Europese Unie verder toe.

Tabel 2. Verspreiding van Cms over landen in de verschillende werelddelen

Werelddeel	Land
Europa	België, Tsjechië, Denemarken, Finland, Duitsland, Noorwegen, Polen, Rusland, Slowakije, Spanje, Zweden, Oekraïne, Nederland
Azië	Afghanistan, China, Japan, Cambodja, Kazakstan, Korea, Nepal, Siberië, Taiwan, Oezbekistan
Afrika	Algerije
Noord-Amerika	Canada, Verenigde Staten
Centraal en Zuid-Amerika	Argentinië, Costa Rica, Panama, Peru en Venezuela

Cms kan op drie manieren schade veroorzaken: (1) door directe opbrengstverliezen tijdens de teelt en gedurende de opslag, (2) door afkeuring van partijen als gevolg van de slechte kwaliteit of vanwege vastgestelde toleranties, (3) door verlies van exportmarkten of door gebrek aan mogelijkheid nieuwe markten te openen als direct gevolg van de angst van importerende landen

ringrot te introduceren. Dit is in de recente geschiedenis een belangrijke schadepost voor Canada en de VS geweest (De Boer, 1987).

In de jaren 40 was de directe schade als gevolg van ringrot infecties en de schade als gevolg van afkeuringen in de VS en Canada aanzienlijk. Het ontbreken van een adequate laboratoriumtoets om besmettingen vast te stellen, het gebruik van 'picker planters' (machines die m.b.v. een metalen pen de knol in de grond bracht) en de gewoonte om ter vermeerdering van het pootgoed knollen te snijden waren hiervoor in belangrijke mate verantwoordelijk. Binnen Noord-Amerika en binnen de Europese Unie geldt een nultolerantie, wat betekent dat één besmette knol of plant leidt tot afkeuring van de hele partij.

In de jaren 1940 – 1950 was ringrot in Noord-Amerika een belangrijke economische ziekte in de (poot)aardappelteelt. Tijdens surveys in Ottawa (Canada) van 1943 tot 1947 bleek 6 – 12% van het geïnspecteerde areaal 9 – 21% van de individuele bedrijven geïnfecteerd (Richardson & Goodin, 1949). In 1944 werd in Quebec de ziekte aangetoond in 15.7% en in 1945 in 8.6% van alle gekeurde partijen aardappelen (Baribeau 1948). In Maine in de VS werd in 1939 en 1940 van alle gecertificeerde partijen respectievelijk 11% en 7.5% vanwege ringrot afgekeurd (Baribeau, 1948). In de VS werden rond 1940 regelmatig partijen afgekeurd met infectiepercentages tot 80% ringrot (Eddins, 1939; Kreutzer & Mclean, 1943). De directe schade is sterk afhankelijk van allerlei factoren (zie 2.3). Echter, ook van latent besmette knollen werden in de VS nog altijd 1-5% zieke knollen geoogst (Eddins, 1939)

Er wordt wel vermeld dat alle statutaire beheersingsmaatregelen meer hebben gekost dan de werkelijke opbrengstverliezen (Stead & Wilson, 1996; De Boer, 1987). Echter de directe schade als gevolg van ringrot moet niet onderschat worden. In 1978 werd in de VS nog altijd c. 60% van het afgekeurde pootaardappelareaal, als gevolg van ringrot afgekeurd (Slack et al., 1979). Tussen 1982 en 1985 werd afhankelijk van de staat tussen de 0 – 15% (gemiddelde 4%) van het pootgoed areaal in de VS afgekeurd als gevolg van ringrot (De Boer, 1987). In diezelfde periode lagen in Canada deze percentages op 0-3% (gemiddeld 1%). In Canada kan dankzij een intensieve campagne, de laatste 5 jaar gesproken worden van een functionele eradicatie van ringrot in de pootaardappelteelt; vanaf 1994 werden slechts in 1-2 partijen symptoomloze infecties werden geconstateerd (De Boer, 1999).

#### **4. Virulentiefactoren**

Voor het ontwikkelen van goede beheersingsstrategieën is kennis over die eigenschappen van de ziekteverwekker die bepalend zijn voor het ziekteproces uiterst belangrijk. Deze kennis kan worden gebruikt voor het ontwikkelen van bestrijdingsmiddelen, resistentie van de plant en geeft inzicht in de achtergrond van de ecologische parameters.

Genetisch onderzoek naar virulentiefactoren van Cms wordt sterk bemoeilijkt door het ontbreken van geschikte vectoren waarmee genetische materiaal in het genoom kan worden geïntegreerd. Deze vectoren, zoals de transposons, die geschikt zijn voor transformatie van Gram-negatieve bacteriën, zijn uiterst efficiënte gereedschappen om de functie van genen te leren kennen. Door het effect van de mutagenese (uitschakeling) van de genen te bestuderen of juist (nieuw) genetisch materiaal via transposons toe te voegen, kan inzicht verkregen worden in het ziekteproces. Inmiddels is er wel een vector gegenereerd, op basis van het replicatie-origine van plasmide pCS1 dat van nature in veel Cms stammen voorkomt, die kan dienen als kloneringsvector (Laine et al, 1996). Hiermee kan wel extra genetisch materiaal in de cel worden gebracht, maar geen genetisch materiaal geïntegreerd in het genoom worden, en hiermee kunnen dus ook geen genen uitgeschakeld worden.

Cms produceert 3 verschillende extracellulaire polysacchariden (EPS), een neutrale en twee zure EPS-moleculen (Varbanets et al, 1992). Glucose is de voornaamste monosaccharide in de verschillende fracties. De basisstructuur van de verschillende EPS-moleculen wordt gevormd door disaccharide repeterende eenheden van glucopyranoside en D-glucoronzuur (3)- $\beta$ -D-GlcpA-(1,4)-D-Glcp(1). De EPS-moleculen hebben ook een peptide gedeelte. EPS speelt mogelijk een rol bij langdurige bewaring op oppervlakten van vaste dragers en mogelijk als carbohydraat-reserve om tijden van voedselschaarste te overleven (Baer et al., 1998). Aangezien Cms zich sterk aan aardappelweefsel kan hechten, speelt EPS wellicht ook een rol bij adsorptie van Cms aan de celwand van waardplanten (Dinesen & De Boer, 1995).

Cms produceert een extracellulaire  $\beta$ -fructofuranosidase dat sucrose hydrolyseert tot glucose en fructose (Baer et al., 1998). Het enzym speelt een rol bij de productie van EPS.

Verder produceert Cms ook een amylase en een cellulase, die beide een rol spelen in het ziekteproces. Amylase negatieve mutanten waren minder virulent dan wild type stammen, terwijl cellulase negatieve mutanten avirulent waren (Metzler et al., 1997).

Virulente stammen van Cms zijn in staat een overgevoelighedsreactie (resistentiereactie) te veroorzaken op tabak, een niet-waardplant van Cms, avirulente stammen kunnen dit niet. In de waardplanten aardappel en tomaat wordt deze overgevoelighedsreactie niet gevonden (Nissinen



et al., 1997). Cms is blijkbaar in staat het afweersysteem van deze planten te omzeilen. Het ophelderen van de genetische oorzaak van de beperkte waardplant-specificiteit van Cms wordt gezien als één van de belangrijkste uitdagingen voor moleculair-biologen. Kennis hierover kan belangrijk zijn bij het ontwikkelen van geschikte bestrijdingsstrategieën tijdens de aardappelteelt (vruchtwisseling, onkruidbestrijding) en bij het zoeken naar bronnen voor immuniteit.

## **5. Verspreiding**

### **5.1. Pootgoed.**

De voornaamste wijze van verspreiding van Cms is via besmet pootgoed. In de VS waar nog altijd pootgoed gesneden wordt, is contactbesmetting met gecontamineerde messen en in mindere mate besmette handen de belangrijkste oorzaak van verspreiding van Cms binnen het pootgoed. Wanneer het mes besmet is zal ook de 10e knol die gesneden wordt nog besmet worden (Star, 1940). Een homogene knolbesmetting van 0.1% kan bij het snijden van de knollen al een percentage zieke planten van 1.5% opleveren (Starr, 1943). Wanneer er ringrot symptomen in het veld zichtbaar zijn, en de partij is gesneden met een gecontamineerd mes is vaak een groot deel van de planten besmet (Starr, 1940; Dykstra, 1941; Dykstra, 1942; Metzger & Binkley, 1940). Besmetting lijkt wel te kunnen plaatsvinden via de ogen van niet beschadigde knollen, maar niet via de intacte schil (Star, 1940; Dykstra, 1941; Dykstra 1942). Incubatie van intacte knollen in een suspensie van Cms leidde soms wel en soms niet tot ringrot (Dykstra, 1941; Dykstra, 1942). Mansfeld-Giese (pers. com.) vond echter geen besmetting via ogen van intacte knollen en zelfs niet van knollen waar voorzichtig een schil van getrokken was. Wel vond hij infectie na het maken van diepe sneden in de knol of via inoculatie van intacte spruiten van voorgekiemde knollen. In Europa waar weinig pootgoed gesneden wordt, moet vooral met voorgekiemde knollen extra gelet worden op gevaar van verspreiding van ringrot.

Dykstra (1942) vond dat wanneer knollen direct na snijden worden geplant er minder ziekte optreedt, dan wanneer de knollen 24-36 uur in een jute zak worden bewaard. De auteur verklaarde dit uit een mogelijk verdere verspreiding van Cms in de knollen tijdens de opslag. Het verse snijvlak kan ook door groundbacteriën zijn gekoloniseerd, waardoor ziekte-expressie werd voorkomen. Bonde (1939) vond juist een hoger ziektepercentage in knollen die direct geplant waren dan in knollen die 24 uur bewaard waren.

Cms kan ook effectief verspreid worden door de 'picker planter' die binnen de VS veel gebruik wordt (Raeder, 1949; Dykstra, 1941).

## 5.2. In de grond

Tot dusver zijn er geen duidelijke aanwijzingen dat de verspreiding van Cms in het veld een belangrijke rol speelt in de epidemiologie (Dykstra, 1941; Dykstra, 1942; Mansfeld-Giese, 1997). In veldproeven waar geïnfecteerde planten stonden naast niet-geïnfecteerde controle planten, werd slechts in een zeer lage frequentie overdracht van Cms via het wortelstelsel gevonden (Mansfeld-Giese, 1997). Wanneer de wortelstelsels van elkaar werden gescheiden door een schot, werd geen enkele overdracht (via de bovengrondse delen) gesignaleerd. Ook in andere veldproeven werden in gezonde controle planten die in de rij naast Cms-besmette planten stonden of in aangrenzende rijen stonden nooit ringrot zieke planten gevonden (Dykstra, 1942; Sletten, 1985; Mazzucchi et al., 1982; DeBoer, pers. com.). In een lage frequentie werden in de controle planten IF-positieve cellen gevonden (DeBoer, pers. com.).

Slechts incidenteel wordt in de literatuur melding gemaakt van een (mogelijke) verspreiding in het veld. Zo werd verspreiding aangetoond in een deel van een aardappelperceel waar drainage slecht verliep (Iverson & Kelly, 1940; Dykstra, 1941). In veldproeven in Maine (V.S.) werd een relatief hoog percentage van ogenschijnlijk gezonde knollen, die naast zieke planten waren geplant, besmet met de ringrot bacterie (Bonde, 1939). Er werd echter niet aangegeven hoe deze infecties tot stand kwamen. In potproeven waarin gezonde en zieke knollen bij elkaar werden geplant in één pot, werd 25% van de gezonde planten geïnfecteerd (Bonde, 1939). Er werd gesuggereerd dat de bacterie via grondwater verspreid werd.

## 5.3. Insecten en nematoden

Er zijn diverse insecten geïdentificeerd die als vector van Cms kunnen fungeren, hoewel de rol van insecten bij de overdracht van Cms via de bovengrondse delen van de plant onduidelijk is. De coloradokever (*Leptinotarsa decemlineata*) en de groene perzikluis (*Myzus persicae*) bleken relatief goede vectoren te zijn van Cms, terwijl de 'aster leaf hopper' niet in staat was Cms over te dragen naar een aardappelplant (Christie et al., 1991). Eén coloradokever (was in staat de ziekte over te dragen wanneer deze eerst 2 uur werd gevoed op een besmette plant en daarna 2 uur op een gezonde plant. Voor transmissie van Cms door de groene perzikluis was een verblijf van minimaal 48 uur op een besmette plant, gevolgd door een verblijf van minimaal 48 uur op een

gezonde plant noodzakelijk. Over de persistentie van Cms in insecten is niets bekend. Ook is niet onderzocht of de dochterknollen op deze wijze besmet konden worden. In een andere studie werd aangetoond dat insecten zoals de coloradokever, de sprinkhaan (*Melanoplus differentialis*) en de 'black blister beetle' (*Epicauta pennsylvanica*) in staat waren Cms van zieke naar gezonde planten over te dragen (List & Kreutzer, 1942). In deze studie werd niet vermeld hoelang de insecten op zieke en gezonde planten waren gevoed. De transmissie werd bepaald door detectie van Cms in de bladstelen. De hoeveelheid Cms cellen die door de coloradokever wordt overgedragen is in de regel niet voldoende om ringrot symptomen te geven (Duncan et al., 1958). Bij certificering worden bovengrondse delen van de plant weinig bemonsterd, omdat de hoogste dichtheden van Cms in de regel in de knol en de stengelbasis te vinden is. Derhalve is de rol van de insecten in de transmissie van Cms op grond van de huidige gegevens slecht te bepalen.

Van *C. toxicus*, *C. iranicus* en *C. tritici* ('gumming diseases' van grassen) is bekend dat deze voornamelijk via nematoden verspreid worden. Voor Cms en *C. m. subsp. michiganensis* zijn hierover geen gegevens in Engelstalige literatuur bekend.

## **6. Overleving**

### **6.1. Materialen**

Cms is relatief goed bestand tegen uitdrogen en op oppervlakten van vaste dragers overleeft Cms lang t.o.v. veel andere bacteriesoorten. Afhankelijk van de temperatuur en in het bijzonder de luchtvochtigheid werd een overleving van meer dan 2 jaar vastgesteld (tabel 3). Cms werd in gerefereerd onderzoek m.b.v. een weinig gevoelige bioassay gedetecteerd, dus de aangegeven overlevingsperiodes zouden nog onderschat kunnen zijn. Tevens is geen rekening gehouden met de mogelijkheid van het ontstaan van cellen in een zgn 'viable but non culturable state' (VBNC's), waarbij de bacteriecellen nog wel leven, maar niet meer zijn te kweken en alleen na een specifieke 'trigger' gewekt kunnen worden.

### **6.2. Grond**

Er zijn geen indicaties dat Cms lang in natuurlijke gronde kan overleven. Nelson (1979) vond in leemgrond een maximale overlevingsperiode van 278 dagen. Deze overlevingsperiode werd alleen bereikt wanneer de grond onder droge condities (verwelkingspunt) en bij een lage

grondtemperatuur van 0 °C of –10 °C werd bewaard. Hogere temperaturen en een hoger vochtgehalte waren negatief voor de overleving van Cms.

Tabel 3. Persistentie van Cms op materialen bij verschillende temperaturen en luchtvochtigheid

Materiaal	Temperatuur (in °C)	Relatieve luchtvochtigheid (in %)	Overlevingsduur (in maanden)	referentie
jute	5, 20	94	< 7	Nelson (1980)
	5, 20	12	>24	Nelson (1980)
papier	5, 20	94	<7	Nelson (1980)
	5, 20	12	>24	Nelson (1980)
plastic	5, 20	94	• 7	Nelson (1980)
	5, 20	12	>24	Nelson (1980)
multiplex	5	94	7	Nelson (1980)
	20	94	14	Nelson (1980)
	5	12	>24	Nelson (1980)
	20	12	<7	Nelson (1980)
wol	variërend	laag	>10	Nelson (1978)
leer	variërend	laag	>10	Nelson (1978)
rubber	variërend	laag	>10	Nelson (1978)
jute	variërend	laag	>10	Nelson (1978)
	-40,	nd	>53	Nelson and Kozub (1990)
	-40 °C – 5 °C	nd	> 53	Nelson and Kozub (1990)
	5 °C	nd	c. 23	Nelson and Kozub (1990)
	25 °C	nd	12 – 23	Nelson and Kozub (1990)
beton	variërend	laag	>10	Nelson (1978)
papier	variërend	laag	>10	Nelson (1978)
plastic	variërend	laag	>10	Nelson (1978)
multiplex	variërend	laag	>10	Nelson (1978)
staal	variërend	laag	< 4	Nelson (1978)
katoen	variërend	laag	7-10	Nelson (1978)
jute	1-15	60-90%	>10	Nelson (1978)
beton	1-15	60-90%	7-10	Nelson (1978)
papier	1-15	60-90%	7-10	Nelson (1978)
plastic	1-15	60-90%	7-10	Nelson (1978)
multiplex	1-15	60-90%	7-10	Nelson (1978)

Bij 20 °C en een vochtgehalte op veldcapaciteit overleefde de bacterie slechts 6 dagen. In Minnesota (VS) werd een steriele en niet-steriele grond geïnoculeerd met een reïncultuur van Cms en bacteriën afkomstig van ringrot-zieke knollen, waarbij de grond buiten werd bewaard en ook binnen bij een constante temperatuur van 20 °C en 3 °C . Bij 3 °C werd in een steriele grond een maximale overlevingstijd van 4.5 maand gevonden (Dykstra, 1942). Onder andere (niet-steriele)

condities was de bacterie nog eerder uitgedoofd. Sneisko & Bonde (1943) vonden wel een goede overleving in steriele (droge) gronden. De Boer (niet gepubliceerd) vond zelfs een overlevingstijd van 25 jaar in steriele grond. Hoewel abiotische omstandigheden een belangrijke rol kunnen spelen bij de overleving van Cms in steriele grond, lijkt de geringe persistentie voornamelijk bepaald te worden door de microflora en microfauna in de grond.

De geringe persistentie blijkt verder uit experimenten waarbij men gezonde knollen plantte op percelen waarvan in het vorige oogstseizoen ringrot-zieke knollen geoogst waren. Bonde (1942) heeft gedurende 7 jaar op 2 – 8 velden waar een zwaar aangetast gewas van geoogst werd, gezonde aardappelplanten geplant, maar in gewas en geoogste knollen nooit ringrot gevonden. In aanvullende veldexperimenten werden besmette knollen door verschillende gronden gemengd en al dan niet bedekt met stro. Na de winter werd er een gezond gewas op geteeld, zonder dat dit in gewas of knollen tot ringrot leidde. Ook in North Dakota (VS) vond men in 3 opeenvolgende teelten, waarbij Cms-vrije knollen werden geplant in een grond waar een zwaar besmet gewas van was geoogst, geen ringrot symptomen, terwijl in het eerste teeltjaar nog rotte of gedeeltelijk rotte knollen in de grond te vinden waren (Dykstra, 1941, Dykstra, 1942). Ook Eddins (1939) kon in geen van de ruim 1200 planten, afkomstig van Cms-vrij pootgoed ringrot detecteren, wanneer deze in velden werden geplant, waar het jaar daarvoor 25-64% zieke knollen waren geoogst. Alleen wanneer grote aantallen knollen buiten in potten met besmette grond gedurende de winter werden bewaard, kon in een lage frequentie Cms via een bioassay worden aangetoond. In aanvullende experimenten werden in Ottawa (Canada) rotte en gedeeltelijk rotte knollen in de herfst door de bodem geploegd, waar vervolgens in het voorjaar vers-gesneden knollen op werden geplant. Er werden geen ringrot-zieke planten gevonden en ook de dochterknollen leken het jaar daarop vrij van ringrot (Dykstra, 1942).

### **6.3. Tijdens de bewaring**

De populatie Cms lijkt tijdens de aardappelopslag groter te worden, maar gedetailleerde gegevens hierover zijn niet bekend. Verhoging van de temperatuur gedurende 5 weken voor opslag bij 4 °C of behandeling met Rindite om de kiemrust te breken lijken geen effect te hebben op de detecteerbaarheid van het pathogeen (Langerfeld, 1990).

## 6.4. Aardappelopslag

In aardappelopslag in het veld kan Cms makkelijk overleven en vormt een potentieel gevaar voor volggewassen (Bonde, 1942). De planten en dochterknollen van geïnfecteerde opslagknollen hoeven echter niet noodzakelijkerwijs besmet te zijn (Haasis, 1940).

## 6.5. Onkruiden en rotatiegewassen

Door Knorr (1948) werden op de volgende plantensoorten na stengelinoculatie symptomen waargenomen: *Althaea sp.*, *Lycopersicon esculentum* (tomaat), *S. antipoviczii*, *S. ballsii*, *S. chacoense*, *S. citrullifolium*, *S. commersonii*, *S. corymbosum*, *S. demissum atypicum*, *S. endlicheri*, *S. fendleri*, *S. jujuyense*, *S. melongena*, *S. mammosum*, *S. pampasense*, *S. parodii*, *S. radicans*, *S. tequilense*, *S. tlaxcalense*, *S. vavilovii*, *S. verrucosum*, *S. warscewiczii* en *S. tuberosum*. In aanvulling hierop werd door Slack (1987) de volgende plantensoorten genoemd als waardplant voor Cms, zonder echter te vermelden hoe deze soorten getoetst waren: *L. pimpinellifolium*, *L. racemgerum*, *S. cardiophyllum* en *S. integrifolium*

Op de volgende planten na werden 2 maanden na stengelinoculaties geen symptomen gevonden (Knorr, 1948): *Ainsodus luidus*, *Apium graveolens*, *Atropa belladonna*, *Beta vulgaris*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Browallia americana*, *Capsicum annum*, *Cuscuta sp.*, *Datura metel*, *Datura meteloides*, *Datura quercifolia*, *Datura stramonium*, *Datura tatula*, *Daucus carota*, *Helianthus*, *Hyoscyamus albus*, *Hyoscyamus niger*, *Lacatuca sativa*, *Lupinus luteus*, *Lycium halimifolium*, *Lycopersicum humboldtii*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana acuminata*, *Nicotiana angustifolia*, *Nicotiana bigelovii*, *Nicotinana cerinthoides*, *Nicotiana chinensis*, *Nicotiana glutinosa*, *N. longiflora*, *N. multivalvis*, *N. noctiflora*, *N. quadrivalvis*, *N. repanda*, *N. rustica*, *N. sanderae*, *N. sylvestris*, *N. tabacum*, *Nierembergia hippomanica*, *Pelargonium zonale*, *Petunia violacea*, *Phaseolus vulgaris*, *Physalis angulata*, *Physalis alkekengi*, *P. aequata*, *P. heterophylla*, *P. lanceolata*, *P. longifolia*, *P. virginiana*, *Pisum sativum*, *Salpiglossis sinuata*, *Saracha procumbens*, *Schizanthus pinnatus*, *Schizanthus sinuata*, *S. wisetonensis*, *Soja max*, *Soja hispida*, *Solanum acaule*, *S. aculeatissimum*, *S. antigenum*, *Solanum balbisii*, *S. crolinense*, *S. ciliatum macrocarpum*, *S. dimissum*, *S. dulcamara*, *S. gilo*, *S. guyanense*, *S. indicum*, *S. neoantipoviczii*, *S. nigrum*, *S. pyracanthum*, *S. pseudocapsicum*, *s. rostratum*, *S. spinosissimum*, *S. triflorum*, *s. tripartitum*, *Spinacia oleracea*, *Trifolium pratense*, *Vicia faba*

De volgende planten waren na stengelinoculaties na 2 maanden IF-negatief (Mansfeld-Giese, pers. com.): *Agropyrum repens*, *Artemisia vulgaris*, *Brassica campestris*, *Brassica napus*,

*Capsella bursa-pastoris*, *Chenopodium album*, *Cirsium arvense*, *Plantago major*, *Polygonum persicaria*, *Rumex crispus*, *Senico vulgaris*, *Sinapis arvensis*, *Solanum nigrum*, *Sonchus arvensis*, *Taraxacum vulgare*

In extracten van de volgende planten afkomstig van ringrot geïnfecteerde percelen waren allen IF-negatief (Mansfeld Giese., pers. com.): *Agropyrum repens*, *Brassica campestris*, *Capsella bursa-pastoris*, *Chenopodium album*, *Polygonum persicaria*, *Senico vulgaris*, *Solanum nigrum*, *Sonchus arvensis*, *Taraxacum vulgare*, *urtica urens*, *Viola tricolor*.

Cms is in staat vanuit gecontamineerde gronden de tomatenplant ziek te maken (Anonymous, 1941). In deze studie wordt ook beschreven dat het pathogeen overgedragen kan worden aan tomatenzaden via geïnfecteerde vruchten.

Zizz & Harrison (1991) onderzochten onkruiden algemeen aanwezig op een aardappelveld in de VS. Lage aantallen Cms werden gevonden in 14% van de onderzochte planten van *Solanum saccharoides* (harige nachtschade), maar niet in *Chenopodium album* en *Amaranthus retroflexus*. In deze abstract werd niet vermeld of er van het betreffende veld een geïnfecteerd aardappelgewas was gerooid.

Tabel 4. Detectie van Cms in symptoomloze suikerbiet (Overgenomen van Dr. S.H. de Boer, Charlottetown, Canada)

Experiment	Weefseltype	Aantal monsters	Aantal positief in IMF	Aantal bevestigd d.m.v. isolatie
Eerste vondst	6-weeken oude wortels in kas	20		1
Survey	wortels in veld	128	49	6
Grond	wortels	3	1	1
geïnoculeerd				
zaad uit V.S. '84	zaden	6	5	5
zaad uit V.S. '85	zaden	7	1	0
zaad uit Europa	zaden	26	2	0

Cms lijkt ook symptoomloos in bieten aanwezig te kunnen zijn en zelfs overgedragen te kunnen worden naar het zaad. In 1988 werd Cms gevonden in een partij bietenzaad afkomstig uit Oregon (VS) in een concentratie van  $10^5$  cfu per gram (Bugbee et al., 1987; Bugbee en Gudmestad, 1988). De bacteriën werden geïsoleerd uit zaad dat aan de oppervlakte was gesteriliseerd en de bacteriën leken dus zaad-overdraagbaar. Het zaad was geteeld in een gebied waar geen aardappel in de directe omgeving van de suikerbiet werd verbouwd. De Cms stammen waren biochemisch gelijk aan isolaten uit aardappel. Ook uit wortels van de suikerbiet en andere partijen zaden werd Cms geïsoleerd (tabel 4). Andere onderzoekers waren niet in staat Cms in

suikerbietzaden te isoleren (De Boer, pers. com.; Mansfeld-Giese, pers. com.). Zo werden 40 zaden van 2 verschillende partijen m.b.v. IF onderzocht zonder IF-positieve zaden te vinden. Ook na een verrijgingsprocedure van zaadextracten in YGM broth werden geen positieve monsters gevonden. Stengel inoculatie van suikerbietzaden met Cms leidde slechts bij 3 van de 50 planten tot IF-positieve resultaten, waarbij het aantal cellen per beeldveld zeer laag was (De Boer, pers. com.). In dezelfde proef werden vijftig geïnoculeerde eierplanten allen ziek. Suikerbietzaden gezaaid in Cms-geïnfesteerde gronden leverden niet-besmette planten op.

## ***7. Verspreiding in de aardappelplant***

Cms wordt vanuit besmette knollen door de houtvaten getransporteerd naar de stengel en via stolonen naar nieuw gevormde dochterknollen. Vanuit de vaatbundels kunnen ook de intercellulaire ruimtes van omringende weefsels worden gepenetreerd, o.a. de parenchym cellen van xyleem, cortex en merg (Kreutzer & McLean, 1943). In de knol wordt door desintegratie van het parenchymatische weefsel in de vaatbundelring rot veroorzaakt (Dykstra, 1942).

In de knol verspreidt Cms zich maar langzaam. Na inoculatie van de vaatbundel van intacte knollen met een injectienaald, werd de bacterie na 2 maanden slechts tot 10 mm vanaf het punt van inoculatie teruggevonden en na 3 maanden tot 20 mm vanaf het punt van inoculatie (Dykstra, 1942). Bij inoculatie van snijvlakken van gesneden knollen waren na 3 weken slechts 4 van de 13 en pas na 6 weken alle scheuten gekoloniseerd (Dykstra, 1942).

De dichtheden van Cms in het vaatbundelring van knol en stengel van gevoelige rassen kunnen laat in het seizoen oplopen tot  $10^{10}$  cellen per ml extract. Maar ook in symptomloze infecties in relatief tolerante rassen werden hoge concentraties van  $10^8 - 10^9$  cellen per ml gevonden.

De dichtheden van Cms in de plant kunnen sterk verschillen (Haasis 1940; Kreutzer & McLean, 1943). M.b.v. de Gram-kleuring werd aangetoond dat de dichtheden in de stengelbasis in de regel veel hoger zijn dan in de topstengels. De dichtheid van Cms in de individuele scheuten kunnen sterk verschillen, terwijl binnen één scheut de infectie ook éézijdig in het vaatsysteem aanwezig kan zijn. Dit verklaart, waarom vaak slechts een deel van de scheut verwelkt. De dichtheden in de wortels zijn vaak hoger dan in de stolonen. In de knol worden hogere dichtheden gevonden in de vaatbundelring bij het naveleinde dan bij de kroon. In knollen met en zonder symptomen werd de vaatbundelring bij het naveleinde op 7 punten bemonsterd (Kreutzer & McLean, 1943). In knollen met symptomen werd Cms gedetecteerd op alle plaatsen, maar in de knollen zonder symptomen slechts in een gedeelte van de 7 monsters. Ook met de UV-detectiemethode werden vaak knollen



gevonden die slechts direct bij het naveleinde van de vaatbundelring een typische fluorescentie vertoonde (zie 10.5) (Iverson & Kelly, 1940).

In onderzoek naar verspreiding van de bacterie moet er rekening mee gehouden worden dat de infectie in de kas in de regel sneller verloopt dan in het veld (Kreutzer & McLean, 1943).

Na inoculatie van bladeinden, van de basis van bladstelen of van stengels werd exclusief een naar beneden gericht transport vastgesteld, in de richting van de wortels, en niet naar reeds gevormde hogere gedeeltes in de plant (Kreutzer & McLean, 1943). Wel kan Cms vanuit de stengel in nieuw gevormde scheuten plaatsvinden. Bij infectie van bovengrondse delen van de planten door insecten of tijdens teelthandelingen zoals bespuitingen in het veld, is er dus een aanzienlijk risico dat nieuw gevormde knollen worden geïnfecteerd.

## **8. Bestrijding**

### **8.1. Introductie**

Door het quarantaine karakter van ringrot is weinig onderzoek gedaan aan mogelijkheden de ziekte in het gewas te bestrijden. Een volledige eradicatie kan op deze wijze vaak niet bereikt worden, zeker niet omdat Cms een vaatpathogeen is, en in een relatief beschermde omgeving zit. Een gedeeltelijke reductie van de ziekte of ziekteverwekker in een partij leidt in het licht van nationale en internationale regelgevingen onvermijdelijk tot afkeuring en vernietiging en is derhalve weinig zinvol. Wel is m.n. in de jaren '40 veel onderzoek gedaan aan geschikte middelen en methoden om gereedschappen, materialen en opslagruimtes te desinfecteren.

### **8.2. Biologische bestrijding**

Er zijn verschillende bacteriën geïsoleerd die antagonistisch werken tegen Cms zowel *in vitro* (op of in een agarmedium) als in planten. Een *Pseudomonas fluorescens* stam geïsoleerd uit de rhizosfeer van een aardappelplant was in staat infecties van Cms vanuit besmette gronden te voorkomen en hield de populaties Cms in de wortels laag (De la Cruz et al., 1992). Na wortelinoculatie bleef de populatie van de antagonist relatief stabiel op een niveau van  $10^5$  cellen per ml gedurende tenminste 8 weken. Gamard & De Boer (1995) isoleerden 88 antagonistische isolaten van het oppervlak van de aardappelknol op basis van *in vitro* antibiosis. In pot- en veldexperimenten werden de beste resultaten verkregen met een *Arthrobacter* species, een Gram-positieve corynevormige bacterie, die symptomatische en latente infecties significant wist te

reduceren. De gesneden knollen werden via snijden met een besmet mes of via vacuüm-infiltratie van gesneden knollen besmet waren met Cms en na 24 uur gedoopt in een suspensie van  $10^8$  cellen/ml van de antagonist.

Geen van de antagonisten wist Cms volledig te elimineren en het is nog maar de vraag of toepassing van deze middelen in een bestrijdingsstrategie wenselijk is, omdat laag-besmette partijen moeilijker te traceren zijn en toch afgekeurd moeten worden.

### **8.3. Chemische bestrijding.**

Voor desinfectie van materialen en gereedschappen, zoals messen, machines, jute zakken en de wanden van opslagruimtes zijn diverse effectieve chemische middelen voorhanden. Echter verschillende hiervan zijn sterk milieubelastend en gebruik hiervan dient zo veel mogelijk beperkt te worden. Bedacht moet worden dat door vervuiling van de bactericiden met knolmateriaal en aanhangende grond, het bestrijdingsmiddel relatief snel geïnactiveerd kan worden (Kreutzer et al., 1942; Kreutzer et al., 1945; Dykstra, 1942).

Voor ontsmetting van messen is een ontsmetting van 10 sec in kwikchloride, lysol of kaliumjodide afdoende (Iverson & Kelly, 1940; Starr, 1940; Starr, 1943; Starr, 1944, Dykstra, 1941; Dykstra, 1942). Ook voor ontsmetting van roterende messen bleek het gebruik van kwikchloride en thymolhoudende verbindingen een afdoende effect te geven (Kreutzer et al. 1945; Lane et al., 1948; Raeder, 1949). In de studie van Knorr (1947) werd het gebruik van kopersulfaat geadviseerd als een effectief, goedkoop en tevens conserverend desinfectans voor hout. Het is weinig corrosief en dus ook geschikt voor desinfectie van metalen. Ammoniumverbindingen bleken in deze studie weinig effectief, maar in een andere studie juist weer goed bruikbaar (Knorr, 1947). Ook voor gebruik van ethanol werden geen éénduidige resultaten gerapporteerd (Dykstra, 1941; Dykstra, 1942). ). In meer recente literatuur worden formaldehyde (2-5%), fenolische verbindingen, chloorhoudende verbindingen, quarternaire ammoniumverbindingen en jodide genoemd als geschikte middelen voor desinfectie (tabel 5) (De Boer & Slack, 1984).

Tabel 5. Bactericiden geschikt voor desinfectie van gereedschap en materialen (Slack & De Boer, 1984)

Desinfectans	Concentratie	Geïnactiveerd door organisch materiaal	Opmerkingen
Chloor	0.5%	+	Corrosief voor metalen, toevoeging detergens verhoogd effectiviteit, irriterende voor de ademhaling
Formaldehyde	2-5%	-	Minder effectief bij kou, corrosief, irriterende geur
Jodide	Zie instructies leverancier	+	corrosief
Fenolische verbindingen	1-3% (of zie instructies leverancier)	-	laat kleverige substantie achter
Quarternaire ammoniumverbindingen	00.8% (of zie instructies leverancier)	+	geur- en kleurloos, niet-corrosief, stabiel, effectief enkel bij lange incubatietijd
Stoom	..	-	Oppervlak moet voldoende heet worden

Jute zakken kunnen ook met kopersulfaat (Starr & Riedl, 1945), en met quarternaire ammoniumverbindingen (MacLachlan & Racicot, 1950) ontsmet worden.

Behandeling van knollen met bactericiden leidt nooit tot volledige eliminatie van ringrotinfecties, hoewel er met bepaalde middelen wel een significante reductie van het percentage ringrot mogelijk is (Starr, 1940, Dykstra, 1941, Dykstra, 1942, ). Relatief goede resultaten werden verkregen met kwikverbindingen (kwikchloride en kwikoxide en kwikcyanide), met kalium jodide met lysol en met azijnzuur (Iverson & Kelly, 1940; Dykstra, 1942). Behandeling van knollen met Mercurnol, een commerciële kwikverbinding, gedurende 10 min leidde tot een significante reductie van c. 50% in het percentage ringrot zieke planten (Starr, 1940). In deze studie werd geen effect gevonden van een behandeling met formaldehyde, lysol en kwikoxide. Veel van de gebruikte middelen hebben een fytotoxisch effect, waarbij het percentage opkomst van de knollen negatief beïnvloed wordt (Dykstra, 1941).

Voor desinfectie van opslagruimtes is sproeien met bactericiden effectiever dan het gebruik van gassen (Dykstra 1942). Met name sproeien met chloormiddelen bleek effectief te werken.

#### 8.4. Fysische bestrijding

Gebruik van heet water is de meest toegepaste fysische methode voor desinfectie van materialen. Voor geïnfecteerde messen bleek een behandeling van 15 sec in kokend water Cms effectief te doden, maar niet een temperatuur van 76 °C of lager (Starr, 1944). Voor een effectieve ontsmetting van jute zakken met stoom, moest afhankelijk van het aantal zakken en de druk 20 – 30 min geautoclaveerd worden (Starr, 1947). Jute zakken konden ook effectief met infrarood bestraling ontsmet worden (MacLachlan & Racicot, 1950).

Een behandeling van geïnfecteerde knollen met heet water van 52 °C gedurende 4 min leidde tot een verhoging i.p.v. een verlaging van de ziekteincidentie (Dykstra, 1942).

## **8.5. Resistentie**

In Nederland is tot dusver slechts één ringrot besmetting gevonden en wordt pootgoed (nog) niet integraal op ringrot getoetst. Elke cultivar waarin ringrot moeilijk tot expressie komt en de bacterie zich slecht in vermenigvuldigd vormt derhalve een potentiële bedreiging voor onze aardappelteelt. Alleen cultivars met een volledige immuniteit zouden hier ingezet mogen worden, maar deze zijn (nog) niet voorhanden. In landen waar de ziekte wel op grotere schaal voorkomt, kan overwogen worden tolerante rassen te gebruiken, om zo schade aan het gewas zo veel mogelijk te beperken. Landen die om deze reden bewust tolerante rassen gebruiken, zullen mogelijk wel te maken krijgen met verdergaande exportbeperkingen, omdat het risico van introductie van latent-geïnfecteerde knollen alleen maar groter wordt. Aan de andere kant worden in Europa al jarenlang tolerante cultivars gebruikt en is het ziekteprobleem hier lang niet zo groot als in de VS waar steeds gevoelige rassen zijn gebruikt (DeBoer & McCann, 1990). Blijkbaar is het gebruik van gesneden knollen van grotere betekenis in de epidemiologie van ringrot dan het gebruik van tolerante rassen.

Tot 1959 werd voor het toetsen van zaailingen op resistentie voor ringrot gebruik gemaakt van een toets waarbij eerst knollen werden geoogst en vervolgens werden gesneden en geïnoculeerd met een dichte suspensie van Cms, afkomstig van rotte knollen. Na 100 –120 dagen werden de visuele symptomen beoordeeld. Bonde et al. (1959) beschreef een eenvoudigere toetsmethode waarin de wortels van jonge zaailingen van c. 5 cm groot in een dichte suspensie van Cms werden gedoopt. Na 30 – 50 dagen kon op symptomen worden gescoord. Inoculatie van bewortelde zaailingen gaf in grote lijnen dezelfde resultaten als toetsing van geïnoculeerde knollen.

Er is geen enkel immuun cultivar bekend, wel zijn er diverse rassen met een grote mate van tolerantie. In de VS werd in 1940 het cv. Teton op de markt gebracht, dat in hoge mate resistent (maar niet immuun) was voor ringrot (Riedl et al., 1946; Bonde et al., 1947). Riedl et al (1946) bepaalde in zes opeenvolgende jaren de resistentie van cv. Teton in veldproeven. In vijf jaren van de zes jaren werd er niet of nauwelijks ringrot gevonden; in één jaar was 18% van de planten aangetast. Een gevoelig ras (cv. Katahdin) gaf in dezelfde jaren een percentage ringrot tussen de 80 en 100%. In cv. Teton werden ook lagere dichtheden van Cms gevonden dan in de gevoelige cultivars (Starr & Riedl., 1948). Resistente cultivars bleken t.o.v. gevoelige cultivars geen

bacteriën met een verhoogde virulentie uit te selecteren. In studies van Bonde et al. (1942, 1947) werden ook resistenties gevonden in het Nederlandse cv. Friso en het Britse cv. President. In kruisingen waarbij één van de ouders resistent voor ringrot was bleek een hoog percentage van de nakomelingen ook resistent. In 1955 werd cv. Merrimack in de VS geïntroduceerd met een grote mate van tolerantie van ringrot en resistent voor de aardappelziekte *Phytophthora infestans* (Akeley et al., 1955). Merrimack had cv. President als één van de voorouders.

Resistentie werd ook gevonden in *Solanum demissum*, *S. emmeae*, *S. phureja*, *S. kessebrenneri*, *S. semidemissum* en *S. jamessii* (Dunin, 1962). Door Knorr (1948) werd gesuggereerd om *Solanum demissum* als bron van resistentie te gebruiken bij veredeling voor ringrot omdat deze soort immuun is.

## **8.6. Schoon uitgangsmateriaal**

Eradicatieprogramma's uitgevoerd om pootgoedlijnen vrij te krijgen van Cms zijn opmerkelijk succesvol geweest. Al in 1941 werd intensief gewerkt aan het ringrot-vrij maken van pootgoed met een lage incidentie van ringrot (Glick, 1941). Hiervoor werden stengelprints microscopisch beoordeeld met een Gram-kleuring. Via veldtoetsingen en laboratoriumtoetsen werden uiteindelijk 21 van de 23 lijnen van 10 verschillende cultivars vrij van Cms. Van 1983 tot 1992 werd tijdens een intensieve campagne ook in Finland het aantal besmette pootgoedlijnen teruggebracht van c. 300 in 1983 tot c. 20 in 1992 (Karjalainen et al., 1995). Het meest opmerkelijke succes is geboekt in Canada, waar men door een pakket aan maatregelen gericht op het ringrot-vrij krijgen van m.n. pootgoed een 'functionele eradicatie' heeft bereikt. In de jaren 1981 tot 1992 werd al een drastische verlaging van het aantal ringrot-besmette partijen bereikt (tabel 6), terwijl in de laatste 7 jaar in Oost-Canada nog slechts sporadisch latente besmettingen in pootgoed worden aangetoond (De Boer, 1999).

Bij eradicatieprogramma's is wel gebruik gemaakt van steriele weefselkweek vermeerdering (Nelson, 1986). De ringrot bacterie infecteert het vaatbundelweefsel en wordt in het algemeen niet in de apicale gedeeltes van de plant gevonden. Toch heeft weefselkweek niet geleid tot een volledige uitsluiting van de bacterie. Cms groeit niet op de media die gebruikt worden voor weefselkweek en kunnen daardoor onopgemerkt persisteren in cultures (De Boer, 1994).

Tabel 6. Aantal op ringrot getoetste en met ringrot geïnfecteerde partijen pootgoed op Prince Edward Island (Canada) in de periode van 1981 – 1992

Teelt jaar	totaal aantal getoetste partijen	Aantal geïnfecteerde partijen	Percentage geïnfecteerd
1981	161	6	3,7
1982	185	0	0
1983	273	14	5,1
1984	301	10	3,3
1985	802	18	2,2
1986	1400	4	0,3
1987	1400	8	0,6
1988	1300	4	0,3
1989	1500	2	0,1
1990	1500	0	0
1991	1925	1	0,05
1992	2435	1	0,04

## 9. Identificatie

Voor betrouwbare identificatie dient men eerst een reïncultuur van de bacterie in handen te hebben. Een essentieel onderdeel van de identificatie is de pathogeniteitsproef, die voor Cms in het algemeen op aubergine wordt uitgevoerd (zie 10.8). Met klassieke determinatiemethoden gebaseerd op verschillende biochemische toetsen waarmee de fysiologische eigenschappen van de bacterie wordt bepaald, kan Cms betrouwbaar geïdentificeerd worden. Er zijn verschillende van deze toetsen die Cms discrimineren van andere *Clavibacter* subspecies (Bugbee et al., 1987). Een alternatief hiervoor is een identificatie m.b.v. vetzuuranalyse. Tenslotte zijn serologische toetsen en de Gram-kleuring belangrijke instrumenten bij het uitvoeren van een correcte identificatie. Meer recentelijk zijn genetische vingervorm methoden beschikbaar gekomen, zoals rep-PCR waarmee een voor Cms karakteristiek patroon wordt verkregen dat afwijkt van andere *C. michiganensis* subspecies (Louws et al., 1998; Stead, pers. com.).

Voor het bepalen van de fysiologische eigenschappen wordt ook wel gebruik gemaakt van Biolog, een geautomatiseerd systeem waarbij men in een microplaat simultaan 95 toetsen uitvoert op de benutting van koolstofbronnen. Biolog bleek slechts in c. 50% van de onderzochte stammen Cms correct te kunnen identificeren (Harris-Baldwin & Gudmestad, 1996). Vaak werd Cms abusievelijk geïdentificeerd als *Curtobacterium*. Inmiddels zijn er nieuwe platen en software beschikbaar gekomen, die volgens Biolog met name voor Gram-positieve bacteriën betere resultaten geven.

Voor analyse van de vetzuren van de bacteriecelwand met behulp van gaschromatografie wordt gebruik gemaakt van een geautomatiseerd systeem (Hewlett Packard). Met dit systeem is met

een hoge mate van nauwkeurigheid de identiteit van Cms te bepalen (Gudmestad et al., 1988). Het systeem is ook gebruikt om Cms rechtstreeks in de knol te detecteren (Jager et al., 1990). Geïnoculeerde extracten bleken een voor Cms karakteristiek patroon op te leveren dat afweek van bijvoorbeeld met Cmm geïnoculeerde extracten.

## **10. Detectie**

### **10.1. Introductie**

Vanuit de oude literatuur is het duidelijk dat controle op ringrot d.m.v. veldinspecties of visuele beoordeling van knollen volstrekt onvoldoende is, en dat latente infecties een belangrijke rol spelen bij de verspreiding en in stand houding van de ziekte (Dykstra, 1942; Raeder, 1949). Een gevoelige laboratoriumtoets op knollen of de stengelbasis bij voorkeur aan het einde van het groeiseizoen is noodzakelijk voor betrouwbare controle van pootgoed op de aanwezigheid van Cms. In tabel 7 is een overzicht gegeven van de verschillende karakteristieken van beschikbare laboratoriumtoetsen.

### **10.2. Bemonstering**

*10.2.1. Individuele knollen vs. mengmonsters.* In de praktijk wordt veel gewerkt met mengmonsters van naveleinden van 200 knollen of een veelvoud daarvan. Hoewel er geen gedetailleerd onderzoek gedaan is aan de kans op detectie bij bemonstering van individuele knollen in vergelijking met bemonstering van mengmonsters, lijkt één besmette knol zoveel Cms cellen te bevatten, dat dit in veel gevallen zal leiden tot detectie van Cms in mengmonsters.

*10.2.2. Stengel vs. knol.* Cms kan zowel in de stengel als knol betrouwbaar gedetecteerd worden. Stengels representeren meerdere knollen en met bemonstering van stengels wordt derhalve sneller een representatieve steekproef bereikt. Bovendien kunnen stengels eerder in het seizoen bemonsterd worden en laten stengels een random bemonstering toe (De Boer, 1991). Het basale gedeelte van de stengel bevat hogere dichtheden Cms dan de topstengel (zie 7). De bacterie verspreidt zich via de vaatbundel vanuit de geïnfecteerde stengel via de stolonen naar de dochterknollen. Bij resistentere rassen verloopt het infectieproces traag en bereikt de bacterie de knollen soms niet. Bij deze rassen werd dan ook een significant grotere detectiekans geconstateerd voor stengel- dan voor knolmonsters (De Boer & Hall, ?; De Boer & Hall, 1996).

Verder bevatten stengelextracten minder minerale componenten uit grond en minder saprofytische bacteriën, wat met name in ELISA tot lagere achtergrondwaarden leidt (De Boer et al., 1994). Bemonstering van de (onderste) bladstengels leek in sommige studies net zo betrouwbaar als van de stengelbasis (De Boer & Hall, ?), maar lijkt in de praktijk uiteindelijk toch minder betrouwbaar, mogelijk omdat Cms het vaatsysteem in de stengel slechts aan één kant koloniseert. Sherf (1944) vond ook een consistente infectie van de wortels, hoewel dit nergens wordt bevestigd. Wortels zouden in potentie ook bemonsterd kunnen worden.

*10.2.3. Aantal monsters.* Om er 100% zeker van te zijn dat een partij vrij is van Cms zouden alle planten of knollen getoetst moeten worden. Omdat dit praktisch onuitvoerbaar is, wordt slechts een deel van de partij getoetst om zo een schatting te maken van de waarschijnlijkheid dat een partij vrij is van cms.

De Boer (1991) rekende uit dat bij een betrouwbaarheidsinterval van 95% er 1600 planten bemonsterd moeten worden wil een ziekteincidentie van 0.19% nog opgemerkt kunnen worden. Bij deze berekening werd uitgegaan van een gevoeligheid en specificiteit van de test van 100%. Turkensteen (1996) heeft bij een betrouwbaarheidsinterval van 95% en 99% uitgerekend wat de kans is ten onrechte partijen gezond te verklaren uitgaande van verschillende monstergroottes (tabel 8). Binnen de EU worden per 25 ton aardappelen 200 knollen te toetsen. Tabel 8 geeft aan dat bij deze monstergrootte de kans 95% is dat bij een gezond verklaring de ziekteincidentie lager is dan 1.8%. In 5% van de gevallen kan deze besmetting hoger zijn. Deze data laten zien dat er bij bemonstering van 200 knollen er nog steeds een aanzienlijk risico op vals-negatieve uitslagen bestaat. Het bemonsteren van 200 stengels i.p.v. 200 knollen zou de betrouwbaarheid van de toetsprocedure significant kunnen verbeteren.

Tabel 8. Betrouwbaarheidsintervallen voor percentages betreffende knolmonsters

Aantallen getoetste knollen	Betrouwbaarheidsinterval 95%	Betrouwbaarheidsinterval 99%
30	0.0 – 11.6	0.0 - 16.2
50	0.0 – 7.1	0.0 – 10.1
100	0.0 – 3.6	0.0 – 5.2
200	0.0 – 1.8	0.0 – 2.6
300	0.0 – 1.4	0.0 – 2.0
500	0.0 – 0.7	0.0 – 1.1
1000	0.0 – 0.3	0.0 – 0.5

*10.2.4. Bemonsteringsstrategie.* Bij bemonstering van stengels in het veld is het nog enigzins doenlijk om een 'random' monster te verkrijgen. Hiervoor werden verschillende strategieën beschreven (De Boer, 1991). Bij de oogst kan er van geselecteerde rijen knollen worden



verzameld om een representatief monster te verkrijgen. In een bulk partij opgeslagen knollen wordt het ondoenlijk.

Tijdens de bewaring lijken de dichtheden van Cms in de knol weinig te veranderen, hoewel hier geen gedetailleerd onderzoek aan verricht is. Het moment waarop knollen na de oogst onderzocht worden, lijkt daarom vanuit bemonsteringsoogpunt minder belangrijk.

*10.2.5. Extractiemethoden.* Naast partijbemonstering van knollen of planten is ook de wijze waarop bacteriecellen uit het weefsel worden vrijgemaakt van belang voor een betrouwbare detectie. Uit knolmateriaal worden de naveleinden uit aardappelknollen genomen na verwijdering van de schil. De naveleinden worden veelal als mengmonster in buffer of water geëxtraheerd. Voor het vrijmaken van de bacteriecellen kan het weefsel met een Waring blender worden vermalen of overnacht in water bij kamertemperatuur worden geschud (Dinesen & De Boer, 1995). Er werden in deze studie hogere celdichtheden bij de schudmethode dan bij de vermaalmethode gevonden. De schudmethode is ook gebruikersvriendelijker en is in veel laboratoria binnen de EU de standaard geworden. Bij overnacht schudden neemt de populatie saprofieten sterk toe, en nam ook de Cms populatie toe (factor 10). In dit experiment werd gebruik gemaakt van metabolisch actieve cellen van Cms gegroeid op een agar medium, die aan het extract werden toegevoegd; dit kan de groei van Cms gunstig beïnvloeden. De toename van saprofieten leken in deze studie niet van invloed te zijn op de ELISA of IF resultaten. In de schudvloeistof kan Cms direct worden gedetecteerd. Het vermalen weefsel wordt eerst gefiltreerd. Om de gevoeligheid van de techniek te verhogen, kunnen de bacteriën d.m.v. centrifugering worden geconcentreerd. Geconcentreerde en niet-geconcentreerde extracten gaven in ELISA identieke resultaten. Blijkbaar komen tijdens resuspenderen van geconcentreerde monsters, opnieuw grote hoeveelheden oplosbaar antigeen vrij. In IF worden na concentratie hogere celdichtheden per beeldveld gevonden dan daarvoor.

### **10.3. Visuele inspectie**

Visuele inspectie van aardappelen op ringrot is uiterst lastig. Volgens de literatuur kunnen ervaren controleurs bij gunstige condities voor symptomontwikkeling, ringrot nog terugvinden in een veld met een ziektepercentage van 0.01 - 0.1% (Slack, 1987; Fernow, 1944). Het kan bij gebruik van latent geïnfecteerde knollen wel 2 tot 3 jaar duren voordat de ziekte manifest wordt in het veld (Fernow, 1944).

## 10.4. Uitplaatmethoden

Cms groeit zowel op vaste agarmedia als in vloeibare media traag. Bij isolatie vanuit natuurlijk geïnfecteerd weefsel kan het wel 8 dagen duren voor er kolonies zichtbaar zijn. De kans dat het pathogeen overgroeid wordt door andere pathogenen tijdens het groei op agar media is dan ook groot. Ook in de plant vermenigvuldigt Cms zich relatief traag t.o.v. pathogene bacteriën als pectinolytische *Erwinia* spp. en *Ralstonia solanacearum*. Pas relatief laat in het groeiseizoen worden symptomen zichtbaar. De minimum groeitemperatuur ligt op 3-4 °C, de maximum groeitemperatuur op 30-31 °C, terwijl de bacterie optimaal groeit bij een temperatuur tussen de 20 en 23 °C. Bij het toetsen van twee Cms isolaten bij 21, 23 en 25 °C werd significant betere groei bij 23 dan bij 21 en 25 °C vastgesteld (Jansing & Rudolph, 1998).

Een geschikt agar medium is uiterst belangrijk voor isolatie en identificatie van dit quarantaine pathogeen. De precieze nutriënten die Cms voor groei nodig heeft zijn niet bekend. Essentieel zijn in ieder geval biotine, nicotinezuur en thiamine (Starr, 1949). Een onbekende factor in gistextract is in staat de groei van Cms aanzienlijk te versnellen.

Tabel 9. Plating efficiëncies voor Cms en saprofytische bacteriën van drie semi-selectieve media

Medium	Plating efficiency (% t.o.v. niet-selectief medium) Cms	Saprofytische bacteriën	Referentie
NCP-88	75-133	1-38 <sup>a</sup>	De la Cruz et al. (1992)
YGMI	91-100	0-10 <sup>b</sup>	Rozen & Van Vuurde (1990)
MTNA	111	c. 1 <sup>a</sup>	Jansing & Rudolph (1998)

<sup>a</sup> saprofyten van aardappelextracten

<sup>b</sup> saprofyten van mestsuspensies

Door specialisten wordt YGM (DeBoer and Copeman, 1974) beschouwd als beste niet-selectief medium (Stead pers. com.; Mansfeld Giese pers. com.; DeBoer, pers. com.). Cms blijkt ook goed te groeien op trypticase soy agar (BBL). Er zijn verschillende pogingen gedaan om agar media selectiever te maken voor Cms. Daarbij werd gekeken naar de benutting van specifieke koolstof- en stikstofbronnen door Cms en het effect van de toevoeging van antibiotica op Cms (Snieszko and Bonde, 1943; De Bruyne et al., 1986; Cruz et al., 1992; Rozen & Van Vuurde, 1990; Jansing & Rudolph, 1998). Van ontwikkelde selectieve agarmedia zoals NCP-88 (Cruz et al., 1992), YGMI (Rozen & Van Vuurde, 1990) en MTNA (Jansing & Rudolph, 1998) zijn de percentages 'plating efficiency' voor Cms en de selectiviteit van het medium t.a.v. saprofyten in

tabel 9 weergegeven. Gebruik van NCP-88 bleek in andere laboratoria ongeschikt voor groei van Cms (DeBoer pers. com.; Stead, pers. com.). Jansing & Rudolph (1998) konden geen groei van Cms op YGMI vinden. Bij het ontwikkelen van semi-selectieve media moet rekening gehouden worden met veranderde fysiologische karakteristieken van Cms stammen die in laboratoria op agar media worden gecultiveerd t.o.v. Cms populaties in natuurlijk geïnfecteerde monsterextracten. Productie van EPS resulteert bijvoorbeeld in een toenemende tolerantie voor antibiotica.

### **10.5. UV-licht**

In de V.S. is het gebruik van UV-licht om ringrot symptomen beter zichtbaar te maken, jarenlang in gebruik geweest (Iverson & Harrington, 1942). Knollen met (lichte) ringrot symptomen laten onder UV een groene fluorescentie zien, door de productie van het vitamine riboflavine door Cms. Echter, ook andere vaatziekten kunnen fluorescentie veroorzaken en deze methode is derhalve weinig specifiek (Iverson & Harrington, 1942). Bij hogere bewaartemperaturen van de knollen dan 4 °C wordt riboflavine snel afgebroken en is de methode niet effectief meer (Burkholder, 1942).

### **10.6. Gram-kleuring**

In 1940 werd de Gram-kleuring geïntroduceerd (Metzger en Glick, 1940). Detectie van Cms vond plaats door vaatbundelweefsel van stengel of knol op microscoopglasjes te drukken, te kleuren en de preparaten te beoordelen met een lichtmicroscop. Er werden echter relatief veel vals-positieve resultaten gevonden door de aanwezigheid van saprofytische Gram-positieve cellen die van nature in de vaten van de aardappelplant voorkomen voor. De aantallen saprofytische vaatkoloniserende bacteriën (endofyten) variëren van gemiddeld 10 cfu per gram knolweefsel tot 10<sup>4</sup> cfu per gram stengel en een relatief hoog percentage van deze bacteriën zijn Gram-positieve staafjes (DeBoer & Copeman, 1974).

Voor kleuring van cellen kan i.p.v. de Gram-kleuring ook Congo rood gebruikt worden (Burkholder, 1942).

## 10.7. Serologische methoden

*10.7.1. Antistoffen.* Voor detectie van Cms zijn geen antistoffen beschikbaar die volledig specifiek zijn voor Cms. Alle tot dusver geproduceerde antistoffen vertonen kruisreacties met andere bacteriën, die in relatief veel aardappelmonsters voorkomen, hoewel vaak in lage aantallen. *Bacillus*, een Gram-positieve bacterie, kan een belangrijk deel van de endofytische flora in knol en stengel vormen, met de nodige risico's op kruisreacties (De Boer & Copeman, 1974). Bij toepassing van immunofluorescentie cel-kleuring (IF) bij keuring van pootgoed, moet vanwege deze kruisreacties een detectiegrens aangehouden worden van een minimaal aantal specifiek-gekleurde cellen per beeldveld. Ook met de monoklonale antistoffen wordt hierdoor een detectiegrens van 5 fluorescerende cellen per beeldveld gehanteerd. Dit beperkt mogelijk samenvoegen van monsters en heeft gevolgen voor de gevoeligheid van de test. In immunofluorescentie-technieken zijn kruisreacties vaak te herkennen aan een afwijkende celgrootte en morfologie of aan een afwijkende kleuringsintensiteit, maar herkenning van kruisreacties vraagt veel ervaring. In ELISA is herkenning van kruisreacties niet mogelijk.

De kwaliteit van het antiserum wordt zowel bepaald door het gebruikte proefdier als door het antigeen dat voor immunisatie gebruikt wordt. De Boer & Copeman (1980) vergeleken de kwaliteit van polyklonale antisera die waren geproduceerd met hitte-behandelde en glutaaraldehyde gefixeerde cellen, met onbehandelde levende cellen, en met een fenol/water extract. Met de behandelde cellen en het fenol/water extract werden antisera met relatief hoge titers in IF en agglutinatie verkregen. Het antiserum tegen de onbehandelde cellen was relatief specifiek in IF.

Met polyklonale antisera zijn in IF kruisreacties aangetoond met bacteriesoorten die taxonomisch verwant zijn aan Cms, zoals met *C. m. subsp. insidiosus* en *C. m. subsp. michiganensis* (De Boer, 1982), maar ook met saprofytische bacteriën die in aardappel en grond voorkomen (Calzolari et al., 1982; Crowley & De Boer, 1982; Miller, 1984). In 1980 en 1981 werd in Canada in gemiddeld 25% van ruim 300 ogenschijnlijk gezonde planten kruisreacties in IF waargenomen (Crowley & De Boer, 1982). Uit deze monsters werden 8 bacteriën geïsoleerd, waarvan 3 Gram-positief, 4 Gram-negatief en 1 Gram-variabel, die morfologisch identiek was aan Cms. Verzadiging van de antistoffen met één isolaat, voorkwam geen kruisreacties met de andere. In ELISA komen ook kruisreacties voor, maar de bacteriën die hiervoor verantwoordelijk zijn, zijn niet geïsoleerd.

Er zijn monoklonale antistoffen geselecteerd tegen celwand-gebonden componenten voor gebruik in IF (mca 9A1, De Boer & Wieczorek, 1984) en tegen een oplosbaar antigeen van Cms voor gebruik in ELISA (mca 1H3, De Boer et al., 1988). Deze monoklonalen vertonen (veel) minder kruisreacties dan de polyklonale antisera, maar zijn ook niet volledig specifiek zijn. Van de ELISA-

monoklonaal werd direct al gerapporteerd dat deze kruisreageerde met 1 saprofiet (*Micrococcus luteus*, De Boer & Hall, ?) uit een panel van 12 saprofieten die geselecteerd waren op basis van kruisreacties met polyklonale antisera. In de initiële screening werden met de IF-monoklonaal geen kruisreacties gevonden met verwante bacteriesoorten, en ook niet met saprofytische bacteriën uit aardappelextracten. De monoklonaal reageerde wel met 19 Cms stammen van verschillende herkomst. Inmiddels zijn er wel kruisreacties in IF met deze monoklonaal geconstateerd (De Boer et al., 1994; Mansfeld-Giese, pers. com.).

De ELISA-monoklonaal blijkt niet te reageren met zgn. niet-mucoïde Cms stammen die niet of nauwelijks extracellulaire polysacchariden (bacterieslijm) produceren (Baer & Gudmestad, 1993). Er zijn recentelijk aanwijzingen verkregen dat ook de IF-monoklonaal bepaalde Cms -stammen niet detecteert of slechts een zwakke kleuring geeft (Stead, UK, pers. com.). Bij gebruik van monoklonalen moet er voor gewaakt worden dat alle fenotypische varianten van Cms gedetecteerd worden. De meeste polyklonale antisera detecteren tot dusver alle bekende fenotypische varianten, waaronder de niet-mucoïde varianten van Cms (Bishop et al, 1988). De monoklonale antistoffen zijn commercieel verkrijgbaar bij het Amerikaanse bedrijf Agdia.

*10.7.2. Agglutinatie.* Clafin en Sheppard (1977) vonden met een antiserum geproduceerd tegen gewassen levende bacteriën in een agglutinatie-test een specifieke reactie met Cms; verwante *Clavibacter* soorten gaven geen kruisreacties. Ook kon Cms met deze test effectief gedetecteerd worden in aardappelknol- en stengelextracten. Slack et al. (1978) vonden echter met een antiserum tegen glutaaraldehyde-gefixeerde cellen wel in de agglutinatie-test, maar niet in IF kruisreacties met fylogenetisch verwante *Clavibacter* soorten. De gevoeligheid van de agglutinatie-test was  $2 \cdot 10^7$  cellen per ml, terwijl in dezelfde studie IF een veel hogere gevoeligheid had van  $2 \cdot 10^2$  cellen per ml.

Bij evaluatie van praktijkmonsters met IF en agglutinatie werd een goede correlatie tussen beide toetsmethoden gevonden, hoewel er, ondanks de lagere gevoeligheid van de agglutinatie-test, met deze test meer vals-positieve resultaten werden gescoord dan met IF (De Boer et al., 1989)

*10.7.3. Immunofluorescentie cel-kleuring (IF).* Bij deze methode wordt Cms gedetecteerd door de cellen in de monsterextracten te fixeren op een microscoopglasje en daarna te kleuren met specifieke antilichamen voorzien van een fluorescerende kleurstof.

In IF kunnen kruisreacties door ervaren laboranten vaak (maar niet altijd) herkend worden op basis van afwijkende celgrootte en vorm of op basis van de kleuringsintensiteit. Het gebruik van verschillende antiserumverduunningen voor de beoordeling van monsters, waardoor kruisreactie

uitgetitreerd worden, speelt hierbij ook een belangrijke rol. Overigens moet er rekening mee gehouden worden dat verschillende Cms stammen kunnen variëren in titer (antiserumverduunning waarbij nog een brillante kleuring te zien is) (Bruyne et al., 1986). De techniek is snel (< 48 uur), relatief eenvoudig en relatief gevoelig (c.  $10^4$  cellen per ml). De gevoeligheid is overigens direct afhankelijk van het aantal microscoopvelden dat beoordeeld wordt.

Voor uitvoering van IF zijn schone preparaten nodig, vrij van grove autofluorescerende monsterdeeltjes, waardoor de monstervoorbereiding t.o.v. ELISA extra tijd kost.

IF werd ook gebruikt voor *in situ* detectie van Cms in stengels van aardappelplanten. Hiervoor werden de stengeldelen gefixeerd, gedehydrateerd en ingebed in paraffine (Stefani, 1989). Coupes werden geïncubeerd met Cms antistoffen en daarna m.b.v. UV microscopie beoordeeld. Cms werd in de houtvaten en incidenteel in de intercellulaire ruimtes getraceerd.

*10.7.4. ELISA.* Bij deze methode worden bacterieproducten (antigenen) geïmmobiliseerd op de wand van kunststof microtiterplaten. Specifieke Cms-antilichamen voorzien van een marker (enzym) maken de aanwezigheid van de antigenen zichtbaar, door een enzymatische reactie die een kleuromslag geeft.

De mogelijkheid om de uitvoering van ELISA te automatiseren, maakt deze techniek uitzonderlijk geschikt voor het verwerken van grote aantallen monsters. De techniek is relatief snel (< 48 uur) en weinig storingsgevoelig.

De beperkte gevoeligheid van de techniek ( $10^5$ - $5 \times 10^6$  cellen/ml) wordt door sommigen als een zwak punt van ELISA ervaren (Corbiere et al., 1987) In Canada heeft men echter goede ervaring met het gebruik van ELISA, gebaseerd op het gebruik van monoklonaal 1H3, voor keuring van pootgoed. Men acht daar de gevoeligheid van ELISA gelijk aan die van IF. Door zorgvuldig te werken (blocking, wassen) weet men de achtergrond zeer laag te houden (ELISA-waarde <0.05), waardoor men de drempelwaarde op 0.1 kan leggen.

Het aantal vals-positieve reacties kan afhankelijk van de ervaring van het laboratorium met de techniek oplopen tot c. 30%, waardoor veel extra nawerk verricht moet worden (De Boer et al., 1994). Vals-positieve reacties kunnen niet, zoals met IF, op basis van celmorfologie of kleuringsintensiteit herkend worden of door middel van het gebruik van lage antiserumverduunningen voorkomen worden (Corbière et al., 1987). ELISA kan slechts op semi-kwantitatieve wijze gebruikt worden omdat de hoeveelheid oplosbaar antigeen per cel kan variëren (De Boer, 1991). Net als bij gebruik van ELISA voor andere bacteriën is de directe format (DAS-ELISA) specifiekere dan de indirecte format (Jansing, 1991). In deze studie werd een grotere specificiteit met konijnen- dan van kippen-antistoffen gevonden voor detectie van Cms.

Een adequaat gebruik van positieve en negatieve controles en een zorgvuldige data-analyse maken betrouwbare gebruik van ELISA voor detectie van Cms in pootgoed mogelijk (De Boer et al., 1996). Door transformatie van OD-waarde op basis van de controles die op elke plaat aanwezig horen te zijn, worden plaatverschillen zo veel mogelijk vermeden. Verder dienen drempelwaardes zorgvuldig bepaald te worden (De Boer et al., 1996).

In stengeldelen van afstervende planten werden relatief hoge achtergrondwaarde in ELISA gevonden, mogelijk als gevolg van hoge concentraties kruisreagerende saprofieten in het vaatweefsel laat in het seizoen (De Boer et al., 1992).

#### *10.7.5. Evaluatie van IF en ELISA*

IF en ELISA werden geëvalueerd in 6 laboratoria voor detectie van Cms in 385 meng monsters van stengel en knolmateriaal, waarvan 88 daadwerkelijk besmet met Cms (De Boer et al., 1994). Met ELISA wist slechts een laboratorium alle monsters correct te diagnosticeren. De gevoeligheid, uitgedrukt als het aantal gedetecteerde echt-positieve monsters op het werkelijke aantal echt-positieve monsters was voor stengels gemiddeld 97.7% en voor knollen gemiddeld 93.3%. De specificiteit, uitgedrukt als het aantal beoordeelde echt-negatieve monsters op het werkelijke aantal echt-negatieve monsters was voor stengels en knollen gemiddeld respectievelijk 90.1 en 86.7%.

Met IF waren drie laboratoria in staat alle monsters besmet met Cms correct te diagnosticeren. De gemiddelde gevoeligheid van de IF test was 97.3 en 90.9% voor respectievelijk stengels en knollen. De gemiddelde specificiteit was 97.8 en 98.5% voor respectievelijk stengels en knollen. Wanneer slechts één van de twee toetsen, IF of ELISA positief hoefden te zijn, dan werd een gevoeligheid van 100% gehaald. Uit deze gegevens blijkt dat gemiddeld genomen IF beter op gevoeligheid en specificiteit scoort dan ELISA en Cms betrouwbaarder in stengeldelen dan in knolmateriaal kan worden aangetoond.

Het beeld dat aan het gebruik van ELISA de nodige bezwaren kleven, wordt bevestigd door onderzoek waarin men 270 individuele knollen en 900 stengeldelen van geïnfecteerd pootgoed in vijf laboratoria heeft onderzocht met ELISA (De Boer et al., 1992). Wanneer minimaal drie van de vijf laboratoria een monster positief scoorden met ELISA, werd het monster positief gerekend, oordeelden minimaal drie laboratoria een monster negatief, dan werd het negatief gerekend. Het percentage stengel en knolmonsters dat in overeenstemming was met de consensus uitslagen varieerde tussen de laboratoria van 65.5 – 96.7%.

In een vergelijkende studie binnen één laboratorium werd wel een goede correlatie gevonden tussen IF en ELISA resultaten (De Boer & Hall, ?). In een recente studie vond De Boer bij een

screening van 34 monsters, waarvan 24 besmet met ringrot, er 2 die wel in ELISA en PCR, maar niet in IF positief scoorden (De Boer, 1999). Overigens werden in deze vergelijking monsters gebruikt, die geselecteerd waren op basis van een ELISA-positieve uitslag.

*10.7.6. Immunofluorescentie-koloniekleuring (IFC).* IFC is een methode waarbij, Cms cellen in de matrix van een agar medium kolonies vormen (gietplaten), en na kolonie-vorming worden gekleurd met specifieke antistoffen voorzien van een fluorescerende merker (Roozen en Van Vuurde, 1991). Monsters, zoals aardappelknolextracten, worden gemengd met een geschikt agar medium dat eerst door verhitting vloeibaar is gemaakt en daarna is afgekoeld tot een temperatuur van c. 45 °C. De platen worden enkele dagen geïncubeerd bij 21 °C, zodat de bacteriën in het medium kunnen uitgroeien, waarna de Cms kolonies worden gekleurd met de specifieke gemerkte antistoffen. De gekleurde kolonies kunnen worden waargenomen met behulp van UV-microscopie.

Met deze methode konden cultiveerbare Cms cellen worden aangetoond op een niveau van c.  $10^5$  cfu/ml in vloeibare mest. De recovery van Cms werd negatief beïnvloed door hoge aantallen saprofytische mestbacteriën, die in de gietplaten uitgroeiden en onvoldoende geremd konden worden door toevoeging van specifieke antibiotica aan het agarmedium. Ook de 'IF-monoklonaal' 9A1 (zie 10.7.1.) gaf een goede fluorescentie, terwijl de 'ELISA-monoklonaal' 1H3 een halo van fluorescerende oplosbare antigenen rond de kolonie te zien gaf. De IFC preparaten kunnen na gietplaten ingedroogd en minstens 18 maanden bewaard worden en geven daarna na kleuring nog steeds uitstekende kleuringsresultaten (Jansing, 1991). Er werd niet bepaald of de bacteriën daarna nog levend waren.

Sterke punten van deze techniek is dat kwantitatief cultiveerbare bacteriën kunnen worden aangetoond, waardoor de techniek m.n. waardevol is in epidemiologische studies. In het algemeen is de interferentie met saprofytische bacteriën minder dan bij groei op agarplaten, waardoor de 'plating efficiency' hoger is dan bij uitplaten. Verder blijven de bacteriën tijdens het hele detectieproces levend, en kunnen ze vanuit de fluorescerende kolonies worden geherisoleerd. Een negatief punt is dat het vrij grote verbruik van gemerkte antistoffen. Verder geldt zoals voor alle isolatietechnieken dat Cms vaak moeilijk vanuit besmet aardappelweefsel uitgroeit op agar media (zie 10.4), gedeeltelijk door interferentie met snelgroeïende saprofytische bacteriën.

*10.7.7. Immunoïsolatie.* Cms kan uit complexe substraten worden geïsoleerd m.b.v. specifieke antilichamen gehecht aan een vaste drager zoals polystyreen (van microtiterplaten) of paramagnetische deeltjes (Jansing, 1991). Na hechting van de Cms cellen aan de



geïmmobiliseerde antistoffen en het wegwassen van niet gebonden materiaal, kan de bacterie worden uitgeplaat of op andere wijze worden gedetecteerd. Nadeel van deze methode is dat relatief veel Cms cellen tijdens de isolatie worden weggewassen waardoor de detectiegrens negatief beïnvloed wordt.

## 10.8. Bioassays

In bioassays worden gevoelige indicatorplanten geïnoculeerd met ruwe monster-extracten of suspensies van reïncultures. De indicatorplanten fungeren in de eerste plaats als 'verrijkingsmedium' waarmee het pathogeen selectief wordt opgehoopt. Zo vond Langerfeld (1990) met IF direct uitgevoerd op het knolweefsel minder positieve monsters dan na een bioassay met aubergines gevolgd door IF-beoordeling van de toetsplant. Typische symptomen in de indicatorplant worden ook gebruikt bij het stellen van een diagnose. Voor Cms wordt in het algemeen de aubergine (*Solanum melongena*, cultivar 'Black Beauty') gebruikt. Tomaat wordt ook wel gebruikt als indicatorplant, maar blijkt minder goed in staat lage dichtheden Cms te verrijken tot detecteerbare hoeveelheden (Stead, pers. com.). De aubergine wordt uit zaad opgegroeid tot het derde blad is verschenen. In de stengel wordt een sneetje gemaakt, waarin het monsterextract of de bacteriën m.b.v. een pipet of kwastje worden opgebracht. De wond wordt dichtgemaakt met vaseline en de plant wordt gedurende 8 weken verder gekweekt, of tot het moment dat er symptomen zichtbaar zijn.

De symptomen bestaan uit glazige donkere vlekken en verwelkte gedeeltes van de bladrand. Het aangetaste weefsel wordt lichter en necrotiseert, waarbij de randen vaak helder geel zijn. Van planten met symptomen wordt de steel van het blad met ziekteverschijnselen bemonsterd. Van symptoomloze planten wordt een deel van de stengel boven het inoculatiepunt gebruikt.

De bacteriegroei in en het ontstaan van symptomen in de eierplanttest is afhankelijk van verschillende factoren. Zo is er een negatief verband tussen inoculumdichtheid en latentieperiode (aantal dagen tot er symptomen zichtbaar zijn) en een positief verband tussen de ouderdom van de plant en latentieperiode (Bishop & Slack, 1987; Lelliott & Sellar, 1976). Verder werden er significante verschillen gevonden tussen Cms isolaten m.b.t. latentieperiode (Bishop & Slack, 1987). Bruyne et al. (1986) vond met 11 van de 45 getoetste stammen helemaal geen symptomen op aubergine. De aanwezigheid van *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, een bacterie die de aardappelziekte zwartbenigheid kan veroorzaken, maar ook van andere antagonistische bacteriën in de extracten, kan negatief werken op symptoomvorming (Olsson, 1976). Verder kan *Verticillium albo-atrum* en *Ralstonia solanacearum* symptomen veroorzaken die

verward kunnen worden met ringrot symptomen. Tenslotte kan ook *Erwinia chrysanthemi* symptomen veroorzaken die lijken op symptomen in de vroege fase van een ringrot infectie (Persson & Janse, 1988). Echter bij inoculatie met *Erwinia chrysanthemi* wordt het vaatweefsel van de bladstelen bruin of zwart; dit wordt nooit gevonden bij inoculatie met Cms.

Bij gebruik van de aardappel als toetsplant, kan het beste worden uitgegaan van wortelgeïnoculeerde planten gegroeid van stengeldelen die behandeld zijn met indole-3-butyric acid (IBA). (Nelson et al. , 1971). Ontwikkeling en expressie van de ziekte verloopt na behandeling met IBA sneller en heftiger dan van niet-behandelde stengeldelen.

## 10.9. Moleculair-biologische detectiemethoden

*10.9.1. Primers en probes.* Moleculair-biologische detectiemethoden richten zich op detectie van (specifieke) nucleinezuren (DNA/RNA) van de bacterie. In zowel dot-blot methodes als amplificatiemethodieken (PCR) is detectie gebaseerd op hybridisatie-reacties met specifieke stukjes DNA (probes of primers). De selectie van probes en primers voor Cms is op verschillende wijze uitgevoerd. Li & DeBoer (1995a) bepaalden de totale sequentie van het 16S ribosomaal DNA en vergeleken dit met de sequenties van andere *Clavibacter* (sub)species. Sequenties van rDNA is populair omdat deze genen naast geconserveerde regio's ook hypervariabele stukken voorkomen die voor specifieke detectie veel gebruikt worden. De sequenties komen in meerdere copieën voor, wat de gevoeligheid van een assay gebaseerd op deze sequenties ten goede zal komen. Bovendien kunnen de sequenties ook gebruikt worden in assays gericht op detectie van rRNA moleculen (Li et al., 1997). Ribosomaal RNA komt in zeer veel copieën voor in actieve cellen en worden in diverse assays, zoals in FISH (zie 10.9.4) als target gebruikt. De 16S rRNA sequenties van de diverse *Clavibacter michiganensis* subspecies vertoonden een sterke homologie met die van Cms, met een dissimilariteit van 0.3- 0.7% (Li & De Boer, 1995). Desondanks konden er toch specifieke PCR-primers geselecteerd worden.

Ook de RNA intergenic spacer regions (ISR), die bij bacteriën tussen de 5S, 16S en 23S genen in liggen worden veel gebruikt voor primer of probe design. Op deze regio's vindt minder selectiedruk plaats en hebben daardoor vaak een grotere variatie dan 16S rDNA sequenties. Op basis van het ISR tussen 16S en 23S rDNA werden specifieke PCR primers geselecteerd (Li & De Boer, 1995b).

Verder werden er specifieke primers geselecteerd m.b.v. genomic subtraction (Mills et al., 1997). Hierbij werd DNA van Cms geknipt met een restrictieënzym, en gehybridiseerd met geknipt DNA van een verwante bacterie waarbij elk knipfragment was voorzien van een

biotinemolecuul als merker. Na hybridisatie werden alle gemerkte dsDNA moleculen verwijderd met streptavidine gemerkte-probes, waarna specifieke fragmenten overbleven. Verreault et al. (1988) paste een at random benadering toe om vanuit het totaal DNA specifieke Cms fragmenten te selecteren.

Cms draagt een autonoom replicerend plasmide, dat ook geïntegreerd in het chromosoom wordt gevonden. Sequenties van dit plasmide zijn ook gebruikt voor selectie van primers (Schneider et al., 1993). Echter, er is minimaal één virulente Cms stam bekend, die geen plasmide heeft en die met verschillende geselecteerde primer paren ook niet gedetecteerd kan worden (Mogen et al., 1988). Ook werden primers en een probe ontwikkeld tegen de repeterende sequenties die zowel op het plasmide gelegen zijn, als geïntegreerd in het genoom (Johansen et al., 1989; Lee et al., 1997). Deze sequenties vertoonden echter homologie met sequenties die op *C. m. subsp. insidiosum* voorkomen.

Naast specifieke primers en probes is er een geschikte extractiemethode nodig om het nucleïnezuur uit de bacteriecel vrij te maken. De cellen van Gram-positieve bacteriën zijn moeilijk open te breken en een makkelijk uitvoerbare methode die reproduceerbaar en efficiënt RNA of DNA uit de celwand kan vrijmaken ontbreekt tot dusver. In veel methoden worden toxische stoffen gebruikt, zoals fenol, chloroform of guanidine-isothiocyanaat. De meest rigide extractiemethode is beschreven door Verreault et al. (1988) die in ons laboratorium (IPO, Wageningen UR) relatief goed werkt.

*10.9.2. DNA hybridisatie.* In de jaren '80 is veel onderzoek gedaan naar detectie van Cms d.m.v. DNA-hybridisatie op een membraanfilter. Hierbij wordt DNA geïsoleerd uit het monstermateriaal (aardappel-extract) gehybridiseerd met een probe (stukje DNA), specifiek voor Cms (Johansen et al., 1989; Verreault et al., 1988; Rademaker et al., 1992). De probe wordt hierbij voorzien van een merker-molecuul, zoals het radioactieve <sup>32</sup>P of het DIG molecuul waarmee de hybridisatie (indirect) vastgesteld kon worden. De detectiegrens onder optimale condities was 1 ng per spot (Verreault et al., 1988) en c. 2.10<sup>4</sup> cellen per spot (Rademaker et al., 1992). Echter de methode is relatief bewerkelijk en hybridisatiecondities zijn kritisch om aspecifieke bindingen te voorkomen. Vaak zijn reacties niet duidelijk positief of negatief.

*10.9.3. Polymerase kettingreactie (PCR).* Er zijn inmiddels verschillende primer sets voor detectie van Cms op basis van PCR-amplificatie beschreven (tabel 9). Mills et al. (1997) ontwikkelde 3 primer sets op basis van sequenties van fragmenten verkregen via genomic subtraction. Li & De Boer ontwikkelde primer sets op basis van ISR en 16S rDNA sequenties. Lee et al. (1997)

ontwikkelde een nested PCR techniek gebaseerd op sequenties tegen het repeterende segment van plasmide pCS1. Verder zijn er ook nog PCR amplificaties ontwikkeld door Karjalainen et al (1995, 1996) en Pastrik et al. (1997), zonder dat bekend is waartegen de primer sets gericht zijn. Bijna alle beschreven primer paren reageerden uitsluitend met de getoetste Cms stammen, en niet met taxonomisch-verwante soorten, waaronder *Clavibacter michiganensis* subspecies. De detectiegrens voor de verschillende methodieken varieerden van voor reïncultures van 1 tot 10 cellen per reactie (tabel 10). De detectiegrens in aardappelextracten is sterk afhankelijk van de gebruikte zuiveringsprocedure. Met name de PCR ontwikkeld door Mills et al (1997) en die ontwikkeld door Pastrik et al (1997) lijken in evaluatie-experimenten specifiek te zijn voor Cms.

Tabel 10. Specificiteit en gevoeligheid van verschillende PCR-amplificatie methodieken voor detectie van Cms

Primer paar	Aantal getoetste Cms stammen/aantal positief	Aantal getoetste niet-target stammen/aantal positief	Detectiegrens voor reïncultuur (cellen per reactie)	Detectiegrens in aardappelknol-extract (cellen per reactie)	Referentie
Cms50	29/29	27/0	1	10	Mills et al., 1997
Cms72	29/29	27/0	1	10	Mills et al., 1997
Cms85	29/29	27/0	1	10	Mills et al., 1997
Sp1f/Sp5r	24/24	68/0	5	nb <sup>a</sup>	Li and DeBoer, 1995
CMS1F1/CMS1R1	5/0	30/1	nb	10.000	Lee et al. (1997)
CMS1F1/CMS1R1 + CMS1F2/CMS1R2 (nested PCR)	5/0	30/0	n	100	Lee et al. (1997)

<sup>a</sup> in een vergelijking met IF en ELISA had PCR ten minste dezelfde gevoeligheid

nb = niet bepaald

Vanwege het gevaar op PCR-remmende extract componenten dient elk monster in de PCR hierop deugdelijk gecontroleerd te worden. Dit kan op efficiënte wijze door gebruik van een interne controle template (Hu et al., 1995). Hierbij wordt in een plasmide een stukje DNA gecloneerd dat met de specifieke Cms primers een PCR product oplevert dat kleiner of groter is dan het PCR-product met een Cms stam. D.m.v. gelelectroforese, waarbij fragmenten op grootte worden gescheiden kan onderscheid gemaakt worden tussen de product van de controle template en het product dat ontstaat als gevolg van de aanwezigheid van Cms. De interne controle template kan ook gebruikt worden voor een kwantitatieve PCR (Hu et al., 1995). Immers, de verhouding tussen de hoeveelheid amplicons (amplificatieproducten) van de controle template, die altijd in een vaste hoeveelheid aan elk monster wordt toegediend, en de hoeveelheid amplicons afkomstig van Cms,

is een maat voor de hoeveelheid Cms die aanvankelijk (voor de PCR) in het monster aanwezig was.

De remming van PCR door plantenstoffen zoals polyfenolische verbindingen kan effectief voorkomen worden door toevoeging van magere melkpoeder ('Blotto') in de PCR reactiemix (De Boer et al., 1995). DNA werd uit aardappelsap geëxtraheerd door lysis van de cellen in een buffer met 1% SDS, een proteinase K behandeling gevolgd door een isopropanol precipitatie. Hierna kon slechts in 7 van de 13 monsters Cms gedetecteerd worden, terwijl na toevoeging van Blotto alle geïnfecteerde monsters positief waren. De optimum concentratie melkpoeder varieert van 1-5%, en is afhankelijk van de batch Taq polymerase.

De electroforese van PCR-producten en de kleuring van DNA in de gel met het mutagene ethidium, wordt nog altijd als lastig en tijdrovend ervaren. Door de firma Perkin & Elmer het Taqman systeem ontwikkeld waarbij een probe aan het monster wordt toegevoegd die als de probe hybridiseert met de gegenereerde amplicons een fluorescerend signaal ontwikkeld. De extra hybridisatiestap met de Taqman probe maakt het systeem zo specifiek dat analyse van amplicons d.m.v. gelelectroforese achterwege gelaten kan worden. Het signaal kan tijdens de reactie ('on line'), of na afloop van de PCR m.b.v. een fluorescentiemeter bepaald worden. Op basis van de CMS50 primers beschreven door Mills et al (1997) werd ook voor detectie van Cms een Taqman PCR ontwikkeld (Schaad et al., 1998). De Taqman PCR detecteerde wel 15 Cms stammen, maar niet 18 niet-target stammen waaronder 17 fylogenetisch verwante soorten. De Taqman PCR werd nog gevoeliger gemaakt door voor de PCR een microbiële verrijking van Cms uit te voeren op het semi-selectieve medium NCP-88 (TaqMan BIO-PCR).

*10.9.4. Fluorescence in situ hybridisatie (FISH).* In FISH worden fluorescent gemerkte oligonucleotide gebruikt voor in situ hybridisatie van ribosomaal RNA in cellen die op microscoopglasjes gefixeerd zijn (Li et al. , 1997; Mirza et al., 1993). Na hybridisatie kunnen de fluorescerende cellen zichtbaar gemaakt worden m.b.v. UV-microscopie. Voor detectie van Cms m.b.v. FISH werd een probe ontwikkeld gericht tegen sequenties op het variabele V6 van 16S rRNA. Voor penetratie van de probe door de celwand moet deze eerst permeabel gemaakt worden met een combinatie van eiwitplitsende enzymen, glutaaraldehyde of formaldehyde, SDS en ethanol, wat de procedure relatief lang maakt. De kleuring van Cms cellen is vaak zwak, en voor voldoende contrast wordt veelal gebruik gemaakt van beeldanalyse met een integrator op de microscoop, waardoor beelden bij elkaar worden opgeteld. Li et al. (1997) vonden een specifieke reactie met Cms; 6 Cms stammen reageerden wel, maar 15 andere bacteriestammen, waaronder 13 stammen taxonomisch verwant met Cms, reageerden niet. Echter Beuning et al. (1995)

vonden nog steeds een kruisreactie met *C. m. insidiosus*, *C. m. subsp. nebraskensis* en *C. m. subsp. tessellarius*.

De FISH techniek kan in principe gecombineerd worden met IF waarbij verschillende kleuren labels worden gebruikt voor oligonucleotide en antilichaam. Door met een combinatie van FISH en IF verschillende target moleculen te detecteren (RNA en antigenen) kan de kans op vals-positieve reacties praktisch tot nul gereduceerd worden. Echter, in FISH worden uitsluitend levende (metabolisch-actieve) cellen gedetecteerd, terwijl in IF ook dode cellen gekleurd worden. IF-positieve, FISH-negatieve cellen kan duiden op de aanwezigheid van dode cellen in de preparaten, maar kunnen ook kruisreagerende cellen zijn.

## 11. Toepassing van detectie- en beheersingsmaatregelen in de EU en Canada

### 11.1. Binnen de EU.

De maatregelen van de EU om de ziekte ringrot te beheersen zijn vastgelegd in Council Directive 93/85/EEC (Anonymous, 1993). Het doel van deze richtlijnen is (1) Cms op te sporen en de omvang van de verspreiding vast te stellen, (2) verdere verspreiding te voorkomen, (3) maatregelen te nemen om de ziekte uit te roeien.

Wanneer Cms op een perceel gevonden wordt, mag daar 3 jaar lang geen aardappels op geteeld worden. Gedurende deze tijd moet aardappelopslag geëlimineerd worden en de groei van andere waardplanten voorkomen worden. Het 4e jaar mogen er alleen consumptie-aardappelen geteeld worden, waarna een verplichte rotatieperiode van 2 jaar volgt. Als alternatief, kan i.p.v. 3 jaar ook 4 jaar lang afgezien worden van de teelt van aardappelen (meer algemeen de groei van waardplanten voorkomen worden). In het 5e jaar is dan onder voorwaarde weer teelt van pootgoed mogelijk. Wanneer op een éénmaal geïnfecteerd perceel weer pootgoed wordt geteeld, wordt gewas en oogst extra gecontroleerd op aanwezigheid van Cms. Op velden die grenzen aan geïnfecteerde percelen of op een geïnfecteerd bedrijf liggen, mag minimaal 1 jaar geen pootgoed verbouwd worden.

Na een vondst van ringrot wordt alle transport van verdacht materiaal verboden en de herkomst van de besmetting opgespoord. Er wordt nagegaan met welke percelen en materialen de verdachte partij er contactbesmetting heeft kunnen plaatsvinden. Het gaat hierbij om knolmateriaal, machines gereedschappen en (opslag)ruimtes. Gecontamineerd plantenmateriaal wordt vernietigd, terwijl materialen, schuren en opslagplaatsen worden gedecontamineerd met een effectief desinfectans.

Binnen de demarcatie zone die als besmet wordt beschouwd, worden speciale maatregelen genomen om verspreiding te voorkomen, zoals gescheiden behandeling van consumptie- en pootgoed, extra surveys op gewassen en ontsmetting van ruimtes en gereedschappen.

De voorgeschreven keuringsmethode van aardappelknollen lijkt sterk op de procedure die voor de bruinrotbacterie *Ralstonia solanacearum* wordt gebruikt. Per 25 ton aardappelen worden 200 knollen genomen. De knollen worden gewassen en de schil wordt bij het navelende verwijderd met een steriel mes. Vaatbundelweefsel wordt verzameld en in een buffer vermalen of gedurende 18 uur geschud. De grove bestanddelen worden d.m.v. filtratie of differentiële centrifugering uit de buffer verwijderd. Voor detectie van Cms wordt een Gram-kleuring en immunofluorescentie-

celkleuring (IF) als voorscreening gebruikt. Voor IF mag zowel de monoklonaal 9A1 als een polyklonaal antiserum gebruikt worden. IF-positieve monsters worden verder onderzocht op aanwezigheid van Cms m.b.v. bioassay. Hierbij wordt per monster in de steel van 25 jonge eierplanten, die zich in het 3e bladstadium bevinden, een sneetje gemaakt, waarin het monsterextract wordt gepipetteerd, waarna de wond met vaseline wordt dichtgesmeerd. Gedurende 40 dagen worden de planten bekeken op symptoomontwikkeling. In eierplanten kan Cms ook latent (symptoomloos) in grote aantallen aanwezig zijn. Cms is vanuit de stelen van bladeren met symptomen te kweken op een algemeen agarmedium. Daarna kan met behulp van identificatiemethoden als vetzuuranalyse, BOX-PCR, serologie, Gram-kleuring en fysiologische methoden de identiteit verder vastgesteld worden (zie 9).

Sterke punten van de huidige procedure zijn: De aanwezigheid van virulente Cms bacteriën wordt onomstotelijk vastgesteld. De screening met IF kan binnen 1 á 2 dagen worden uitgevoerd en geeft de mogelijkheid om snel IF-negatieve monsters vrij te geven.

Zwakke punten van de huidige procedure zijn: IF kent een detectieniveau van c.  $10^4$  cellen per ml. Lagere dichtheden in latent-geïnfecteerd materiaal blijven onopgemerkt. Het voorkomen van (vals-positieve) kruisreacties in IF leidt incidenteel onnodig tot het vastleggen van aardappelpartijen. Ook monsters met uitsluitend dode Cms cellen zullen IF-positief zijn, maar niet bevestigd kunnen worden in de eierplanttest.

Directe isolatie vanuit aardappelextracten is alleen mogelijk bij hoge dichtheden. De eierplant moet als intermediair worden gebruikt voor isolatie. De resultaten van de eierplant test kunnen 40 dagen op zich laten wachten; daarbij kost de plant veel ruimte in dure quarantaine kasruimten. De eierplant test leidt niet altijd tot symptoomontwikkeling. Bij afwezigheid van symptomen moeten alle 25 planten bemonsterd worden om zeker te zijn van de uitslag. Andere pathogenen kunnen symptomen op eierplanten veroorzaken die lijken op die van Cms.



## 11.2. In Canada

(bron: Van den Bovenkamp, 1993).

In Canada worden verschillende preventieve maatregelen genomen om introductie van de ziekteverwekker te voorkomen. Zo goed als alle uitgangsmateriaal is afkomstig van 'nuclear material' of in vitro vermeerdering of miniknollen die nooit in het veld zijn geweest (uitgangsmateriaal ringrot vrij), waarbij geproduceerd pootgoed verplicht wordt onderzocht in een nacontroletoets.

Canada hanteert een afkapsysteem met de klassen Pre-Elite, Elite I, Elite II, Elite III, Elite IV, Foundation Seed en Certified Seed. Op bedrijven waar ook pootgoed wordt geteeld, mag t.b.v. productie van consumptie-aardappelen geen materiaal lager dan Foundation seed worden uitgepoot.

Van elke partij pootgoed en van elke partij geëxporteerde consumptie-aardappelen (behalve die naar de USA worden geëxporteerd) worden in principe 400 knollen getoetst (> 0.4 ha). Deze toets wordt aangevuld met veldinspecties door landelijke en provinciale overheden en toetsingen in consumptiepercelen in gebieden waar pootaardappelen worden geteeld. De In de provincies New Brunswick en Prince Edward Island waar 85% van de Canadese pootgoed productie plaatsvindt, wordt onafhankelijk van de bestemming al het pootgoed getoetst op ringrot.

Voor controle op ringrot wordt gebruik gemaakt van ELISA, gebaseerd op monokonaal 1H3 als voorscreening. ELISA-positieve monsters worden nagetoetst met IF, gebaseerd op mca 9A1 Monsters positief in beide assays worden als besmet beschouwd. Voor materiaal dat naar de EU wordt geëxporteerd, worden de EU richtlijnen gevolgd (IF als voorscreening). De toetsen worden uitgevoerd door particuliere bedrijven, die hiervoor geaccrediteerd zijn. Besmette monsters worden door het Centre for Animal and Plant Health in Charlottetown nogmaals onderzocht op besmetting met ringrot.

Wordt ringrot gevonden dan wordt de betrokken partij uit de roulatie genomen en verwerkt door de industrie (bij grote partijen) of op de boerderij tot kleine verpakkingen consumptie-aardappelen.

Op betrokken perceel mogen 2 jaar geen aardappelen meer worden geteeld (of zoveel langer als er opslag wordt aangetroffen. Van alle bedrijven en percelen die in verbinding stonden met het besmette perceel en bedrijf (gezamenlijke machines, leveranciers pootgoed, afnemers pootgoed) worden 1000 knollen per perceel getoetst

Het besmette bedrijf dient voorafgaande aan een nieuwe aardappelteelt, volledig chemisch ontsmet te worden. Al het pootgoed moet nieuw vanuit een ringrot vrije zone aangekocht worden.

Het besmette bedrijf wordt 5 jaar lang onder toezicht genomen (veldinspecties, extra monster onderzoek (1000 knollen/partij)).

Niet besmette bedrijven die in aanraking zijn geweest met het besmette bedrijf, mogen drie jaar lang geen aardappelen telen, tenzij de totale productie, opslag en sortering wordt uitgevoerd volgens richtlijnen van de provinciale overheid en drie jaar lang wordt afgezien van het snijden van pootgoed.

Verdere opmerkingen:

- Invoering van toets- en eradicatieprogramma is uitgevoerd in nauwe samenwerking tussen nationale en regionale overheden en telersorganisaties. Om acceptatie van telers te vergroten werden voorlichtingsbijeenkomsten belegd, waarin telers de ernst van de situatie werd uitgelegd.
- In Canada en de V.S. wordt traditioneel nog veel pootgoed gesneden. In het verleden werden kleine knollen niet gebruikt i.v.m. mogelijke virusinfecties. Deze praktijk is ondanks controle op virussen nooit verlaten (Metzger et al., 1940).
- Op grote schaal zijn in Canada op markten en volkstuinen consumptie-aardappelen bemonsterd (In de V.S. was men in het verleden extra alert op aardappelteelt in volkstuinen, omdat regelmatig niet-gecertificeerd pootgoed werd gebruikt (Dykstra, 1942))
- Uit tabel 6 blijkt dat met de hieronder beschreven (rigide) maatregelen een hoog niveau van uitroeiing heeft weten te bereiken, echter de ziekte is nog steeds niet volledig uit Canada verdwenen.

## 12. Conclusies voor de praktijk:

Cms blijkt in het algemeen goed beheersbaar te zijn omdat dit pathogeen slecht in grond en oppervlaktewater lijkt te overleven en door zijn langzame groei slecht kan concurreren met andere micro-organismen. Een land als Canada heeft door het nemen van strenge hygiënische maatregelen en een intensief keuringsprogramma de ziekte vrijwel volledig uit de pootaardappelkolom geëlimineerd. Geconcludeerd kan worden dat ringrot ook in Nederland in principe geen probleem hoeft te geven wanneer:

- De aardappelproductieketen, maar met name het pootgoed, jaarlijks via veldinspecties wordt gecontroleerd
- Import uit landen met een ringrot historie zo veel mogelijk vermeden wordt
- Men terughoudend is in het gebruik van tolerante rassen, waarin symptomen niet of moeilijk zichtbaar worden
- Men bereid is tot een integrale toetsing van het pootgoed wanneer meerdere vondsten van ringrot worden vastgesteld
- Bij infecties (potentiële) contactbesmettingen zo snel mogelijk worden opgespoord en geëlimineerd, waarbij oppervlakten van machines, gebouwen en kleding zorgvuldig wordt gereinigd, besmette en van besmetting verdachte partijen worden geëlimineerd en partijen van dezelfde pootgoedlijnen zorgvuldig worden gecontroleerd
- Aardappelteelt op eenmaal besmette bedrijven slechts onder strenge voorwaarden wordt toegestaan en gedurende ten minste 5 jaar intensief wordt gecontroleerd en begeleid
- Machines, die door telers gezamenlijk worden gebruikt regelmatig worden gedesinfecteerd en ook de kans op verspreiding van de bacterie via schoeisel en kleding zo veel mogelijk wordt vermeden
- Er gebruik wordt gemaakt van goed gevalideerde gevoelige detectiemethoden. Voor serologische technieken blijft de voorkeur uitgaan naar IF. Gebruik van beschikbare monoklonale antistoffen moet kritisch worden bezien i.v.m. het mogelijk optreden van varianten van Cms die niet met de monoklonale antistoffen reageren. Gevoeligere moleculair-biologische technieken (zoals PCR) moeten eerst goed gevalideerd worden voor tot introductie kan worden overgegaan.

### 13. Inventarisatie onderzoeksvragen

Aanbevolen wordt, nog eens een studie uit te voeren naar de kritische momenten voor introductie en verspreiding van Cms in de Nederlandse aardappelteelt. Hierbij kan gedacht worden aan de selectie van pootgoed en importbepalingen, teeltgebruiken, zoals irrigatie, bestrijding van schimmelziekten waardoor rijsporen ontstaan, mogelijkheden voor gesloten pootgoedteelt, aantal generaties te velde, vruchtwisseling en de teelt van pootgoed op schone geïsoleerde plaatsen in Nederland.

Daarnaast zie ik als belangrijke en urgente onderzoeksvragen:

1. Onderzoek naar geschikte middelen voor ontsmetting van ruimtes, machines en gereedschappen
2. Onderzoek naar persistentie en verspreiding van Cms in oppervlaktewater
3. Onderzoek naar overleving en vermeerdering van Cms in onkruiden, m.n. onkruiden die langs Nederlandse waterwegen groeien. Een vergelijking met de situatie voor bruinrot dringt zich hier op, waar bitterzoet zorgt voor een (blijvende) contaminatie van het oppervlaktewater.
4. Onderzoek naar verbetering van detectiestrategieën. Er blijft behoefte aan snelle, goedkope, efficiënte en robuuste methodes die gevoeliger zijn dan de huidige IF (of ELISA methodiek). Ook zou de winst van een bemonstering (van stengels) in het veld i.p.v. in geogoste knollen m.b.t. de kans op detectie nog eens goed bekeken moeten worden.

Voor het vergroten van inzicht in de biologie en ecologie van Cms i.v.m. bestrijdingsstrategieën is verder onderzoek gewenst naar:

5. Overleving van Cms in gronden die representatief zijn voor de Nederlandse aardappelteelt
6. Mogelijke verspreiding van Cms via insecten en nematoden
7. De mogelijke vorming van Cms cellen in een 'viable but non culturable state (niet kweekbaar, wel levend, en slechts onder bepaalde condities te wekken)
8. Mogelijke overdracht van Cms via 'true potato seed'
9. Populatieverloop van Cms tijdens de bewaring
10. De rol van suikerbiet in de ecologie van Cms
11. Optreden van niet-mucoïde varianten die niet-detecteerbaar zijn met sommige antistoffen
12. Mogelijkheid de aardappel volledig resistent te maken voor Cms. Met name hiervoor is aanvullend moleculair-biologisch en biochemisch onderzoek gewenst.

Binnen het kader van EU FAIR-project 98-4366 wordt onderzoek gedaan aan onderwerp 2 en 7 in beperkte mate aan onderwerp 3, 5, 9, 10 en 11. Binnen het kader van een door de EU gefinancierd SMT project worden verschillende detectiemethoden met elkaar vergeleken.

## Literatuur

Anonymous, 1941. Will ring rot attack the tomato crop. Wisconsin Agricultural Experimental Station Bulletin 451, 64-65.

Anonymous, 1993. Council Directive 93/85/EEC on the control of potato ring rot. Official Journal of the European Communities No L. 259/1-25.

Akeley, R.V., Stevenson, F.J., Blood, P.T., Schultz, E.S., Bonde, Reiner & Nielsen, K.F. 1995. Merrimack: a new variety of potato resistant to late blight and ring rot and adapted to New Hampshire. American Potato Journal 32, 93-99.

Appel, O. (1906). Neuere Untersuchungen über Kartoffel- und Tomatenerkrankungen. Jahresbericht der Vereinigung der Vertreter der angewandten Botanik 3, 122-136.

Ark, P.A. 1946. Some laboratory and field data on ring rot of potatoes in California. American Potato Journal 23, 170-181.

Baer, D. & Gudmestad, N.C. 1993. Serological detection of nonmucoid strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato. Phytopathology 83, 157-163.

Baer, D. White, A.R. & Gudmestad, N.C. 1998. Partial characterization of an extracellular  $\beta$ -fructofuranosidase from *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Canadian Journal of Microbiology 44, 852-865

Baribeau, B. 1948. Bacterial ring rot of potatoes. American Potato Journal 25, 71-82.

Beuningen, van A., Derks, H. and Janse, J.D. 1995. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with special attention to fluorescent in situ hybridization (FISH) using a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe. In: Zuchtungsforchung Berichte aus der Bundesanstalt für Zuchtungsforchung in Kulturpflanzen (Flamme, W., Grunewaldt, J., Proeseler, g. and Wenzel, g. Eds.), pp. 266-269, Halberstadter Druckhaus GmbH.

Bishop, A.L. and Slack, S.A. 1982. Effect of temperature on development of ring rot in potato. Phytopathology 72, 1382 (Abstract).

Bishop, A.L., Slack & S.A. 1987a. Effect of cultivar, inoculum dose and strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* on symptom development in potatoes. Journal of Phytopathology 77, 1085-1089.

Bishop, A.L. & Slack, S.A. 1987b. Effect of inoculum dose and preparation, strain variation, and plant growth conditions on the eggplant assay for bacterial Ring Rot. American Potato Journal 64, 227-234.

Bishop, A.L., Clarke, R.G. & Slack, S.A. 1988. Antigenic anomaly in a naturally occurring non fluidal strain of *Corynebacterium sepedonicum*. American Potato Journal 65, 237-246.

Boer, S.H. de & Copeman, R.J. 1974. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. Canadian Journal Plant Science 54, 115-122.

Boer, S.H. & Copeman, R.J. 1980. Bacterial ring rot testing with the indirect fluorescent antibody staining procedure. American potato journal 57, 457-465

Boer, S.H. de. 1982. Cross-reaction of *Corynebacterium sepedonicum* antisera with *C. insidiosum*, *C. michiganense* and an unidentified Coryneform bacterium. Phytopathology 72, 1474-1478.

Boer, S.H. 1983. Evaluation of an agar immunodiffusion procedure for confirming bacterial ring rot diagnoses. American potato journal 60, 661-670.

Boer, S.H. de & Slack, S.A. 1984. Current status and prospects for detecting and controlling bacterial ring rot of potatoes in North America. Plant Disease 68, 841-844.

Boer, S.H. de & Wieczorek, A. 1984. Production of monoclonal antibodies to *Corynebacterium sepedonicum*. Phytopathology. 74, 1431-1434.

Boer, S.H. de. 1987. The relationship between bacterial ring rot and North American seed potato export markets. American Potato Journal 64, 683-694.

- Boer, S.H. de, Wieczorek, A., Kummer, A. 1988. An ELISA test for bacterial ring rot of potato with a new monoclonal antibody. *Plant Disease* 72, 874-878; 18 ref.
- Boer, S.H. de. 1989. Predictive value of post harvest serological tests for bacterial ring rot of potato. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11, 317-321.
- Boer, S.H. de & McCann, M. 1989. Determination of population densities of *Corynebacterium sepedonicum* in potato stems during the growing season. *Phytopathology* 79, 946-951.
- Boer, S.H. de & McCann, M. 1990. Detection of *Corynebacterium sepedonicum* in potato cultivars with different propensities to express ring rot symptoms. *American Potato Journal* 67, 685-694.
- Boer, S.H. de. 1991. Current status and future prospects of bacterial ring rot testing. *American Potato Journal* 68, 107-113.
- Boer, S.H. de, Van Vaerenbergh, J., Stead, D.E., A.S., Janse, J.D. & McKenzie, A.R. 1992. A comparative study in five laboratories on detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato stems and tubers. *Potato Research* 35, 217-226.
- Boer, S.H. de. 1994. The role of plant pathology research in the Canadian potato industry. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16, 150-155.
- Boer, S.H. de, Stead, D.E., Alivizatos, A.S., Janse, J.D., Van Vaerenbergh, J., Dehaan, T.L. & Mawhinney, J. 1994. Evaluation of serological tests for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in composite potato stem and tuber samples. *Plant Disease* 78, 725-729.
- Boer, S.H. de, Ward, L.J., Li, X. & Chittaranjan. 1995. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Research* 23, 2567-2568.
- Boer, S.H. de. 1996. Validation of thresholds for serological tests that detect *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tuber tissue. *EPPO Bulletin* 26, 391-398.
- Boer, S.H. de & Hall, J.W. 1996. The probability of detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by indexing seed potato lots with serological tests. *Journal of Phytopathology* 144, 459-463.
- Boer, S.H. de. 1999. Role of laboratory indexing in eradication of the bacterial ring rot disease. p. 537-538. In: Abstracts of the 14<sup>th</sup> Triennial Conference of the European Association for Potato Research (EAPR '99), 2-7 mei, Sorrento, Italië.
- Boer, S.H. de & Hall, J.W. Serological detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in composite samples of potato stems and tubers. ??? 1-24
- Bonde, R. 1939. Bacterial wilt and soft rot of the potato in Maine. The Maine Agricultural Experiment Station –Bulletin 396.
- Bonde, R. 1942. Ring rot in volunteer plants. *American Potato Journal* 19, 131-133.
- Bonde, R., Stevenson, F.J., Clark, C.F. & Akeley, R.V. 1942. Resistance of certain potato varieties and seedling progenies to ring rot. *Phytopathology* 32, 813-819.
- Bonde, R., Stevenson, F.J. & Akeley, R.V. 1947. Breeding potatoes for resistance to ring rot. *Phytopathology* 37, 539-555.
- Bonde, R., Akeley, R. & Merriam, D. 1959. A method for testing seedling progenies of potato for ring rot resistance. *Plant Disease Reporter* 43, 198-200.
- Bruyne, E. de, Vantomme, R, Vaerenbergh, J. van; Swings, J. & Ley, J. de. 1986. Evaluation of the identification procedure of *Corynebacterium sepedonicum*, the causal agent of ringrot in potatoes. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 51, 1347-1350.
- Bugbee, W.M., Gudmestad, N.C., Secor, G.A. and Nolte. P. 1987. Sugar beet as a symptomless host for *Corynebacterium sepedonicum*. *Phytopathology* 77. 765-770.
- Bugbee, W.M. & Gudmestad, N.C. 1988. The recovery of *Corynebacterium sepedonicum* from sugar beet seed. *Phytopathology* 78 205-208.
- Burkholder, W.H., 1942. Diagnosis of the bacterial ring rot of the potato. *American Potato Journal* 19, 208-212.

- Calzolari, A., Bazzi, c. & Mazzucchi, U. 1982. Cross-reactions between *Corynebacterium sepedonicum* and *Arthrobacter polychromogenes* in immunofluorescence staining. *Potato Research* 25, 239-246.
- Christie, R.D.; Sumalde, A.C., Schulz, J.T. & Gudmestad, N.C. 1991. Insect transmission of the bacterial ring rot pathogen. *American Potato Journal* 68, 363-372.
- Claflin, L.E. & Shepard, J.F. 1977. An agglutination test for the serodiagnosis of *Corynebacterium sepedonicum*. *American Potato Journal* 54, 331-338.
- Corbière, R., Hingand, L. & Jouan, B. 1987. Application of ELISA and immunofluorescence methods to detect *Corynebacterium sepedonicum*: reaction of potato cultivars to ring rot. *Potato Research*. 30, 539-549.
- Crowley, C.F., Boer, S.H. de. 1982. Nonpathogenic bacteria associated with potato stems cross-react with *Corynebacterium sepedonicum* antisera in immunofluorescence. *American Potato Journal*. 59, 1-8.
- Cruz, A.R. de la, Poplawsky, A.R. & Wiese, M.V. 1992. Biological suppression of potato ring rot by fluorescent pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1986-1991.
- Cruz, A.R. de la, Wiese, M.V. & Schaad, N.W. 1992. A semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from potato tissues. *Plant Disease* 76, 830-835.
- Davis, M.J., Gillaspie, A.G. Jr., Vidaver, A.K. and Harris, R.W. 1984. *Clavibacter*: A new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli*, subsp. *xyli* sp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 107-117
- Dinesen, I.G. & Boer, S.H. 1995. Extraction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from composite samples of potato tubers. *American Potato Journal* 72, 133-142.
- Duncan, J., G n reux, H. & Couture, G.R. 1958. Indice de transmission de la fl trissure bact rienne par le doryphore. *Quebec Society Protection of Plants Report* 40, 88-90.
- Dunin, M.S. 1962. Potato ring rot – pathogenesis, diagnosis, protective measures. *Review of Applied Mycology* 41 – Excerpt.
- Dykstra, T.P. 1941. Results of experiments in control of bacterial ring rot of potatoes in 1940. *American Potato Journal* 18, 27-55.
- Dykstra, T.P. 1942. Compilation of results in control of potato ring rot in 1941. *American Potato Journal* 19, 175-196.
- Eddins, A.H. 1939. Some characteristics of bacterial ring rot of potatoes. *American Potato Journal* 16, 309-322.
- Fernow, K.H. 1944. Potato ring rot control for those who think they don't have the disease. *American Potato Journal* 21, 14-17.
- Franc, G.D. 1999. Persistence and latency of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field-grown seed potatoes. *Plant Disease* 83, 247-250.
- Gamard, P. & Boer, S.H. de. 1995. Evaluation of antagonistic bacteria for suppression of bacterial ring rot of potato. *European Journal of Plant Pathology* 101 (5), 519-525.
- Glick, D.P. 1941. Results of attempted eradication of bacterial ring rot from potatoes. *American Potato Journal* 18, 140-143.
- Gudmestad, N.C., Henningson, P.J. & Bugbee, W.M. 1988. Cellular fatty acid comparison of strains of *Corynebacterium michiganense* subsp. *sepedonicum* from potato and sugar beet. *Canadian Journal of Microbiology* 34, 716-722.
- Haasis, F.W. 1940. The distribution of *Phytophthora sepedonica* in potato seed-pieces, plants and tubers, and its significance. *Department Agriculture State of California - Bulletin* 29, 16-20.
- Harris-Baldwin, A. & Gudmestad, N.C. 1996. Identification of Phytopathogenic Coryneform bacteria using the biolog automated microbial identification system. *Plant Disease* 80, 874-878.



- Hu, X. Lai, F.M. Reddy, A.S.N. & Ishimaru, C.A. 1995. Quantitative detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 85, 1468-1473.
- Iverson, V.E. & Kelly, H.C. 1940. Control of bacterial ring rot of potatoes with special reference to the ultraviolet-light method for selecting disease-free seed stock. Montana State College Agricultural Experiment Station – Bulletin 386.
- Iverson, V.E. & Harrington, F.M. 1942. Accuracy of the ultraviolet-light method for selecting ring rot free potato seed stocks. *American Potato Journal* 19, 71-74.
- Jager, J., Lorenz, D.H. & Eichhorn, K.W.. 1990. Rapid detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* syn. *Corynebacterium michiganense* spp. *sepedonicum* (Cms) in the tissue of potato tubers and aubergine plants by gas chromatography of whole cell fatty acids.. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 42, 87-90.
- Jansing, H. & Rudolph, K. 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105, 590-601.
- Jansing, H. (1991). Nachweismethoden für *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Erreger der bakteriellen Ringfäule an Kartoffeln. Dissertation, Göttingen, 151 pp.
- Johansen, I.E., Rasmussen, O.F., & Heide, M. 1989. Specific identification of *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* by DNA hybridization. *Phytopathology* 79, 1019-1023.
- Karjalainen, R., Kangasniemi, A., Hämäläinen, J. & Tegel, J. 1995. Evaluation of PCR methods for the diagnosis of bacterial ring rot infections in potato. *EPPO Bulletin* 25, 169-175.
- Karjalainen, R., Kangasniemi, A. & Hämäläinen, J. 1996. Applications of PCR for the diagnosis of bacterial ring rot infections in potato. *Diagnostics in crop production. BCPC Symposium proceedings* 65, 133-139.
- Knorr, L.C. 1947. Field testing of disinfectants for the control of potato ring rot bacteria on wooden and metallic surfaces. *American Potato Journal* 24, 141-150.
- Knorr, L.C. 1948. Suspect range of the potato ring rot bacterium. *American Potato Journal* 25, 361-371.
- Kreutzer, W.A. & McLean, J.G. 1943. Location and movement of the causal agent of ring rot in the potato plant. *Colorado Agricultural Experiment Station – Technical Bulletin* 30.
- Kreutzer, W.A., Henderson, W.J. & Lane, G.H. 1945. The comparative effectiveness of certain cutting-knife treatments in the control of ring rot of potatoes. *American Potato Journal* 22, 127-133.
- Lachance, R.O. and Genereux, H. 1963. *Proceedings of the Canadian Phytopathological Society* 30, 13.
- Laine, M.J., Nakhei, H., Dreier, J., Lehtila, K., Meletzus, D., Eichenlaub, R. & Metzler, M.C. 1996. Stable transformation of the gram-positive phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* with several cloning vectors. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1500-1506.
- Lane, G.H., Kunkel, R. & Kreutzer, W.A. 1948. Tests of cutting knife disinfectants and cutting techniques in the control of ring rot of potatoes. *American Potato Journal* 25, 446-454.
- Langerfeld, E. 1990. Distribution of infected tubers in potato samples attacked by bacterial ring rot (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* Davis et al.). *Journal of Plant Diseases and Protection*. 97, 187-193.
- Louws, F.J., Bell, J., MedinaMora, C.M., Smart, C.D., Opgenorth, D., Ishimaru, C.A., Hausbeck, M.K., DeBruijn, F.J., Fulbright, D.W. 1998. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology* 88, 862-868.
- Lee, I.M., Bartoszyk, I.M., Gundersen, D.E., Mogen, B. & Davis, R.E. 1997. Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2625-2630.
- Lelliott, R.A. & Sellar, 1976. The detection of latent ring rot (*Corynebacterium sepedonicum* (Spieck et Kotth.) Kapt. et Burkh.) in potato stocks. *EPPO Bulletin* 6, 101-106.
- Lewosz, J. & Pastuszewska, T. 1995. Action of phthalocyanine on the exopolysaccharides, detectability and survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *EPPO* 25, 177-184.

- Li, X.A. & Boer, S.H. de. 1995a. Comparison of 16S ribosomal RNA genes in *Clavibacter michiganensis* subspecies with other coryneform bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41, 925-929.
- Li, X.A. & Boer, S.H. de. 1995b. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Phytopathology 85, 837-842.
- Li, X.A., Boer, S.H. de. & Ward, L.J. 1997. Improved microscopic identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* cells by combining *in situ* hybridization with immunofluorescence. Letters in Applied Microbiology 24, 431-434.
- List, G.M. & Kreutzer, W.A. 1942. Transmission of the causal agent of the ring rot disease of potatoes by insects. Journal of Economic Entomology 35, 455-458.
- Logsdon, C.E. 1967. Effect of soil temperature on potato ring rot. American Potato Journal 44, 281-286.
- MacLachlan, D.S. & Racicot, H.N. 1950. Some method of used bag disinfection in potato ring rot control. 32<sup>nd</sup> Annual Report of the of the Quebec Society for protection of plants. 8 pages
- Mansfield-Giese, K. 1997. Plant-to-plant transmission of the bacterial ring rot pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Potato Research 40, 229-235.
- Mazzucchi, U, Bazzi, C. & McKenzie, A.R. 1982. Transmission of *Corynebacterium sepedonicum* from latently infected seed potatoes in the Po valley. Phytopathologia Mediterranea 21, 116-117.
- Metzger, C.H. & Binkley, A.M. 1940. Some evidence of the spread of bacterial wilt. American Potato Journal 17, 198-201.
- Metzger, C.H., Blodgett, F.M., Martin, W.H., Smith, O., Ware, L.M., Jehle, R.A. & Eddins, A.H. 1940. Report of the committee to coordinate research on new and unusual potato diseases. American Potato Journal 17, 81-88.
- Metzger, C.H. & Glick, D.P. 1940. A promising method for eradication bacterial wilt and ring rot from the potato. American Potato Journal 17, 45-53.
- Metzler, M.C., Laine, M.J. & Boer, S.H. de. 1997. The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. FEMS Microbiology Letters 150, 1-8.
- Miller, H.J. 1984. Cross-reactions of *Corynebacterium sepedonicum* antisera with soil bacteria associated with potato tubers. Netherlands Journal of Plant Pathology 90, 23-28.
- Mills, D., Russell, B.W. & Hanus, J.W. 1997. Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridization. Phytopathology 87, 853-861.
- Mirza, M.S., Rademaker, J.L.W., Janse, J.D. & Akkermans, A.D.L. 199 Specific 16S rRNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Canadian Journal of Microbiology 39, 1029-1034.
- Mogen, B.D., Olson, H.R., Sparks, R.B., Gudmestad, N.C. & Oleson, A.E. 1990. Genetic variation in strains of *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum*. polymorphisms in restriction fragments containing a highly repeated sequence. Phytopathology 80, 90-96.
- Nelson, G.A., Torfason, W.E. & Harper, F.R. 1971. Comparison of inoculation methods on ring rot development in potatoes. American Potato Journal 48, 225-229.
- Nelson, G.A. 1978. Survival of *Corynebacterium sepedonicum* on contaminated surfaces. American Potato Journal 55, 449-453.
- Nelson, G.A. 1979. Persistence of *Corynebacterium sepedonicum* in soil and in buried potato stems. American Potato Journal 56, 71-77.
- Nelson, G.A. 1980. Long-term survival of *Corynebacterium sepedonicum* on contaminated surfaces and in infected potato stems. American Potato Journal 57, 595-599.
- Nelson, G.A. 1982. *Corynebacterium sepedonicum* in potato: Effect of inoculum concentration on ring rot symptoms and latent infection. Canadian Journal of Plant Pathology 4, 129-133.

- Nelson, G.A. & Kozub, G.C. 1983. Effect of total light energy on symptoms and growth of in ring rot infected Red Pontiac potato plants. *American Potato Journal* 60, 261-468.
- Nelson, G.A. 1986. Freeing Russet Burbank potato plants from ring rot by stem cutting and tuber propagation. *American Potato Journal* 63: 411-414.
- Nelson, G.A. & Kozub, G.C. 1990. Survival of *Corynebacterium sepedonicum* at freezing and at wide fluctuations between freezing and above-freezing temperatures. *American Potato Journal*, 67, 625-631.
- Nissinen, R., Lai, F.M., Laine, M.J., Bauer, P.J., Reilley, A.A., Li, X. Boer, S.H. de, Ishimaru, C.A. & Metzler, M.C. 1997. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* elicits a hypersensitive response to tobacco and secretes hypersensitive response-inducing protein(s). *Journal Phytopathology* 87, 678-684.
- Olsson, K. 1976. Experience of ring rot caused by *Corynebacterium sepedonicum* (Spieck. et Kotth.) Skapt. et Burkh. in Sweden. Particularly detection of the disease in its latent form. *EPPO Bulletin* 6, 209-219.
- Pastrik, K.H. & Rainey, R., 1996. Differentiation and detection of the subspecies of *Clavibacter michiganensis* by PCR (polymerase chain reaction) techniques. p. 193. In: Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium of the European Foundation for Plant Pathology (Dehne, H.W., Adam, G., Diekmann, M. Frahm, J. Mauler-Machnik, A. & Halteren, P. van (eds). 9 –12 september , Bonn, Germany
- Persson, P. & Janse, J.D. 1988. Ring rot-like symptoms in *Solanum melongena* caused by *Erwinia chrysanthemi* (potato strain) after artificial inoculation. *EPPO Bulletin* 18, 575-578.
- Rademaker, J.L.W., Thalen, M. & Janse, J.D. 1992. Experiences with DNA-hybridization using a biotinylated probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Mededelingen van de Faculteit Landbouww. Universiteit Gent*, 57, 263-268.
- Raeder, J.M. 1949a. Ring rot of potatoes. *American Potato Journal* 26, 126-131.
- Raeder, J.M. 1949b. Ring rot of potatoes, part II: Substitutes for boiling water as knife disinfectants in preventing the spread of *Corynebacterium sepedonicum*. *American Potato Journal* 26, 203-207.
- Richardson, L.R. & Goodin, R.E. 1949. Five years of bacterial ring rot. *American Potato Journal* 26, 85-59.
- Riedl, W.A., Stevenson, F.J. & Bonde, R. 1946. The teton potato: a new variety resistant to ring rot. *American Potato Journal* 23, 379-389.
- Riley, I.T., Reardon, T.B. & McKay, A.C. 1988. Genetic analysis of plant pathogenic bacteria in the genus *Clavibacter* using allozyme electrophoresis. *Journal of General Microbiology* 134, 3025-3030.
- Rojalin, L.B. 1935. Institut für Kartoffeln Moskau 4, 3-21.
- Rozen, N.J.M. & Vuurde, J.W.I. van. 1991. Development of a semi-selective medium and an immunofluorescence colony-staining procedure for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in cattle manure slurry. *Netherlands Journal Plant Pathology* 97, 321-334.
- Schaad, N.W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A. & Knorr, D. 1998. Use of bio-PCR and an automated fluorescence detection system for reliable, sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers. Abstract 3.3.40. In: Abstracts of invited & offered papers of the 7<sup>th</sup> International congress of Plant Pathology, 9-16 augustus. Edinburgh, Schotland, Verenigd Koninkrijk.
- Schneider, B.J., Zhao, J. & Orser, C.S. 1993. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by DNA amplification. *FEMS Microbiological Letters* 109, 207-212.
- Sherf, A.F. 1944. Infection experiments with potato ring rot and the effect of soil temperature on the disease. *American Potato Journal* 21, 27-29.
- Slack, S.A. 1987. Biology and ecology of *Corynebacterium sepedonicum*. *American Potato Journal* 64, 665-670.
- Slack, S.A., Kelman, A. & Perry, J.B. 1978. Comparison of three serodiagnostic assays for detection of *Corynebacterium sepedonicum*. *American Potato Journal* 56, 441-446.
- Sletten, A. 1985. The effect of *Corynebacterium sepedonicum* on symptoms and yield of four potato cultivars. *Potato Research* 28, 27-33.

- Snieszko, S.F. & Bonde, R. 1943. Studies on the morphology, physiology, serology, longevity and pathogenicity of *Corynebacterium sepedonicum*. *Phytopathology* 33, 1032-1044.
- Spieckermann, 1913. Zur Kenntneis der in Deutschland auftretenden Gefasskrankheiten der kartoffelpflanze, III. *Landw. Ztz.* 33, 380-382.
- Spieckermann, A. & Kotthoff, P. 1914. Untersuchungen über die Kartoffelpflanze und ihre Krankheiten. 1. Die Bakterienringfäule der Kartoffelpflanze. *Landwirtschaftliche Jahrbücher* 64, 659-732.
- Starr, G.H. 1940. Experimental work for the control of ring rot of potatoes. *American Potato Journal* 17, 318-322.
- Starr, G.H. 1943. Ring rot increase in potato seed lots having known quantities of infection. *American Potato Journal* 20, 237-241.
- Starr, G.H. & Riedl, W.A. 1945. Potato ring rot and its control. *Wyoming Agricultural Experiment Station, Bulletin* 270, 3-16.
- Starr, G.H. 1944. Hot water for the control of potato ring rot bacteria on the cutting knife. *American Potato Journal* 21, 161-163.
- Starr, G.H. 1947. Steam sterilization to kill potato ring rot bacteria on burlap bags. *American Potato Journal* 24, 231-233.
- Starr, G.H. 1947. The effect of different concentrations of bacterial suspensions used in inoculations upon subsequent ring rot symptoms in the potato plant. *American Potato Journal* 24, 151-156.
- Starr, G.H. & Riedl, W.A. 1948. A comparison of *Corynebacterium sepedonicum* inocula from resistant and susceptible potato varieties. *American Potato Journal* 25, 432-437.
- Starr, M.P. 1949. The nutrition of phytophthogenic bacteria. *Journal of Bacteriology* 57, 253-258.
- Stead, D.E. and Wilson, J. 1996. A review of the risks and yield losses caused by the potato ring rot pathogen, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Internal report CSI, Harpenden, United Kingdom, 9 pp.
- Stefani, E. 1989. *In situ* detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* in potato stems using the fluorescent antibody technique. *Phytopathologia Mediterranea*. 28, 53-56.
- Sturz, A.V., Christie, B.R. and Matheson, B.G. 1997. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 162-167.
- Turkensteen, L.J. 1986. Achtergrond-document over bruinrot. 13 p. Intern rapport IPO-DLO, Wageningen, Nederland.
- Varbanets, L.D. Gvozdjak, R.I. & Muras, V.A. 1992. Structure and phytotoxic activity of *Clavibacter (Corynebacterium) sepedonicum* extracellular polysaccharide. pp. 665-668 In: Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, June 9-12 (Lemattre, M., Freigoun, S., Rudolph, K., and Swings, J.G., eds). Versailles, France.
- Verreault, H., Lafond, M., Asselin, A., Banville, G. & Bellemare, G. 1988. Characterization of two DNA clones specific for identification of *Corynebacterium sepedonicum*. *Canadian Journal of Microbiology* 34, 993-997.
- Vidaver, A.K. 1982. The plant pathogenic corynebacteria. *Annual Review of Microbiology* 36, 495-517.
- Zizz, J.D. & Harrison, M.D. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck & Kotth.) (Carlson & Vidaver) in common weed species found in Colorado potato fields. *Phytopathology* 81, 1348 (abstract).