

Stengelaaltjesrassen in bolgewassen

Literatuurstudie, identificatie- en waardplantexperimenten naar het voorkomen van *D. dipsaci* rassen in tulp, narcis, hyacint en andere gewassen

Auteur(s): Joop van Doorn, Evert Brommer, Gerrie Wieger, Astrid de Boer, Robert Dees

© 2009 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

PPO Publicatienr.; € ...,...



**landbouw, natuur en
voedselkwaliteit**

Projectnummer: LNV BO Fytosanitair (BO-06-005-001-09)
(PPO 3234021708)

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bollen, Boomkwekerij en Fruit

Adres : Prof. van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse
: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252-462121
Fax : 0252-462100
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
SUMMARY	7
1 INLEIDING.....	9
1.1 BESTAANDE KENNIS.....	9
1.2 DOELSTELLINGEN	11
1.3 AFKORTINGEN	11
2 LITERATUURSTUDIE	13
2.1 HISTORIE	13
2.2 DOEL EN WERKPLANNEN.....	13
2.3 HET RASSENCONCEPT	14
2.4 MOLECULAIRE EN BIOCHEMISCHE GEGEVENS OVER HET BESTAAN VAN RASSEN	14
2.5 WAARDPLANTEN	15
2.6 TECHNIEKEN VOOR WAARDPLANTONDERZOEK: Kweek van <i>D. DIPSACI</i> EN INOCULATIE-TECHNIEKEN	16
2.7 LITERATUUR	17
3 IDENTIFICATIE VAN RASSEN.....	19
3.1 VERZAMELEN VAN ISOLATEN	19
3.2 KARAKTERISATIE VAN <i>D. DIPSACI</i> -ISOLATEN.....	20
3.3 MERKERS VOOR HET HYACINTENSTENGELAALTJESRAS	21
3.4 LEVENDE BEWARING IN INGEGRAVEN CONTAINERS (INUNDATIEBAKKEN).....	22
3.5 DISCUSSIE	23
4 INFECTIE-EXPERIMENTEN IN DE KAS	25
4.1 ACHTERGROND	25
4.2 POTPROEF AGV	25
4.2.1 <i>Materiaal en methoden</i>	25
4.2.2 <i>Beginbesmetting (Pi)</i>	26
4.2.3 <i>Eindbesmetting (Pf) en vermeerdering Pf/Pi</i>	27
4.3 PPO-LISSE: KASEXPERIMENTEN	28
4.3.1 <i>Gang van zaken, isolaten en cultivars</i>	28
4.3.2 <i>Resultaten</i>	29
4.4 CONCLUSIE EN DISCUSSIE	30
5 LOKPROEVEN	33
5.1 ACHTERGROND	33
5.2 PROEFOPZET	33
5.3 RESULTATEN.....	34
5.4 DISCUSSIE	36
6 PROEFVELDEXPERIMENTEN (INUNDATIEBAK-EXPERIMENTEN).....	37
6.1 ACHTERGROND	37
6.2 PROEFOPZET	37
6.3 RESULTATEN.....	38
6.4 CONCLUSIES	41
7 DISCUSSIE	43

7.1	DISCUSSIE BETREFFENDE DE RESULTATEN BINNEN DIT PROJECT.....	43
7.2	ALGEMENE DISCUSSIE: KENNISHIATEN EN ONDERWERPEN VAN VERVOLGONDERZOEK.....	44
7.2.1	<i>Inventarisatie factoren die (mogelijk) bijdragen aan toename stengelaaltjes-besmettingen</i>	44
7.2.2	<i>Beheersingsmethoden (grondontsmetting, “koken”, alternatieven).....</i>	44
7.2.3	<i>Resistentie tegen stengelaaltjes</i>	45
7.2.4	<i>Problemen in andere vollegrondsgewassen</i>	45
7.2.5	<i>Data betreffende langdurige overleving.....</i>	45
7.2.6	<i>Bekendheid van richtlijnen hoe te handelen met besmette partijen en percelen (brochure).....</i>	46
7.2.7	<i>Ontwikkeling van toetsen op (plant-) materialen en bemonsteringsmethoden.....</i>	46
7.2.8	<i>Bemonstering uitschot plantgoed/verdacht plantmateriaal bij bv. partijen met voorgeschiedenis: tracking and tracing.....</i>	46
7.2.9	<i>Fundamenteel onderzoek.....</i>	46
8	OVERIGE STENGELAALTJESPROJECTEN EN PLANNEN	49
8.1	OVERIGE STENGELAALTJESPROJECTEN	49
8.2	PLANNEN	50
9	LITERATUUR.....	51
10	OUTPUT	53
11	BIJLAGEN	55

Samenvatting

In Nederland veroorzaakt Ditylenchus dipsaci een quarantaineziekte in bloembolgewassen: narcis, tulp, hyacint en (sier-) ui. Bij aantreffen van deze nematode (stengelaaltje) op een bedrijf worden, onder toezicht van PD en keurmeesters van de Bloembollenkeuringsdienst, verregaande en kostbare maatregelen getroffen waaronder vernietiging van plantgoed en braakliggen of sanitatie van getroffen percelen. Het stengelaaltjesprobleem is chronisch en zeer lastig te beheersen.

In de bloembollensector onderscheidt men vanouds op grond van waardplantbereik een vijftal rassen: het tulpen-, narcissen-, hyacinten-, uien- en het knoflookstengelaaltje. Wanneer het rassenconcept, wat zeker niet ondersteund wordt door alle wetenschappers, inderdaad geldt, dan zou een specifieke toets op rasniveau op termijn kunnen leiden tot gedifferentieerde maatregelen) wanneer bv. in narcis alleen het narcissenstengelaaltje wordt aangetroffen. Dan zou het perceel geschikt zijn om bv. tulp of hyacint te telen. In dit onderzoek is onderzocht, na een literatuuronderzoek, of via kasexperimenten, beperkte veldexperimenten (in zg. proefbakken of inundatiebakken) en via lokproeven rassen aantoonbaar zijn bij verzamelde stengelaaltjespopulaties.

Via een literatuuronderzoek, met het accent op de "oude" literatuur betreffende stengelaaltjesrassen (omstreeks 1950) en waardplantbereik (vooral gegevens en publicaties/rapporten van Seinhorst) is geconcludeerd dat er aanwijzingen zijn voor het bestaan van verschillende rassen met een deels afgebakend waardplantbereik.

Er zijn een 15-tal populaties stengelaaltjes verzameld van de verschillende waardplanten (behalve sierui), en tevens enkele populaties afkomstig van Phlox, Hosta en knolselderij. Een deel hiervan is gebruikt bij de waardplant- en lokproeven. Het bleek lastig om populaties goed in stand te houden, mede doordat een aantal proefbakken (inundatiebakken) niet goed waterdoorlatend bleken te zijn.

Er zijn alleen merkers beschikbaar voor het identificeren van het hyacintenstengelaaltje; voor tulpenstengelaaltje en narcissenstengelaaltje is er geen betrouwbare merker of DNA-techniek gevonden, waarschijnlijk door het bestaan van zg. mengpopulaties.

In kasexperimenten zijn de gewassen aardappel, ui, boon en suikerbiet naast tulp, narcis en hyacint geïnoculeerd met populaties stengelaaltjes, waaronder ook populaties van ui. Alleen bij ui werd een significant duidelijke waardplantspecificiteit gevonden; de verwachte waardplantspecificiteit in de bolgewassen kwam niet duidelijk naar voren. Suikerbiet was een matige waard, terwijl aardappel een matige waard bleek te zijn over alle geteste rassen. Bij het uitvoeren van dergelijke experimenten met vollegrondgewassen in een kas zijn vraagtekens gezet vanwege de ongewone condities.

In de veldexperimenten (inundatiebakken) bleek ui waard voor alle geteste populaties, terwijl gerst en aardappel niet gevoelig waren.

In lokproeven is vastgesteld dat stengelaaltjes reageren op plantexudaten en er zijn aanwijzingen die duiden op (lichte) waardpreferentie. Uit een serie experimenten met tulpenstengelaaltjes (tsa) en narcissenstengelaaltjes (nsa) kan de voorzichtige conclusie worden getrokken dat tsa aangetrokken wordt door exudaten van tulp en hyacint. Nsa wordt aangetrokken door narcis en afgestoten door hyacint en in mindere mate door tulp. Als nsa de keuze krijgt tussen narcis en als alternatief tulp of hyacint ligt de voorkeur bij narcis. De vitaliteit van de gebruikte stengelaaltjes bleek een belangrijke factor voor het welslagen van deze lokproeven.

De wisselende gegevens betreffende mogelijke waardplantgevoeligheid voor populaties/rassen stengelaaltjes geeft aan, dat voor eenduidige resultaten experimenten vele jaren moeten worden uitgevoerd op percelen/proefcontainers die zo veel mogelijk homogeen met een basisconcentratie aan stengelaaltjes zijn besmet

Summary

The existence of races within the stem nematode Ditylenchus dipsaci ("stengelaaltje")

The stem nematode *Ditylenchus dipsaci* causes a quarantine disease in flower bulbs in The Netherlands. When found, extensive and expensive measures are taken by the Dutch inspection service. The most important question in relation to control of the disease and governmental regulations is, whether biological races within the species *D. dipsaci* do exist, especially in flower bulbs. Other questions are, besides effective measures to control the nematodes, information about the host plant range of the proposed races. Also ecological information, for instance on the survival in the soil and spread under different conditions and different crops is needed besides a molecular test to differentiate putative races of *D. dipsaci*. In this project, we tried to answer the question whether or not races exist within *D. dipsaci* (especially within the flower bulbs). A literature search indicated among others that races might exist, and host ranges are designated but are dependent of how experiments are performed. Furthermore, experiments were performed to investigate putative host ranges of several *D. dipsaci* races ("can the narcissus race infect potato, and vice versa?"). By using baiting techniques the existence of races was also investigated ("are individual *D. dipsaci* nematode of the narcissus race attracted to narcissus extracts only, or not?"). In some experiments attraction by the host plant was found. Greenhouse experiments with host plants didn't reveal biological races among *D. dipsaci*-populations as such. These experiments have been repeated under field condition; it proved to be difficult to maintain populations of *D. dipsaci* and to find clear evidence for infection in test plants.

1 Inleiding

Stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*) veroorzaken een quarantaineziekte in Nederland in de bloembollenteelt. De bloembollensector (maar ook andere vollegrondsteelten) vormen een doelwit voor deze nematode. Beheersing is lastig doordat er weinig methoden beschikbaar zijn ter bestrijding van deze nematode in grond. Problemen in het veld met diverse soorten aaltjes worden groter, nu grondontsmetting met cis-dichloorpropeen als bestrijdingsmaatregel niet meer kan worden toegepast. Er is een alternatief toegelaten, metamnatrium in combinatie met dazomet, maar instanties achten de werking tegen diverse aaltjes onvoldoende omdat deze wisselvalliger is en omdat de dieptewerking minder is dan die van cis-dichloorpropeen. De toelatingen van zowel metamnatrium als dazomet zijn sterk gereguleerd en de toelating van beide middelen staat onder druk.

Problemen worden gesignaleerd door o.a. de bloembollensector (knelpunten in het sectorplan Gewasbescherming Bloembollenteelt 2010) en de PD (basismemorandum stengelaaltjes in bloembollen). Alleen al aan taxatieschade van besmette partijen bollen kost het Productschap Tuinbouw gemiddeld ongeveer 1 miljoen euro op jaarbasis.

De overheid wil bestaande fytosanitaire maatregelen onder de loep nemen om mogelijk tot aanpassing van de bestaande maatregelen te komen. Hiervoor is een goede risicoanalyse naast een betrouwbare detectie van groot belang.

Een goede identificatie van deze nematodenrassen evenals mogelijke detectie in plantmateriaal, zaad of grondmonsters ontbreekt grotendeels. Verder is het nog onduidelijk welke waardplanten de verschillende, in Nederland voorkomende, stengelaaltjesrassen kunnen infecteren in verband met de bestaande en toekomstige wisselteelten op percelen. Vanuit de overheid (PD) is het daarom van belang of gedifferentieerde maatregelen voor bedrijven met stengelaaltjes mogelijk zijn in relatie tot het gevonden aaltjesras.

Ditylenchus dipsaci tast bolgewassen aan; de levenscyclus draagt bij aan de langdurige overleving van deze nematodesoort. Zowel de juvenielen als de volwassen aaltjes zijn beweeglijk; aaltjes van het 2e juveniele stadium (J2) verlaten de eitjes waarbij aaltjes van het 4e juveniele (J4) stadium vanuit de grond de plant kunnen binnendringen. Na één vervelling ontstaan hieruit volwassen aaltjes. De J4-generatie is bestand tegen ongunstige omstandigheden en kan voor lange tijd in grond en plantenweefsel overleven. Dit stadium is bij langzame uitdroging droogteresistent: aaltjeswol en kan vele jaren overleven. In aangetaste knollen overleven alle stadia. Het aaltje is reeds actief bij 2 °C; reproductie begint bij 5 °C. Bij 15 °C duurt de cyclus 19 - 23 dagen. Eén vrouwtje legt 200 - 500 eieren, zodat het aaltje zich onder gunstige omstandigheden explosief kan vermeerderen.

De bedreiging voor de bloembollenteelt ligt vooral in de aard van de teelt: de reizende bollenkraam met zijn opplant van het ene perceel naar het andere. Op deze wijze kan deze nematode gemakkelijk verspreid worden.

In enkele andere teelten, zoals die van plantuien geldt ook een quarantainestatus: meldingsplicht, perceelmaatregelen, vernietiging van het plantgoed enz. Remediering van besmette percelen lopen uiteen van jarenlange braak tot aan grondontsmetting. Het is duidelijk dat een stengelaaltjesbesmetting de teler en grondeigenaar veel geld kosten; daarnaast bestaat het risico van herbesmetting zodat regelmatige controle en monsternamen noodzakelijk blijft.

*Vragen die de teler en de PD graag beantwoord zouden zien liggen op het vlak van identificatie op rasniveau, vruchtwisseling (waardplantbereik van populaties/rassen) en beheersing/bestrijding van *D. dipsaci*.*

1.1 Bestaande kennis

De afgelopen jaren zijn verschillende projecten gewijd aan de stengelaaltjesproblematiek in bloembolgewassen (zie ook hoofdstuk 7 en 8).

Als in een gewas stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*) worden gevonden wordt de grond vastgelegd door de PD omdat het een quarantaineorganisme betreft. Er mogen pas weer vatbare bolgewassen geteeld worden als de grond na bemonstering door de PD is vrijgegeven. Dit kan na bestrijding door grondontsmetting of inundatie dan wel na een periode van 6-10 jaar waarin geen bloembolwaardplanten zijn geteeld. PPO heeft de afgelopen jaren onderzoek uitgevoerd naar de epidemiologie van stengelaaltjes (verspreiding verticaal, aanwezigheid in onkruiden en op bedrijven), hittetolerantie en inundatie naast grondontsmetting via verschillende strategieën en middelen (project epidemiologie van stengelaaltjes in bolgewassen; PT-project36119b; van Os et al. 2006)).

Gebleken is dat een chemische grondontsmetting met metamnatrium onvoldoende werkt zonder aanvullende behandeling met dazomet. Maar ook in combinatie is deze grondontsmetting niet afdoende. In vergelijking met chemische grondontsmetting geeft inunderen mogelijk een zekerder bestrijding omdat door die behandeling ook de diepere grondlaag wordt bereikt. De verdeling van stengelaaltjes in de bodem is onderzocht (2002 -2005). Na het rooien van zieke narcissen zijn grondmonsters genomen op verschillende diepten. Stengelaaltjes worden merendeels in de bovenlaag (0-20) aangetroffen; lage aantallen komen voor op 20-40 en 40-60 cm diepte. De werkingsdiepte van chemische grondontsmetting is max. 40 cm. *D. dipsaci* aaltjes zijn aangetroffen in schuurstof en een keer op de porriehoop. Stengelaaltjes kunnen lang op een bedrijf aanwezig blijven; monitoring lijkt noodzakelijk om herbesmettingen te voorkomen. Kan een warmwaterbehandeling stengelaaltjes in narcis afdoden of zijn er temperatuurtolerante (hitte-resistente) populaties? In diverse partijen is overleving gevonden na voorweken gevolgd door 4 uur 47° C. De resultaten hieromtrent zijn niet eenduidig, maar voorweken helpt de behandeling met warm water effectief te zijn. Alternatieve bestrijding zoals biologische grondontsmetting en biofumigatie met Sarepta mosterd (hoewel geen waard) werkte niet in tegenstelling tot inundatie. Onkruiden tussen zieke bollen kunnen hoge aantallen stengelaaltjes bevatten; wat dit precies betekent is onduidelijk. Biofumigatie of biologische grondontsmetting is een nieuwe ontwikkeling waarbij natuurlijke materialen in de grond worden gebracht alwaar bij omzetting stoffen vrijkomen die dodelijk zijn voor aaltjes (en ander bodemleven) en/of voor anaerobe omstandigheden zorgen. Deze methoden zijn perspectiefvol, maar nog onvoldoende praktisch toepasbaar. Het braak houden van een veld om aaltjes te bestrijden is een aanvullende maatregel; de rol van groenbemesters is nog niet duidelijk.

Inundatie is een oplossingsrichting, maar niet voor alle percelen/grondsoorten geschikt. Hier loopt momenteel nog onderzoek naar (zie ook hoofdstuk 8).

Binnen een PT project Identificatie van stengelaaltjesrassen in bloembollen (PT 36119a; van Doorn et al. 2005) zijn gedurende 3 jaar ruim 200 monsters ontvangen uit hoofdzakelijk bolgewassen en voornamelijk narcis. Methoden om stengelaaltjes te isoleren en te bewaren zijn geoptimaliseerd: in water bleken deze bij 4° C tot enkele weken vitaal; ingedroogd op filtreerpapier gaf wisselende (soms enkele jaren, soms enkele dagen) en onbetrouwbare (reproduceerbare) resultaten. Via RAPD en AFLP-analyse zijn merkers gezocht om de verschillende rassen te onderscheiden. De huidige stand van zaken is, dat er een merker is voor het tulpenstengelaaltje, maar in ongeveer 70% van de isolaten een positieve reactie geeft. Een kwantitatieve test gebaseerd op aantallen van een ribosomale gensequentie, bleek achteraf geen goed onderscheid te kunnen geven tussen tulpen- en narcissenstengelaaltje. In deze studie is een merker gevalideerd voor het hyacintenstengelaaltje, dat ook volgens AFLP-analyse in een cluster valt buiten die van de andere stengelaaltjesrassen (tulpe en narcis).

Om stengelaaltjes goed te kunnen bestrijden met een warmwaterbehandeling, dienen de bollen voorgeweekt te worden. Deze voorbehandeling is echter arbeidsintensief en er is risico op verspreiding van Fusarium. Het doel van het onderzoek is om te beoordelen of koud-stomen een geschikte methode is om het bestrijdende effect van een standaard voorbehoedende warmwaterbehandeling van 2 uur bij 45 °C (cultuurkook) tegen stengelaaltjes te verbeteren. Uit het onderzoek "Koudstomen bij voorweken narcis" is gebleken dat koudstomen in de meeste gevallen een betere bestrijding van stengelaaltje gaf. In het onderzoek worden de behandelingen herhaald om zekerheid over de bestrijding te krijgen.

1.2 Doelstellingen

Hoofddoel: opheldering verschaffen over de status van rassen binnen de stengelaaltjes in Nederland (*wat is er bekend over het biologische rassenconcept van *Ditylenchus dipsaci*?*).

Dit zoeken we uit via inventarisatie van het waardplantbereik en -preferentie van gekarakteriseerde stengelaaltjespopulaties (komen er homogene *D. dipsaci* populaties voor in de gewassen? Tast het tulpenstengelaaltje ook aardappel, sier- en plantui, rogge of suikerbiet aan en vice versa? Is de tulp volledig resistent tegen het narcissenstengelaaltje?). Dit zal in vollegrondssituatie worden uitgezocht met de isolaten, gebruikt in 2006 voor kasexperimenten, om de voor bolgewassen nadelige kaseffecten te voorkomen. De achtergrond gegevens van Seinhorst was een aparte studie (Schomaker 2008), en is niet in dit rapport opgenomen.

Via lokproeven is naar een alternatieve identificatie van stengelaaltjesrassen gezocht. Deze aspecten zijn beschreven in de volgende hoofdstukken:

- a. literatuurstudie (HOOFDSTUK 2)
- b. verzamelen en identificatie van populaties stengelaaltjes van diverse achtergrond (HOOFDSTUK 3)
- c. uitvoeren van kas (pot-) experimenten (waardplantbereik van een aantal rassen van stengelaaltjes (HOOFDSTUK 4)
- d. uitvoeren van veldexperimenten (zg. inundatiebakexperimenten) om waardplantbereik in een beperkt aantal cultuurgewassen te meten (HOOFDSTUK 5)
- e. uitvoeren van lokproeven om stengelaaltjesrassen te kunnen onderscheiden (HOOFDSTUK 6)
- f. discussie en evaluatie van kennishiaten betreffende de stengelaaltjesproblematiek (HOOFDSTUK 7)
- g. lopend onderzoek (HOOFDSTUK 8)
- h. extra literatuur (HOOFDSTUK 9)
- i. output (HOOFDSTUK 10)
- j. bijlagen (LNV-flyers) (HOOFDSTUK 11)

1.3 Afkortingen

Tsa = tulpenstengelaaltje

Nsa = narcissenstengelaaltje

Hsa = hyacintenstengelaaltje

Usa = uienstengelaaltje

2 Literatuurstudie

Het bestaan van rassen en waardplantvoorkeur bij *Ditylenchus dipsaci*

Beknopt overzicht van literatuurgegevens over waardplantspecificiteit, kweek- en inoculatie-technieken, en aanwijzingen voor het al dan niet bestaan van rassen, met nadruk op bolgewassen.
Programmanummer BO-06 005 Plantgezondheid, thema Fytosanitair.

2.1 Historie

Stengelaaltjes hebben in Nederland al een lange geschiedenis. In 1834 werd het “ringziek” van hyacint beschreven en het veroorzakende stengelaaltje door een Fransman in 1880 onderkend, en snel daarna ook in Nederland. Al in 1882 verschijnt een publicatie van de hand van de later legendarische Hugo de Vries in het vakblad voor de Algemene Vereniging voor Bloembollencultuur.

Aan het begin van de 20^{ste} eeuw veroorzaakte het ringziek bij narcis veel problemen en vormde de directe aanleiding tot de oprichting van het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek in Lisse! Was er een melding in 1906 (Ritzema Bos) van aantasting in tulp, pas in 1958 (Silver, PD) werden in enkele partijen tulpen, waarschijnlijk voor het eerst, een aantasting door *D. dipsaci* waargenomen die onmiddellijk werden vernietigd (jaarboek PD 1975). Omstreeks 1920 startte Professor van Slogteren in Lisse een onderzoek naar stengelaaltjes in bolgewassen. De aanleiding was een controverse tussen Hollandse kwekers die de Engelsen beschuldigden van import van stengelaaltjes; de Engelsen deden dit op hun beurt!

De vragen, in deze tijd gesteld, zijn nog vrijwel onverminderd actueel: hoe voorkom je aaltjes, hoe bestrijdt of beheers je deze nematoden, en hoe zit het nu met de waardplanten die ze kunnen aantasten?

Het stengelaaltjesprobleem bestaat al heel lang, is nog niet opgelost. Dit geeft de complexiteit van dit probleem aan.

2.2 Doel en werkplannen

Ten dienste van het fytosanitaire beleid van de PD wordt onderzoek gedaan naar het bestaan van biologische rassen van *D. dipsaci*, met nadruk op de “rassen” die bolgewassen aantasten (zijnde een Q-organisme in deze teelten) en gewassen die betrokken zijn of kunnen zijn bij gewasrotaties (bv. aardappel, ui, suikerbiet, en rogge). In het laatste geval kunnen, bij eventuele waardstatus, stengelaaltjes worden verspreid. Het onderzoek moet een basis evenals gereedschappen geven om tot een eventueel gedifferentieerd teeltverbod in bolgewassen te komen.

Hiertoe wordt onderzoek uitgevoerd:

- literatuurgegevens van uit recente literatuur, aangevuld met gegevens van PPO uit eerder onderzoek (PPO BBF, PRI Biometris) betreffende rassenconcept en waardplantbereik worden ontsloten.
- referentie- en veldpopulaties van *D. dipsaci* zullen worden verzameld en gekweekt ten dienste van het uitvoeren van toetsen (PPO AGV, PPO BBF).
- biotoetsen en loktoetsen met referentie-isolaten, en met veldisolaten uit diverse bolrotaties (PPO BBF, PRI Bioint) zullen worden uitgevoerd.

Dit beknopte verslag behandelt onderdeel (a): status populaties, rassen, en soorten als basis om tot een eventueel gedifferentieerd teeltverbod in bolgewassen te komen; kweekmethoden van stengelaaltjes voor inoculatie van potproeven en bioassays. Het aspect horizontale en verticale distributie en overleving van stengelaaltjes in grond ten behoeve van de onderbouwing van de bestaande bemonsteringsmethoden zal niet worden meegenomen.

2.3 Het rassenconcept

Er is veel onderzoek uitgevoerd naar het vinden van aanwijzingen tot het bestaan van rassen bij stengelaaltjes. Wat zijn de meningen? Sturhan (1991) stelde, dat momenteel *D. dipsaci* beschouwd moet worden als een complex van soorten, bestaande uit vele rassen en populaties die hoofdzakelijk verschillen in waardbereik en in verschillende stadia van soortvorming en in gedeeltelijke of totale voortplantingsisolement verkeren. Sturhan en Brzeski benoemden 30 rassen. Gentzsch poneerde, dat door de "vloeiende overgangen" tussen de "rassen" deze feitelijk niet te definiëren zijn. Hesling (1966) stelde, dat *D. dipsaci*-rassen getypeerd worden door een waardplant waar deze extra goed op gedijen. Verder benoemt hij ook geografische variatie: rassenverschillen kunnen optreden tussen landen. Viglierchio (1971) zei, dat de soort *D. dipsaci* gezien kan worden als een "wilde type" polyfaag met rasafwijkingen als deel van het gencontinuüm (hybridisatie en terugkruising).

Janssen (1994) zette vraagtekens: Seinhorst definieerde 11 biologische rassen; later werden dit er 30 terwijl er vraagtekens bij het gebruik van het begrip rassen zijn ontstaan. Problemen voor het definiëren van rassen bij stengelaaltjes zijn het bestaan van mengpopulaties van rassen die experimenten vertroebelen. Verder kunnen hybriden uit kruisingen wel symptomen veroorzaken, maar er is vaak geen sprake van langdurige overleving. Er zijn kruisingen en hybriden verkregen tussen luzerne, rogge, haver, biet, rode klaver en witte klaver; sommige hybriden leverde nakomelingen op die misvormd en slecht overleefden (Sturhan 1964). Luzerne mannetjes gaven geen nakomelingen met rode- en witte klaverras vrouwtjes; steriele hybriden werden verkregen met tulpenras vrouwtjes en rode klaver mannetjes, en haverras vrouwtjes met tulpenras mannetjes. Er was sprake van genetische incompatibiliteit en abnormaal nageslacht, en vaak vitaliteitsverlies na enkele generaties. Webster (1967) zag als reden voor de variatie in waardplantbereik de herhaalde terugkruisingen van de hybriden met de ouderrassen, en de tragere voortplanting van de hybriden. Hij vond ook, dat het narcissenras tulp aantastte, een bewijs dat dit wel eens een mengpopulatie geweest kan zijn. Volgens Windrich (1974) infecteerde het "zuivere" narcissenras tulp niet.

Interessant is, dat bij kruisingsexperimenten tussen mannetjes en vrouwtjes van verschillende rassen er reciproke barrières blijken op te treden. Een mannelijke narcissenstengelaaltje geeft, samen met een tulpenstengelaaltjesvrouwtje op tulp aantastingen, vergelijkbaar met wat nakomelingen doen afkomstig van een tulpenstengelaaltjesechtpaar; daarentegen geven nakomelingen van een mannelijke tulpenstengelaaltje met een vrouwtje-narcissenstengelaaltje geen symptomen.

Duidelijk is, dat het reuzentype stengelaaltje bij boon een apart ras vormt (Esquibet 2003), mede door zijn afwijkende karyotype (zie hieronder).

Het bestaan van rassen bij stengelaaltjes staat nog steeds ter discussie. Het voorkomen van genetische incompatibiliteit en verminderde vitaliteit van hybriden zou kunnen wijzen op het ontstaan van nieuwe (sub-) soorten D. dipsaci. Concrete aanwijzingen ontbreken vooralsnog; deze moeten mede gefundeerd worden op moleculair onderzoek.

2.4 Moleculaire en biochemische gegevens over het bestaan van rassen

In het verleden zijn technieken gebruikt zoals gel-electroforese (Eriksson et al. 1969) om via eiwitprofielen rassen te herkennen. Sporadisch zijn serologische technieken gebruikt (Ouchterlony-test) om op grond hiervan rassen te kunnen onderscheiden. (Gibbins et al. 1968). De resultaten waren niet goed en vonden weinig navolging. Een alternatief is een zg. lokproef: men laat de veronderstelde rassen van *D. dipsaci* zelf een keuze maken uit waardplantmateriaal. Experimenten zijn uitgevoerd door Kooistra (1964) met tulp en narcis, en Blake (1962) met het haverras.

Siegel (2003) gebruikte agar om de aantrekking op *D. dipsaci*-rassen door knoflook en ui te meten. Deze methode lijkt een alternatief voor moleculaire merkeranalyse om rassen te onderscheiden.

De laatste decennia worden DNA-technieken gebruikt om rassen te kunnen onderscheiden. Dotblot experimenten met totaal DNA van stengelaaltjespopulaties zijn bruikbaar om *Ditylenchus* op soortniveau te herkennen, maar niet om tot rasniveau te discrimineren (Palmer et al. 1991).

DNA-technieken om op rasniveau verschillen aan te tonen in populaties of rassen van *D. dipsaci* zijn

ondermeer RAPD (random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) en ITS (ribosomale repeat). Middels RAPD- en AFLP fingerprinting (Esquibet et al. 1998, 2003) was het reuzenras van *D. dipsaci* te onderscheiden van andere stengelaaltjesrassen uit boon, biet, ui en wortel. Waarschijnlijk is het reuzenras zelfs een aparte soort, zoals blijkt uit zijn waardspecificiteit en afwijkend karyotype (chromosoomaantal) van $n = 24$. De meeste *D. dipsaci*-rassen hebben een karyotype van $n=12$ (Triantaphyllou et al. 1980).

Subbotin en medewerkers hebben, op grond van kleine ribosomale sequentieverschillen een onderverdeling in rassen gemaakt. Hier is tulp niet in opgenomen; bovendien gingen zij uit van DNA, geïsoleerd uit populaties en niet van een enkel individu. Dit sluit het effect van mengpopulaties (en dus gemengd DNA) niet uit. Ook zij stellen, dat op grond van moleculaire gegevens, er geen verschil tussen rassen, behoudens het reuzenras, te maken valt (Subbotin et al. 2000, 2005).

Uit onderzoek van PPO BBF (niet-gepubliceerde resultaten) blijkt, dat mengpopulaties van stengelaaltjesrassen kunnen voorkomen, zoals bij narcis. Dit gegeven is niet gebruikt door andere onderzoekers. De juiste aanpak lijkt identificatie van steekproeven van populaties op individuniveau: analyse van merkers per nematode dus. PPO heeft een merker voor het hyacintenstengelaaltje (hsa), en ook voor tulpenstengelaaltjes (tsa) ontwikkeld via RAPD-analyse. De merker van tulp bleek niet alle populaties te herkennen; die voor hsa wel (echter, getoetst met een beperkt aantal populaties van hsa). Op ITS-niveau, dat enkele tientallen malen als kopie voorkomt in het genoom) bleken twee typen ITS-sequenties met zeer geringe verschillen, voor te komen (A en B), waarvan tsa voornamelijk type A (maar ook een paar type B) heeft, en narcissenstengelaaltje (nsa) type B (maar ook een paar kopieën A). Op grond van deze kwantitatieve verschillen zouden nsa en tsa te onderscheiden zijn. Verdere toetsing van populaties tsa en nsa (welke laatste dus een mengpopulatie van tsa en nsa kan zijn) is nodig om deze discriminerende merkers te testen. Hiertoe zijn zuivere populaties nsa nodig; mogelijk zijn deze te vinden in Engeland, waar al decennia lang “daffodils” worden geteeld. Anderzijds zijn populaties tsa mogelijk vindbaar in Turkije (de plek waar de tulp oorspronkelijk vandaan komt).

Van een aantal min of meer monofage stengelaaltjesrassen kan verwacht worden, dat deze een subspecies (gaan) vormen en via merkeranalyse te onderscheiden zijn. Van belang is om zuivere populaties te hebben, dan wel analyses aan een steekproef van aparte individuen uit te voeren. Er zijn enkele rassen, die mogelijk tot subspecies verheven kunnen worden: het bonenreuzenras, het hyacintenras, en het luzernerass. Deze hebben een beperkt waardplantbereik.

2.5 Waardplanten

Van een aantal stengelaaltjesrassen is bekend, dat deze een breed waardplantbereik hebben: het aardbeien-, suikerbieten-, rogge- en haverrassen. Dit is in tegenstelling tot wat bekend is bij de rassen, afkomstig van rode klaver, witte klaver en hyacint: deze zijn sterk monofaag (Tenente 1996). Het gewas ui kan waard zijn van wel 14 rassen (uien-, rogge-, haver-, bieten-, aardappel-, witte klaver-, rode klaver-, aardbeien-, kaardebol-, tulpen-, hyacinten-, narcissen- en andere *D. dipsaci*-rassen!). Uit onderzoek van Kleijburg (1961) bleek, dat bij voorvrucht aardappel en biet het minste uienstengelaaltjesbesmetting werd gevonden op percelen met dit aaltje. Blijkbaar zijn deze gewassen, hoewel bekend als waard, niet erg geliefd bij het uienstengelaaltje. Bij teelt van bonen echter werd wel forse besmetting met (uien-) stengelaaltjes geconstateerd. Het wortelras zou, naast wortel, ook selderij, ui, haver, rogge en suikerbiet aantasten, maar niet knoflook, aardbei, gerst en aardappel (Greco et al. 2002). Het tulpenras als polyfaag tast veel waardplanten aan: boon (*Vicia* en *Phaseolus*), erwt (*Pisum*), ui, komkommerachtigen (Hesling 1972). Rode klaver, rode biet, kool, spruitjes, wortel, en maïs zouden weer geen waardplanten zijn voor tulpenstengelaaltjes (Hesling 1972). Ook zou hyacint niet erg gevoelig zijn voor zowel het tulpen- als het narcissenstengelaaltjesras (Webster 1967).

Voor een aantal stengelaaltjesrassen zijn er in de literatuur verschillende meldingen van waardplanten. Zo werd door Webster gemeld, in tegenstelling tot wat een aantal andere auteurs meldden, dat tulp door het luzerne-, narcissen- en witte klaverras aangetast zouden kunnen worden. Waarschijnlijk heeft Webster hier gewerkt met een mengpopulatie van zowel narcissen- als tulpenstengelaaltjes. Vergelijking van gegevens uit

de literatuur lieten zien, dat gegevens over gevoeligheid van waardplanten voor bepaalde stengelaaltjesrassen sterk konden verschillen (Janssen 1994).

Er zijn ook berichten, dat rassen op niet-waardplanten schade kunnen veroorzaken, en zelfs afsterving, hoewel geen reproductie op deze niet-waardplanten werd waargenomen. Een voorbeeld hiervan is het alfalfa ras op zaailingen van ui, tomaat, suikerbeet en haver (Griffin 1975).

Seinhorst (1958) en Metlesky (1988) hebben een lijst van “differential hosts” opgesteld voor een aantal stengelaaltjesrassen, op grond waarvan onderscheid tussen rassen te maken zou zijn.

Mogelijk is voor een aantal monofage stengelaaltjesrassen met zekerheid vast te stellen welke waardplanten zij prefereren; voor een groot aantal echter is dit veel minder duidelijk. De eenduidigheid van de gebruikte populaties stengelaaltjes is moeilijk vast te stellen, evenals de vitaliteit van deze nematoden en standaard proefomstandigheden. Tabel 1 laat zien, hoeveel hiaten in waardplantpreferentie voor stengelaaltjesrassen er zijn. Deze kennis is noodzakelijk om een betrouwbare gewasrotatie te kunnen uitvoeren. De discussie ten aanzien van het rassenconcept bij *D. dipsaci* geeft aan, dat nauwkeurig uitgevoerde waardplantexperimenten noodzakelijk zijn om hier duidelijkheid in te brengen.

Tabel 1. Waardplant versus ras: preferenties tot zover bekend.

Waard ► Ras ▼	tulp	narcis	hyacint	ui	suikerbiet	aardappel	rogge	
tulpenras	+	+	+/-	+	+Whitehead			
narcis	-	+	+/-; - (Sturhan)	+				
hyacint ¹	-	-	+	-; +/- (Sturhan)				
ui	- (Seinhorst)	+		+	+			
suikerbiet	- (Sturhan)			+	+		+	
aardappel	-(Seinhorst)			+		+	+	
rogge	- (Seinhorst)			+	+		+	
.....								

¹ zelfde ras als op Muscari, Chionodoxa, Puschkinia en Scilla voorkomt: hyacintachtigen

...= nader in te vullen, bv. een klaver- of luzernerass

De gegevens betreffende waardplantbereik van stengelaaltjesrassen zijn soms niet eenduidig en verschillen per auteur. Dit komt door het hanteren van onder meer verschillende proefopzetten en verschillende populaties stengelaaltjes. Er bestaan nog veel “witte vlekken” in kennis over waardplantbereik van D. dipsaci-rassen.

2.6 Technieken voor waardplantonderzoek: kweek van *D. dipsaci* en inoculatie-technieken

Er zijn veel publicaties beschikbaar betreffende experimenten voor opkweek van stengelaaltjes en infectie-experimenten, vooral alfalfa en rode klaver. Dit betreft meestal vermeerdering van populaties op weefselkweek en zaailingen, of in potjes met steriele aarde. Er zijn meldingen van massakweken voor onderzoek, bv. voor het alfalastengelaaltje (Faulkner et al. 1974). Een nadeel van deze kweekmethodieken kan zijn, dat er een waardplanteffect op kan treden welke de vitaliteit en virulentie beïnvloedt. Om deze reden zou het werken met natuurlijke populaties de voorkeur moeten hebben. Ook zijn abiotische factoren van invloed op kweek, infectie en snelheid van infectie.

Voor een zuivere kweek van stengelaaltjes werd doorgaans één vrouwtje ingezet; voor hybriden één

vrouwje met vier mannetjes.

Ortega (1997) inoculeerde klaver 3 weken na zaaien. Dicht bij een steunblaadje werd 10 microliter van 1 % carboxymethylcellulose met ong. 60 nematoden toegediend. Het geheel werd met plastic afgedekt (kap) en potten kregen van onderen water, elke 2 weken. Beoordeling van de potten op een geslaagde infectie vindt dan plaats na 3 en 4 weken na inoculatie (bladeren, basis, bladstengel). Dit kan zowel als infectieprotocol gebruikt worden, als een manier voor vermeerdering van stengelaaltjes voor vervolgonderzoek. Whitehead (1987) gebruikte een vergelijkbaar protocol voor alfalfa; een recent protocol is dat van Douda (2005) voor knoflook en ui.

Een voorbeeld van een infectieprotocol met stengelaaltjes is dat van Webster (1967):

- stengelaaltjes kunnen bewaard worden in gedroogd plantenmateriaal (4^{de} stadium)
- voor toepassing op waardplanten in pot of veldsituatie worden stengelaaltjes geïsoleerd uit gedroogd of vers materiaal via de mistmethode
- inoculatie vindt doorgaans plaats met 100-1000 nematoden/plant; toediening vindt via vochtige talk op de apex van zaailingen (Palo 1962) of op bollen (vochtige watten), of op graanzaailingen in 3-5% carboxymethylcellulose; 10 bollen of 25 plantjes. Voor zaadexperimenten worden ong. 300 aaltjes per zaadje ingezet in potten van 7.5 cm diameter met vochtige compost
- na inoculatie 48 uur vochtig houden (plastic, kap e.d.)

Het kweken van stengelaaltjes in vitro levert gekarakteriseerde populaties op, die mogelijk minder virulent of vitaal kunnen zijn. Standaard protocollen zijn hiervoor in de literatuur beschikbaar, ook voor inoculatie.

2.7 Literatuur

1. Anonymus. Waardplantenonderzoek van stengelaaltjes in bloembolgewassen. Jaarboek PD, 1975. 63-69
2. Douda, O. 2005. Host range and growth of stem and bulb nematode (*D. dipsaci*) populations isolated from garlic and chicory. Plant Protect. Sci.41: 104-108
3. Eriksson KB, and J Granberg 1969. Studies of *Ditylenchus dipsaci* races using electrophoresis in acrylamide gels. Nematologica 15: 530-534 Ed. E J Brill, Leiden.
4. Esquibet M, S Bekal, P Castagnone-Sereno, JP Gauthier, R Rivoal, and G Caubel 1998. Differentiation of normal and giant *Vicia faba* populations of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: agreement between RAPD and phenotypic characteristics. Heredity 81: 291-298
5. Esquibet M, E Grenier, O Plantard, F A Andaloussi, and G Caubel. 2003. DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: development of diagnostic markers for normal and giant races. Genome 46: 077-1083.
6. Faulkner LR, DB Bower, DW Evans, and JH Elgin 1997. Mass culturing of *Ditylenchus dipsaci* to yield large quantities of inoculum. J. Nematol. 6: 126-129.
7. Gentzsch D 1990. Rassen von *Ditylenchus dipsaci* mit Hinweisen für die Praxis. Gesunde Pflanzen 42: 432-434.
8. Gibbins LN, and GS Grandison 1968. An assessment of serological procedures for the differentiation of biological races of *Ditylenchus dipsaci*. Nematologica 14: 184-188. E.J. Brill, Leiden.
9. Greco N, A Brandonisio, and P Boncoraglio 2002. Investigations on *Ditylenchus dipsaci* damaging carrot in Italy. Nematol. Medit. 30:139-146
10. Griffin GD 1975. Parasitism of nonhost cultivars by *Ditylenchus dipsaci*. J Nematol 7: 236-238
11. Hesling JJ (1966). Biological races of stem eelworm. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst. 1965: 132-141.
12. Hesling JJ 1972. Host plants of tulip stem eelworm (*Ditylenchus dipsaci*). PI Path 21: 109-111
13. Janssen GJW (1994). The relevance of races in *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev, the stem nematode. Fundam. Appl. Nematol. 17: 469-473.
14. Kleijburg P (1961). Stengelaaltjesonderzoek ten behoeve van de uienteelt. Overflag, Wageningen.
15. Kooistra 1964. Jaarverslag LBO; onvolledig.
16. Ortega FM *et al.* 1997. Test of agrochemicals and cultivars. Ann Appl Biol 130 Suppl.: 38-39.

17. Palmer HM, HJ Atkinson, and RN Perry 1991. The use of DNA probes to identify *Ditylenchus dipsaci*. *Revue Nematol.* 14: 625-628
18. Seinhorst JW. 1964. Stengelaaltjes. Intern rapport, IPO, Wageningen.
19. Spiegel Y, PM Burrow, and M Bar-Eyal 2003. A chemo- attractant in onion root exudates recognized by *Ditylenchus dipsaci* in laboratory bioassay. *Phytopathol* 93: 127-132
20. Sturhan D. 1964. *Nematologica* 10: 328-334.
21. Sturhan D and MW Brzeski 1991. Stem and bulb nematodes, *Ditylenchus* spp. In: Nickle WR (Ed.), *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, Inc., NY, p.423-464.
22. Subbotin SA, M Madani, EL Krall, D Sturhan, and M Moens 2000. Identification and phylogenetic relationships within the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* complex (Tylenchida: Anguinidae) as inferred from analysis of the ITS-rDNA sequences. *J. Nematol.* 35: 365-
23. Subbotin SA, M Madani, E Krall, D Sturhan, and M Moens 2005. Molecular diagnostics, taxonomy, and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the internal transcribed spacer-rDNA. *Phytopathol.* 95: 1308-1315.
24. Tenente RCV 1996. Nematode problems of bulbs, with special reference to *D. dipsaci*. *Nematropica* 26: 91-99
25. Triantaphyllou AC, and H Hirschmann. 1980. Cytogenetics and morphology in relation to evolution and speciation of plant-parasitic nematodes. *Ann Rev Phytopath* 18: 333-359.
26. Webster JM 1967. The significance of biological races of *Ditylenchus dipsaci* and their hybrids. *Ann Appl Biol.* 59: 77-83.
27. Whitehead AG *et al.* 1987. Variation on the development of stem nematodes, *Ditylenchus dipsaci*, in susceptible and resistant crop plants. *Annals of Appl. Biol.* 111: 373-383.
28. Windrich WA 1974. Attack of tulip by hybrids of tulip and narcissus races of *Ditylenchus dipsaci*. *Nematologica* 20: 269-270.

3 Identificatie van rassen

Zoals geschetst in hoofdstuk 2 is er discussie over het al dan niet bestaan van gescheiden rassen, enkele rassen (zoals het reuzenbonenras) en variabele populaties of een supergenus. Voor onderzoek zijn populaties stengelaaltjes, vooral uit bolgewassen, de afgelopen jaren verzameld (levend en dood) en geanalyseerd via verschillende technieken (3.2).

3.1 Verzamelen van isolaten

In Tabel 1 zijn de levende isolaten opgenomen zoals verzameld binnen dit LNV-project. Helaas zijn veel populaties niet in leven gebleven door de gebleken slechte staat van de inundatiebakken. Via extra financiering (2008) zijn deze ingegraven containers leeggemaakt, gerepareerd (andere ontwateringbuizen, vervanging schelpenbodem/zand, andere grond) en opnieuw geënt met de dan nog beschikbare populaties *D.dipsaci*. Zie ook 3.4. In Tabel 2 staan de gebruikte populaties vermeld.

Tabel 1. Isolaten van *D.dipsaci*, verzameld voor o.a. toepassing binnen dit project.

isolaat	Herkomst/bak	levend/dood*	ras	opmerkingen
CSL 20605413	UK (Scilly Isl.)	dood*	nsa ?	
CSL 20604348	UK (Kent)	dood*	nsa ?	
CSL 20603740	UK (Scilly Isl.)	dood*	nsa?	
CSL 20603741	UK(Lincolnsh.)	dood	nsa ?	
CSL 20686687	UK („)	dood	nsa ?	
CSL 20608435	„	?	nsa	
CSL 20608526	„	dood	nsa	
Kirton	„			
N1	PPO 2007	levend		
Ice follies	PPO 2000	levend	nsa	gekaracteriseerd
Tete a Tete	PPO 2008	dood	nsa	gekaracteriseerd
tulp		Dood	tsa	Gekarakteriseerd
tulp	PPO 2005	Dood	tsa	Gekarakteriseerd
Muscari		levend	hsa	Gekarakteriseerd
Hyacint	PPO	dood	hsa	Gekarakteriseerd
Chionodoxa		levend	hsa	Gekarakteriseerd
Phlox		levend		
Phlox		levend		
ui	Friesland, Hantum	dood		Niet meer levend (2008)
ui	Flevoland, Zeewolde	dood		
ui	Zuid Holland, Voorne Putte	dood		
Hosta		levend		
knolselderij		levend		

CSL: Ontvangen juni 2006 (Rebecca Lawson, CSL). * Er is een collectie van ongeveer 44 drooggevroren fracties van stengelaaltjespopulaties vanaf 2002 (van Doorn et al. 2006) waaronder 14 diepgevroren hsa van verschillende herkomst en datum (2001-2009). Levend: in stand gehouden op de zg. inundatiebakken. Niet van alle isolaten is de herkomst bekend of vastgelegd (lege vakken).

Tabel 2. Herkomst stengelaaltjes-isolaten potproeven 2006

Isolaten: cv	lokatie
T1	Apeldoorn (N-Holland)
T2	Madame Lefebvre (Egmond)
N1	Bridal Crown (H. Frankrijk)*
N2	Ice Follies (Inundatiebakken PPO)
H	Purple Voice (H. Den Helder)
Ui	(Meindert Zuidland)

* Bleek op dit perceel in een hoek ooit tsa gevonden te zijn.

3.2 Karakterisatie van *D. dipsaci*-isolaten

Er zijn enkele mogelijkheden (zie ook Fig.1) om *Ditylenchus dipsaci* op rasniveau te identificeren:

- morfologisch
- boltoets
- weefselweektoets
- merkers
- real-time PCR
- lokproeven

Morfologisch is deze nematode te onderscheiden van bv. *D. destructor*, ook via DNA-technieken is dit mogelijk (Hooper 1972; van Doorn et al. 2005). Ook kan zo het “reuzenbonenras” onderscheiden worden; andere rassen zijn niet te onderscheiden op morfologische karakteristieken tot zover bekend. Alternatieven zijn het gebruik maken van waardplantspecificiteit.

Op rasniveau is identificatie via waardplantreeksen een mogelijkheid (zie Hoofdstuk 2). Praktisch gezien werd de boltoets van Windrich (Fig.1a) gebruikt volgens een protocol dat jarenlang bij de Plantenziektkundige Dienst is gebruikt. Nadeel van deze methode is de gevoeligheid voor schimmelinfectie en uitdroging, de kwaliteit van de te gebruiken tulpenbollen en mogelijk de cultivar; bovendien geeft deze methode geen uitsluitel van het aanwezig zijn van mengpopulaties (tulpen- en narcissenstengelaaltje en met de toets kan alleen bepaald worden of een populatie tot het tulpenras behoort, wanneer de toets negatief is dan is er geen uitsluitel tot welk ras de populatie dan wel behoort.

Een weefselweektoets (Fig. 1b) is ontwikkeld door PPO (van Doorn et al 2005), maar schimmelinfectie, en het probleem dat niet jaarrond weefselweekplantjes beschikbaar zijn maakte deze benadering niet toepasbaar. De uiteindelijke oplossing zal vanuit de moleculair-genetische hoek moeten komen (zie 3.3) of mogelijk via lokproeven (Hoofdstuk 5).

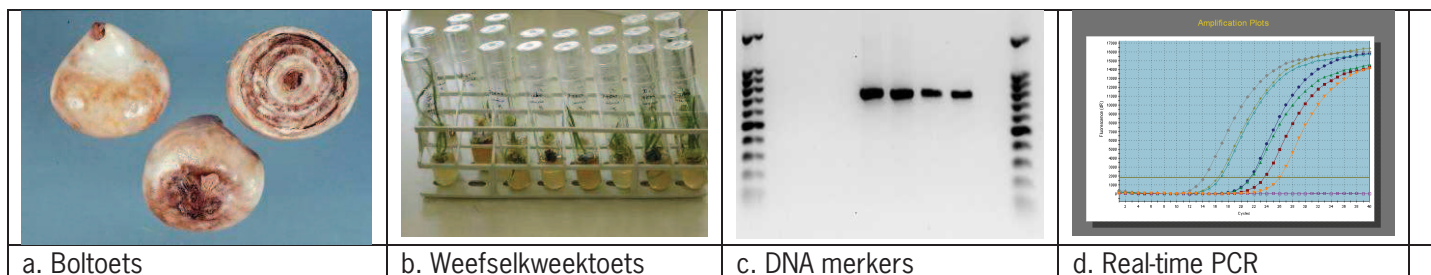


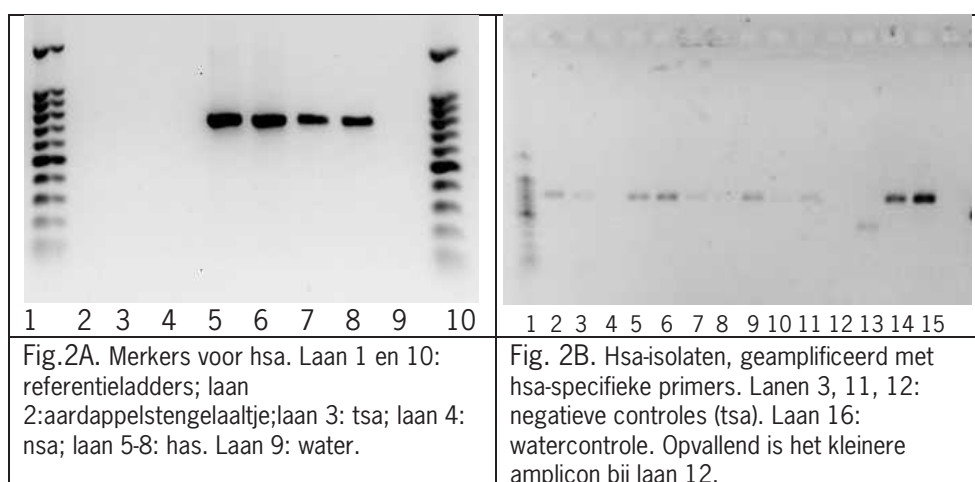
Fig.1. Methodieken om stengelaaltjesrassen te kunnen onderscheiden: inoculatie op verwonde tulpenbollen (bulb scale test, Windrich 1970) (a); via kweek op weefselkweekplantjes van tulp (b); DNA-markers, ontwikkeld via RAPDs (van Doorn 2006) en via real-time PCR op fragmenten van het rDNA (d).

3.3 Merkers voor het hyacintenstengelaaltjesras

Er zijn PCRs beschreven voor de identificatie van *D. dipsaci*. Op rasniveau ligt dit anders; in de literatuur is alleen een DNA-identificatiemethode (PCR) beschreven voor het zg. reuzenbonenras (Subotin et al. 2005).

PPO is een aantal jaren geleden bezig geweest met het ontwikkelen van specifieke markers via RAPDs (Van Doorn et al. 2005). Aanvankelijk leken er specifieke markers te zijn voor het tulpen- en het narcissenras; later bleken de markers voor tulp niet 100% betrouwbaar maar meer gecorreleerd aan bepaalde typen populaties.

Binnen dit project is beperkt verder gekeken naar deze markers. Gebleken is, dat een merker voor hyacint, afgeleid van een RADP-merker in alle gevallen positief correleerde met de aangetroffen *D. dipsaci* in hyacint of hyacintachtigen zoals Chionodoxa of Muscari. Het DNA-fragment van 777 bp vertoont geen homologie met gedeponeerde DNA-sequenties in databanken (Fig. 2A, B).



Tot zover getest zijn ongeveer 10-12 onafhankelijk verkregen isolaten hsa, verspreid over een aantal jaren,

positief in de ontwikkelde PCR. Dit duidt op een mogelijk goed te onderscheiden subgroep (subspecies?) van *D.dipsaci* in bloembolgewassen.

3.4 Levende bewaring in ingegraven containers (inundatiebakken)

Voor het in stand houden van levend inoculum wordt de quarantainefaciliteit van PPO Lisse ("inundatiebakken") gebruikt: ingegraven containers (60 stuks) die onder water gezet kunnen worden (afdoden populaties bodemnematoden; Fig. 3; Fig.4).

Fig. 3. Ingegraven proefcontainers (inundatiebakken) voor waardplantexperimenten van quarantainenematoden (*D.dipsaci*). Door deze onder water te zetten (inundatie) kunnen deze dan weer *D. dipsscivrij* gemaakt worden.



Fig.4. Voorbeeld van de 60 inundatiebakken van PPO Lisse (niet actueel).

	Inundatiebakken plattegrond nov 2007.															
baknr	19 N TaT najaar 2006	20 leeg pos. controle roef 03-0	21 N TaT najaar 2006	22 N TaT najaar 2006	23 leeg pos. controle roef 03-07	24 leeg	63 leeg ontsmet 2007	34 leeg ontsmetting niet goed	35 leeg ontsmetting niet goed	36 leeg ontsmet 2007	LEEG kapot	53 didi tulp 26-10-'05	54 Phlox nov '06	55 N1 Bridal Crown + N. Carlton jan '07; ½	56 Phlox nov '07	baknr
baknr	13 N TaT najaar 2006	14 leeg	15 leeg	16 N TaT najaar 2006	17 leeg pos. controle roef 03-0	18 N TaT najaar 2006	61 leeg ontsmet 2007	62 leeg ontsmetting niet goed	31 leeg ontsmet 2007	32 leeg ontsmet 2007	33 leeg ontsmet 2007	49 didi hyacint 26-10-'05	50 T1 Apeldoorn jan '07 ½ bak	51 Sternbergia jan '07/ mrt '07	52 leeg ontsmet 2005	baknr
baknr	7 N TaT najaar 2006	8 N TaT najaar 2006	9 N TaT najaar 2006	10 N TaT najaar 2006	11 leeg	12 N TaT najaar 2006	59 leeg ontsmet 2007	60 leeg ontsmet 2007	28 leeg ontsmet 2007	29 leeg ontsmet 2007	30 leeg ontsmetting niet goed	45 didi narcis 26-10-'05	46 leeg ontsmet 2007	47 leeg ontsmetting niet goed	48 leeg ontsmet 2005	baknr
baknr	1 N TaT najaar 2006	2 N TaT najaar 2006	3 N TaT najaar 2006	4 N TaT najaar 2006	5 leeg pos. controle roef 03-0	6 N TaT najaar 2006	57 leeg ontsmet 2007	58 leeg ontsmet 2007	25 leeg ontsmet 2007	26 leeg ontsmetting niet goed	27 leeg ontsmet 2007	41 didi allium 26-10-'05	42 Ui Lelie stad jan '07	43 leeg ontsmet 2005	44 leeg ontsmet 2005	baknr
isolaat in bakken 12 - 24 is N2 van de waardplantenproef 2006.																

Stengelaaltjes kunnen alleen goed bewaard worden in inundatiebakken wanneer deze goed waterdoorlatend zijn en zo veel mogelijk jaarrond de waardplant er op staat. Bij proeven waar met niet-waardplanten wordt gewerkt daalt de populatie stengelaaltjes in de grond dramatisch. Wanneer de teeltcondities door slechte bemesting matig tot slecht zijn, en de weersomstandigheden extreem zijn (veel kou, veel droogte) dan kan de populatie verloren gaan. Het kweken van populaties dient zo veel mogelijk in meervoud (meerdere

inundatiebakken) te gebeuren; dit is echter een arbeidsintensieve en kostbare zaak.

3.5 Discussie

Het blijkt erg lastig om goed gekarakteriseerde populaties *D. dipsaci* in stand te houden en zodanig te vermeerderen dat er voldoende individuen per experiment beschikbaar zijn. In de literatuur worden wel kweekmethodieken beschreven; dit gaat dan meestal om gewassen die goed in de kas kweekbaar zijn. Een extra handicap is het ontbreken van een goede (moleculaire) test om rassen te kunnen onderscheiden, vooral tsa en nsa. Bij hsa lijkt een betrouwbare merker van 777 bp te bestaan.

Algemene problemen met *D. dipsaci* populaties:

- seizoensfluctuaties: natte en koude perioden brengen het aantal aaltjes in de grond sterk terug
- quarantainecondities: lastig om de containers goed te bewerken in verband met afvalafvoer, verzorging en beperkte ruimte om experimenten te doen
- verzamelen van voldoende materiaal om stengelaaltjespopulaties in stand te houden; soms is er te weinig plantmateriaal om de populatie in stand te houden (vaak meerdere bakken nodig voor basishoeveelheden); bij het verzamelen van ziek plantmateriaal blijkt er vaak onvoldoende individuen te zijn voor het uitvoeren van experimenten.
- er zouden mengpopulaties kunnen bestaan, waardoor merkeranalyse om het ras vast te stellen moeilijk wordt

*De beste oplossing lijkt het gebruik van vollegrondspercelen met een goede besmettingsgraad aan *D. dipsaci* in de bodem, aangevuld met inundatiebakken voor in stand houden van populaties. Door de helft van het perceel het ene jaar te gebruiken, en de andere helft het jaar daarop (en de gebruikte helft vol te planten met de waardplant om de besmettingsgraad te herstellen) is de meeste kans voor een redelijk percentage zieke planten.*

4 Infectie-experimenten in de kas

4.1 Achtergrond

Om de waardplantstatus van een aantal stengelaaltjespopulaties (rassen) vast te stellen is gekozen voor enerzijds enkele akkerbouwgewassen, anderzijds voor een aantal bolgewassen. Daar er geen quarantainefaciliteit in de vollegrond beschikbaar was bij PPO AGV is gekozen voor een kasexperiment in potten, zoals ook wel beschreven in de literatuur.

Protocollen zijn uitgewisseld tussen PPO AGV en PPO BBF evenals de benodigde stengelaaltjespopulaties.

4.2 Potproef AGV

Om de waardplantstatus te toetsen van een drietal akkerbouwgewassen voor *D. dipsaci* is een potproef uitgevoerd. Voor het uitvoeren van potproeven met *D. dipsaci* waren binnen PPO AGV nog geen protocollen aanwezig. Allereerst is daarom een nieuw protocol geschreven. Als basis voor het nieuwe protocol zijn protocollen gebruikt die nu gebruikt worden bij potproeven met andere aaltjessoorten, aangevuld met kennis op basis van wetenschappelijke publicaties en mondelinge mededelingen van Jan van Bezooijen van de vakgroep Nematologie en Björn Niere van de BBA in Munster. Vooral het inoculeren van de potproef wijkt af van bestaande protocollen, maar ook het uithalen verloopt anders. Als basis van dit nieuwe protocol zijn de volgende protocollen gebruikt

23.4.1 Inzetten potproef

23.4.2 Uithalen potproef

23.5.1.1. Opkweek planten voor potproef

23.5.3 Verzorgen potproef

23.5.6 Isoleren aaltjes uit wortelmateriaal (mistkast methode)

23.7.2 Identificatie en tellen

Deze protocollen zijn beschikbaar bij AGV.

4.2.1 Materiaal en methoden

Als toetspopulaties zijn 5 stengelaaltjes populatie van verschillende herkomst gebruikt. Met stengelaaltjes besmette bollen zijn afkomstig van PPO BBF. Het inoculum voor de potproeven is verkregen door de besmette bollen in de mistkast te plaatsen. Twee populaties hebben als herkomst narcis, twee tulp en één hyacint. De vijf populaties zijn geïnoculeerd op aardappel, suikerbiet en ui. Ter controle op locatie (AGV Emmeloord) is een populatie met als herkomst tulp ook geïnoculeerd op tulp.

Tabel 3. Herkomst populaties

Isolaties	cultivar	locatie
T1	Apeldoorn	(N-Holland)
T2	Madame Lefebre	(Egmond)

N1	Bridal Crown	(H. Frankrijk)
N2	Ice Follies	(Inundatiebakken PPO)
H	Purple Voice	(H. Den Helder)

T1, T2: tsa; N1, N2: waarschijnlijk nsa; H: hsa

Door contacten met teeltbegeleiders en collega's zijn een aantal populaties aangeleverd en toegezegd. De meeste populaties komen van het gewas ui en vanuit Duitsland zijn een aantal suikerbieten populaties toegezegd. Het IRS zou bieten verzamelen van aangetaste percelen in het Zuid Westen. Dit is echter niet gelukt.

Tabel 4. Herkomst populaties uienstengelaaltje

Herkomst populatie	Waardgewas
Friesland, Hantum	Ui
Flevoland, Zeewolde	Ui
Zuid Holland, Voorne Putte	Ui

Daarnaast zijn de door PPO Lisse aangeleverde populaties ook op kweek gezet bij PPO-AGV. Alle populaties zijn vermeerderd op veldbonen en na het drogen van de stengelvoet opgeslagen in de conditioneer cel.

De aaltjes zijn direct op het gewas geïnoculeerd, waarbij watten om de plant zijn gevouwen op de plek van de inoculatie. Dit is gedaan om deze plek vochtig te houden, zodat de aaltjes meer kans hadden het gewas te penetreren. Na het inoculeren is de kastemperatuur omlaag gebracht naar 15°C met een hoge luchtvochtigheid gedurende twee dagen. Op de tablet in de kas is een tent gebouwd met daaronder een verdamper om de luchtvochtigheid gedurende twee dagen op peil te houden.

Als medium is de standaardgrond gebruikt die ook voor potproeven met andere aaltjessoorten wordt gebruikt. Tot en met het verspenen van de planten is het standaardprotocol voor potproeven uitgevoerd. De gegeven zijn verwerkt met behulp van het statistische programma Genstat. Er is een anova gedaan na een log10 transformatie. Vervolgens werden de verkregen medianen per object gepresenteerd. De experimenten zijn ten minste in drie herhalingen uitgevoerd.

4.2.2 Beginbesmetting (Pi)

De populaties zijn aangeleverd in de vorm van besmet plantmateriaal, aangeleverd door PPO Lisse. De kwaliteit en kwantiteit vielen niet mee. De besmette bollen zijn in de mistkast geplaatst om de aaltjes te verzamelen. De opbrengst viel tegen, waardoor de Pi bij een aantal populaties erg laag was (Tabel 5).

Tabel 5. Pi per pot

Populatie	Pi per plant
Tulp 1	135
Tulp 2	48
Narcis 1	105
Narcis 2	100
Hyacint	39

De beginbesmetting is per plant weergegeven.

4.2.3 Eindbesmetting (Pf) en vermeerdering Pf/Pi

Alleen bij het gewas ui is vermeerdering waargenomen. De vermeerdering van de populaties Tulp 2 en Hyacint bleef achter bij de andere populaties (Tabel 6).

Tabel 6. Resultaten per gewas.

Herkomst populatie	gewas	Pf/Pi	Pf totaal
Tulp 1	Aardappel	0.28	14
Tulp 2	Aardappel	0.17	4
Narcis 1	Aardappel	0.94	85
Narcis 2	Aardappel	0.27	15
Hyacint	Aardappel	0.16	3
Tulp 1	Suikerbiet	0.21	23
Tulp 2	Suikerbiet	0.30	19
Narcis 1	Suikerbiet	0.17	12
Narcis 2	Suikerbiet	0.16	12
Hyacint	Suikerbiet	0.21	9
Tulp 1	Ui	3.25	1674
Tulp 2	Ui	0.61	170
Narcis 1	Ui	1.50	588
Narcis 2	Ui	3.50	1342
Hyacint	Ui	0.53	44
Tulp 2	Tulp	0.61	44

De vermeerdering en eindbesmetting is weergegeven per plant. Bij de uien was sprake van plant wegval mede als gevolg van de zware *Ditylenchus dipsaci* besmetting. Bij de verwerking van de proef zijn bij de uien alleen de vitale planten geoogst en meegenomen in de verwerking. Bij de aardappelen en suikerbieten zijn geen planten weggevallen. Plantwegval bij de uien is versterkt doordat de standaardgrond gemengd met potgrond voor potproeven geen goed medium is gebleken voor uien. De uien sloegen slecht aan en de gewasontwikkeling viel tegen. Door de lage Pf cijfers is behalve bij de uien de gehele suspensie geteld.



Fig. 5. Door stengelaaltjes aangetaste stengelvoet van veldboon

4.3 PPO-Lisse: kasexperimenten

4.3.1 Gang van zaken, isolaten en cultivars

In samenwerking met AGV zijn populaties verzameld: 6 populaties stengelaaltjes (2x tsa, 2 x nsa, 1 x hsa, 1 x usa)

De experimenten zijn uitgevoerd in de kas op tulp (M. Lefebvre), narcis (Jet Fire), Hyacint (Blue Star) en enkele referentieplanten (ui en boon). De potproeven zijn zo veel mogelijk op die van AGV afgestemd.

Inoculatie: er is gebruik gemaakt van bladinoculatie (Fig. 6B) volgens het protocol van AGV (50-200 aaltjes/plant; 48 uur hoge RV/20° C, daarna 70-80% RV/15° C).

Er vond regelmatige beoordeling (tweemaal per week) plaats, en watergift werd gegeven via de schotel onder de potten (Fig. 6A).

Gebruikte isolaten staan vermeld in Tabel 7. In ieder potje werden 3 bollen geplant; geïnoculeerd met 2 x 100 aaltjes per plant

Fig. 6. Infectie-experimenten bij PPO Lisse



A. Quarantainekas van PPO Lisse



B. Bladinoculatie via vochtige watten



C. Geinoculeerde tulp



D. Geinoculeerde boon

Tabel 7. Gebruikte stengelaaltjespopulaties en afkortingen

T1	Apeldoorn (Noord Holland)
T2	Madame Lefebvre (Egmond)
	Bridal Crown (WW-proef P.
N1	V.)
N2	Ice Follies (Inundatiebakken)
H	Purple Voice (P.V.)
Ui	(Meindert Zuidland)
b	Boon
aa	Aardappel

Gewassen:

T	Tulp
N	Narcis 'Jet Fire'
H	Hyacint 'Blue Star'

4.3.2 Resultaten

Er werd een sterke vermeerdering gevonden in de potproeven met bolgewassen in tegenstelling tot wat gevonden is in de inundatie-experimenten (Hoofdstuk 6). De populaties zijn verzameld voor de experimenten uit praktijkmateriaal. Daarnaast lijkt het erop, dat de kascondities mogelijk het natuurlijke gedrag (waaronder waardplantvoorkeur/specificiteit) verstoren. Wanneer we uitgaan van de gegevens, en hierop conclusies trekken wijzen deze erop, dat bv. nsa 1 eerder een tsa (of een mengsel van tsa/nsa) was, dan een echte nsa-populatie. Vreemd is, dat de hyacintenpopulatie het goed doet op tulp (tabel 8). PCR wees uit, dat het hier ook niet ging om een hsa, maar mogelijk om een tsa daar deze ook hyacint kan aantasten. De populatie Narcis 1 geeft een betrouwbaar hogere eindbesmetting dan de andere populaties na op aardappel na. Dit kan een populatieverschil zijn, maar gemiddeld genomen is aardappel een slechte tot matige waard voor *D. dipsaci* in vergelijking met de potproeven van AGV.

In Tabel 9 is te zien, dat alle populaties stengelaaltjes die getest zijn, boon als waard herkennen, en aardappel geen goede waard is voor de bloembolrassen van *D. dipsaci*. De uienpopulaties verschillen onderling aanzienlijk in hun aantastinggedrag op verschillende plantensoorten (Tabel 9).

Tabel 8. Vermeerdering Pf/Pi in bolgewassen

Herkomst populatie	gewas	Pf/Pi (over 8 herhalingen)
Tulp 1	tulp	1.7
Tulp 2	tulp	10.2

Narcis 1	tulp	42.6
Narcis 2	tulp	21.7
Hyacint	tulp	115.2
Tulp 1	narcis	292.8
Tulp 2	narcis	52.7
Narcis 1	narcis	207
Narcis 2	narcis	530.6
Hyacint	narcis	422.7
Tulp 1	hyacint	169.2
Tulp 2	hyacint	0.1
Narcis 1	hyacint	6.2
Narcis 2	hyacint	4.4
Hyacint	hyacint	16

Tabel 9. Vermeerdering van stengelaaltjespopulaties in boon, aardappel en bolgewassen

Herkomst populatie	gewas	Pf/Pi (over 2 herhalingen)
Narcis 1	boon	10.5
Narcis 2	boon	15.3
Hyacint	boon	13.3
Ui	boon	32.8
Narcis 1	aardappel	0.8
Narcis 2	aardappel	1.8
Hyacint	aardappel	0.1
Ui	tulp	0.1
Ui	narcis	0
Ui	hyacint	243

4.4 Conclusie en discussie

Uit de door PPO-AGV uitgevoerde kaspottenproef met zaailingen van diverse akkerbouwgewassen blijkt ui alle tsa en nsa populaties te vermeerderen. Voor aardappel lijkt geen van de twee getoetste tsa populatie vatbaar. Deze gegevens bevestigen de verwachting dat de “reizende bollenkraam” een risico kan vormen voor verspreiding en overdracht van stengelaaltjes in de akkerbouwwrotatie wat betreft ui en misschien voor aardappel; voor de laatste is alleen een aanwijzing verkregen bij de kasexperimenten uitgevoerd in Lisse (Tabel 9). Het is aannemelijk dat de populatie narcis 2 een mengpopulatie is van zowel nsa als tsa.

Bij het inoculeren is gestreefd naar een Pi van 100 tot 200 larven per plant.

Helaas was de opbrengst vanuit de mistkast niet voldoende om dit streven te realiseren. Vooral bij de

populaties met als herkomst Tulp 2 en Hyacint viel de opbrengst tegen waardoor minder dan 100 larven per plant konden worden geïnoculeerd. De lagere Pi is een mogelijke verklaring voor het feit dat alleen bij deze twee populaties geen vermeerdering op ui is waargenomen. Door de lage beginbesmetting is de populatie mogelijk niet goed aangeslagen. Dit is ook de reden waardoor de populatie Tulp 2 zich niet heeft vermeerderd op tulp. Ui lijkt dus een goede waard voor *D. dipsaci*, zoals dit in het huidige aaltjesschema al is weergegeven. Tulp 1 gedraagt zich echter meer als een nsa (zie tabel 8: rij 1 versus rij 6).

De resultaten van dit onderzoek komen voor een groot deel overeen met de huidige weergave in het aaltjesschema. Ui is een goede waard en is schadegevoelig. Aardappel is een matige waard. Volgens het schema is suikerbiet geen waardplant; toch zijn er nog aaltjes gevonden in de bieten. Ook komen er steeds meer schade meldingen uit grote suikerbieten teeltgebieden als Zuid West Nederland en Rheinland Pfalz in Duitsland. Mogelijk is suikerbiet een zeer matige waard voor de onderzochte populaties. Om meer duidelijkheid te krijgen over de problematiek in suikerbieten zou het onderzoek herhaald moeten worden met populaties van percelen waar schade in suikerbieten is geconstateerd.

Ditylenchus populaties die door de bollenteelt op akkerbouwbedrijven worden geïntroduceerd zijn een potentiële bedreiging voor de akkerbouwer wanneer uien voorkomen in het bouwplan. Doordat tulpen steeds meer geteeld worden op akkerbouwbedrijven, vergroot dit het risico op verspreiding van *D. dipsaci*. De kans is mede hierdoor reëel dat de komende jaren steeds meer problemen opduiken met *Ditylenchus*. Een hard bewijs dat stengelaaltjespopulaties uit bloembolgewassen daadwerkelijk een bedreiging kunnen vormen voor bv. aardappel- en suikerbietenteelt en vice versa moet nog worden bewezen.

Stengelaaltjes		
	Huidige weergave	Resultaat potproef
Aardappel	●●	●
Suikerbiet	-	●
Ui	●●●	●●
Tulp	●●●	●

Legenda Vermeerdering	
?	onbekend
- -	lieve afname
-	niet
●	weinig
●●	matig
●●●	sterk
R	safhankelijk

Fig. 7. Een aaltjesschema met vergelijking van literatuurgegevens enerzijds en waardplantexperimenten (gemiddelde vermeerdering van de gebruikte stengelaaltjespopulaties).

De resultaten van de bij PPO-BBF uitgevoerde kaspotproef met tsa en nsa op tulp/narcis zijn niet in lijn met de gestelde hypothese van differentiële interactie: tulp en narcis vatbaar voor populaties van

t_{sa}; narcis vatbaar voor n_{sa}. De beproefde interacties lijken in de potproef anders uit te pakken dan in de buitencontainerproef (referentie lopende containerproef met n_{sa}). Blijkbaar is de interactie niet alleen genetisch bepaald, maar spelen ook andere factoren een doorslaggevende rol zoals fysiologie van de bol, inoculatiemethode (plant versus grond), omgevingsfactoren (kas versus buiten). Daarbij moet aangenomen worden, dat de n_{sa}1 waarschijnlijk een mengpopulatie is met t_{sa}, evenals de h_{sa} waarschijnlijk een t_{sa} populatie was. Opvallend was de geringe virulentie van t_{sa} op tulp. Deze experimenten geven aan wat door de bank genomen het grote probleem is voor *D. dipsaci*-onderzoek: het in handen hebben en houden van goed gekarakteriseerde, vitale populaties in grote aantallen jaarrond. Bij het starten van de experimenten waren er geen populaties u_{sa}, t_{sa}, h_{sa} en n_{sa} die goed gekarakteriseerd waren; in overleg met de begeleidingscommissie is gebruik gemaakt van populaties *D. dipsaci* afkomstig van narcis, tulp, hyacint en ui.

Nadeel van deze benadering bleek de niet optimale groeiomstandigheden in de kas voor gewassen die meestal in de vollegrond geteeld worden.

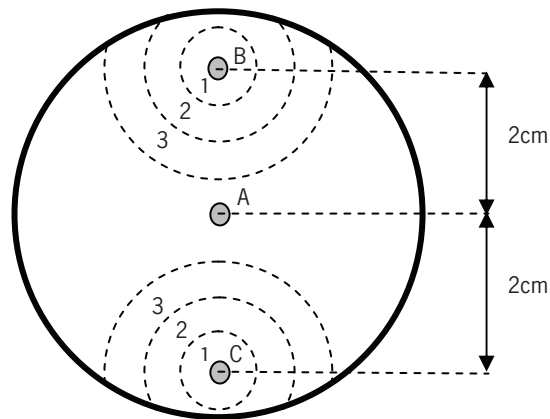
5 Lokproeven

5.1 Achtergrond

Naast eventuele moleculaire verschillen tussen rassen bij *D. dipsaci* is het mogelijk dat waardplantpreferentie van bv. nsa gekoppeld is aan een vorm van chemotaxis, veroorzaakt door bepaalde componenten (exudaten) van de waardplanten, in dit geval narcis. In de literatuur zijn hier voorbeelden. Er is een experimentopzet beschreven voor *D. dipsaci* en de waardplant ui (Spiegel et al. 2003). Ook is bekend dat gevoelige planten vaak meer aantrekking voor *D. dipsaci* hebben dan resistente cultivars (Griffin et al. 1971).

5.2 Proefopzet

- Wortellexudaten: Planten 1 week met wortels in 0.05M CaCl₂·2H₂O, exudaten filtreren door 0.2µm en bewaren bij -20°C.
- Aaltjes: Geïnfecteerde bollen overnacht in mistkamer voor extractie, aaltjes bewaren bij 4°C.
- Methode Spiegel *et al*/2003 wordt gevolgd:
- Petrischaaltje (5cm) met 1ml 1% agarose. Test- en/of controledruppel(s) van 10µl op 2cm vanaf het centrum op één lijn. Testdruppel = wortellexudaat in 0.05M CaCl₂·2H₂O; Controle-druppel = 0.05M CaCl₂·2H₂O.
- Aaltjes individueel met 'aaltjeshengel' in het centrum aanbrengen. Vijf herhalingen per combinatie met 25 aaltjes per schaalte.
- Schaaltes sluiten en op labtafel wegzetten (ca. 22°C) in verschillende oriëntaties.
- Na 30, 60, 120 en 180 minuten de aaltjes in de cirkeldelen (Fig.8) B1-2-3 en C1-2-3 tellen.



A: startpunt aaltjes
B/C: test- en/of controledruppel(s) 10 μ l

Fig.8. Arena voor lokproeven met *D.dipsaci*: startpunt (A) en testpunten B en C.

5.3 Resultaten

- De resultaten (in de tabellen) worden uitgedrukt als het quotiënt van het percentage aaltjes in en rondom druppel B en C. Het totale aantal aaltjes in en rondom de druppels wordt hierbij op 100% gesteld.
- Quotiënt >1: druppel B is aantrekkelijk
Quotiënt <1: druppel C is aantrekkelijk
- *: het verschil is significant, P(t-test) <0.05

Tabel 10. Quotiënten van het percentage stengelaaltjes (nsa) bij testdruppels B en C

Quotiënt van het % aaltjes in en rondom druppel B en C.

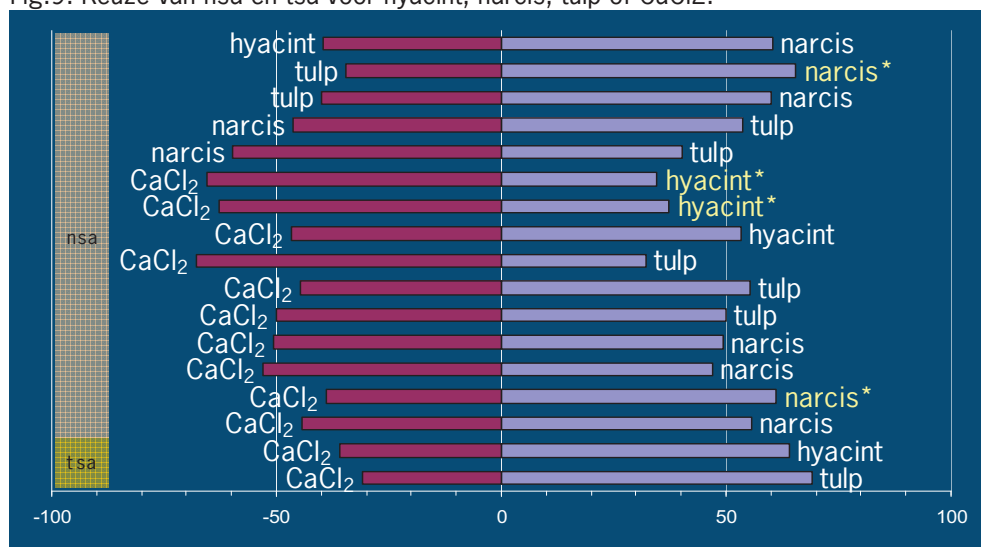
B	C	30min	60min	120min	180min
tulp	CaCl ₂	1.88	1.88	2.22	3.14*
hyacint	CaCl ₂	6.00*	2.00	1.78	2.14

Quotiënt van het % aaltjes in en rondom druppel B en C.

B	C	30min	60min	120min	180min
tulp	narcis	0.67*	0.67	0.68	0.60*
tulp	narcis	1.60*	1.07	1.15	1.00
narcis	tulp	0.77	0.96	1.50	3.25
narcis	tulp	1.53	1.94*	1.89*	2.28*
narcis	hyacint	1.13	2.36*	1.52	1.48

Volgens tabel 10 lijkt narcis gemiddeld aantrekkelijker voor nsa dan tulp of hyacint. Eenzelfde tendens valt te bespeuren uit Fig.9: nsa kiest, hoewel niet significant meestal voor narcisexudaat. Bij de keuze hyacint, tulp of CaCl₂ wisselt het, maar is de keuze meer voor CaCl₂ of "50/50". Bij tsa (waar toen weinig verse stengelaaltjes van beschikbaar waren) kiezen de aaltjes liever hyacint of tulp dan CaCl₂, hoewel ook niet significant.

Fig.9. Keuze van nsa en tsa voor hyacint, narcis, tulp of CaCl₂.



Deze experimenten zijn herhaald bij PPO in 2008 volgens voorschrift van PRI. In dit geval zijn hyacintenstengelaaltjes (hsa) ingezet. Slechts in een viertal gevallen waren er voldoende vitale hsa-individuen om waarde te hechten aan de uitslag. Er is exudaat gebruikt van zowel de wortel als de stengel om te zien of dit verschil gaf. Deze experimenten zijn in duplo uitgevoerd en na 1 uur afgelezen. Er kwamen geen significante resultaten uit naar voren; in deze experimenten kon niet worden vastgesteld of er in een plantenextract een aantrekkend bestanddeel aanwezig was (resultaten niet weergegeven).

5.4 Discussie

In attractieproeven van PRI is vastgesteld dat stengelaaltjes reageren op plantexudaten en eerste resultaten wijzen op (lichte) waardpreferentie. Uit de eerste serie experimenten met tulpen-stengel-aaltje (tsa) en narcis-stengel-aaltje (nsa) kan de voorzichtige conclusie worden getrokken dat tsa aangetrokken wordt door exudaten van tulp en hyacint. Nsa wordt aangetrokken door narcis en afgestoten door hyacint en in mindere mate door tulp. Als nsa de keuze krijgt tussen narcis en als alternatief tulp of hyacint ligt de voorkeur bij narcis.

De vraag blijft in hoeverre geëxtraheerde componenten van narcis, tulp en hyacint voldoende verbindingen bevatten die *in vivo* zorgen voor attractie. Een alternatief is om stengelstukjes in agarose in te bedden en deze te gebruiken. Componenten van ui (mogelijk een hittebestendig, wateroplosbaar niet-eiwitcomponent) bleken voor een uienstengelaaltjes significant aantrekkelijker dan bv. componenten van tomaat, haver of mosterd (Spiegel et al. 2003).

Bij de schimmel *Phytophthora* spp. zijn aminozuren de voornaamste attractanten; verder worden ook allerlei niet-plantspecifieke of abiotische factoren genoemd zoals koolstofgradiënten, suikers, organische zuren en pH.

Theoretische modelbouw, gebaseerd op gegevens betreffende o.a. bacteriën en *Meloidogyne* spp. gaven aan, dat chemoattractie vanaf 1-2 meter van de wortels kan plaatsvinden. In hoeverre stengelaaltjes zich kunnen richten op exudaten uit de wortel is niet duidelijk.

Bij herhaling bleek in 2007 bij PRI en in 2008 bij PPO, dat vooral de vitaliteit van de testpopulaties cruciaal waren. Daarnaast is niet uit te sluiten, dat het exudaateffect wel eens niet alleen waardplantspecifieke componenten kunnen zijn, maar mogelijk ook abiotische factoren zoals zouten en specifieke aminozuren. Hoewel een positief effect is gesignaleerd en men in een aantal experimenten van attractie kan spreken, is dit effect niet significant.

*Gezien ook de relatief lastige procedure (vitale nematoden, voldoende aantal enz.) lijkt een lokproef op dit moment niet geschikt om populaties *D. dipsaci* op ras te kunnen onderscheiden.*

6 Proefveldexperimenten (inundatiebak-experimenten)

6.1 Achtergrond

Voor de beoordeling of planten waardplant zijn voor stengelaaltjes is gebleken dat de experimentele condities in de kas niet optimaal waren voor de vollegrondgewassen zoals bloembolgewassen. Om te bepalen of de populaties *D. dipsaci* derhalve parasitair zijn op deze waardplanten moeten experimenten buiten (in containers) worden uitgevoerd. PPO heeft een quarantaine containerveld. Hier zijn populaties *D. dipsaci* van diverse afkomst verzameld, aangehouden en gebruikt voor beperkte waardplantexperimenten: zijn tulp, narcis en hyacint naast gerst, aardappel en ui gevoelig voor de verschillende populaties? Een probleem bleek de slechte conditie van een aantal in gebruik zijnde inundatiebakken; door een kapotte of slecht werkende afwatering bleken een aantal verzamelde populaties (waaronder een nsa uit Engeland, een hsa en de tsa-populaties) verdwenen te zijn. Via aanvullend LNV-geld (zg. NAP-gelden) zijn deze bakken in 2007-2008 opgeknapt door het herstellen van de pijpconstructie voor afwatering, controle en reparatie van de bakken.

6.2 Proefopzet

Populaties: er zijn verschillende populaties stengelaaltjes verzameld, ook uit het buitenland (nsa). Het betrof 3 populaties tsa, 3 populaties hsa, en 2 populaties nsa waarvan een die voor waardplant (potexperimenten) is gebruikt. Daarnaast zijn twee populaties stengelaaltjes uit Phlox en Hosta via besmet plantgoed in inundatiebakken aangebracht (zie hoofdstuk 3.4).

Waardplanten: een aantal inundatiebakken zijn gebruikt voor onderzoek naar de waardplantstatus van de gewassen tulp, hyacint, narcis, aardappel (cv Seresta), gerst (cv Reggae) en ui (cv Bravo). Dit waren de bakken nrs. 33, 46 en 59. Andere bakken zijn gebruikt om de populaties in stand te houden en als controle (aanplant van de waardplant tulp, narcis of hyacint). Ook zijn tulp, narcis, krokus en hyacint onderzocht als waard van hsa.

Analyse: van de planten zijn monsters via de mistkamer geanalyseerd op infectie met stengelaaltjes. Grondmonsters zijn gestoken voor en na de teelt (op standaard wijze: van gehele bak (8 steken; 1 1/2 cm boor, 30 cm diep)) en via spoelen of bij Blgg geanalyseerd op stengelaaltjes. Deze monsters zijn geteld om vast te stellen of er sprake was van toename in aantallen stengelaaltjes; dit is een maat, naast symptomen op en aan de plant voor het zijn van een waard voor deze nematode. Voor identificatie is gebruik gemaakt van PCR, hoewel dit op rasniveau (behalve voor hsa) niet sluitend is en de boltoets (Windrich).

6.3 Resultaten

In 2007 zijn een aantal populaties gedecimeerd door overmatig water in de achteraf kapotte inundatiebakken. De lage aantallen stengelaaltjes in de inundatiebakken maken een verdere proefneming dat jaar niet mogelijk; nieuwe populaties zijn verzameld (Muscari, Chionodoxa, tulp). Voor een goede uitvoering dienen er voldoende stengelaaltjes in de grond aanwezig te zijn om proeven met verschillende planten uit te voeren. De proefopstelling (inundatiebakken) zijn opgeknapt; populaties stengelaaltjes zijn opgepept door aanplant van voor de rassen specifieke waardplanten.

In het onderzoek van 2008 zijn drie vollegrondgewassen getest op hun waard-zijn voor nsa (Tabel 11a; Fig.10).

De aanplant van ui (bak 46) bleek dit jaar opgegeten door een onbekend organisme (kruisje in Tabel 11 a bij bovengronds gewas).

Tabel. 11a. Stand gewas op nsa-inundatiebakken juli 2008. U = ui; A = aardappel, en Z = gerst

Bovengronds gewas					Grondmonsters aantal / 300g			
In.bak		Monster datum	Monster gewicht (g)	aantal sa	Inundatiebak	zaai 25-4-2008	na oogst 15-10-2008	
46	U46	x			46	13	35	
	A46	22-9-2008	2.6	0			26	
	Z46	16-7-2008	7.4	0			nvt	
59	U59	22-9-2008	1.9	17	59	5	14	
	A59	22-9-2008	3	0			8	
	Z59	16-7-2008	7.5	0			nvt	

Fig.10. Waardplantexperimenten in inundatiebakken: aardappel, gerst en ui.



Bak 59: aardappel, gerst en ui op nsa



Bak 33: met gerst, aardappel en ui



46: gezonde controle: detail ui

Voor gerst zijn geen grondmonsters genomen na de oogst. Er waren geen bovengrondse symptomen waarneembaar bij de geteste gewassen, behalve bij ui in inundatiebak 59. In ui werden ook stengelaaltjes uit het gewas geëxtraheerd. Aardappel en gerst lieten geen aaltjes zien in het bovengrondse gewas. Het aantal stengelaaltjes in de grond leek bij ui en aardappel licht toe te nemen. ,

Onderzoek 2009

Waardplantexperimenten zijn uitgevoerd met verschillende gewassen op met hsa (Tabel 12 en 13), en met nsa besmette bakken (Tabel 11b).
Dit jaar is de controleaanplant van ui niet opgekomen.

Tabel 11b. Waarnemingen aan potentiële waardplantgewassen en grond bij nsa

gewas		grondmonster		bovengrondse symptomen	Symptomen bol/knol
		planten sa / 300 g	rooien sa / 300 g		
sierui	A	1	10	geen symptomen	ringen na doorsnijden, veel stengelaaltjes
	B	1	74		ringen na doorsnijden, veel stengelaaltjes
Tulp	A	2	1	geen	geen, geen stengelaaltjes
Hyacint	A	1	1	geen	geen, geen stengelaaltjes
Krokus	A	2	1	geen	geen, 1 dood stengelaaltje
Suikerbiet	A	3	1	geen	geen
	B	1	1		
Aardappel	A	3	1	geen	geen
	B	3	>0		
Braak	A	0	2	geen	geen
	B	0	0		
Ui*	A	29	54	geen	geen
	B	2	3		
Bladrammenas	A	2	45	geen	nvt
	B	1	0		
winterrogge*	A	1	3	geen	nvt
	B	1	4		

Toelichting bij Tabel 11b: sa = stengelaaltje; * = controle ui is niet opgekomen; ** = bovengronds gewas is voor A driemaal bemonsterd op eenzelfde tijdstip; 1 monster (59 sa/10 gr); 2 monsters 0 sa/10 gr.
Het totale monster voor analyse (tellingen) in de mistkamer was resp. 36, 15 en 30 gr.
Winterrogge is eenmaal bemonsterd: 0 sa/10 gr.

Tabel 12. Symptomen in inundatie bakken met hsa. Narcis en tulp zijn niet weergegeven, zij lieten geen symptomen noch stengelaaltjes in de plant zien.

gewas		grondmonster		bovengrondse symptomen	Symptomen bol/knol
		planten sa / 300 g	rooien sa / 300 g		
Hyacint	A	5	65	lokale vergeling bladbasis, 1x ook licht gebobbeld	ringen na doorsnijden, veel stengelaaltjes
	B	1	17		
Krokus	A	3	0	geen; uitz 1x scheurig topblad	grijze vlekken rond bodem; sa geen sa
	B	2	3	geen	

Tabel 13. Aantallen hsa in Hyacint, Krokus, Narcis en Tulp in het gewas en in de grond.

nr	gewas	aaltje	bovengrondsgewas			bovengron	aantal sa per 300 g grond	
			april				planten/zaai	oogst
			gewicht (g)	#sa	#sa/10g		gewicht (g)	juli
18	H	hsa	30.4	10	3		5	65
18	K	hsa	1.7	2	12		3	0
18	N	hsa	15	0	0		7	0
18	T	hsa	20	0	0		6	0
36	H	hsa	15.5	17	11		1	17
36	K	hsa	2.8	6	21		2	3
36	N	hsa	21.1	0	0		4	1
36	T	hsa	22	0	0		1	4

sa = aantallen sa; in juli zijn geen bovengrondse plantendelen geteld.

In de nsa-bakken was de grondbesmetting laag. Alleen bij sierui en ui, en eenmaal bij bladrammenas (wat niet conform de verwachting was) werd een toename gevonden qua aantallen *D. dipsaci* in de grond. Er zijn geen symptomen gezien in het bovengronds gewas. Met nsa zijn in ui in het bovengrondse gedeelte en de bollen stengelaaltjes aangetroffen (Tabel 11c).

Ook in de hsa bakken was de oorspronkelijk grondbesmetting laag (1-7 sa / 300 g grond). Bij teelt van hyacint werd zowel in bak 18 als 36 een toename gevonden van de aantallen *D. dipsaci* aaltjes in de grond (65/17). Geen toename was te zien voor de op deze bakken geplante narcis, tulp en krokus. In de hsa-bakken werd in het bovengronds gewas en de bollen van de tulp en de narcis geen aaltjes gevonden. In het bovengrondsgewas van krokus werd een enkel stengelaaltje aangetroffen. Na rooien van de krokusbollen waren hierbij 2 uit 17 en 2 uit 18 knollen verdacht. In het monster uit bak 18 werden ook daadwerkelijk 2320 stengelaaltjes aangetroffen. In het andere monster werden ze niet gezien. 9 uit 10 en 10 uit 10 hyacintenbollen vertoonden ringen na de oogst in de bakken besmet met hsa. Een monster van deze bollen bevatte tienduizenden stengelaaltjes. (Tabel 13).

6.4 Conclusies

Binnen het project “rassen bij stengelaaltjes” worden in een vollegronds quarantainefaciliteit (zg. inundatiebakken) populaties van stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*) gekweekt, vermeerderd en gebruikt voor kleinschalig waardplantonderzoek en als materiaal voor andere analyses zoals DNA-analyses en lokproeven.

Gebleken is, dat bij infectie-experimenten met *D. dipsaci* niet altijd bovengrondse symptomen te zien zijn in het te testen gewas; dit maakt een visuele waarneming van mogelijke besmettingen lastig. Hier ligt een kennishiaat: zijn er drempelwaarden van aantallen stengelaaltjes nodig om symptomen te kunnen zien?? Bovendien zijn bij sommige gewassen (vooral hyacint) pas typische symptomen waarneembaar bij doorsnijden van de bol; de beslissing of een gewas nu waard is voor een bepaalde populatie/ras stengelaaltje is lastig. Ui en sierui lijken in ieder geval volgens de potproeven nsa te vermeerderen en een waard; dit blijkt ook uit vollegrondsexperimenten binnen een ander project (PT; waardplanten van *D. dipsaci*). Opvallend is het verschil in de herhalingen voor bladrammenas; in een geval geeft deze een toename van nsa in de grond en het andere geval niet. Dit komt overeen met bevindingen op een proefperceel met nsa; Tot op heden zijn geen *D. dipsaci* in bladrammenas aangetroffen in het bovengrondse gewas. Hsa lijkt waardplantspecifiek voor hyacint (en verwante species zoals *Chionodoxa* en *Muscari* op grond van vroegere experimenten en ervaringen (niet in dit project). Dit wordt bevestigd door het DNA-merkeronderzoek (zie hoofdstuk 3.3). AFLP-analyse van DNA van enkele populaties van hsa moet dit bevestigen.

De wisselende gegevens betreffende mogelijke waardplantgevoeligheid voor populaties/rassen stengelaaltjes geeft aan, dat voor eenduidige resultaten experimenten vele jaren moeten worden uitgevoerd op percelen/proefcontainers die zo veel mogelijk homogeen met een basisconcentratie aan stengelaaltjes zijn besmet. Daarbij moet dan de populatie voorafgaand aan een experiment (en na afloop een experiment (van een jaar) minstens een of twee jaar met de oorspronkelijke waardplant beplant worden om de populatie weer op peil te brengen indien vervolgonderzoek uitgevoerd gaat worden). Daar dit langdurig en dus kostbaar onderzoek is (mede door de quarantainestatus van *D. dipsaci* in bloembolgewassen en de daarmee gepaard gaande extra veiligheidsmaatregelen) is dit moeilijk haalbaar.

7 Discussie

7.1 Discussie betreffende de resultaten binnen dit project

De literatuurstudie was gericht op oude literatuur met het accent op het bestaan van rassen bij *D. dipsaci*, en de mogelijkheden tot kweken van de nematode. Informatie betreffende de verspreiding in de grond in relatie tot bemonsteringstechnieken is beschreven door Schomaker (2008).

Het stengelaaltjesprobleem bestaat al heel lang. Het is een chronisch probleem en erg complex in de zin van de populatiegenetica, waardplantvoorkeur en bestrijdingsmogelijkheden. Het bestaan van rassen bij stengelaaltjes staat nog steeds ter discussie. Het voorkomen van genetische incompatibiliteit en verminderde vitaliteit van hybriden zou kunnen wijzen op het ontstaan van nieuwe (sub-) soorten *D. dipsaci* (Dropkin 1988). Concrete aanwijzingen ontbreken vooralsnog; deze moeten komen uit vooral moleculair (genetisch) onderzoek, gekoppeld met waardplantonderzoek. Seinhorst heeft echter in het verleden duidelijke verschillen gevonden tussen nsa en tsa.

De gegevens betreffende waardplantbereik van stengelaaltjesrassen zijn soms niet eenduidig en verschillen per auteur. Dit komt door het hanteren van onder meer verschillende proefopzetten (wanneer is een plant nu aangetast: bij symptomatisch weefsel, aantasting ondergrondse delen en flinke aantallen in de grond?) en verschillende populaties stengelaaltjes. Er bestaan daarom nog veel kennishiaten betreffende waardplantbereik van *D. dipsaci*-rassen.

Het kweken van stengelaaltjes *in vitro* levert gekarakteriseerde populaties op, die mogelijk minder virulent of vitaal kunnen zijn. Standaard protocollen zijn hiervoor in de literatuur beschikbaar, ook voor inoculatie; of deze de eigenschappen hebben van *in vivo* gekweekte populaties is echter onduidelijk.

Identificatie van rassen bij *D. dipsaci* is voor tsa en nsa nog niet mogelijk, hoewel tsa vaak reageert met een set primers die zijn ontwikkeld door PPO (van Doorn et al. 2006). Het probleem is waarschijnlijk het bestaan van mengpopulaties van nsa en tsa. Daardoor is er middels AFLP geen onderscheid te maken. Een nieuwe AFLP-analyse van een aantal verschillende tsa, nsa en andere, goed gekarakteriseerde populaties *D. dipsaci* wordt in 2010 uitgevoerd. Deze zijn geselecteerd op "echtheid": PPO bezit ten minste een populatie nsa die alleen narcisachtigen aantast. Voor hsa is wel een merker gevonden die tot nu toe dit "ras" kan aantonen in PCR. Hsa infecteert alleen hyacintachtigen, en soms narcis. Voor verdere analyse is een fundamentele studie noodzakelijk; om voldoende genetisch betrouwbare analyses te kunnen doen zijn "whole genome amplifications" noodzakelijk om mengsels van genetisch materiaal te voorkomen (McNulty et al. 2008). Momenteel wordt hier een start mee gemaakt. De vakgroep Nematologie van WUR is geïnteresseerd (zie hoofdstuk 7.2.9); in combinatie met de faciliteiten, gegevens en ervaring van PPO en PD kan een dergelijke aanpak de discussie aangaande rassen nieuwe informatie verschaffen. Dit moet condenserend in een STW-project.

De resultaten van de bij PPO-BBF uitgevoerde kaspotproef met tsa en nsa op tulp/narcis zijn niet in lijn met de gestelde hypothese van differentiële interactie: tulp en narcis vatbaar voor populaties van tsa; narcis vatbaar voor nsa. De beproefde interacties lijken in de potproef anders uit te pakken dan in de buitencontainerproef. Blijkbaar is de interactie niet alleen genetisch bepaald, maar spelen ook andere factoren een doorslaggevende rol zoals fysiologie van de bol, inoculatiemethode (plant versus grond), omgevingsfactoren (kas versus buiten).

Uit de PPO-AGV uitgevoerde kaspotproef met zaailingen van diversie akkerbouwgewassen blijkt uit alle tsa en nsa-populaties te vermeederen en aardappel een van de twee getoetste tsa populaties. Deze gegevens bevestigen de verwachting dat de reizende bollenkraam een risico zou kunnen vormen voor verspreiding en overdracht van stengelaaltjes in de akkerbouwrotatie. Echter, meer onderzoek is hier voor nodig. Het feit dat het erg lastig is om percelen met een constant niveau aan vitale stengelaaltjes in stand te houden geeft

aan, dat dit type onderzoek jarenlange inspanning benodigt.

In attractieproeven van PRI en PPO is vastgesteld dat stengelaaltjes reageren op plantexudaten en eerste resultaten wijzen op waardpreferentie hoewel niet significant. Belangrijkste resultaten van het onderzoek zijn dat er een toets ontwikkeld is, waarin de stengelaaltjes actief over het medium agarose naar wortel-exudaten bewegen, op basis van literatuurgegevens en ervaring met entomopathogene aaltjes. De toets is mogelijk te optimaliseren door optimalisatie van het wortel-exudaat, en de kwaliteit van het uitgangsmateriaal van het te testen gewas). Uit de eerste serie experimenten met tsa en nsa kan de voorzichtige conclusie worden getrokken dat tsa aangetrokken wordt door exudaten van tulp en hyacint. Nsa wordt aangetrokken door narcis en afgestoten door hyacint en in mindere mate door tulp. Bottleneck van deze experimenten is de vitaliteit van de stengelaaltjespopulaties (persoonlijke waarneming van PRI en PPO). Meestal werden er 50 individuen gebruikt; in veel van de lokexperimenten bleek minder dan de helft te migreren; vaak bleven individuele aaltjes onderweg steken als gevolg van overlijden of andere malaise zoals geringe beweeglijkheid. Mogelijk kan bij veelvuldig herhalen wel een goed resultaat behaald worden, of door het ontwikkelen van een andere "arena" waar de aaltjes zich in kunnen bewegen. Daarbij zal ook meegenomen moeten worden de effecten van bufferbestanddelen, pH en andere abiotische factoren om meer zekerheid te hebben dat attractie daadwerkelijk door waardplant-specifieke moleculen wordt getriggerd.

7.2 Algemene Discussie: kennishiaten en onderwerpen van vervolgonderzoek

Ondanks dat er vooral vroeger (Seinhorst, Windrich e.a.) vanaf de jaren 1950, maar ook daarna veel onderzoek aan stengelaaltjes is uitgevoerd (PPO), zijn er nog steeds de nodige vragen.

7.2.1 Inventarisatie factoren die (mogelijk) bijdragen aan toename stengelaaltjes-besmettingen

Tijdens een brainstormsessie (20 nov. 2007 bij PPO op verzoek van het LEI) werd aangegeven dat er mogelijk een aantal factoren te benoemen zijn in verband met de toename van het stengelaaltje. Dit zijn zowel beïnvloedbare als niet beïnvloedbare factoren.

Samenvattend zijn de meest belangrijke, *beïnvloedbare* factoren:

- Braakperiode / gebruik van groenbemesters
- Teelt van waardplant na waardplant
- Kennis van ziektesymptomen
- Bedrijfshygiëne
- Slecht uitlezen van partijen (vervuiling)
- Ondernemerschap van telers
- Gebruik van huurland
- Kennis van waardplanten voor *D. dipsaci*

Op grond van deze discussie heeft het LEI een kort verslag opgesteld; hieruit bleek dat men geen oorzakelijke verbanden kon leggen aan de hand van de door de BKD geleverde gegevens van besmette bedrijven van de afgelopen 10-15 jaar. Hiervoor zijn andere parameters nodig.

7.2.2 Beheersingsmethoden (grondontsmetting, "koken", alternatieven)

Over het beheersen van het stengelaaltjesprobleem bestaan de nodige vragen:

- wat is de status van de beschikbare grondontsmettingsmiddelen (bv. cis-dichloorpropeen: komt dit middel ooit nog eens terug?), en hoe kunnen deze optimaal toegepast worden? Er zijn een aantal methoden die kunnen leiden tot vermindering of vernietiging van populaties stengelaaltjes in met name bolgewassen. Grondontsmetting draagt hieraan bij. De toelating van dichloorpropeen is vervallen; een alternatief is metamnatrium. Metamnatrium werkt echter waarschijnlijk minder diep in de grond. Het Ctgb laat in geval van een besmetverklaring met stengelaaltjes in bloembollen een toepassing van Basamid CleanStart in het seizoen van 2009 en 2010 toe. Voor Monam CleanStart was er al eerder een dergelijk besluit genomen. In beide gevallen geldt de volgende teeltmaatregel: na de ontsmetting met Monam CleanStart en Basamid CleanStart moet er worden afgedekt met plastic folie.

- belang van de stengelaaltjes op grotere diepte dan dat er meestal standaard wordt bemonsterd: 40-60cm? PPO heeft in het verleden gevonden dat ook op deze diepte *D. dipsaci* kan voorkomen. Onduidelijk is of dit onderdeel uitmaakt van de levenscyclus (bv. wegkruipen in de winter naar grotere dieptes). Dit vraagt meer onderzoek.

- voorkeur inunderen boven grondontsmetting en wat is de optimale inundatietechniek (bv. invloed temperatuur tijdens inundatie op effect en dus op de duur)?

- aanpassing/bewaring van grondmonsters? Het langere tijd bewaren kan aanleiding geven tot mortaliteit; met DNA-toetsen (Blgg) hoeft dit echter geen probleem te zijn.

- daadwerkelijke verspreidingskans via schuurstof? Dit is sporadisch gevonden (PPO); om het risico in te schatten is meer onderzoek nodig.

- kunnen we volstaan met een meer strikte opvolging van partijmaatregelen en 'vrijgeven' van perceelsmaatregelen? Hierbij ligt het accent op vermindering verspreiding via plantgoed door afvoer van besmette partijen (vernietigen); perceelsmaatregelen (uitzielen, ontsmetten, vruchtwisseling) vallen dan onder verantwoordelijkheid van kweker.

- kunnen we volstaan met een beperkte partij- en perceelmaatregel? Hierbij ligt het accent op een gedifferentieerde aanpak perceel en partij, waarbij alleen zieke plek chemisch ontsmet wordt plus standaard buffer en de partij declasseren voor uitsluitend afbroei (bol voor bloem). Een aantal van deze vragen kunnen in vervolgonderzoek aan de orde komen.

7.2.3 Resistentie tegen stengelaaltjes

Wanneer er meer bekend wordt over waardplantspecificiteit van rassen/populaties *D. dipsaci*, dan is dit aspect beter aanpakbaar. Momenteel is hier vrijwel niets over bekend; mogelijk bestaat er nauwelijks resistentie.

7.2.4 Problemen in andere vollegrondsgewassen

De bollenteelt kent een traditionele vruchtwisseling van vrijwel allemaal vatbare bolgewassen. Er zijn *D. dipsaci*-rassen bekend met een deels overlappende en deels exclusieve voorkeur voor bepaalde waardplanten, zoals het tulpenstengelaaltje voor tulp en narcis e.a. (aardappel), en het narcissenstengelaaltje voor narcis e.a. maar niet voor tulp. Er zijn reële veronderstellingen over mengpopulaties en onderlinge kruisbaarheid. Deze populatiebiologische aspecten zijn een jaar onderzocht binnen een project, gefinancierd door LNV, maar vervolgonderzoek is wenselijk om voorkomende gevallen te bestuderen, en vast te stellen in hoeverre populaties *D. dipsaci* uit aardappel bv. tulp kan besmetten.

7.2.5 Data betreffende langdurige overleving

Hier zijn geen recente gegevens betreffende *D. dipsaci* van bekend; zou via tracking en tracing bijgehouden kunnen worden.

7.2.6 Bekendheid van richtlijnen hoe te handelen met besmette partijen en percelen (brochure)

Specifieke, praktische informatie blijkt niet goed tot de praktijk (telers) door te dringen. Communicatie moet op verschillende wijzen worden aangepakt; brochures hierover zijn zeker wenselijk.

7.2.7 Ontwikkeling van toetsen op (plant-) materialen en bemonsteringsmethoden

De bestaande methode van visuele beoordeling van gewas en droge bollen laat latente besmettingen ongemoeid. PCR-toetsen zijn objectiever, specifieker (soort) en gevoeliger. Knelpunten vormen de bemonstering en monstervoorbewerking. Voor grondmonsters is hier in voorzien (o.a. door de inspanningen van Blgg). Voor plant-, bol- en watermonsters is er nog geen mogelijkheid. Dit moet verder onderzocht worden.

7.2.8 Bemonstering uitschot plantgoed/verdacht plantmateriaal bij bv. partijen met voorgeschiedenis: tracking and tracing

De teelt van bloembollen op huurpercelen (onbekende historie) is een risicofactor. Aaltjeswol (droge vorm van aaltjes) vormt mogelijk een belangrijke lokale verspreidingsbron in werk/opslagruimten via stofverplaatsing (Van Os et al. 2006) en via fust. Besmet plantgoed vormt een belangrijke vector voor verspreiding over grote afstanden, naar andere bedrijven en gewasrotaties. Latent besmette bloembollen vormen mogelijk een belangrijke besmettingsbron. Het vrijhouden van uitgangsmateriaal van *D. dipsacis* derhalve van groot belang. Door middel van traceringsonderzoek zou nagegaan kunnen worden waar de besmetting oorspronkelijk vandaan komt. Droge partijen zijn altijd herleidbaar naar de teeltplaats. De vraag is of die besmetting zijn oorsprong vindt in de grond of in het plantmateriaal.

Via tracking en tracing kunnen systematisch (en momenteel onverklaarbare aantastingen door *D. dipsaci* in het productieproces opgespoord worden.

7.2.9 Fundamenteel onderzoek

Een voorstel vanuit Nematologie van WUR en PPO BBF betreft een nieuwe aanpak van de ontwikkeling van een rasspecifieke identificatie als basis voor verder onderzoek naar de beheersing van deze nematode.

Stengelaaltjes vormen een hardnekkig probleem in de bollenteelt. Het bestaan van rassen is aannemelijk, maar over aard, identificatie en verspreiding is vrijwel niets bekend. We kiezen hier voor radicaal nieuwe aanpak die mogelijk wordt gemaakt door nieuwe DNA technieken. Individuele, goed op "ras" gekarakteriseerde stengelaaltjes zullen gebruikt worden als startmateriaal (= gegarandeerd één ras). Dit zal leiden tot de identificatie van meerdere specifieke DNA merkers per ras. Dit is onontbeerlijk gereedschap waarmee vervolgens het voorkomen, de verspreiding en het overleven van dit aaltje in de verschillende relevante bollenteelten en -systemen in kaart kunnen brengen.

Vooraf de langdurige overleving van deze nematodensoort baart telers zorgen.

Stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*) zijn hardnekkige plantenparasieten met een grote economische impact. De omvang van de economische impact kan verklaard worden door de enorme brede waardplantreeks - stengelaaltjes parasiteren zo'n 500 plantensoorten verdeeld over zo'n 40 families -, en door de opvallend lage schade drempel. In veel gevallen is de aanwezigheid van 10 stengelaaltjes in een bodemonmonster van 0,5 kg al voldoende om zichtbare en economisch significante schade te veroorzaken. Wat maakt nu dat stengelaaltjes zo hardnekkig zijn? Uit één van de ontwikkelingsstadia van het stengelaaltje kunnen zich zogenaamde Dauerlarven ontwikkelen. Dit is een levensstadium waarin de nematode overleeft op het moment dat er geen geschikte waardplant aanwezig is. Stengelaaltjes zijn in dit stadium grotendeels uitgedroogd en verbruiken bijna geen energie. Op deze manier kunnen ze enige jaren overleven onder droge omstandigheden. De lage schadedrempel, en de mogelijkheid om lang te overleven in de bodem verklaren waarom stengelaaltjes zo'n notoir probleem zijn.

Rassen – het is inderdaad correct dat stengelaaltjes in principe kunnen parasiteren op honderden soorten planten, maar er zijn geen individuele populaties die dit daadwerkelijk kunnen. Binnen stengelaaltjes worden zo'n 30 biologische rassen onderscheiden, en deze worden gedefinieerd aan de hand van hun waardplantvoorkeur. Veelal wordt zo'n ras genoemd naar de meest belangrijke waardplant, en zo worden niet alleen het tulpen-, het hyacinten-, het narcissenras onderscheiden, maar ook o.a. het uien-, het lucerne- en het rode klaverras.

Het maakt nogal een verschil met welk stengelaaltjes ras we te maken hebben, en het beheersen van dit probleem zou enorm geholpen zijn als we eenvoudig de identiteit van een ras zouden kunnen vaststellen. Echter, qua uiterlijk zijn deze rassen onmogelijk te onderscheiden. Reguliere moleculaire methoden stellen ons wel in staat stengelaaltjes als soort te detecteren (ook in zeer lage dichtheden), maar rassen onderscheiden is iets wat wereldwijd nog niemand gelukt is. Dit komt o.a. omdat je voor het vinden van merkers pure rassen in handen moet hebben – veel voor onderzoek gebruikte populaties zijn waarschijnlijk mengsels van rassen geweest. Een andere verklaring voor het uitblijven van succes is dat men gekeken heeft naar zogenaamde “neutrale merkers”; DNA fragmenten die niets met de waardplantvoorkeur te maken hebben.

Waarom denken we dit rassenprobleem nu wel kunnen oplossen? In de eerste plaats gaan we individuele aaltjes als startpunt gaan nemen. Per definitie kan het kan hier dus nooit meer om een mengsel van rassen gaan. Een enkele nematode bevat erg weinig DNA (0,2 ng) maar er bestaan sinds kort methoden om dit niveau op te krikken (“whole genome amplification”).

Voor soortdetectie bij nematoden wordt veelal gebruik gemaakt van één DNA gebied, het ribosomaal DNA. Bij deze nieuwe benadering willen we vier rassen onder de loep nemen: het tulpen-, het hyacinten-, het narcissen- en het uienras. Van ieder ras nemen we een beperkt aantal populaties (2-5), en voor iedere populatie bepalen we de base volgorde van 2.000 tot 4.000 genen. Een nieuwe techniek, “454 sequencing” zal gebruikt worden op snel en relatief goedkoop duizenden fragmenten te sequencen voor iedere populatie. Als startmateriaal fungeren de bij PPO aanwezige, goed gekarakteriseerde populaties nsa (1 populatie) tsa (populaties verkrijgbaar uit schadegevallen in tulp), hsa (2 populaties) en het uienras (1 populatie). Verder zijn er nog populaties afkomstig uit Phlox en knolselderij.

Behalve hun waardplantvoorkeur lijken de stengelaaltjesrassen genetisch erg veel op elkaar. De algemene benodigde genen (“reguliere stengelaaltjesgenen”) - de overgrote meerderheid - zullen bij ieder ras c.q. populatie (vrijwel) hetzelfde zijn, en kunnen terzijde gelegd worden. Na deze schifting zullen naar schatting enige tientallen ras-kenmerkende genen overblijven. Voor bijv. het hyacinten-ras – genen die het stengelaaltjes nodig heeft om een hyacint te herkennen, binnen te dringen, afweer te neutraliseren en voedselopname mogelijk te maken. Door meerdere populaties van ieder ras te vergelijken kunnen binnen- en tussenras variatie van elkaar onderscheiden.

Op grond van deze resultaten zullen meerdere specifieke DNA merkers per ras beschikbaar komen. Deze merkers zullen gebruikt worden voor identificatie en kwantificering van stengelaaltjesrassen, en maken het mogelijk om verspreiding en overleving in kaart te brengen. Dit geheel vormt een radicale stap richting de beheersing van dit zeer schadelijke en hardnekkige aaltje.

8 Overige stengelaaltjesprojecten en plannen

Andere projecten betreffen de problematiek van stengelaaltjes inzake waardplantbereik (welke gewassen kunnen geteeld worden op een besmet perceel?), inundatie als alternatieve bestrijdingsmethode, het risico van stengelaaltjesverspreiding via ontsmettingsbaden, en de mogelijkheid van verspreiding van stengelaaltjes via uitgangsmateriaal van ook niet-bolgewassen. Daarnaast is een consultancyproject uitgevoerd betreffende monitoring van bedrijven met herhaalde stengelaaltjesbesmetting als pilot voor een groter (nog in te dienen) project.

8.1 Overige stengelaaltjesprojecten

Waardplanten (PPO 3234053900)

Het is nog (steeds) onduidelijk welke waardplanten de verschillende, in Nederland voorkomende, stengelaaltjesrassen kunnen infecteren in verband met de bestaande en toekomstige wisselteelten op percelen. Gegevens over welke gewassen nu wel of niet gevoelig zijn, uitgevoerd op vollegrondspercelen en over meerdere jaren uitgevoerd kunnen hier uitsluitsel over geven. In ieder geval moet er meer duidelijkheid komen op de risico's van bepaalde teelten op gronden met een stengelaaltjesverleden ("welke gewassen kun je telen op grond waar bijvoorbeeld tulpenstengelaaltjes of narcissenstengelaaltjes zijn aangetroffen?"). Groenbemesters worden algemeen geteeld als tussengewas. Onduidelijk is in hoeverre deze bijdragen aan de in standhouding, vermeerdering en verspreiding van stengelaaltjes. Ook de relatie met akkerbouwgewassen (rogge, aardappel) en vaste planten en dus de mogelijkheden van vruchtwisseling is nog niet duidelijk.

Een overzicht welke gewassen nu waardplant zijn voor met name de in bolgewassen voorkomende, zo goed mogelijk gekarakteriseerde stengelaaltjespopulaties en –rassen is daarom van groot belang om perspectieven van vruchtwisseling en het gebruik van groenbemesters en tussenteelten vast te kunnen stellen voor percelen al of niet met een stengelaaltjesverleden.

Inundatie (PPO 3236054600)

PPO-onderzoek toonde aan dat inundatie een goede bestrijding geeft van stengelaaltjes in de bodem; na 12 weken vond men geen levende aaltjes meer (Vreeburg et al 2009a). Dit project is bijna beëindigd; doorteelt van de waardplant narcis op geïnundeerde gronden moet uitwijzen of inderdaad alle *D. dipsaci* dood zijn.

Effect ontsmettingsbaden op verspreiding (PPO 3236054700)

Stengelaaltjes kunnen uit aangetaste tulpenbollen vrijkomen bij ontsmetting in ontsmettingsbaden. PPO heeft aangetoond dat *D. dipsaci* ten minste 2 maanden kan overleven; er bleken geen middelen te zijn die verspreiding konden voorkomen. Dit bewijst dat besmettingsbaden een besmettingsbron kunnen vormen; alleen kort verhitten van het bad geeft afdoding van de stengelaaltjes (Vreeburg et al. 2009b).

Stengelaaltjesverspreiding via uitgangsmateriaal (PPO 3234092009)

Ditylenchus dipsaci is een quarantaineziekte in bepaalde gewassen die meerjarig zijn en (vaak) verplaatst worden: bloembollen en (plant-) uien. Bij aantreffen van besmette partijen is de schade groot. Hoewel het voor de bloembolgewassen die aangetast worden door deze nematode een quarantainestatus heeft (narcis, tulp, hyacint, krokus, sierui), is dit niet het geval voor andere gewassen zoals bv. Phlox. Het is echter nog niet bewezen, dat via een partij Phlox een perceel besmet wordt, waarna (zonder dat men dit weet) een hierop geteelde partij tulp of narcis besmet wordt. Onbekend is, wat het risico hierop is: kunnen bv. aardappelstengelaaltjes tulp aantasten? Het is namelijk niet duidelijk of in alle gevallen *D. dipsaci* overleeft, en hoe lang het duurt voor de besmetting zichtbaar wordt. De waardplantstatus van het gewas speelt hier ook een rol (kan een Phlox-stengelaaltje tulp kan aantasten?). Dit project tracht hier duidelijkheid in te geven.

Daarnaast spelen bloembollen een rol in de verspreiding van *D. dipsaci* naar akkerbouw gebieden. Tulpen worden steeds meer binnen akkerbouw rotaties geteeld buiten de traditionele bollengebieden.

Dit project wil antwoord geven op de vraag in welke mate besmet plantmateriaal een permanente vestiging van stengelaaltjes op akkerbouw percelen kunnen realiseren en vice versa.

Consultancy-project Tracing stengelaaltjes op bedrijf (PPO 3234104700)

Er zijn bedrijven die meerdere malen worden geconfronteerd met besmetting door stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*). Momenteel zijn er weer enkele bedrijven zwaar getroffen, die al meerdere jaren problemen hebben met stengelaaltjes. Dit biedt de mogelijkheid om het probleem via bemonstering breed in kaart te brengen als start voor een toekomstig (groot) project zoals aangegeven tijdens de begeleidingscommissie stengelaaltjes (28 mei 2009).

Via analyses van grond-, gewas- ("uitschot bollen"), stof- en ontsmettingswatermonsters wordt getracht vast te stellen waar stengelaaltjes aanwezig zijn op een zwaar getroffen bedrijf.

Dit consultancy-project beoogt een startpunt (pilot) te zijn voor een groter tracking- and tracing onderzoek betreffende kansen op herhaalde infectie op bedrijven.

8.2 Plannen

Parapluplan "stengelaaltjes"

De stengelaaltjesproblematiek treft in Nederland vooral de bloembollensector vanwege de Q-status door de meerjarige teelt en economische impact, ook tav. de export van bolgewassen..OK De reizende bollenkraam is zeker niet de enige mogelijkheid tot verspreiding van *Ditylenchus dipsaci*. Andere teelten zoals aardappel, vaste planten (Phlox, Hosta) en plantui kunnen mogelijk besmet worden. Doordat in vaste planten *D. dipsaci* geen Q-status heeft, kan een perceel wat hierdoor is aangetast, en vervolgens gebruikt wordt voor de teelt van bv. tulp mogelijk kunnen zorgen voor verspreiding. Derhalve is *D. dipsaci* een breder probleem in Nederland, en ook daarbuiten (bv. suikerbieten in Duitsland). Dat het stengelaaltje een lastig en moeilijk beheersbaar probleem is valt af te lezen aan de lange historie van het onderzoek. De aanpak dient zich te richten op verschillende onderdelen: beheersing en bestrijding, goede communicatie en informatie over symptomen en gang van zaken bij een aantasting, goede monitoring en toetsing op stengelaaltjes, en fundamenteel onderzoek, o.a. naar het bestaan van rassen via nieuwe moleculaire technieken..

Doel is het opsporen van niet-zichtbare maar wel aanwezige besmettingen om nieuwe besmettingen en schade in het volgende jaar (jaren) te voorkomen.

Outline parapluplan Tracking en Tracing van *D. dipsaci*

- a. **Monitoring van bedrijven** met stengelaaltjesverleden
- b. **Aantonen van *D. dipsaci*** in grond, plantmateriaal, stof en ontsmettingsbadwater: gevoelige toetsontwikkeling
- c. **Tracing van percelen met *D. dipsaci*-verleden:** in kaart brengen van gegevens over getroffen bedrijven van de afgelopen jaren –invoeren van systeem voor de keuringsdienst/PD
- d. **Tracking (lokalisatie) van percelen/besmette plekken** via GPS
- e. **Factsheet/poster voor de teler:** wat te doen bij een stengelaaltjesbesmetting op bedrijf?
- f. **Fundamenteel onderzoek aan rassenconcept stengelaaltjes** (zie 7.2.9)
- g. **Stengelaaltjesproblemen in vaste planten en akkerbouwgewassen**

Getracht zal worden deze aspecten in onderzoek te nemen in samenwerking met verschillende partijen.

9 Literatuur

Doorn J. van, T Hollinger, K Pham. 2006. Identificatie van stengelaaltjes in bolgewassen; toetsontwikkeling op rasniveau (2002-2005). Eindrapportage PT 36119; PPO nr. 320682-I.

Dropkin VH. 1988. The concept of race in Phytonematology. Ann. Rev. Phytopathol. 26: 345-361.

Griffin GD and W W Waite 1971. Attraction of *Ditylenchus dipsaci* and *Meloidogyne hapla* by resistant and susceptible alfalfa seedlings. J. of Nematol. 3: 215-219.

Hooper, DJ (1972) *Ditylenchus dipsaci*. *CIH Descriptions of Plant-parasitic Nematodes* Set 1, No. 14.

Marek M, M Zouhar, P Rysanek and P Havranek 2005. Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. Helminthologia 42: 49-56.

McNulty SN, GJ Weil, M Heinz, SD Crosby and PU Fischer 2008. *Brugia malayi*: whole genome amplification for genomic characterization of filarial parasites. Exp. Parasitol. 119: 256-263

Os, G van, A de Boer. 2006. Epidemiologie van stengelaaltjes in bolgewassen. PT eindrapportage nr. 36119a; PPO 320682-II

Perera MR, SP Taylor, VA Vanstone and MGK Jones 2009. Protein biomarkers to distinguish oat and Lucerne races of the stem nematode, *Ditylenchus dipsaci*, with quarantine significance for Western Australia. Nematology 11: 555-563.

Schomaker CH 2008. Onderzoek oude literatuur stengelaaltjes PRI Wageningen, rapport 209

Spiegel Y, Burrows, PM, and Bar-Eyal M 2003. A chemo attractant in onion root exudates recognized by *Ditylenchus dipsaci* in laboratory bioassay. Phytopathology 93:127-132.

Subbotin SA, M Madani, E Krall, D Sturhan, and M Moens 2005. Molecular diagnostics, taxonomy, and phylogeny of the stem nematode *Ditylenchus dipsaci* species complex based on the sequences of the internal transcribed spacer-rDNA. Phytopathol. 95: 1308-1315.

Vreeburg, Peter; Joop van Doorn en Andre Korsuize. 2009a. Inundatie doodt stengelaaltjes, mits lang genoeg toegepast. BloembollenVisie 169: 20-21

Vreeburg, Peter; Astrid de Boer, Andre Korsuize en Joop van Doorn. 2009b. Voorkom verspreiding van stengelaaltjes tijdens ontsmetten tulp. BloembollenVisie 176: 20-21.

10 Output

Bijeenkomsten begeleidingscommissies/werkgroepen

- klankbordwerkgroep stengelaaltjes
- KAVB werkgroep commissie *D.dipsaci*: 2007 (5 juli, 27 november) , 2008, 2009
- Workshop LEI 20 nov.2007

Congressen

- European Society of Nematologists XXVIII Int. Symposium, Blagoevrag (Bulgarije): 5-9 juni: paper; development of diagnostic markers for identification of *Ditylenchus dipsaci* races in bulbous ornamentals
- ISHS Symposium Flower Bulbs (20-24 april 2008, Lisse): posters

Vakbladartikelen

juni 2008 (BloembollenVisie) (zie ook hoofdstuk 11): *zijn er rassen te onderscheiden bij stengelaaltjes?* Joop van Doorn, Peter Vreeburg, Astrid de Boer, Pham Khanh, Anne Sophie van Bruggen, Gerrie Wieger en Nico Heemskerk.

Kennisdagen/posters

Open Dag/Kennismiddag 2006, 2007, 2008 (8 februari, 30 mei) en 2009, PPO Lisse

Flyers LNV

2006, 2007, 2008 (zie hoofdstuk 11)

Overige output

- collectie gekarakteriseerde *D. dipsaci* populaties (nsa, tsa, usa, hsa) dood en levend
- een loktoetsformat (agaroseplaat) voor lokproefexperimenten
- DNA-merker voor hsa
- Lezingen voor de KAVB productgroepen (hyacint, tulp en narcis) over stengelaaltjes

11 Bijlagen

Flyers in opdracht van LNV (Beleidsondersteunende projecten Fytosanitair)



WAGENINGENUR
for quality of life

Stengelaaltjesrassen in bolgewassen

Thema: Fytosanitair beleid R0-06-005-001-009

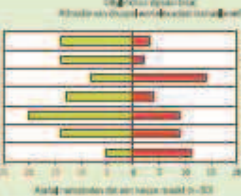
Probleem
Stengelaaltjes veroorzaken een quarantaineprobleem in bloembolgewassen in Nederland. De bloembolsector lijdt grote schade door het teeltoverbod op besmette percelen. Maatregelen zijn moeilijk te nemen doordat er weinig bestrijdingsmethoden beschikbaar zijn.

Onderzoek
Doel van het onderzoek is nagaan of gedifferentieerde maatregelen voor bedrijven met stengelaaltjes mogelijk zijn in relatie tot het gevonden aaltjesras. Het onderzoek wordt uitgevoerd door:

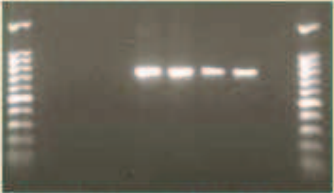
- Lokproeven met plantenextracten narcis, tulip, hyacint
- Verzamelen van zo goed mogelijk gekarakteriseerde populaties stengelaaltjes voor waardplantexperimenten
- Met bestaande markeringen uit eerder onderzoek nagaan of verzamelde populaties stengelaaltjes tot een ras behoren




Quarantaineprobleem met waardplanten, als gevolg van stengelaaltjes (A. bulbis). Gewricht.



Stengelaaltjes (A. bulbis) op waardplanten (narcis, tulip, hyacint). Aantal stengelaaltjes per plant (n=10).



Stengelaaltjes (A. bulbis) op waardplanten (narcis, tulip, hyacint). DNA-merken.

Resultaten

- Narcissenstengelaaltjes worden meer door narcis aangetrokken, blijkt uit lokproeven. De vitaliteit van de gebruikte populaties aaltjes blijft belangrijk.
- Er zijn 11 populaties stengelaaltjes verzameld in kweeklabellen voor waardplantonderzoek.
- Het hyacintenstengelaaltje kan mogelijk met een DNA-merker worden gekarakteriseerd.

Praktijk

- Toetsing op het hyacintenstengelaaltje is nu mogelijk.
- Er zijn geschikte proefvelden aangelegd om verschillende waardplanten op hun gevoeligheid voor de diverse stengelaaltjesrassen te toetsen.
- De lokproeven moeten verder uitgewerkt worden voordat de resultaten in de praktijk toegepast kunnen worden.

Communicatie 2008

- Overleg met LEI, februari
- Artikel in BloembollenVisie, maart
- Overleg met de bloembolensector, juni en november

Joop van Doorn, Astrid de Boer, Peter Vreeburg, Robert Dees, Gerrie Wiegman & Willem Jan de Kogel

Projectnr.: 06-005-001-009

Stengelaaftesrassen in bolgewassen

Thema: Fytosanitair beleid

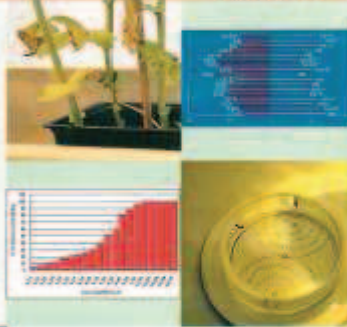
BO-05-005.3.1.9

Aktgangspunt

Stengelaaftes (Glyberis) doordringen van quaantiteitsvrije in bolgewassen zoals tulp, narcis, hyacinthe (tulp). Door het gebruik van bepaalde planten is de economische schade gered. Ondersteuning van de stengelaaftesrassen maakt wellicht een gedifferentieerd beleid op zangstake planten mogelijk. Informatie op de status van het fytosanitaire beleid van de stengelaaftesrassen, het maken van onderscheid tussen rassen en informatie over welke culturen planten door welke rassen worden aangevallen.

Onderzoek

- Oude literatuur over waarden van stengelaaftesrassen
- Oude literatuur over bestrijdingsmethoden (bestrijding)
- Identificatie van rassen van Glyberis
- Het proces van waardenbepaling van welke rassen van de stengelaaftesrassen
- Het proces van bestrijdingsmethoden van welke rassen van de stengelaaftesrassen



Resultaten

- Literatuurverricht van waarden van de stengelaaftesrassen in bolgewassen
- Gegevens over bestrijdingsmethoden
- Literatuurverricht van welke rassen van de stengelaaftesrassen
- Het proces van waardenbepaling van welke rassen van de stengelaaftesrassen
- Het proces van bestrijdingsmethoden van welke rassen van de stengelaaftesrassen

De praktijk

- Telen welke welke gewassen beter met op een percelen met een stengelaaftesrassen geteeld kunnen worden
- Mogelijk kan een selectie van welke rassen van de stengelaaftesrassen te bevinden op een
- Onderzoek van het fytosanitaire beleid van welke rassen van de stengelaaftesrassen

Jeroen van Goud, André de Boer, Gert van Os, Evert Brimmer, Corrie Schoneker, Gert Wiggers & Willem van de Kragt

Contact: Jeroen van Goud
Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
Postbus 85, 2150 AB Lisse
T 0252 40 20 25 - F 0252 40 21 02
j.v.goud@ppom.wur.nl

De rapport is ontwikkeld door BO-05-005.3.1.9
Financiering door het Ministerie van L&N



Stengelaaltjesrassen in bolgewassen

Thema: Fytsanitaire beleid

BOL-005-001.09

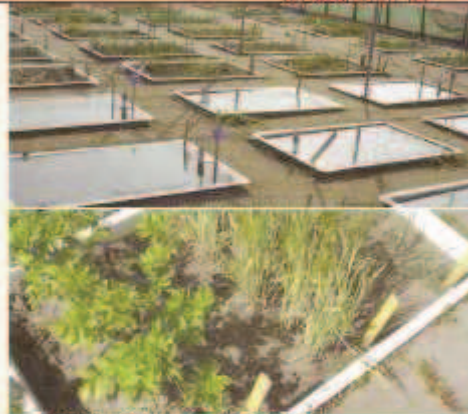
Probleem

Stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*) veroorzaken een quarantainesteek in bolgewassen zoals tulip, narcis en hyacint. De bloembollensector lijdt grote schade door het teeltoverbod op besmette percelen. Door de verschillende stengelaaltjesrassen te onderscheiden, is wellicht een gedifferentieerd teeltoverbod mogelijk. Knoopunten hierbij zijn:

- De status van het taxonomische begrip 'ras' bij populaties stengelaaltjes
- Het maken van onderscheid tussen stengelaaltjesrassen
- Informatie over welke (cultuur-) planten door welke stengelaaltjesrassen kunnen worden aangeast

Onderzoek

- Collectievorming van rassenpopulaties van *D. dipsaci*
- Onderzoek naar het waardplantgebied van de verzamelde stengelaaltjesrassen
- Ontwikkelen van rassen-specifieke markeringen



Gedifferentieerd PO voor stengelaaltjesrassen



DNA markeringen voor stengelaaltjesrassen: praktijktoets

Resultaten

- Collectie en analyse van *D. dipsaci*-rassen (2 a hyacinten, 1 a tulipenstengelaaltje en diverse andere populaties, n.a. van u en Philou)
- Aardappel en gerst lijken geen waardplant voor het narcissenstengelaaltje
- U is een waardplant voor het narcissenstengelaaltje
- Nieuwe populaties stengelaaltjes uit hyacintachtigen (*Chionodoxa*, *Muscari*) bezitten de marker specifiek voor dit ras
- DNA-marker lijkt toepasbaar voor onderscheid van hyacintenstengelaaltjes

Praktijk

- Bij gewasrotatie moeten telers oppassen bij het telen van (sier-) u; gerst en aardappel lijken veel minder vatbaar
- Meer gegevens over gevoelige waardplanten volgen in 2009

Joop van Doorn, Astrid de Boer, Peter Vaseburg & Robert Dees

Contact: Joop van Doorn
Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
Postbus 85, 2140 AB Lisse
T: 0252 46 23 31 - F: 0252 46 23 00
joop.vandoorn@wur.nl - www.ppo.wur.nl

Dit project is onderdeel van de Wageningen
Plantgezondheid van het Ministerie van L&V

Dit aantreffen van stengelgalles in een partij narcissen, hyacinthen of tulpen gaat de alarmbellen rinkelen. De quarantaineautoriteit zorgt dan voor plantvernieuwing (bij hulp) en een teeltverbod op het perceel. Wanneer het tulpenstengelgal van de narcissenstengelgal in narcissen te onderscheiden is, is er wellicht een ander scenario mogelijk. PPO houdt zich bezig met het ontwikkelen van biologische en moleculaire testmethoden met als doel de ontwikkeling van toetsen om rassen te kunnen onderscheiden.

[illegible]

worden gevold dan een goedkeuring van een
commissie van de Kamer.

[illegible][illegible][illegible]

These findings suggest that the intergenerational transmission of ethnic identity is not a simple matter of passing on a fixed trait. The results suggest that the transmission of ethnic identity is a complex process that is influenced by a variety of factors, including social context, individual characteristics, and the nature of the relationship between the generations.

The blood containing the red DNA inclusion bodies is centrifuged (Difco) and the supernatant is removed (Difco) and the pellet is resuspended in water. The supernatant is removed and the pellet is resuspended in water.

Neonatal sepsis [4]

of interest to all **neonates**

The authors of this paper report on the results of a study of neonatal sepsis in a tertiary care hospital. The study was conducted over a 12-month period and involved 100 neonates who were diagnosed with sepsis. The authors found that the most common cause of sepsis was bacterial infection, followed by fungal infection. The mortality rate was high, and the authors conclude that early diagnosis and treatment are crucial for improving outcomes in neonatal sepsis.



op DNA-strengen. Het bleek inderdaad veel moeilijker om met een verschillende DNA-reeks te werken dan met eenzelfde. Daarom zijn nu twee versies verschenen, waarbij de op-DNA-strengen gebaseerde lijnen. Middelste versie van de DNA-strengenschematische kaart, met PPS en met marker specifiek voor het tijdsysteem. Het is een zeer goede lijn, maar het is ook een

Er wordt al heel lang onderzoek uitgevoerd naar stingschietten. Het is een ingewikkeld en lastig probleem. Het Amerikaanse Laboratorium voor Biomedisch onderzoek is met deze vraag geïnteresseerd en 100% door professor van Glasgow; de directe aanleiding was een artikel in een Engelse en Nederlandse samenleving die elke beschieting van het lichaam van het menselijke lichaam.

ONGEVOERLIJKE WASSEN?
Het Ministerie van LNV vindt het niet redelijk dat het natuurconcept op het Noordplaatlandschap voor mogelijk dreigende inbeddingen van natuur in de omgeving van de aanleg van de A12 wordt gebruikt. Daarom is er in 2005 onderzoek gedaan om uit te maken wat de werkelijke toestand van de verschillende natuur. Hiermee zijn de mogelijkheden om te komen tot een beter beheer van de natuur in de omgeving van de aanleg van de A12 onderzocht.

Resumo

set is a great help, but that is about all it gives you. The help consists of a list of numbers and the names of the words that

De productieschaarstelling kent een typische opbouw: is complete materialen. De vraag is in hoeverre deze is vast opzet. De groeiende zijn voor alleen maar dan wat tijd. Verschillende materialen bodem zijn ook ruw en onbewerkt. De groeiende zijn in niet in alle gevallen even groot. Een kleine van de stroom van zijn.

