

Van bruinrot en geelziek tot witsnot!

In deze speciale uitgave van Gewasbescherming wordt het onderzoek aan plantpathogene bacteriën beschreven dat uitgevoerd wordt bij diverse Nederlandse onderzoeksinstellingen. Het is geen overbodige luxe dat deze diverse en intrigerende groep van bacteriën onder de aandacht wordt gebracht, omdat ze naast virussen, schimmels, oömyceten en nematoden, aanzienlijke schade kunnen veroorzaken aan diverse economisch belangrijke gewassen en tevens een groot probleem kunnen vormen in de boomteelt. Uit de artikelen beschreven in deze speciale uitgave wordt duidelijk dat diverse genera en soorten redelijk tot goed kunnen gedijen in het gematigde Nederlandse klimaat en dat het voorkomen zich niet beperkt tot slechts enkele bacteriesoorten.

Opvallend is bovendien dat er momenteel weinig onderzoek wordt gedaan bij universiteiten aan plantpathogene bacteriën. In diverse onderwijsinstellingen en colleges aan universiteiten krijgen plantpathogene bacteriën zeker aandacht, maar ze worden in het fundamenteel wetenschappelijk onderzoek bij universiteiten veelal gebruikt als testorganismen om bijvoorbeeld resistentie in planten te kunnen bepalen of planten genetisch te transformeren. Voorbeelden hierbij zijn *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en *Agrobacterium tumefaciens*. Echter, het fyto bacteriologische onderzoek in Nederland vindt tegenwoordig voornamelijk plaats bij onderzoeksinstituten (o.a. PRI, PPO), keuringsdiensten (o.a. PD, NAK) en bedrijven (o.a. zaadbedrijven).

De vers opgerichte KNPV-werkgroep Fytobacteriologie gaat een serieuze poging doen om de schaars wordende fyto bacteriologen in Nederland en België bijeen te brengen en dit onderzoeksgebied te stimuleren. Uitwisseling van resultaten en het versterken van de contacten met het fyto bacteriologisch onderzoek bij bedrijven zijn belangrijke doelstellingen van de bijeenkomsten die tweemaal per jaar zullen plaatsvinden. Onderwerpen die aan bod zullen komen zijn identificatie, detectie, ecologie, epidemiologie, beheersing en quarantaine problemen, pathogeniteit en genomics. Andere suggesties zijn van harte welkom.

U kunt u als werkgroep lid aanmelden via: joop.vandoorn@wur.nl.

Via dit themanummer moge duidelijk worden met welke 'bacterieproblemen' diverse sectoren in Nederland te maken hebben. Historisch gezien levert Nederland al geruime tijd een belangrijke internationale bijdrage aan het fyto bacteriologisch onderzoek. Denk bijvoorbeeld aan het epidemiologisch en diagnostisch onderzoek dat gedaan is en wordt aan *Ralstonia* en *Erwinia*. Enkele andere plantpathogene bacteriën die momenteel onderzocht worden betreffen de notoire geelziek-veroorzakende *Xanthomonas hyacinthi* en *Pseudomonas syringae*, die de kastanjeziekte veroorzaakt.

Tot slot hoopt de jonge (en dus enthousiaste) KNPV-werkgroep Fytobacteriologie regelmatig in Gewasbescherming iets te melden via artikelen en (korte) berichten. In een volgend nummer waarschijnlijk iets over de MicroZoo!

Namens de KNPV-werkgroep Fytobacteriologie: Joop van Doorn en Jos Raaijmakers.

VOORWOORD

Nederlands onderzoek aan plantpathogene bacteriën in perspectief

Jan van der Wolf¹ en Gé van den Bovenkamp²

¹ Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen, Jan.vanderWolf@wur.nl

² NAK, Postbus 1115, 8300 BC Emmeloord

Ziekten veroorzaakt door plantpathogene bacteriën worden door producenten van uitgangsmateriaal, door telers en door exporteurs gezien als zeer bedreigend. De ziekteverwekker is vaak moeilijk op te sporen, kan zich symptomeloos verspreiden, is in plantmateriaal niet of moeilijk te bestrijden, resistentiebronnen zijn veelal onbekend en de economische schade bij uitbraak is vaak aanzienlijk. Onderzoek aan plantpathogene bacteriën in Nederland kent dan ook een lange historie. In deze schets wordt het belang van dit onderzoek voor het voetlicht gebracht. Er wordt stilgestaan bij het onderzoek uit heden en verleden. Ook worden kennisleemtes en onderzoekswensen geïnventariseerd.

I. Inleiding

Historie fyto bacteriologisch onderzoek in Nederland

Onderzoek aan plantenziekten, veroorzaakt door bacteriën, heeft in Nederland een lange historie. Al in 1880 deed J.H. Wakker, in het laboratorium van de botanicus Hugo de Vries in Amsterdam, als één van de eerste fyto bacteriologen onderzoek aan geelziek in hyacint. Hij isoleerde en kweekte de bacterie *Xanthomonas hyacinthi*, die toen nog beschreven werd als *Bacterium hyacinthi*, tot op reincultuur en voerde er inoculatie-experimenten mee uit. Een andere Nederlandse pionier was C.J.J. van Hall, die in 1902 binnen het Phytopathologisch Laboratorium Willie Commelin Scholten werkzaam was. Hij beschreef o.a. de bacterieziekte bij sering, die veroorzaakt wordt door *Pseudomonas syringae*, en de bacterieziekte zwartbenigheid in aardappel met als veroorzaker *Bacillus atrosepticus* (nu *Pectobacterium atrosepticum*). Daarna kwam het werk in Nederland lange tijd tot stilstand. Pas in de jaren zestig van de vorige eeuw kwam het onderzoek naar plantpathogene bacteriën in beweging toen er bij het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (IPO), een voltijds bacterioloog werd aangesteld (H.P. Maas Geesteranus). Deze hield zich vooral bezig met de ecologie van *Erwinia amylovora*, de veroorzaker van perving, en met (opnieuw!) zwartbenigheid in aardappel (*Pectobacterium* en *Dickeya* spp.). In de jaren zeventig breidde het Nederlandse

fyto bacteriologisch onderzoek zich verder uit. Binnen het IPO werd een seroloog (H. Vrugink) aangesteld die serologische methoden ontwikkelde voor de diagnostiek van plantpathogene bacteriën en die de eerste ELISA voor detectie van plantpathogene bacteriën introduceerde. Ook kwamen er bacteriologen in dienst bij de Plantenziektenkundige Dienst (bacterieziekten met een quarantainestatus), het toenmalige Rijksproefstation voor Zaadonderzoek (onderzoek aan zaadoverdraagbare bacteriën zoals *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* en *P. syringae* pv. *pisi*), het toenmalige Rijksinstituut voor Onderzoek van Bos- en Landschapsbouw “De Dorschkamp” (o.a. ecologisch onderzoek aan *Erwinia salicis* in wilg) en het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek (nu PPO Bloembollen) in Lisse (o.a. onderzoek naar diagnostiek van *Xanthomonas hyacinthi*). In die jaren werd binnen Wageningen Universiteit fundamenteel, epidemiologisch onderzoek verricht aan *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in kool en aan *Erwinia amylovora* in appel en peer. Het bacteriologisch onderzoek in Nederland kreeg van 1995 – 2000 een flinke injectie tijdens de uitbraak van bruinrot (*Ralstonia solanacearum*) in de pootaardappelteelt en later, in hetzelfde gewas, van ringrot (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*). De schade door bruinrot liep van 1995 tot 1998 op tot ca. 7 M€ per jaar. Door het snel optimaliseren van detectiemethoden, het identificeren van infectiebronnen (w.o. bitterzoet en opper-

vlahtewater voor *R. solanacearum*), het integraal toetsen van pootgoed en het nemen van adequate beheersmaatregelen (o.a. beregeningsverbod), konden de besmettingen, onder regie van de PD, al snel worden ingedamd. Zo toetste de NAK, op het hoogtepunt, per jaar ruim 60.000 monsters pootaardappelen met immunofluorescentie-microscopie op bruinrot- en ringrotbacteriën.

Inmiddels is de capaciteit van het wetenschappelijke bacteriologische onderzoek ongeveer gehalveerd t.o.v. die in de jaren zeventig en tachtig van de vorige eeuw! Door fusies en bezuinigingen op het landbouwkundig onderzoek werden bacteriologen, die met pensioen gingen, niet of slechts gedeeltelijk vervangen. Er is geen leerstoelgroep 'fyto bacteriologie' en er zijn geen universitaire docenten meer die zich voltijds met dit onderwerp bezig houden. Dit, terwijl er in het laatste decennium toch grote ziekteproblemen ontstonden door bacterieziekten. De vraag is, hoe bacteriologische kennis en expertise in Nederland kan worden behouden en bij voorkeur kan worden versterkt.

Recente ontwikkelingen

Binnen de, door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) gefinancierde, beleidsondersteunende (BO) programma's wordt nog altijd aandacht besteed aan diagnostiek van plantpathogene bacteriën, met name aan moleculaire technieken. Deze projecten worden voornamelijk uitgevoerd binnen Plant Research International (PRI) en PPO Bloembollen. Onderzoek aan methodiekontwikkeling wordt ook uitgevoerd door de keuringsdiensten (NAK, NAKT en BKD) en door particuliere laboratoria, zoals het Hilbrands Laboratorium voor Bodemziekten en Groen Agro Control. Voor zaadgebonden bacterieziekten heeft, sinds de hiervoor beschreven afname aan bacteriologisch onderzoek bij universiteiten, instituten en proefstations, een concentratie binnen de zaadveredelingsbedrijven (vooral in de tuinbouwsector) plaats gevonden. Een ander, in aanleg privaat initiatief, is het "Deltaplan Erwinia" (aardappel en bloembollen) dat grotendeels door het betrokken bedrijfsleven wordt gefinancierd en dat vooral toegepast onderzoek beoogt. Het Deltaplan Erwinia genereert ook onderzoekcapaciteit bij de betrokken bedrijven. Onderzoek binnen private ondernemingen leidt echter niet noodzakelijkerwijs tot kennis die vrij toegankelijk is. Voeding door, en aansluiting bij, fundamenteel en strategisch wetenschappelijk onderzoek aan de betrokken bacteriën blijft van wezenlijk belang. Binnen de Plantenziektenkundige Dienst con-

centreert de onderzoekaandacht zich, naast bruin- en ringrot, steeds meer op de quarantaine (Q) -organismen *C. michiganensis* pv. *michiganensis* en *X. fragariae*.

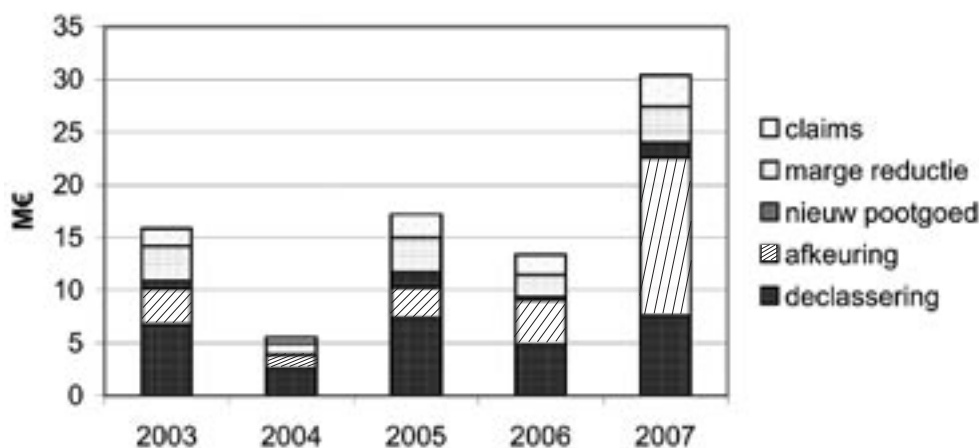
Daarnaast wordt op dit moment door PRI en PPO voor een aantal belangrijke bacteriële ziekteverwekkers ook ecologisch onderzoek verricht, zoals onderzoek aan *Pectobacterium* en *Dickeya* in bloembollen en aardappelen, aan zaadinfectie door *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in koolgewassen en aan *X. fragariae* in aardbei.

Belang van bacteriologisch onderzoek

In uitgangsmateriaal (zaden, bollen, pootgoed, etc) worden, naast virusziekten, bacterieziekten beschouwd als de grootste bedreiging. Bacteriën kunnen immers gedurende langere perioden latent en in lage concentraties in uitgangsmateriaal aanwezig zijn. Detectie van deze lage aantallen is vaak gecompliceerd. Zowel de kleinschalige (binnen de plant) als de grootschalige (in het gewas) verdeling van de ziekteverwekker is in de regel niet homogeen. In besmet zaad bijvoorbeeld, wordt vaak een Poisson-distributie van de betrokken bacteriën gevonden. Dit heeft consequenties voor de bemonstering.

Componenten van plantendelen in te toetsen extracten (saprophytische bacteriën bij uitplaten, bacteriën die kruisreacties veroorzaken in serologische assays, stoffen die PCR- amplificatie hinderen) kunnen storend werken op de detectie van pathogene bacteriën. Ook de genetische en serologische diversiteit van bacteriepopulaties kunnen detectie bemoeilijken, zoals bij *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, een pathogeen met een brede waardplantreeks. Bij ziekteontwikkeling kunnen bacteriën zich snel verspreiden via grondwater, spatwater, aerosolen, insecten en teeltmaatregelen. In Nederland zijn geen gewasbeschermingsmiddelen toegelaten waarmee plantpathogene bacteriën afdoende kunnen worden bestreden. Tenslotte is een aantal pathogene bacteriën als quarantaine-organismen op de A1 en A2 EPP0-lijst geplaatst. Besmettingen met deze organismen kunnen tot verregaande beheersmaatregelen leiden, met alle financiële gevolgen van dien.

Het economisch belang van bacterieziekten voor de Nederlandse land- en tuinbouw is dan ook groot. Alleen al aan ziekten veroorzaakt door *Dickeya* en *Pectobacterium* (Erwinia), in de pootaardappel- en bloembolteelt, wordt per jaar tegenwoordig een verlies geleden van minimaal 25 M€ (Figuur 1). In 2008 veroorzaakte *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, de veroorzaker van bacteriekanker, een miljoenen schade in de tomatenteelt (Anonymus, 2008).



Figuur 1. Geschatte schade in de jaren 2003 tot 2007, veroorzaakt door de ziekten zwartbenigheid en stengelnatrot (*Dickeya* en *Pectobacterium*) in de pootaardappelteelt. Nieuw pootgoed, afkeuring en declassering: schade voor de pootgoedteler; claims en marge reductie: schade voor de handelshuizen (Bron LEI).

De bacterieziekten die op dit moment in de Nederlandse teelten de grootste schade veroorzaken zijn te vinden in Tabel 1.

Verwacht wordt dat de schade als gevolg van bacterieziekten in de toekomst zal toenemen. Door de opwarming van de aarde zal er, naar verwachting, tijdens het groeiseizoen meer en heviger neerslag vallen waardoor ziekteontwikkeling en verspreiding van pathogene bacteriën wordt bevorderd. Verder rukken sommige insecten (cicade-achtigen), die fytoplasma's kunnen overbrengen, verder op naar het noorden. De Nederlandse land- en tuinbouw concentreren zich steeds meer op de kennis- en kapitaalintensieve vermeerdering van uitgangsmateriaal. Een deel van dit uitgangsmateriaal, bijvoorbeeld groentezaden, wordt op wereldschaal in verschillende geografische gebieden geproduceerd, waardoor de kans op introductie van nieuwe bacteriële pathogenen of pathogeenvarianten wordt vergroot.

II. Diagnostiek

Beheersing van bacterieziekten berust tot op heden vooral op preventie. Het gebruik van pathogeenvrij uitgangsmateriaal is één van de belangrijkste elementen binnen een preventiestrategie. Vandaar dat binnen het huidige bacteriologisch onderzoek veel aandacht besteed wordt aan diagnostiek. Het blijft noodzakelijk om via regelmatige surveys introducties van nieuwe pathogenen en pathogeenvarianten op te sporen. Dit geldt in het bijzonder voor quarantaineorganismen. De beschikbaarheid van betrouwbare, betaalbare en efficiënte isolatiemethodieken is daarbij essentieel. Inmiddels zijn er al voor veel pathogene bacteriën op DNA gebaseerde detectiemethoden ontwikkeld. De grootschalige, routinematige toepassing daarvan binnen de keuringssystematiek komt voorzichtig op gang. Er is een sterke behoefte aan snelle methodieken waarmee levende van dode bacteriën

Tabel 1. Belangrijke bacterieziekten in de Nederlandse land- en tuinbouw.

Pathoogeen	Gewas	Status	Ziekte	Schade
<i>Pectobacterium</i> en <i>Dickeya</i>	Aardappel		Zwartbenigheid	17-30 m€/jaar
<i>Pectobacterium</i> en <i>Dickeya</i>	Bloembollen		o.a. snot bij hyacint	Ca. 10 m€/jaar
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Kool		Zwartnervigheid	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Tomaat	A2	Bacteriekanker	1-5 M€(2008)
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Aardbei	A2	Bladvlekkenziekte	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Boomteelt en bloemisterij		Wortelknobbel	
<i>Erwinia amylovora</i>	Fruitteelt	A2	Perenvuur	
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Watermeloen en komkommer		"Fruit blotch"	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	Paardenkastanje		Bloedingsziekte	

kunnen worden onderscheiden. Validatie van methodieken is daarbij een tijdrovende, dure maar onontbeerlijke zaak. Door de Plantenziektenkundige Dienst wordt geëist dat alle, door de keuringsdiensten gebruikte, methodieken een volledige validatie hebben doorlopen op basis van NEN-ISO-normen.

Schadedrempels

Voor veel pathogenen die kwaliteitsziekten kunnen veroorzaken, ontbreekt veelal nog de kennis over schadedrempels. Wat betekent een bepaalde laboratoriumuitslag m.b.t. de verwachte schade? In een aantal gevallen zijn contaminaties van plantmateriaal met ziekteverwekkers nauwelijks uit te sluiten. Contaminaties leiden echter niet altijd tot infecties en infecties niet tot meetbare schade. Kennis over de relaties tussen besmettingsniveaus, omgevingsfactoren en te verwachten schade ontbreekt veelal. *Agrobacterium tumefaciens* en *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* komen bijvoorbeeld vaak in lage dichtheden in de grond voor, maar de kans op het optreden van respectievelijk wortelknobbel of natrot is onbekend.

Bemonstering en extractie

Het gebruik van gevalideerde, betrouwbare bemonsterings- en extractieprotocollen is essentieel voor het aantonen van pathogenen in niet-symptomatisch plantmateriaal. Deze protocollen ontbreken voor een aantal belangrijke pathogenen, inclusief quarantaineorganismen zoals *Erwinia amylovora* en *Xanthomonas fragariae*. Voor andere pathogenen (bijv. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) zijn de bemonsteringstechnieken bewerkelijk en kostbaar. Een goede kennis van de epidemiologie van deze ziekten vormt de basis voor het ontwikkelen van bemonsteringsprotocollen. Dit vraagt vaak onderzoek over verschillende jaren.

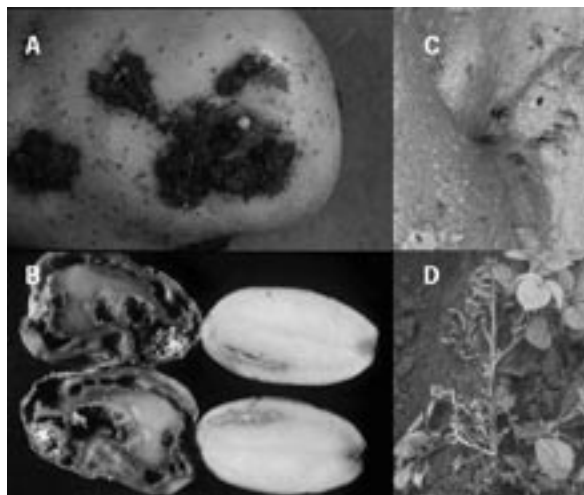
Monitoring van pathoogpopulaties

In de afgelopen decennia is Nederland een aantal malen geconfronteerd met de introductie van nieuwe pathogenen of pathoogvarianten. Daarbij kan gedacht worden aan de ernstige uitbraak van bruinrot (*Ralstonia solanacearum*) in 1995, incidentele besmettingen met ringrot (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*), de verspreiding van de bloedingsziekte (*Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*) in paardenkastanje, maar ook aan de vondst van een nieuwe variant van *Erwinia chrysanthemi* (Dickeya) in 2007 (Figuur 2). Regelmatige surveys, gevolgd door (genetische)

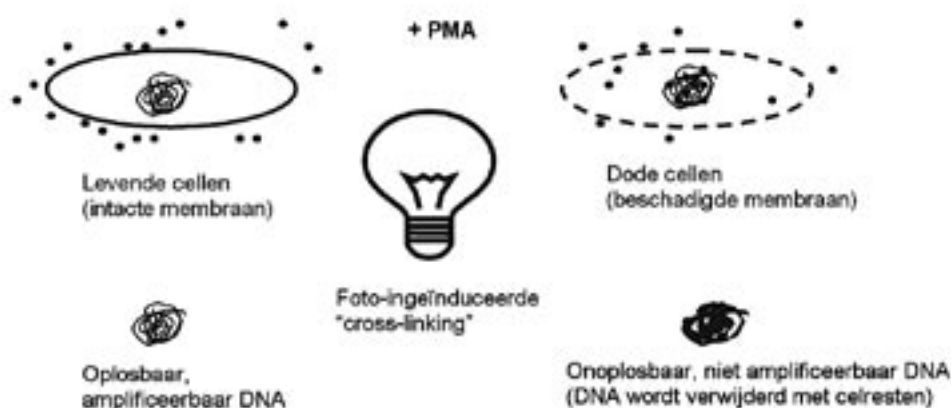
karacterisering van bacteriële pathogenen, blijven noodzakelijk. Voor bacteriesoorten die virulente en avirulente vormen kennen (bijvoorbeeld *E. carotovora* subsp. *carotovora* in de aardappelteelt), dienen merkers voor virulentie ontwikkeld te worden. De beschikbaarheid van goed gevalideerde, internationaal geaccepteerde karakteriseringsmethodieken is bij dit alles van wezenlijk belang.

Gevalideerde detectiemethoden

Keuringsdiensten streven ernaar om voor detectie van plantpathogenen, wanneer betrouwbare serologische toepassingen niet voorhanden zijn, zo veel mogelijk gebruik te maken van (kwantitatieve) TaqMan PCR methoden. Het gebruik van serologische methoden voor bacteriën, zoals cel-kleuring met immunofluorescentie en ELISA, staat regelmatig ter discussie vanwege problemen met specificiteit en soms ook de serologische diversiteit van het te detecteren pathoog. Om de vereiste gevoeligheid te halen moet echter detectie met een TaqMan PCR-methode veelal voorafgegaan worden door een verrijking van de bacterie in of op een groeimedium (Bio-Taqman PCR). Voor controle op het extraheren, detecteren en kwantificeren van pathogene bacteriën zijn betrouwbare interne controles nodig. Gestreefd wordt naar protocollen waarmee verschillende pathogene bacteriën in het monster, al dan niet na verrijking, gelijktijdig



Figuur 2. Introducties van nieuwe ziekteverwekkers: A. *Ralstonia solanacearum* – bruinrot in aardappel (vuile ogen, foto PD), B. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* - ringrot in aardappel (knolrot), C. *Pseudomonas* sp. – bloedingsziekte in (foto werkgroep Aesculaap), D. *Dickeya* sp. – zwartbenigheid aardappel.



Figuur 3. Propidium monoazide (PMA) PCR voor DNA amplificatie van specifiek levende bacteriecellen. PMA is wel in staat om dode cellen met een beschadigde membraan binnen te dringen, maar levende cellen met een intacte membraan niet. PMA hecht zich aan het DNA en wordt met behulp van foto-geïnduceerde cross-linking covalent gebonden aan het DNA. Tijdens de DNA-extractie wordt het PMA-DNA complex met de celresten verwijderd.

gedetecteerd kunnen worden (multiplex PCR, BioPlex PCR) en waarmee dus kosten worden bespaard.

Levend versus dood

Gebruik van PCR kan het detecteren van dode bacteriën niet uitsluiten, zelfs niet als een Bio-PCR protocol wordt toegepast (Schaad *et al.*, 1995). In bepaalde situaties is specifieke detectie van levende cellen gewenst, bijvoorbeeld na een zaadbehandeling met warm water. Er zijn nu moleculaire methoden beschikbaar waarmee detectie van dode cellen in PCR kan worden uitgesloten. Dit kan door, in plaats van DNA, RNA te detecteren. RNA wordt in tegenstelling tot DNA snel afgebroken na celdood (Van der Wolf, 2004). Ook zijn er methoden, zoals PMA-PCR, waarmee selectief het DNA van dode bacteriecellen kan worden verwijderd (zie Figuur 3, Nocker *et al.*, 2007).

Isoleren versus detecteren

Bij keuringsdiensten blijft de vraag bestaan of, zoals nu is voorgeschreven in EPPO-protocollen, isolatie van Q-organismen noodzakelijk is. In sommige gevallen groeit het pathogeen slechts langzaam en wordt het op agarmedia vaak overgroeid door andere micro-organismen. Dit geldt o.a. voor *Xanthomonas fragariae* in aardbei en *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in aardappel. E.e.a. leidt er regelmatig toe dat uit (Bio-) PCR positieve monsters de doelbacterie niet geïsoleerd kan worden. Verbetering van de groeimedia, door deze selectiever te maken, is één mogelijkheid. Een andere oplossing voor dit probleem is mogelijk het gebruik van goed gevalideerde, op DNA-detectie gebaseerde, technie-

ken, die in staat zijn om dode van levende bacteriën te onderscheiden. De betrouwbaarheid zou verder verhoogd kunnen worden door meerdere DNA-sequenties, bij voorkeur virulentiegenen, simultaan aan te tonen. Hiermee ontstaat een hoge mate van zekerheid dat monsters daadwerkelijk besmet zijn met het vitale doelorganisme. Uiteraard kan een dergelijke aanpak niet zonder overleg met, en instemming van, de landen die participeren binnen EPPO.

III. Ontsmetting en sanitatie

Ontsmetting

Bij de beheersing van bacterieziekten blijven er vragen omtrent de effectiviteit van beschikbare bactericiden voor ontsmetting van materialen en machines. De effectiviteit daarvan is sterk afhankelijk van de verontreiniging met organisch materiaal, zoals grond en gewasresten.

Sanitatie

Het ontbreekt aan (toegelaten) bactericiden en antagonisten (inclusief bacteriofagen) voor de bestrijding van plantpathogene bacteriën in en op plantmateriaal. Er is een terugkerende vraag vanuit de sector naar middelen voor sanitatie. Overheid en bedrijfsleven zouden hier gezamenlijk naar moeten kijken. Hierbij moet ook de potentie van middelen, die weerstand tegen bacteriële pathogenen in planten induceren, onderzocht worden. Het voordeel van deze laatste middelen is dat er minder risico is op resistentievorming. In dit type onderzoek moet voortdurend rekening worden gehouden met de commerciële haalbaarheid van toepassing,

omdat voor toelating kostbare registratiedossiers nodig zijn.

IV. Ecologie

Beheersing van bacterieziekten berust, naast gebruik van pathogeenvrij uitgangsmateriaal en sanitatie, ook op het voorkómen van introducties en verspreiding van de ziekteverwekker. Kennis van de ecologie is noodzakelijk voor het ontwikkelen van efficiënte hygiëne- en teeltmaatregelen.

Besmettingsbronnen

Voor een aantal belangrijke, bacteriële ziekteverwekkers is het belang van de verschillende infectiebronnen onbekend. Via kwantitatief ecologisch onderzoek kunnen infectiebronnen worden geïdentificeerd en kan het relatieve belang worden bepaald. Deze gegevens kunnen worden gebruikt in bio-economische modellen (Breukers, 2006). Een dergelijke aanpak is al toegepast om de effectiviteit van maatregelen, die voor beheersing van bruinrot in de aardappelteelt kunnen worden gebruikt, in kaart te brengen. Ook dient er, met het oog op de ontwikkeling van een effectieve bemonsteringssysteem, meer kennis te komen over de verdeling van de ziekteverwekkers in ruimte en tijd (zie II).

Overlevingsstrategieën

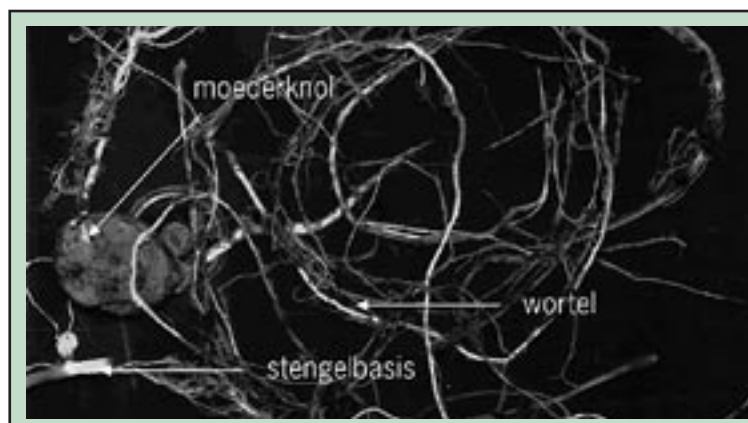
Om (onverwachte) introducties te voorkomen is een goede kennis van overlevingsstrategieën essentieel. Onder andere op het gebied van overleving in gewasresten en in alternatieve waardplanten liggen er vragen. Veel van de economisch belangrijke pathogenen hebben namelijk een brede waardplantenreeks. Ook is onderzoek gewenst naar de aanwezigheid van cellen die wel levend, maar niet kweekbaar zijn ("viable but not culturable"), omdat deze makkelijk gemist kunnen worden in op kweek gebaseerde technieken (Van Overbeek *et al.*, 2004).

Kolonisatie van de waardplant

Dit type studies is nodig om vast te kunnen stellen wanneer en waar sanitatie van plantmateriaal zin heeft. Door de kolonisatie van het pathogeen in vatbare en resistente cultivars te volgen, kunnen basisgegevens worden gegenereerd voor resistentieveredeling. Met fluorescente (GFP) gemerkte bacteriën, in combinatie met UV-microscopie of met confocale laserscanning microscopie, kan de kolonisatie van planten in detail gevolgd worden. De verwachting is dat in de nabije toekomst niet-invasieve technieken beschikbaar komen voor studie naar kolonisatie van de plant met GFP-gemerkte bacteriën (Figuur 4).

V. Plant – pathogeen interacties

Mechanistisch onderzoek naar factoren die van belang zijn voor ziekte-expressie is van belang voor o.a. de resistentieveredeling tegen bacterieziekten en onderzoek naar specifieke bactericiden. Door het uitvoeren van dit type onderzoek is er voor *Pectobacterium atrosepticum* een transcriptiefactor geïdentificeerd die bij overexpressie, via triggering van het resistentiemechanisme, leidt tot resistentie van de waardplant. Een dergelijke benadering zou in theorie bruikbaar kunnen zijn om, bijvoorbeeld via cisgenese, plantmateriaal resistent te maken. Ook zijn er plantenmetabolieten geïdentificeerd die de waardplant kunnen aanzetten tot locale of systemische resistentie tegen bacteriële pathogenen. Recentelijk is zo de rol van azelaïnezuur in *Arabidopsis* vastgesteld. Getracht kan worden dergelijke metabolieten tot overexpressie te brengen. Mechanistisch onderzoek heeft ook geleid tot ontdekking van 'quorum sensing' bij bacteriën. Bij quorum sensing spelen signaalstoffen van de bacterie een rol, waarmee de dichtheid van de eigen populatie wordt gemeten. Pas als de populatiedichtheid hoog genoeg is om de waardplant te kunnen infecteren, gaat



Figuur 4. Kolonisatie van ondergrondse delen van de aardappel met een GFP-gemerkte *Dickeya* sp., zichtbaar gemaakt met een niet-invasieve methode (GFP-screen). Plantendelen geïnfecteerd met GFP-gemerkte *Dickeya* sp. lichten op.

de bacterie over tot expressie van virulentiefactoren. De bacterie blijft zo lange tijd verborgen voor het afweermechanisme van de plant. Quorum sensing speelt ook een belangrijke rol bij vorming van biofilms, waarbinnen bacteriën zich kunnen beschermen tegen ongunstige omstandigheden en bactericiden. Door de signaalstoffen van de ziekteverwekker te inactiveren ('quorum quenching'), kan infectie worden voorkomen, zoals is aangetoond voor *Pectobacterium* in aardappel, of de vorming van biofilms worden verstoord

Mechanistisch onderzoek vraagt een fundamenteel-strategische aanpak en dient binnen, of in samenwerking met, universiteiten uitgevoerd te worden. Op dit moment wordt op beperkte schaal onderzoek gedaan aan (moleculaire) interacties tussen pathogene bacteriën en de plant (rol van bacteriële metaboliëten bij Fytopathologie (WUR), geïnduceerde resistentie bij de Plant-Microbe Interactions groep (Universiteit Utrecht)). Gezien het belang van plantpathogene bacteriën voor de Nederlandse land- en tuinbouw zou dit onderzoeksveld sterk moeten worden uitgebreid. Financiering kan komen vanuit wetenschappelijke fondsen, zoals NWO en STW.

VI. Naar een integrale benadering

Beheersingsstrategieën

Het hiervoor geschetste, noodzakelijke onderzoek naar de ecologische aspecten van plantpathogene bacteriën, plant-pathogeeninteracties, toetsingsprotocollen en mogelijkheden voor ontsmetting en sanitatie moet uiteindelijk resulteren in integrale, ketengerichte en kosteneffectieve beheersingsstrategieën. Samenwerking tussen bèta- en gamma-onderzoekers is hiervoor van groot belang. Onderzoekinstellingen, keuringsdiensten, Plantenziektenkundige Dienst en bedrijfsleven moeten daartoe intensief blijven communiceren en samenwerken. Van dit laatste is het 'Deltaplan Erwinia' een goed voorbeeld. In nieuwe onderzoeksprogramma's moet voldoende budget vrijgemaakt worden om een dergelijke aanpak mogelijk te maken.

Binnen het onderzoek wordt veelal gekeken naar het effect van één maatregel op de beheersing van bacteriële plantenziekten. Echter, een effectieve beheersstrategie vraagt om een integrale benadering waarbij de individuele beheersmaatregelen op elkaar worden afgestemd. Kritische controlepunten moeten worden geïdentificeerd tijdens teelt, oogst en opslag. Via bio-economische modellering moet de effectiviteit en de economische haalbaarheid van (combinaties

van) beheersmaatregelen vaker in kaart worden gebracht, zoals eerder gedaan voor bruinrot in aardappel (Breukers, 2006). De modellen moeten via onderzoek in de praktijk worden geëvalueerd.

Het is daarbij van wezenlijk belang om voldoende fundamenteel onderzoek te blijven genereren ter ondersteuning en voeding van het (toegepaste) onderzoek bij keuringsdiensten, bedrijfsleven, Plantenziektenkundige Dienst etc. Een leerstoel 'fyto bacteriologie' aan de WUR kan bij dit alles een belangrijke vliegwielfunctie vervullen. Net als bij bacteriën, kun je kennis vermenigvuldigen door te delen!

Literatuur

- Anonymus (2008) Miljoenschade door Clavibacter. Groenten en Fruit 62, 11 januari 2008
- Breukers A (2006) Bio-economic modelling of brown rot in the Dutch potato production chain. PhD thesis, Wageningen University, 141 pp
- Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD & Camper AK (2007) Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. Applied and environmental microbiology 73: 5111 – 5117
- Schaad NW, Cheong SS, Tamaki S, Hatziloukas E & Panopoulos NJ (1995) A combined biological amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv *syringae* in bean seed extracts. Phytopathology 85: 243-248
- Van der Wolf JM, Van Beckhoven JRCM, De Haan EG, Van den Bovenkamp GW & Leone GOM (2004) Specific detection of *Ralstonia solanacearum* 16S rRNA sequences by AmpliDet RNA. European Journal of Plant Pathology 110: 25 –33
- Van Overbeek LS, Bergervoet JHW, Jacobs FHH & Van Elsas JD (2004) The low temperature induced viable but nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. Phytopathology 94: 463-469

Effectieve kolonisatie van aardappelplanten door *Dickeya*-soorten (*Erwinia chrysanthemi*)

Jan van der Wolf, Robert Czajkowski en Henk Velvis

PRI Bio-interacties en Plantgezondheid

De bacterieziekten zwartbenigheid en stengelnatrot, veroorzaakt door *Pectobacterium* en *Dickeya* (*Erwinia*)-soorten, berokkenen grote schade aan de pootaardappelteelt. Bij PRI en HZPC wordt onderzoek verricht naar de verspreiding van deze pathogenen tijdens teelt- en (na) oogst. Het was al bekend dat er bij aanwezigheid van rotte knollen, tijdens oogst en na oogst, versmering van pootgoed kan plaatsvinden. Getracht is de vraag te beantwoorden hoe verspreiding tijdens de teelt kan plaatsvinden, zowel via boven- als via ondergrondse delen van de plant.

Van bovengronds naar ondergronds

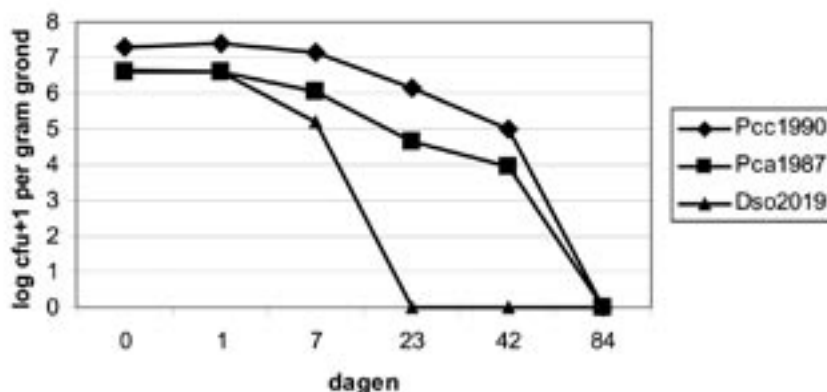
Hoewel introductie van *Erwinia* via natuurlijke openingen (stomata) in blad en stengel niet uitgesloten kan worden, is voor een effectieve besmetting van het aardappelloof beschadiging nodig. Besmetting van verwond loof kan plaatsvinden tijdens teeltwerkzaamheden, zoals het spuiten met gewasbeschermingsmiddelen. Machines kunnen in aanraking komen met systemisch geïnfecteerde planten waarna het inoculum verder wordt verspreid via verwonde stengels of bladeren. Loof kan ook besmet raken door dieren en mensen die door het gewas lopen en de bacterie verspreiden via vacht, kleding of schoeisel. De vraag is of besmet loof vervolgens kan resulteren in besmette knollen. In principe zijn er twee routes voorstelbaar. De eerste route is via de grond als de bacteriën uit loofresten lekken. Dit kan tijdens de gewasgroei, of ook na loofvernietiging als besmette loofresten boven de dochterknollen blijven liggen. De tweede route is via systemische verspreiding vanuit het loof via stengels, wortels en stolonen naar de dochterknollen. Aangenomen wordt, dat een neerwaartse beweging van de bacterie tegen de sapstroom van de plant in, onwaarschijnlijk is.

Binnen PPO heeft Nicolien Roozen onderzoek uitgevoerd naar het risico vanuit besmet loof. Zij vond dat in aardappelplanten, symptomeloos besmet met *Pectobacterium atrosepticum* en *Dickeya dianthicola*, hoge dichtheden van gemiddeld 10^6 bacteriën per ml extract aanwezig waren. Dit kwam overeen met onderzoek dat eerder in Schotland uitgevoerd is (Burgess *et al.*, 1994).

Als dit loof werd uitgespreid op de grond boven pathogeenvrije knollen en er daarna kunstmatig werd berekend, kon *P. atrosepticum* in de knollen worden aangetoond in een dichtheid van ca. 100 cellen per knol, ook als de knollen wat dieper in de grond lagen (Roozen, niet gepubliceerd). *D. dianthicola* kon echter niet worden teruggevonden in de knollen. Uit recent onderzoek binnen PRI is gebleken dat *Dickeya* spp.-populaties sneller afsterven in grond dan *Pectobacterium* spp. (Figuur 1). Mogelijk is dat een verklaring. Besmetting van aardappelplanten vanuit besmet loof via inspoeling in grond lijkt dus wel mogelijk voor *Pectobacterium* spp., maar is niet aangetoond voor *Dickeya* spp.

Binnen PRI en HZPC is onderzoek gedaan naar neerwaarts transport van de bacterie, vanuit besmet loof, naar de ondergrondse delen van de plant. In een kas werden planten opgekweekt tot het stadium dat er stolonen (ondergrondse stengels) gevormd werden. Drie stengels van elke plant werden geïnoculeerd met een GFP-gemerkte stam van *Dickeya* sp. via injectie met een besmette pipetpunt. De wond werd met plastic folie afgedekt om uitdrogen te voorkomen. De planten werden dertig dagen gekweekt en daarna m.b.v. uitplaten, UV-microscopie en confocale laser scanning-microscopie geanalyseerd op *Dickeya*-besmetting. Om de bacterie in plantendelen goed terug te kunnen vinden m.b.v. microscopie werden plantendelen eerst ingebed in een agarmedium en geïncubeerd gedurende twee dagen bij 27 °C. Hierbij vermeerderde *Dickeya* zich in het plantenweefsel, zodat niet

ARTIKEL



Figuur 1. Overleving van spontane antibioticum-resistente stammen van *Dickeya* sp. (*Dso* 2019), *Pectobacterium atrosepticum* (*Pca* 1987) en *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc* 1990) in grond.

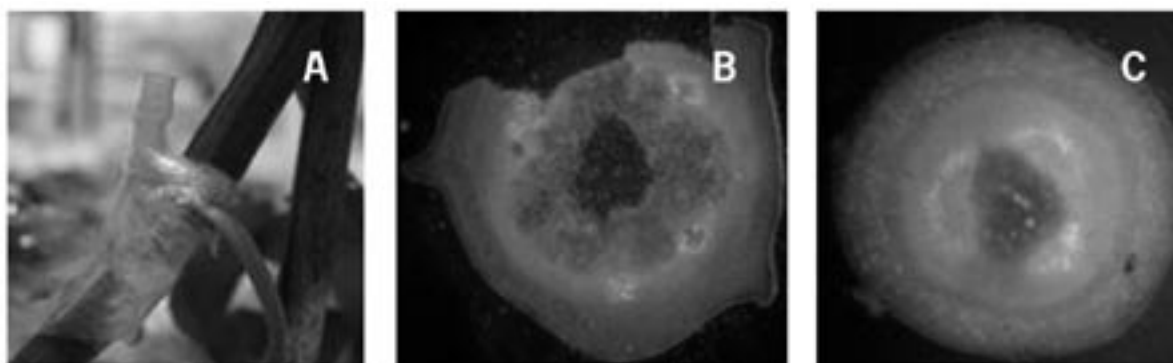
invasief de besmettingen in de plantendelen getraceerd konden worden. De bacterie werd met uitplaten en microscopie in alle plantendelen teruggevonden: in de stengel, wortels, stolonen en dochterknollen (Figuur 2). Een identiek experiment in het veld met een antibioticumresistente mutant van *D. dianthicola* (uitgevoerd bij HZPC) toonde aan dat de bacterie zich wel vanuit de wond naar de stengelbasis kon bewegen, maar niet tot in de ondergrondse delen van de plant. Mogelijk is dit een effect van de gekozen stam. Ook in andere (veld-) experimenten werden grote verschillen in virulentie tussen stammen van *Dickeya* waargenomen. Vanuit besmette bladeren kon *Dickeya* sp. wel de stengel, maar niet de ondergrondse delen van de plant bereiken.

Verspreiding ondergronds

Van *P. atrosepticum* is bekend dat deze zich vanuit rotte knollen kan verspreiden via vrij water tot een afstand van een tot drie meter (Harrison & Brewer, 1982). Onderzoek van HZPC in het veld

liet zien dat *Dickeya* zich vanuit besmette knollen tot tenminste een meter kan verplaatsen (afstand van drie planten) binnen een rij en ook naar buurplanten in een volgende rij. De bacteriën kunnen knollen infecteren via wonden, of lenticellen die met nat weer openstaan. Het was niet bekend of de bacteriën in staat zijn wortels te penetreren en ook niet of ze, vanuit die wortels, andere delen van de plant, inclusief de dochterknollen, systemisch kunnen infecteren.

In kasexperimenten met een GFP-gemerkte stam van *Dickeya* sp., werd gevonden dat inoculatie van grond, waarin aardappelplanten werden gekweekt, al na één dag resulteerde in systemische infectie van de wortels. Het maakte nauwelijks uit of planten werden geïnoculeerd met een beschadigd wortelstelsel (ca. 30% verwijderd met een mes) of met een intact wortelstelsel. Na vijftien dagen werd de bacterie in de stengels teruggevonden en na dertig dagen werden planten met zwartbenigheid waargenomen. De bacterie kon na dertig dagen ook getraceerd worden in stolonen en in het navelende van dochterknollen (Tabel 1). *Dickeya* sp.



Figuur 2. Systemische infectie van aardappelplanten door GFP-gemerkte stam van *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*) na stengelinoeculatie (A). De GFP gemerkte bacteriën zijn terug te vinden in vaatbundels van stengels (B) en stolonen (C).

Tabel 1. Systemische infectie van aardappelplanten door een GFP-gemerkte stam van *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*) vanuit geïnfecteerde gronden (percentage inwendig geïnfecteerde monsters).

Tijd na inoculatie (dagen) ¹	Wortels	Stolonen	Dochterknollen
1	17		
15	42	13	13
30	75	50	38

¹ Planten hadden eerste stolonen gevormd (ca. 10 cm hoog) toen potgrond werd geïnfecteerd met de bacterie

is dus uitstekend in staat om wortels binnen te dringen en van daaruit de planten te koloniseren. Aangenomen wordt, dat de bacteriën vooral tijdens de vorming van laterale wortels, waarbij natuurlijke openingen ontstaan, naar binnen dringen. Dit is in het verleden waargenomen bij planten *in vitro* werden opgekweekt (Underberg, 1992).

Besmettingen aan de navelinden die ontstaan bij systemische infecties zijn lastig via knolbehandelingen, zoals desinfectie met bactericiden of fysische methoden, te elimineren. Daarom moet onderzocht worden hoe efficiënt bacterie-infecties, na planten van pootgoed, vanuit navelinden verlopen t.o.v. infecties in het periderm (o.a. lenticellen).

Naar behandeling van pootgoed

In een volgende fase van het onderzoek zal gekeken worden naar de mogelijkheid om pootgoed te beschermen met antagonisten. Vanuit pootgoed zijn diverse soorten antagonisten geïsoleerd die *in vitro* en op aardappelknolschijven effectief de groei van *Dickeya* afremmen of ook de bacteriën doden. Momenteel wordt onder-

zoek gedaan naar de effectiviteit van antagonisten om systemische infecties van *Dickeya* vanuit de knol naar stengel te voorkomen.

Dit onderzoek wordt gefinancierd vanuit het beleidsondersteunende onderzoeksprogramma van het Ministerie van LNV. Robert Czajkowski werkt sinds 1 februari 2009 verder aan het onderzoek met een PhD-beurs van STW (nr. 10306)

Literatuur

- Burgess PJ, Blakeman JP & Perombelon MCM (1994) Contamination and subsequent multiplication of soft rot *Erwinias* on healthy potato leaves and debris after haulm destruction Plant Pathology 43, 286-299
- Harrison MD & Brewer JW (1982) Field dispersal of soft rot bacteria In: Phytopathogenic Prokaryotes, Vol 2, ed. Mount, MS & Lacy, GH, pp 31-53 New York: Academic Press
- Underberg HR (1992) Ecological model studies on the colonization patterns and population dynamics of *Erwinia chrysanthemi* Burkholder, Mc Fadden and Dimock 1953 in the rhizosphere of potato In: Facultät für Biologie, pp 117 Tübingen, Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Toetsontwikkeling op *Erwinia* bij de NAK: BioPlex real-time PCR

Eisse G. de Haan en Gé W. van den Bovenkamp

NAK, Postbus 1115, 8300 BC Emmeloord; e-mail: ehaan@nak.nl; gbovenkamp@nak.nl

Inleiding

De Nederlandse Algemene Keuringsdienst voor zaaizaad en pootgoed van landbouwgewassen (NAK) houdt zich, als onafhankelijke keuringsinstelling, bezig met de kwaliteitsbewaking en certificering van zaaizaad en pootaardappelen. De belangrijkste kwaliteitsziekte bij pootaardappelen in Nederland wordt veroorzaakt door een groep bacteriën die we in dit artikel met 'Erwinia-complex' of 'Erwinia spp.' aanduiden. Oorspronkelijk betrof dit alleen *Pectobacterium atrosepticum* (voorheen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) en de bacteriën behorende tot de nieuw benoemde *Dickeya*-groep (voor aardappel voornamelijk *Dickeya dianthicola* en een recent door Slawiak *et al.* onderscheiden, afwijkende biovar 3 clade; beiden voorheen *Erwinia chrysanthemi*). Onderzoek door NAK en Plant Research International (de Haan *et al.*, 2008) liet zien dat er in West-Europa, binnen de soort *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (voorheen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) ook stammen voorkomen

die, na knolinoculatie, te velde dezelfde ziektesymptomen veroorzaken als *P. atrosepticum* en de in Nederland voorkomende *Dickeya* spp. (Figuur 1). Deze symptomen staan bekend als zwartbenigheid en stengelnatrot van aardappel.

Toetsingen: heden en verleden

De NAK zet al langer knoltoetsingen in als hulpmiddel bij het beheersen van 'Erwinia spp.' In de jaren tachtig van de vorige eeuw hanteerde de NAK een verplichte, serologische nacontroletoets (ELISA) op *P. atrosepticum* voor de top van de pootgoedkolom. Daarbij werden partijen pootaardappelen met een te hoog besmettingspercentage gedeclasseerd naar die klasse waarvoor geen verplicht onderzoek was voorgeschreven. Vanwege het ontbreken van een betrouwbare toetsmethode voor *Dickeya* spp., en vanwege een statistisch te kleine monstergrootte, erodeerde het vertrouwen van de sector in de toets met als gevolg dat iedere vorm van toetsing op 'Erwinia spp.' binnen de pootaardappelkolom verdween.

In 2001 ontwikkelde de afdeling Laboratoriummethoden & Diagnostiek van de NAK een nieuwe serologische aanpak waarbij *P. atrosepticum* en *Dickeya* spp. (na verrijking in een semiselectief medium) serologisch (ELISA) kunnen worden gedetecteerd. Via het poolen van monsters (naveleinden van knollen) kan een kostenbesparing worden bereikt en kan toch een schatting worden gegeven (*most probable number*-methode) van het percentage besmette knollen in de partij. Het betreft een toetsing op vrijwillige basis.

De betrouwbaarheid van het onderzoek blijkt sterk afhankelijk van de door inzender gekozen monstergrootte: statistisch is, bij een monstergrootte van 300 knollen, de kans dat een besmetting van 1% 'Erwinia spp.' in een homogeen besmette partij wordt aangetoond 95%. De NAK adviseert de toets als aanvulling op de eigen, door de inzender eerder verzamelde informatie in te zetten. Daarbij komen vragen aan bod als "hoeveel is er in het veld door de teler geselecteerd, wat is de voorgeschiedenis



Figuur 1. Zwartbenigheid in aardappel veroorzaakt door een pathogene stam van *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (verwelking, zwarte stengelvoeten).

van de partij, hoe waren de oogstomstandigheden, waren er veel rotte moederknollen aanwezig tijdens de oogst, wat is de bestemming, heb ik betere partijen als alternatief” etc.

Nieuwe ontwikkelingen

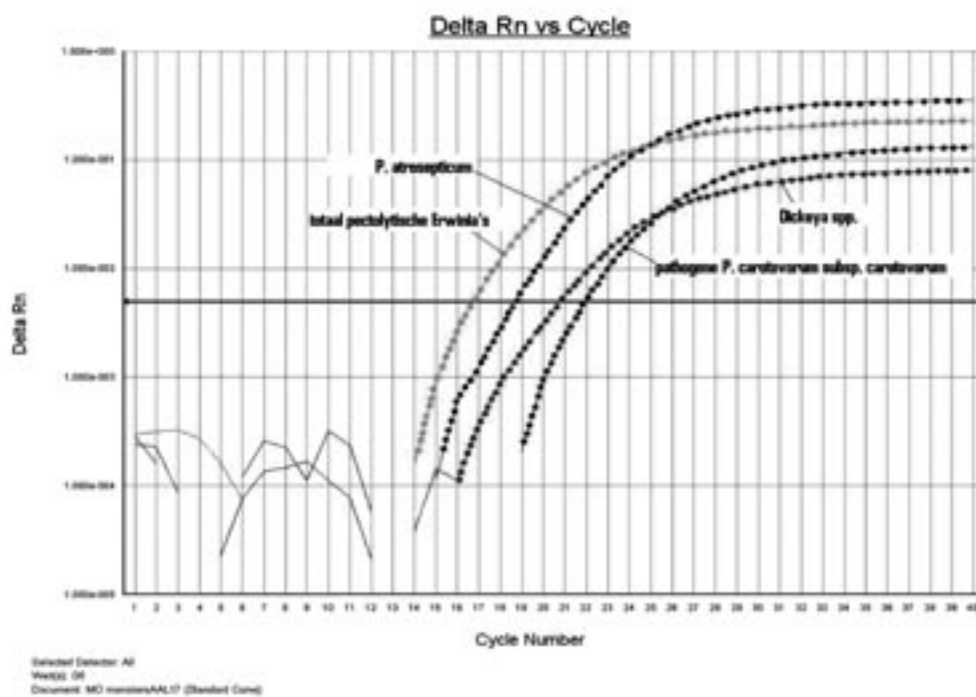
Omdat de groep pathogene *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) -stammen niet serologisch kan worden onderscheiden van niet-pathogene Pcc's, is een serologische toetsing op het complete 'Erwinia-complex' in pootaardappel niet mogelijk. Uit recent onderzoek bleek bovendien dat de beschikbare antisera tegen *P. atrosepticum* en *Dickeya* spp. kruisreageren met bepaalde pectolytische pseudomonaden en met sommige niet-pathogene Pcc's. Een oplossing dient daarom gezocht te worden in een moleculaire (DNA) benadering.

Uit een genetische karakterisering met behulp van REP-PCR (van der Wolf *et al.*, 2003) bleek bijna 90% van de pathogene Pcc's een gemeenschappelijk DNA-fragment te bezitten dat slechts incidenteel (10%) in niet virulente stammen voorkomt. Op basis van het uitgesneden en gereamplificeerde DNA-fragment zijn drie primersets ontwikkeld. Uiteindelijk heeft dit geleid tot de ontwikkeling van een primer/probe-combinatie voor een Taqman PCR.

Multiplex PCR

In 2008 bereikte de NAK al een belangrijke doorbraak bij de ontwikkeling van *multiplex real time PCR* voor het aantonen van virussen (PVX, PVY, PVA, PLRV) rechtstreeks aan aardappelknollen. Multiplex formats zijn essentieel voor routine-onderzoek om de prijs van de toets betaalbaar te houden. Dit nieuw ontwikkelde format is nu ook toegepast voor het *Erwinia*-onderzoek. De multiplex real time PCR wordt uitgevoerd in een 'mastermix' waarmee de verschillende doelorganismen in één multiplex-reactie even efficiënt en gevoelig geamplificeerd worden als in afzonderlijke monoplex-reacties. Eerder was dit in multiplexsystemen, wegens een drastisch afnemende gevoeligheid, vaak niet mogelijk.

Met deze nieuw ontwikkelde test kunnen (flexibel) tot vier doelorganismen aangetoond worden (Figuur 2). Naast de bekende drie pathogene *Erwinia*-soorten voor aardappel kan de multiplex PCR gecompleteerd worden met een generieke (pectolytische) *Erwinia*-detectie of met een cytochroom-oxidase (COX) -test (positieve controle op een goede DNA-extractie). Het voordeel van een aanvullende, generieke *Erwinia*-detectie is dat ook alle niet-pathogene (pectolytische) *Erwinia*'s aangetoond worden. Ten aanzien van de detectie van pathogene 'Erwinia spp.' werkt de generieke *Erwinia*-detectie als een extra bevestiging.



Figuur 2. 4-plex reactie. Door toepassing van vier verschillende fluorescente reporter dyes kan in één reactie onderscheid worden gemaakt tussen de vier verschillende doelorganismen (*P. atrosepticum*, *Dickeya* spp., pathogene *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en totaal pectolytische *Erwinia*'s)

Fluorescentiesignaal

Naast een juiste samenstelling van de mastermix, specifieke primers, de juiste primer/probe-concentraties etc., is vooral de keuze van het juiste type probes (voor elk doelorganisme verschillend) belangrijk. In dit systeem worden zgn. 'double-dye probes' toegepast. Deze double-dye probes hebben een fluorescerende reporter dye en een quencher die de fluorescentie van de dye tegengaat. Gedurende de amplificatie raakt, door exonuclease-activiteit van Taq DNA polymerase, de dye los van de quencher en begint te fluoresceren. Hoe vaker replicatie plaats vindt, des te groter de hoeveelheid reporter dye die begint te fluoresceren en hoe sterker het signaal. Via fluorescentiemeting kan het verloop van de amplificatie in de tijd gevolgd worden en kan de oorspronkelijke hoeveelheid doel-DNA worden berekend (zie ook: Roenhorst, 2006). Door een juiste combinatie van quenchers (zo weinig mogelijk achtergrond, waardoor de gevoeligheid van de test toeneemt) en dyes (geen spectrale overlap tussen de verschillende dyes) blijkt het mogelijk een multiplex PCR voor de praktijk te ontwikkelen met dezelfde kwaliteit als de afzonderlijke monoplex PCR's (Tabel 1).

Gevoeligheid en validatie

Gemiddeld ligt de gevoeligheid van een PCR voor *Erwinia*-onderzoek in knolsap rond 10^4 cellen per ml. Deze gevoeligheid is voor de praktijk onvoldoende. Immers, lagere (latente) besmettingen kunnen bij uitpoten van de knollen, onder voor het pathogeen gunstige omstandigheden, tot expressie komen met als gevolg declassering of afkeuring van het perceel. Daarom wordt ook bij de nieuwe NAK-test de detectie voorafgegaan door semi-selectieve verrijking van het sap in een pectinemedium. Op deze manier kan een gevoeligheid bereikt worden van enkele cellen per ml voorafgaande aan verrijking.

Door de NAK is uitgebreid onderzoek verricht naar de complexiteit van verrijking. Bij het onderzoek worden navels (primaire invalspoort via de stoloon voor de bacterie) van tien verschillende knollen samengevoegd. Het samenvoegen van knollen, met hun natuurlijke (onbekende dichtheden) bacteriepopulaties, vergroot de kans dat er meerdere pathogene doelorganismen in het verrijkingsmedium terechtkomen. Verschillende aanvangsconcentraties van doel- en niet-doelorganismen kunnen de efficiëntie van het

Tabel 1. Vergelijking van twaalf verrijkte praktijkmonsters, onderzocht in een 4-plex systeem en in afzonderlijke 1(mono)-plex systemen.

De monsters variëren sterk in pathogeen-samenstelling (besmettingsgraad en aantal aanwezige pathogenen). Nrs 1, 2: Pca; nrs 3, 4: *Dickeya* spp.; nrs. 5, 7: Pca en virulente Pcc; nrs. 6, 8, 9, 11,12 Pca, *Dickeya* spp. en virulente Pcc; nr. 7 Pca en virulente Pcc. PEC = generieke reactie voor *Erwinia* spp. ntc = no template controle. De Ct-waarden (aantal cycli dat is verlopen wanneer het fluorescentiesignaal de drempelwaarde passeert; de positieve waarden zijn cursief: Ct < 40) van de nieuw ontwikkelde BioPlex PCR zijn vergelijkbaar met de waarden van de afzonderlijke 1-plex PCR-testen.

Monster	4-plex PCR (Ct-waarden)				1-plex PCR (Ct-waarden)			
	nrs.	Pca	<i>Dickeya</i>	vPcc	PEC	Pca	<i>Dickeya</i>	vPcc
1	25,74	40,00	40,00	18,29	25,64	40,00	40,00	18,23
2	24,43	40,00	40,00	23,04	24,30	40,00	40,00	22,77
3	40,00	24,13	40,00	20,50	40,00	24,27	40,00	20,31
4	40,00	20,41	40,00	16,80	40,00	20,31	40,00	16,88
5	28,45	40,00	32,77	19,53	28,24	40,00	32,63	19,48
6	24,71	33,46	35,19	23,32	24,79	32,83	33,46	23,33
7	27,55	40,00	26,73	22,08	27,83	40,00	26,72	22,19
8	32,65	35,28	31,51	23,03	32,72	33,50	31,36	22,90
9	32,77	29,95	30,41	25,45	31,94	29,98	30,37	25,44
10	40,00	30,21	31,36	26,17	40,00	30,16	31,42	26,01
11	30,44	26,72	34,21	23,24	30,11	27,09	34,31	23,25
12	20,45	22,98	22,62	18,38	20,31	22,53	22,69	18,24
ntc	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
Gem. pos.	27,47	27,89	30,60	21,65	27,32	27,58	30,37	21,59
Stdev.	0,10	0,22	0,16	0,05	0,10	0,22	0,16	0,05

verrijkingproces beïnvloeden. Door onderlinge competitie om voedingsstoffen (pectine) kan het ene pathogeen veel sneller de stationaire fase in het verrijkingproces bereiken dan het andere, en daardoor dat andere pathogeen wegdrücken. Echter, in validatie-experimenten met extracten van partijen pootaardappelen met natuurlijke besmettings- en achtergrondpopulaties (verschillende uitgangconcentraties van de doelorganismen) is dit effect alleen in het geval van drie gelijktijdig aanwezige doelorganismen vastgesteld. Ook temperatuur speelt daarbij een belangrijke rol. Het is met name *P. atrosepticum* die bij verrijkingstemperaturen boven het optimum voor de soort soms wordt weggedrukt. Een en ander betreft overigens een zuiver verrijkingseffect en geen verdringing binnen de multiplex PCR-reactie. Uitgebreide validatie-experimenten (Elisa versus PCR) lieten overigens zien dat het optreden van drie pathogenen per samengesteld monster nauwelijks voorkomt. Bovendien is voor het routinematige kwaliteitsonderzoek de detectie van 'pathogene *Erwinia* spp.' belangrijk, en niet de exacte soortsaamenstelling.

Er is uitgebreid onderzoek verricht naar de specificiteit van de aldus ontworpen 'BioPlex PCR'. De specificiteit voor '*Erwinia* spp.' en op aardappel optredende, andere (bodembegonden) bacteriën (waaronder bekende kruisreageerders met Elisa) bleek 100%. Een uitgebreide validatie aan praktijkmonsters is opgestart.

Om de toets betaalbaar te houden wordt, naast het multiplexen en het samenvoegen van knollen, gebruik gemaakt van een DNA-extractiesysteem met hoge verwerkingscapaciteit (Kingfisher 96) en met eigen lysisbuffers. Op deze manier kunnen in 20 minuten 96 extracten worden gemaakt.

Toepassing en verder onderzoek

Met de ontwikkelde BioPlex real-time PCR is, ten opzichte van de nu gebruikte Elisa-test, een belangrijke stap gezet naar een completere (pathogene Pcc's), specifiekere en gevoeliger test om pathogene '*Erwinia* spp.' in partijen aardappels aan te tonen. Het betreft een belangrijk hulpmiddel voor teler en handelshuis om de besmetting in een partij pootaardappels vast te stellen en daarop geëigende maatregelen te nemen. Het lopende, landelijke onderzoek naar beheersingsmogelijkheden, binnen het kader van het 'Deltaplan *Erwinia*', moet daar aanvullende handvatten voor bieden. Op dit moment wordt tevens onderzoek verricht naar

de toepasbaarheid van de nieuwe BioPlex real-time PCR bij het aantonen van *Dickeya* spp. en *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* in bolgewassen.

Het ontwikkelde multiplex format wordt door de NAK voor meerdere pathoengroepen (waaronder virussen en nematoden) uitontwikkeld en toegepast. De beperkende factor is daarbij overigens de apparatuur. Met de ABI 7500 thermocycler is het mogelijk tot vijf pathogenen in één reactie te detecteren. Wanneer meer dan vijf doelorganismen in één reactie dienen te worden aangetoond, zal gekeken moeten worden naar de toepassing van andere typen thermocyclers of naar array-technologieën. De hier beschreven doorbraak in het multiplexen heeft recent bij de NAK geleid tot de opening van een groot routinelaboratorium voor moleculaire toepassingen.

Literatuur

- de Haan EG, Dekker-Nooren CCEM, van den Bovenkamp GW, Speksnijder AGCL, van der Zouwen PS & van der Wolf JM (2008) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *European Journal of Plant Pathology* 122: 561-569
- Roehorst, JW (2006) Real-time PCR brengt routinematige toepassing van moleculair biologische technieken dichterbij. *Gewasbescherming* 37 (5) 194-197
- Ślawiak, M, van Beckhoven JRCM, Speksnijder AGCL, Czajkowski R, Grabe G, & van der Wolf JM. Biochemical and genetic analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp strains from potato in Europe *European Journal of Plant Pathology* (in druk)
- van der Wolf JM, van der Zouwen PS van der, van Beckhoven JRCM, Speksnijder AGCL, de Haan EG, Boons CGA & van den Bovenkamp GW (2003) *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* als primaire veroorzaker van zwartbenigheid in de aardappel. *Plant Research International*, Wageningen Intern rapport, 38 pp

Bruinrot bij aardappel

Jaap D. Janse¹, Maria Bergsma-Vlami², Alex van Beuningen², Hans Derks², Henk Hendriks², Nico Horn², Frans Janssen², Jeroen Kavelaars², Annelien Roenhorst², Marjoleine Schoeman², Maarten Steeghs², Napoleon N.S. Tjou-Tam-Sin², Monique Verdel² en Marcel Wenneker³

¹ Afdeling Laboratoriummethoden en Diagnostiek, Nederlandse Algemene Keuringsdienst, Postbus 1115, 8300BC Emmeloord, jjanse@nak.nl

² Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen

³ Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Sector Fruit, Postbus 200, 6670 AE Zetten

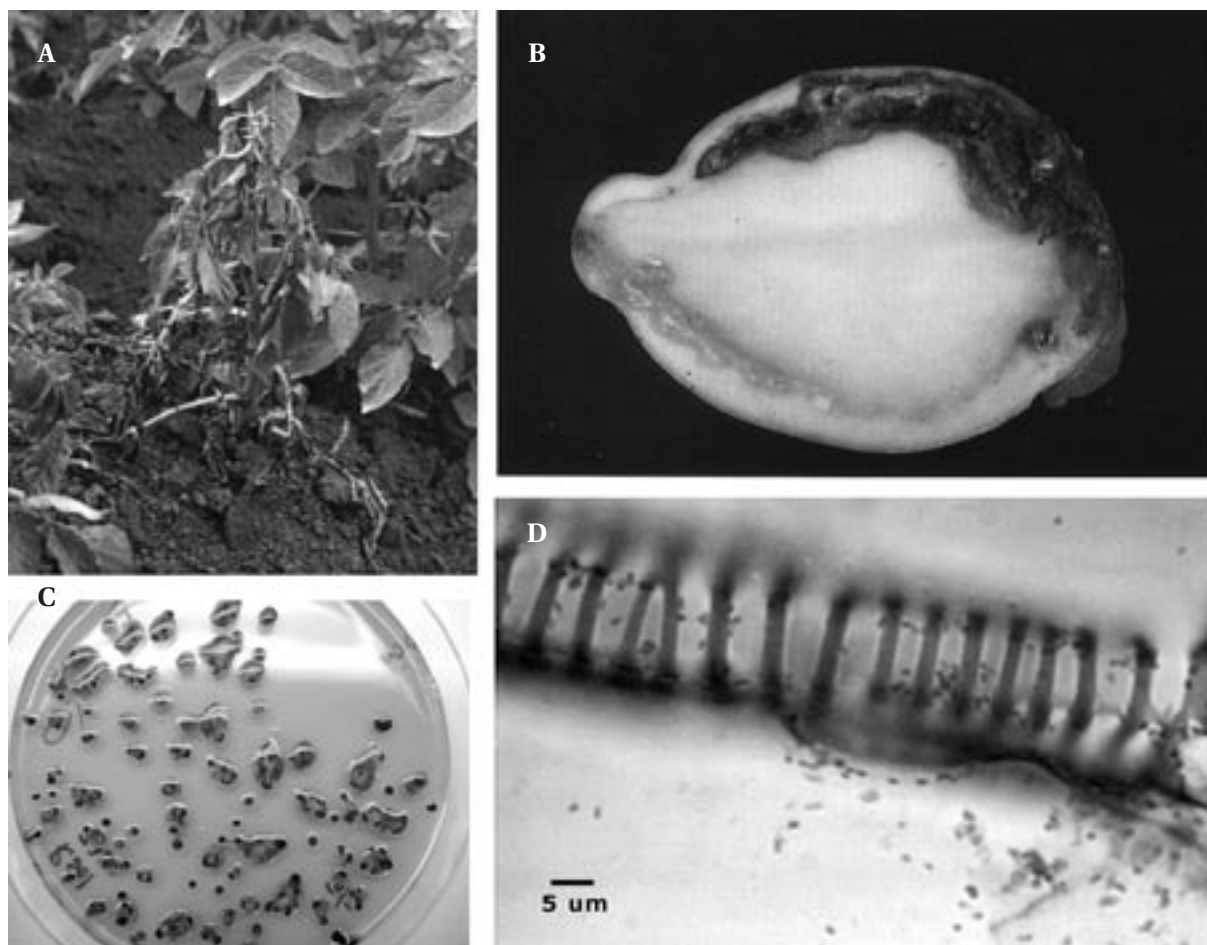
Inleiding

De quarantaineziekte bruinrot van aardappel, veroorzaakt door de bacterie *Ralstonia* (voorheen: *Pseudomonas*) *solanacearum* werd in Nederland voor het eerst met zekerheid aangetroffen in 1992. Het betrof een geïsoleerd geval in Zuid-Nederland dat later verbonden bleek te zijn met al eerder opgetreden besmettingen in België. Echter, door een verband met sluipende oppervlaktewaterbesmetting sluimerde de ziekte vrijwel zeker sinds het eind van de jaren tachtig en kwam tot uitbarsting in 1995. In hetzelfde jaar werd ook oppervlaktewaterbesmetting in Noord-Nederland vastgesteld. Sindsdien is door een grote inspanning van de Plantenziektenkundige Dienst (PD), de Nederlandse Algemene Keuringsdienst (NAK), het bedrijfsleven en het onderzoek (Plant Research International (PRI – voorheen IPO) en Wageningen Universiteit) veel bereikt in de opsporing en uitroeiing/bestrijding door toename van de kennis van diagnostiek en epidemiologie van deze ziekte. Dit artikel geeft een overzicht van de aanpak en het onderzoek sinds de uitbraak van bruinrot in 1995 en werpt een blik vooruit naar toekomstige ontwikkelingen.

De bacterie *Ralstonia solanacearum*

Aan het eind van de 19^e eeuw werd een ernstige verwelkingsziekte (slijmziekte genoemd) beschreven in (sub)tropische streken bij tomaat, tabak, aardappel (Figuur 1A en B), banaan en pinda. De grondlegger van de fyto bacteriologie, de Amerikaan Erwin F. Smith toonde al in 1896 aan dat de veroorzaker een bacterie was, *Bacillus solanacearum* genaamd. In 1914 plaatste Smith deze niet-sporenvormende Gram-negatieve bacterie (Figuur 1D) in het geslacht *Pseudomonas*. Vervolgens werd slijmziekte aangetoond bij zeer veel verschillende waardplanten in (sub)

tropische gebieden. Moraes (1947) beschreef echter in Portugal een vorm van de bacterie die beter aangepast was aan gematigde klimaatstreken (groei optimum van 27°C i.p.v. 35°C). Later werd die vorm ook aangetroffen in andere landen van het Mediterrane gebied, met name in Egypte, en in bergstreken in de tropen. Het bleek dat deze ‘koude’ vorm, en de bacterie die bij banaan voorkwam, goed te onderscheiden waren op basis van pathogeniteit op verschillende waardplanten (indeling in rassen of races) en gebruik van specifieke nutriënten (koolstofbronnen) in het laboratorium (biochemische variëteiten of biovars). De tropische vorm met een zeer grote waardplantenreeks werd door Buddenhagen (1961) ras 1 genoemd (waarvan zich later nog ras 4 en 5 afsplitsten), de vorm gespecialiseerd op banaan en de verwante *Heliconia*, ras 2, en de ‘koude’ vorm met een beperkte waardplantenreeks, voornamelijk *Solanaceae*, ras 3. De ‘koude’ vorm (ras 3) bleek bij de biochemische indeling van Hayward (zie Hayward, 1994) tot biovar 2 (later ook wel 2A genoemd) te behoren, terwijl de andere rassen binnen andere biovars (1, 3-5) vielen. Een speciale biovar (2T) van ras 3 bleek in de Andes voor te komen, en er werd daar in wilde aardappel resistentie gevonden tegen ras 3. Dit ras heeft zich vermoedelijk met de aardappel vanuit de Andes over de wereld is verspreid, wellicht tijdens de tweede wereldoorlog met geallieerde troepen naar het Mediterrane gebied. Ras 3 blijkt genetisch zeer homogeen te zijn. Bij de ontwikkeling van het moleculair-biologisch/taxonomisch onderzoek is verdere verfijning van de diversiteit van de bruinrotbacterie mogelijk gebleken, o.a. op basis van RFLP- en 16S rRNA-analyse en sequentie-analyse van het endonuclease-gen (*egl*) en andere huishoudgenen (Castillo & Greenberg, 2007; Cook & Sequeira, 1994; Fegan & Prior,



Figuur 1.

- A: Symptomen van bruinrot veroorzaakt door de bacterie *Ralstonia solanacearum* in aardappel: sterke verwelking door verstopping en afbraak van het vaatweefsel;
- B: Symptomen van bruinrot in een aardappelknol: lichtbruine vatverkleuring, uit het aangetaste weefstel treedt na aansnijden spontaan vuilwit bacterieslijm naar buiten. Het zwartverkleurde weefsel is secundaire aantasting door andere micro-organismen;
- C: Typische kolonies van de bruinrotbacterie, slijmerig met een diffuse rode kern, door opname van een kleurstof, tetrazoliumchloride, op de selectieve voedingsbodem SMSA 5 dagen na uitplaten;
- D: Kleine roodgekleurde cellen (kleuring volgens Gram) van *Ralstonia solanacearum* in een spiraalvat (kleinste vaatweefsel-onderdeel) van een aardappelknol.

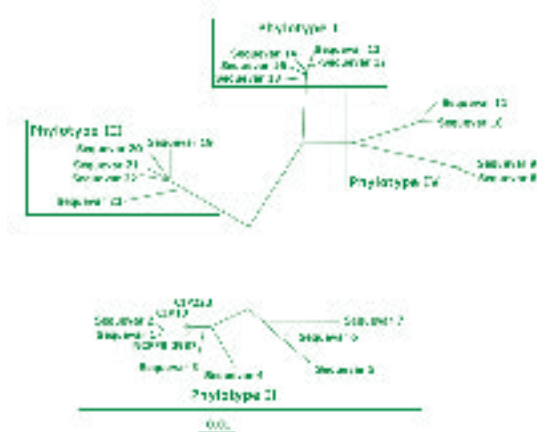
© Janse, 2006

2005, Gabriel *et al.*, 2006; Pingsheng *et al.*, 2007; Poussier *et al.*, 2000) en de bacterie werd in het geslacht *Ralstonia* geplaatst (Yabuuchi *et al.*, 1995). Op basis van de sequentieanalyses worden nu vier zogenaamde 'fylotypen' onderscheiden: fylotype I betreft stammen met een oorsprong in Azië, fylotype II heeft zijn oorsprong op het Amerikaans continent (IIa biovar 2, ras 3 stammen, IIb overige, ook enkele uit Afrika), fylotype III Afrika en fylotype IV Indonesië. Tabel 1 en Figuur 2 geven een overzicht van de huidige indelingen en de complexiteit van deze bacterie. Een nieuwe agressieve vorm met veel waardplanten, waaronder *Anthurium*, *Cucurbitaceae*, *Heliconia* en tomaat werd recent als fylotype II/4NPB (niet pathogeen voor banaan)

beschreven voor Martinique (Wicker *et al.*, 2007). Deze kan een bedreiging vormen voor de Europese kasteelt. De 'koude vorm', die in Nederland en vele landen in West-Europa voorkomt (Janse, 1996), blijkt in deze typering geneticaal homogeen te zijn en tot nu toe altijd *Ralstonia solanacearum* (*Rsol*) ras 3, biovar 2, fylotype II (sequevar 1 en 2) te betreffen.

De eerste vondsten en uitbraak in Nederland in 1995

In de jaren zestig van de vorige eeuw kwam export van vroege aardappelen uit het Middellandse gebied, met name Malta, Cyprus en Egypte, naar West-Europa op gang. Al in 1961 rapporteerden



Figuur 2. Classificering van *Ralstonia solanacearum* in zgn. fylogtypen en sequevars (sequentie variëteiten) op basis van partiële sequentie-analyse van het endoglucanase gen. Het balkje stelt 100 nucleotide posities voor. Naar Fegan & Prior, 2000.



Figuur 3. Verzamelen van een monster aardappelknollen voor onderzoek op latente bruinrotinfectie (200 knollen monster) door een inspecteur van de buitendienst van de PD. De inspecteur draagt een wegwerpoverall en overschoenen en handschoenen om eventuele verspreiding van de bacterie te voorkomen. Copyright: NIVAP

ARTIKEL

Tabel 1. Subspecifieke diversiteit van *Ralstonia solanacearum*¹.

Ras	Biovar	RFLP-patroon ²	Fylogtype ³	Waardplantenreeks	Voorkomen
1	1	1-7	I b	Breed	Z. Amerika, VS
1	3	8-14	I	Breed	Vnl. Z.O Azië, Z. Amerika, Australië, China, enkele in VS
1	1 en 2N		IV	Breed	Afrika
1	1, 2, 2N en <i>Ralstonia solanacearum</i> van kruidnagel en Blood Disease Bacterium (BDB) van banaan		III		
1	4	11, 15-18, 21-23	I	Breed	Z.O. Azië, China, Australië, enkele ook VS
1	5	19, 20	I	<i>Morus alba</i> (moerbeï)	China
2	1	24, 25, 28	I b (banaan-variant op Filippijnen IV)	Banaan (<i>Musa</i> spp.), <i>Heliconia</i>	Z. en C. Amerika, Filippijnen
3	2 of 2A	26A, B	I a	Beperkt	Alle bewoonde continenten
3	2 of 2A	27A,B,C	I b	Beperkt	Ten westen van Andes: Chili, Colombia
Tussen 1 en 3	2T (2N)	29-33	I b	Beperkt	Ten oosten van Andes: laag landen Brazilië, Peru
4	4		I	Gember	Australië, China, Hawaii, India, Japan, Mauritius, Z. Azië, India

¹ Voor bevestigende AFLP and PCR-RFLP van deze onderverdelingen, zie Poussier et al. (2000) en Horita et al. (2005).

² Naar Cook and Sequiera (1994).

³ Voor indeling fylogtypen en sequevars, zie Figuur 2 en o.a. Fegan & Prior 2005, Castillo & Greenberg, 2007.

het Verenigd Koninkrijk en Duitsland vonden van bruinrot in deze aardappelen, waarover zich overigens niemand erg druk maakte. In 1972 toonde men in Zweden aan dat lokale infecties van bruinrot ontstonden, stroomafwaarts van twee aardappelverwerkende fabrieken die onbehandeld afval loosden in een rivier van waaruit aardappelen berekend werden. Ook toonde men daar aan dat het onkruid bitterzoet (*Solanum dulcamara*) dat langs en in het water groeit, de bacterie in stand hield. In een vierjarig bestrijdingsprogramma (zuivering afval fabriek, bestrijding bitterzoet langs rivier, vier jaar geen aardappelen op besmette percelen en vernietiging besmette aardappelen) werden de ziekte en de bacterie uitgeroeid (Janse, 1996; Persson, 2008). Intussen nam de export van vroege aardappelen uit Egypte, de vondsten van bruinrot in deze aardappelen en de berekening (vanwege meer opbrengst en bestrijding van de schurftbacterie *Streptomyces scabiei*) in West-Europa en ook in Nederland sterk toe. In België leidde dit in 1989 tot een vergelijkbare uitbraak van de ziekte langs een kanaal, stroomafwaarts van een verwerkende industrie. Dit was tevens aanleiding tot een uitbraak in Nederland die werd aangetoond midden in het pootaardappelexportseizoen van 1995 en in verscheidene andere West-Europese landen (Elphinstone *et al.*, 1998; Janse, 1996). Vanwege het risico van besmetting had de PD al pro-actief een detectiemethode voor het aantonen van latente infecties van aardappel ontwikkeld, die binnen de European Plant Protection Organisation (EPPO) en de EU werd aanvaard (Janse, 1988). Bij de uitbraak in Nederland werd een zware infectie in enkele lijnen van het lokale ras Bildtstar vastgesteld, met verspreiding via pootgoed en contact (machines e.d.). Er werd besloten, ook onder verplichting van de Europese Commissie en druk van lidstaten, tot het volledig (integraal) toetsen van al het te verhandelen pootgoed. Hierbij werden in dat jaar door PD, NAK, Naktuinbouw en TNO Zeist in enkele maanden tijd 55.000 monsters getoetst (200 knollenmonsters per elke 25 ton aardappelen), waarbij 94 besmettingen in 24 verschillende cultivars werden gevonden (Figuur 3). Een aantal besmettingen kon niet tot contact of pootgoed worden teruggeleid – hier viel de verdenking op het oppervlaktewater. Deze verdenking kon eind 1995 bevestigd worden door het aantreffen van de bacterie in oppervlaktewater en bitterzoet in verschillende delen van het land (Janse, 1996; Janse *et al.*, 1998).

Integrale toetsing en maatregelenpakket

Om de ziekte terug te dringen als ook om de exportpositie te behouden, wordt al het pootgoed, reeds gedurende een groot aantal



Figuur 4. Verspreiding van *Ralstonia solanacearum* in oppervlaktewater zoals vastgesteld door de jaren heen via monitoring van de PD (1997, 2000 en 2005). Zie verder: tekst.

Copyright: PD

jaren integraal getoetst (200 knollen/25 ton), terwijl ook *surveys* in consumptie- en industrieaardappelen en *monitoring* (opvolgen van gevonden besmettingen) plaats vonden. Deze operatie werd vanaf 1996 uitgevoerd door PD en NAK. Tevens werd een uitgebreide *monitoring* van oppervlaktewater uitgevoerd. Toen in

2004 de ziektedruk in de aardappelkolom behoorlijk verlaagd was, werd in overleg met de EU besloten tot toetsing van een 200 knollenmonster per partij, ongeacht de grootte van de partij. In 2006 werd de integrale toetsing overgedragen aan de NAK, terwijl de PD *monitoring, surveys* en watertoetsing en toetsing van bacteriecultures uit water- en knolmonsters bleef uitvoeren. Deze laatste activiteiten, met uitzondering van de toetsing van cultures uit knolmonsters, zijn sinds 2008 ook overgedragen aan de NAK.

In aanvulling op de integrale toets, vanuit nationale overwegingen en vanuit de EU Bestrijdingsrichtlijn voor bruinrot (Anonymus, 1998 en 2006) werden in grote lijnen de volgende algemene en specifieke maatregelen genomen bij het vinden van bruinrot in knollen of een perceel:

- toetsing op latente infecties van bruinrot in al het geproduceerde pootgoed van een getroffen bedrijf,
- *surveys* in industrie- en consumptie (inclusief import),
- vernietiging van aangetaste partijen door stomen (en vervolgens vervoederen aan varkens), biovergisting met een categorie 3 vergister, tunnelcompostering, verwerken in door de PD erkende verwerkende bedrijven en (incidenteel) diep begraven,
- partijen van een besmet bedrijf waarin geen *Rsol* is aangetoond slechts in kleinverpakking (maximaal 10 kg) direct naar consumentenmarkt of voor verwerking naar de industrie,
- ontsmetting bedrijf en strenge bedrijfs-hygiëne,
- opslagbestrijding besmette percelen en een teeltverbod van vier (bij consump-

tietelt) of vijf jaar (bij teelt pootgoed) op een besmet perceel,

- melding vondsten in Brussel en evt. aan individuele EU-lidstaten,
- irrigatieverbod in bekende en door de PD afgebakende besmette oppervlakte-watergebieden,
- traceringsonderzoek (klonale verwantschap, contact, berekening) na vondsten.

Invloed van maatregelen en toets

Uit Tabel 2 blijkt dat de ziekte de laatste jaren nog slechts sporadisch voorkomt (en men zou terecht kunnen spreken van functionele uitroeiing). Echter, het nog steeds weer vinden van één of enkele gevallen van bruinrot per jaar geeft ook aan dat bij teelt in de directe omgeving van besmet oppervlaktewater een klein risico bestaat dat pootaardappelen onopgemerkt in contact komen met dit water, temeer daar de bacterie nog steeds op grote schaal in het oppervlaktewater voorkomt en hierin waarschijnlijk ook niet uit te roeien is. In 2005 is daarom een algeheel beregeningsverbod voor pootgoed ingesteld. In de laatste jaren zijn enkele zeer lichte besmettingen opgetreden. Enerzijds geeft dit aan dat ook andere factoren, zoals fouten in waterhuishouding rondom percelen, overwaaien beregeningswater van naburige percelen, eventueel vogels, water-toeristen, etc. een rol spelen en er wel degelijk risico op herintroductie vanuit oppervlaktewater blijft bestaan. Anderzijds werd er nooit verspreiding via afspoeling van de bacterie uit besmette velden naar het oppervlaktewater vastgesteld. Het maatregelenpakket is zeer effectief gebleken. Op percelen waar ooit (zware) besmetting werd vastgesteld, is veelal weer één of twee maal aardappelen geteeld. Bedrijven die besmet

Tabel 2. Aantal op bruinrot onderzochte en besmet bevonden aardappelmonsters van 1996-2008.

Categorie	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Integrale bemonstering*	57.500	67.150	59.700	66.800	66.775	63.091	60.928	62.817	60.700	32.524	28.338	22.472	24.823
Aantal besmette monsters	9	30	5	62	34	16	14	7	1	1	1	1	1
% besmette monsters	0,01	0,04	0,01	0,09	0,05	0,03	0,02	0,01	0,002	0,002	0,004	0,004	0,004
Surveys (incl. tracing)	2.850	4.300	4.100	5.300	4.573	3.463	4.339	2.682	4.965	3.339	2.222	2.880	3.081
Aantal besmette monsters	15	17	137	60	19	10	40	6	1	1	3	1	14
% besmette monsters	0,53	0,39	3,34	1,13	0,4	0,3	0,9	0,22	0,02	0,03	0,14	0,03	0,45
Totaal % besmette monsters	0,04	0,07	0,22	0,17	0,07	0,04	0,08	0,02	0,003	0,006	0,01	0,008	0,05

* Integrale bemonstering = NAK-pootgoed + TBM-pootgoed + kwekersklonen

waren, blijven/bleven opgenomen in het *survey*-programma van de PD. In geen van deze gevallen werd heraanastaging gevonden. Dit is ook een zeer sterke aanwijzing tegen het vóórkomen van zogenaamde 'viable, but non-culturable' of VBNC (levende, maar niet-kweekbare) -vormen van de bacterie die overal in het milieu aanwezig zouden zijn.

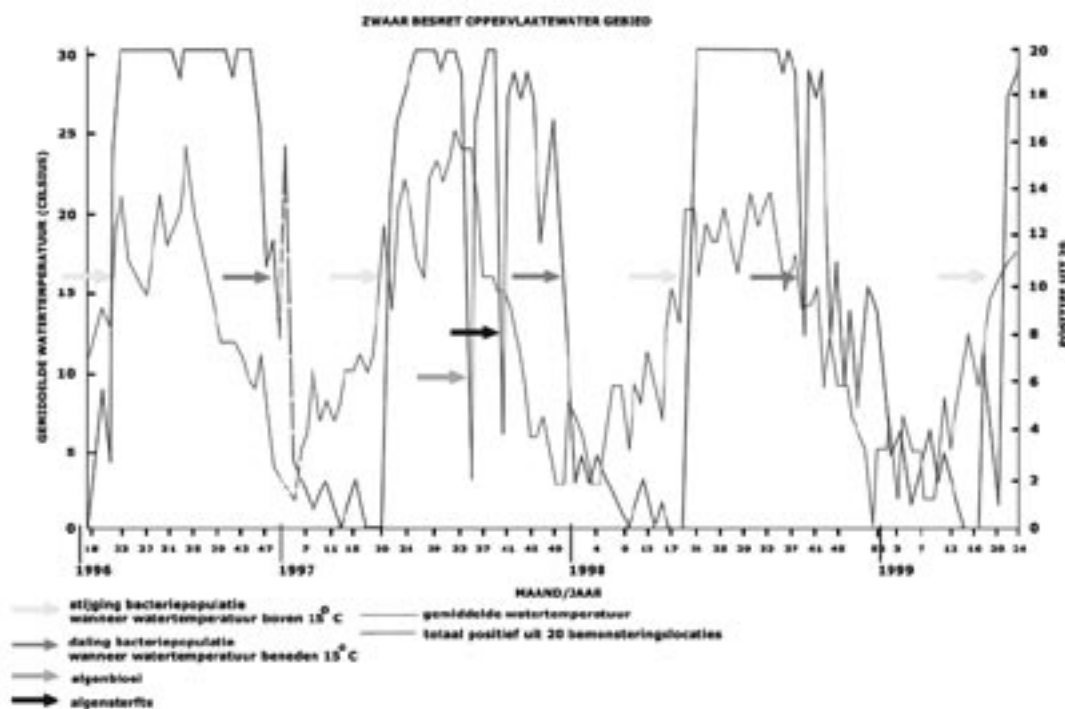
Niet direct duidelijk uit Tabel 2 is het vele werk van de PD-buitendienst. Naast de inspecties en bemonstering, de moeilijke gesprekken met zwaar getroffen telers, de vele bedrijfsbezoeken en de uitgebreide traceringsonderzoeken. Ook noemens- en prijzenswaardig is de grote steun vanuit het georganiseerde bedrijfsleven. Aan het beregeningsverbod, dat in droge zomers een grote impact heeft, zijn uitgebreide discussies vooraf gegaan. Ook de steun bij traceringsonderzoeken van telers en handel, bezoeken aan het buitenland, bereidheid om aanvullende maatregelen te nemen waar het instrumentarium van de overheid tekort schoot (partijen uit de handel nemen) en de inzet voor de Potatopolverzekering hebben het werk voor de PD sterk gefaciliteerd en genomen maatregelen succesvol gemaakt.

Monitoring van oppervlaktewater

Toetsing op het voorkomen van *Rsol* vindt plaats via isolatie op een kunstmatige voedingsbodem (SMSA genoemd) die op basis van een aantal voedingsstoffen en toegevoegde antibiotica selectief is voor de bruinrotbacterie (Figuur 1C). Dit medium heeft het mogelijk gemaakt de bacterie in zeer lage aantallen (10-100 cellen/ml) in oppervlaktewater en andere substraten aan te tonen. Door de jaren heen is de bacterie in een steeds groter gebied in allerlei oppervlaktewatervoren en ook in bitterzoet aangetoond. Sinds 2005 wordt nog slechts aan de rand van besmette gebieden en in nog niet besmette gebieden bemonsterd omdat inperking van besmette gebieden niet aan de orde was. Om deze reden is het percentage besmette monsters afgenomen. De kaartjes van Nederland (Figuur 4) geven een duidelijk beeld van hoe de bacterie zich in de loop van de jaren in een steeds groter gebied heeft weten te vestigen. Tevens werd afvalwater en effluent bemonsterd bij aardappelverwerkende industrieën en stadszuiveringen. De bacterie is overigens nooit in effluent aangetoond.

Diagnostiek

De screening op latente infecties en diagnose van bacteriën, verkregen uit zowel latent als zichtbaar besmet plantenmateriaal, water, grond



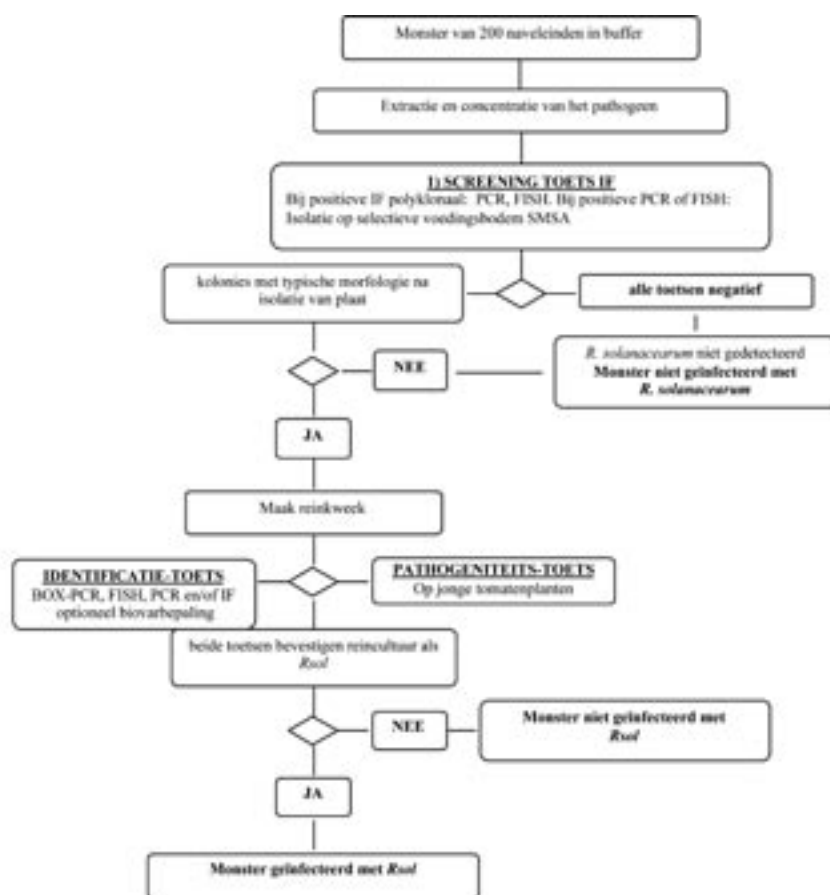
Figuur 5. Aantallen kolonievormende eenheden van *Ralstonia solanacearum* in een zwaar besmet oppervlaktewater gedurende drie seizoenen. De bacterie kon tot aan ijsvorming worden aangetoond, zij het in lage aantallen. In het jaar 1997/98 vond sterke afname van de populatie in de zomer plaats, waarschijnlijk door invloed van sterke algengroei. Copyright: Janse, 2006

en afval, wordt uitgevoerd volgens een standaard EU- toetsmethode vastgelegd in een EU-bestrijdingsrichtlijn (Anonymus, 1998 en 2006). De basis screeningtoets is een serologische toets die gebruik maakt van fluorescentie-microscopie, nl. immunofluorescentie (IF). Bij het vinden van een positieve IF wordt een verplichte aanvullende screeningtoets uitgevoerd die gebruik maakt van een DNA techniek (PCR of fluorescente *in-situ* hybridisatie, FISH). Is deze tweede toets ook positief dan is het monster bruinrot-verdacht en wordt via isolatie op SMSA getracht de bacterie in handen te krijgen. Wanneer typische kolonies worden verkregen worden deze reingekweekt en middels biochemische (vetzuuranalyse, biovarbepaling), serologische (IF) en DNA technieken zoals PCR, rep-PCR (vingerafdrukmethode) of FISH, geïdentificeerd en via kunstmatige inoculatie in jonge tomatenplanten op hun pathogeniteit getoetst. De pathogeniteitstoets is doorslaggevend voor een definitieve diagnose omdat de eerdergenoemde toetsen gevoelig zijn voor storende vals-positieve reacties met andere organismen (zgn. kruisreacties). Het

toetsings- en beslisschema van de EU-methode die ook door PD en NAK worden toegepast is vermeld in Figuur 6.

Enkele resultaten uit het diagnostisch onderzoek

In samenwerking met de leerstoelgroep Microbiologie van de WU werd een 16S rRNA-probe ontwikkeld die werd toegepast in de FISH-toets (Wullings *et al.*, 1998). Deze toets werd opgenomen in het internationale (ring-) onderzoek binnen de EU (Elphinstone *et al.*, 2006) en in de EU-toetsmethode. Verder werd een door het PRI verder ontwikkelde RNA-toets (NASBA) op praktijkwaarde getoetst met een groot aantal praktijkmonsters en een panel van mogelijk kruisreagerende bacteriën. Deze techniek bleek helaas niet betrouwbaar genoeg. De veelbelovende real-time TaqMan PCR (Weller *et al.*, 2000) werd op eenzelfde wijze getoetst. De vermenigvuldiging van eventueel aanwezig DNA van *R. solanacearum* word in deze toets direct vanaf het begin al gemeten door middel van een fluorescerend label aan het DNA. Ten opzichte van conventionele PCR en IF hoeven veel minder



Figuur 6. Schema van de diagnose van een aardappelmonster verdacht van bruinrot (latente infectie) volgens de EU bestrijdingsrichtlijn bruinrot.

handelingen plaats te vinden met een eenzelfde of zelfs hogere betrouwbaarheid. Er wordt nu in internationaal verband geprobeerd deze techniek in de EU-methode op te nemen. Real-time PCR kan dan naast, of als vervanger van, de IF toets worden ingezet. Ook werden commercieel geproduceerde antisera gevalideerd met een panel kruisreagerende bacteriën en een groter aantal positieve en negatieve praktijkmonsters, zodat deze betrouwbaar in de integrale toetsing kon worden ingezet.

Enkele resultaten uit het epidemiologisch onderzoek

In de laatste decennia heeft de PD ook bijgedragen aan het nationale en internationale epidemiologische onderzoek aan de bruinrotbacterie en hierover gepubliceerd. Belangrijke vragen betroffen de overleving van de bacterie op en in diverse substraten (Janse *et al.*, 1998; Wenneker *et al.*, 1998) en de overleving in (natuurlijk) besmette grond op enkele praktijkpercelen. Overleving in grond van meer dan een jaar werd definitief aangetoond. Bij snijmaïs bleken geen (micro-) wortelinfecties voor te komen (van Beuningen *et al.*, 1999). De meeste van deze gegevens kwamen sterk overeen met gegevens van het PRI in microkosmosexperimenten (van Elsland *et al.*, 2000 en 2001). Ook werd voor het eerst uit verwelkende brandnetelplanten (*Urtica dioica*), die met de voeten in sterk besmet oppervlaktewater stonden, *Rsol* geïsoleerd (Wenneker *et al.*, 1999). Deze vondsten waren van belang om te adviseren over gewassen in de rotatie op een besmet perceel.

In samenwerking met Biologische Bedrijfssystemen (WU) werd aangetoond dat *Rsol* zes weken anaerobe vergisting van besmet materiaal in een speciale tank niet overleefde (Termorshuizen *et al.*, 2003). In samenwerking met de zetmeelindustrie werd nagegaan of de bacterie het zuiveringsproces van de fabriek kon overleven. Bacteriën konden wel in het onbehandelde waswater worden aangetoond en in de eerste stappen van de afvalzuivering, maar nooit in het uiteindelijke effluent of vaste eindproduct. Er werden succesvolle proeven gedaan met semi-anaerobe afdoding van de bacterie in het veld onder plastic (biologische grondontsmetting) (Messiha *et al.*, 2007b), waarbij een 93% afdoding werd vastgesteld. Uit het onderzoek bleek verder dat de bacterie in potproeven tenminste 180 dagen overleefde in grond en langer in Nederlands dan in Egyptische gronden en langer in klei- dan in zandgrond (Messiha, 2006, 2006a; Messiha *et al.*, 2007a). Ook werd de overleving in oppervlaktewater in een zwaar, matig en licht besmet

gebied gedurende een periode van drie jaar nauwkeurig in kaart gebracht (Figuur 5). Hierbij bleek de bacterie, wanneer bitterzoet aanwezig was in het zwaar besmette gebied, tot aan ijsvorming in de winter aantoonbaar, terwijl een duidelijke toename in bacterieaantallen te zien was wanneer de temperatuur boven de 15°C kwam (Wenneker *et al.*, 1999).

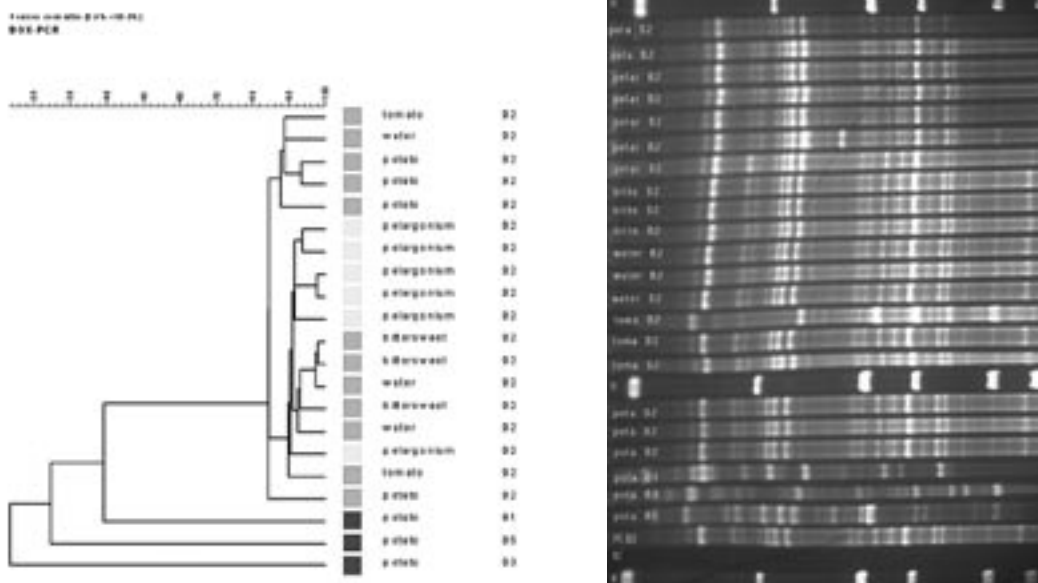
Uitgebreid onderzoek werd verricht naar de statistische betrouwbaarheid van de bemonstering op latente infecties, waarbij werd vastgesteld dat de praktijksituatie de statistische trefkans zeer betrouwbaar benadert (Janse & Wenneker, 2002). Er werd onderzoek gedaan naar de effectiviteit van ontsmettingsmiddelen zoals chloor en waterstofperoxide (H₂O₂) in combinatie met perazijnzuur, om het beregeningswater te ontsmetten. Water behandeld met 100 ppm H₂O₂/perazijnzuur, met behulp van apparatuur vervaardigd door de fa. Brightspark, bleek vrij te zijn van de bruinrotbacterie (van Beuningen *et al.*, 2005). Er is inmiddels een vergunning verleend voor het middel (merknaam Clamarin) voor beregening van consumptieaardappelen en er zal in 2009 een praktijkproef worden uitgevoerd. Verder werden door diverse PD-medewerkers veel (concrete) gegevens aangeleverd voor een bio-economisch model, ontwikkeld om de epidemiologie, schade van bruinrot en het effect van het door Nederland ingevoerde maatregelenpakket te berekenen en ook een kosteneffectieve strategie voor de toekomst te voorspellen (Breukers, 2006; Breukers *et al.*, 2007).

Vondsten van *Ralstonia solanacearum* ras 3 biovar 2 in *Pelargonium*

In 2002 ontving de PD verwelkende planten van *Pelargonium* die bleken te zijn aangetast door *Rsol* ras 3, biovar 2 (Figuur 7). Tegelijkertijd vond deze vaststelling ook plaats in Duitsland, Engeland en België. De productie van stekken op bedrijven in Kenia die besmet oppervlaktewater gebruikten, bleken hieraan debet. Resultaten van dit onderzoek werden internationaal gepresenteerd (Janse *et al.*, 2004b) en de PD en het Central Science Laboratory (CSL, Verenigd Koninkrijk) konden op basis hiervan ook de Amerikaanse PD van advies dienen toen zij vergelijkbare aantastingen van stekken vonden afkomstig uit Kenia en Guatemala in 2003/4.

Internationale problematiek en samenwerking

In de beginjaren van de bruinrot-uitbraak werd in het buitenland, met name de EU, gevreesd dat er veel Nederlands pootgoed besmet zou zijn. Temeer nadat de warme zomers van 1994-1995



Figuur 7. Resultaten van een BOX-PCR-toets (DNA-vingerafdruk in een agarose-gel en bijbehorende analyse-resultaten in het dendrogram) naar de identiteit van *Ralstonia solanacearum* isolaten afkomstig uit *Pelargonium*. In dit onderzoek bleek dat deze isolaten tot biovar 2, ras 3 behoorden, waarop ook andere toetsen (inclusief een waardplantonderzoek) wezen. Zie Janse *et al.*, 2004. Copyright: Janse 2006

ARTIKEL

en extra beregelingen (achteraf) blijkbaar ook in een aantal van deze lidstaten tot infecties in aardappel hadden geleid. Uiteindelijk werd in veel EU lidstaten vastgesteld dat import van besmette aardappelen uit het Mediterrane gebied en het gebruik van besmet oppervlaktewater waarschijnlijk de hoofdoorzaak vormden en niet Nederlands pootgoed. Er is door de PD heel veel gedaan aan voorlichting, zowel nationaal als internationaal, over het Nederlandse bestrijdingssysteem, zowel in Brussel als op internationale wetenschappelijke bijeenkomsten, maar ook aan telers. Er werd in een groot aantal buitenlandse missies diagnostische expertise geleverd en vermeende besmettingen in Nederlands pootgoed of de nateelt daarvan nader onderzocht. De meeste van deze vermeende besmettingen bleken na gezamenlijk onderzoek ter plaatse, te berusten op niet herleidbare oorzaken of op vals positieve diagnoses. In een aantal gevallen kon ook de oorzaak in het betreffende land gevonden worden. Daarnaast werd de verkregen expertise ingezet bij het opstarten van laboratoria en training van personeel in het buitenland. Verder opereerde de afdeling Bacteriologie van de PD als projectleider in twee vierjarige EU-projecten, met CSL (Verenigd Koninkrijk), het Rijksinstituut voor Plantenziekten (België) en de Franse PD als partners (1996-1999 en 2002-2006). Doel was het opzetten van een duurzaam bruinrot beheerssysteem in Egypte, epidemiologisch

onderzoek en training (Janse *et al.*, 2004a). Er werd een toetslaboratorium ingericht, inclusief een quarantainekas. Daarnaast werd sinds 1997/98 een jaarlijks toetsprogramma van circa 12.000 aardappelmonsters operationeel en werd personeel getraind. Veel energie werd gestoken in wetenschappelijk advies betreffende de opzet en de handhaving van ziektevrrije gebieden, zgn. *pest free areas* of PFA's. Dit alles resulteerde in een sterke daling van het aantal intercepties van bruinrot. De bruinrotbacterie werd gedetecteerd in oppervlaktewater in de Nijldelta en in bepaalde onkruiden, zoals *Portulaca oleracea* (wilde postelein) en er werden uitgebreide overlevingsstudies gedaan (Farag *et al.*, 1999; Tomlinson *et al.*, 2009 in druk). Tenslotte werd een voorlichtingspakket ontwikkeld, demonstratieproefvelden aangelegd en lokale en EU-trainingen uitgevoerd, waarbij vier MSc-studenten en een PhD-student succesvol werden opgeleid.

Toekomstige ontwikkelingen op het gebied van toetsing en beleid

Er wordt voorzien dat de al eerder beschreven *real-time* PCR-methode een veelbelovend alternatief (t.o.v. immunofluorescentie) kan zijn voor screening van aardappelextracten. Voorlopige validatiedata geven aan dat *real-time* PCR de bekende herkomsten van de bruinrotbacterie specifiek aantoonst en even gevoelig is. Binnen het EU-project EUPHRESKO waaraan

PD en NAK deelnemen, wordt deze *real-time* PCR-toets in internationaal verband vergeleken met andere technieken. Tevens wordt deze toets, samen met onderzoekers van het CSL, die het protocol ontwikkeld hebben (Weller *et al.*, 2000), volledig gevalideerd. Wanneer de *real-time* PCR toets opgenomen is in de EU-bestrijdingsrichtlijn zal deze techniek door PD en NAK worden ingezet voor de integrale toetsing van aardappelen op bruinrot.

De toekomstige beleidsopgave van de PD zal niet alleen zijn dit quarantaine-organisme te weren en te bestrijden maar ook om een wetenschappelijk draagvlak te creëren dat kritieke processen in de productieketen definieert voor overleving en verspreiding. Het is daarbij van groot belang om voldoende fundamenteel onderzoek te blijven uitvoeren ter ondersteuning van het toegepaste onderzoek. Door aanvullende studies naar knelpunten gerelateerd aan de ecologie en epidemiologie kunnen gewogen beheersmaatregelen worden ontwikkeld die tegen acceptabele kosten door overheid en sector kunnen worden geïmplementeerd.

Samenvattend: lessen die geleerd zijn en advies voor de toekomst

Uit al het onderzoek en het toets- en traceringswerk is naar voren gekomen dat de gulden regels voor bruinrotbestrijding de volgende zijn:

- Onbehandeld oppervlaktewater niet gebruiken
- Uitgaan van gezond, getoetst en gecertificeerd pootgoed
- Goed scheiden van consumptieaardappels en pootgoed op een bedrijf
- Op het eigen bedrijf sorteren en opslaan om versmering te voorkomen
- Strenge bedrijfshygiëne en adequate controle hierop
- Proactief investeren in voorlichting, educatie, ecologische, epidemiologische en diagnostische expertise en een rampenplan
- Compenseren voor schade of mogelijkheid creëren van verzekering van telers tegen bedrijfsoverstijgende schade
- Uitvoeren van regelmatige *surveys* in consumptie- en industrieaardappelen en op waardplanten van *Rsol* in kasgewassen

Dankwoord

De auteurs willen de volgende personen bedanken voor hun bijdrage aan het onderzoek en de bestrijding van bruinrot: Jeroen van de Bildt,

Peggy Gorkink, Joris Voogd, Marco Landman en Mario van Sabben.

Literatuur

- Anonymus (1998) Council Directive 98/57/EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum*. Annex II-test scheme for the diagnosis, detection and identification of *Ralstonia solanacearum*. Official Journal of the European Communities L235: 8–39
- Anonymus (2006) Commission Directive 2006/63/EC of 14 July 2006: amending Annexes II to VII to Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* Official Journal of the European Communities L206: 36–106
- Breukers A (2006) Bio-economic modelling of brown rot in the Dutch potato production chain. Business Economics Group, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Breukers A, van der Werf W, Mourits M & Lansink AO (2007) Improving cost-effectiveness of brown rot control: the value of bio-economic modelling. EPPO Bulletin/Bulletin OEPP 37: 391–394
- Buddenhagen IW, Sequeira L & Kelman A (1962) Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 52, 726
- Castillo JA & Greenberg JT (2007) Evolutionary Dynamics of *Ralstonia solanacearum*. Applied and Environmental Microbiology 73: 1225–1238
- Cook D & Sequeira L (1994). Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: Hayward AC, Hartman GL, eds. Bacterial wilt: the Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK: CAB International: 77–93
- Elphinstone JG, Stanford HM & Stead DE (1998) Survival and transmission of *Ralstonia solanacearum* in aquatic plants of *Solanum dulcamara* and associated surface water in England. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 28: 93–94
- Elphinstone JG, Stead DE, Caffier D, Janse JD, Lopez MM, Mazzucchi U, Müller P, Persson P, Rauscher E, Schiessendoppler E, Sousa Santos M, Stefani E & van Vaerenbergh J (2000) Standardization of methods for detection of *Ralstonia solanacearum* in potato. Bulletin OEPP/EPPO 30: 391–395
- Farag N, Stead DE & Janse JD (1999). *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* race3, biovar2, detected in surface (irrigation) water in Egypt. Journal of Phytopathology 147: 485–487
- Fegan M & Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex - Allen, A. (ed.); Prior, P. (ed.); Hayward, A.C. (ed.), p 449–461

- Gabriel DW, Allen A, Schell M, Denny TP, Greenberg JT, Duan YP, Flores-Cruz Z, Huang Q, Clifford JM, Presting G, González ET, Reddy J, Elphinstone J, Swanson J, Yao J, Mulholland V, Liu L, Farmerie W, Patnaikuni M, Balogh B, Norman D, Alvarez A, Castillo JA, Jones J, Saddler G, Walunas T, Zhukov A & Mikhailova N (2006) Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 69-79
- Hayward AC (1994) Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward AC, Hartman GL, eds. *Bacterial wilt: the Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK: CAB International, 123-135
- Horita K, Tsuchiya A & Ooshiro M (2005) Characteristics of *Ralstonia solanacearum* Biovar N2 Strains in Asia. *Journal of Phytopathology* 153: 209-213
- Janse JD (1988) A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bulletin OEPP/EPPO* 18: 343-351
- Janse JD (1996) Potato brown rot in western Europe - history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin* 26: 679-695
- Janse JD (2006) *Phytopacteriology - Principles and Practice*. CABI Publishing, Wallingford, UK and Oxford Press, New York, 360 pp
- Janse JD, Araluppan FAX, Schans J, Wenneker M & Westerhuis W (1998) Experiences with bacterial brown rot *Ralstonia solanaceum* biovar 2, race 3 in the Netherlands. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (ed.), *Bacterial wilt disease. Molecular and ecological aspects*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany
- Janse, JD, Dijkstra H, Beuningen AR van, Derks JHJ, Tjou-Tam-Sin NNA & Schoeman-Weerdesteijn ME (2004a) Meerjarig EU-programma betreffende technische assistentie aan Egypte voor de bestrijding van bruinrot (*Ralstonia solanacearum*) bij aardappel . *Gewasbescherming* 35(3): 172-175
- Janse JD, Van den Beld HE, Elphinstone J, Simpkins S, Tjou-TamSin NNA & Van Vaerenbergh J (2004b) Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium* zonale cuttings. *Journal of Plant Pathology* 86: 147-155
- Janse JD & Wenneker M (2002) Possibilities in the avoidance and control of bacterial plant diseases when using pathogen tested (certified) or treated planting material. *Plant Pathology* 51: 523-536 (review article)
- Messiha NAS (2006) Bacterial wilt of potato (*Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2): disease management, pathogen survival and possible eradication. Doctoral Thesis, Wageningen University, 150 pp
- Messiha NAS, van Bruggen AHC, van Diepeningen AD, de Vos OJ, Termorshuizen AJ, Tjou-Tam-Sin NNA & Janse JD (2007a) Potato brown rot incidence and severity under different management and amendment regimes in different soil types. *European Journal of Plant Pathology* ISSN 0929-1873 Print 1573-8469 (published online)
- Messiha NAS, van Diepeningen AD, Wenneker M, van Beuningen AR, Janse JD, Coenen TGC, Termorshuizen AJ, van Bruggen AHC & Blok WJ (2007b) Biological soil disinfestation, a new control method for potato brown rot, caused by *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *European Journal of Plant Pathology* 117: 403-415
- Moraes, MA de (1947) Uma bacteriose vascular da batateira (*Bacterium solanacearum*) E. F. Smith. *Agronomia Lusitana* 9, 277-328 (in het Portugees)
- Persson P (2008) Successful eradication of *Ralstonia solanacearum* from Sweden. *Bulletin OEPP/EPPO* 28, 113-119
- Poussier SD, Trigalet-Demery, P, Vandewalle, Goffinet B, Luisetti J & Trigalet A (2000). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146: 1679-1692
- Pingsheng J, Allen C, Sanchez-Perez A, Yao J, Elphinstone J, Jones JB & Momol MT (2007) New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. *Plant Disease* 91: 195-203
- Termorshuizen AJ, Volker D, Blok WJ, ten Brummeler E, Hartog BJ, Janse JD, Knol W & Wenneker M (2003) Survival of human and plant pathogens during anaerobic mesophilic digestion of vegetable, fruit, and garden waste. *European Journal of Soil Biology* 39: 165-171
- Tomlinson DT, Elphinstone JG, Soliman MY, Hanafy MS, Shoala TM, Abd El-Fatah H, Agag SH, Kamal M, Abd El-Aliem MM, Fawzi FG, Stead DE & Janse JD (2009) Recovery of *Ralstonia solanacearum* from canal water in traditional potato growing areas of Egypt but not from designated Pest Free Areas. *European Journal of Plant Pathology* (in druk)
- Van Beuningen AR, Derks JHJ, Gorkink R, Ronda BHNAM & Janse JD (1999) Field experiment on the sensitivity of potato cultivars and some weeds and *Zea mays* after irrigation with contaminated surface water. *Verslagen en mededelingen Plantenziektenkundige Dienst Wageningen* 200

- (Annual Report Diagnostic Centre 1998): 45-46
- Van Beuningen AR, Tax M, Voogd JGB, van Overbeek LS & Janse JD (2005) Bruinrot bij aardappel: Doorbraak in de preventie van herintroductie als gevolg van beregening en bespuiting Gewasbescherming 36 (6): 248-252
- Van der Tuin WR, Nahumury ET, Spit BE & Janse JD (1996) *Pseudomonas* (*Ralstonia*)*solanacearum* race 1, biovar 4 in *Curcuma longa*. Verslagen en Mededelingen Plantenziektenkundige Dienst 186, 1997, Annual Report 1996, 17
- van Elsas JD, Kastelein P, Bekkum P van, Wolf, JM van der, de Vries PM & van Overbeek LS (2000) Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* 90: 1358-1366
- van Elsas JD, Kastelein P, Vries PM de & Overbeek LS van (2001) Effects of ecological factors on the survival physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 1-13
- Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N & Stead DE (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2853-2858
- Wenneker M, van Beuningen AR, van Nieuwenhuijze AEM & Janse JD, 1998. Overleving van bruinrot en ontsmetting oppervlaktewater: Overleving van de bruinrotbacterie (*Pseudomonas solanacearum*) in en op diverse substraten en de effectiviteit van enkele middelen voor de ontsmetting van oppervlaktewater. *Gewasbescherming* 29, 7-11
- Wenneker M, Verdel MSW, Van Beuningen AR, Derks JHJ & Janse JD (1999) *Ralstonia* (*Pseudomonas*)*solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: first report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology* 105: 307-315
- Wullings BA, Beuningen AR van, Janse JD & Akkermans ADL (1998) Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by Fluorescent In Situ Hybridization with 23S rRNA-Targeted probes. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4546-4554
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud, C, Fegan M & Prior P (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6790-6801
- Yabuuchi, E, Kosako Y, Yano I, Hotta H & Nishiuchi Y (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiological Immunology* 39: 897-904

Beurzen KNPV

Het KNPV-bestuur verleent van tijd tot tijd subsidies om activiteiten mogelijk te maken die passen in de doelstelling van de vereniging.

Randvoorwaarden voor de toekenning:

- indienen gemotiveerd verzoek: wat, met welk doel, welke kosten, wie financiert en wat wordt teruggeleverd (het aanvraagformulier is te downloaden van website www.knpv.org);
- passen binnen de doelstelling van de vereniging, c.q. bevorderen samenwerking en/of kennisuitwisseling op gebied van gewasbescherming;
- ingediend kan worden door individuele personen mits KNPV lid, verenigingen, (KNPV-) werkgroepen en maatschappelijke organisaties;
- de gevraagde financiële bijdrage zou niet logischerwijs door de werkgever betaald moeten worden (om dit te beoordelen inzicht geven in medefinanciering en/of eigen bijdrage);
- er wordt een tastbare tegenprestatie gevraagd, bijvoorbeeld een korte rapportage voor Gewasbescherming (plaatsing ter bepaling van redactie) of een poster op een gewasbeschermingsdag;
- een pre hebben voorstellen die samenwerking tussen de groepen onderzoek, onderwijs, industrie en beleid bevorderen.

Aanvraagformulieren kunt u vinden op www.knpv.org. De aanvraag wordt beoordeeld door een toetsingscommissie.

Bloedingsziekte bij paardenkastanje: onderzoek naar de oorzaak en verspreiding

Alexander R. van Beuningen¹, Jaap D. Janse², Annelien Roenhorst¹ en Maria José Villalón-Robles³

¹ Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen, tevens correspondentieadres: Drs. Alexander R. van Beuningen, e-mail: A.R.van.Beuningen@minlnv.nl

² Nederlandse Algemene Keuringsdienst, Postbus 1115, 8300 BC Emmeloord

³ Seminis Holland BV, Postbus 97, 6700 AB Wageningen

Inleiding

Bloedingsziekte bij paardenkastanje (*Aesculus hippocastanum*) wordt veroorzaakt door de bacterie *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* (Engels: bleeding canker of horse chestnut). De ernst en omvang is vergelijkbaar met bacterievuur bij appel/peer (*Erwinia amylovora*) en bacteriekanker bij hazelnoot (*Pseudomonas avellanae*). De ziekte komt vanaf 2002 voor in Nederland en werd sindsdien ook gemeld in België (2003) (Bultreys *et al.*, 2008), Noord-Frankrijk (2004), Duitsland (Schmidt *et al.*, 2008) en Engeland*. De landelijke werkgroep Aesculaap, opgericht in 2004, deed in de afgelopen vijf jaar onderzoek naar de oorzaak en het verloop van de ziekte. Deze kennis is onmisbaar om de ziekte effectief te kunnen beheersen. Een weerslag van het onderzoek en de huidige stand van zaken is te vinden op de website van Aesculaap (www.kastanjeziekte.wur.nl). Dit artikel geeft een overzicht van het onderzoek dat de Plantenziektenkundige Dienst (PD) heeft uitgevoerd sinds 2005, onder de koepel van Aesculaap in opdracht van het Ministerie van LNV. Het onderzoek richtte zich op de identiteit van de ziekteverwekker, verspreidingsmechanismen (epidemiologie) en onderzoek naar het voorkomen van resistentie.

*Het betreft hier een toename van bloedingen bij kastanjabomen, symptomen die voor deze tijd werden toegeschreven aan *Phytophthora* sp.

Symptomen en ziekteverloop

De bloedingsziekte bij paardenkastanje kenmerkt zich door bloedingen op de stam. Bloedingen bestaan uit stroperig suikerrijk boom-

sap dat in contact met de buitenlucht oxideert en bruinzwart van kleur wordt. Dieper in de bast (floëem) komen roestbruine tot zwarte necrotische plekken voor, die zich uitbreiden tot het houtweefsel. Het is niet bekend hoe lang de periode is tussen het begin van de ziekte met typische symptomen onder de bast en het moment waarop de uitwendige bloedingsverschijnselen ontstaan. Na verloop van tijd sterven grote delen van het floëemweefsel in de stam af en dat leidt tot verdroging (atrofie) van takken die hiermee in verbinding staan. Deze takken groeien langzamer, hebben kleinere bladeren, vertonen vroeger bladverlies (kenmerkend is de vroegtijdige vergeling van een deel van de boomkroon) en sterven uiteindelijk. Als de ziekte grote delen van de bast en cambium onherstelbaar heeft beschadigd, kunnen bastscheuren van ca. 5-20 cm ontstaan in de lengterichting van de stam. Hierdoor laat de bast los en komt het onderliggende weefsel bloot te liggen. Als dit rondom de stam gebeurt, sterft de boom af omdat hij als het ware wordt geringd. De kans hierop is het grootst bij jongere bomen (10-30 jaar) met een relatief geringe stamomtrek en dunne floëemlaag. Deze bomen kunnen binnen 3-5 jaar bezwijken terwijl oudere monumentale bomen een grotere kans hebben om te ziekte te overleven.

In 2007 werd vastgesteld dat de ziekte bij jonge bomen (<10 jaar) in één seizoen tot afsterving kan leiden. Aangetaste bomen blijken door het loslaten van de bast gevoeliger voor houtrot-schimmels, die mede oorzaak kunnen zijn van het afsterven van de boom (Figuur 1). In toenemende mate worden zieke en dode bomen uit veiligheidsoverwegingen gekapt.



Figuur 1. Vruchtlichamen van secundaire houtrot-schimmels bij *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii' die kunnen leiden tot het afsterven van de boom.

Frequentie van de bloedingsziekte

In 2005 en 2006 onderzocht de werkgroep Aesculaap in diverse gemeenten paardenkastanjes met symptomen van bloedingsziekte (Tabel 1). In 2006 was ongeveer veertig procent van het Nederlandse paardenkastanjes ziek, een stijging van zeven procentpunt t.o.v. 2005. Cijfers van gemeenten die in beide jaren inventariseerden lieten dezelfde stijging zien. Van de

periode na 2006 zijn alleen cijfers bekend van de provincie Noord-Holland die een eigen inventarisatie uitvoerde. Zij vond een aantasting van 52% in 2007. Dit is een toename ten opzichte van de percentages in 2005 en 2006, respectievelijk 32% en 48%. De omvang van de ziekte is sindsdien niet verminderd.

In de ons omringende landen is het aantal aangetaste bomen ook erg hoog. In Engeland werd in 2007 een landelijke inventarisatie uitgevoerd waarbij van een relatief kleine groep van 2.629 kastanjabomen ongeveer 49% aangetast bleek te zijn (<http://www.forestry.gov.uk/fr/INFD-6KYBGV>). In België is momenteel 61,5 % van de kastanjabomen ziek (meldpunt bloedingsziekte op <http://www.bomenbeterbeheren.be>). Van de landen Duitsland, Frankrijk waar de ziekte ook is gemeld, zijn geen cijfers bekend. Uit de inventarisaties komt verder naar voren dat de soorten *Aesculus pavia* (rode pavia) en *Aesculus flava* (gele pavia) weinig aangetast worden. *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii' daarentegen is het vaakst aangetast.*

Tabel 1. Landelijke gemeentelijke inventarisatie van het aantal aangetaste bomen per soort/cultivar. Hieraan namen in 2005 en 2006 respectievelijk 93 (totaal 44.919 bomen) en 115 gemeenten (48.562 bomen) deel.

Soort / cultivar	Aantal bomen	2005 (% ziek)	2006 (% ziek)
<i>Aesculus hippocastanum</i>	14735	31,3	38,4
<i>Aesculus hippocastanum</i> 'Baumannii'	14447	34,0	38,2
<i>Aesculus hippocastanum</i> 'Pyramidalis'	274	44,5	32,5
<i>Aesculus</i> x <i>Carnea</i> + <i>Aesculus hippocastanum</i>	4482	27,6	31,2
<i>Aesculus</i> x <i>Carnea</i> (soort)	3397	24,3	38,5
<i>Aesculus</i> x <i>Carnea</i> 'Briotii'	2636	25,1	25,6
<i>Aesculus</i> x <i>Carnea</i> 'Plantierensis'	163	13,2	36,8
<i>Aesculus pavia</i>	113	2,0	1,8
<i>Aesculus flava</i>	242	1,4	4,5
Onbekend	7448	29,3	45,9

Bron: Eindrapport onderzoeksprogramma 'Behoud de kastanje', Werkgroep Aesculaap, februari 2007.

*Zowel van de Nederlandse, Engelse en Belgische inventarisatie op basis van visuele vaststelling is feitelijk onbekend welk aandeel van de bastkankers wordt veroorzaakt door de drie bekende kankerveroorzakende pathogenen: *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora citricola* en *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*. De gedachte is dat het grootste deel kan worden toegeschreven aan *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi*.

De oorzaak van bloedingsziekte bij paardenkastanje

De landelijke werkgroep Aesculaap onderzoekt sinds 2005 de oorzaak, verspreiding en bestrijding/ beheersing van de bloedingsziekte bij paardenkastanje. Het isoleren van het pathogeen ging aanvankelijk lastig. In eerste instantie werd gedacht aan schimmels, oömyceten en virussen. Symptomen van bloedingsziekte worden vaak veroorzaakt door oömyceten (bijvoorbeeld de zgn. teervlekken op de stam van *Alnus* sp., veroorzaakt door *Phytophthora alni*) en gedacht werd dat de dramatische symptomen bij paardenkastanje verband hielden met *Phytophthora citricola* en *Phytophthora cactorum*. Vanaf de jaren '70 zijn deze soorten in het Verenigd Koninkrijk met regelmaat aangetroffen bij paardenkastanje en veroorzaakten vergelijkbare symptomen* (Brasier, 1976) (Figuur 2). Isolaties uitgevoerd in samenwerking met de Duitse *Phytophthora*-deskundige Dr. T. Jung, waren echter allemaal negatief. Ook virussen bleken niet verantwoordelijk voor het ontstaan van de bloedingsziekte.

Hierna richtte de aandacht zich op bacteriën. Zowel de PD als Plant Research International (PRI) isoleerden een *Pseudomonas syringae*-achtige bacterie uit de bloedende bomen. Inoculatiestudies bevestigden dat deze *P. syringae*-isolaten de symptomen van bloedingsziekte konden veroorzaken na kunstmatige infectie van zaailingen en volwassen paardenkastanjabomen.



Figuur 2. Stambloedingen bij *Aesculus hippocastanum* veroorzaakt door *Phytophthora cactorum* (Leon, Spanje, juli 2007).

Verwantschap van *P. syringae* uit paardenkastanje met andere *P. syringae*-pathovars

De *P. syringae*-pathovar van paardenkastanje vertoont sterke overeenkomst met *P. syringae* pv. *syringae*. Deze soort veroorzaakt twijgen- en bloesemsterfte bij o.a. forsythia, peer en sering en werd ook eerder bij kastanje aangetroffen als veroorzaker van bladvlekken. Er zijn enkele belangrijke biochemische verschillen tussen de *P. syringae*-pathovar van paardenkastanje en *P. syringae* pv. *syringae*. De paardenkastanjepathovar is negatief voor gelatine-hydrolyse, fluoresceert slechts zwak op King's medium B en is tolerant voor 5% NaCl.

De *P. syringae* groep bevat meer dan vijftig pathogene variëteiten (pathovars) waarvan een aantal boomziekten kunnen veroorzaken (Tabel 2). Van een aantal soorten is bekend dat zij kankers kunnen veroorzaken bij bomen, en met name *P. savastanoi*, verantwoordelijk voor bastwoekerziekte bij de gewone es (*Fraxinus excelsior*) geeft een sterk gelijkend ziektebeeld met bloedingsziekte bij paardenkastanje (Janse, 1981).

De PD heeft onderzoek gedaan naar de pathogeniteit van de verschillende *P. syringae*-pathovars voor 1-2 jaar oude zaailingen van witte paardenkastanje en 10-15 jaar oude bomen van *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii'. De pathovars *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *viburni* en *P. syringae* pv. *aesculi* blijken zwak pathogeen te zijn voor kastanjezaailingen. Verder vertoonden de pathovars *P. syringae* pv. *aesculi*, *P. syringae* pv. *morsprunorm* en *P. syringae* pv. *ulmi* en *P. tremae* de grootste verwantschap met *P. syringae* pathovars van paardenkastanje in clustering van DNA-fingerprints van Box-PCR-fragmenten, DNA-DNA-hybridisatie, biochemische toetsen en vetzuuranalyse. Dit taxonomisch onderzoek werd uitgevoerd samen met Belgische collega's (Janse *et al.*, 2006). Later werd op basis van sequentiehomologie van het gyrase B-gen de pathovarnaam *aesculi* toegekend aan de isolaten uit paardenkastanje (Webber *et al.*, 2008). Dit is opmerkelijk omdat het *P. syringae* pv. *aesculi*-isolaat afkomstig uit India beschreven is als een pathogeen dat bladvlekken (maar geen bastkankers) geeft bij *Aesculus indica* (Durgapal & Singh, 1980). Overigens heeft men bij CSL/FERA (York, Engeland) ook met een isolaat van bloedingsziekte bladvlekken verkregen op paardenkastanje.

Tabel 2. Pathogene bacteriën voor houtige gewassen.

Pathoogeen	Gastheer	Voorkomend in Nederland
<i>Brenneria nigrifluence</i>	<i>Juglans regia</i>	
<i>Brenneria rubrifaciens</i>		
<i>Brenneria salicis</i>	<i>Salix</i> spp.	+
<i>Erwinia amylovora</i>	o.a. Rosaceae w.o. appel, meidoorn, vuurdoorn, peer	+
<i>Erwinia (Brenneria) quercina</i>	<i>Quercus</i> spp.	
<i>Pseudomonas avellanae</i>	<i>Corylus avellana</i> (hazelnoot)	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coryli</i>		
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i>		
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>fraxini</i>	<i>Fraxinus excelsior</i>	+
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	<i>Olea europaea</i>	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aesculi</i>	<i>Aesculus</i> ssp.	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>avii</i>	<i>Prunus avium</i>	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ciccaronei</i>	<i>Ceratonia siliqua</i>	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>erobotryae</i>	<i>Eriobotrya japonica</i>	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>	<i>Morus alba</i>	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	<i>Prunus</i> spp.	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>persicae</i>	<i>Prunus persica</i>	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ribicola</i>	<i>Ribes aureum</i>	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Vele waardplanten w.o. <i>Syringae vulgaris</i>	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>theae</i>	<i>Camellia sinensis</i>	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>ulmi</i>	<i>Ulmus</i> sp.	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>viburni</i>	<i>Viburnum</i> sp.	+
<i>Pseudomonas tremae</i>	<i>Trema orientalis</i>	
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	<i>Juglans regia</i>	+
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i>	perzik / pruim / nectarine	
<i>Xanthomonas populi</i>	<i>Populus</i> sp.	+

Waardplantenspecificiteit van *P. syringae* pv. *aesculi*

Om te bepalen of ook andere boomsoorten aangetast zouden kunnen worden door *P. syringae* pv. *aesculi* zijn in 2006 in Nederland 72 verschillende bomen met bloedingsverschijnselen bemonsterd en onderzocht (Tabel 3) (Figuur 3). In geen van de gevallen konden de symptomen in verband worden gebracht met de *P. syringae*-bacterie of andere plantpathogene bacteriën (*Erwinia* sp., *Xanthomonas* sp.). In enkele gevallen werd wel een *Phytophthora*-soort geïsoleerd.

In aanvullende experimenten bleek het niet mogelijk om via staminoculatie algemene waardplanten van *P. syringae* zoals wilde kers (*Prunus* sp.) en moerbeï (*Morus alba*) te infecteren met de *P. syringae*-bacterie van paardenkastanje. Deze soort heeft dus een sterke waardplantenspecificiteit die zich beperkt tot *Aesculus* spp.

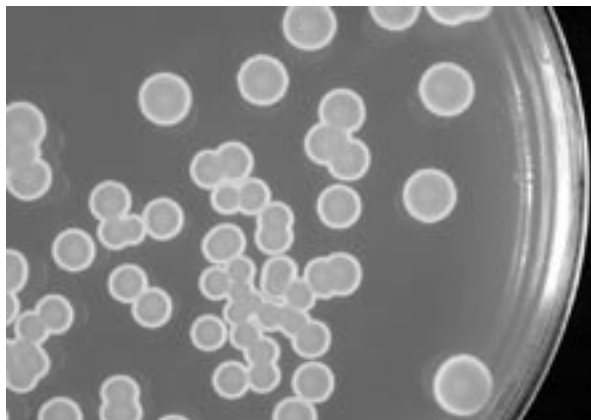
Infectieproeven zijn uitgevoerd met takken van verschillende soorten, cultivars en hybriden van paardenkastanje om de gevoeligheid voor de bloedingsziekte vast te stellen. De uitbreiding van bastnecrose na inoculatie met *P. syringae* pv. *aesculi* werd gevolgd. Cultivars van *A. hippocastanum*, 'Baumannii', 'Incisa', 'Memmingeri' en 'Pyramidalis', waren allemaal gevoelig voor de bacterie en vertoonden uitbreidingen van bastnecrose. Van de hybridensoorten *A. carnea* (rode paardenkastanje), *A. carnea* 'Plantierensis' en *A. mutabilis* was alleen de laatste niet (of tenminste minder) vatbaar. En van de soorten *A. flava* (gele pavia), *A. parviflora* (herfstpaardenkastanje), *A. pavia* (rode pavia) en *A. turbinata* (Japanse paardenkastanje) was alleen de laatste vatbaar voor *P. syringae* pv. *aesculi*. D eerste drie niet of tenminste minder.

Tabel 3. Overzicht van onderzochte bomen met bloedingverschijnselen in Nederland in 2006.

Soort	Aantal
<i>Acer sacharimum</i>	11
<i>Acer sp.</i>	3
<i>Alnus sp.</i>	1
<i>Betula sp.</i>	2
<i>Fagus sylvatica</i>	16
<i>Fraxinus excelsior</i>	4
<i>Metasequoia sp.</i>	2
<i>Platanus sp.</i>	2
<i>Prunus gondounii</i>	2
<i>Prunus sp.</i>	2
<i>Quercus robur</i>	14
<i>Quercus rubra</i>	9
<i>Tilia sp.</i>	3



Figuur 3. Stambloedingen bij *Acer* (Zeevolde, augustus 2008).



Figuur 4. Typische Levan⁺ kolonies van de *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* gekweekt uit ontwikkelende vruchten van *Aesculus hippocastanum*.

Isolatie en identificatie van *P. syringae* pv. *aesculi*

De huidige isolatie- en identificatiemethode is erg bewerkelijk. Extracten van kleine stukjes ziek bastweefsel of spoelmonsters van takjes, blad, bloemen en vruchten worden uitgeplaat op twee verschillende voedingsbodems, 5% sucrose agar en King's medium B. Op het eerste medium produceren de *P. syringae*-bacteriën veel slijm (extracellulair polysaccharide levan) en vormen herkenbare glanzende, bolle kolonies (Figuur 4) en op King's medium B scheidt de bacterie een diffunderend groen fluorescerend pigment af. Indien op de voedingsbodems typische kolonies worden waargenomen, worden deze geteld, reingekweekt, en vervolgens geanalyseerd met vetzuuranalyse. Kolonies met een hoge overeenkomst in vetzuursamenstelling met *P. syringae* identificeert men vervolgens verder met een genetische vingerafdruk-methode (fingerprinting, de zgn. BOX-PCR) (Figuur 5). Ter bevestiging wordt een pathogeniteitstoets uitgevoerd op jonge kastanjeaailingen, waarmee wordt voldaan aan de Postulaten van Koch. Inmiddels heeft het PRI een antiserum ontwikkeld, dat is gevalideerd en kan worden gebruikt voor de screening van weefselmonsters van bomen op *P. syringae* pv. *aesculi*. Daarnaast is er ook een real-time-PCR beschikbaar dat gebaseerd is op het gyrase B-gen van de bacterie (Green *et al.*, 2009).

Epidemiologisch onderzoek

In de jaren 2006-2008 is epidemiologisch onderzoek uitgevoerd om vast te stellen hoe de verspreiding van de *P. syringae*-bacterie in de boom plaats vindt. Van pathovars van *P. syringae* is bekend dat ze via kwetsbare plekken in de bast bomen kunnen binnendringen, bijvoorbeeld via beschadigingen door hagel, insecten en andere dieren, schuurplekken van langs elkaar bewegende takken, maaibeschattingen, snoeiwonden, vorstbarsten, vertakkingen etc. Om de verspreiding van *P. syringae* pv. *aesculi* in de boom te bepalen, is in 2006 en 2007 gedurende een periode van negen maanden, maandelijks een boom geveld en onderzocht. Er werd gekeken naar symptomen, en monsters van de bast en spoelmonsters van de takken, bloemen, bloeiwijzen, bladeren, knopjes en takjes werden geanalyseerd. Er komen in de epifytische monsters ook veel andere *P. syringae*-bacteriën voor en vaak wordt de groei van *P. syringae* onderdrukt door saprophyten zodat isolaties vals-negatief kunnen zijn en kwantitatieve bepalingen van *P. syringae* pv.

Resultaat vetzuur- analyse	Gel Kolom Nr.	Sample	Oorsprong isolaat	DNA vingerafdruk in agarose-gel
	1	Ladder 1 Kb plus		
<i>P. syringae</i>	2	PD 4818	Winssen, 2004	
<i>P. syringae</i>	3	Hout. 15	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	4	Hout. 15,2	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	5	PD 4337	Gorinchem, 2002	
Saprofiet	6	Hout. 16	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	7	PD 5089	NL, 2005	
Saprofiet	8	Hout. 17,1	Houten, 2006	
<i>P. putida</i>	9	Hout. 17,2	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	10	PD 5136	Merelbeke 2005	
<i>P. syringae</i>	11	Hout. 18	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	12	PD 5141	Nieuwpoort, 2005	
	13	DNA-Ladder 1 Kb plus		
<i>P. syringae</i>	14	Hout. 19	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	15	PD 5126	PRI, 2005	
Saprofiet	16	Hout. 20	Houten, 2006	
<i>P. syringae</i>	17	Hout. 21	Houten, 2006	
<i>P. putida</i>	18	Hout. 22,1	Houten, 2006	
<i>B. pickettii</i>	19	Hout. 22,2	Houten, 2006	
<i>P. putida</i>	20	Hout. 24	Houten, 2006	
<i>P. putida</i>	21	Hout. 25,1	Houten, 2006	
Saprofiet	22	Hout. 25,2	Houten, 2006	
	23	NC		
	24	Ladder 1 Kb plus		

Figuur 5. Box-PCR analyse van de *Pseudomonas syringae*-bacterie uit kastanje en saprofytische bacteriën. Duidelijke verschillen in bandenpatronen maken het mogelijk verdachte kolonies te identificeren (referentie-isolaten: PD 4818, 4337, 5089, 5136, 5141 en 5126).

aesculi onmogelijk worden. Van de ca. 700 monsters afkomstig van drie onderzoekslocaties werden ruim 600 kolonies met een typische *P. syringae*-morfologie getoetst met vetzuuranalyse. Hiervan gaven 390 een overeenkomst met *Pseudomonas (syringae)*. Van deze 390 kolonies waren er 201 identiek aan *P. syringae* pv. *aesculi* in BOX-PCR-analyse. Uiteindelijk waren 166 van de 700 geanalyseerde monsters positief voor *P. syringae* pv. *aesculi* op basis van zowel koloniemorfologie, vetzuuranalyse en BOX-PCR fingerprinting. De pathogeniteitstoets op kastanjezaailingen werd uitgevoerd met 60 van de 166 isolaten waarmee werd voldaan aan de postulaten van Koch.

In 2007 en 2008 werden regenwatermonsters verzameld tijdens zware regenbuien in de buurt van aangetaste kastanjabomen. Het afdruipe water van bladeren, takjes, vruchten en stam van aanwezige kastanjabomen werd opgevangen in centrifugebuizen en op het laboratorium geanalyseerd. Een aantal watermonsters (13 van de 32) bleek besmet te zijn met de *P. syringae* bacterie (concentratie 10^2 - 10^3 cfu.ml⁻¹).

Ook vruchten werden onderzocht op de aanwezigheid van *P. syringae* om de mogelijke rol van overdracht via zaad te kunnen vaststellen. Zaadoverdraagbaarheid kan namelijk belangrijke consequenties hebben voor de verspreiding van de ziekte omdat de vermeerdering van paardenkastanje plaatsvindt via zaailingen. Op drie proeflocaties met geïnfecteerde kastanjabomen werden bloemmengsels, individuele bloemen en vruchtbeginsels verzameld en onderzocht op het epifytisch voorkomen van de bacterie. Op één locatie werden twintig bomen bemonsterd: van zeven bomen waren de bloemmonsters besmet (maximaal 10^7 cfu per bloemtros) en van negen bomen de verzamelde vruchtbeginsels (maximaal 10^5 cfu per vruchtbeginsel). Ook werden tijdens de bloei een klein aantal bloembezoekende insecten verzameld en geanalyseerd. Van dezelfde locatie is later in het seizoen gekeken of de bacterie ook kon worden aangetoond in ontwikkelende vruchten (aan de boom), zaden met kiem (gevallen bolsters) en gekiemde zaden en kiemplantjes. Alleen in de ontwikkelende vruchten werd bij alle tien de bemonsterde

bomen *P. syringae* pv. *aesculi* aangetroffen (maximaal 10^6 cfu/vrucht; de identiteit van de isolaten is nog niet bevestigd met de pathogeniteitstoets)

Bovenstaand onderzoek leverde de volgende gegevens op:

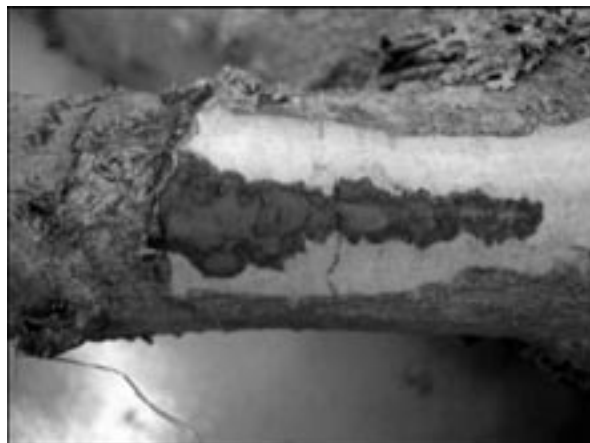
- *P. syringae* pv. *aesculi* komt voor in spoelmonsters van takjes, bladeren, bloemen en (zich ontwikkelende) vruchten en in regenwater op kastanjabomen in de omgeving van zieke bomen;
- Bij de onderzochte bloembezoekende insecten is geen *P. syringae* aangetoond.
- Er zijn te weinig insecten geanalyseerd om hieruit conclusies te trekken betreffende de mogelijke rol bij de overdracht;
- De inwendige aantasting is veel groter dan de uitwendige bloedingsplek (Figuur 6);
- *P. syringae* pv. *aesculi* komt niet voor in houtweefsel;
- *P. syringae* pv. *aesculi* induceert de vorming van afsluitingsweefsel, te zien als verkurkte plekken, rondom geïnfecteerd bastweefsel. Soms wordt hiermee de verdere uitbreiding van de aantastingsplekken gestopt en heeft dit afsluitingsweefsel de infectieuze plekken plaatselijk kunnen inkapselen;
- Regelmatig werden bloedingsymptomen waargenomen op gesteltakken en jongere takken tot op zes meter hoogte. In geen van de gevallen stonden deze aantastingen in verband met bloedingverschijnselen op de stam;
- Enkele keren werden infecties met de *P. syringae*-bacterie gevonden op plekken waar maaischade of oude snoeiwonden waren te zien en op plaatsen waar de hoofdstam vertakt (Figuur 6).

Mogelijke verspreidingswijzen van *P. syringae* pv. *aesculi*

P. syringae pv. *aesculi* werd zowel op bloemen als in afspoelend regenwater aangetroffen. Dit zou er op kunnen duiden dat de bacterie zich in de bloemen vermeerderd, waarbij de nectar als voedingsbron fungeert. Tevens zou hier de primaire infectie kunnen plaatsvinden, daar de bacterie eveneens werd aangetroffen in verschillende delen van zich ontwikkelende vruchten. Vanuit de primaire infectie kunnen de bacteriën vervolgens met regenwater mee gespoeld worden. Dit kan in geval van beschadigingen van de bast tot infecties op de stam leiden.



Figuur 6. Gesteltak (diameter 5 cm) van paardenkastanje met verschijnselen van bloedingsziekte. Boven: uitwendige barsten in de bast; onder: inwendig typische roodbruin verkleuring (ca. 20x3 cm).



Onder experimentele omstandigheden bleek het eveneens mogelijk om zaailingen te infecteren door oppervlakkige prik- en schraapwondjes in de bast. Ook verwondingen die ontstaan na het verwijderen van bladeren bleken als invalspoort voor de bacterie te kunnen fungeren. Een vernevelde bacteriesuspensie leidde in alle gevallen tot infectie op de beschadigde plekken. Van lenticellen is niet komen vast te staan dat deze de bacterie een toegang kunnen verschaffen.

In 2008 zijn infectieproeven met *P. syringae* pv. *aesculi* uitgevoerd bij 10-15 jaar oude bomen van *Aesculus hippocastanum* 'Baumannii'. Vastgesteld is dat één bacterie, aangebracht in een klein sneetje in de stam, voldoende is om een infectie te starten en na enkele maanden bastnecrose te veroorzaken.

Bestrijding / beheersmogelijkheden

De resultaten van het epidemiologisch onderzoek maken duidelijk dat het vooralsnog moeilijk is om verspreiding van de ziekte tegen te gaan. Toch is er wel een aantal aanknopingspunten:

- Indien wordt aangenomen dat regenwater een belangrijke rol speelt in de verspreiding, dan wordt aanbevolen bij aan- of herplant bomen op een 'veilige' afstand van geïnfecteerde bomen te planten.
- De uitgevoerde inventarisatie geeft de indruk dat niet alle cultivars, en niet alle individuen binnen cultivars, in dezelfde mate zijn aangetast. Dit zou kunnen duiden op resistentie of tolerantie. Op termijn zou het inkruisen van verminderde vatbaarheid de ziekte beheersbaar kunnen maken.
- Snoeien beperken en alleen uitvoeren als geen bladeren/bloemen aanwezig zijn.
- Daar met name infecties op de stam leiden tot het afsterven van de boom, kan met het plaatsen van een manchete onder de kroon van de boom worden voorkomen dat lekwater van geïnfecteerde bloemen, bladeren en takken op de stam terecht komt.
- De vitaliteit van de boom verbeteren waardoor deze minder vatbaar is voor de kastanjeziekte. Proeven daarmee in een aantal Nederland steden lijken een positief effect te hebben, hoewel wetenschappelijk bewijs ontbreekt. Het ploffen (onder druk spuiten van voedingsstoffen en lucht tussen de wortels), bemesten en het aanbrengen van schimmeldominante compost lijkt de conditie van bomen te verbeteren en zo te resulteren in verminderde aantastingen (Rapport "Kastanjebloedingziekte 2008 en andere boomziekten", gemeente Dordrecht; <http://www.bomenindordt.nl/>)
- Door de werkgroep Aesculaap is een beheersadvies opgesteld dat gebaseerd is op de onderzoeksresultaten van de werkgroep en deze is te vinden op de website.

Conclusies en mogelijk toekomstig onderzoek

Nu het binnen de groep van onderzoekers van Aesculaap steeds duidelijker wordt dat de directe bestrijding van de kastanjeziekte zeer moeilijk, zo niet onmogelijk is, blijven er toch nog enkele mogelijkheden over waaronder resistentieveredeling en herplant van minder vatbare soorten/cultivars zoals pavia en flava. Voor verder onderzoek komen volgens de werkgroep Aesculaap de volgende onderwerpen in aanmerking:

- Verificatie, met behulp van een pathogeniteits-toets van bacterie-isolaten die verkregen werden uit diverse substraten (bloemen, vruchtbe-ginsels, vruchten, regenwater) in 2008.
- Ontwikkeling van een goede screenings- en toetsmethode voor resistentie-onderzoek.
- Voortzetting van de inventarisatie van resistenties binnen het sortiment van de paardenkastanje.

- Voortzetting van onderzoek naar de relatie van wondweefsel (callus) vorming en secundair houtrot.
- In 2008 zijn in een veldproef in de gemeente Houten de remstoffen ascorbinezuur, citroenzuur en cysteïne getest om na te gaan of zij in staat zijn bloedingen bij paardenkastanje te remmen c.q. te stoppen. De bacterie wordt hierbij overigens niet aangepakt. Deze proef met remstoffen moet worden voortgezet omdat de bomen nog weinig tijd gehad hebben om te reageren.

Referenties

- Brasier CM & Strouts RG (1976) New records of *Phytophthora* on trees in Britain. I. *Phytophthora* root rot and bleeding canker of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). *European Journal of Forest Pathology* 6, 129-136
- Bultreys A, Gheysen IC & Planchon V (2008) Characterization of *Pseudomonas syringae* strains Isolated from Diseased Horse-chestnut Trees in Belgium. In: *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics. Springer Netherland, 283-293
- Durgapal JC & Singh B (1980) Taxonomy of pseudomonads pathogenic to horse-chestnut, wild fig and wild cherry in India. *Indian Phytopathology* 33, 533-535
- Green S, Laue B, Fossdal CG, A'Hara SW & Cottrell JE (2009) Infection of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) by *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* and its detection by quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*, Early view online, May 7 2009
- Janse JD (1981) The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*) caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini*. 11. Etiology and taxonomic considerations. *European Journal of Forest Pathology* 11:425-438
- Janse JD, van Beuningen AR, van Vaerenbergh J, Speksnijder AGCL, Heyrman J, de Vos P & Maes M (2006) An overview of some emerging diseases, including a taxonomic study on a *Pseudomonas* bacterium related to *P. tremae* and *P. s. pv. ulmi*, causing bleeding canker of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*). 11th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria, Edinburgh, UK. Programme and abstracts book: p. 11-12
- Schmidt O, Dujesiefken D, Stobbe H, Moreth U, Kehr R & Schröder Th (2008) *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* associated with horse chestnut bleeding canker in Germany. *Forest Pathology* 38, 124-128
- Webber JE, Parkinson NM, Rose J, Stanford H, Cook RTA & Elphinstone JG (2008) Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* causing bleeding canker of horse chestnut in the UK. *Plant Pathology* 57: 368

Geelziek in hyacint en in bijzondere bolgewassen: detectie en overdracht van *Xanthomonas hyacinthi*

Joop van Doorn¹, Paul van Leeuwen¹ en Roberto Miglino²

¹ PPO PPO Bloembollen, Boomkwekerijgewassen en Fruit, postbus 85, 2160 AB Lisse

² Bloembollenkeuringsdienst, postbus 300, 2160 AH Lisse

Het is bekend dat de plantpathogene bacterie *Xanthomonas hyacinthi* hyacinten en nauw-verbante bolgewassen kan aantasten en 'geelziek' kan veroorzaken. Veel minder bekend is dat deze geel-gepigmenteerde Gram-negatieve bacterie ook andere bolgewassen kan infecteren en hierin in toenemende mate schade veroorzaakt. Onderzocht wordt of geelziek in bijzondere bolgewassen aantoonbaar is met de detectietechnieken ontwikkeld voor *X. hyacinthi* of dat er mogelijk sprake is van andere *Xanthomonas*-pathovars. Voor de teelt van hyacint is het van groot belang om vast te stellen of hyacinten op het veld gemakkelijk via deze andere bolgewassen geïnfecteerd kunnen raken.

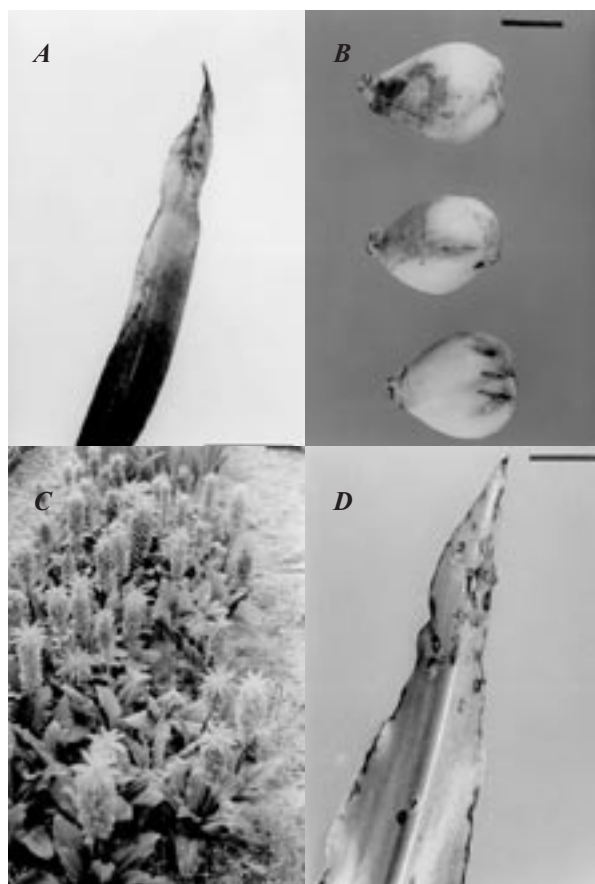
Xanthomonas hyacinthi in bijzondere bolgewassen

Geelziek in hyacint is wellicht de oudst bekende afwijking in planten waarvan bekend werd dat een bacterie (tegenwoordig *Xanthomonas hyacinthi* genaamd) deze ziekte veroorzaakte (Wakker, 1887). Tot niet zo lang geleden gingen er in de bollensector vanuit dat *Xanthomonas hyacinthi* hyacintencultivars en enkele nauw verwante bolgewassen zoals *Galtonia candicans* (Kaapse hyacint), *Scilla*-soorten (sterhyacint) en *Muscari* (blauw druifje) kon aantasten (Janse *et al.*, 1983). De bladsymptomen die *X. hyacinthi* veroorzaakt in deze siergewassen lijken namelijk sterk op die in hyacint. Echter, vanaf 1994 ontving de Diagnostiek Service van PPO bollen van *Puschkinia libanotica* (buishyacint) en *Chionodoxa gigantea* (sneeuwroem) met een afwijking. Wanneer deze bollen longitudinaal aangesneden werden, bleken deze in en rondom de basale plaat geïnfecteerd met gelige bacteriën. Het weefsel was helder geel tot bruinig okerkleurig. Ook bleken enkele bollen aan de top (neus) geïnfecteerd. Daar deze bacterie het typerende okergele pigment xanthomonadine produceerde, deed dit een infectie met een *Xanthomonas*-soort vermoeden. Deze monsters bleken inderdaad positief voor *X. hyacinthi* na toetsing in ELISA met specifieke poly- en monoclonale antistoffen (van Doorn *et al.*, 1999).

Regelmatig werden ook planten van *Eucomis bicolor* en *E. punctata* (ananasplant) ontvangen met typische bladsymptomen (necrotische bladplekken) die aan geelziekaantasting in hyacint deden denken (Figuur 1). Deze plantensoort, evenals *Puschkinia* en *Chionodoxa* behorende tot de Liliaceae, komt oorspronkelijk uit Zuid-Afrika.

Onderzoeksvragen

Vanwege de relatief nieuwe problemen in deze bijzondere bolgewassen is het belangrijk te weten of de veroorzaker inderdaad *X. hyacinthi* is en niet een andere *Xanthomonas*-soort die deze monocotyle planten kan aantasten. Dit is vast te stellen door verschillen in biochemische en genetische karakteristieken van bacterie-isolaten uit deze bijzondere bolgewassen op te sporen en de bestaande identificatie- en detectietechnieken voor *X. hyacinthi* toe te passen op deze isolaten. Van groot belang is ook om vast te stellen of hyacinten via deze waardplanten geïnfecteerd kunnen raken. Men gaat er van uit dat natuurlijke besmetting vooral via wind en regen optreedt, maar ook mechanisch door het lopen of bewerken van vochtig gewas plaats kan vinden. Ten slotte willen telers een goede methode om verdachte of lichtbesmette partijen bollen te behandelen.



Figuur 1. Symptomen, veroorzaakt door *Xanthomonas hyacinthi* in blad van *Scilla* (A), in bolletjes van *Chionodoxa* (B) en in *Eucomis* (C) met necrotische bladspetters in detail (D). De zwarte balk is 1 cm, behalve in C (10 cm).

Waardplantreeks

Infectieproeven met tien verschillende soorten bijzondere bolgewassen zijn uitgevoerd. Kunstmatige infectie vond plaats via een besmette sorteermachine of door het gewas een aantal maal in het voorjaar op het veld te bespuiten met een bacteriesuspensie van 10^7 CFU/ml. De onderzochte soorten waren: *Scilla mischtschenkoana* (syn. *S. tubergeniana*), *S. siberica*, *S. bifolia*, *Hyacinthoides hispanica* (syn. *Scilla campanulata* en *Endymion hispanicus*), *Puschkinia libanotica* 'Alba', *Chionodoxa luciliae*, *C. forbesii*, *C. sardensis*, *Muscari armeniacum* en *M. azureum* (syn. *Hyacinthella azurea*). Bollen met geelzieksymptomen zijn alleen aangetroffen na bolinfectie bij *S. mischtschenkoana*, *S. siberica* en *M. azureum*. Bij *M. armeniacum* en *Hyacinthoides* zijn alleen bladsymptomen waargenomen en geen bolaantasting. De mechanische infectie leidde bij *S. mischtschenkoana* tot meer dan 10% aantasting en bij *S. siberica* en *M. azureum* tot minder dan 1% aantasting. Een gedeelte van de bollen is handmatig gerooid (om infectie via beschadiging te

voorkomen) en weer geplant om de aantasting door de bacterie het jaar erop waar te nemen. Tijdens de nateelt zijn geen geelzieksymptomen meer waargenomen. Ook bleken alle gerooide bollen daarna vrij te zijn van *X. hyacinthi*. Wel was vooral bij *S. mischtschenkoana* duidelijk te zien dat er een percentage bollen weggevallen was tijdens de teelt welke overeen kwam met het percentage planten met geelzieksymptomen uit de voorgaande teelt. De conclusie was dat de partij bollen is 'uitgeziekt': zieke bollen sterven af in de grond. Vanuit de praktijk is dit verschijnsel ook gemeld.

Detectie en toetsing voor de praktijk

Hoewel de gele, glimmende koloniemorfologie typerend lijkt voor *X. hyacinthi* is dit bedrieglijk. *Pantoea agglomerans* en enkele Gram-positieve bacteriesoorten (o.a. *Rhodococcus* spp.) tonen eenzelfde koloniemorfologie. Daarom zijn *X. hyacinthi*-specifieke toetsen noodzakelijk voor zowel identificatiedoeleinden als voor detectie. Voor *X. hyacinthi* uit hyacint zijn zowel serologische als DNA-toetsen ontwikkeld.

Tevens is er een polyclonaal antiserum en bestaan er monoclonale antistoffen gericht tegen lipopolysaccharide (LPS) -fracties van *X. hyacinthi* en tegen fimbriae-eiwitten. (van Doorn *et al.*, 1999). ELISA met als coating polyclonaal antiserum en monoclonale antistoffen, gericht tegen LPS bleek gevoelig en specifiek. Voor PCR bleek als target het zg. fimbria-gen (*fimA*), coderend voor een polymere oppervlakte eiwitstructuren (type 4-fimbriae) een soortspecifieke target (van Doorn *et al.*, 2001). Deze toetsen zijn geïmplementeerd en in gebruik door de Bloembollenkeuringsdienst.

Real-time PCR voor *Xanthomonas hyacinthi*: scorpion-probe systeem

Bij toepassing van PCR op grotere schaal bestaat het risico van ruimtecontaminatie in het laboratorium. Daar ook tijdsbesparing (o.a. geen analyse via gelelektroforese) een belangrijk item is voor de



Figuur 2. Detectie van *Xanthomonas hyacinthi*-isolaten afkomstig uit andere bolgewassen. Gebruikt zijn de primers JAAN en JARA (amplicon 223 bp). Isolaten uit *Eucomis bicolor* (4-8), *E. punctata* (9-10), *Puschkinia* (11-13), *Chionodoxa* (14-18); positieve controle: isolaten S148 en TV43 uit hyacint (2-3).

routinematige toetsing heeft de Bloembollenkeuringsdienst al jaren geleden gekozen om een real-time PCR op geelziek te ontwikkelen (real-time scorpion-probe systeem). In een standaard PCR amplificeren de primers JAAN en JARA specifiek een 223 bp DNA fragment van het fimbria-subunit-gen *fimA* (van Doorn *et al.*, 2001) van *X. hyacinthi* (Figuur 2). De door de BKD ontwikkelde real-time PCR combineert op primer JAAN een fluorofoor (FAM) en een quencher ('uitdover') -molecuul. Als er geen target is dooft de fluorescentie uit. Deze PCR kan direct op nauwelijks voorbereekt plantensap worden uitgevoerd. Deze real-time PCR heeft bewezen reproduceerbaar, robuust, snel (1 uur) en zeer gevoelig te zijn en wordt regelmatig gebruikt voor analyse van geelziek-verdachte monsters.

Identificatie: zijn er verschillende pathovars?

Om de vraag te beantwoorden of er soms andere pathovars van *Xanthomonas* in bijzondere bolgewassen voorkomen, zijn *Xanthomonas*-isolaten geïsoleerd uit *Eucomis*, *Puschkinia* en *Chionodoxa*. De geïsoleerde bacteriën zijn op verschillende wijze onderzocht om te zien of deze tot *X. hyacinthi* behoren en of deze de hyacintencultivars 'Anne Marie' en 'Delfts Blauw' kunnen infecteren. Er werden geen verschillen aangetoond in biochemische en genetische karakteristieken (SDS-PAGE fingerprints, reactie met (monoclonale) antisera) en ook niet met real-time PCR (amplificatie van een deel van het *fimA*-gen) en Southern blotting. Tot zover wijst dit op het bestaan van een homogene groep *X. hyacinthi*-stammen die verschillende waardplanten, behorende tot de Liliaceae, kan infecteren (van Doorn, 2002). De *Xanthomonas*-isolaten, verkregen uit diverse bijzondere bolgewassen, reageerden alle positief in de real-time PCR.

Overdracht naar hyacint via bijzondere bolgewassen

In de praktijk wordt regelmatig onverwachts geelziek in een partij hyacinten aangetroffen. Als de hyacinten de gebruikelijke 'heetstookbehandeling' tegen geelziek hebben gehad wordt deze partij bollen verondersteld vrij te zijn van de bacterie. Heetstook is een temperatuurbehandeling van 30°C in juli-augustus gedurende 4-6 weken, gevolgd door 2 weken 38°C en tot slot 3 dagen 44°C hetgeen dodelijk is voor geelziek maar (net) niet voor de hyacintenspruit.

Als op een naburig perceel een bijzonder bolgewas staat waarvan bekend is dat het besmet kan zijn met *X. hyacinthi* ontstaat de vraag of dat de besmettingsbron is. Om vast te stellen of *X. hyacinthi* gemakkelijk vanuit een bijzonder bolgewas hyacinten kan besmetten is een infectieproef uitgevoerd. Daarvoor zijn bollen van *Scilla mischtschenkoana*, *Chiono-*



Figuur 3. Veldproef (in schaakbordpatroon) voor de overdracht van 'geelziek' van bijzondere bolgewassen (*Chionodoxa*, *Scilla*) naar hyacint ('Pink Pearl').

doxa forbesii en *Hyacinthoides hispanica* mechanisch geïnfecteerd. Deze besmette bollen zijn in een schaakbordpatroon tussen hyacinten geplant (Figuur 3) met enkele veldjes met gezonde *Muscari armeniacum* ertussen. Bij de helft van het proefveld is een paar maal een natte doek door een nat gewas gesleept om de verspreiding van *X. hyacinthi* te stimuleren.

Zowel bij *Scilla* als bij *Chionodoxa* zijn duidelijk bladsymptomen waargenomen (Figuur 1A, B). In het blad en bijbehorende bollen is de aanwezigheid van de bacterie ook door middel van toetsing vastgesteld. Bij *Scilla* ontwikkelden de



Figuur 4. *Chionodoxa* besmet met *X. hyacinthi* (links) geeft kleinere plant met kleine bloemen.

planten zich normaal. Bij *Chionodoxa* (Figuur 4) gaven de aangetaste bollen een blad met een korte bloemsteel, zogenaamde noodbloei. Het waren echter vooral de hyacinten die naast de *Scilla* stonden die aangetast werden door de bacterie. De overdracht van *Chionodoxa* naar hyacint verliep moeizaam; de verwachting is daarom dat de kans op besmetting op het veld van hyacint vanuit naburige percelen erg klein zal zijn. In *Muscari* en *Hyacinthoides* zijn alleen bladsymptomen aangetroffen in de veldjes die tijdens de groei met een natte doek zijn behan-

deld. In de bollen van deze gewassen is geen geelziekaantasting aangetroffen. Het slepen van een natte doek door het gewas kon de bacterie zichtbaar wel verspreiden en voor een aantasting van het blad zorgen maar de bacterie was niet in staat om de bol te bereiken.

Blijft een partij bollen besmet met geelziek door spoelen?

Zoals in de vorige analyse is beschreven, is in onderzoek vastgesteld en vanuit de praktijk aangegeven dat een partij *S. mischtschenkoana* aangetast door *X. hyacinthi* kan uitzielen. Vanuit dezelfde praktijk wordt echter sinds enkele jaren aangegeven dat partijen juist niet meer uitzielen. Een belangrijke verandering in de bedrijfsvoering is het tegenwoordig veelvuldig toepassen van spoelen om de bollen schoon te maken. Het is goed denkbaar dat de bollen door verwondingen bij het rooien en het spoelen daarna worden besmet. Op deze wijze kan de bacterie in een partij bollen aanwezig blijven. Om vast te stellen of *X. hyacinthi* via spoelen in een partij aanwezig kan blijven en na hoeveel jaren niet spoelen een partij bollen weer vrij kan zijn van *X. hyacinthi* is in 2006 een onderzoek gestart. Het onderzoek werd uitgevoerd met *S. mischtschenkoana* en *C. luciliae* (Figuur 3). Bij aanvang van het onderzoek zijn bollen niet besmet, mechanisch besmet of via spoelwater besmet. Dezelfde partijen zijn in de twee daarop volgende zomers na het rooien steeds wel of niet gespoeld. Na twee van de drie proefjaren is duidelijk dat spoelen heeft geleid tot meer planten met symptomen in het blad en meer aangetaste bollen ten opzichte van niet spoelen. Meer conclusies kunnen pas worden getrokken na het afronden van het onderzoek.

Verspreiding van geelziek via zaad?

Eucomis bicolor (ananasplant) wordt via zaad vermeerderd. Ondanks vele hygiënische maatregelen blijven partijen *Eucomis* een percentage met geelziek aangetaste planten houden (Figuur 1 C, D). Omdat andere waardplanten zoals hyacinten en bijna alle bijzondere bolgewassen afsterven op het moment dat *Eucomis* wordt geteeld en een bovengronds gewas vormt, lijkt een kruisbesmetting onwaarschijnlijk. Het vermoeden bestaat dat *X. hyacinthi* wellicht via zaad of zaadhuid verspreid kan worden. Dit aspect wordt komend jaar onderzocht. Van andere *Xanthomonas*-soorten die bijvoorbeeld rijst aantasten is bekend dat deze zaadpathogenen zijn.

Conclusies en toekomstig onderzoek.

De toetsing op geelziek, zoals die plaatsvindt bij de Bloembollenkeuringsdienst via PCR blijkt

toepasbaar ook op gewassen anders dan hyacint. In een enkel geval is lichte kruisreactie vastgesteld met één *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*-isolaat. (Van Doorn *et al.*, 2001). Dit aspect moet nog nader onderzocht worden. De geelziekproblemen in de kleine bollen van hyacintachtigen zoals Scilla en Muscari lossen zich in de praktijk letterlijk vanzelf op door het uitzielfenomeen; aangetaste bollen blijken veelal niet levenskrachtig. Wel is nu aangetoond dat gezonde hyacinten via naburige met geelziek besmette hyacintachtigen besmet kunnen worden, al gaat de overdracht moeizaam; reden te meer voor telers om voorzorgsmaatregelen te nemen. Ook via spoelen bestaat het gevaar van besmetting. Het is daarom raadzaam om een besmette partij niet te spoelen maar via een schudzeef (droog) te ontdoen van grond. De komende jaren wordt dit gevaar nader onderzocht; ook zal worden bekeken in hoeverre *Eucomis* via zaad besmet kan zijn met *X. hyacinthi*.

Daarnaast is het niet bekend of de bacterie mogelijk via onkruiden of bembegroeiing (monocotylen zoals grassen) kan overleven en op deze wijze inoculum kan zijn voor herbesmetting. Toch blijft volgens de ervaren hyacintenteler overeind staan, dat besmettingen in het veld met geelziek vooral ontstaan via wind, dieren zoals hazen en mensen (buurmannen die ook hyacinten telen) die door het (vochtige) veld lopen.

Literatuur

- Wakker JH. (1887) Onderzoek der ziekten van hyacinten en andere bol- en knolgewassen gedurende de jaren 1883, 1884 en 1885. Algemeene Vereeniging voor Bloembollencultuur, p.4-13
- Van Doorn J, Ojanen-Reuhs T, Hollinger TC, Reuhs BL, Schots A, Boonekamp PM & Oudega B (1999) Development and application of pathovar-specific monoclonal antibodies that recognize the lipopolysaccharide O antigen and the type IV fimbriae of *Xanthomonas hyacinthi*. Applied and Environmental Microbiology 65: 4171-4180
- Van Doorn J, Hollinger TC & Oudega B (2001) Analysis of the type IV fimbrial subunit gene *fimA* of *Xanthomonas hyacinthi*: application in PCR-mediated detection of yellow disease in hyacinths. Applied and Environmental Microbiology 67: 598-607
- Van Doorn J (2002) Type IV fimbriae of *Xanthomonas hyacinthi*: characterization and application for the detection of yellow disease in hyacinths. Thesis, Vrije Universiteit Amsterdam
- Janse JD Miller HJ (1983) Yellow disease in *Scilla tubergeniana* and related bulbs caused by *Xanthomonas campesytris* pv. *hyacinthi*. Netherlands Journal of Plant Pathology 89: 203-206

Erwinia: rot voor de bollenteler

Joop van Doorn, Peter Vreeburg, Paul van Leeuwen, Robert Dees en Wendy Martin

WUR, PPO Bloembollen, Boomkwekerijgewassen en Fruit, postbus 85, 2160 AB Lisse

De afgelopen acht jaar ondervonden bloembolgewassen zoals hyacint, Muscari, dahlia en iris in toenemende mate problemen met zachtrot: agressief snot zoals de gedupeerde telers deze bacterieziekte benoemden. Agressief rot heeft geleid tot grote teeltkundige problemen en economische schade. Deze bacterieaancontaminatie wordt veroorzaakt door *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* spp.). *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora*, de veroorzaker van het zogenaamde “oude witsnot”, tast ook bolgewassen aan, maar geeft meestal veel minder problemen.

Vanaf 2004 tot eind 2007 is onderzoek aan *Erwinia* verricht binnen het PT-project ‘Beheersing van *Erwinia* in bloembollen’ en binnen LNV-projecten. Dit onderzoek was gericht op identificatie en toetsontwikkeling, besmettingsroutes, invloed van gewasrotatie en de productieketen op incidentie, overleving en beheersing van met name *Erwinia chrysanthemi*.

Inleiding

Ongeveer 8 tot 10 jaar geleden werden de eerste gevallen van een nieuw zachtrot zichtbaar in de bloembollen, vooral bij hyacint (Figuur 1), maar ook bij gewassen als *Muscari*, *Scilla*, iris, dahlia, freesia en amaryllis. In hyacint verschillen de symptomen sterk van “oud witsnot”, veroorzaakt

door *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc; nu gereclassificeerd tot *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; Pcc). Het verschil tussen witsnot en het “nieuwe agressieve snot” is enerzijds het hogere percentage aangetaste bollen, anderzijds de grotere snelheid en mate van aantasting (agressiviteit). Ook werd geconstateerd dat deze nieuwe bacterierot bij hogere temperaturen tot ontwikkeling komt dan de ziekte veroorzaakt door Pcc.

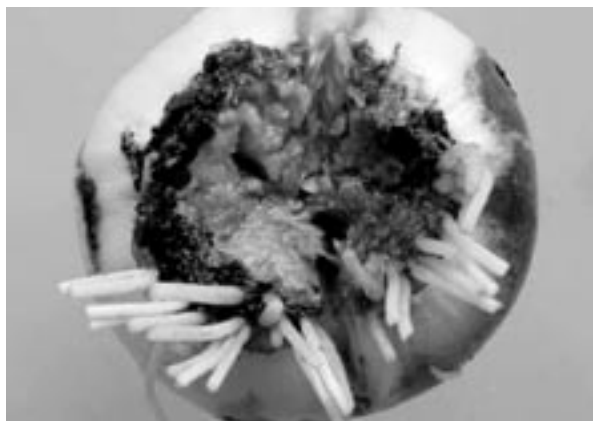
De laatste jaren, vanaf 2003, zijn er in toenemende mate problemen met rot in bolgewassen. Deze rotproblemen worden in de meeste gevallen door *Erwinia chrysanthemi* (tegenwoordig ook *Dickeya* genoemd) veroorzaakt.

De oude benaming “*Erwinia*” wordt nog steeds gebruikt voor de bacteriële rotproblemen in het bloembollenvak die door *Pectobacterium* of *Dickeya* spp. worden veroorzaakt.

In de hele bloembolproductieketen, het veld, kas, bewaring en export, veroorzaakte het agressieve rot in toenemende mate schade, vergelijkbaar met wat zich afspeelt in de pootaardappelsector. Cijfers voor de bollensector zijn niet voorhanden, omdat er niet op *Erwinia* wordt gekeurd; geschat wordt dat de gezamenlijke schade in teelt en export jaarlijks tussen de 4 en 8 M€ bedraagt.

Bij hyacint vindt grote uitval plaats tijdens de bewaring. Soms rotten partijen voor 100% weg. Mogelijke vormen van rot veroorzaakt door *Erwinia* zijn: “leeglopen van bollen” en zogenaamde “kroepoek” (Tabel 1).

In het gewas dahlia zijn er sterke aanwijzingen dat *Erwinia* betrokken is bij het verschijnsel “ploffers” (natrot). In sommige partijen dahlia vallen hoge percentages knollen weg waardoor



Figuur 1. Een door *Dickeya* aangetaste bolbodem van hyacint (boven) en zogenaamde ‘leeglopers’ bij hyacintbollen in de bewaring veroorzaakt door deze bacterie als gevolg van omzetting van de reservestoffen van de bol (onder).

Tabel 1. Overzicht van *Erwinia*-soorten in de bloembollensector

<i>Erwinia</i> -soort	Nieuwe benaming	Bijzonderheden	Ziekte
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Ecc)	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Heel diverse soort	witsnot
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Weinig diverse soort; komt tot zover bekend nauwelijks voor in bloembolgewassen	Witsnot?
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Dickeya</i> spp: <i>D. dadantii</i> , <i>D. chrysanthemi</i> , <i>D. zea</i> , <i>D. paradisiacal</i> , <i>D. dianthicola</i> , <i>D. dieffenbachia</i>	In meerdere soorten onderverdeeld	“Agressief snot”
<i>Erwinia rhapontici</i> *	<i>Erwinia rhapontici</i>	Veroorzaakt in hyacint “snotlintjes”	“Inwendig neusrot”
<i>Erwinia herbicola</i> *	<i>Pantoeae agglomerans</i>	Er komen zowel pathogene als niet-pathogene isolaten voor	“Kroepoek”

* wordt weinig aangetroffen

de stekproductie van deze soorten erg wordt bemoeilijkt.

Bij *Zantedeschia* is *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) al lang een probleem; *Dickeya* tast dit gewas vrijwel niet aan. Ecc kan soms tot 30% uitval geven in de teelt. Ook bij export van partijen *Zantedeschia* (Calla) leiden *Erwinia*-aantastingen tot aanzienlijke schade.

In iris wordt sinds enkele jaren veel uitval geconstateerd door zachtrot in de bewaring en tijdens de rooi. Er zijn aanwijzingen dat een *Erwinia*-soort betrokken zou zijn bij dit “stinkend zachtrot” of zelfs hoofdveroorzaker zou zijn. Ook in *Muscari* nemen de problemen met rotbacteriën toe. Een geconcentreerde aanpak, gericht op het *Erwinia*-probleem is dan ook meer dan wenselijk!

Aandachtspunten bollensector

Uit een enquête, gehouden onder bloembollentelers in 2004 bleek, dat ongeveer 70 % van de respondenten in mindere of meerdere mate last had van *Erwinia*. Spoelen van bolmateriaal werd als een belangrijke oorzaak gezien. Op zich niet vreemd omdat *Erwinia* een vochtminnende bacterie is, die snel met vrij water wordt verspreid. Onduidelijk was welke *Erwinia*-soorten verantwoordelijk zijn voor het veroorzaken van rot of snot en of ook andere bacteriesoorten of schimmels (bv. *Pseudomonas* spp. of *Fusarium*) zachtrot kunnen veroorzaken. Tevens werd de vraag gesteld welke toetsmethoden er bestaan om *Erwinia* aan te tonen en welke middelen aantastingen kunnen inperken. Op bedrijfsniveau was er veel belangstelling om te weten te komen of vruchtwisseling *Erwinia* kan overbrengen van het ene gewas naar het andere. Ook wilde men

weten of bemesting het gewas meer weerstand zou kunnen geven zoals calciumgift bij witlof. Ten slotte wilde de telers weten welke verwerkingshandelingen gedurende de keten - van het rooien van bollen tot aan het verpakken voor export - invloed hadden op de ziekte-incidentie.

Typering isolaten en toegepaste toetsmethoden

Analyses van 189 monsters, verdacht van zachtrot, werden uitgevoerd door middel van standaard PCRs. Onderzocht werden 134 monsters van hyacint, zeven van *Zantedeschia* en verder monsters van iris, dahlia, *Muscari*, sierui, amaryllis, freesia, krokus, *Brodiaea* en narcis. In ongeveer 70% werd *Erwinia* aangetroffen. Niet altijd kon *Erwinia* in monsters met specifieke symptomen worden aangetoond. In sommige gevallen werd *Pseudomonas* spp. of *Fusarium* spp. aangetroffen.

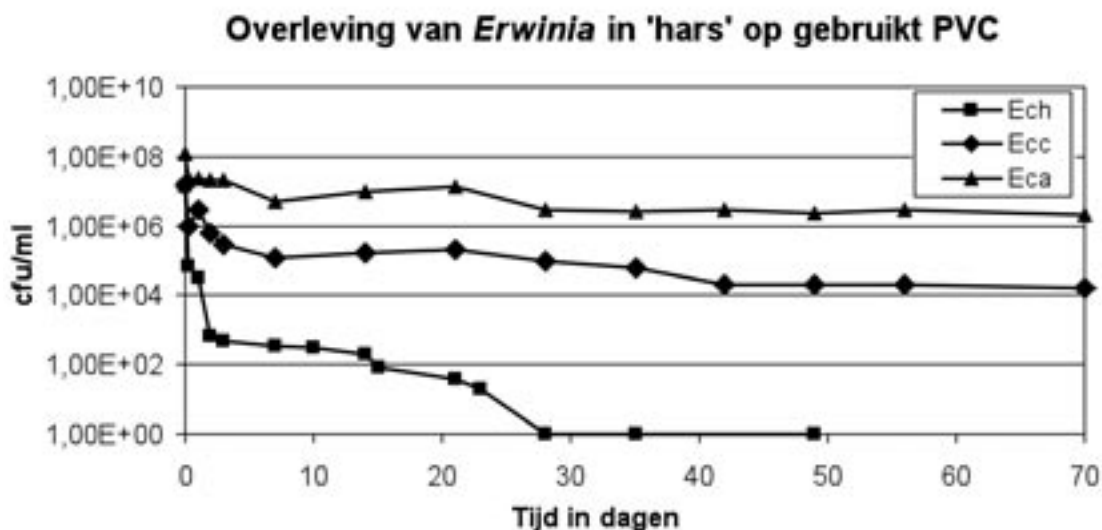
Van een aantal isolaten is onderzocht tot welke soort *Dickeya* deze behoorden. In hyacint werden *D. dadantii* en *D. zea* gevonden. Deze analyses zullen verder worden uitgebreid naar isolaten uit diverse soorten bolgewassen. Naast PCR zijn, in samenwerking met PRI en HZPC TaqMan PCRs getest om o.a. *Pectobacterium* en *Dickeya* te kunnen detecteren. Deze bleken over het algemeen goed bruikbaar. In de meeste gevallen werkte ELISA goed om *Dickeya* aan te tonen; in een paar gevallen werden echter ook kruisreacties met *Pseudomonas* geconstateerd. In samenwerking met PRI is ook Luminex toegepast; deze serologische methode biedt mogelijkheden voor routinematige toepassing (Peters *et al.*, 2007). Ook zijn alternatieve toetsmethodieken onderzocht (Van Doorn

et al., 2006). Stressinductie via mechanische beschadiging van bollen in combinatie met een temperatuurbehandeling wordt momenteel onderzocht op zijn praktische toepasbaarheid met als doel dit op bedrijven zelf te laten toepassen. MIPS (Multiple Imaging Plant Stress) is uitgevoerd op hyacintenbollen uit een zieke partij. De resultaten waren niet eenduidig. Ook niet-aangetaste bollen (*Erwinia*-vrij) gaven een signaal, waarschijnlijk als gevolg van kleine mechanische beschadigingen aan de buitenkant. Hoewel niet-destructieve methodieken om ziekten in de bol te kunnen aantonen zeer wenselijk zijn, lijkt deze methode (nog) niet geschikt.

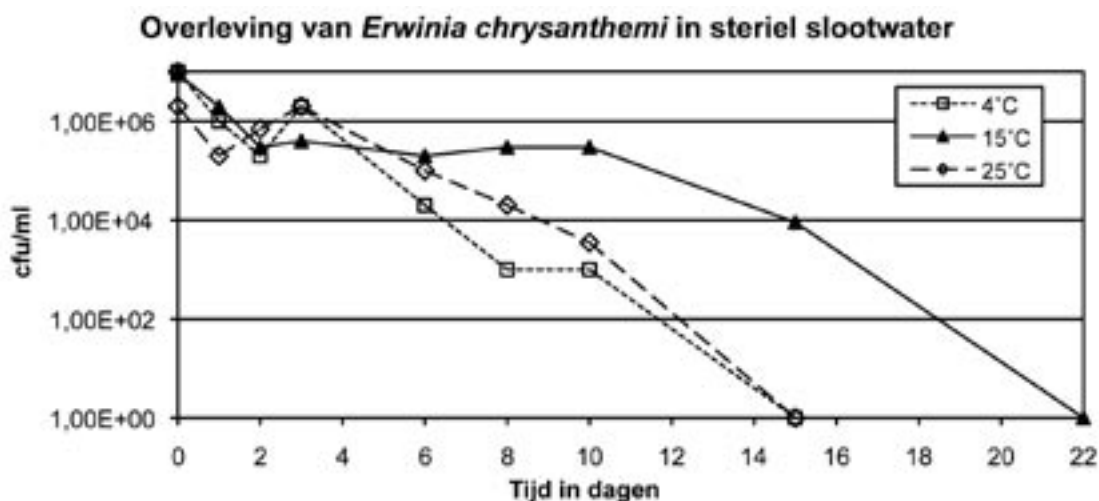
Overleving van *Erwinia*

Hoe *Erwinia* (vooral *Dickeya*) in schone partijen terecht komt, is niet duidelijk. Er zijn verschillende mogelijkheden: via regen, via irrigatiewater, via versmering (besmetting via aangetaste bollen op bv. sorteerbanden) en via latent besmette bollen. Omdat er bij de teelt van een aantal bolgewassen ook waterbroei wordt toegepast, is onderzocht hoe lang *Erwinia* kan overleven in water. Er bleek verschil tussen *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* en *Dickeya*. In kraanwater overleefde *Dickeya* nauwelijks een dag; in bassin water langer, evenals in slotwater (Figuur 2). Deze overleving is temperatuurafhankelijk; in sommige gevallen werd de vorming van

ARTIKEL

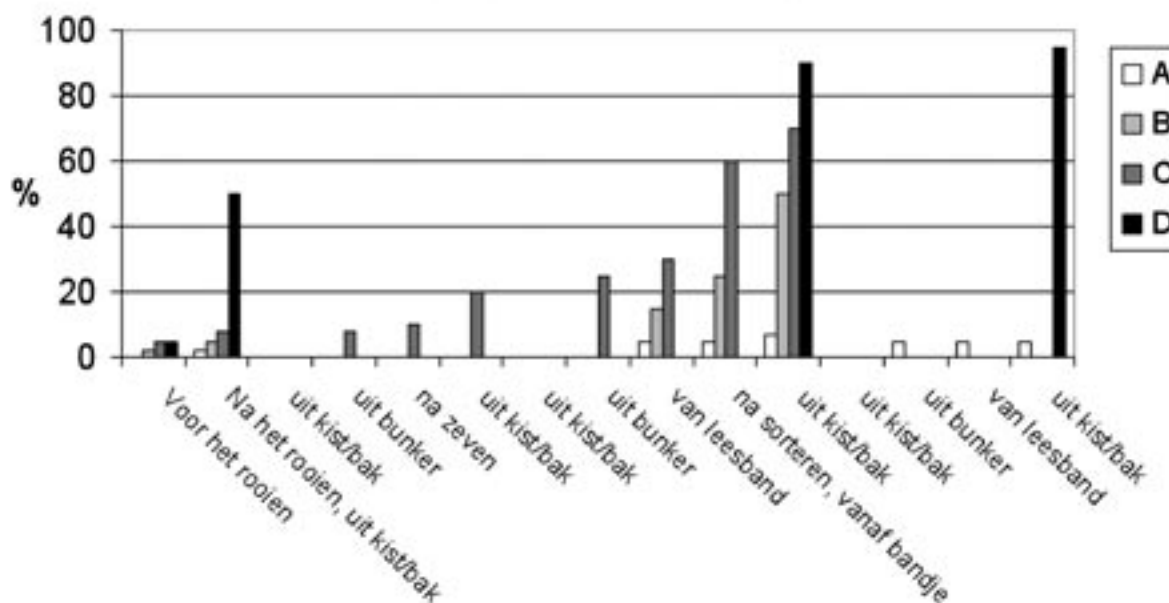


Figuur 2. Overleving van *Dickeya* en *Pectobacterium* spp. in "hars"(extracellulaire polysacchariden) op kunststof (PVC). Ecc = *E. carotovora* subsp *carotovora* (= Pcc = *P. carotovorum* subsp *carotovoru*;; Ech = *E. chrysanthemi*; Eca = *E. carotovora* subsp *atroseptica*.



Figuur 3. Overleving van *Dickeya* (*E. chrysanthemi*) in gesteriliseerd slotwater in kolonievormende eenheden. In tegenstelling tot *Pectobacterium* overleeft *Dickeya* relatief kort.

Bolbeschadiging tijdens verwerking hyacint



Figuur 4. Variatie in het optreden van beschadiging van hyacintebollen per bedrijf en het risico op *Erwinia*-aantasting als gevolg hiervan.

een biofilm geconstateerd, waarin bacteriën in het algemeen langer kunnen overleven dan in suspensies. Op materialen, zoals metaal, beton en vooral PVC, konden deze bacteriesoorten alleen in een bolexudaat ("hars") langer dan een dag overleven (Figuur 3). Als de bacterie vrij in suspensie op materialen wordt aangebracht, is de overleving sterk afhankelijk van de relatieve luchtvochtigheid. Hoe hoger de vochtigheid, hoe langer de overleving. Opvallend was dat *Dickeya* spp. sneller het loodje legt dan *Pectobacterium atrosepticum* en *P. carotovorum* supsp. *carotovorum* (Van Doorn *et al.*, 2007). Bedrijfshygiëne is hier wederom het toverwoord om besmetting van partijen bollen met *Erwinia* te voorkomen.

Ketenonderzoek

De invloed van een aantal stadia in de productieketen van vooral hyacintebollen is onder de loep genomen om te zien waar *Dickeya* spp. kan toeslaan. De mate van aantasting kan worden beperkt door een reeks van maatregelen vanaf rooien tot aan planten. Hygiënische maatregelen, getroffen gedurende de teelt en verwerking werpen vruchten af om verspreiding van agressief rot naar andere partijen te voorkomen. Verschillende ketenstadia zijn onderzocht: vruchtwisseling, bemesting, vermeerdering, drogen, verwerking en bewaring en de invloed van de uitvoering van handelingen op verschillende bedrijven. Figuur 4 geeft aan waar beschadigingen van hyacintebollen optreden bij verschillende bedrijven tijdens handelingen in de keten. Beschadiging staat vaak garant voor een *Erwinia*-aantasting;

bedrijf A heeft het onder controle (weinig beschadiging) terwijl bedrijf D bij rooien en sorteren een stuk voorzichtiger te werk zou moeten gaan!

Het vruchtwisselingonderzoek is gestart met grondbesmetting met *Dickeya* spp. en *Ecc* (*Zantedeschia*) via aangetaste bollen van hyacint, iris en *Zantedeschia*. Vervolgens zijn vijf bolgewassen (de eerder genoemde bolgewassen en dahlia en *Muscari*) in rotatie geteeld op deze percelen. De vruchtwisselingsexperimenten toonden geen relatie tussen besmetting van de grond en aantasting van de gewassen (Vreeburg *et al.*, 2007). De geconstateerde besmettingen werden veroorzaakt door besmetting die al in de aangeplante partijen aanwezig was. Bemesting van percelen met calcium, kalium, stikstof, selenium, mangaan, sporenmix en stalmest had geen duidelijk effect (positief of negatief) op aantasting door *Dickeya* spp. in hyacint. Het vermeerderen van bv. hyacint via snijden of hollen (groei van bolletjes op het wondweefsel) liet zien, dat mechanische overdracht van *Erwinia* mogelijk is, vooral via snijden. Er bleken ook latente besmettingen op te treden welke pas een jaar later zichtbaar werden. Dit en andere ervaringen leren dat gebruik van gezond uitgangsmateriaal van het grootste belang is.

Verwijdering van aangetaste of verdachte planten bij het rooien kan de verspreiding via versmering van *Dickeya* en *Pectobacterium* bij verwerking, onder andere bij het machinaal sorteren, beperken. Na rooien is snel drogen en voorzichtig (met

zo min mogelijk beschadigingen) verwerken bij schonen, sorteren, tellen en verpakken van groot belang. Deze verwerking dient zo laat mogelijk te worden uitgevoerd omdat na wondheling en afharding de kans op aantasting in de tijd minder wordt. Per bedrijf kan beschadiging en dus de kans op *Erwinia*-infectie sterk variëren (Figuur 4). Bij verwerking van bollen is het belangrijk om in verband met de warmteminnende *Dickeya* de temperatuur onder de 23-25°C te houden. Schon door spoelen wordt uiteraard sterk afgeraden.

Bestrijding

Ozonbehandeling na beschadiging en infectie met *Erwinia* is toegepast op enkele kleine partij en hyacint. Deze gaf geen beperking van nieuwe aantasting door *Dickeya* spp. Boldompeling van hyacinten met desinfecterende middelen zoals formaline, 'mild acid', Citrex of etherische olie gaven wisselende resultaten en gaven vaak ook meer aantasting. De aanwezigheid van water gaf waarschijnlijk *Erwinia*'s de kans zich te verspreiden. De werking van etherische olie in een bewaarcel kon tot op heden in enkele pilotexperimenten niet bewezen worden ondanks enkele positieve berichten uit de praktijk. UV-bestraling is niet toegepast.

Andere mogelijkheden zijn behandelingen van bollen in bewaarcellen met gasvormige middelen en eventueel een aanpak d.m.v. 'quorum quenching'. Hierbij wordt het infectieproces van de bacterie verstoord door afbraak van signaalstoffen (homoserine lactonen) die belangrijk zijn voor het aanschakelen van virulentiefactoren (o.a. de productie van pectinolytische enzymen). Misschien is introductie van endofytische antagonisten die antimicrobiële stoffen produceren of quenchers van homoserine lactonen produceren een mogelijkheid om latente infectie met *Erwinia* te beheersen (Jafra *et al.*, 2006).

Toekomstig onderzoek: Deltaplan *Erwinia*

Het is duidelijk dat er voor het oplossen van de *Erwinia*-problemen in de bloembollensector (veel) onderzoek nodig is. Er zijn aanwijzingen dat er sprake is van een veel agressiever isolaat/soort van *Dickeya* (persoonlijke mededeling Van der Wolf). Daar ook de aardappelsector vergelijkbare problemen heeft, is een gezamenlijke aanpak verstandig. Hiertoe is het *Erwinia* Deltaplan in het leven geroepen op initiatief van PRI, de pootaardappelsector, de bloembollensector en PPO. Er zal door fundamenteel, strategisch en toegepast onderzoek door de verschillende partijen gewerkt worden aan het oplossen van

de *Erwinia*-problemen. Het toegepaste onderzoek voor de bloembolsector is door PPO en voor de aardappelsector door HZPC al in 2009 gestart. Voor het fundamentele en strategische onderzoek wordt nog gezocht naar financiering. Thema's waaraan zal worden gewerkt binnen het Deltaplan betreffen genomisch onderzoek, plant-pathogeeninteracties (o.a. de infectieroutes), de epidemiologie, diagnostiek van de verschillende *Erwinia*-soorten, resistentie, bestrijding en beheersing. Hierbij ligt de focus vooral op *Dickeya*.

Deze gezamenlijke aanpak zal er toe moeten leiden dat op korte termijn praktische (voor de sectoren toepasbare) informatie beschikbaar komt. Voor duurzame oplossingen op de langere termijn zal uit fundamenteel onderzoek kennis gegenereerd worden om het "rot-probleem" in de toekomst te kunnen beheersen.

Literatuur

- Doorn J van, Hollinger T & Vreeburg P (2006) Snelle toetsen op *Erwinia* geven steeds beter zicht op aantasting BloembollenVisie 87: 22-23
- Doorn J van, Kampen D van, Hollinger T, Zouwen P van der, Speksnijder A & Wolf J van der (2007) Overleving van *Erwinia* in grond en materialen onderzocht. BloembollenVisie 115: 20-21
- Vreeburg P, Doorn J van, Leeuwen P van, Korsuize A & Trompert J (2007) Grondbesmetting en voeding spellen een minder grote rol bij *Erwinia*-besmetting. BloembollenVisie 118: 20-21
- Jafra S, Przynsowa J, Czajkowski R, Michta A, Garbeva P & Van der Wolf JM (2006) Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone. Canadian Journal of Microbiology 52: 1006-1015
- Jeroen Peters J, Sledz W, Bergervoet JHW & van der Wolf JM (2007) An enrichment microsphere immunoassay for the detection of *Pectobacterium atrosepticum* and *Dickeya dianthicola* in potato tuber extracts. European Journal of Plant Pathology 117: 97-107
- Nassar A, Darrasse A, Lemattre M, Kotoujansky A, Dervin C, Vedel R, & Bertheau Y (1996) Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel- genes. Applied and Environmental Microbiology 62: 2228-2235
- Darrasse A, Priou S, Kotoujansky A & Bertheau Y (1994) PCR and restriction fragment length polymorphism of a pel gene as a tool to identify *Erwinia carotovoras* in relation to potato diseases. Applied and Environmental Microbiology 60:1437-1443

Detectie van *Agrobacterium tumefaciens* in grond

Ellis Meekes¹, Roland Butôt¹, Shakti Lieten², Inez Dinkla²

¹ Naktuinbouw, Postbus 40, 2370 AA Roelofarendsveen

² Bioclear, Postbus 2262, 9704 CG, Groningen

Wortelknobbelsbacterie

Agrobacterium tumefaciens, ook wel wortelknobbel genoemd, is de veroorzaker van knobbels in wortels en stengels bij een brede reeks van gewassen. Wortelknobbel kan aanzienlijke verliezen veroorzaken in uitgangsmateriaal van roos (Figuur 1) en fruitbomen. Een infectie met *A. tumefaciens* kan optreden tijdens enting, watergift of wanneer gezond materiaal geplant wordt in gronden waar *A. tumefaciens* al in aanwezig is. Het risico op infectie neemt toe als de plant beschadigingen heeft. Onder Nederlandse omstandigheden groeien de wortelknobbels traag en is de schade meestal beperkt, maar onder warmere omstan-



Figuur 1: Stengelknobbels in roos veroorzaakt door *A. tumefaciens*.

digheden kunnen de wortelknobbels snel uitgroeien. Dit kan vooral bij export naar landen met een multolerantie grote economische schade tot gevolg hebben. Aantasting met deze bacterie kan niet worden bestreden. Verwijdering van de knobbels is geen garantie dat het materiaal vrij is van *A. tumefaciens*: er kunnen in een later stadium alsnog knobbels ontstaan.

Agrobacterium komt in de natuur vrij algemeen voor, maar niet elke *Agrobacterium* veroorzaakt een wortelknobbel. Voor knobbelvorming moet *Agrobacterium* een tumor-inducerend (Ti) plasmide bij zich hebben waarvan een deel na infectie wordt ingebouwd in het planten-DNA. Dit zal de plant aanzetten tot knobbelvorming. Isolaten zonder dit Ti-plasmide zullen geen symptomen veroorzaken. De nomenclatuur rond *Agrobacterium* is dusdanig ingewikkeld dat het lastig is om tot een eenduidige naamgeving te komen (zie voor meer informatie Willems, 2006 en Young *et al.*, 2005).

Detectie van *A. tumefaciens*

Tot voor kort was het niet mogelijk om de wortelknobbelbacterie in grondmonsters aan te tonen. Hierdoor kwam besmetting pas aan het licht als het gewas al symptomen vertoonde. In de fruitboom- en rozensector was er behoefte aan een toets waarmee *A. tumefaciens* voorafgaand aan de teelt gedetecteerd kon worden, zowel in grond als plantmateriaal. De afgelopen jaren is daarom in nauw overleg met de sector een toets ontwikkeld om de aanwezigheid van de ziekteverwekkende bacterie *A. tumefaciens* in grond aan te tonen. Deze toets is met financiering van Productschap Tuinbouw ontwikkeld door Bioclear en Naktuinbouw (Lieten *et al.*, 2008).

Om inzicht te krijgen in de wortelknobbel-problematiek is gedurende de eerste fase van het project een moleculaire toets opgezet. Het unieke aan deze nieuw ontwikkelde toets is dat hiermee *Agrobacterium* in grond kan worden aangetoond. Daarnaast kan met dezelfde methode *A. tume-*

ARTIKEL

faciens zowel in planten als in water worden aangetoond. De primers voor een *nested*-PCR zijn gebaseerd op het *iaaM*-gen van het Ti-plasmide; de moleculaire toets toont daardoor specifiek de ziekteverwekkende bacteriën aan en sluit de aanwezige niet-pathogene *Agrobacteria* uit. Aanvankelijk was de methode gebaseerd op een directe extractie van DNA uit 0,5 gram grond, maar bij analyse van grondmonsters uit de praktijk bleek dat deze methode, met een detectieniveau van 200 cellen/g grond, niet gevoelig genoeg was. Om de gevoeligheid van de toets verder te verhogen is een vermeerderingsstap op semi-selectief medium geïmplementeerd. Het detectieniveau werd daarmee verhoogd naar ca. 10-30 *iaaM* genen/g grond. In de onderzoeksfase is een kwantitatieve PCR analyse ontwikkeld (Q-PCR). Deze is in het onderzoeksproject gebruikt voor kwantificering van de hoeveelheid aanwezige genen, maar de Q-PCR heeft echter een hogere detectiegrens dan de *nested* PCR. Om deze reden wordt voorsnog voor de praktijk toetsing de *nested* PCR gebruikt.

Er is nader onderzocht of er een verschil is tussen grond besmet met een laboratoriumstam van *A. tumefaciens* en een natuurlijk besmette grond wat betreft het aantal *iaaM*-genen per *A. tumefaciens* cel. Om dit te bepalen is met behulp van *real-time* PCR het totaal aantal bacteriecellen, *A. tumefaciens*-cellen en *iaaM*-genen per gram grond in de tijd vergeleken voor beide gronden. In de natuurlijk besmette grond bleek dat gemiddeld 10-100 *A. tumefaciens* cellen 1 *iaaM*-gen bevatten. Bij aanvang bevatte kunstmatig besmette grond 10 *iaaM*-genen per *A. tumefaciens* cel. In tijd nam echter het aantal *iaaM*-genen per *A. tumefaciens*-cel in kunstmatig besmette grond af, naar een niveau dat overeenkwam met de natuurlijk besmette grond (Figuur 2). Dit duidt mogelijk op een ander overlevingspatroon van een laborator-

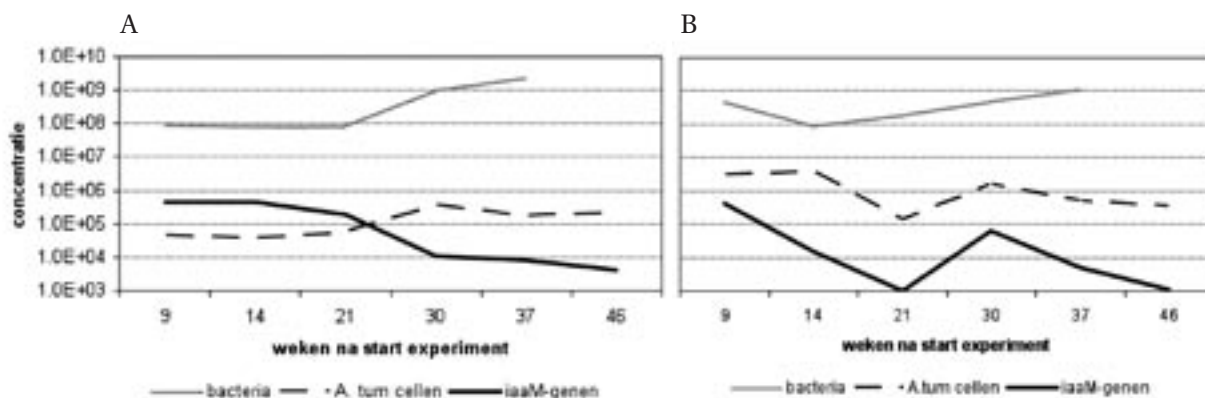
umstam dan van een van nature aanwezige stam. Hier is verder binnen dit project geen onderzoek naar gedaan

Veldvalidatie

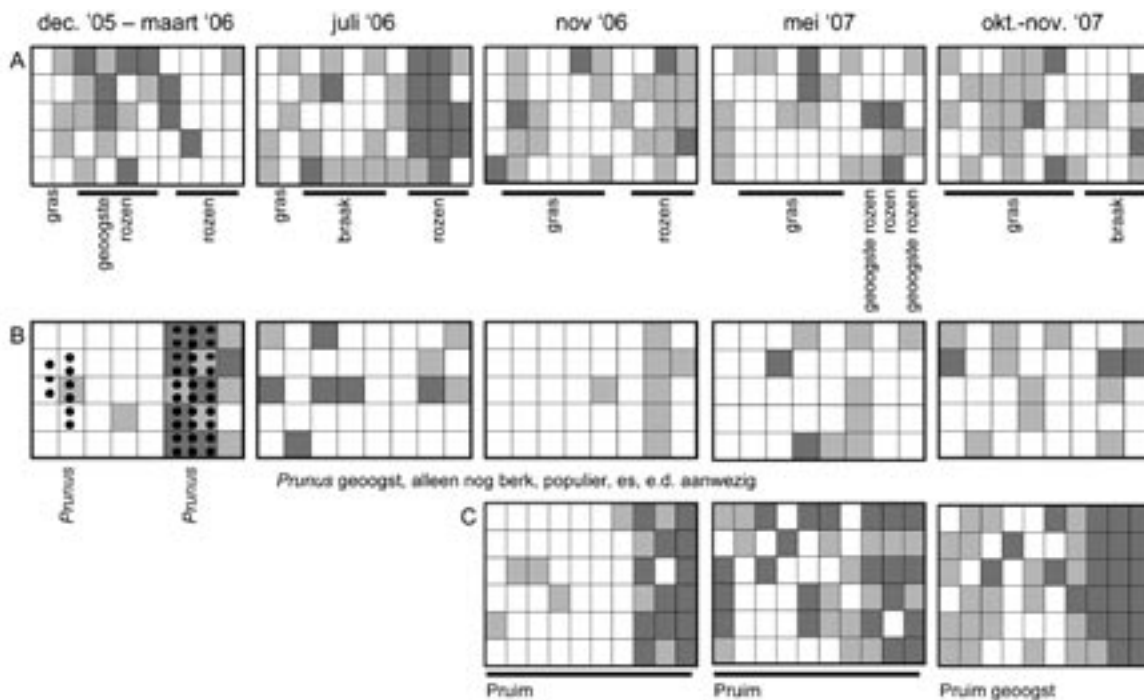
De toets is vervolgens op praktijkvelden gevalideerd. Voor validatie zijn drie percelen geselecteerd waarvan bekend was dat planten symptomen vertoonden bij oogst: de aantastingspercentages varieerden van 25 tot 100%. In het laboratorium is bevestigd dat de symptomen (knobbels) inderdaad werden veroorzaakt door *A. tumefaciens*. Deze percelen zijn gedurende twee jaar gevolgd, waarbij twee tot drie keer per jaar een bemonstering werd uitgevoerd. Hiervoor werden de percelen opgedeeld in plots van 10 x 15 m met 6 monsterpunten per plot (totaal \geq 100 g grond/plot). Door te kiezen voor een fijnmazig bemonsteringspatroon, gaven de data ook inzicht in de verspreiding van *A. tumefaciens* in een veld.

Perceel A: Op dit perceel werd enkele jaren rimpelroos (*Rosa rugosa*) geteeld. De planten zijn in etappes geogst van november 2005 tot maart 2007 (van links naar rechts, Figuur 3A), waarna gras werd ingezaaid. In november 2005 vertoonde 25% van de geogste planten in het midden van het perceel symptomen. In dit gedeelte van het perceel werd ook een hoge concentratie *A. tumefaciens* aangetoond (Figuur 3A). In 2006 werd de hoogste concentratie *A. tumefaciens* aangetoond in de rechter helft van het perceel, waar rozen aanwezig waren tot eind 2007.

Perceel B: Op perceel B stonden van maart 2006 tot eind 2007 laanbomen, waaronder Japanse sierkers (*Prunus serulata*). In maart 2006 werden de rijen sierkers geogst en 100% van de planten vertoonden symptomen. *A. tumefaciens* werd zowel in de knobbels als in de grond rondom



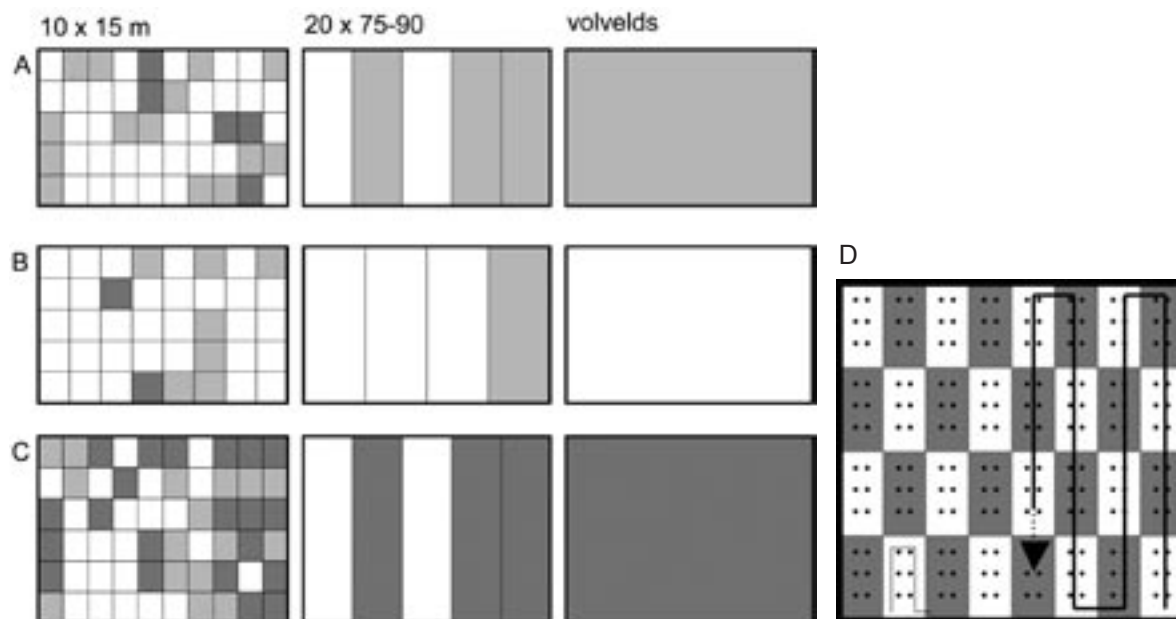
Figuur 2. Concentratie van totaal aantal aanwezige bacteriën (grijze lijn), *A. tumefaciens* cellen (gestippelde lijn) en *iaaM*-genen (gestippelde lijn) in grond kunstmatig besmet met een *A. tumefaciens* laboratorium stam (A) en in een grond natuurlijk besmet met *A. tumefaciens* (B).



Figuur 3: A. tumefaciens besmetting van percelen en plots (10 x 15 m): donker grijs: hoog niveau A. tumefaciens; licht grijs: A. tumefaciens aanwezig; wit: geen A. tumefaciens gedetecteerd. Perceel A: Rosa rugosa, B: rijen met zwarte stippen geven aan waar Prunus serulata (sierkers) heeft gestaan; C: Prunus domestica (pruim).

deze bomen aangetoond. Vlak na oogst was de concentratie van A. tumefaciens in de grond waar de bomen gestaan hebben het hoogst (Figuur 3B). Buiten de rijen sierkers stonden er geen andere gevoelige gewassen op dit perceel. Het is mogelijk dat op dit perceel A. tumefaciens met de bomen is meegekomen.

Perceel C: Op dit perceel hebben van 2002-2004 appelbomen gestaan. Bij de oogst (eind 2004) werden in 50% van de appelbomen wortelknobbelsymptomen waargenomen. Doordat in 2004 de detectiemethode nog niet was geoptimaliseerd werd de moleculaire analyse zonder voorweek



Figuur 4: Resultaten opschaling van bemonstering op A. tumefaciens besmetting in mei 2007 perceel A: Rosa rugosa, perceel B: Prunus serulata (sierkers), perceel C: Prunus domestica (pruim): donker grijs: hoog niveau A. tumefaciens; licht grijs: A. tumefaciens aanwezig; wit: geen A. tumefaciens gedetecteerd. In D worden de verschillende bemonsteringspatronen weergegeven.

uitgevoerd. De detectielimiet was 200 genen/g grond, hierdoor werd op dit perceel slechts in één van de plots *A. tumefaciens* aangetoond in de grond (data niet getoond). Toen eind 2005 opnieuw een gevoelig gewas werd geteeld (pruim, *Prunus domestica*), is dit perceel opnieuw opgenomen in de bemonsteringscyclus. Bij de oogst (eind 2007) vertoonden 50% van de pruimbomen symptomen. Het rechter gedeelte van het veld (Figuur 3C) vertoonde een hogere concentratie *A. tumefaciens* dan de rest van het veld. Dit gedeelte was beplant met uitgangsmateriaal van een andere herkomst, maar ook de grondbewerking en grondontsmetting verschilden van de rest van het perceel. (Figuur 3C).

Een fijnmazig bemonsteringspatroon is voor de praktijk niet haalbaar, omdat door de vele analyses de uiteindelijke kosten voor de toets te hoog zijn. In het laatste jaar is daarom naast dit fijnmazige bemonsteringspatroon, het bemonsterende oppervlak vergroot naar 20 x 75-90 m, en een volveldsbemonstering; de afstand tussen de bemonsteringspunten werd niet gevarieerd. De bemonstering van het grotere oppervlak werd opnieuw uitgevoerd en leverde een groter grondmonster op (>1 kg). Uit de gegevens bleek dat *A. tumefaciens* nog steeds detecteerbaar was in de grondmonsters, maar dat lagere concentraties in het veld gemist kunnen worden bij een grover bemonsteringspatroon (Figuur 4). In november 2007 is dit herhaald, wat leidde tot dezelfde resultaten.

Toets in de praktijk

Hoe werkt deze toets in de praktijk? Een perceel wordt bemonsterd volgens het aaltjesprotocol van de Naktuinbouw. Bij monsternamen kan rekening gehouden worden met eventuele verdenkingen van besmetting op het gehele of een deel van het perceel. Na analyse van de monsters wordt het risico van besmetting in drie gradaties weergegeven:

- zwaar besmet;
- besmet;
- bacterie niet aangetoond.

Als de uitkomst van de toets 'zwaar besmet' is dan wordt aangeraden om geen enkel gevoelig gewas op dit perceel te telen. Indien de bacterie niet is aangetoond dan kan er geplant worden en is het risico op besmetting op het perceel gering. Indien het toetsingsresultaat 'besmet' is dan wordt aangeraden om geen gevoelig gewas te telen. Eventueel kan indien gewenst het perceel fijnmaziger bemonsterd worden om de infectiehaard op te sporen.

De teler dient zijn gezond verstand te gebruiken bij het interpreteren van de resultaten. Het spreekt voor zich dat een teler rekening houdt met de gevoeligheid van het gewas, maar ook met het afzetgebied. Daarnaast kan de toets gebruikt worden bij de keuze van een te pachten perceel. Indien een eigen perceel besmet is, kan een planning gemaakt worden om de infectiedruk in een aantal jaren sterk terug te dringen. Indien een perceel tijdens de teelt besmet blijkt, dan is het verstandig om na het rooien de besmette planten te verwijderen en af te voeren. Het is beter om de overige symptoomloze planten uit een dergelijke partij niet te exporteren naar warme landen. Een besmetting in een partij kan namelijk latent aanwezig zijn en in de jaren daarna alsnog symptomen geven.

Tot slot

Uit bovenstaande gegevens blijkt dat er een goede relatie bestaat tussen de aanwezigheid van *A. tumefaciens* in de bodem en waargenomen symptomen in het veld. Lage concentraties van *A. tumefaciens* zijn echter moeilijk te detecteren, zoals bij opschaling is gebleken. Verder blijft *A. tumefaciens* langer dan twee jaar in grond aanwezig. Om de schadedrempel te bepalen zijn echter meer velddata noodzakelijk. Bij validatie van de toets is ook gebleken dat het bewust besmetten van grond met een laboratoriumstam kan leiden tot een overschatting van de gevoeligheid: het percentage *A. tumefaciens*-cellen met een Ti-plasmide is in natuurlijk besmette grond aanzienlijk lager dan in kunstmatig besmette grond. De toets wordt gedurende twee jaar door Naktuinbouw, met medewerking van de sector gevalideerd en klaargemaakt voor de praktijk.

Literatuur

- Lieten SH, Meekes ETM, Dinkla IJT, Butôt R, Geurkink AK, Jongedijk GP & Krooneman J (2008) Detectie van *Agrobacterium tumefaciens* in grond, verkrijgen van inzicht in de wortelknobbelproblematiek. Eindrapportage Productschap Tuinbouw (2005.2725), 34 pp
- Willems A (2006) The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil* 287: 3–14
- Young, JM, Kerr, A & Sawada, H (2005) Genus II. *Agrobacterium*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology; The Proteobacteria 2nd edn Vol. 2*. (Eds. Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Volume Editors), Garrity GM (Editor-in-Chief)). Springer-Verlag, New York, pp 340-345

Het natuurwetenschappelijk wereldbeeld

A.J.Vijverberg@kabelfoon.nl

Vorig jaar vroeg een kennis mij of hij tomaten ook in zijn eigen tuin kon planten. Na enige discussie bleek zijn vraag samen te hangen met de vele katten in zijn tuin. Uitwerpselen van katten stinken, de wortels van de planten nemen die uitwerpselen uit de grond op, de tomatenvruchten bevatten dus de restanten van die uitwerpselen en zullen dus ook stinken. Vanuit de biologie geredeneerd, is het niet moeilijk om dit bezwaar weg te wuiven. Justus von Liebig (1803-1873) heeft ons geleerd dat de plant alleen mineralen uit de bodem opneemt. Het naar voren brengen van die oude kennis, zo dacht ik, moet in staat zijn om mijn vriend over zijn bezwaren heen te helpen.

Om de stelling over de opname van mineralen aan de gemiddelde burger uit te leggen is een hels karwei. Van wijn proef je toch ook van welke grondsoort deze afkomstig is? En alle wijntelers verbinden het unieke karakter van “hun” grond en “hun” klimaat met de kwaliteit van “hun” wijn. En Opperdoezer ronde zijn toch zo duur en zo lekker omdat er nergens anders die combinatie van kleigrond en zeelucht te vinden is dan op dat plekje in Noord-Holland? En je proeft toch meteen de versheid van grasboter? En tomaten uit de volleggrond zijn toch veel lekkerder dan de waterballen van substraat? Of niet soms? Over smaken schreef Pam het volgende¹:

“Kip smaakte vroeger naar kip, zoals een aardbei vroeger naar aardbei smaakte”, schreef Theodor Holman, “en tomaat smaakte niet naar water.”

Dat laatste heb ik zelf [Pam dus] ook altijd gedacht, tot ik las dat uit blindsmaktesten telkens weer blijkt dat mensen het verschil niet proeven tussen een industriële kastomaat en een tomaat, die biologisch is geteeld op koude grond.”

Elders schreef Pam in dezelfde column *“Vroeger is tricky business”*. Daar is geld mee te verdienen.

Het voorgaande, de discussie met mijn vriend en de column van Pam, maakt duidelijk dat de werkelijkheid van de consument een andere is dan de natuurwetenschappelijke

werkelijkheid zoals ook de politieke, de maatschappelijke werkelijkheid een andere is dan de economische of de natuurwetenschappelijke werkelijkheid. Pam mag zich dan door de blindsmaktesten hebben laten overtuigen. Ik denk dat dit niet geldt voor de gemiddelde consument.

Het verschil tussen de natuurwetenschappelijke en de maatschappelijke werkelijkheid kwam onlangs scherp naar voren in Frankrijk. “L’Agence Française de sécurité sanitaire des aliments” (Afssa), de Franse voedselautoriteit, heeft op verzoek van de Franse regering onderzoek gedaan naar de gezondheidsaspecten van de transgene maïshybride MON 810².

Het instituut concludeerde op 23 januari van dit jaar dat er aan deze hybride geen enkel gezondheidsrisico verbonden was. Tot de publicatie in Le Figaro bleef het rapport geheim. Voor die geheimhouding was een simpele reden: de conclusies kwamen de Franse regering niet uit, zeker niet op het moment van de publicatie in Le Figaro. Enkele dagen na die publicatie zou de EU een bijeenkomst houden over de gezondheidsaspecten van deze hybride.

“Als veredeling al niet ‘klassiek’ was zou het ongetwijfeld verboden worden.”

Waarom is en blijft de Franse regering tegen de toelating van deze hybride? Tussen de regering en een aantal maatschappelijke organisaties is “Le Grenelle de l’environnement” gesloten: een pact over het milieu³. Bij zo’n overeenkomst moet iedereen aan tafel wat krijgen. De Franse regering was er veel aan gelegen om de industrie rond kernenergie (bouw en exploitatie van centrales), de bloem, de “fluron” van de Franse industrie aldus Le Figaro, ongeschonden door het pact te slepen. “Voor wat, hoort wat” en dus kregen de “alternatieven” de verzekering dat de maïshybride MON 810 verboden zou blijven. “De experts” zo eindigt het laatst geciteerde artikel in Le Figaro, “hebben hun werk gedaan

COLUMN

buiten het zicht van de lobbies. Aan de politiek is het nu de beurt om niet te wijken voor de “demagogie”.

Niet gezondheidsrisico's maar milieurisico's zijn nu de redenen waarom de Franse regering zich verzet tegen het vrijgeven van de teelt van deze hybride. Het “voorzorgbegin-sel” is van stal gehaald en daarmee is alles tegen te houden. Een aantal lidstaten van de EU heeft zich gehaast om bij het Franse standpunt aan te sluiten.

Uit het voorbeeld blijkt, dat het natuurwetenschappelijke wereldbeeld één wereldbeeld is. De politieke of maatschappelijke werkelijkheid kan daar van afwijken. Dat laatste wereldbeeld geeft de doorslag in de politiek.

Ook cisgenese, met risico's die binnen de klassieke veredeling blijven⁴, wordt met het voorzorgprincipe tegengehouden. Als veredeling al niet ‘klassiek’ was zou het ongetwijfeld verboden worden.” Het stemt misschien droef, maar het is wel waar.

Referenties

- ¹ Pam, M., 2009. Vroeger smaakte kip ook niet naar kip. De Volkskrant, 12-02.
- ² Mennessier, M. & M. Perez, 2009. Le maÔs OGM est sans danger pour l'homme, selon l'Afssa. Le Figaro 12-02.
- ³ Thr ard, Y., 2009. Les OGM, une affaire très politiques. Le Figaro 12-02.
- ⁴ Anonymus, 2009. Gewasbescherming 40: 154.

COLUMN



*Gregor Mendel, grondlegger van de plantenveredeling.
Bron: Wikipedia.*

Get Involved with the PLANT MANAGEMENT NETWORK



The Royal Netherlands Society of Plant Pathology (KNPV) has partnered with the PLANT MANAGEMENT NETWORK (PMN), a nonprofit online publisher of applied plant science resources, in support of its mission: to enhance the health, management, and production of agricultural and horticultural crops.

We encourage you to get involved in this mission by submitting your manuscripts or subscribing to the PLANT MANAGEMENT NETWORK. PMN provides a peer-reviewed and page-charge free venue for applied crop protection and production information in its suite of peer-reviewed journals. This information is used by students, researchers, and practitioners focused on the applied end of the plant sciences. In 2008, nearly 360,000 individuals used PMN's suite of resources. Visit www.plantmanagementnetwork.org/call to learn more.

PMN also provides an added value for KNPV members: a discounted subscription to the Plant Management Network's resources, which include crop protection titles like *Plant Health Progress journal*, *Plant Disease Management Reports*, *Arthropod Management Tests*, *Crop Management journal*, *Forage and Grazinglands journal*, and *Applied Turfgrass Science journal*.

Collectively, PMN's resources offer hundreds of peer-reviewed articles, thousands of efficacy trials, and thousands more pages of useful applied information on agricultural and horticultural crops, forages, turfgrasses, and ornamentals.

KNPV members can access all 12 resources found on PMN's website at the discounted rate of just \$38 yearly. Visit www.knpv.org/en/menu/Plant_Management_Network for more information.



ADVERTENTIE

Boeiende Workshop voor mbo-leerlingen

Mbo-leerlingen kun je boeien met virustoetsen in het lab en een lezing over het Tulpen Virus X. Maar het moet niet te theoretisch worden. PPO-onderzoekers zorgen voor een succesvolle workshop.

“De lezing over TVX was onwijs interessant,” is een van de reacties van de mbo-leerlingen uit Hoorn na afloop van de workshop diagnostiek. Een twintigtal mbo-leerlingen van het Clusius College, allen geïnteresseerd in de bollenteelt, namen op woensdag 13 mei deel aan een workshop diagnostiek. Onderzoekers van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving verzorgden lezingen en lieten leerlingen kennismaken met laboratoriumtechnieken

De leerlingen zijn praktisch ingesteld. Ze weten wat actueel is. Ze staan met beide benen in de bollenwereld. Omdat het Tulpen Virus X een hot item is, sluit dit aan bij hun belevingswereld. Ook zij hebben praktische vragen: Wat kun je doen om verspreiding van dit virus te voorkomen? Hoe vind je het virus? De TVX-lezing door viroloog Maarten de Kock beschouwden ze daarom als hoogtepunt van de dag.

Maar het programma bood meer: De leerlingen maakten kennis met een prototype van een slim apparaat dat de herbicidendosering aanpast op basis van kleurherkenning. Ze leerden hoe je een betrouwbare proef opzet: reproduceerbaar, meerdere proeven. En ze maakten kennis met virusdetectie in het laboratorium.

Docent Theo de Geus is enthousiast omdat het voor scholen normaal lastig is om duidelijk te maken hoe diagnostiek werkt. Hoe kun je bijvoorbeeld in een klas laten zien hoe een Elisa-toets werkt? “Natuurlijk zijn er wel filmpjes, maar dit werkt toch beter.”

Mbo-leerlingen zijn praktisch. Ze willen dingen zien en doen. Met lange theoretische inleidingen hebben ze wat meer moeite, maar zo gauw de link met de praktijk gelegd wordt, trek je hun interesse. Soms was een inleiding iets te lang en te moeilijk, maar het feit dat ze veel dingen zelf mochten doen, maakte de dag tot een succes.

Het is de bedoeling dat de workshop jaarlijks zal worden gegeven voor het Clusius College, als vast onderdeel van het curriculum. De workshop was een initiatief vanuit het project Kennisdoorstroming naar Groen Onderwijs (gefinancierd door het Ministerie van LNV) in samenwerking met het Clusius en de Stuurgroep Gewasbescherming van de AOC-Raad. Meer informatie: Gera van Os, PPO Bollen, Bomen & Fruit (e-mail: gera.vanos@wur.nl).

Het programmateam Plantgezondheid van de Groene Kenniscoöperatie stimuleert de samenwerking tussen onderzoek, onderwijs en ondernemers. Voor meer informatie kunt u contact opnemen met Barry Looman, trekker van het programmateam (info@plantgezondheid.nl). Meer informatie: www.plantgezondheid.nl of www.groenekenniscooperatie.nl.



Hoe herken je TVX? Hoe verspreidt het zich? Mbo-leerlingen maken kennis met virusdiagnostiek. Foto: Gera van Os (PPO)

Nieuws

Deze nieuwsrubriek brengt items over gewasbescherming die de redactie interessant vindt.

Belangrijke criteria voor plaatsing van het bericht zijn:

- het bericht moet relevant zijn voor de gewasbescherming,
- het mag geen reclameboodschap bevatten,
- het moet afkomstig zijn van een van de erkende agrarische nieuwsbrennende tijdschriften, kranten, nieuwsbrieven, internetsites of autoriteiten,
- het moet naspeurbaar zijn naar de oorspronkelijke bron, die waar mogelijk wordt weergegeven.

Opinies van individuen of belangenorganisaties en visies en andere interpretaties van actuele onderwerpen kunnen als citaat worden opgenomen mits de bron bekend is.

Van harte nodigen wij u uit nieuws-items bij de redactie aan te dragen.

Ziekte in kas meetbaar in lucht

De alarmstoffen die planten afgeven als ze worden aangetast, kun je meten in de lucht van een kas. Daarmee is een detectiesysteem te ontwerpen die de uitbraak van een ziekte of plaag in de kas op tijd vaststelt. Dat melden Wageningse bedrijfstechnologen en plantenfysiologen in *Annals of Applied Biology*.



De onderzoekers borduren voort op de vondst van Wageningse entomologen, dat planten die worden aangevreten door insecten signaalstoffen afgeven waarmee ze de natuurlijke vijand van dat insect lokken. In het nieuwe onderzoek werden tomatenplaten in een kas ontdaan van hun zijscheuten. De vrijkomende vluchtige alarmstoffen werden opgevangen en geanalyseerd, vertelt hoofdauteur ir. Roel Jansen.

De onderzoekers vonden drie groepen van vluchtige alarmstoffen. In de eerste plaats een groep van alcoholen die vrijkomen als het celmembraan van de plant beschadigd raakt, en ten tweede een groep van terpenen, olieachtige stoffen, die vrijkomen als de bladhaartjes van de planten worden aangetast. 'Interessante stoffen,' zegt Jansen, 'maar dit soort stoffen komen ook vrij als je de plant aanraakt of plukt. Dat is verwarrend, want je wilt weten wanneer een plant door een ziekteverwekker wordt aangetast.'

Gelukkig komt er nog een derde groep van hormoonstoffen vrij, bij de aantasting van planten door pathogenen en insecten, waaronder methylsalicylaat. De concentratie van deze stoffen in de lucht neemt toe bij vraat of aantasting, maar niet bij vruchtenplukken. 'Het zijn echte stresshormonen,' zegt Jansen.

'We weten nu welke stoffen vrijkomen bij vraat en plantenziekten en in welke concentratie,' vervolgt hij. Daarmee is de basis gelegd voor een sensor die de aantasting van planten in kassen registreert. Maar voor een fabrikant de sensor kan gaan bouwen, is verder onderzoek nodig. 'We gaan eerst opschalingsberekeningen doen,' zegt Jansen. 'We kennen nu de concentraties van alarmstoffen in een kleine kas van veertig vierkante meter. Maar wat gebeurt er als die kas tien of honderd keer zo groot is? Dat kunnen we modelmatig schatten, maar zo'n model bevat aannames. Daarom willen we opnieuw meten in een goed gecontroleerde praktijkkas, bijvoorbeeld bij Wageningen UR Glastuinbouw in Bleiswijk.'

Jansen voorziet vraag naar dit detectiesysteem. 'De richtlijnen voor gebruik van gewasbeschermingsmiddelen worden steeds strenger. Als je op tijd een plaag in de kas herkent, kun je met minder middelen toe. De trend in de tuinbouw is dat er minder kassen komen, maar wel veel grotere kassen. Door die schaalgrootte is de uitbraak en verspreiding van ziekten in de kas een groter risico voor de tuinders, terwijl ze vaak niet in staat zijn om zelf alle planten in de kas te controleren op ziekten en plagen. Daardoor ontstaat behoefte aan een automatisch alarmsysteem.'

Jansen is inmiddels vier jaar bezig met het onderzoek naar de detectie van alarmstoffen van planten in de kas. 'We zijn begonnen in het lab, met beschadigde plantenstukjes in kleine

NIEUWS

schaaltjes.' Over drie maanden hoopt hij op het onderwerp te promoveren bij de leerstoelgroep Agrarische bedrijfstechnologie. Hij voert zijn onderzoek uit in nauwe samenwerking met de leerstoelgroepen Plantenfysiologie en Organische Chemie in Wageningen en het Duitse onderzoekscentrum in Jülich, dat een faciliteit heeft voor metingen aan alarmstoffen onder zeer gecontroleerde omstandigheden.

Bron: Nieuwsbericht Wageningen UR, 11 juni 2009

Fundamenten voor bestrijding aardappelziekte worden zichtbaar

Oratie prof. Govers

De aardappelziekte, valse meeldauw, sudden oak death en een zalmziekte zijn het resultaat van een groep minuscule, maar vernietigende organismen, de Oömyceten, die door hun veranderlijkheid en massale aantallen de afweerstellingen van plant en dier weten te veroveren. Chemische middelen vormen veelal de enige, maar tegelijk ongewenste remedie. Welk duurzaam perspectief biedt toekomstig onderzoek tegen deze plagen en mislukte oogsten? In haar inaugurele rede bij de aanvaarding van het ambt van persoonlijk hoogleraar aan Wageningen Universiteit gaat prof.dr.ir. Francine Govers in op de sporadische openingen die de ziekteverwekkers hebben gelaten en een strategisch aanknopingspunt vormen voor hun bestrijding.



De één tot tweeduizend soorten tellende groep micro-organismen Oömyceten ('ei-schimmels') zijn geen schimmels. Zelfs schimmels (en paddenstoelen) zijn meer verwant aan de mens dan aan deze eencellige organismen. Hun effect echter op gewassen en dieren is desastreuus, zoals ondermeer blijkt uit de aardappelziekte die in

1845 via België Europa binnenkwam en na een snelle opmars de Grote Ierse Hongersnood veroorzaakte.

In haar inaugurale rede 'Dynamische ziekteverwekkers, wat we (willen) weten over oömyceten' gaat prof. Francine Govers in op het beperkte aantal strategieën dat voorhanden is om de ziekteverwekker, *Phytophthora infestans* ('de plantvernietiger'), de baas te blijven. Deze aanpak biedt tegelijk een kans om de hoeveelheid bestrijdingsmiddelen die bij aardappelen per hectare het hoogst is, te reduceren.

Het strijdtoneel speelt zich af op microscopische schaal, waar de ziekteverwekker zich een weg probeert te banen door de biologische verdedigingslinie van de gastheer, de aardappelplant. Met een speciale groep van eiwitten, de RXLR-effectoren attaqueert *Phytophthora* de plant. Het aanvalsarsenaal is groot en divers. *Phytophthora* beschikt over een assortiment van wel 560 RXLR-effectoren, zodat de kans groot is dat een geschikt wapen de plantendefensie doorbreekt. Bij een geslaagde aanval slaan de effectoren een bres in de verdediging door de afweer van de plant te onderdrukken. Daardoor is de weg vrij voor sporen van *P. infestans* die zich vervolgens te goed doen aan voedingsstoffen en zich te vermenigvuldigen, met de dood van de plant tot gevolg. Wilde aardappelplanten zoals die in Zuid-Amerika voorkomen, zijn redelijk bestand tegen zulke aanvallen. Aardappel resistentie-eiwitten herkennen de indringers en blokkeren de opmars.

Via onderzoek, onder meer in Wageningen, zijn inmiddels meer dan tien resistentiegenen - die de resistentie-eiwitten aanmaken - geïdentificeerd. Van zeven is de bijbehorende RXLR-effector bekend. Als de herkenning niet 100% is, bijvoorbeeld doordat de RXLR-effector er net iets anders uitziet, ontsnapt de indringer en kan zich alsnog vermenigvuldigen. Zo weet de ziekteverwekker de uit wilde rassen ingekruiste resistentie na enige jaren te doorbreken.

Voorspellen

Fytopathologen proberen meer grip te krijgen op de interactie. De uitdaging is om te voorspellen of een aangetroffen stam een perceel met een resistent aardappelcultivar zal aantasten. Door monsters te nemen is met een DNA-chip te bepalen welke stammen er in het

veld rondzweven, en hoe hun RXRL arsenaal eruit ziet, zodat vervolgens is vast te stellen welke aardappelcultivars geen last zullen ondervinden van *Phytophthora* en welke wel. Alleen in het laatste geval is spuiten nodig. Wanneer deze werkwijze operatief zal zijn hangt volgens prof. Govers af van de snelheid waarmee we nieuwe combinaties van resistentiegenen en RXLR-effectoren met al zijn varianten, kunnen identificeren.

Om niet op één paard te wedden richten onderzoekers zich ook op de zwakke schakels in de levenscyclus van *Phytophthora* en de genetische eigenschappen die uitsluitend bij oömyceten voorkomen. Zo is vastgesteld dat van een bepaald enzym, fosfolipase D, unieke vormen voorkomen in oömyceten. Juist deze vormen zijn ideale aangrijpingspunten voor de bestrijding omdat de specifieke remming ervan geen direct effect heeft op alle andere, nuttige organismen inclusief het gewas zelf.

Tenslotte wijst prof. Govers op een vorm van biologische bestrijding. Bodembacteriën van het geslacht *Pseudomonas* belagen de sporen van *Phytophthora*. De bodembacterie benut daarvoor een speciaal klein eiwit. De vraag is hoe dit eiwit de sporen kapot maakt. Door vijftienduizend genen van *Phytophthora* te analyseren zijn kandidaten naar voren gekomen die mogelijk ook nieuwe specifieke aangrijpingspunten vormen.

Bron: Nieuwsbericht Wageningen UR, 11 juni 2009

Infectiekans aardbei door *Xanthomonas fragariae* in grond gering

De kans dat een aardbeienplant via de grond door de bacterie *Xanthomonas fragariae* besmet raakt is gering. Om infecties vanuit de grond te voorkomen, lijkt het dus voldoende om op een besmet perceel 2 jaar geen aardbeien te telen. Dat blijkt uit onderzoek van Plant Research International (PRI), onderdeel van Wageningen UR.

De zeer besmettelijke bacterie *Xanthomonas fragariae* veroorzaakt bij aardbeiplanten de bacteriebladvlekkenziekte, die kan leiden tot grote problemen in de aardbeivermeerdering. Om verspreiding van deze quarantaineziekte te voorkomen, wordt een aangetast gewas doodgespoten met onkruidbestrijdingsmiddel en verbrand of ondergewerkt om de vertering te bevorderen. In het laatste geval mag een teler 2 jaar geen aardbeien telen op het betreffende perceel.

Uit onderzoek van PRI blijkt dat *Xanthomonas fragariae* slecht overleeft in besmette, ondergewerkte gewasresten. Met een gevoelige PCR-techniek werd de bacterie na 6 maanden slechts in één van de 16 onderzochte monsters gevonden. Ook is er nauwelijks bacterieoverdracht vanuit besmette gewasresten in de grond naar schone planten. Om infecties vanuit de grond te voorkomen, lijkt het dus voldoende om op een besmet perceel twee jaar geen aardbeien te telen.

Zie voor meer informatie het rapport 'Effect van loofdoodmiddel op de overleving van *Xanthomonas fragariae* in ondergewerkte gewasresten van aardbei' op de site van Kennisonline.

Bron: Kennisonline - Wageningen UR, 9 juni 2009

Onduidelijkheid over openbaarmaking gegevens bestrijdingsmiddelen

Het College van Beroep voor het bedrijfsleven vraagt het Europese Hof van Justitie om uitleg van de wetsregels op het gebied van openbaarmaking van informatie over bestrijdingsmiddelen.

Aanleiding is een zaak die de Stichting Natuur en Milieu (SNM), Vereniging Milieudefensie en de Vereniging Goede Waar & Co hebben aangespannen tegen het College voor de toelating van gewasbeschermingsmiddelen en Biociden (Ctgb).

De milieuorganisaties willen inzicht in de hoeveelheid van het middel propamocarb die in en op sla aanwezig mag zijn. Het ministerie van volksgezondheid heeft hiervoor een norm vastgesteld op basis van gegevens die door de fabrikant van het middel zijn verstrekt, voor de toelating van het middel.

Via de Wet Openbaarheid Bestuur (WOB) hebben milieuorganisaties bij het Ctgb openbaarheid gevraagd van deze gegevens. Het Ctgb heeft dit verzoek afgewezen op basis van de Bestrijdingsmiddelenwet. De gegevens zijn volgens het Ctgb bedrijfsgeheim en hoeven daardoor niet openbaar gemaakt te worden. De milieuorganisaties hebben dit aangevochten bij het CBB, maar de College kon hierover geen uitspraak doen. Het CBB vraagt advies aan het Europese Hof.

Bron: Agrarisch Dagblad, 9 juni 2009

Genetische modificatie maakte ongelukkige start

De discussie over gengewassen is vastgelopen in een patstelling doordat de ontwikkeling ongelukkig is begonnen met soja die resistent is tegen een onkruidbestrijdingsmiddel. Dat zei prof. dr. Louise Fresco op een seminar van het ministerie van LNV over genetische modificatie.

“Een historische en dubbele fout”, aldus Fresco, als hoogleraar duurzame ontwikkeling verbonden aan de Universiteit van Amsterdam. Modificatie ligt slecht bij het publiek, en bestrijdingsmiddelen ook. Ze verweet de wetenschap het nut van gensoja slecht te hebben gecommuniceerd. “Als genetische modificatie was begonnen met tarwe die de mens beschermt tegen maagkanker was de acceptatie veel groter geweest”, betoogde ze. Dat deze gewassen worden ontwikkeld door grote ondernemingen vergroot volgens haar de acceptatie ook niet echt.

Fresco hield een genuanceerd betoog waarin ze zich niet categorisch voor of tegen gemodificeerde gewassen uitsprak. Ze vindt dat bij iedere specifieke toepassing steeds opnieuw naar de specifieke voor- en nadelen moet worden gekeken.

Bron: Boerderij, 9 juni 2009

Waardplantrelaties geel bietencystenaaltjes voor groenbemesters onderzocht

De bladrammenas- en gele mosterdrassen die resistent zijn tegen het witte bietencystenaaltje lijken dit ook te zijn tegen het geel bietencystenaaltje. Een teler kan beter geen bladkool of koolzaad zaaien na de teelt van maïs als het perceel besmet is met het geel bietencystenaaltje. Er kan dan beter gekozen worden voor bladrammenas ‘Corporal’ of ‘Terranova’ of gele mosterd ‘Achilles’ of ‘Abraham’. Dat blijkt uit onderzoek door het IRS.

Op zand- en lösspercelen is het voor telers sinds 2006 verplicht om na de teelt van maïs een groenbemester te zaaien. De verwachting is dat het probleem van het geel bietencystenaaltje groter zal worden op zandgronden wanneer telers niet de juiste groenbemester kiezen. Doel van dit onderzoek was de waardplantstatus van diverse groenbemesters voor het geel bietencystenaaltje vast te stellen. Om dit te kunnen vaststellen is een klimaatkamertoets

uitgevoerd, waarbij het aantal gevormde cysten op de wortels is geteld. Daarnaast is een veldproef uitgevoerd om de vermeerdering in het veld voor de diverse gewassen vast te stellen.

Biet, bladkool, vatbare bladrammenas ‘Siletta Nova’, vatbare gele mosterd ‘Gisilba’ en koolzaad vermeerderen het geel bietencystenaaltje sterk. Perzische klaver vermeerdert het aaltje matig. Alexandrijnse klaver vermeerdert het aaltje slecht en de resistente bladrammenasrassen ‘Corporal’ en ‘Terranova’ en gele mosterd ‘Achilles’ en ‘Abraham’ vermeerderen het geel bietencystenaaltje niet. Voor stamslabonen en voederwikke kunnen uit deze resultaten geen conclusies worden getrokken.

Zie voor meer informatie het rapport ‘Waardplantrelaties geel bietencystenaaltjes voor groenbemesters’ op de site van het IRS.

Bron: IRS, 9 juni 2009

‘Biologische bestrijders halen vaak de markt niet’

Veel biologische bestrijdingsmiddelen komen niet op de markt omdat er geen patent voor te verkrijgen valt. Volgens Jolanda Wijsmuller, manager geïntegreerde teelt bij Bayer CropScience, zijn er wereldwijd honderden veelbelovende middelen bekend waarover universiteiten al gepubliceerd hebben. Daar valt dan geen patent meer voor aan te vragen. Bayer doet daarom pogingen om afspraken te maken met universiteiten in en buiten Europa om nieuwe middelen met veel potentie toch op de markt te kunnen brengen.

Bayer voorziet dat er in de toekomst meer natuurlijke bestrijders nodig zijn, omdat de emissie- en residu-eisen steeds strenger worden. Het concern meent dat Nederland een pioniersland kan zijn als het gaat om biologische bestrijding.

Bron: Agrarisch Dagblad, 9 juni 2009

Komkommerbontvirus: steeds groter probleem

In Nederland, maar ook in andere Europese landen, nemen de problemen met het komkommerbontvirus toe. De virusdruk wordt merkbaar groter voor telers en een steeds groter wordende groep zet geen tweede komkommerteelt maar een zomerteelt tomaat.

Behalve dat de hevigheid waarmee het virus toeslaat toeneemt, lijkt ook het moment waarop het virus zich openbaart te vervroegen. De druk neemt op meerdere fronten toe. Daarbij neemt het aantal bedrijven dat eerder geïnfecteerd wordt toe. Niet alleen in Nederland wordt de virusdruk groter, maar ook in Scandinavië, Duitsland en Oostenrijk zijn de problemen met het virus steeds groot. Volgens teeltdeskundigen is de impact van het komkommerbontvirus inmiddels te vergelijken met het pepinomozaïekvirus in tomaat.

Telers kunnen het virus alleen beheersen door hygiëneprotocollen consequent toe te passen.

Bron: *Groenten en fruit*, 8 juni 2009

Nog veel onduidelijkheden *E. coli* in groente

Nieuwe inzichten in het vóórkomen van schadelijke *E. coli*-bacteriën in verse groente roepen vragen op over de huidige steekproefmethodes.

Volgens een literatuurstudie van het Rikilt uit Wageningen moet mogelijk op een andere manier gezocht worden naar ziekteverwekkers als *E. coli* 0157. Nu wordt vooral gekeken naar indicatoren voor de aanwezigheid van schadelijke *E. coli*, maar deze blijken veelal tot de normale microflora van de plant te behoren.

Volgens de onderzoekers is het lastig besmetting aan te tonen op het teeltbedrijf, omdat de schadelijke bacterie zeldzaam is. Gemiddeld wordt per hectare één krop sla aangetroffen met schadelijke *E. coli*-aantasting. Van Nederlandse bodem komen dus jaarlijks vijfhonderd besmette kroppen. Door het steeds vaker verwerken van sla en kruisbesmetting via snijmachines kunnen de gevolgen echter groter zijn.

Die besmetting vindt veelal plaats via dierlijke mest. De risico's zijn wel kleiner bij gebruik van oude en vooral vaste mest. In het Verenigd Koninkrijk geldt daarom een zaaiwachttijd van 6 maanden na bemesting, maar dat is niet realistisch in Nederland stelt het Rikilt.

Omstandigheden na oogst

Ook over de ideale omstandigheden na de oogst lijken de opvattingen te verschuiven. In verpakkingen waarin verwerkte sla lang houdbaar is blijken de schadelijke bacteriën

goed te overleven en bij lage temperatuur zijn de bacteriën actiever, zo blijkt uit onderzoek.

Besmette groente heeft vooral in het buitenland veel aandacht gehad van onderzoekers. De cijfers wijzen dat ook uit. In de Verenigde Staten had verse groente over de periode 1990 tot 2004 het grootste aandeel in het totaal aantal voedselvergiftigingen en het hoogste aantal ziektegevallen per uitbraak. Daarmee leidde verse groente tot meer problemen dan vlees of vis.

In Nederland vond in 2007 een forse uitbraak plaats, waarbij 41 mensen betrokken waren. Ook in Nederland richt het *E. coli*-onderzoek zich meer op groente. De nadruk van onderzoek van Voedsel- en Warenautoriteit (VWA) ligt op vlees, maar in de steekproef zit steeds vaker ook groente.

Bron: *Agrarisch Dagblad*, 5 juni 2009

Roofmijten automatisch uitzetten in groenteteelt

Nic Sosef en Biobest hebben samen het Biobolo-systeem, een automatisch uitzetsysteem voor roofmijten in de sierteelt, doorontwikkeld zodat het systeem ook in opgaande vruchtgroentegewassen gebruikt kan worden.

De biobolo is een automatische roofmijtdispenser die met een ronddraaiende beweging de roofmijten en hun draagstof verdeelt over het gewas. De roofmijten worden ingezet tegen spint en trips. De biobolo werd al gebruikt in de sierteelt, maar moest voor de groenteteelt aangepast worden. Gert Jan Dillo, hoofd afdeling biologie van Nic Sosef: "De eerste biobolo was gemaakt om over het gewas heen de roofmijten uit te spreiden. Bij opgaande glasgroentengewassen is dat moeilijk, ook vanwege de touwtjes die er zitten." Het systeem is daarom aangepast; de roofmijten worden met een lichte luchtondersteuning het gewas ingebracht en de biobolo kan naar links en naar rechts bewegen. Hierdoor worden de roofmijten vanaf de zijkant aangebracht in pakweg de bovenste veertig centimeter van de plant.

Het systeem kan op een buisrailwagen gemonteerd worden, maar kan bijvoorbeeld ook op een spuitrobot gezet worden. In een paprika met een V-systeem, kan de biobolo om elk pad ingezet worden. In de paprika- en

komkommerteelt zal de biobolo elk pad in moeten. Het gebruik van een biobolo kan tot zeventig procent arbeid besparen, aldus Dillo. De biobolo wordt nu door drie paprikatelers gebruikt.

Bron: *Groenten en Fruit*, 4 juni 2009

Bestrijding van Topazvlekken is mogelijk met biologisch middel

In 2007 werden sommige telers van het appelras Topaz voor het eerst geconfronteerd met de ziekte 'Topazvlekken'. Aangezien Topaz een belangrijk ras is voor de ontwikkeling van de biologische fruitteelt in Nederland is in 2008 door Wageningen UR op een biologische fruitteeltbedrijf onderzoek gedaan naar de determinatie en bestrijding van deze ziekte. Zwavel is de remedie.

Zwavel is toegelaten in de biologische teelt. Met dit middel kan de ziekte bestreden worden; het percentage aangetaste vruchten vermindert hierbij van 15 naar 1%. De veroorzaker van de ziekte kon echter niet gedetermineerd worden.

Tot nu toe is er nog weinig bekend over de minimaal benodigde dosering voor zwavel, het minimaal aantal bespuitingen en de belangrijkste bestrijdingsmomenten. Het weglaten van de bespuitingen gedurende perioden van drie tot zes weken in de periode 1 april tot 15 juli leidde niet tot duidelijke toename van de aantasting. Wel bleek dat bestrijding vóór 15 juli moet plaats vinden. Het lijkt er op dat met de reductie in het aantal bespuitingen, dat met schurftresistente appelrassen gerealiseerd wordt, een grens bereikt is waarbij andere relatief onbekende ziektes gaan optreden. De ziekte



Foto: PPO Fruit Randwijk

'Topazvlekken' was al eerder gesignaleerd in volledig onbespoten boomgaarden. De sterke toename in 2007 bij Topaz in de biologische boomgaarden kan te maken hebben met het relatief droge voorjaar in dat jaar, waardoor er minder met zwavel tegen schurft gespoten is.

Bron: *BioKennis*, Wageningen UR, 4 juni 2009

Spinselmot

Op diverse plaatsen in Nederland komen massaal rupsen voor van spinselmotten (*Yponomeuta*-soorten), ook wel stippelmotten genoemd. Wanneer er geen voedsel meer te vinden is, gaan zij op zoek waarbij ze een plakkerig spinsel maken die hele bomen, stoepen, auto's, bankjes, grafstenen en speeltoestellen kunnen bedekken.

De rupsen zijn onschadelijk voor de gezondheid in tegenstelling tot de rupsen van eikenprocessierups. In juni verpoppen de rupsen zich en in de periode juli en augustus komen er witte zwartgestippelde vlindertjes van twee cm groot te voorschijn. Kaalgevreten bomen produceren doorgaans nieuw blad en ondervinden geen schade van de vraat, als deze incidenteel voorkomt.

Nieuwsbericht Plantenziektenkundige Dienst, 29 mei 2009

Meer geld voor onderzoek naar bijen
Om de komende drie jaar goed onderzoek naar het wel en wee van de honingbij te kunnen doen, reserveert minister Gerda Verburg (LNV) een miljoen euro.

Verburg wil zo meer informatie verzamelen over de bijensterfte en bijenhouderij, want betrouwbare gegevens ontbreken nu volgens haar. Het geld is een aanvulling op de 170.000 euro die elk jaar al gaat naar onderzoek naar de varroa-mijt en de parasiet *Nosema ceranae* die als 'bedreiging nummer een' worden gezien, zo maakte het ministerie van LNV vandaag bekend. Maar ook het verminderende aantal foerageerplekken door de intensieve landbouw, het gebruik van bestrijdingsmiddelen en de aanwezigheid van de mens hebben effect op de bijenpopulatie.

Verburg wijst er tevens op dat ook de vergrijzing onder hobbyimkers meespeelt. "Het aantal imkers loopt al enige jaren terug, terwijl er nauwelijks jonge, vakbekwame

bijhouders bij komen.” In de Tweede Kamer stelde de minister eerder al dat er wel meer bijenvolken lijken dood te gaan dan vroeger, maar dat dit geen reden voor paniek was.

Bron: ANP, 29 mei 2009

Onkruidreductie met compost biedt perspectief

Het aanbrengen van compost direct na het zaaien op een gezaaide rij geeft een goede onkruidonderdrukking indien alles goed wordt uitgevoerd. Dat meldt Pieter Bleeker van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving (PPO) van Wageningen UR. In hoeverre het lichtdicht maken van de zaaiunit de onkruidonderdrukking heeft versterkt is moeilijk aan te geven. In de met de hand aangelegde proeven bleek de onkruidonderdrukking net zo goed te zijn.

Om snel en een breder beeld te krijgen van de mogelijkheden van het gebruik van compost voor onkruidonderdrukking werden in 2007 twee proeven in wortelen aangelegd en in 2008 proeven in prei voor plantenopkweek en in zaaiuien. De opkomst van de meeste gewassen was met een laagje compost beter dan zonder compost. Alleen bij de preiteelt voor opkweek van planten was de opkomst lager. Het is onduidelijk of dit door de compost kwam of door het met de hand aanleggen van de proef.

Het grootste probleem is nog altijd de manier van opbrengen van de compost. In 2007 is een oude lelieplantmachine omgebouwd tot een machine die in staat is om de zwarte grond goed te verdelen en in dezelfde werkgang voor het aanbrengen van de zwarte grond te zaaien. Maar het vlak maken van de grond tussen de gezaaide rijen moet beter. Door het beregenen om een goede opkomst van de uien te bevorderen, spoelde grond die tussen de rijen lag op de compost. Onkruidzaden die in deze grond aanwezig waren konden toen alsnog gaan kiemen waardoor het gewenste effect dit jaar lager was dan in voorgaande jaren.

De in 2008 gebouwde nieuwe machine werkt veel beter. De kwaliteit van de compost is nog een punt van aandacht; voldoende fijn en droog zijn twee belangrijke eigenschappen die nodig zijn voor een goede werking van de machine.

Bron: BioKennis, Wageningen UR, 28 mei 2009

IRS: aandeel bietencystenaaltjes-resistente rassen bijna verdubbeld

De definitieve suikerbietenzaadbestellingen zijn bekend. Het aandeel van de bietencystenaaltjesresistente rassen steeg van 6,8 naar 13,1%. Binnen dit segment is vooral het nieuwe ras Theresa KWS besteld. Het aandeel rhizoctoniairesistente rassen nam toe van 17,7 naar 18,6%. Bij deze rassen heeft Piranha met 12,8% het hoogste aandeel.

De nieuwkomer Emilia KWS is met 20,9% het meest bestelde ras. De toprassen van vorig jaar, Shakira en Coyote zijn op hun retour. Hun aandeel komt uit op 17,2% respectievelijk 13,4%. Het totale marktaandeel van de nieuwe rassen is 36,6%.

Het aandeel rassen met een hoog suikergehalte is toegenomen van 44,5% naar 56,5%. Dit ging vooral ten koste van de rassen met een middelmatig gehalte. Ook dit jaar is er een aantal rassen besteld die het derde jaar van het rassenonderzoek nog moeten afronden. Het totale marktaandeel van deze rassen is echter minder dan 1%. Zie voor een overzicht de site van het IRS.

Bron: Nieuwsbrief IRS, 28 mei 2005

Speciale tipkaart virus in komkommer Wageningen UR Glastuinbouw heeft een tipkaart voor de komkommerteelt uitgebracht.

De tipkaart is bestemd voor telers en geeft tips om de verspreiding van virussen in komkommers tegen te gaan. Omdat het komkommerbontvirus de meeste problemen geeft in de Nederlandse komkommerteelt, zijn de tips er vooral op gericht om dit virus te voorkomen of tegen te gaan. Dit virus is mechanisch overdraagbaar en wordt op vele manieren verspreid, onder andere door gewashandelingen of via besmette materialen en gewasresten. De hygiënemaatregelen zijn noodzakelijk, want chemische en biologische bestrijdingsmiddelen ontbreken en resistente komkommerrassen zijn niet beschikbaar.

In de tipkaart staan de symptomen op een rij, de manieren waarop het virus zich verspreidt en de hygiënemaatregelen die een teler zou moeten treffen. De tipkaart is een bondige uitgave van het hygiëneprotocol komkommer.

Bron: Groenten en Fruit, 28 mei 2009

Formaline-verbod gaat problemen geven

Formaline (formaldehyde) mag tijdens de teeltwisseling van groentegewassen in kassen niet meer gebruikt worden. Het middel werd veel ingezet na een tomaten-, paprika- en komkommerteelt om zo de kas te reinigen en te ontsmetten voordat er een nieuwe teelt ingaat.

Al een paar jaar hing het verbod op formaldehyde de glasgroentetelers boven het hoofd, maar nu is het dan een feit, aldus LTO Groeiservice. Er zijn wel alternatieven voor Formaline, zoals waterstofperoxide en perazijnzuur, maar Formaline is makkelijker om mee te werken en telers vinden dat Formaline beter werkt. Daarom wil LTO Groeiservice samen met andere sectoren proberen het middel terug te krijgen als biocide. 'Het middel is namelijk heel belangrijk voor telers zodat zij schoon met een nieuwe teelt kunnen beginnen.'

Goedkoper en beter

Volgens Saskia Stricker van LTO Groeiservice zal het verbod problemen opleveren bij tomaten- en paprikateelt, maar met name bij de komkommerteelt. "Zij hebben het middel vaak hard nodig vanwege de ziektedruk." Het voordeel van Formaline is dat het middel alles doodt wat nog leeft en het heeft een goede dampwerking waardoor het goed in de kieren van de kas doordringt. Ook is het middel goedkoper dan de alternatieve middelen. Dat laatste zegt ook Marcel van Veldhoven, directeur van een machinaal loonbedrijf in De Lier. Volgens hem wordt Formaline zelfs door glasgroentetelers het meest gebruikt als ontsmettingsmiddel. "Het is een relatief goedkoop middel en er worden altijd goede resultaten mee gehaald." Volgens hem is het gebruik van het middel door telers in de loop der jaren verminderd, maar wordt er de laatste twee jaar vanwege de groeiende problemen met ziekten juist weer door telers graag gebruik van gemaakt.

Bron: Groenten en Fruit, 27 mei 2009

Ctgb liet vorig jaar 42 nieuwe gewasbeschermingsmiddelen toe. Eind 2008 stonden in Nederland 699 toegelaten gewasbeschermingsmiddelen op basis van 226 verschillende werkzame stoffen geregistreerd. Daarvan zijn er 42 op basis van nieuwe aanvragen in 2008 toegelaten. Voor de biociden bestaat het

pakket toegelaten middelen uit 799 biociden op basis van 79 werkzame stoffen. Voor 56 middelen is in 2008 een nieuwe aanvraag ingediend. Dat meldt het College voor toelating van gewasbeschermingsmiddelen en biociden (Ctgb) in het jaarverslag over 2008.

In totaal waren er 56 toelatingen van nieuwe gewasbeschermingsmiddelen in 2008. Voor 1 product ging het om een wederzijdse erkenning en voor 13 middelen betrof het een herregistratie. Het Ctgb gaf voor 372 producten een proefonthefing. Daarnaast kregen 64 middelen de status van een dringend vereiste toelating, hetgeen betekent dat ze de gedurende een bepaalde periode in een specifiek gewas toegepast mochten worden om bepaalde onkruiden, insecten of een specifieke ziekteverwekker te kunnen bestrijden. Het Jaarverslag 2008 en het werkplan 2009 van het Ctgb is te vinden op de website van de organisatie.

Bron: Ctgb, 26 mei 2009

Veredelingsprogramma Biologische aardappelen van start

De biologische aardappelteelt onder druk. Dit heeft te maken met de aardappelziekte Phytophthora en het ontbreken van geschikte rassen die voldoende opbrengst en kwaliteit leveren. Binnen het project Bio-Impuls, het ketenprogramma voor de biologische aardappelteelt in Nederland, start daarom dit jaar het veredelingsprogramma voor de biologische aardappel.

In het veredelingsprogramma wordt de expertise van biologische aardappeltelers, kwekers en onderzoekers van Wageningen UR en Louis Bolk Instituut samengebracht. Het unieke Nederlandse hobbykweekstelsel neemt hierin een centrale rol in. Inmiddels zijn de aardappelen op meerdere proefvelden en locaties gepoot.

Het programma kent drie parallel lopende trajecten:

- 1 Door het aanbieden van aardappelveredelingscursussen en begeleiding wordt het aantal biologische boerenkwekers vergroot. Daardoor kan in een groter aantal kloontjes geselecteerd worden en wordt de kans op een goede stroom van adequate rassen voor de biologische teelt op korte termijn vergroot.

- 2 Voor de middellange termijn wordt reeds beschikbaar 'half-materiaal' opgewerkt tot geschikt basismateriaal (geniteurs)
- 3 Voor de lange termijn worden nieuwe resistentiegenen ingekruist in cultuurmateriaal. De verwachting is dat dit de genetische basis voor kruisingsouders verbreedt en dat er meer resistentiegenen kunnen worden ingekruist.

Bron: BioKennis, Wageningen UR, 26 mei 2009

Overheid steunt bestrijding Erwinia in pootgoed

Het ministerie van landbouw betaalt mee aan het Deltaplan Erwinia. Het plan is bedoeld om de bacterieziekte Erwinia te bestrijden in de teelt van pootaardappelen.

Het is nog niet duidelijk hoeveel het ministerie gaat bijdragen, zegt Joris van Waes, voorzitter van de LTO-werkgroep Pootaardappelen. "Er gaan wat verschuivingen plaatsvinden in het deltaplan. We zijn erg blij dat het ministerie gaat bijdragen aan de bestrijding van Erwinia".

Uit een studie vorig jaar van het onderzoeksinstituut LEI-WUR blijkt dat Erwinia van 2003 tot en met 2007 de pootgoedtelers gemiddeld 12 miljoen euro per jaar heeft gekost. Voor de handelshuizen komt de schade op 5 miljoen euro.

Het Deltaplan Erwinia bestaat uit drie delen, zegt Van Waes. "Het eerste deel betreft fundamenteel onderzoek naar Erwinia. Het tweede deel is een mengeling van fundamenteel en toegepast onderzoek. Het derde deel is het veldonderzoek, dat wordt gefinancierd door LTO, NAO (aardappelhandel) en de KAVB (bollentelers). Dit deel is dit jaar gestart."

Er is met het ministerie afgesproken dat het tweede deel van het plan wordt verschoven naar het eerste en het derde deel. Van Waes: "We moeten nog overleggen hoe we dat gaan doen. Daarom starten het eerste en het tweede deel van het deltaplan volgend jaar. Het betekent wel dat de organisaties meer geld moeten uittrekken voor het veldonderzoek."

Het deltaplan loopt vier jaar. Hiervóór heeft de sector het vierjarige project 'Bacterievrij Pootgoed' uitgevoerd om te kijken hoe pootgoed besmet raakt. Het deltaplan is een vervolg. Van Waes: "De bestrijding is belangrijk. Erwinia

kost veel geld en we moeten voorkomen dat het imago van ons pootgoed beschadigd raakt."

Bron: Agrarisch Dagblad, 22 mei 2009

Aaltjesseizoen begint vroeger

Aaltjes zijn steeds vroeger in het voorjaar actief. Ze profiteren van de opwarming van het klimaat. Een proces dat zich ook ondergronds voltrekt. De bodemtemperatuur bereikt daardoor kort na de winter al het niveau waarop aaltjes actief worden. Zodoende is een vroeg begin van het aaltjesseizoen tegenwoordig meer regel dan uitzondering. Analyse van de nog korte meetreeksen van het weerstation van Wageningen Universiteit heeft dit aan het licht gebracht.

Bron: Boerderij, 22 mei 2009

Wageningen werkt aan schurftsensoren
Onderzoekers van Plant Research International en van Praktijkonderzoek Plant en Omgeving van Wageningen UR werken aan een sensor, die op fruitbomen schurft en echte meeldauw kan constateren. De sensor is gecombineerd met een apparaat die de aandoeningen gericht bestrijdt.

Onderzoekers hebben vandaag op een wetenschappelijke bijeenkomst over gewasbescherming in het Belgische Gent een toelichting gegeven op het onderzoek. Het doel is om de bestrijding van schurft heel gericht toe te passen, zodat het chemicaliëngebruik kan worden verminderd.

De sensor meet de weerkaatsing van licht en kan daardoor bepaalde aandoeningen herkennen. De robot kan direct de ziekte bestrijden door een lokale bespuiting.

Bron: Agrarisch Dagblad, 19 mei 2009

Kosten wegen zwaarst bij geïntegreerde gewasbescherming

De kosten zijn het belangrijkste argument voor akkerbouwers in de keuze voor geïntegreerde gewasbescherming. Dit speelt een grotere rol dan de milieubesparing die geïntegreerde gewasbescherming oplevert.

De stichting ter Bevordering van de Agrarische Bedrijfs- en Gebiedsontwikkeling heeft een driejarig onderzoek laten doen naar geïntegreerde gewasbescherming in de akkerbouw. Het onderzoek is uitgevoerd door DLV Plant, PPO,

Opticrop en het HLB. Er hebben zo'n negentig akkerbouwers verspreid over Nederland aan het project meegedaan.

Uit het project blijkt dat de kosten het belangrijkste argument zijn om een methode wel of niet toe te passen, belangrijker dan het milieuvoordeel. Akkerbouwers wijzen een methode vaak af omdat het onbekend is of omdat ze het risico te groot vinden. Van alle deelnemers is 47 procent een nieuwe geïntegreerde methode gaan toepassen sinds de start van het project in 2006. Maar ze doen dat pas als ze zeker weten dat de methode goed werkt. De eis van afnemers om milieuvriendelijk te werken speelt bij bijna geen enkele akkerbouwer een rol.

Grote verschillen

Volgens projectmanager Jacob Dogterom van DLV Plant zijn kennisoverdracht en demonstraties belangrijk om akkerbouwers te bewegen een andere methode toe te passen. "Het project is er gekomen omdat akkerbouwers meer wilden weten over geïntegreerde gewasbescherming. Maar zelfs dan valt het niet mee om vernieuwingen tot stand te brengen."

Dogterom noemt een aantal oorzaken. "Veel akkerbouwers zijn al nauwkeurig bezig met de gewasbescherming. Een nieuwe methode moet echt geld of tijd besparen willen ze overstappen en dat valt niet altijd mee bij de geïntegreerde gewasbescherming." Toch zijn er grote verschillen in het verbruik van gewasbeschermingsmiddelen per bedrijf, stelt Dogterom. "Dat komt vooral door de schaalgrootte. Een akkerbouwer met een grote oppervlakte gewassen kan zich geen fouten veroorloven in de gewasbescherming. Ook is er onder akkerbouwers verschil in risicobeleving."

Bron: Agrarisch Dagblad, 18 mei 2009

Kaalvraat eiken door meerdere soorten rupsen

Sinds een paar weken komen op veel plaatsen in Nederland grote aantallen rupsen voor in bomen en struiken. Vooral op eiken kan dit lokaal tot kaalvraat leiden. Op dit moment gaat het vooral om rupsen van de kleine wintervlinder (*Operophtera brumata*), de grote wintervlinder (*Erannis defoliaria*), andere spanrupsen zoals *Agriopsis aurantiaria*, rupsen van de voorjaarsuil (*Orthosia*-soorten) en verder nog rupsen van bladrollers, zoals de eikenbladroller (*Tortrix viridana*) en de groene knopbladroller (*Hedya nubiferana*).

Daarnaast zijn er ook veel larven van bladwespen aanwezig; deze lijken op rupsen en kunnen ook veel bladvraat veroorzaken. De eerste drie soorten rupsen (spanrupsen) zijn herkenbaar doordat ze in een boogje lopen. De bladrollers spinnen zich, in een rolletje, in de bladeren. Alle genoemde rupsen zijn 'kaal', dit in tegenstelling tot de eikenprocessierups die zeer harig is.

Mogelijk dat deze grote aantallen larven dit jaar massaal, en vooral ook tegelijkertijd, optreden vanwege de zeer koude winter (veel soorten zijn daardoor pas laat en tegelijkertijd actief geworden) in combinatie met het gunstige, vrij warme weer van de afgelopen twee maanden. De meeste rupsen zullen binnen enkele weken verdwijnen, omdat ze volgroeid zijn en zullen verpoppen. De overlast zal daarmee verdwijnen en de bomen en struiken zullen nieuw blad vormen. De meeste, gezonde, bomen en struiken zullen deze 'rupsen'-aanval dan ook prima overleven.

Bron: Nieuwsbericht Plantenziektenkundige Dienst, 19 mei 2009

Bijenkenmers in Wageningen geprikkeld Alleen de varroamijt is verantwoordelijk voor de massale bijensterfte die de laatste jaren optreedt.

Utrechtse wetenschappers die beweren dat de volken bezwijken aan het bestrijdingsmiddel imidacloprid, hebben het mis. Dat stelt bijendeskundige Tjeerd Blacquièr van Wageningen Universiteit. De wetenschapper reageert geprikkeld op uitspraken die twee weken geleden door 'Utrecht' zijn gedaan. Volgens Blacquièr is het te makkelijk om aan te nemen dat er een nieuw probleem is opgedoken dat veroorzaakt wordt door insecticiden. "Dat is voor de imkers ook makkelijk, want dan hebben ze tenminste niets fout gedaan."

De Wageningse deskundige blijft de aloude varroa aanwijzen als schuldige. Volgens hem zijn imkers niet voldoende geschoold om deze uiterst lastige plaag afdoende te bestrijden. Volgens de wetenschappers van de Universiteit Utrecht wordt er de laatste jaren zeer soepel omgegaan met imidacloprid, een bestrijdingsmiddel voor groenten als boerenkool en prei. Dit middel verstoort het navigatievermogen van bijen, die daardoor de korf niet meer kunnen vinden. De Utrechters pleiten voor een verbod, zoals dat al in Duitsland, Slovenië en Italië zou gelden.

Blacquièrè bestrijdt dat zo'n verbod waar dan ook bestaat. Ook zijn er volgens hem 'best goede trucs' om de varroamijt aan te pakken. De Wageningse universiteit heeft volgens hem bij het ministerie van LNV een voorstel voor meer scholing en voorlichting ingediend.

Bron: ANP, 14 mei 2009

Onkruidbestrijding bij zaaiuien

In 2006, 2007 en 2008 hebben onderzoekers van PPO-AGV van Wageningen UR onderzocht wat de effecten zijn bij het zaaien van clusterpillen (met vijf tot zes uienzaden per pil) en van zaaien met een aangepaste zaaischijf, waardoor er zes zaden binnen drie centimeter werden gezaaid. Het eerste onderzoek werd gefinancierd door de Stichting Proefbedrijven Flevoland. Het vervolgonderzoek is gefinancierd door LNV.

Onkruidbestrijding in de biologische teelt van zaaiuien is een groot probleem. Mechanische onkruidbestrijding met intrarij-wieders (vinger- en torsiewieder) vraagt nog veel handwerk en volledig handwieden kan 100 tot 300 uur per ha vragen. Het zaaien van uien op clusters, in combinatie met een geavanceerd wieldsysteem kan bijdragen aan een lagere kostprijs van biologische zaaiuien een daarvoor de teelt meer rendabel maken.

Onder normale teeltomstandigheden staat een clustertje uien sneller vast in de grond dan een enkel uienplantje en kan er met een vinger- en/of een torsiewieder eerder en agressiever gewerkt kan worden. Met schoffel-apparatuur met nieuwe sensing-technieken waarmee de plaats van de plant goed bepaald kan worden en een goede intra-rij-wieder moet het aantal wieden tot beneden tien uur per hectare terug te brengen zijn.

De vrees dat bij clusterzaai de vorm van de uien niet rond genoeg is, omdat de uien zeer dicht bij elkaar staan, bleek ongegrond; er was geen verschil in bolvorm te zien bij de diverse zaaimethoden in de drie onderzoek-jaren.

Pillenzaai gaf een grotere compactheid van de clusters, dus minder spreiding van het aantal planten per cluster, dan zaaien met de zaaischijf. Een voordeel van pillenzaai is dat er stoffen (fungiciden, insecticiden en/of antagogenisten) aan de pil toegevoegd kunnen worden. In 2008 is pillenzaai bij twee zaaidiepten toegepast om vochttekort tijdens het kiemen te

voorkomen. Dieper zaaien bleek in deze proef minder verschillen in opbrengst te geven. De onderzoekers adviseren vervolgonderzoek te doen om het op clusters zaaien tot een betrouwbaar alternatief zaaisysteem uit te werken.

Bron: BioKennis, Wageningen UR, 14 mei 2009

Herkenning dreigende plaag via DNA-vingerafdruk

Een schadelijk organisme in ingevoerd plantgoed wordt in de toekomst herkend aan zijn genetische vingerafdruk.

Plant Research International van Wageningen UR coördineert een internationaal onderzoeksconsortium dat de komende jaren de genetische vingerafdrucken van de belangrijkste schadelijke organismen in kaart brengt. In het project - met de naam QBOL (Quarantaine-organismen Barcode Of Life) - worden de kenmerkende delen van de genetisch code van schimmels, virussen, bacteriën, aaltjes, insecten en fytoplasma's vastgelegd. Dat gebeurt aan de hand van de collecties die in vijftien verschillende landen zijn samengebracht.

De nieuwe methode van plaagherkenning kan in de plaats komen van de bestaande technieken, waarbij veel kennis nodig is van zowel plant als de eigenschappen van het schadelijke organisme. Als een snelle genetische vingerafdruk kan worden genomen van een verdacht organisme, kan aan de hand daarvan bepaald worden of de verdenking terecht is.

Volgens Plant Research International wordt het steeds belangrijker om schadelijke organismen te kunnen herkennen aan de genetische vingerafdruk. Dat heeft te maken met de toenemende handel in planten, en het daarmee samenhangende grotere risico op verspreiding van ziekten en plagen. Daarbij komt dat steeds minder mensen in staat zijn om schadelijke organismen te herkennen.

In de databank worden niet alleen de genetische vingerafdruk vastgelegd. Ook de uiterlijke en moleculaire eigenschappen van de verschillende organismen worden opgeslagen.

Bron: Agrarisch Dagblad, 7 mei 2009

Sector Tuinbouw en PD stellen hygiëneprotocol *Tuta absoluta* op

De sector Tuinbouw heeft in samenwerking met de PD een hygiëneprotocol voor het mineermotje *Tuta absoluta* opgesteld. Er is namelijk een reële kans op verspreiding van het motje vanuit sorteer- pakstations of opslagloodsen naar de tomatenteelt, vooral met het stijgen van de buitentemperaturen en de uitloop van het importseizoen van Zuid Europese tomaten. Deuren en ramen gesloten houden, het verantwoordelijk afvoeren van afval en het ophangen van feromoonvallen zijn de belangrijkste beheersmaatregelen. Deze maatregelen staan in de fact sheet 'Hygiëne maatregelen bij importeurs, sorteer- en pakstations om insleep *Tuta absoluta* te voorkomen'.

De PD heeft onlangs een risicoanalyse uitgevoerd en geconcludeerd dat er een gerede kans bestaat dat *Tuta absoluta* via de productstroom van Spaanse tomaten terecht kan komen in Nederland. Om er zeker van te zijn dat het motje niet in de Nederlandse kassen voorkomt, zijn de afgelopen weken op tachtig tomatenbedrijven feromoonvallen opgehangen. Omdat *Tuta absoluta* nog geen quarantainestatus heeft in de EU zullen bij het aantreffen vooralsnog geen maatregelen worden opgelegd. Ondanks de incidentele vondsten in sorteer- en pakstations is Nederland momenteel nog vrij van het organisme.

Bron: Nieuwsbericht PD, 6 mei 2009

Nieuwe EU eisen voor handel uit Portugal om verspreiding van het dennenhoutaaltje te voorkomen

Sinds begin 2009 is er een toenemend aantal onderscheppingen van verpakingshout, hout en schors, afkomstig uit Portugal, besmet met het dennenhoutaaltje. Op 24 april 2009 is de EU-wetgeving daarom aangescherpt om de verdere verspreiding van het dennenhoutaaltje *Bursaphelenchus xylophilus* vanuit Portugal naar andere delen van de EU te voorkómen. Deze maatregelen zijn ingegaan op 16 juni 2009. De Plantenziektenkundige Dienst (PD) blijft de komende tijd gerichte inspecties uitvoeren op coniferen hout, schors en plantmateriaal afkomstig uit Portugal.

Gevolgen voor het bedrijfsleven

Alle Nederlandse bedrijven die handel drijven met Portugal kunnen direct te maken krijgen met de nieuwe EU-maatregelen. Dit komt vooral doordat de eisen voor verpakingshout in het verkeer tussen Portugal en andere lidstaten zijn aangescherpt. Al het verpakingshout dat reeds in het verkeer

circuleert mag niet langer vanuit Portugal worden verhandeld naar andere lidstaten, tenzij dit voldoet aan de EU-eisen. Bedrijven die handelen in coniferen hout, schors en plantmateriaal afkomstig uit Portugal kunnen daarnaast te maken krijgen met controles die uitgevoerd worden door, of in opdracht van, de Plantenziektenkundige Dienst.

Dennenhoutaaltje

In Portugal komt het dennenhoutaaltje *Bursaphelenchus xylophilus*, een quarantaine-organisme, op grote schaal voor. Het aaltje vormt een grote bedreiging voor naaldbomen, in het bijzonder *Pinus*-soorten, en voor de Europese handel. Het organisme komt tevens voor in Canada, China, Japan, Mexico, Taiwan, de VS en Zuid-Korea. Sinds medio 2008 heeft de EU Portugal, met uitzondering van de eilanden, tot een besmet gebied verklaard.

Bron: Nieuwsbericht PD, 6 mei 2009

Scirtothrips dorsalis quarantainewaardig voor alle plantensoorten

Scirtothrips dorsalis is momenteel in de EU gereguleerd voor planten van Citrus, *Fortunella*, *Poncirus* en hun hybriden, met uitzondering van vruchten en zaden. *Scirtothrips dorsalis* kan echter veel meer plantensoorten aantasten dan waarvoor het in de EU een quarantaine-organisme is. De PD heeft daarom een risico-analyse (PRA) opgesteld van *Scirtothrips dorsalis* en op basis van de voorlopige conclusies uit de PRA heeft *Scirtothrips dorsalis* de status 'quarantainewaardig' gekregen voor alle planten bestemd voor opplant. Dit betekent dat de PD ook maatregelen oplegt bij vondst van *S. dorsalis* op plantensoorten anders dan de gereguleerde soorten. Vestiging van *S. dorsalis* in Nederlandse kassen zou namelijk negatieve gevolgen kunnen hebben voor de Nederlandse export. Bij vondst op eindproducten (snijbloemen, vruchten, groenten e.d.) van niet-gereguleerde gewassen worden geen maatregelen opgelegd omdat de kans op introductie in een kas via deze producten als nihil wordt ingeschat.

Bron: Nieuwsbrief Plantenziektenkundige Dienst, nummer 2, mei 2009



Scirtothrips Dorsalis

Foto: Mid Florida Research and Education Center

Onderzoek naar Aziatische boktor in Enschede afgerond

Begin juli 2008 is er een volwassen kever van de Aziatische boktor gevonden in de wijk Roombeek. De PD is die zomer, samen met de gemeente Enschede, direct een onderzoek gestart. Het vervolgonderzoek begin februari 2009 waarbij hoger in de bomen werd gekeken, leverde géén nieuwe vondsten van de Aziatische boktor op.

In deze steekproef zijn in totaal 64 verschillende bomen intensief bekeken. Er zijn vijf monsters genomen; vier waren afkomstig van berkenbomen (*Betula*) en een monster kwam van een beukenboom (*Fagus*). Bij alle vijf ging het om door spechten opgeghakte boorgangen. Het onderzoek is nu afgerond. De bomen in de wijk worden de komende jaren uit voorzorg nog wel regelmatig bekeken.

Bron: Nieuwsbrief Plantenziektenkundige Dienst, nummer 2, mei 2009

Fonds Kleine toepassingen vernieuwd

Op 23 maart 2009 is het startsein gegeven voor het vernieuwde Fonds Kleine Toepassingen. Nefyto, LTO Nederland en de PD organiseerden een startbijeenkomst. Vertegenwoordigers van de sector en LNV waren hierbij aanwezig.

Het Fonds is een belangrijk instrument om een effectief middelenpakket te krijgen voor kleine toepassingen. Er zijn tot 2008 103 aanvragen toegelaten. Dit heeft inmiddels in 25 toelatings geresulteerd. De overige aanvragen zitten nog in de onderzoeksfase of zijn nog in behandeling. Voor de nieuwe periode van het Fonds (2009-2013) is het toekenningsbedrag verhoogd. Daarnaast kan de ontheffing voor biologische bestrijders nu ook binnen het fonds worden gefinancierd. De verwachting is dat meer producenten voor biologische bestrijders gebruik gaan maken van deze regeling.

De PD is op meerdere terreinen van de kleine toepassingen actief. Naast het secretariaat van de toekenningscommissie van het Fonds, geeft de PD via het Loket Kleine Toepassingen adviezen aan het bedrijfsleven en de overheid. De PD adviseert onder andere over gewasbeschermingsproblemen, algemene toelatingsaspecten en structurele oplossingen voor de problematiek rondom kleine toepassingen. Internationaal zet de PD zich in om te stimuleren dat gewasbeschermingsproblemen gezamenlijk worden opgelost. Daarnaast worden zowel procedurele

als wettelijke obstakels onder de aandacht van de lidstaten gebracht.

Bron: Nieuwsbrief Plantenziektenkundige Dienst, nummer 2, mei 2009

PD plaatst vallen ter controle op *Tuta absoluta* op Tomatenbedrijven

Tuta absoluta is een zeer klein mineermotje dat grote schade kan veroorzaken in de tomatenteelt. Sinds 2007 komt hij in Europa voor in Spanje en heeft zich daar in zeer korte tijd weten te vestigen in de tomatenteelt. De PD heeft een risicoanalyse uitgevoerd en heeft geconcludeerd dat er een gereede kans bestaat dat de *Tuta absoluta* via de productstroom van Spaanse tomaten terecht kan komen in Nederland.

Dit is inmiddels ook gebleken. Tot nu toe is de mineermot in Nederland op acht locaties op feromoonvallen aangetroffen. Buiten zal de mineermot zich niet handhaven, maar als het de weg weet te vinden naar kassen, dan kan dat tot aanzienlijke schade leiden in de tomatenteelt. De resultaten van de risico-analyse zijn besproken met de sectoren, die zich beraden op hun standpunt.

Om er zeker van te zijn dat hij niet in de Nederlandse kassen voorkomt, hangt de PD op tachtig tomatenbedrijven feromoonvallen op ter controle op de aanwezigheid van *Tuta absoluta*. Omdat de mineermot nog geen quarantainestatus heeft zullen bij aantreffen vooralsnog geen maatregelen worden opgelegd. Wel kan de PD adviseren bij beheersing en bestrijding. In juni vindt een vervolg sectorconsultatie plaats waarbij de resultaten van de nadere monitoring worden meegenomen in de risicoanalyse.

Bron: Nieuwsbrief Plantenziektenkundige Dienst, nummer 2, mei 2009

Cursus bedrijfshygiëne voor plantenkwekers Plantenkwekers zijn geschrokken van de problemen die *Clavibacter* in tomaat vorig jaar met zich meebracht. Om die reden heeft Naktuinbouw samen met opleider Breedwise een workshop ontwikkeld over de bedrijfshygiëne op plantenkwekerijen.

Het doel van de workshop is om medewerkers van opkweek van vruchtgroenteplanten en zaadproducenten van gewassen als tomaat bewust te maken van het nut van bedrijfshygiëne. De cursus duurt een middag en een

avond en is op LBO/MBO-nivo. Alfred Klaver van Naktuinbouw: "Een dezer dagen komt het nieuwe hygiëneprotocol voor onder andere pepino en *Clavibacter* beschikbaar. In de cursus komt dit nieuwe protocol aan de orde."

Naast het hoe en waarom van het protocol worden ook plantenziekten behandeld. De deelnemers krijgen zicht in de aard van ziekteverwekkers zoals *Clavibacter* en pepino en de infectie- en verspreidingsmogelijkheden. Na het volgen van de workshop weten de deelnemers hoe zij risico's op besmetting vroegtijdig kunnen signaleren en hoe ze moeten handelen.

Volgens Klaver is het de bedoeling om later in het jaar een cursus te geven voor de leidinggevenden op teeltmateriaalbedrijven. "Die cursus is dan meer op mbo-hbo-niveau."

Bron: *Groenten en Fruit*, 22 april 2009

De redactie van Gewasbescherming besteedt bij het verzamelen van de informatie voor de rubriek Nieuws aandacht en zorg aan de juistheid van deze informatie, maar kan deze niet garanderen. De items in de rubriek Nieuws geven de zienswijze van de betreffende bron weer en uitdrukkelijk niet die van de redactie of van de KNPV. De redactie is niet verantwoordelijk en/of aansprakelijk voor eventuele fouten en onvolkomenheden in de verstrekte informatie.

NIEUWS

European Journal of Plant Pathology ***Published in cooperation with the European Foundation for Plant Pathology***

The European Journal of Plant Pathology is an international journal that publishes original research articles dealing with fundamental and applied aspects of plant pathology. Thus, in addition to bacteriological, mycological, and virological topics, entomological, nematological and plant protection studies in general are also included.

Editor-in-Chief:
Mike Cooke,
School of Biological and Environmental Science, College of Life Sciences, University College Dublin, Ireland

The European Journal of Plant Pathology is published in cooperation with the European Foundation for Plant Pathology; therefore a special price is given to all members of 27 national societies associated with this foundation.

As a member of the Koninklijke Nederlandse Plantenziektkundige Vereniging you are also entitled to this considerable discount. The regular subscription fee is EUR 1545,- but as member of the KNPV you only pay EUR 173 (2008 prices). The journal is published in three volumes; each volume consists of four issues.

Associate Editors:
Solke H. De Boer, Centre for Animal and Plant Health, Charlottetown, Canada; Peter Burt, University of Greenwich at Medway, Chatham, UK; Thierry Candresse, INRA, Villenave d'Ornon, France; David B. Collinge, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark; Mike Deadman, Sultan Qaboos University, Sultanate of Oman; Heinz-W. Dehne, Rheinische Friedrich-Wilhelms University, Bonn, Germany; Simon Edwards, Harper Adams University College, Newport, UK; Maria R. Finckh, University of Kassel, Germany; Jeanne Gilbert, Agriculture and Agri-Food Canada, Winnipeg, Canada; Stephen B. Goodwin, USDA-ARS, Purdue University, West Lafayette, IN, USA; Simon Gowen, The University of Reading, UK; Johannes Hallmann, Federal Biological Research Centre, Münster, Germany; Wilhelm Jelkmann, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Dossenheim, Germany; Peter W. Jones, University College

Cork, Ireland; Hans J. Lyngs Jørgensen, University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark; Philippe Lucas, INRA/Agrocampus Rennes, Le Rheu Cedex, France; Mark P. McQuilken, The Scottish Agricultural College, Auchincruive, UK; Tobin L. Peever, Washington State University, Pullman, WA, USA; Corné M.J. Pieterse, Utrecht University, The Netherlands; Christine Struck, University of Rostock, Germany; George W. Sundin, Michigan State University, East Lansing, MI, USA; John Thomas, Department of Primary Industries and Fisheries, Indooroopilly, Australia; Susanne Vogelgsang, Research Station Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, Zürich, Switzerland; Cees Waalwijk, Plant Research International B.V., Wageningen, The Netherlands; Jon West, Rothamsted Research, Harpenden, Herts, UK; Xiangming Xu, East Malling Research, Kent, UK

European Foundation for Plant Pathology Secretariat:

Piet M. Boonekamp, Plant Research International B.V., Wageningen, The Netherlands

If you are interested in a subscription or you would like further information, please contact:

*Ing. Zuzana Bernhart
Publishing Editor
Plant Pathology & Entomology
Springer Science + Business Media
P.O. Box 17
3300 AA Dordrecht
The Netherlands
zuzana.bernhart@springer.com .*



Agenda

Binnenlandse bijeenkomsten

30 september-2 oktober 2009

Suprofruit 2009. 10^e internationale workshop duurzame toepassing van spuittechnieken in de fruitteelt, congrescentrum Hof van Wageningen (WICC), Wageningen

Info: website: www.suprofruit2009.wur.nl

29 oktober 2009

81^e bijeenkomst KNPV-werkgroep Bodempathogenen en bodemmicrobiologie.

Info: e-mail: gera.vanos@wur.nl

18 december 2009

Entomologendag, Nederlandse Entomologische Vereniging.

Info: website: www.nev.nl

Buitenlandse bijeenkomsten

19-23 juli 2009

XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Quebec, Canada.

Info: website: www.mpmi2009.ulaval.ca/

30 juli-6 augustus 2009

APS Annual Meeting, Portland, Oregon, USA.

Info: website: www.apsnet.org

1-5 augustus 2009

APS Annual Meeting 2009, Portland Convention Center, Portland, Oregon, USA.

Info: website: www.apsnet.org

10-14 augustus 2009

14th Australasian Plant Breeding Conference and 11th SABRAO Conference in Cairns, North Queensland, Australia.

Info: website: www.plantbreeding09.com.au

10-21 augustus 2009

Pest and Disease Diagnostics for International Trade and Food Security, Wooster, Ohio.

Info: website: <http://plantpath.osu.edu/extension/international/>

28-31 augustus 2009

2nd International Symposium on Agricultural Research, Athens, Greece.

Info: website: www.atiner.gr/docs/Agriculture.htm

1-4 september 2009

British Mycological Society Annual Scientific Main meeting, University of

Dundee, UK.

Info: website: <http://www.britmycolsoc.org.uk>

6-11 september 2009

IOBC/WPRS Working Group 'Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate', Mediterranean Agronomic Institute of Chania (MAICH), Crete, Greece.

Info: e-mail: dperdikis@aia.gr; website: www.iobc-wprs.org

8-10 september 2009

2nd World Seed Conference "Responding to the Challenges of the Changing World: The Role of New Plant Varieties and High Quality Seed in Agriculture", FAO headquarters, Rome, Italy.

Info: website: <http://worldseedconference.org/en/worldseed-conference/home.html>

16-17 september 2009

Potatoes: viruses and their vectors at: University of York, UK

Info: website: www.aab.org.uk

21-24 september 2009

North American Weed Management Assoc. Annual Conference & Trade Show 'Response to the Riparian Invasion - Improving the Health of our Riparian Areas', Kearney, Nebraska.

Info: website: www.wssa.net

22 september 2009

BSPP Presidential Meeting 2009 "Celebrating Darwin's 200th Birthday" at University Museum, Oxford, UK.

Info: website: www.bspp.org.uk

29 september-1 oktober 2009

APPS 2009 Conference, Newcastle NSW Australia.

Info: e-mail: conference@conlog.com.au;

website: www.australasianplantpathologysociety.org.au

30 september-2 oktober 2009

APPS 2009 'Plant Health Management-An Integrated Approach', Civic Precinct, Newcastle, Australia.

Info: e-mail: conference@conlog.com.au

30 september-3 oktober 2009

General Assembly of IOBC-wprs, in Morocco.

Info: website: www.iobc-wprs.org

3-8 oktober 2009

IOBC/WPRS Working Group 'Integrated Protection in Field Vegetable Crops', Dubrovnik, Croatia.

Info: e-mail: rosemary.collier@warwick.ac.uk;

website: www.iobc-wprs.org

7-9 oktober 2009

IOBC/WPRS Working Group 'Pesticides and Beneficial Organisms', Dubrovnik, Croatia.

Info: website: www.iobc-wprs.org/events/

13-15 oktober 2009

Conference on computer applications in plant protection, Turkey.

Info: website: www.eppo.org

18-25 oktober 2009

The 13th World Forestry Congress 'Forests in development - a vital balance' in Buenos Aires, Argentina.

Info: e-mail: info@wfc2009.org;

website: <http://www.wfc2009.org>

25-30 oktober 2009

9th IPMB Congress, St. Louis, MO, USA.

Info: e-mail: ipmb2009@missouri.edu; website: www.ipmb2009.org

1-4 november 2009

IOBC/WPRS Working Group 'Integrated Protection and Production in Viticulture' Staufen im Breisgau, Germany.

Info: e-mail: calonnec@bordeaux.inra.fr; website: www.iobc-wprs.org

1-5 november 2009

ASA / CSSA / SSSA Annual Meeting, Pittsburgh, Pennsylvania.

Info: website: www.wssa.net

9-11 november 2009

First International Conference of Mycops, the Institute of Mycology and Plant Pathology, University of Punjab, Lahore, Pakistan

Info: Professor Dr Rukshana Bajwa; e-mail: director@mpp.pu.edu.pk, or the Conference Secretary Dr Sarwar Alam; e-mail: drssalam@yahoo.com

9-12 november 2009

The 2009 International Conference on Horticulture in Bangalore, Karnataka, India.

Info: website: www.pnasf.org/ich2009.htm

10-12 november 2009

Workshop for Phytosanitary Inspectors, Vilnius.

Info: website: www.eppo.org

10-13 november 2009

5th International Conference on Plant Pathology 'Plant pathology in the globalized era', the Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India.

Info: e-mail: ipsdis@indiatimes.com and ipsdis@yahoo.com

1-2 december 2009

2nd International *Phytophthora capsici* Conference, Islamorada Fl (Florida Keys), USA.

Info: website: <http://conferences.dce.ufl.edu/pcap/reg.aspx>

9-11 december 2009

National Soybean Rust Symposium in New Orleans, Louisiana, USA.

Info: e-mail: dorrance.1@osu.edu

13-17 december 2009

Entomological Society of America Annual Meeting, Indianapolis Convention Center Indianapolis, Indianapolis, USA.

Info: website: www.entsoc.org

5-7 januari 2010

International Advances in Pesticide Application 2010, Robinson College, Cambridge, UK.

Info: website: www.aab.org.uk

28 februari-3 maart 2010

Global Biosecurity 2010: safeguarding agriculture and the environment, Brisbane, Australia.

Info: website: www.globalbiosecurity2010.co

13-18 juni 2010

13th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Rome, Italy.

Info: website: www.mpunion.com

1-6 augustus 2010

9th International Mycological Congress (IMC9) in Edinburgh, Scotland, UK.

Info: website: <http://www.imc9.info/>

7-11 augustus 2010

APS Annual Meeting, Opryland, Nashville, Tennessee, USA.

Info: website: www.apsnet.org

22-27 augustus 2010

XXVIII International Horticultural Congress (IHC2010) in Lisbon, Portugal.

Info: e-mail: info@ihc2010.org; website: www.ihc2010.org

31 augustus-3 september 2010

The 8th International Conference on *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens in Oxford, UK.

Info: e-mail: syringae2010@plants.ox.ac.uk; website: www.reading.ac.uk/Psyringae2010

31 oktober-4 november 2010

ASA / CSSA / SSSA Annual Meeting, Long Beach, California.

Info: website: www.wssa.net