

Strategische kennis voor preventie van bacterieziek in de poot aardappelteelt: een samenvatting

Van der Wolf¹, J., Kurm, V.¹, Van Duivenbode, I.², Langeslag, G.², Ransijn, J.², Gros, J.³, Mendes, O.¹, Krijger, M.¹, & Poleij, L.¹

¹ Wageningen University & Research, Wageningen Plant Research, Business Unit Biointeractions & Plant Health, P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen. E Jan.vanderWolf@wur.nl, T 06-10028194

² NAK, Nagelerweg, Randweg 14, 8304 AS Emmeloord

³ Agrico Research, Burchtweg 17, 8314 PP Bant

Dit onderzoek is in opdracht van BO-Akkerbouw, Agrico, HZPC, NAK, Stichting NAO projecten en het Ministerie van Economische Zaken (TKI, grant nr AF18034), uitgevoerd door de Stichting Wageningen Research (WR) business unit Biointeracties & Plantgezondheid, in samenwerking met de NAK.

WR is een onderdeel van Wageningen University & Research, samenwerkingsverband tussen Wageningen University en de Stichting Wageningen Research.

Het volledige onderzoeksrapport is als pdf gratis op te vragen bij Mw. M. Notermans (Marion.Notermans@wur.nl)

Trefwoorden: *Pectobacterium*, *Dickeya*, Detectie, Regenwater, Onkruiden, Grond, Miniknollen

Wageningen, 11 November 2024

Samenvatting

Ontwikkeling van detectiemethoden.

In het onderzoek naar initiële besmettingen van aardappelplanten met 'blackleg causing soft rot Pectobacteriaceae' (BL-SRP), die de ziekten zwartbenigheid en stengelnatrot ('bacterieziek') kunnen veroorzaken, is het niet alleen belangrijk te weten of deze aanwezig zijn, maar ook welke soort verantwoordelijk is voor de ziekte. *Dickeya solani* en *D. dianthicola*, *Pectobacterium atrosepticum*, en sommige varianten van *P. brasiliense*, zijn vaak agressief, *P. parmentieri* geeft een lagere ziekte-incidentie, terwijl er varianten van *P. brasiliense* zijn die geen bacterieziek veroorzaken. Resultaten uit vorig onderzoek (Deltaplan Erwinia 2.0) lieten zien dat de infectie-incidenties van BL-SRP in een PB1 gewas gegroeid uit miniknollen, laag zijn ($\leq 3.4\%$)¹. Er werden in dit project in de periode 2019- 2022 surveys uitgevoerd, waarvoor een gevoelige verrijkings-multiplex TaqMan assay werd ontwikkeld die alle BL-SRP varianten gevoelig aantoonde, maar waarmee geen onderscheid gemaakt kon worden tussen de varianten. De gedachte was dat gedurende de surveys, (het geringe aantal) monsters dat positief zou zijn in deze verrijkings multiplex TaqMan assay daarna verder geanalyseerd zouden worden met reeds beschikbare simplex TaqMan assays specifiek voor de verschillende varianten. In alle gevallen werd een extractie- en amplificatiecontrole toegevoegd aan de monsters op basis waarvan een vals-negatieve reactie als gevolg van remming van de TaqMan reactie kon worden uitgesloten. De gevoeligheid van de multiplex en simplex TaqMan assays (zonder verrijking) lag tussen 1000 en 100.000 cellen per gram plantmateriaal. De gevoeligheid van de verrijkings-TaqMan assay lag tussen de 10 en 100 cellen per gram plantmateriaal. De methodes zijn met succes toegepast in het onderzoek naar initiële infectie.

Voor experimenteel onderzoek, waarbij planten bewust werden besmet, werd een spontane rifampicine resistente mutant van *P. brasiliense* geselecteerd. Deze merkerstam (mutant) is goed te onderscheiden van wild-type stammen die overal in de natuur voorkomen. Door rifampicine aan het groeimedium toe te voegen, worden de wild-type stammen uitgeschakeld. De groeisnelheid van de mutant en het vermogen om aardappelknollen te laten rotten waren vergelijkbaar met de wild-type stam. Echter, in een veldexperiment met geïnoculeerde knollen gaf de mutant wel significant minder zieke planten dan de wild-type stam (62 t.o.v. 88 %). De mutant is toegepast in experimenteel onderzoek naar de relatie tussen de doses waarmee planten worden geïnoculeerd via bladbespuitingen, en de respons (aantal symptomatische en geïnfecteerde bladeren en knollen 8 weken na inoculatie).

*Er werden gevoelige en betrouwbare methoden ontwikkeld voor het traceren en kwantificeren van BL-SRP tijdens surveys op basis van een (verrijkings) multiplex TaqMan assay. Het selecteren van een spontane rifampicine-resistente stam van een virulente stam van *P. brasiliense* maken veldstudies mogelijk naar de epidemiologie van de ziekteverwekker.*

Viable but non culturable cells

De detectiemethode van de NAK is gebaseerd op uitgroei van SRP in een vloeibaar groeimedium met polypectaat onder anaerobe condities, waarna het pathogeen met een moleculaire toets (TaqMan assay) wordt aangetoond. Ook in onderzoek naar de populatiedynamica en bestrijding van SRP wordt veelal gebruik gemaakt van een combinatie van methoden gebaseerd op vermeerdering van de ziekteverwekker op of in media en een moleculaire toets. Verrijking verbetert de gevoeligheid van de detectiemethode alleen als de bacterie zich kan vermeerderen. De vraag is of BL-SRP ook in een Viable But Not Culturable (VBNC) vorm kunnen voorkomen, waarin ze wel levend, maar niet kweekbaar zijn. Dit zou met name voor detectie van lage dichtheden van de bacterie in grond een probleem kunnen vormen. Het bestaan van VBNC's is al voor een scala aan bacteriën, inclusief plant pathogene bacteriën aangetoond²⁻⁵. VBNC's kunnen onder specifieke omstandigheden wel weer 'gewekt' worden en dan ziekten veroorzaken.

Voor *P. atrosepticum* is al aangetoond dat deze in een zgn. VBNC-toestand aanwezig kan voorkomen⁶. In dit project is het voor *P. brasiliense* onderzocht. Er werden condities aangelegd waarvan bekend zijn dat deze

kunnen leiden tot cellen in een VBNC-toestand. Zo werden de cellen in een koolstof-vrij medium geïncubeerd, onder lage zuurstofspanning gehouden, met een koperoplossing (CuSO₄) behandeld, met een hoge concentratie zout, met bleek of ingevroren en daarna weer ontdooid. Alleen een behandeling met koper resulteerde in cellen die niet uitgroeien op een voedingsbodem maar volgens directe dood/levend kleuringen nog wel actief zijn. Voor deze dood/levend kleuring werden stoffen gebruikt die aantonen dat de celmembraan intact is (Syto9, propidium jodide), en stoffen die enzymactiviteit aantonen (carboxy fluoresceïne diacetaat, propidium jodide). Na de kleuring worden de cellen onder de microscoop beoordeeld. Echter de cellen konden niet meer 'gewekt' worden, ook niet door het inoculeren van aardappelknollen of *in vitro* aardappelplanten.

De resultaten wijzen erop dat P. brasiliense mogelijk wel in een VBNC-toestand kan voorkomen, maar niet meer gewekt. We hebben geen aanwijzingen dat VBNC's een rol spelen in de epidemiologie van P. brasiliense.

Dosis respons studies

Er werd in 2021 en 2022 op een zandgrond in Wageningen veldexperimenten uitgevoerd, waarin de relatie werd vastgesteld tussen de dosis (hoeveelheid cellen van *P. brasiliense*) en de respons (infectiepercentage) bij inoculatie van het loof van aardappelplanten (cv Agria). De planten gegroeid vanuit miniknollen werden in een jong (4-6 blad) stadium bespoten met dichtheden van 10⁸, 10⁵, 10³, 10¹ of 0 cellen/ml van de rif-stam van *P. brasiliense*. Tijdens de inoculatie werd geprobeerd om contaminatie van de grond met het inoculum zoveel mogelijk te voorkomen. Ter vergelijking, werd in één van de behandelingen een hoge dosis van de bacteriesuspensie (10⁸ cellen/ml) direct rond de planten op de grond aangebracht.

In 2021, waarin tijdens het groeiseizoen veel regen viel, werd al bij een inoculumdichtheid van 10³ cellen per ml een significant hogere infectie-incidentie in het loof gevonden dan in de negatieve (water-behandelde) controle. Echter, ook in het loof van de negatieve controle werden infecties gevonden, waarschijnlijk doordat de bacterie zich ondergronds via regenwater had verplaatst naar naburige veldjes, en vandaar uit de planten systemisch hadden gekoloniseerd. De dochterknollen van vrijwel alle onderzochte planten waren besmet, ook die van de negatieve controle. Bij bladbespuitingen met een inoculumdichtheid van tenminste 10⁵ cellen/ml werden symptomatische planten (achterblijvende groei, verwelking, donker grijsgroene samengeknepen topbladeren) gevonden. Ook na inoculatie van de grond met 10⁸ cellen/ml was een hoog percentage van de planten symptomatisch.

In 2022, een jaar met betrekkelijk weinig neerslag, werd er alleen bij een inoculumdichtheid van 10⁸ cellen/ml een significant hogere infectie-incidentie in het loof gevonden dan bij de negatieve controle. Tijdens dit seizoen, werden de resultaten beïnvloed door zware besmettingen met wild-type stammen van *P. brasiliense* vanuit de randrijen van aardappels die als buffergewas waren gebruikt. Na loofinoculatie waren de infectie-incidenties van dochterknollen al bij een inoculumdichtheid van 10¹ cellen hoger dan van de negatieve controle. Symptomatische planten werden alleen gevonden na inoculatie van de grond met 10⁸ cellen/ml.

Geconcludeerd werd dat ook bij een groeiseizoen met veel regen, alleen na inoculatie van het loof met relatief hoge dichtheden ($\geq 10^5$ cellen/ml) er een risico is op symptoomontwikkeling. Tijdens een nat groeiseizoen, kunnen er symptoomloze infecties van loof al optreden bij 10³ cellen/ml, maar bij een relatief droog groeiseizoen zijn hoge inoculum dichtheden nodig (10⁸ cellen/ml). Al bij een lage inoculumdichtheid (10 cellen/ml), kunnen er na loofinoculaties, knolinfecties optreden. De hypothese is dat deze lage dichtheden met regenwater vanaf de buitenkant van het loof naar de grond lekken en zo knollen kunnen infecteren. Dit betekent dat ook bij een lage bronsterkte (denk aan insecten) er risico's zijn op knolinfecties.

Initiële infecties

In 2019 en 2020 werden er surveys gehouden op 5 verschillende Nederlandse pootgoedbedrijven om informatie te verzamelen over de infectie incidentie van BL-SRP in een aardappelgewas gegroeid uit miniknollen (PB1-gewas), alsmede over de verdeling van BL-SRP in individuele planten⁷. In de laatste twee weken voor loofvernietiging, werden van 100-200 planten het jonge blad, de stengelbasis en de knollen verzameld en geanalyseerd met de verrijkings multiplex TaqMan assay op de aanwezigheid van *P.*

parmentieri, *P. brasiliense*, *P. atrosepticum*, and *Dickeya* spp. Er werd steeds met cv. Agria gewerkt omdat dit ras relatief gevoelig is voor BL-SRP. In 2019, werden er op 4 bedrijven lage infectie-incidenties met *P. parmentieri* (1–6%) gevonden in bladmonsters. De zwakke reacties in de TaqMan assay gaven aan dat er of zeer lage dichtheden in het blad aanwezig waren of dat (de meeste) cellen dood waren. Op één bedrijf werden reacties in bladeren gevonden met TaqMan assays die *D. zea* and *D. chrysanthemi* specifiek aantoonde. In 2020, waren onderzochte PB1 gewassen op twee bedrijven (A en B) grotendeels vrij van infecties met BL-SRP. Op een derde bedrijf (C) werd een hoog percentage van besmette knollen gevonden (21%) met een assay voor *D. fangzhongdai*. Het pathogeen werd geïsoleerd en bleek in staat om, na vacuüm infiltratie van knollen, op het veld zwartbenigheid te veroorzaken. Op de laatste twee bedrijven (D en E) werden hoge percentages besmette knollen gevonden met assays voor *P. brasiliense* (35–39%) en *P. parmentieri* (12–19%), maar ook de percentages van bladeren besmet met *P. brasiliense* waren hoog (8%). In 2021 en 2022 werd de speurtocht voortgezet op de twee bedrijven (D en E) die in 2020 te maken hadden met zware besmettingen met *P. brasiliense* in hun PB1 gewassen. Dit keer werden alleen de oudere bladeren (onder in het gewas) van 100 planten (cv. Agria) bemonsterd en geanalyseerd. In 2021, een relatief nat en koel jaar, werden opnieuw hoge besmettingspercentages bij beide telers gevonden. Bij teler D was 42% van de planten besmet met de virulente *P. brasiliense* bacteriën en 7% met *P. parmentieri*. Bij teler E waren deze percentages respectievelijk 16 en 0%. Op basis van een kwantitatieve TaqMan assay werd geschat dat de stengels tot 10^6 cellen per gram bladmateriaal konden bevatten. Er werden in dit jaar rottende stengels in het bemonsterde PB1 gewas bij beide telers gevonden die zeer hoge dichtheden *P. brasiliense* bevatten. In 2022, een relatief droog en warm jaar, waren de besmettingspercentages met BL-SRP laag ($\leq 1\%$) bij beide telers. Op basis van de assay-waarden kon geconcludeerd worden dat ook de dichtheden laag waren.

Geconcludeerd werd dat hoge infectie incidenties met BL-SRP kunnen voorkomen in een PB1 gewas aan het einde van het groeiseizoen. De incidenties zijn afhankelijk van plaats en groeiseizoen. Bij relatief droog en warm weer werden er lage incidenties gevonden, maar bij nat weer kan de incidentie wel oplopen tot boven de 40%. De virulente groep van P. brasiliense is de meest voorkomende BL-SRP variant die gevonden werd in het PB1 gewas. Dit is op dit moment ook de dominante variant die door de NAK in symptomatische planten wordt gevonden (> 90%). Opvallend was dat infecties òf in de knollen òf in het blad van individuele planten werden gevonden, maar zelden in beide delen van de plant.

Infectiebronnen

Dichtbij gelegen PB2 gewassen. In 2022 werden tijdens het groeiseizoen bij telers D en E niet alleen een PB1, maar ook verschillende keren een dichtbij gelegen PB2 gewas (cv. Agria) bemonsterd, om te onderzoeken of de besmettingen in het PB1 gewas uit het PB2 gewas (cv. Agria) afkomstig konden zijn. In geen enkel jaar (2019-2022) werden in de bemonsterde PB1 gewassen typische bacteriezieke planten gevonden, maar wel in sommige aanpalende PB2 gewassen bij telers D en E (die niet zijn bemonsterd). Bij teler D lag het PB2 gewas dat in 2022 werd bemonsterd op 26 meter, en bij teler E op 59 meter van het PB1 gewas. De hypothese was dat het PB2 gewas eerder besmet zou zijn dan het PB1 gewas en zo een bron van infectie zou vormen. Echter 2022 was een droog en warm jaar en ook in het PB2 gewas waren de infectiepercentages in het loof laag.

Insecten

In 2022 is onderzoek gedaan naar de mogelijke rol van insecten bij de transmissie van BL-SRP. Bij telers D en E werden tijdens het groeiseizoen tweemaal per week (sticky) vangplaten opgehangen. De insecten op de vangplaten werden individueel bemonsterd en geanalyseerd met de verrijkings multiplex TaqMan assay. In totaal zijn er 665 insecten bemonsterd. Bij teler D was 3% en bij teler E 2.3% van alle insecten besmet, veelal met *P. parmentieri* of een virulente groep van *P. brasiliense*.

Regenwater.

De aanwezigheid van SRP in regenwater werd tijdens het groeiseizoen in 2021 onderzocht op 10 plaatsen en in 2022 op 8 plaatsen in Nederland. In totaal werden er 32 monsters geanalyseerd. Per monster werd 0.5-2 liter regenwater op 1.5 meter hoogte verzameld en op ruime afstand van gebouwen. Er werden in 2021 geen SRP gedetecteerd. In 2022 werd in één monster dat zwaar gecontamineerd was met gronddeeltjes, een niet-virulente vorm van *P. brasiliense* gedetecteerd.

Geconcludeerd werd dat insecten mogelijk een rol spelen bij ontstaan van initiële infecties omdat een relatief hoog percentage van de insecten BL-SRP bij zich dragen, de varianten die in Nederland aanwezig zijn in

bacteriezieke planten. De insecten kunnen gecontamineerd raken door contact met besmettingsbronnen in een wijde omgeving van een PB1 gewas, omdat insecten zich over grote afstanden kunnen verplaatsen. We hebben niet aan kunnen tonen dat regenwater BL-SRP bevatten, en achten de kans dat besmet regenwater een rol speelt in het ontstaan van initiële infecties klein. Over de rol van infecties in een PB2 gewas of gewassen van een lagere klasse, aanpalend gelegen aan een PB1 gewas, bestaat nog onduidelijkheid.

Rol van omgevingsfactoren op besmettingsniveau pootgoed (bijdrage NAK)

Voor onderzoek naar de rol van omgevingsfactoren op het besmettingsniveau van pootgoed is door de NAK gebruik gemaakt van keuringsgegevens uit de periode 2015 en 2018. Reden hiervoor is dat er die periode een trial plaatsvond waarbij alle verhandelbare partijen PB1-S zijn getoetst op aanwezigheid van SRP in het nacontrolemonster. Een pootgoedpartij werd als besmet aangemerkt op het moment dat één of meer reacties in de nacontrole positief waren voor in ieder geval één van de SRP-soorten (NAK). Algemene kenmerken van de partij zijn afkomstig uit de aangifte. Omgevingskenmerken zoals weerskenmerken (KNMI, 2022) (bijvoorbeeld omgevingstemperatuur, relatieve luchtvochtigheid en zonne-instraling), grondkenmerken (bijvoorbeeld grondsoort en doorlatendheid), raskenmerken (EUROPotato, 2022) en omgevingsgewassen (RVO, 2022) zijn aan een partij gekoppeld op basis van de locatie van het perceel. Omdat ras, klasse en generatie van de partij al veel verklaren werden deze kenmerken altijd meegenomen (basiskenmerken) in het model en werd steeds alleen het te testen kenmerk toegevoegd aan de basiskenmerken.

Er werd gevonden dat kenmerken die duiden op verticale besmetting (van moeder naar dochterknol) zoals bijv. klasse/generatie of een besmette moederpartij, een sterke relatie vertonen met de aanwezigheid van SRP in de dochterpartij. Er is groot verschil in besmettingsrisico tussen rassen. Sommige rassen worden nauwelijks positief getoetst op SRP in het nacontrolemonster, andere rassen regelmatig. Omgevingskenmerken die mogelijk het risico op, of vatbaarheid voor, een horizontale besmetting (vanuit de omgeving) verhogen, vertonen ook een aanzienlijke relatie met de aanwezigheid van SRP in de nacontrole, maar niet zo sterk als kenmerken als klasse/generatie, kwaliteit uitgangsmateriaal of ras. Grondsoort, relatieve luchtvochtigheid en neerslag aan het einde van het teeltseizoen en de grondverzadiging die daarmee samenhangt vertonen allemaal een positieve correlatie met de aanwezigheid van SRP in de nacontrole. Temperatuur in het seizoen vertoont een negatieve correlatie met de aanwezigheid van SRP in de nacontrole.