



Format versie juni 2022

Titel PPS-voorstel: Naar preventie van bacterieziekten in de pootaardappelteelt door vermeerdering van kennis over infectiebronnen en transmissie routes

Aanvraagnummer: LWV22032

Inzenden uiterlijk 11 september 2022 via de indienlink op <https://kia-landbouwwatervoedsel.nl/regelingen/>.

Algemene informatie

Contactgegevens indiener/penvoerder (niet de onderzoeksinstituting)

Naam: Ir Jan Gottschall
Organisatie: Stichting NAO projecten
e-mailadres: gottschall@nao.nl

Contactgegevens onderzoeksinstituting

Naam: Dr Jan M. van der Wolf
Organisatie: Wageningen Plant Research, Wageningen UR
e-mailadres: Jan.vanderWolf@wur.nl

- Het PPS-voorstel draagt bij aan missie:**
- A. Kringlooplandbouw
 - B. Klimaatneutrale landbouw en voedselproductie
 - C. Klimaatbestendig landelijk en stedelijk gebied
 - D. Gewaardeerd, gezond en veilig voedsel
 - E. Duurzame en veilige Noordzee, oceanen en binnenwateren
 - F. Nederland de best beschermde en leefbare delta
- Of aan Sleuteltechnologie:**
- ST1. Smart Technologies in Agri-Horti-Water-Food
 - ST2. Biotechnologie en Veredeling
- Of aan:**
- Internationalisering
 - Cross-over met TKI LSH
 - Cross-over met TKI Logistiek
- NB: slechts 1 vakje aankruisen**

Als hierboven een missie is gekozen, bij welk MMIP binnen die missie past het voorstel?

Dit idee sluit aan bij A2 (Robuuste Teeltsystemen). Er worden nieuwe gewasbeschermingsstrategieën ontwikkeld, gebruikmakend van teeltmaatregelen, gebaseerd op kennis over de biologie van de ziekteverwekker. Uit lopend onderzoek blijkt dat er vanuit de omgeving nieuwe agressieve varianten van soft rot Pectobacteriaceae (SRP) de pootaardappelteelt bedreigen. Dit project helpt bij de vroege signalering, detectie, preventie en beheersing van deze ernstige fyto-sanitaire bedreigingen, op basis van kennis van de epidemiologie van deze organismen.

Korte samenvatting van het PPS-voorstel

Nederland is de grootste leverancier van gecertificeerde pootaardappelen in de wereld en exporteert jaarlijks ca. 700.000 ton. Zwartbenigheid, veroorzaakt door bacteriën uit de groep van soft rot Pectobacteriaceae (SRP) wordt gezien als één van de belangrijkste ziekten van pootaardappelen. De teelt begint met SRP-vrije miniknollen, maar dit PB1 gewas kan ongedacht al tijdens het groeiseizoen vóór loofvernietiging zwaar besmet

raken. Potentiële infectiebronnen verantwoordelijk voor initiële infectie en transmissieroutes zijn gedeeltelijk vanuit de literatuur bekend of in eerdere onderzoeksprojecten geïdentificeerd. In dit project wordt het relatieve belang van deze bronnen (naburige aardappelgewassen, grond, onkruiden, regenwater) en de transmissieroutes (insecten) van SRP onderzocht. Hierbij worden moleculaire methoden gebruikt, gebaseerd op metagenomica, om betrouwbaar de identiteit van de ziekteverwekker en de herkomst van de besmettingen vast te kunnen stellen. SRP kunnen ook door de mens verspreid worden tijdens pootgoed selectie, waarbij virus- en bacteriezieke planten tijdens de teelt worden verwijderd. In experimenteel onderzoek met een merkerstam van *Pectobacterium brasiliense*, de dominante veroorzaker van bacteriezieke, worden zieke planten al dan niet geselecteerd en de mate van verspreiding van de bacterie binnen het gewas onderzocht, zowel naar loof als naar knol. Verder wordt in experimenten met een merkerstam onderzocht wat de minimale afstand moet zijn tussen een PB1 gewas en andere (aardappel)gewassen, en welke buffergewassen het beste als 'isolatie' tussen de aardappelgewassen geteeld kunnen worden om de kans op besmettingen te reduceren. Hiervoor wordt experimenteel onderzoek uitgevoerd, maar worden ook data uit de praktijk verzameld en geanalyseerd. De nieuwe kennis wordt benut voor het opstellen van teeltadviezen waarmee het risico op initiële infecties van het aardappelgewas met SRP kan worden beperkt.

Ontvangen advies in fase 1: positief neutraal negatief

Geef aan hoe de ontvangen terugkoppeling geadresseerd is in het definitieve voorstel.

'Het voorstel beschrijft goed hoe wordt voortgebouwd op bestaande kennis en de toepassing in een teeltsysteem. Probeer wel voldoende teeltsysteemkennis bij de uitwerking te betrekken. Kijk niet bij slechts 1 teler naar de manier van telen, maar maak een bredere analyse bij meerdere telers, ook die geen problemen ervaren. Maak ook duidelijk welke nieuwe kennis ontwikkeld gaat worden, bestaande kennis implementeren hoort immers niet thuis in een onderzoeksproject.'

In het onderzoek zal naast experimenteel onderzoek ook door handelshuizen informatie worden verzameld over het bouwplan van pootgoedtelers in relatie tot cijfers over klassenverlaging en afkeuring. Deze informatie zal mee helpen een verband vast te vinden tussen de afstand tussen PB1 gewassen en lagere klassen pootgoed die wenselijk is om besmettingen te voorkomen. Hiermee wordt ondersteunende kennis opgebouwd die gebruikt wordt voor het vertalen van de resultaten van de experimenten naar concrete teeltadviezen. In het project wordt nieuwe kennis opgebouwd over de aard en het belang van infectiebronnen en carriers door gebruik te maken van 'state of the art' technieken (metagenomica). Zo wordt de rol van insecten in de verspreiding van SRP en de besmettingen vanuit de grond onderzocht door gebruik te maken van gevoelige detectiemethoden (enrichment-TaqMan assays). Ook wordt nieuwe kennis gegenereerd over verspreiding tijdens teeltwerkzaamheden.

PPS-voorstel

1. Doel en beoogde resultaten

Beschrijf het doel van het project

Beschrijf wat dit project concreet gaat opleveren voor welke partners/gebruikers

Beschrijf wat er al bekend is (uitgebreide state of the art in **bijlage 1**)

Achtergrond. De teelt van aardappelpootgoed start met het gebruik van miniknollen afkomstig uit weefselkweekplanten die vrij zijn van ziekteverwekkers. Echter, al tijdens het eerste groeiseizoen (PB1 gewas), nog voor loofvernietiging, kunnen er ernstige infecties met 'soft rot Pectobacteriaceae' (SRP) optreden. SRP kunnen in het veld de ziekten zwartbenigheid en stengelnatrot veroorzaken en zachtrot tijdens de bewaring. Binnen een lopend PPS project (TU18028, einddatum 31 december 2022), wordt er onderzoek gedaan naar de het moment waarop infecties plaatsvinden en welke delen van de plant geïnfecteerd raakten. Surveys hebben laten zien dat, afhankelijk van de teler en het groeiseizoen, tot wel 45% van de PB1 planten al één of meerdere besmette knollen meedragen en tot 8 % van de planten een besmetting van het loof heeft opgelopen. Ook infecties met nieuwe agressieve varianten van SRP in het PB1 gewas werden gevonden. Uit het onderzoek werd duidelijk dat besmettingen zeker vanuit de lucht maar potentieel ook vanuit de bodem kunnen plaatsvinden. In aanvullend experimenteel onderzoek is aangetoond dat inoculatie van het loof (vanuit de lucht), al bij een relatief lage dosis, kunnen resulteren in infecties van loof en knol. Er werd in één van de 33 onderzochte regenwatermonsters een besmetting met SRP geconstateerd. In de literatuur worden verschillende (potentiële) infectiebronnen vermeld, maar welke daarvan belangrijk zijn voor de initiële infecties van het PB1 gewas is onbekend. Naast aanpalende gewassen van lagere klassen die besmettingen op een bedrijf in stand kunnen houden, zijn infecties gerapporteerd in aardappelopslag, andere waardplanten (cultuurgewassen, onkruiden) en oppervlaktewater. Over de mogelijke rol van (loofresten in) grond bestaat nog onduidelijkheid. Als carriers, die voor transmissie kunnen zorgen zijn van een besmettingsbron naar een PB1 gewas zijn machines, insecten, kleding, veren en vacht, spatwater, irrigatiewater en aerosolen in de literatuur genoemd. Over het relatieve belang van de verschillende (potentiële) infectiebronnen en transmissie routes bestaat nog veel onduidelijkheid.

Kennis hierover is belangrijk voor het ontwikkelen van een beheersingsstrategie, die dan gericht kan worden op eliminatie van de belangrijkste infectiebronnen en transmissieroutes. Hierbij valt te denken aan de inrichting van het bouwplan, het toepassen van specifieke teeltmaatregelen (bijv. gebruik buffergewassen en strokenteelt), biologische bestrijding en veredelingsonderzoek.

Doelstelling. Het doel is om kennis te verdiepen over: (1) het relatieve belang van bronnen die verantwoordelijk zijn voor initiële infecties met SRP (lagere klassen pootgoed in de nabijheid van de PB1 gewassen, grond, onkruiden, andere waardplanten), (2) het relatieve belang van 'carriers' bij de transmissie (insecten en de mens/machine (selectiewerkzaamheden)), en (3) teeltmaatregelen die de risico's op initiële infecties van het aardappelgewas met SRP kunnen beperken. Gedacht wordt aan: inrichting van het bouwplan afstand van miniknollengewas tot andere (aardappel)gewassen, gebruik van buffergewassen, en het al dan niet toepassen van selectie voor het verwijderen van bacteriezieke planten.

2. Passendheid binnen de KIA en bijdrage aan het portfolio

Dit idee sluit aan bij Missie A2 (Gezonde, weerbare bodem en teeltsystemen, gebaseerd op agro-ecologie en zonder schadelijke emissies naar grond- en oppervlaktewater). Er worden nieuwe gewasbeschermingsstrategieën ontwikkeld, gebruikmakend van teeltmaatregelen, gebaseerd op kennis over de ecologie van de ziekteverwekker. Dit project helpt dan ook bij de vroege signalering, detectie, preventie en beheersing van deze ernstige fytosanitaire bedreiging, op basis van kennis van de epidemiologie van deze organismen. Uit lopend onderzoek blijkt dat er vanuit de omgeving nieuwe agressieve varianten van soft rot Pectobacteriaceae (SRP) de pootaardappelteelt bedreigen.

3. Impact

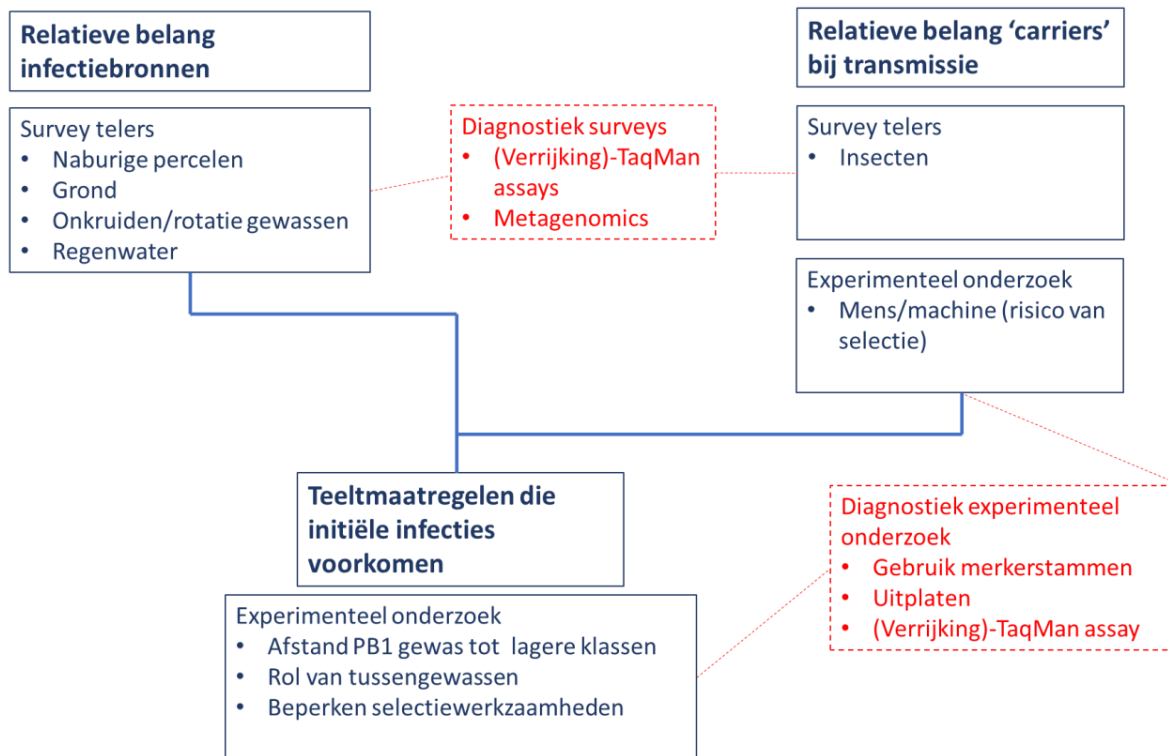
In dit voorstel worden beheersmaatregelen voor een economisch-belangrijke ziekte ontwikkeld door het slim inrichten en weerbaar maken van het productiesysteem. Door gebruik te maken van een doordacht teeltontwerp worden infecties voorkomen waardoor pootaardappelen gedurende meer generaties vermeerderd kunnen worden. Hierdoor wordt verlies van kostbare arbeid en middelen voorkomen. Ook wordt onderzocht of SRP grondgebonden kunnen zijn. De inoculum-druk zou in dat geval verlaagd kunnen worden door gewasrotatie en/of grondbehandelingen toe te passen. In het project worden nieuwe (moleculaire) monitoring- en detectie systemen geoptimaliseerd en beproefd om infectiebronnen betrouwbaar te kunnen identificeren. Het consortium, met vertegenwoordigers van (poot)goedtelers organisaties, handelshuizen en de keuringsdienst, is zo samengesteld dat een maximale ontsluiting van kennis wordt verwacht. Informatie wordt verspreid via een website van de branche organisatie Akkerbouw, door lezingen voor deelgroepen (denk aan de aardappeldemodag), het publiceren in veelgelezen vaktijdschriften (De Aardappelwereld) en door directe contact met telers tijdens surveys.

4. Aanpak van het project

Voor een overzicht zie de lay-out in Figuur 1. In een lopend project zijn twee telers geïdentificeerd die vaak geconfronteerd worden met ernstige infecties van hun PB1 gewas. Bij deze telers wordt zowel het PB1 gewas als in de directe omgeving hiervan, de potentiële infectiebronnen bemonsterd en geanalyseerd. Te denken valt aan nabij gelegen aardappelgewassen, grond (inclusief organisch materiaal), regenwater, onkruiden en rotatiegewassen. Tevens worden potentiële 'carriers' bemonsterd en geanalyseerd die voor transmissie van SRP kunnen zorgen, zoals insecten. Monsters uit de survey worden geanalyseerd met TaqMan assays, al dan niet na verrijking, en met methoden voor 'track & trace', gebaseerd op een metagenomica benadering. Met de metagenomica benadering kan de ziekteverwekker op basis van een sequentie-analyse tot op stamniveau geïdentificeerd worden. Door de sequenties van de pathogenen van het PB1 gewas te vergelijken met die van de infectiebronnen en 'carriers' wordt het mogelijk om op een betrouwbare wijze het verband te leggen tussen de bron van de besmetting, de 'carrier' en de PB1 besmetting.

Onduidelijk is wat het effect is van selectiewerkzaamheden tijdens de teelt op de uiteindelijke besmetting van het gewas en op de verspreiding naar andere gewassen. Tijdens deze selectie worden virus- of bacteriezieke planten uit het gewas met de ondergrondse delen van de plant verwijderd. In experimenteel onderzoek wordt dit risico onderzocht. Planten besmet met een spontane rifampicine mutant van *Pectobacterium brasiliense* worden in het centrum van veldjes met een PB1 aardappelgewas en zo opgegroeid dat vóór de selectie geen verspreiding van het pathogeen kan plaats vinden. De geïnfecteerde planten worden net voor sluiting van het gewas al dan niet uitgeselecteerd, waarna de besmetting van SRP naar blad en knol aan het einde van het groeiseizoen wordt gecontroleerd voor beide behandelingen. Ook wordt met het effect van het rijden met een selectiekar door het gewas en het uitselecteren van zieke planten onderzocht.

Onbekend is wat de minimale afstand moet zijn tussen een PB1 gewas en een geïnfecteerd aardappelgewas. Om dit te onderzoeken worden tweejarige veldexperimenten met merkerstammen (antibioticum-resistente stammen) uitgevoerd, waarbij een PB1 gewas op verschillende afstanden van een besmet gewas wordt geplant en omringd met verschillende gewassen. Ook wordt een PB1 gewas op een solitaire plaats opgekweekt, ver verwijderd van andere aardappelgewassen. Aan het einde van het groeiseizoen worden blad- en knollen geanalyseerd op besmettingen.



Figuur 1. Werkzaamheden binnen het project

De kennis die in dit project wordt gegenereerd stelt de teler potentieel in staat om introductie van SRP in een PB1 gewas te vermijden. Door ook volgende generaties te isoleren van infectiebronnen kunnen infecties lange tijd worden vermeden en kan pootgoed gedurende meer generaties gezond worden vermeerderd. De kosten als gevolg van klassenverlagingen en afkeuringen worden gereduceerd. Het project geeft ook inzicht in de toepasbaarheid van metagenomica technieken in studies naar infectiebronnen en verspreiding van pathogenen.

5. Organisatie

Door het consortium van handelshuizen, NAO, LTO, BO Akkerbouw en Wageningen UR is in de afgelopen jaren in een aantal publiek-private projecten rond bacterieziekten al intensief en succesvol samengewerkt. Ook tussen de NAK en Wageningen UR bestaat er al jaren een actieve en vruchtbare samenwerking in het bacterie-onderzoek. Het bedrijfsleven en de NAK ondersteunen veldexperimenten door het beschikbaar stellen van (proef)velden, pootgoed, teeltgegevens, bemonstering en advisering. Telers aangesloten bij LTO en bij BO-Akkerbouw hebben toegezegd mee te willen werken aan de bemonstering van hun gewassen. De partners zullen helpen bij het uitvoeren van de surveys en de analyse van monstermateriaal. Wageningen UR zal samen met telers een groot deel van de surveys en experimenteel onderzoek uitvoeren, en de samen met partners verkregen kennis integreren in toepasbare teeltadviezen.

De Brancheorganisatie Akkerbouw is een door het Ministerie van LNV, in het kader van het GLB, erkende brancheorganisatie die een brede vertegenwoordiging van de akkerbouwsector kent. De leden zijn: LTO, NAV, NAK, Plantum, NAO, VAVI, Agrifirm, Van Iperen, CZAV, Comité van Graanhandelaren, Cosun en Avebe. Een belangrijke taak is om zorg te dragen voor pre-competitief onderzoek op het gebied van o.a. duurzaam bodembeheer en plantgezondheid. Op initiatief van de BO Akkerbouw is een brede Stuurgroep Plan van Aanpak Erwinia opgericht die dit projectvoorstel een hoge prioriteit geeft.

Binnen het consortium is uitgebreide kennis over teeltmethoden en aardappelziekten aanwezig.

Binnen Wageningen UR en de NAK is door de jaren heen veel expertise opgebouwd op het gebied van ecologie en detectie van SRP. Met haar gespecialiseerde centra voor genomics is Wageningen UR zeer goed geoutilleerd voor onderzoek met NGS-(Next Generation Sequencing) technieken.

Het secretariaat ligt in handen van de BO Akkerbouw. Het project zal worden uitgevoerd onder leiding van Dr. J.M. van der Wolf die een jarenlange bewezen ervaring heeft op het gebied van fundamenteel en strategisch onderzoek aan bacterieziekten in aardappelen.

Een projectcommissie komt drie keer per jaar bijeen, bewaakt de voortgang en stelt samen met de projectleider de onderzoeksplannen vast. Elk jaar kan er door de commissie opnieuw besloten worden over het al dan niet continueren van het project (go/no-go).

Naam partner	Contactpersoon	Emailadres
BO Akkerbouw	Ir E. de Jongh	dejongh@bo-akkerbouw.nl
Stichting NAO Projecten	Ir J. Gottschall	gottschall@nao.nl
Agrico	Dr S. Allefs	S.Allefs@agrico.nl
HZPC	Ir D. Boomsma	Doretta.Boomsma@hzpc.com
NAK	Drs I. van Duivenbode	i.vanduivenbode@nak.nl/g.langeslag@nak.nl
WUR	Dr J.M. van der Wolf	Jan.vanderWolf@wur.nl

6. Kennisvalorisatie en -disseminatie

Beschrijf wie de resultaten van het project gaan gebruiken en hoe hiervoor gezorgd wordt, bijv. via studieclubs, praktijknetwerken, onderwijs.

Beschrijf de beoogde communicatieactiviteiten naar verschillende doelgroepen

Communicatie vindt plaats via:

- Vergaderingen van de klankbordcommissie met vertegenwoordigers van partners en uitvoerders (driemaal per jaar), voor informatie overdracht en planning.
- Vergaderingen van de Stuurgroep 'Plan van aanpak Erwinia' van BO Akkerbouw
- Lezingen die op verzoek worden verzorgd voor leden van LTO, BO Akkerbouw en NAO (o.a. aardappel demodag).
- Teeltadviezen op de website van BO Akkerbouw
- Publicatie in vakbladen zoals de Aardappelwereld en de Boerderij, dit in overleg met en na goedkeuring van de klankbordgroep (tenminste twee).
- Twee publicaties in peer-reviewed wetenschappelijk tijdschriften.

Bijlage 1. State of the art en deliverables

1. *De Nederlandse pootgoedteelt.* Nederland is de grootste leverancier van gecertificeerde pootaardappelen in de wereld en exporteert jaarlijks ca. 700.000 ton (<https://www.potatopro.com/>). De waarde van de Nederlandse export van pootaardappelen is in de periode van 2010 tot 2017 met bijna één derde toegenomen. In 2014 ging er voor bijna een half miljard euro aan pootaardappelen de grens over. Ongeveer de helft van de export gaat naar EU-landen, de andere helft naar landen buiten de Europese Unie (cijfers CBS). In Nederland zijn er circa 1800 pootaardappeltelers werkzaam. Daarnaast zijn er 44 pootgoedexporteurs waar in totaal circa 500 mensen werken. De teelt van pootaardappelen is de basis voor de aardappelteelt, het vierde voedselgewas op aarde. De aardappel scoort beter dan pasta, rijst en peulvruchten op de belangrijke milieuthema's broeikasgas, energieverbruik, landgebruik en watergebruik (informatie NAO).

2. *De ziekte en de ziekteverwekkers.* Bacteriën die de ziekten zwartbenigheid en stengelnatrot in een aardappelgewas kunnen veroorzaken en zachtrot tijdens de bewaring van aardappelknollen, werden voor 1992 tot het geslacht *Erwinia* gerekend, maar zijn nu ingedeeld in de geslachten *Dickeya*- en *Pectobacterium*, die vallen binnen de familie *Pectobacteriaceae* (Czajkowski et al., 2011, Toth et al., 2020). In dit voorstel wordt de groep aangeduid met de afkorting SRP, soft rot *Pectobacteriaceae*. De ziekte in het veld kenmerkt zich vooral door verwelking van planten en een zwartgekleurd natrot aan de stengelbasis. De meeste symptomatische planten hebben een rotte moederknol. Pootgoedpartijen worden tijdens elk groeiseizoen door keurmeesters twee- of driemaal beoordeeld op het voorkomen van bacteriezieke planten. Voor de hogere pootgoedklassen geldt een nultolerantie. De schade die SRP jaarlijks in Europa veroorzaakt in de pootaardappelteelt vooral door afkeuringen en klasse verlagingen, wordt geschat op jaarlijks 46 miljoen Euro (Dupuis et al., 2021). Bacterieziekten veroorzaakt door SRP worden door pootgoedtelers gevreesd. Ze duiken onverwacht op, er zijn geen bestrijdingsmiddelen beschikbaar en er is geen resistentie in commerciële rassen aanwezig, hoewel cultivars wel verschillen in gevoeligheid voor SRP. De telers zijn volledig aangewezen op gebruik van schoon uitgangsmateriaal, bedrijfshygiëne en op teeltmaatregelen. De bacterie wordt via het pootgoed doorgegeven. Versmering binnen en tussen partijen vindt vooral plaats tijdens oogst werkzaamheden. Het is onduidelijk hoe tijdens het eerste groeiseizoen een gewas uit miniknollen al geïnfecteerd raakt.

De genetische diversiteit van SRP is groot (Czajkowski et al., 2015). Verder hebben er over de jaren heen belangrijke verschuivingen in de populatiestructuur plaats gevonden (gegevens NAK). Tot 2000 werd de ziekte veroorzaakt door *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola* en *P. parmentieri* en van 2000 tot 2010 door *D. solani* en *P. parmentieri*. De laatste jaren zijn *P. brasiliense* en *P. parmentieri* de dominante soorten. De oorzaak van deze verschuivingen is onbekend. Ook binnen de soorten kunnen de genetische diversiteit en virulentie verschillen aanzienlijk zijn (van der Wolf et al., 2016, van der Wolf et al., 2021).

De meest gevoelige wijze om SRP in plantmateriaal aan te tonen is door gebruik te maken van een combinatie van verrijking in plantmateriaal en/of een vloeibaar medium en een detectie met een DNA-amplificatiemethode (TaqMan assay). Hiermee kunnen zeer lage dichtheden SRP (ca. 100 cfu/g plantmateriaal) worden aangetoond. Zonder een verrijkingstap kan met een TaqMan assay ca. 10⁴ cellen/g worden gedetecteerd. Er zijn TaqMan assays voor veel varianten ontwikkeld die zwartbenigheid kunnen veroorzaken (Czajkowski et al., 2015). Binnen een lopend project, gefinancierd door BO-Akkerbouw en NAK worden TaqMan assays ontwikkeld tegen varianten waarvoor nog geen assays beschikbaar zijn. Het isoleren van de bacterie uit symptomatisch plantenweefsel en doorstrijken tot een reincultuur is relatief eenvoudig, maar isolatie uit asymptomatisch planten weefsel en grond is lastiger door het ontbreken van geschikte selectieve voedingsbodems. Met de ontwikkelde TaqMan assays kunnen soorten SRP onderscheiden worden, maar geen varianten binnen de soorten. Dit is van belang in forensisch onderzoek. Een nieuwe ontwikkeling is het gebruik van next generation sequencing (NGS) voor zgn. metagenomica, waarmee varianten binnen de soorten onderscheiden kunnen worden door gegenereerde sequenties onderling te vergelijken en te vergelijken met sequenties in databanken. Met NGS analyses voor het herkennen van varianten SRP in (verrijkte) luchtmonsters is al enige ervaring (niet gepubliceerd onderzoek WUR). De kosten van een kale sequentie-analyse worden steeds lager, maar de interpretatie van de gegevens vraagt nog veel tijd.

3. *Het infectieproces.* Miniknollen zijn vrij van ziekteverwekkers, maar het gewas dat groeit uit miniknollen (PB1) kan al voor de oogst (zwaar) besmet zijn met SRP. In het lopende PPS onderzoek (Strategische kennis

voor de preventie van bacterieziekten in de pootaardappelteelt, AF18034) werden gedurende twee jaar bij vijf pootgoedtelers (A-E), 100 of 200 individuele planten van het ras Agria per teler bemonsterd en geanalyseerd op SRP die zwartbenigheid kunnen veroorzaken. Dit gebeurde aan het einde van het groeiseizoen. Per plant werden de topbladeren, de basis van de hoofdstengels en de knollen apart verzameld. In 2019 werden slechts in een lage incidentie zwakke reacties gevonden, voornamelijk met *P. parmentieri*. Echter in 2020, toen de weersomstandigheden gunstiger waren voor SRP, werden bij twee telers (D en E) opvallend hoge percentages met *P. parmentieri* in het PB1 gewas gevonden. Tegelijkertijd was bij deze telers een nog hoger percentage besmet met *P. brasiliense*, de variant die nu verantwoordelijk is voor ca. 90% van alle zieke planten: 40-45% van de knolmonsters en 8% van de loofmonsters was positief voor *P. brasiliense*. Opvallend was dat planten die in het loof besmet waren, zelden besmettingen in de knollen of stengels lieten zien. Dit wijst er op dat er in elk geval ook besmettingen vanuit de lucht plaatsvinden. Immers, wanneer de loofinfecties vanuit de grond zouden komen, zou je verwachten dat ook de knollen en stengels besmet zouden zijn. In 2021, een nat jaar met veel bacterieproblemen, werden alleen bladmonsters verzameld bij telers D en E. Opnieuw werden hoge percentages besmette bladeren gevonden (teler D 45% , teler E 21%). De mate van infectie van een PB1 gewas kan dus sterk verschillen per seizoen en per teler.

Er zijn verschillende (potentiële) infectiebronnen en carriers van SRP in de literatuur beschreven, zoals selectiekarren, selecteurs, loofklappers, insecten, aerosolen, regenwater en oppervlaktewater (Toth et al., 2021, Czajkowski et al., 2011). Echter, het belang van de afzonderlijke bronnen in de epidemiologie van SRP is onbekend, mede omdat in de tijd dat het onderzoek uitgevoerd werd, adequate forensische methoden ontbraken. Omdat er verschillende infectiebronnen tegelijk aanwezig kunnen zijn, kon de link tussen bron en gevonden infectie niet betrouwbaar worden gelegd.

3.1. Infecties vanuit grond. Er zijn aanwijzingen dat SRP niet langdurig in de grond kunnen overleven, maar een definitief antwoord hierop kan nog niet worden gegeven. Experimenten waarbij gesuspendeerde bacteriën aan grond zijn toegevoegd, lieten zien dat populaties *P. carotovorum*, *P. atrosepticum* en *Dickeya dianthicola* al vrij snel (weken tot maanden) in grond met uitplaattechnieken niet meer aantoonbaar zijn (Czajkowski et al., 2011, Van der Wolf, 1994, R. et al., 1995, Armon et al., 1995). In hoeverre besmette gewasresten een rol spelen bij de overleving van SRP is niet duidelijk. Dit zal o.a. afhangen van de snelheid van vertering van gewasresten. Toen residuen van geïnfecteerd aardappelmateriaal aan grond werden toegevoegd, werden er na een jaar geen levende bacteriën gevonden (Boomsma et al., 2012). Echter, in surveys in Schotland naar grondbesmettingen werden er incidenteel wel vrij levende cellen van *P. carotovorum* in grond gevonden, ook op percelen waar een jaar geen aardappels meer hadden gestaan (Perombelon & Hyman, 1989). Ook in recent onderzoek door WUR werd aangetoond dat DNA sequenties van *Pectobacterium* soorten nog in de grond gedetecteerd kunnen worden, zelfs als er een aantal jaren geen aardappelgewas op is geteeld (ongepubliceerde gegevens). Dit kan duiden op (meerjarige) overleving, maar het zou ook achtergebleven DNA van dode cellen kunnen zijn, of een herintroductie van de bacterie vanuit de lucht of vanuit een gewas dat in rotatie met de aardappel is geteeld. Verder viel op in een lopend PPS project dat van veel PB1 planten wel de knollen, maar niet het loof besmet was. Dit wijst op een infectie vanuit de grond.

De bacterie zou in associatie met plantmateriaal (meerjarige onkruiden, gewasresten en aardappelopslag) in de grond kunnen overleven. Studies naar infecties van onkruiden laten zien dat in de rhizosfeer veel bacteriën voorkomen die tot het geslacht *Pectobacterium* behoren, maar een groot deel van deze populaties kan geen zwartbenigheid veroorzaken. *Dickeya* werd slechts incidenteel in de rhizosfeer gevonden.

Als er al grondgebonden inoculum aanwezig is voor aanvang van het poten, is de verwachting dat de dichtheden van de ziekteverwekkers laag zullen zijn. De vraag is of transmissie van deze lage dichtheden naar de ondergrondse delen van de plant relevant is in de epidemiologie van SRP.

3.2. Infecties vanuit de lucht. Er zijn verschillende bronnen geïdentificeerd die een rol kunnen spelen bij loofbesmettingen. Een potentieel belangrijke infectiebron is de aanwezigheid van besmette aardappelgewassen die groeien in de nabijheid van een SRP-vrij gewas. Vaak worden stammen van verschillende generaties aanpalend geteeld, waardoor besmettingen in theorie rond blijven gaan op een

bedrijf. De besmettingen kunnen vervolgens door verschillende carriers worden overgedragen. De aanwezigheid van inoculum is o.a. vastgesteld in aerosolen (maar alleen tijdens het loofklappen) (Boomsma et al., 2012), in en op insecten (Rossmann et al., 2018, Kloepper et al., 1981), en op machines tijdens het loofklappen (Boomsma et al., 2012). Ook mensen en dieren zouden SRP kunnen overdragen via kleding, schoeisel, veren of vacht. mogelijk dat SRP zich kunnen verspreiden via selectiewerkzaamheden, waarbij zieke planten in het veld worden opgespoord en daarna verwijderd (inclusief de knollen). Het uitselcteren van viruszieke planten is noodzakelijk om de virusdruk te verlagen. Bij het uitselcteren van bacteriezieke planten is het de vraag of het middel niet erger is dan de kwaal. Om dit goed te kunnen beoordelen, zijn accurate metingen nodig, en onderzoek uit het verleden heeft daarover nog onvoldoende uitsluitel gegeven (Boomsma et al., 2012).

SRP zijn in het verleden in de VS en het VK gedetecteerd in regenwater (Franc & DeMott, 1998, McCarter Zorner et al., 1984). Bij een survey in Nederland in 2021 en 2022, waarbij in totaal 33 regenmonsters, verzameld op 10 plaatsen verspreid over Nederland, werden geanalyseerd, werd er in één monster een besmetting gevonden. Dit regenwater monster was wel vervuild geraakt met ingewaaid gronddeeltjes. Oppervlaktewater dat voor irrigatie wordt gebruikt, kan ook besmettingen overdragen (Potrykus et al., 2016, Harrison et al., 1987). Echter, in de Nederlandse pootgoedteelt wordt niet geïrrigeerd met oppervlaktewater i.v.m. de risico's op bruinrot.

In conclusie, het belang van deze mogelijke besmettingsbronnen in de epidemiologie van SRP is nog onbekend en zal afhangen van de mate van besmetting van de bron, het moment in de teelt (voor en na opkomst), de incidentie van de besmettingen, en de wijze van het contact met de plant. Als carrier lijken vooral insecten en de mens (tijdens selectiewerkzaamheden) belangrijk te kunnen zijn.

3.3. Kolonisatie van planten. Inoculum vanuit de lucht kan rechtstreeks op de grond terecht komen en via de grond de knol infecteren. In experimenteel onderzoek is infectie van knollen na depositie op de grond wel aangetoond voor *Pectobacterium*-, maar nog niet voor *Dickeya*-soorten (WUR, ongepubliceerd onderzoek). SRP kunnen ook vanuit de lucht landen op het loof, het blad binnendringen via beschadigingen of via natuurlijke openingen (huidmondjes/hydathoden) en zich daarna in het loof vermenigvuldigen (Czajkowski et al., 2010, Kastelein et al., 2020). Resultaten uit het lopende PPS project laten zien dat ook in de praktijk (telers D en E) zowel jong als oud blad aan het einde van het groeiseizoen (zwaar) besmet kan zijn met SRP. De dichtheden variëren sterk van $10 - 10^6$ kve per gram bladmateriaal. Bij hoge inoculum dichtheden bestaat er een klein risico dat de SRP zich via het vaatsysteem naar beneden verplaatsen naar de (dochter)knollen (Kastelein et al., 2020). In theorie kunnen de bacteriën al tijdens de gewasgroei uit het loof naar buiten lekken en via regenwater de grond besmetten. Dit is echter nooit in experimenteel onderzoek aangetoond. Het grootste gevaar op besmetting van knollen vanuit besmet loof ontstaat bij het loofklappen, wanneer loofdeeltjes boven de knollen komen te liggen. De bacteriën kunnen zich in het afgestorven loof sterk vermenigvuldigen en via regenwater de grond in lekken waarna infectie van de (dochter)knollen kan plaatsvinden (Kastelein et al., 2020). Echter, deze infectieroute kan niet verklaren waarom het loof van een PB1 gewas al tijdens de gewasgroei (voor loofvernietiging) geïnfecteerd kan raken.

In het lopende project is veldonderzoek uitgevoerd naar de risico's van loofinfecties. Een éénmalige bespuiting van jonge aardappelplanten met een relatief lage dosis van *P. brasiliense* (10^3 kve per plant) was al in staat om bladinfecties te veroorzaken. Bij een dosis van 10^5 kve per plant ontstonden symptomen tijdens het groeiseizoen. Tijdens de loofinfecties kwam een deel van het inoculum op de grond terecht, dus de precieze wijze van kolonisatie van de plant (boven- of ondergronds) is onduidelijk. De besmettingen verspreiden zich tijdens het groeiseizoen vanuit de geïnoculeerde naar de met water behandelde planten, ook ondergronds. Het experiment laat zien dat infecties vanuit de lucht een groot risico vormen.

4. Kennis lacunes. De teler weet niet welke infectiebronnen bepalend zijn voor de snelle infecties van zijn kostbare PB1 gewas met SRP en daardoor ook niet of en hoe hij deze infectiebron kan vermijden of uitschakelen. Omdat er verschillende bronnen verantwoordelijk kunnen zijn voor de introductie, is het nodig om de bacterie tot op stam-niveau te identificeren. De ontwikkeling van metagenomica-technieken op basis van high throughput sequencing maakt het mogelijk om het relatieve belang van de bronnen te onderzoeken.

5. *Deliverables*. De kennis die in dit project gegenereerd wordt stelt de teler potentieel in staat om introducties van een PB1 gewas met SRP te vermijden. Door ook de volgende generaties te isoleren van infectiebronnen kunnen infecties lange tijd vermeden worden en kan pootgoed meer generaties vermeerderd worden. De kosten als gevolg van klassenverlagingen en afkeuringen worden gereduceerd. Het project geeft ook inzicht in de toepasbaarheid van metagenomica technieken in studies naar infectiebronnen en verspreiding van pathogenen.

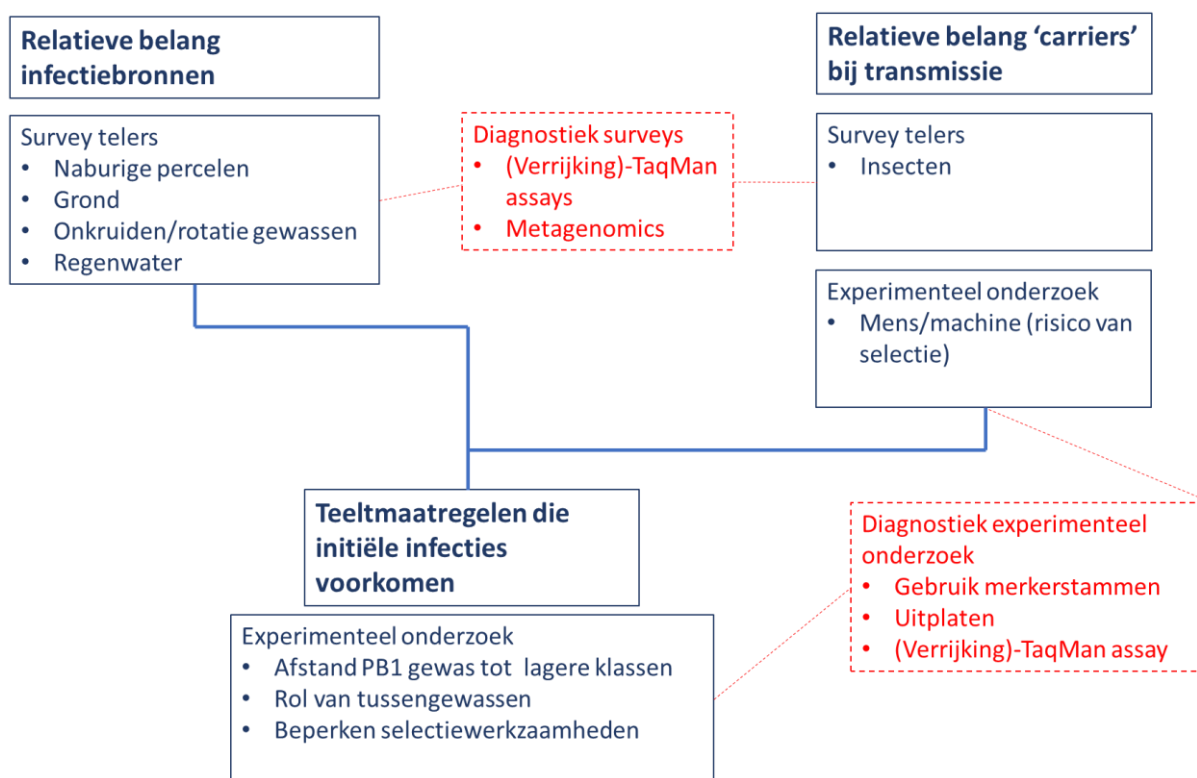
Literatuur

- Armon R, Dosoretz C, Yoirish A, Shelef G, Neeman I, 1995. Survival of the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in sterile and non-sterile soil, sand and their admixture. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 513-8.
- Boomsma D, Kastelein P, Van Der Zouwen PS, *et al.*, 2012. Het project "Deltaplan *Erwinia* Deel C - Pootaardaapelen. Eindrapport van het onderzoek 209-2012. In. Den Haag: Nederlandse Aardappel Organisatie, 104 pages.
- Czajkowski R, De Boer WJ, Van Veen JA, Van Der Wolf JM, 2010. Downward Vascular Translocation of a Green Fluorescent Protein-Tagged Strain of *Dickeya* sp. (Biovar 3) from Stem and Leaf Inoculation Sites on Potato. *Phytopathology* **100**, 1128-37.
- Czajkowski R, Pérombelon MCM, Jafra S, *et al.*, 2015. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Annals of Applied Biology* **166**, 18-38.
- Czajkowski R, Perombelon MCM, Van Veen JA, Van Der Wolf JM, 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology* **60**, 999-1013.
- Dupuis B, Nkuriyingoma P, Gijsegem FV, 2021. Economic impact of *Pectobacterium* and *Dickeya* species on potato crops: A review and case study. In. *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*. Springer, 263-82.
- Franc GD, Demott PJ, 1998. Cloud activation characteristics of airborne *Erwinia carotovora* cells. *Journal of Applied Meteorology* **37**, 1293-300.
- Harrison MD, Franc GD, Maddox DA, Michaud JE, Mccarter Zorner NJ, 1987. Presence of *erwinia-carotovora* in surface water in north america. *Journal of Applied Bacteriology*. 1987; **62**, 565-70.
- Kastelein P, Förch M, Krijger M, Van Der Zouwen P, Van Den Berg W, Van Der Wolf J, 2020. Systemic colonization of potato plants resulting from potato haulm inoculation with *Dickeya solani* or *Pectobacterium parmentieri*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1-15.
- Klopper JW, Brewer JW, Harrison MD, 1981. Insect transmission of *erwinia-carotovora-var-carotovora* and *erwinia-carotovora-var-atroseptica* to potato plants in the field. *American Potato Journal*. 1981; **58**, 165-75.
- Mccarter Zorner NJ, Franc GD, Harrison MD, *et al.*, 1984. Soft rot *erwinia* bacteria in surface and underground waters in southern scotland uk and in colorado usa. *Journal of Applied Bacteriology*. 1984; **57**, 95-106.
- Perombelon MCM, Hyman LJ, 1989. Survival of soft rot coliforms *erwinia-carotovora-ssp-carotovora* and *erwinia-carotovora-ssp-atroseptica* in soil in scotland uk. *Journal of Applied Bacteriology*. 1989; **66**, 95-106.
- Potrykus M, Golanowska M, Sledz W, *et al.*, 2016. Biodiversity of *Dickeya* spp. isolated from potato plants and water sources in temperate climate. *Plant Disease* **100**, 408-17.
- R. A, C. D, A. Y, G. S, I. N, 1995. Survival of the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in sterile and non-sterile soil, sand and their admixture. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 513-8.
- Rossmann S, Dees MW, Perminow J, Meadow R, Brurberg MB, 2018. Soft rot *Enterobacteriaceae* are carried by a large range of insect species in potato fields. *Applied and Environmental Microbiology* **84**.
- Toth I, Barny M-A, Czajkowski R, *et al.*, 2020. *Pectobacterium* and *Dickeya* Taxonomy and Evolution. In: Van Gijsegem F, Van Der Wolf, J, Toth, Ik, ed. *Plant diseases caused by Dickeya and Pectobacterium species: a review* Dordrecht, the Netherlands: Springer, In Press.
- Toth IK, Barny M-A, Brurberg MB, *et al.*, 2021. *Pectobacterium* and *Dickeya*: Environment to Disease Development. In. *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*. Springer, 39-84.
- Van Der Wolf JM, 1994. *Evaluation of serological methods for detection of Erwinia chrysanthemi in potato peel extracts*. Leiden: Leiden University.
- Van Der Wolf JM, Acuña I, De Boer SH, *et al.*, 2021. Diseases Caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* Species Around the World. In. *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*. Springer, 215-61.
- Van Der Wolf JM, De Haan EG, Kastelein P, *et al.*, 2016. Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on potato compared with that of other *Pectobacterium* and *Dickeya* species under climatic conditions prevailing in the Netherlands. *Plant Pathology*, n/a-n/a.

Bijlage 2: Uitgebreid meerjarig werkplan

Het doel van dit project is om kennis verder te verdiepen over a. het relatieve belang van bronnen die verantwoordelijk zijn voor initiële infecties met SRP (lagere klassen pootgoed, aardappelopslag en andere waardplanten), b. het relatieve belang van 'carriers' bij de transmissie zoals insecten, machines en de mens (denk aan selectiewerkzaamheden), en c. teeltmaatregelen die de risico's op initiële infecties van het aardappelgewas met SRP kunnen beperken. Het onderzoek hiernaar zal o.a. afhangen van de resultaten in de onderdelen a en b. Gedacht wordt aan inrichting van het bouwplan, zoals de minimale afstand van een miniknollengewas tot andere (aardappel)gewassen, het plaatsen van een hoog buffergewas of het vermijden van selectiewerkzaamheden (Figuur 2).

In het onderzoek wordt steeds gebruik gemaakt van miniknollen van het veel gebruikte cultivar Agria, een ras dat relatief gevoelig is voor SRP.



Figuur 2. Overzicht van de werkzaamheden.

1. Infectiebronnen en carriers.

1.1. Onderzoek via surveys bij telers

Dit bemonsteringen tijdens de surveys worden uitgevoerd door medewerkers van WUR, HZPC, Agrico en NAK, o.l.v. de WUR. De verrijking TaqMan analyses van de monsters worden in overleg door NAK of WUR uitgevoerd.

1.1.1. Infectiebronnen (jaar 1 en 2). In het lopende project zijn twee telers (D en E) geïdentificeerd die vaak te maken hebben met ernstige infecties van hun PB1 gewas. Bij deze telers worden in de directe omgeving van hun PB1 gewas potentiële infectiebronnen bemonsterd. Vóór het poten worden van elke partij die binnen een afstand van 100 meter van het PB1 gewas ligt, knollen onderzocht op SRP (aantal knollen in overleg met de teler) m.b.v. een verrijkings-TaqMan, om het infectieniveau van de lagere klassen te kunnen bepalen. Ook van de PB1 gewassen wordt een monster onderzocht om nogmaals te controleren of de miniknollen werkelijk SRP-

vrij zijn. Tijdens de teelt worden potentiële infectiebronnen bemonsterd waaronder het loof van de PB1 gewassen en nabij gelegen aardappengewassen, grond (inclusief organisch materiaal), onkruiden, en insecten. Oudere bladmonsters, die volgens lopend onderzoek een hogere infectie-incidentie kennen, worden geanalyseerd zowel met (kwalitatief), als zonder verrijking (kwantitatief). De monsters worden eens in de twee weken genomen, te beginnen vlak na opkomst. Onkruidmonsters worden genomen in een nog niet gesloten gewas. Blad en rhizosfeer monsters van de onkruiden worden geanalyseerd met een verrijking TaqMan assay. Grondmonsters worden vlak voor poten genomen op een diepte van 5-15 cm, en geanalyseerd met een verrijking TaqMan assay. Ook wordt opnieuw regenwater in plastic bakken verzameld, geplaatst op 1.5 meter hoogte in een grasland of braakliggende akker, op tenminste 100 meter van gebouwen vandaan, en in de omgeving van telers D en E.

1.1.2. Carriers (jaar 1). De rol van *insecten* wordt op twee verschillende manieren onderzocht. In de eerste plaats door verouderend blad te analyseren van 200 planten van een miniknollengewas (aan het einde van het groeiseizoen) die in een gaaskooi zijn gekweekt bij telers D en E. Hierbij is de kans sterk gereduceerd dat er besmettingen met insecten kunnen plaatsvinden. In de tweede plaats worden insecten verzameld van gele plakvallen bij telers D en E op twee plaatsen per gewas en geplaatst op een hoogte van 60 cm boven de grond. In pilot experimenten werden op deze hoogte de hoogste aantallen insecten gevonden. De insecten worden gedurende het groeiseizoen op verschillende tijdstippen in het PB1 gewas verzameld vanaf gele plakstroken, en geanalyseerd met een verrijking TaqMan assay. Met name zal worden gekeken naar overdracht door vliegen, die volgens Noors onderzoek belangrijke carriers zijn van SRP (Rossmann et al., 2018). Om de overleving van SRP op vliegen te kunnen onderzoeken worden (vlees)vliegen kunstmatig besmet door dode vliegen op plakstroken, maar ook levende vliegen (na verdoving) te bespuiten met een suspensie van de rif-stam van *P. brasiliense*. De bacteriedichtheden op de vliegen zullen na inoculatie in de tijd worden bepaald d.m.v. uitplaten.

1.1.3. Track & trace technieken (jaar 2 en 3)

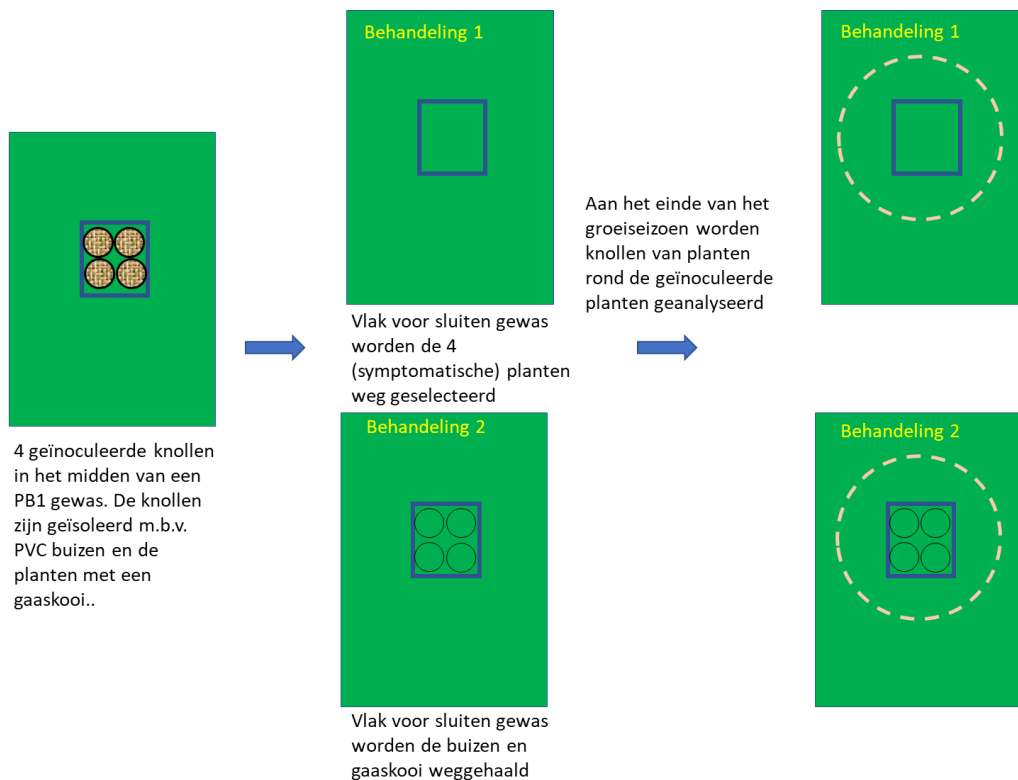
Een selectie van de monsters uit de survey bij telers D en E die positief zijn in de verrijking-TaqMan wordt met methoden voor 'track & trace', gebaseerd op een metagenomica benadering, geanalyseerd. Hiervoor wordt m.b.v. Illumina NovaSeq sequencing het totale DNA van de monsters geanalyseerd. De ziekteverwekker kan daarmee tot op stamniveau kan worden geïdentificeerd. Hiervoor worden verrijkte monsters gebruikt omdat er dan weinig DNA van de waardplanten wordt mee gesequenced. In een pilot uitgevoerd in een vorig project zijn hiermee al goede ervaringen opgedaan. De sequenties van besmettingen in het PB1 gewas worden vergeleken met de sequenties van de positief bevonden infectiebronnen.

1.2. Experimenteel onderzoek naar infectiebronnen en carriers.

1.2.1. Selectie (jaar 1 en 2). Onderzoek naar verspreiding van de bacterie tijdens selectiewerkzaamheden wordt uitgevoerd in experimenteel onderzoek bij de WUR, waarbij gebruik wordt gemaakt van een spontane rifampicine-resistente merkerstam van *P. brasiliense*. Er worden twee soorten experimenten uitgevoerd. In het eerste type experiment wordt gekeken naar verspreiding als gevolg van het weghalen van zieke planten (versmering door de selecteur). In het tweede type experiment wordt zowel het effect van het rijden met de selectiekar als het weghalen van de zieke planten op versmering onderzocht.

Versmering door de selecteur. Midden in een PB1 gewas worden miniknollen gepoot die geïnoculeerd zijn. Deze geïnoculeerde planten worden tijdens de gewasgroei geïsoleerd van de overige planten door er een PVC buis (diameter 40 cm) om de geïnoculeerde knol in te graven (om verspreiding ondergronds tegen te gaan) en deze ook in een gaaskooi te plaatsen (tegen bovengrondse verspreiding). De planten worden vlak voor sluiting van het gewas al dan niet verwijderd via selectie (behandelingen 1 en 2). De veldjes van behandelingen 1 en 2 liggen op ruime afstand van elkaar om kruisbesmettingen te voorkomen. De mate van besmetting van het loof en de moederknol van de geïnoculeerde plant wordt bepaald d.m.v. uitplaten (bronsterkte). In veldjes waaruit de geïnfecteerde planten niet worden verwijderd, wordt tijdens de selectie, de buis en gaaskooi weggehaald, maar niet de geïnfecteerde planten, om verspreiding van de bacterie toe te staan. Aan het einde van het groeiseizoen worden per veldje planten rond de (verwijderde) geïnoculeerde plant geoogst en per plant de infectie-incidentie van de knollen en oudere bladeren bepaald m.b.v. een verrijking TaqMan assay. Op deze

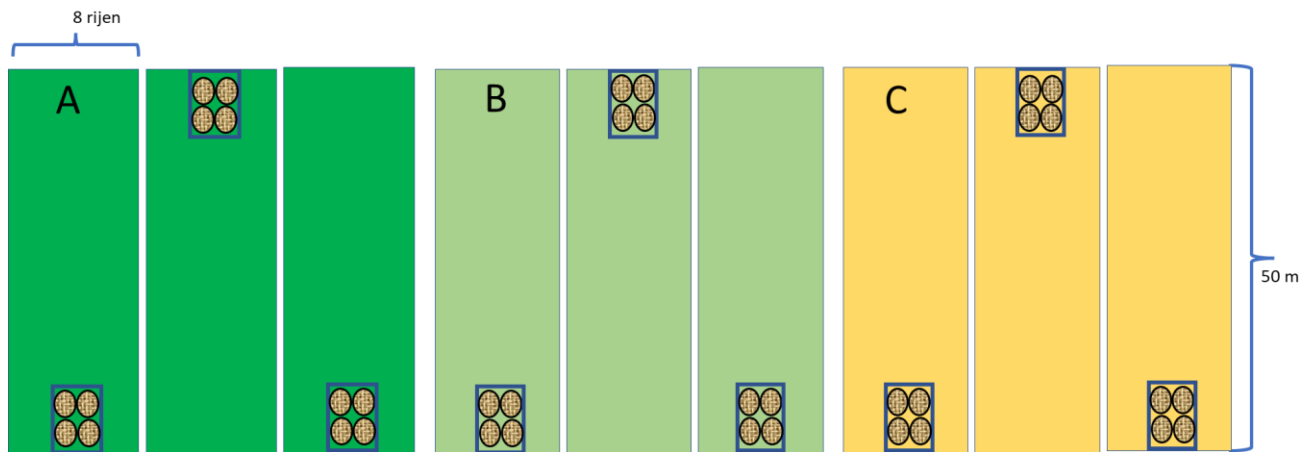
wijze wordt het effect van selectie t.o.v. niet selecteren met elkaar vergeleken. Het experiment wordt tijdens twee groeiseizoenen uitgevoerd.



Figuur 3. Onderzoek naar effect selecteren.

Versmering door selectiekar en selecteur. Hiervoor worden per behandeling drie veldjes van 8 rijen van 50 meter aangelegd (Figuur 4). De planten worden behandeld zoals gebruikelijk in de pootgoedteelt. In elk veldje worden 4 geïnoculeerde knollen vooraan in de rijen geplaatst, op dezelfde wijze geïsoleerd van de andere PB1 planten (PVC buizen, gaaskooi), als beschreven in het vorige experiment. Ook worden er veldjes geplant met water-geïnfiltreerde knollen. De veldjes (A, B en C) worden gescheiden van elkaar door een buffergewas om kruisbesmettingen te voorkomen.

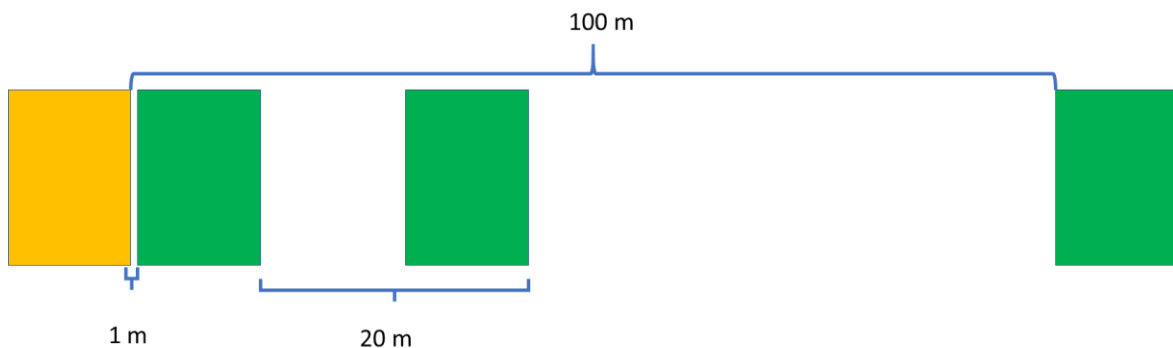
Vlak na sluiting van het gewas en vlak voor selectie worden de buizen/gaaskooi verwijderd. In behandeling A wordt tijdens het groeiseizoen per veldje achter elkaar driemaal met een selectiekar op een praktijkconforme wijze door een plotje gereden. De selectiekar wordt na elke keer rijden door een plotje schoon gemaakt. Bij de eerste ronde worden de zieke planten verwijderd. Bij de twee andere rondes worden er schone planten verwijderd dicht bij de verwijderde zieke planten, om te zorgen voor extra verspreiding. In behandeling B blijven de zieke planten in het veld staan zonder dat er selectiewerkzaamheden plaatsvinden. In behandeling C, met water-geïnfiltreerde knollen, worden er ook geen selectiewerkzaamheden verricht. Voor de selectie wordt de dichtheid bepaald van de geïnoculeerde planten. Direct na de selectie, die in een droog (opgedroogd) gewas wordt uitgevoerd, wordt er loof bemonsterd van planten op toenemende afstand van de zieke planten om de verspreiding direct na selectie te kunnen bepalen. Aan het einde van het groeiseizoen wordt de infectie-incidentie van de knollen van de loof-bemonsterde planten bepaald op toenemende afstand van de geïnoculeerde planten. De bladeren en de knollen van individuele planten worden geanalyseerd.



Figuur 4. Vier geïnoculeerde knollen worden geplaatst in het midden van een 3 plotjes met miniknollen. De knollen zijn geïsoleerd m.b.v. PVC buizen en de planten met een gaaskooi. Na sluiting van het gewas wordt er in A per plot 3x achter elkaar geselecteerd, waarbij tijdens de eerste ronde de zieke planten worden verwijderd en daarna schone planten. In B wordt niet geselecteerd. In C wordt ook niet geselecteerd, daarin staan niet-geïnoculeerde planten als controle

2. Mogelijkheden van ziektebeheersing (jaar 2 en 3)

In de praktijk wordt een PB1 gewas vaak geteeld in de directe nabijheid van een PB2 gewas en zelfs van lagere klassen. Als een nabijgelegen gewas besmet is, is het risico op infecties van het PB1 gewas groot. Op deze wijze blijven infecties in stand. Ook in vorig onderzoek (Deltaplan Erwinia) naar de mogelijkheid om besmettingen via bedrijfshygiëne te voorkomen, lagen geïnfecteerde velden dicht bij een PB1 gewas. De vraag is op welke afstand een PB1 gewas moet liggen van een besmet gewas om risico's op infecties te verkleinen of liever nog uit te sluiten. Om deze vraag te beantwoorden wordt op een proefbedrijf van Wageningen UR veldproeven gedaan (Figuur 4). Een PB1 gewas wordt gepoot op verschillende afstanden van een gewas dat geïnoculeerd is met een merker stam (rifampicine resistent) van *P. brasiliense*, nl. aanpalend (1 m), op 20 meter en op 100 meter afstand van het geïnfecteerde veld. Tijdens de gewasverzorging wordt overdracht van de bacterie zoveel mogelijk voorkomen. In de tussenruimtes wordt of een laag gewas (bijv. suikerbieten), of een hoog opgroeiend gewas (mais of graan) geteeld, waarbij de hypothese is dat besmettingen worden beperkt door een hoog opgroeiend gewas. De besmetting aan het einde van het groeiseizoen wordt bepaald door oudere bladeren te analyseren van (knollen) van individuele planten. Het experiment wordt tijdens twee groeiseizoenen uitgevoerd.



Figuur 4. Onderzoek naar de minimale afstand die nodig is tussen een besmet en een SRP-vrij (PB1) gewas om besmettingen van het PB1 gewas te voorkomen. Een PB1 gewas (groen) wordt op 1, 20 of 100 meter van een gewas gepoot dat besmet is met een merkerstam van *P. brasiliense*. Tussen de PB1 gewassen worden suikerbieten of mais/graan geteeld.

Wat levert het project op?

- Vaststellen van het belang van infectiebronnen verantwoordelijk voor initiële infecties met soft rot Pectobacteriaceae (SRP) en carriers voor overdracht van SRP
- Identificatie en (genetische) karakterisering van stammen van SRP in het Nederlandse aardappel ecosysteem. Dit is van belang om vast te stellen of er nieuwe varianten van SRP de keten binnen sluipen.
- Kennis over de gebruikswaarde van metagenomica technieken in het onderzoek naar infectiebronnen en carriers van bacteriële ziekteverwekkers.
- Kennis over de overleving van SRP op insecten
- Inzicht in de potentiële risico's van selecteren van zieke planten voor verspreiding van SRP binnen een gewas en vanuit een geïnfecteerd naar een SRP-vrij gewas
- Teeltadviezen met aanbevelingen over
 - de afstand waarop PB1 gewassen geteeld moet worden van lagere klassen.buffergewassen die verspreiding naar SRP-vrije gewassen kunnen beperken.
 - Over selectie van bacteriezieke planten
- Tenminste twee artikelen in vakbladen, tenminste twee lezingen voor doelgroepen in Nederland, teeltadviezen op een website, een uitgebreid eindrapport, tenminste één wetenschappelijke publicatie