

Programma 397 - III

Detectie, monitoring, risicobenadering en -perceptie en ondersteuning van fytosanitaire taken

Het onderzoek in dit programma bestond uit twee delen. Het eerste had betrekking op de geïntegreerde teelt, het tweede op de fytosanitaire taken van de Plantenziektenkundige Dienst. Onderwerpen op het gebied van detectie en monitoring van ziekten en plagen, evenals bedrijfskundige en gedragskundige aspecten van de gewasbescherming en de fytosanitaire taken, maakten van beide deel uit.

Met ingang van 2005 werd het tweede deel overgeheveld naar BO cluster Gewasbescherming thema fytosanitair (397-VI). Toen zijn ook de gedragskundige studies uit 397-III verdwenen. In 2005 bevatte 397-III dus alleen nog onderwerpen op het gebied van detectie en monitoring van ziekten en plagen in geïntegreerde teelten.

Land- en tuinbouw zijn nog structureel afhankelijk van het gebruik van chemische middelen. Een succesvolle overgang naar geïntegreerde gewasbescherming is onder andere ook afhankelijk van de mate waarin de ondernemer op het juiste moment de juiste maatregelen weet te treffen. Dit betekent dat deze moet kunnen beschikken over middelen en methoden om 'gewasbelagers op te kunnen sporen en te volgen in hun ontwikkeling.

Programma 397-III had tot doel instrumenten en strategieën aan te dragen en betrouwbare detectiemethoden te ontwikkelen voor een adequate besluitvorming in de gewasbescherming op bedrijven.

Het programma heeft toetsen opgeleverd voor snelle en betrouwbare detectie van plantpathogene bacteriën, schimmels, virussen, nematoden en insecten. Daarvoor zijn diverse technieken gebruikt die zijn gericht op detectie van DNA, eiwit, feromonen en plantengeuren. Er is een enorme vooruitgang geboekt op het gebied van multiplex detectiesystemen, er is inzicht verkregen in de productie van antilichamen op innovatieve wijze, de toepassingsmogelijkheden van flow cytometrie zijn uitgebreid en er zijn diverse kwantitatieve detectietoetsen ontwikkeld.

Het gamma deel van het onderzoek binnen 397-III en 397-VI heeft onder meer geresulteerd in een beslisdocument over succes- en faalfactoren van geautomatiseerde beslissingsondersteunende systemen, een bio-economisch model van bruinrot in de Nederlandse aardappelketen, een risico-analyse van plantenziekten in de keten en een rapport over motieven en randvoorwaarden voor omschakeling naar geïntegreerde of biologische teelt.

Carolien Zijlstra, programmaleider
Johan Baars, programmasecretaris

Detectie van latente *Phytophthora infestans* infecties in aardappelpootgoed

Huub Schepers, Bert Evenhuis, Roeland Kalkdijk, Petra van Bekkum, Wilbert Flier

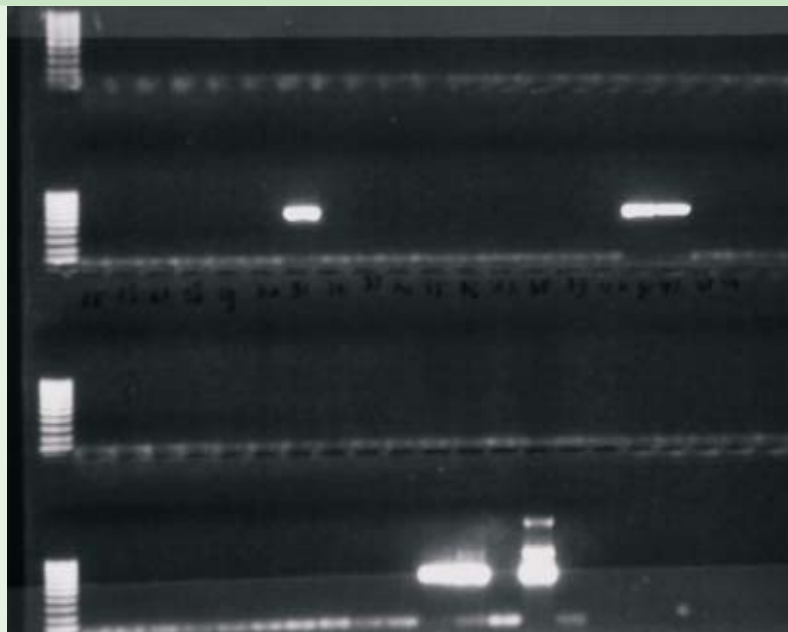
Uitgangspunt

Met *P. infestans* geïnfecteerd pootgoed is een belangrijke bron voor vroege infecties. Een beter inzicht in het infectieproces en de overleving in de poter vergemakkelijken een snelle en efficiënte aanpak van deze infectiebron. De beschikbaarheid van een snelle en betrouwbare PCR-test voor latente knolinfecties is een voorwaarde om op andere aspecten van de epidemiologie voortgang te boeken. Doelen van het project:

- Ontwikkelen van een PCR-test.
 - o Onderzoekstool.
 - o Identificatie van probleempartijen.
- Opstellen van betrouwbare bemonsteringsschema's.

Onderzoek

- 2002: Ontwikkeling van een gevoelige PCR-test en proeven met kunstmatig geïnfecteerd pootgoed.
- 2003: optimalisering PCR-test en grootschalige toetsing op geïnoculeerd pootgoed (zomer) en pootgoedmonsters (herfst).
- Na overleg met PD en NAK is besloten om het opstellen van bemonsteringsschema te laten vallen.
- 2004: toetsen van probleempartijen.



PCR-test op PD/NAK-pootgoedmonster 2003.



Knolaantasting veroorzaakt door *Phytophthora infestans*.

Resultaten

De PCR-test is in 2002 ontwikkeld met behulp van kunstmatig besmette knollen. In 2003 werden door de extreem droge weersomstandigheden slechts 2 verdachte pootgoedpartijen aangeleverd. In 2004 werden 15 verdachte partijen aangeleverd. Al deze partijen zijn met de PCR-test onderzocht op latent geïnfecteerde knollen. In diverse partijen werden met de PCR-test latent geïnfecteerde knollen waargenomen. Wel bleken er wisselende resultaten te worden bereikt met verschillende monsters uit één partij. De steekproef is dus van enorm belang.

De praktijk

- De ontwikkelde PCR-test kan in het onderzoek goede diensten bewijzen.
- In de praktijk kan deze PCR-test worden ingezet om zekerheid te verkrijgen omtrent de aantasting van partijen door *P. infestans* en voor het opsporen van latent geïnfecteerd pootgoed.
- Door het geringe aantal latent geïnfecteerde knollen zal een standaard bemonstering van een partij om een uitspraak te kunnen doen over de aanwezigheid van latent geïnfecteerd pootgoed niet haalbaar zijn.

Feromonen met plantengeuren lokken mannetjes van de roze appelluis

Herman Helsen, Rob van Tol, Frans Griepink, Jan Simonse

Uitgangspunt

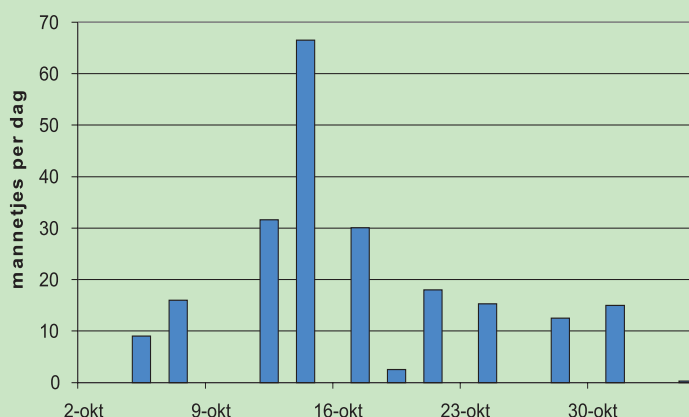
Roze appelluis is een plaag van appel waartegen fruittelers minstens één keer per jaar spuiten. Roze appelluizen verhuizen in het najaar van weegbree naar de appelboom, waar ze eieren leggen.

De vraag was:

- Kan er een specifieke lokstof worden ontwikkeld om in het najaar de invliegende mannetjes te signaleren of weg te vangen zonder teveel storende bijvangsten van andere luissoorten?

Onderzoek

- Er zijn geuren verzameld van appelboompjes met lokkende vrouwtjes.
- Er werd onderzocht op welke van de gevonden stoffen de antennes van mannetjes (met elektronische signalen) reageren.
- In het laboratorium werd het gedrag van de mannetjes op de gevonden geuren onderzocht.
- In veldproeven met experimentele vallen werden varianten van het feromoon en toegevoegde geuren van de appelboom getest op hun selectieve aantrekkelijkheid voor mannetjes van de roze appelluis.



Met de feromoonvallen kon in 2005 voor het eerst het verschijnen van mannetjes van roze appelluis in de boomgaard worden gevolgd.



In proeven in de boomgaard werd een groot aantal mengsels van het feromoon en verschillende appelgeuren getest.

Resultaat

- Mannetjes van roze appelluis kunnen in de val worden gelokt met een mengsel van feromonen en geuren van de appelboom.
- De aantrekkelijkheid en de selectiviteit van dit mengsel wordt sterk beïnvloed door de verhouding van de feromooncomponenten en toegevoegde appelgeuren.
- In 2005 kon met deze lokstof voor het eerst het verschijnen van mannetjes in de boomgaard worden gevolgd.

De praktijk

- Met een voor roze appelluis selectieve feromoonval kan de vlucht van mannetjes in het najaar eenvoudig en snel worden vastgesteld en daarmee het optimale bestrijdingstijdstip in het najaar.
- Feromoonvallen kunnen de mogelijkheid bieden om vooraf de plaagdruk op een perceel vast te stellen. Daarop kan de bestrijdingsstrategie worden afgestemd.
- Beschikbaarheid van een goede lokstof creëert mogelijkheden voor ontwikkeling van nieuwe bestrijdingstechnieken als *Attract & Kill*, massavangst of verwarring.

Contact: Herman Helsen
 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
 Postbus 200, 6670 AE Zetten
 T 0488 47 37 54 - F 0488 47 37 17
 herman.helsen@wur.nl
 www.ppo.wur.nl

Detectie van Botrytis-soorten in bolgewassen

Joop van Doorn, Mark de Boer, Khanh Pham

Uitgangspunt

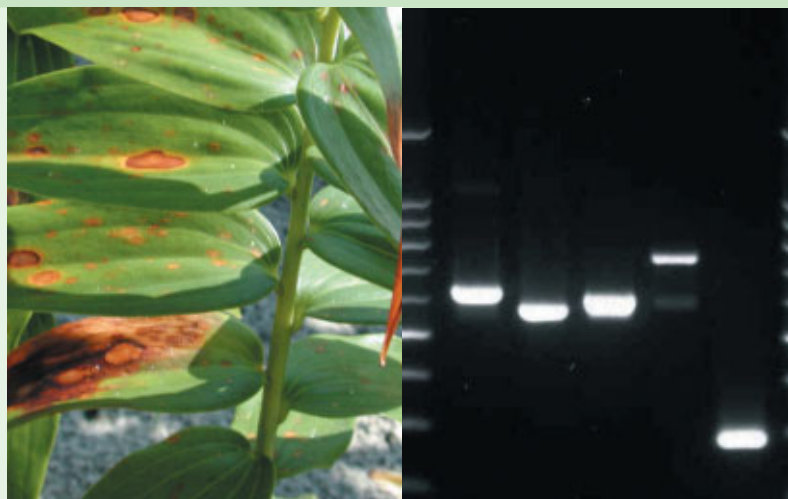
Botrytis ('vuur') is een ernstige schimmelaantasting die vooral in tulp en lelie jaarlijks grote schade geeft. Door gevoelige detectie kan niet alleen de verspreiding en epidemiologie bestudeerd worden, maar kunnen ook waarschuwingssystemen verbeterd worden zodat minder gewasbeschermingsmiddelen gebruikt hoeven te worden.

Botrytis-soorten in de bollenteelt

Soort	gewas
<i>B. tulipae</i>	tulp
<i>B. elliptica</i>	lelie
<i>B. cinerea</i>	alle bolgewassen (?)
<i>B. narcissicola</i>	narcis
<i>B. polyblastis</i>	narcis
<i>B. galanthina</i>	sneeuwklokje
<i>B. gladiolorum</i>	gladiool
<i>B. croci</i>	krokus
<i>B. allii</i>	sierui
<i>B. hyacinthi</i>	hyacint

Onderzoek

- Met antiserum trachten Botrytis gevoelig aan te tonen met ELISA.
- Veel isolaten verzamelen, vooral van *B. tulipae*, *B. elliptica* en andere soorten die bolgewassen aantasten (zie Tabel).
- Door DNA-sequenties van merkerogenen te analyseren kunnen soortspecifieke DNA-testen (PCRs) ontwikkeld worden.
- De ontwikkelde testen kunnen gevalideerd worden op veel praktijk-monsters uit vooral tulp en lelie.



Links: Schadesymptomen in lelie, veroorzaakt door *B. elliptica*.

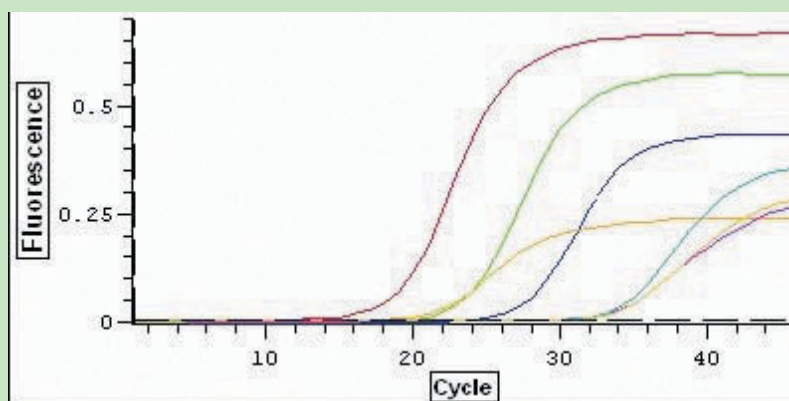
Rechts: Specifieke DNA-fragmenten voor *B. cinerea tulipae*, *gladiolorum*, *elliptica* en *narcissicola*.

Resultaten

Er zijn verschillende soortspecifieke DNA-toetsen ontwikkeld, die zeer gevoelig en specifiek verschillende soorten Botrytis kunnen detecteren. Ook kan men nu semi-kwantitatief aantallen Botrytis-sporen vaststellen.

De praktijk

- Er kan nu gevoelig gemeten worden of er Botrytis-sporen aanwezig zijn (monitoring). Hiermee kunnen bestaande waarschuwingssystemen worden verbeterd.
- Verder kunnen effecten van Botrytis-bestrijding objectief worden gemeten.
- Voor andere toepassingen moet men denken aan luchtbemonstering (schimmelsporen). Voor de ontwikkeling hiervan is nieuw onderzoek nodig.



Real Time PCR om (semi-) kwantitatief Botrytis-soorten (sporen) te kunnen detecteren.

Contact: Joop van Doorn
 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
 Postbus 85, 2160 AB Lisse
 T 0252 46 21 21 - F 0252 46 21 00
 joop.vandoorn@wur.nl
 www.ppo.wur.nl

Ontwikkeling moleculaire detectietest voor ziekteverwekkers in de champignonteelt

Jacqueline Baar, Carolien Zijlstra

Uitgangspunt

- Belangrijke ziekteverwekkers in champignonteelt zijn de schimmels: *Verticillium fungicola*, *Trichoderma aggressivum*, *Mycogone perniciosa* en *Pseudomonas tolaasii*.
- Grote schade: geschat op meer dan € 15 miljoen per jaar.
- Er is een beperkt aantal gewasbeschermingsmiddelen beschikbaar.
- Goede monitoring gewenst.
- Recent ontwikkelde moleculaire technieken bieden mogelijkheden.

Onderzoek

- Monitoring door middel van een te ontwikkelen moleculaire detectietest.
- Ontwikkelen van nieuwe DNA-extractiemethodieken om DNA van ziekteverwekkers uit dekaarde en compost te extraheren.
- Ontwikkelen van nieuwe PCR-technieken voor de belangrijkste ziekteverwekkers in de champignonteelt.
- Samenwerking tussen Praktijkonderzoek Plant & Omgeving en Plant Research International voor TaqMan PCR.

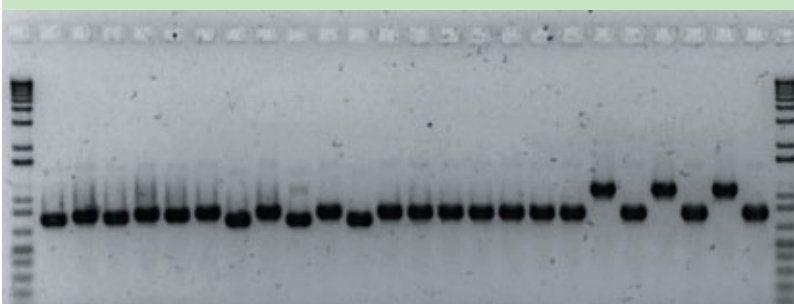


Resultaten

- Extractie van DNA van ziekteverwekkers uit dekaarde en compost zijn geoptimaliseerd.
- Voor het aantonen van aan- dan wel afwezigheid van *V. fungicola*, *P. tolaasii*, *T. aggressivum* en *M. perniciosa* is een TaqMan PCR ontwikkeld.
- Voor kwantitatieve detectie van *V. fungicola* en *P. tolaasii* is een TaqMan PCR ontwikkeld.

De praktijk

- Doelstelling is om moleculaire detectietest op korte termijn operationeel voor de praktijk te maken.
- Het bedrijfsleven heeft interesse in deze test.



Detectie van meerdere gewasbelagers in water

Peter Bonants, Cor Schoen, Marianna Szemes, Ronald van Doorn, Jos Wubben

Uitgangspunt

- Water dat wordt gebruikt om bollen schoon te spoelen (spoelwater) of om kasgewassen van water te voorzien wordt veelal hergebruikt door middel van recirculatie.
- Hierbij loopt men het risico dat het water besmet wordt met gewasbelagers zoals bijvoorbeeld bacteriën, virussen, schimmels en aaltjes.
- Het dramatische gevolg zal zijn dat tijdens de recirculatie van het besmette water de bollen of gewassen besmet worden met gewasbelagers, met alle nadelige gevolgen van dien.

Onderzoek

- Detectie via moleculair biologische technieken (DNA-analyses) maakt het mogelijk om zeer kleine hoeveelheden gewasbelagers aan te tonen in diverse substraten zoals plantmateriaal, water, grond, etc., waardoor bijtijds maatregelen getroffen kunnen worden.
- De nieuwste ontwikkeling betreft de detectie van meerdere gewasbelagers tegelijkertijd (multiplex-detectie) in één toets. Hierbij wordt gebruik gemaakt van chips of micro-arrays gecombineerd met het pUMA systeem.



Resultaten

- Er is een multiplex detectiesysteem ontwikkeld met de naam pUMA.
- Het pUMA (Padlock based Universal Multiplex Array) systeem behelst een aantal stappen van digestie, ligatie, amplificatie en hybridisatie die worden losgelaten op het DNA dat wordt geïsoleerd uit het te analyseren monster.
- Het uiteindelijke resultaat kan worden afgelezen van een micro-array, waarvan hier een voorbeeld is afgebeeld.

De praktijk

Multiplex detectie met gebruik van het pUMA-systeem biedt de volgende voordelen:

- In één toets kunnen meerdere gewasbelagers tegelijkertijd worden gedetecteerd.
- Naast pathogenen kunnen ook beneficials worden gedetecteerd.
- Het is mogelijk om pathogenen te detecteren in water, grond, plantmateriaal, lucht, etc.
- De pUMA micro-arrays zijn universeel toepasbaar.
- Verschillende array-platforms zijn te combineren met het pUMA detectiesysteem.



Contact: Jos Wubben
 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
 Linnaeuslaan 2a, 1431 JV Aalsmeer
 T 0297 25 23 03 - F 0297 35 22 70
 jos.wubben@wur.nl
 www.ppo.wur.nl

Genoom-analyse van ziekteverende bodems

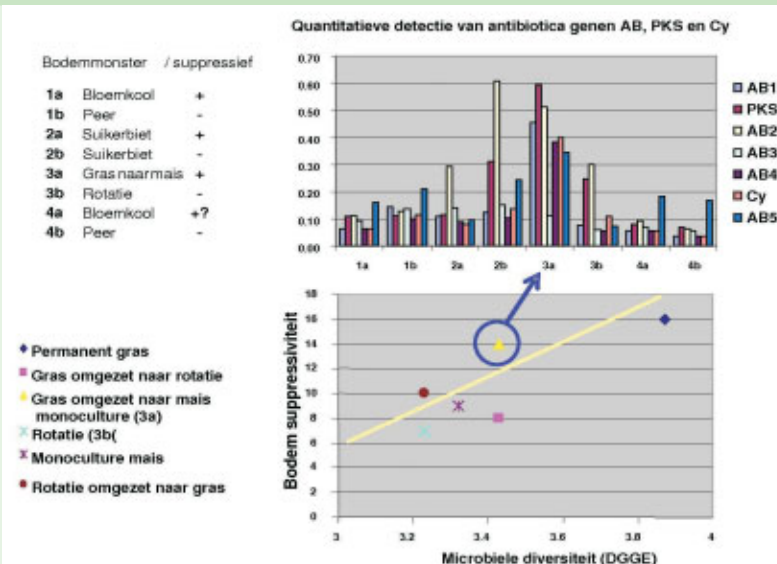
Arjen Speksnijder, Leo van Overbeek

Uitgangspunt

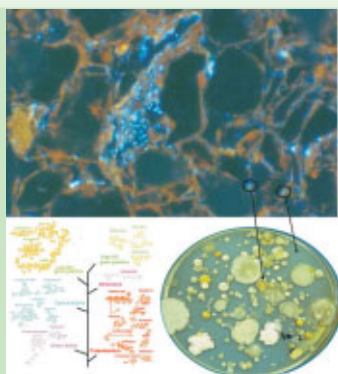
- Micro-organismen kunnen een stimulerende werking hebben op plant en dier en zelfs een beschermende functie uitoefenen.
- De productie van antibiotica en andere metabolieten door de aanwezige microflora in de bodem kan een bijdrage leveren aan de wering van ziekten en plagen.

Onderzoek

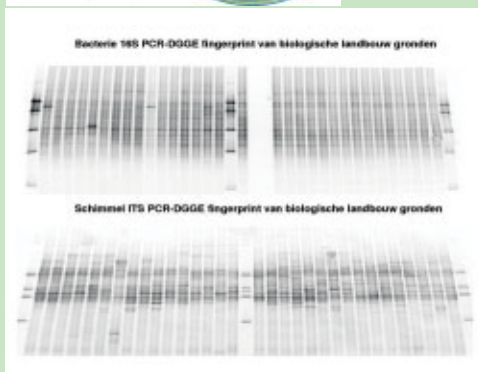
- DNA-detectietechnieken zijn opgezet en uitgevoerd om antibiotica-genen en diversiteit van de microbiële gemeenschap in bodems te meten.



- * Multiplex kwantificering van antibiotica-genen is uitgevoerd op grondmonsters die suppressief zijn tegen bodemgebonden pathogene schimmels.
- * Verhoogde antibiotica-waarden worden gemeten in een bodem met maïs monocultuur (3a).
- * De bodem met permanent gras (3b) heeft een vergelijkbare weerbaarheid maar minder antibiotica en een hogere microbiële diversiteit.



- * 10^8 - 10^{10} micro-organismen per gram grond
- * 5.000-14.000 verschillende soorten
- * 90% onbekend, 90-95% (nog) niet kweekbaar
- * Productie van antibiotica



- * DGGE fingerprints van microbiële populaties in de bodem.
- * Iedere bandpositie is een indicatie voor een soort.
- * Het aantal banden is een indicatie voor de diversiteit.
- * De intensiteit van de band is een relatieve maat voor de kwantiteit van een soort.

Resultaten

- Onbekende antibiotica genen zijn geïdentificeerd door klonering en screening van hoog-moleculair bodem-DNA.
- Suppressieve gronden kunnen een hogere diversiteit aan micro-organismen bevatten waartussen geen plaats is voor pathogenen.
- Suppressieve gronden met een lagere diversiteit hebben een verhoogde aanwezigheid van antibiotica-producerende bacteriën die waarschijnlijk door de plant geselecteerd zijn.

De praktijk

- DNA-detectie van antibiotica-genen kan toegepast worden op biologisch uitgangsmateriaal waar ziektevering van belang is, zoals bij compostering en dekaarde-productie.
- Bij de kwaliteitsbeoordeling van (land)bouwpercelen kan DNA-analyse van de microflora een belangrijke bijdrage leveren in beslissingsmodellen.
- De inzet van (chemische) bestrijdingsmiddelen kan afgestemd worden met de natuurlijk aanwezige ziekteverbaarheid in bodem en plant.

Contact: Arjen Speksnijder
Plant Research International B.V.
Postbus 16, 6700 AA Wageningen
T 0317 47 68 98 - F 0317 41 80 94
arjen.speksnijder@wur.nl
www.pri.wur.nl

Ontwikkeling van een bodemgezondheids-chip

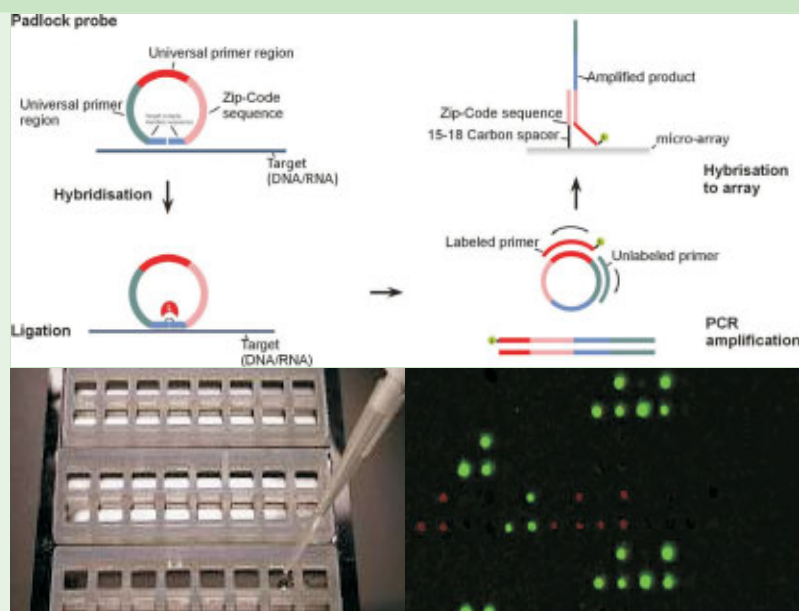
Peter Bonants, Marianna Szemes, Arjen Speksnijder, Carolien Zijlstra, Leo van Overbeek, Ronald van Doorn, Jos Wubben, Joop van Doorn, Cor Schoen

Uitgangspunt

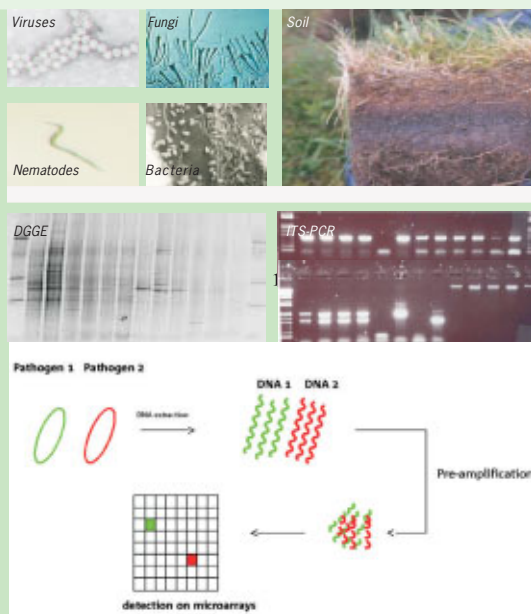
De ontwikkeling van een bodemgezondheids-chip kan een nuttige bijdrage leveren aan de detectie van een aantal targets: plantpathogenen, nuttige organismen (beneficials) en genen, die coderen voor antibiotica productie of antagonistische mechanismen.

Onderzoek

Ontwikkeling van DNA-extractie-protocollen voor grond, alsmede een multiplex detectiesysteem voor de verschillende targets. Aangezien coderende genen van invloed kunnen zijn op gezondheid van de bodem wordt hiervoor genomisch DNA uit de bodem geïsoleerd en geanalyseerd op betreffende functies (Metagenoom). Voor het onderzoek naar mogelijke relaties tussen bodemweerbaarheid en microbiële populaties vinden DGGE-analyses plaats van bodems die werend zijn tegen microbiële plantpathogenen om zo relevante targets (bv antagonisten) te identificeren. Karakteristieke probes die bodemgezondheid definiëren zullen uiteindelijk op de chip worden geplaatst.



Het geïsoleerde DNA wordt met behulp van de pUMA[®] multiplex amplificatiemethode vermenigvuldigd en gehybridiseerd op een micro-array. De uitslag laat zien welke targets (pathogenen of beneficials) aanwezig zijn in het DNA van het grondmonster.
pUMA[®]: padlock probe gebaseerde universele multiplex array.



Boven: DNA vanuit diverse organismen, aanwezig in de bodem, wordt geïsoleerd en geanalyseerd met allerlei moleculaire technieken, bv DGGE of ITS-PCR. Onder: Schematische weergave van het micro-array gebaseerde multiplex detectiesysteem.

Resultaten

- Diverse DNA-extractiemethodieken zijn met elkaar vergeleken.
- DGGE-fingerprintpatronen zijn gemaakt voor schimmel- en bacteriepopulaties van deze extracten.
- Een multiplex amplificatie-/detectiesysteem is ontwikkeld voor een 30-tal targets (pUMA[®]).
- Hoog-moleculair bacterieel DNA-isolaties vanuit grond zijn uitgevoerd om genetische banken te maken met grote inserts. De bank is gescreend voor een aantal interessante genen.

De praktijk

Er zijn een aantal basisprincipes uitgetest. Deze zijn gereed om te worden toegepast op verschillende gronden. In 2005 zijn verschillende gronden multiplex geanalyseerd op de aanwezigheid van een aantal geselecteerde organismen.

Contact: Peter Bonants
Plant Research International B.V.
Postbus 16, 6700 AA Wageningen
T 0317 47 62 13 - F 0317 41 80 94
peter.bonants@wur.nl
www.pri.wur.nl

TaqMan-toets maakt bepalingen van Meloidogyne-besmettingen in bollen mogelijk

Carolien Zijlstra, Richard van Hoof

Uitgangspunt

Er is behoefte aan een snelle en betrouwbare methode voor opsporing van *Meloidogyne chitwoodi* en *M. fallax* in bollen.

Onderzoek

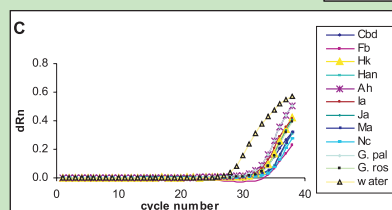
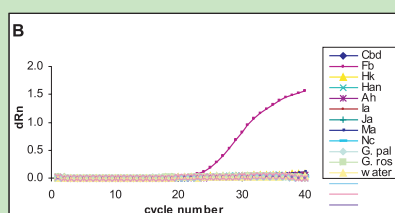
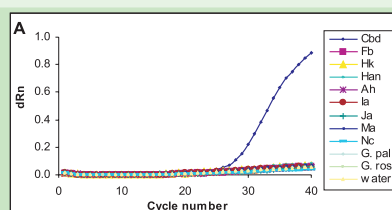
- Ontwikkeling van een TaqMan-toets voor gevoelige detectie.
- Bepaling van detectiebereik, gebruikmakend van schone DNA-monsters van isolaten van *M. chitwoodi* en *M. fallax*.
- TaqMan-analyse van bollen afkomstig van met *Meloidogyne* besmette gronden.



Geteste monsters van in slechte staat verkerende bollen van tulp, iris en krokus.

Tabel 1. Ct-waarden en diagnose op grond van TaqMan-analyse uitgevoerd op wortels van krokus, tulp en iris. Het geteste materiaal bevond zich in relatief slechte conditie. Desalniettemin kwamen door TaqMan gedetecteerde soorten in bollen overeen met de in grond gedetecteerde soorten gebaseerd op morfologische analyse. Een hoge NED-waarde geeft aan dat er geen uitspraak kan worden gedaan, wat het scoren van vals negatieven voorkomt.

Getest materiaal	Ct waarden			Diagnose gebaseerd op TaqMan analyse	Morfologie
	FAM	VIC	NED		
Crocus geel, A2	40	40	38.97	?	<i>M. fallax</i>
Iris Blue Magic, A7	40	30.3	32.1	<i>M. fallax</i>	<i>M. fallax</i>
Iris Blue Magic, F7	26.6	40	33.45	<i>M. chitwoodi</i>	<i>M. chitwoodi</i>
Iris Telstar, D8	40	32.2	32.46	<i>M. fallax</i>	<i>M. fallax</i>
Iris Telstar, E8	40	40	36.78	?	<i>M. chitwoodi</i>
Tulipa Monte Carlo	40	40	36.5	?	<i>M. fallax</i>



Amplificatiecurves van de ontwikkelde TaqMan-toets met detectie van *M. chitwoodi* FAM signaal (A), *M. fallax* VIC signaal (B) en interne amplificatiecontrole NED signaal (C).

Resultaten

- De ontwikkelde TaqMan-toets detecteert specifiek *M. chitwoodi* en *M. fallax*.
- De test maakt zelfs detectie mogelijk in materiaal dat in slechte staat verkeert.
- De interne amplificatiecontrole voorkomt het scoren van vals negatieven.

De praktijk

- De test biedt perspectieven voor detectie van besmettingen in bollen.

TaqMan-toets - snelle en gevoelige bepalmethode voor Meloidogyne-besmettingen in aardappelknollen

Carolien Zijlstra, Richard van Hoof, Gerard Korthals, Thomas Been

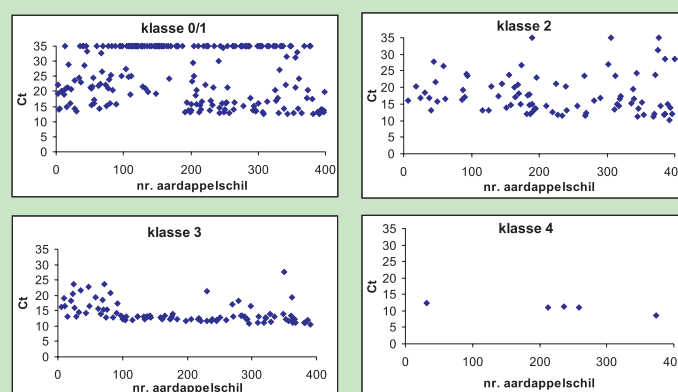
Uitgangspunt

Er is behoefte aan snelle en betrouwbare methoden voor opsporing en kwantificering van *Meloidogyne chitwoodi* en *M. fallax* in bodem- en partijmonsters van opwekingsmateriaal (aardappel).

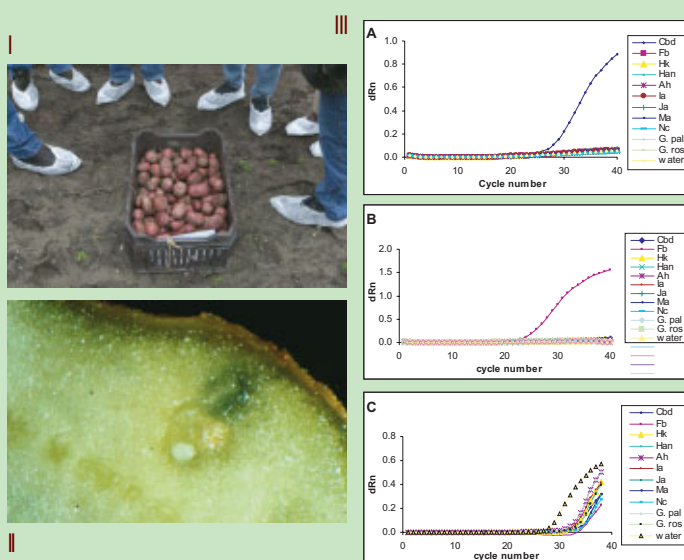
Aanpak

- Ontwikkeling van een TaqMan-toets voor kwantitatieve detectie van *M. chitwoodi* en *M. fallax* in aardappel-pootgoed.
- Bepaling van detectiegrens van de TaqMan-toets.
- TaqMan-analyse van partijen pootgoed die zijn ingedeeld in klassen op grond van mate van zichtbare symptomen.

FAM Ct-waarden per klasse



Toets op aanwezigheid van *M. chitwoodi* in aardappelknollen. Weergegeven zijn Ct-waarden van de TaqMan-toets op schillen van pootgoed klasse 0/1 (geen uitwendige symptomen); klasse 2 (net zichtbare uitwendige symptomen); klasse 3 (duidelijk zichtbare symptomen) en klasse 4 (veel zichtbare symptomen) op aanwezigheid van *M. chitwoodi*. Een Ct < 35 geeft aan dat *M. chitwoodi* aanwezig is.



- I Welke van deze knollen zijn besmet met *M. chitwoodi* en/of *M. fallax*?
- II *Meloidogyne*-vrouwtje in een uitwendig symptoomloze knol.
- III Amplificatiecurves van de ontwikkelde TaqMan-toets met detectie van *M. chitwoodi* FAM signaal (A), *M. fallax* VIC signaal (B) en interne amplificatiecontrole NED signaal (C).

Resultaten

- Er is een multiplex TaqMan toets ontwikkeld met één primerset en twee specifieke probes voor detectie van *M. chitwoodi* en *M. fallax*, evenals een primerset en een probe voor een interne amplificatiecontrole.
- Het kwantitatieve detectiebereik van de toets omvat minstens het gebied van 100 fg (1/1000 juveniel) tot 10 ng target-DNA.
- De test detecteert *M. chitwoodi* in aardappelknollen gevoeliger dan visuele inspectie. Over het algemeen detecteerde de test altijd *M. chitwoodi* in klasse 1 aardappelknollen. Afhankelijk van veldlocatie en oogstjaar gaven testresultaten aan dat 32,5% tot 57,6% van de geteste aardappelknollen zonder uitwendige symptomen (klasse 0 en 1) geïnfecteerd waren met *M. chitwoodi*.
- De TaqMan-toets maakt het mogelijk om één *Meloidogyne*-eitje aan te tonen in 10 cm² aardappelschil.

De praktijk

- De test kan succesvol de aanwezigheid van *M. chitwoodi* en/of *M. fallax* aantonen op het oogsttijdstip terwijl diagnose op grond van visuele inspectie pas plaats vindt 8 weken na de oogst.
- Door 5 knollen ineens te toetsen kan de aanwezigheid van één uiterst licht besmette knol binnen die 5 knollen, waarbij geen uitwendige of inwendige symptomen zichtbaar zijn, aangetoond worden. Het aantal knollen dat ineens getoetst kan worden met dezelfde gevoeligheid als die van de huidige visuele inspectie is hoogstwaarschijnlijk vele malen groter maar vergt nog nader onderzoek.

Ontwikkeling bemonsteringssystemen voor *Meloidogyne chitwoodi* en *M. fallax*

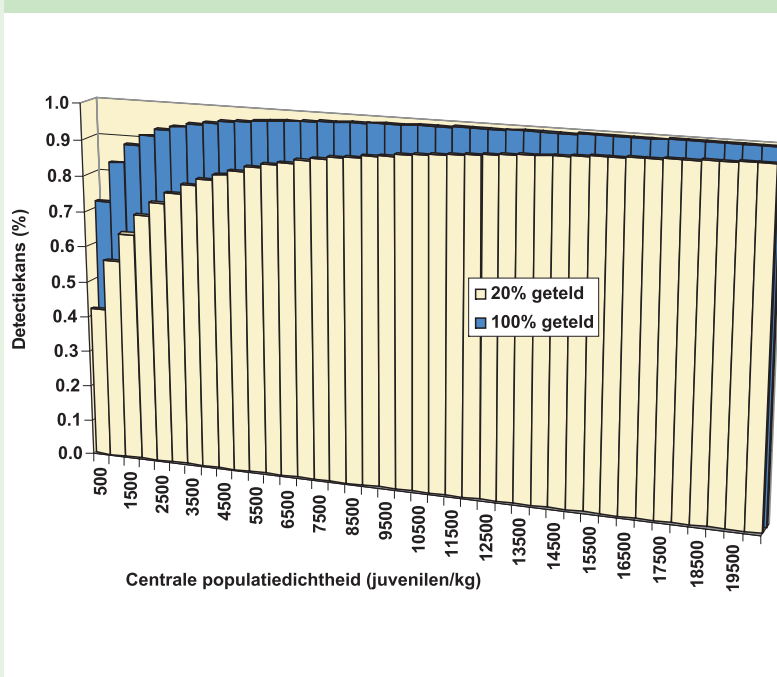
Thomas Been, Corrie Schomaker

Uitgangspunt

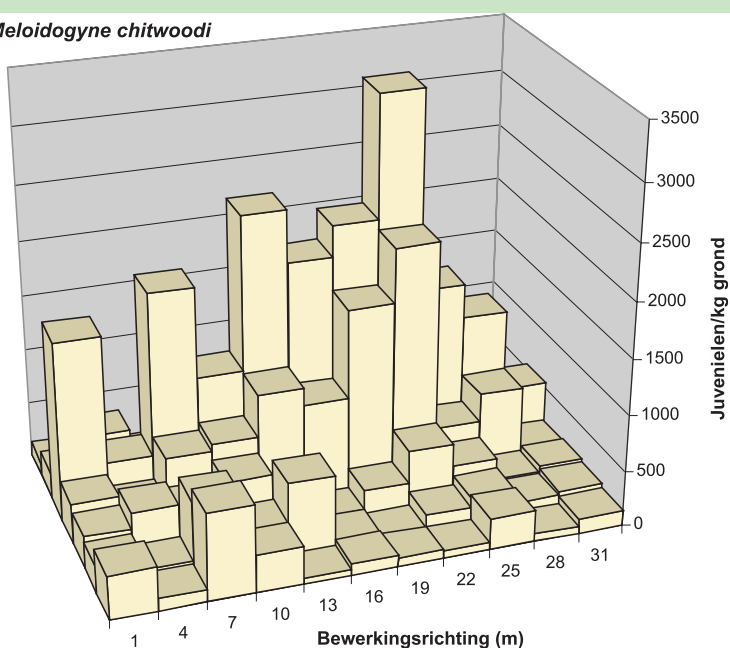
- De wortelknobbelaaltjes *Meloidogyne chitwoodi* en *M. fallax* zijn quarantaine-organismen die de Nederlandse aardappelteelt bedreigen.
- Pootgoedpartijen worden visueel getest op de aanwezigheid van een besmetting.
- Het is van het aardappelras afhankelijk of en in welke mate visuele symptomen worden waargenomen.
- Er is behoefte om via grondbemonstering vóór de teelt van het aardappelgewas te weten of het perceel besmet is.

Onderzoek

- In kaart brengen van de verschillende distributiepatronen van het aaltje binnen een perceel.
- Modelleren van deze distributiepatronen om ze te kunnen gebruiken voor de ontwikkeling van bemonsteringsmethoden.
- Ontwikkeling van een simulatieprogramma om de betrouwbaarheid van bemonsteringsmethoden te berekenen.



Meloidogyne chitwoodi



Resultaten

- Klein-, midden- en grootschalige distributiepatronen van *M. chitwoodi* en *M. fallax* in verschillende velden en jaren in kaart gebracht.
- Modellen voor besmettingshaarden en volveldsbesmettingen geparameteriseerd.
- Software ontwikkeld om de betrouwbaarheid van willekeurige bemonsteringsmethoden te berekenen.

De praktijk

- Ontwikkeling van bemonsteringsmethoden voor de detectie van beide quarantaine-organismen met bekende betrouwbaarheid mogelijk.
- Ontwikkeling van bemonsteringsmethoden voor populatie-inschatting met bekende betrouwbaarheid mogelijk ten behoeve van adviessystemen.

Opsporen van wortelknobbelaaltjes (*Meloidogyne chitwoodi*) in grond

Willemien Runia, Gerard Korthals, Thea van Beers

Uitgangspunt

Meloidogyne chitwoodi en *M. fallax* zijn quarantaineorganismen. Al het uitgangsmateriaal, waaronder aardappelknollen, moet vrij zijn van deze aaltjes. Een partijkeuring is onvoldoende betrouwbaar. Om die reden worden er betrouwbare opsporings- en monitoringsmethodieken ontwikkeld.

Onderzoek

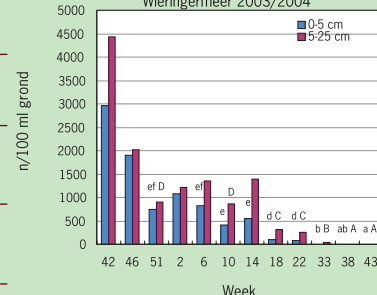
- Horizontaal en verticaal populatieverloop van *M. chitwoodi* in grond door vergelijking van de teelt van pootaardappelen met die van consumptieaardappelen in maandelijkse bemonsteringen van grond (0-5 cm en 5-25 cm diep) gedurende 1 jaar.
- Kwaliteit pootgoedknollen.
- Effectiviteit zonale centrifuge voor detectie *M. chitwoodi*.



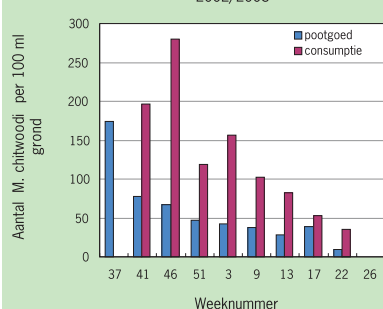
Populatieverloop van *M. chitwoodi* bij pootaardappels.

Locatie	Gemiddelde aantallen aaltjes per 100 ml grond			
	Pi Voór teelt	Pf Na oogst	Pf 1 jaar na start	Pf 1 jaar na oogst
Smakt	12	164	22	
Wieringermeer	54	9653	495	10

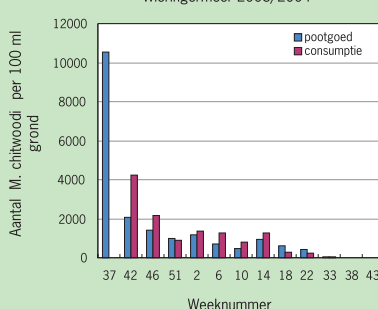
Verticaal populatieverloop *M. chitwoodi* na consumptieteelt Wieringermeer 2003/2004



Populatieverloop *M. chitwoodi* bij aardappel Smakt 2002/2003



Populatieverloop *M. chitwoodi* bij aardappel Wieringermeer 2003/2004



Resultaten

- Een pootgoedteelt laat lagere aantallen aaltjes na dan een consumptieteelt.
- Een lage initiële populatie (Pi) - zelfs 0! - kan leiden tot een zware besmetting na aardappel.
- De aantallen aaltjes in de grondlaag van 0-5 cm zijn lager dan in de grondlaag van 5-25 cm.
- Eén jaar na de oogst wordt *M. chitwoodi* nog steeds aangetoond in zowel de laag 0-5 cm als in 5-25 cm.
- Ook in symptoomloze knollen kan *M. chitwoodi* aanwezig zijn.
- Relatie tussen de eindpopulatie (Pf) en knolsymptomen is nog onduidelijk.
- De zonale centrifuge lijkt veelbelovend en kan op termijn tot kostenbesparing leiden.

De praktijk

Betrouwbaarheid detectie van *M. chitwoodi* wordt sterk verbeterd.

Nieuwe methoden voor de detectie van *Synchytrium endobioticum* in grond

Jan Lamers, Paul van den Boogert, Marga van Gent-Pelzer, Johan Wander, Johan Meffert, Geo van Leeuwen, Peter Bonants

Uitgangspunt

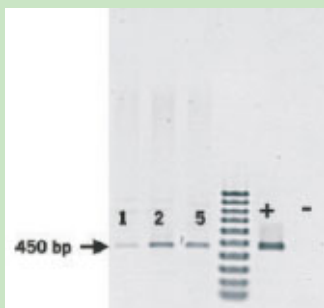
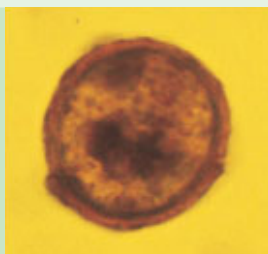
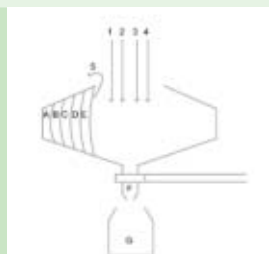
Wratziekte in aardappelen wordt veroorzaakt door *Synchytrium endobioticum*, een quarantaine-organisme dat met behulp van strikte maatregelen beheerst moet worden. Het bestaande EPPO-protocol voor opspoelen van grond is bewerkelijk, tijdrovend en maakt gebruik van chloroform. Een goede detectiemethode is belangrijk om de ziekte beheersbaar te houden.

Onderzoek

- Kan de Hendrickx-centrifuge geoptimaliseerd worden om grondmonsters te analyseren op aanwezigheid van *S. endobioticum*?
- Kan *S. endobioticum* met PCR-technieken in grondmonsters worden aangetoond?



Wratvorming op stengels, stolonen en knollen.



Linksboven: Schematisch zij aanzicht van de Hendrickx-centrifuge in werking. 1: scheidingvloeistof, 2: water, 3: grondsuspensie, 4: kaoline-suspensie, 5: overflow, A: sediment van grond, B: kaoline, C: scheidingvloeistof, D: laag met sporangia, E: water, F: holle aandrijfbuis, G: fles met supernatant (links) Rechtsboven: Een wintersporangium van *S. endobioticum*. Onder: PCR op een verdunningsreeks van wintersporen van *S. endobioticum*.

Resultaten

- De Hendrickx-centrifuge is beproefd, waarmee monsters van 200 gram grond verwerkt worden en waarvan 100 g zonaal gecentrifugeerd wordt.
- Een recovery van 50-70% wordt bereikt met een lagere variatiecoëfficiënt dan de gangbare PD-methode.
- Het gecentrifugeerde monster is vrijwel vrij van grond en organisch materiaal en is goed met PCR te verwerken, ook voor de detectie van andere ziekten.
- In dit monster kan 1 winterspore van wratziekte met PCR-technieken worden aangetoond.
- Er zijn twee wetenschappelijke publicaties geschreven.

De praktijk

- De verplichte bemonsteringskosten om voor een vrijverklaring in aanmerking te komen kunnen met 20-40% dalen.
- De PD heeft een gevoeliger instrument in handen om wratziekte in grond vast te stellen.
- Onderzoek is nodig om verbetering van de detectie te bereiken door de bemonstering af te stemmen op de haardvorming van wratziekte. Ook is onderzoek nodig naar kwantitatief moleculaire detectie met Taqman.

Contact: Jan Lamers

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving

Postbus 430, 8200 AK Lelystad

T 0320 - 29 16 42 - F 0320 - 23 04 79

jan.lamers@wur.nl

www.ppo.wur.nl

Omschakelen naar geïntegreerde of biologische teelt - motieven en randvoorwaarden

Carolien de Lauwere, Abco de Buck, Bert Smit, Jan Buurma, Helma Drost, Henri Prins, Liesbeth Theuws

Uitgangspunt

- Ondernemers spelen een centrale rol in de omschakeling naar geïntegreerde of biologische teelt.
- Ze hebben te maken met veel verschillende partijen die ieder op hun eigen wijze invloed uitoefenen op het omschakelingsproces.
- Samenwerking is essentieel voor een succesvolle omschakeling naar duurzame landbouw.

Onderzoek

- Twintig interviews met experts op het gebied van geïntegreerde of biologische teelt.
- Analyse van tweeëntwintig samenwerkingsverbanden.
- Interviews met partijen die betrokken zijn bij duurzame gewasbescherming.



Resultaten

- Er zijn economische (markt/afzet), teelttechnische (beheersing onkruiden en ziekten en plagen), institutionele (wetgeving te strikt, kennis ontbreekt of is niet toegankelijk), persoonlijke (competenties, vaardigheden) en bedrijfsgebonden (locatie, grondsoort) motieven om wel of niet om te schakelen naar biologische of geïntegreerde teelt.
- 'Randvoorwaarden' voor een succesvol veranderingsproces: gunstig 'veranderingsklimaat', voldoende draagvlak, een duidelijke probleemeigenaar, voldoende betrokken partijen met congruente belangen (belangen hoeven niet hetzelfde te zijn, maar 'mogen' ook niet tegenstrijdig zijn), experimenteerruimte en ruimte om te leren, netwerkvorming en de juiste interventie op het juiste moment.

De praktijk

- Inzicht in omschakelingsprocessen maakt het faciliteren van deze processen gemakkelijker.
- Geëigende instrumenten hiervoor zijn wet- en regelgeving, kennisoverdracht, experimenteerruimte en financiële incentives.
- De aard van het veranderingsproces bepaalt het type interventie.

Contact: Carolien de Lauwere
LEI
Postbus 35, 6700 AA Wageningen
T 0317 48 31 34 - F 070 335 82 33
carolien.delauwere@wur.nl
www.lei.wur.nl

Succes- en faalfactoren van geautomatiseerde beslissingsondersteunende systemen

Marcel Raaphorst, Henri Prins, Bert Annevelink

Uitgangspunt

- In Nederland zijn veel geautomatiseerde beslissingsondersteunende systemen (BOS'sen) ontwikkeld.
- Niet ieder BOS is succesvol gebleken.
- Wat zijn de succes- en faalfactoren?

Onderzoek

- Inventariseren van BOS'sen. Er zijn 27 in Nederland ontwikkelde BOS'sen gevonden op het gebied van gewasbescherming.
- Interviewen van met bouwers en distributeurs van een selectie van deze BOS'sen. Hieruit is een lijst met succes- en faalfactoren is opgesteld.
- Inzicht geven in het eisenpakket van BOS'sen.
- Inschatten welke categorieën BOS'sen de meeste kans van slagen hebben.



Resultaat

De belangrijkste succesfactoren zijn:

- Het belang dat de gebruiker hecht aan het probleem en de mate waarin het BOS kan bijdragen aan het oplossen van dat probleem.
- Een bewezen vermindering van gewasaantasting.
- Een bewezen vermindering van de kosten van het middelenverbruik.
- De voordelen van een lagere belasting van het milieu en een hoge consumentenwaardering voor minder bespoten producten.
- Het verplicht stellen van gebruik door overheid of certificeringsinstellingen.
- De gebruiksvriendelijkheid.
- De duidelijkheid van het advies.
- De uitvoerbaarheid van het advies.
- Lage eisen betreffende gedisciplineerde invoer door de gebruiker.

De praktijk

- De lijst met succes- en faalfactoren wordt gebruikt als checklist bij nieuw te ontwerpen BOS'sen.
- Het verdient aanbeveling ook de klanttevredenheid van BOS'sen te betrekken in een vervolgonderzoek.
- Onderzoek naar de bedrijfsvoering en de risicobeleving kan leren hoe het advies beter wordt opgevolgd.

Contact: Marcel Raaphorst
 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
 Postbus 8, 2670 AA Naaldwijk
 T 0174 63 67 53 - F 0174 63 68 35
 marcel.raaphorst@wur.nl
 www.ppo.wur.nl

Institutionele analyse bruinrot

Bas Janssens

Uitgangspunt

- Quarantaine-ziekten zoals bruinrot en ringrot vormen een grote bedreiging voor de Nederlandse aardappelteelt. De impact kan voor zowel individuele telers als voor de export van pootgoed groot zijn.
- Plantgezondheid is een collectief goed.

Onderzoek

- Interviews met o.a. getroffen en niet-getroffen telers, beleidsmakers, handelshuizen, keuringsdienst en branche-organisaties, aangevuld met desk research.
- Stakeholdersanalyse gericht op belangen, verantwoordelijkheden, verplichtingen en informatie-uitwisseling.
- Nagaan van mogelijkheden voor borging.



Aangetaste aardappelplant.



Aantasting van aardappel door de quarantaine-ziekte bruinrot.

Resultaten

- Vertrouwen, informatie-uitwisseling en open communicatie tussen diverse stakeholders is essentieel en vereist regie.
- Risico van verstremgeling van uitvoering en beleid omdat beide via de klankbordgroep verlopen.

De praktijk

- Klankbordgroep akkerbouw is het overlegforum om te komen tot afspraken over uitvoering en wensen tussen beleid en praktijk.
- Zelfregulering inbedden via eigen risico van de verzekering (Potatopoll).

Contact: Bas Janssens

LEI

P.a. Postbus 2176, 82030 AD Lelystad

T 0320 29 35 29 - F 0320 29 35 95

bas.janssens@wur.nl

www.wur.nl

Bio-economische modellering van bruinrot in de Nederlandse aardappelproductieketen

Annemarie Breukers

Uitgangspunt

Het huidige bruinrotbeleid brengt hoge kosten met zich mee, terwijl volledige uitroeiing nog steeds niet bereikt is.

- Kan het goedkoper?
- Kan het effectiever?

Nodig:

- Inzicht in effect van beheersmaatregelen op bruinrot-incidentie.
- Kwantificering van kosten en baten van bruinrotbeheersmaatregelen.

Daarom:

Ontwikkeling van een bio-economisch model waarmee bruinrot-beheersstrategieën geëvalueerd kunnen worden op basis van hun kostenefficiëntie.

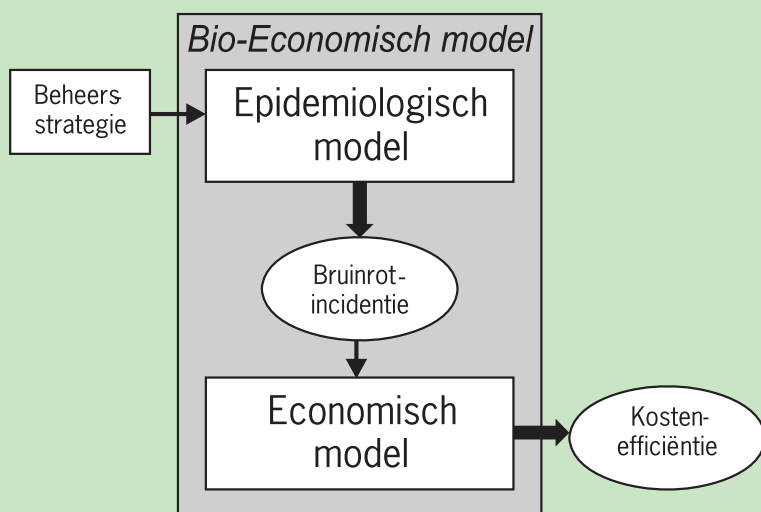
Het onderzoek

- 2004 - 2005: ontwikkeling van een epidemiologisch model waarmee de verspreiding van bruinrot binnen de Nederlandse aardappel-productieketen gesimuleerd kan worden voor verschillende controle-strategieën.
- 2005 - 2006: analyse van de economische gevolgen van preventieve en reactieve maatregelen en potentiële exportverliezen ten gevolge van bruinrot.



Tabel 1. Gemiddelde jaarlijkse kosten ten gevolge van maatregelen voor preventie en eradicatie van bruinrot.

Maatregel	Gemiddelde kosten (*1000 €/jaar)
reguliere bemonstering	4472,6
besmetverklaring partijen	35,9
waarsch. besmetverklaring partijen	178,0
tracering verdachte partijen	4,7
survey besmette bedrijven	6,0
teeltbeperkingen besmette bedrijven	83,5
totaal	4780,7



Schematische weergave van het bio-economisch model. Ovalen geven (tussentijdse) modeluitkomsten weer.

Resultaten

Een geïntegreerd bio-economisch model (voorlopige versie) met de volgende eigenschappen:

- Ruimtelijk expliciet.
- Stochastisch (houdt rekening met de natuurlijke variatie in bruinrot-incidentie).
- Toont zowel gemiddelde als spreiding in de te verwachten kosten, gegeven een bepaalde beheersstrategie.
- Toont ook de 'baten' (= niet geleden exportverliezen) van een bepaalde beheersstrategie.

N.B.: kwantificering van exportverliezen vindt op dit moment plaats; eerste resultaten worden verwacht in januari 2006.

De praktijk

Het bio-economisch model biedt inzicht in de risicofactoren van bruinrotverspreiding in de aardappelketen en het effect van beheersmaatregelen op deze factoren. Daarnaast toont het de relatie tussen de effectiviteit van maatregelen en de kosten die ermee gepaard gaan. Daarmee ondersteunt het model de ontwikkeling van een kosten-efficiënt bruinrot-beleid.

Herziening Q-status mineervliegen *Liriomyza trifolii* en *L. huidobrensis*

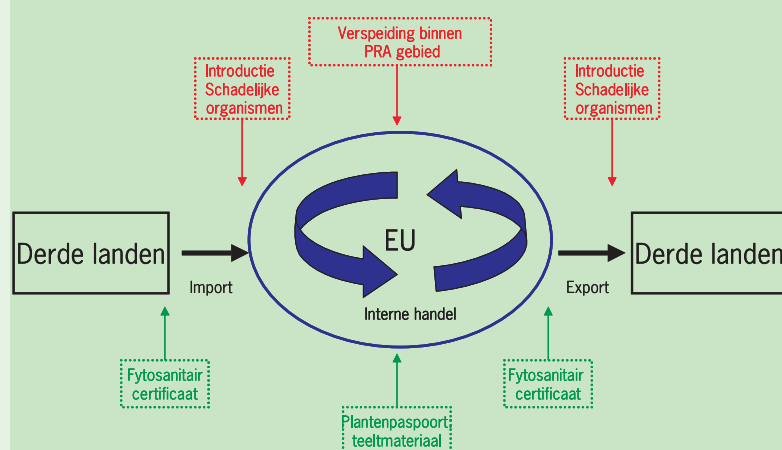
Erick Westerman, Bertin Boertjes, Alfons Oude Lansink, Liesbeth Balk-Theuws

Uitgangspunt

Bij keuringsdiensten, bedrijfsleven en de PD bestaat twijfel over de noodzaak en rechtvaardiging van fytosanitaire maatregelen tegen sommige organismen op de quarantainelijst van de EU. In het project 'Herziening van de status van quarantaine organismen' is een casestudie uitgevoerd voor twee mineervliegen: *Liriomyza trifolii* en *L. huidobrensis*.

Onderzoek

Evaluatie van de quarantaine-waardigheid van *L. trifolii* en *L. huidobrensis* met behulp van Pest Risk Analysis (PRA). Daarnaast beschrijving van besluitvormingstraject voor herziening van de quarantainelijst van de EU.



Volumestromen, fytosanitaire risico's en vereiste documenten.

PRA-Initiatiefase

- Onderscheid organisme
- Toegevoegde waarde PRA

PRA-Assessment

- Pest risk

PRA-Management

- Fytosanitaire maatregelen

Onderdelen

- Identificatie organisme: soortniveau
- Definieren PRA-gebied
- Evaluatie bestaande PRA
- Kwalitatieve beoordeling
- Kwantitatieve beoordeling
- Inventarisatie opties voor maatregelen
- Beoordeling mogelijke opties

Resultaten

- Binnen dit project was het niet mogelijk volledig inzicht te krijgen in de verspreiding van deze mineervliegen in de EU. Voordat definitieve conclusies getrokken kunnen worden, moet dit punt opgehelderd worden.
- Gegeven de belangrijkste pathways lijken de extra risico's op introductie en verspreiding in de EU klein.
- De economische consequenties van het afschaffen van de quarantaine-status van beide mineervliegen lijken gering. Er wordt een kleine afname van de inspectiekosten verwacht.
- Besluitvormingstraject voor herziening Q-status verloopt via het Commissiecircuit van de EU. Dit is een langdurig proces en vereist van Nederland een pro-actieve inzet.
- Lobbyactiviteiten van het bedrijfsleven moeten zich vooral richten op de klankbordgroepen van de PD en sectororganisatie in andere lidstaten.

De praktijk

Het resultaat van dit onderzoek geeft inzicht in:

- De consequenties van het afschaffen van de quarantainestatus van beide mineervliegen.
- Het besluitvormingstraject om tot eventuele aanpassing van de quarantainelijst van de EU te komen.
- De mogelijkheden en ervaringen van onderzoeksinstituten om een Pest Risk Analyse uit te voeren.

Schema Pest Risk Analysis (PRA).

Contact: Erick Westerman

LEI

Postbus 29703, 2502 LS Den Haag

T 070 33 58 330 / F 070 36 15 624

erick.westerman@wur.nl

www.lei.wur.nl

Zelfregulering van plantgezondheid in de bloemisterij (2004)

Liesbeth Balk, Bram van der Maas, Alfons Oude Lansink, Erick Westerman

Uitgangspunt

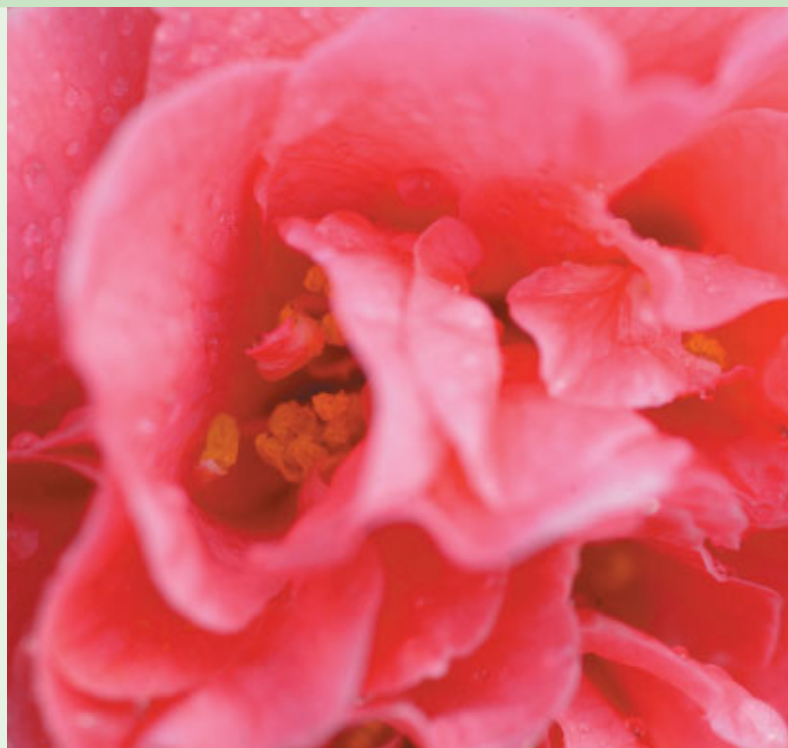
Het realiseren van een efficiënt en effectief fyto-sanitair beleid op basis van een gezamenlijke visie van overheid, bedrijfsleven en onderzoek:

- Zelfregulering en preventie in de keten.
- Meer onderbouwing en begrip maatregelen.
- Meer samenwerking en communicatie tussen overheid (inclusief Brussel) en bedrijfsleven.

Onderzoek

De mogelijkheden voor zelfregulering binnen de Europese regelgeving (Fytorichtlijn):

- Theorieën over zelfregulering.
- Behoeftte aan zelfregulering in de praktijk.
- Ruimte binnen de Europese regelgeving.
- Mogelijkheden tot aanpassingen van het fyto-sanitair controlesysteem.



Resultaten

De volgende succesfactoren zelfregulering werden geïdentificeerd:

- Gezamenlijk belang van bedrijven in de sector.
- Bedrijven in de sector kennen elkaars gedrag en kunnen overtredingen signaleren.
- Sectoren hebben een geschiedenis van samenwerking.
- Instrumenten om overtreders 'gedragscode' te straffen.
- Beloning door ketenpartners voor zelfregulerend gedrag.

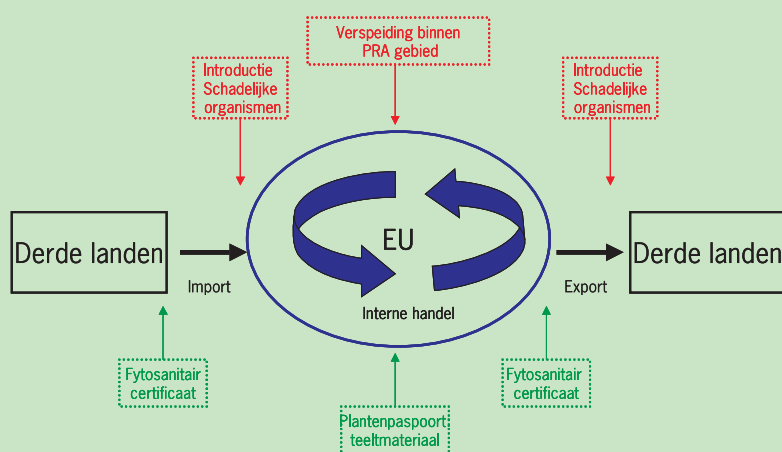
Binnen de regelgeving (EU) is ruimte voor bijvoorbeeld 'Reduced checks plus' en vormen van 'Toezicht op controle'.

Interesse voor zelfregulering neemt toe naarmate voordelen toenemen en grip op de keten groter is. Eventuele risico's moeten acceptabel en te beheersen zijn.

De praktijk

Onderzoek vormt de basis voor vervolgstappen. Concrete aanbevelingen:

- Stakeholders nemen gezamenlijk vervolgstappen.
- Acceptatie van exportlanden in kaart brengen.
- Nadere analyse van kosten en baten.
- Keteninventarisatie maakt behoefte meer inzichtelijk.
- Ontwikkelen instrument voor risico-analyse.
- Krachtenbundeling met andere sectoren.



Handelsstromen en aangrijpingspunten fyto-sanitair beleid.

Contact: Erick Westerman

LEI

Postbus 29703, 2502 LS Den Haag

T 070 33 58 330 / F 070 36 15 624

erick.westerman@wur.nl

www.lei.wur.nl

Zelfregulering van plantgezondheid in de bloemisterij (2005)

Anita van der Knijff, Bram van der Maas, Erick Westerman

Uitgangspunt

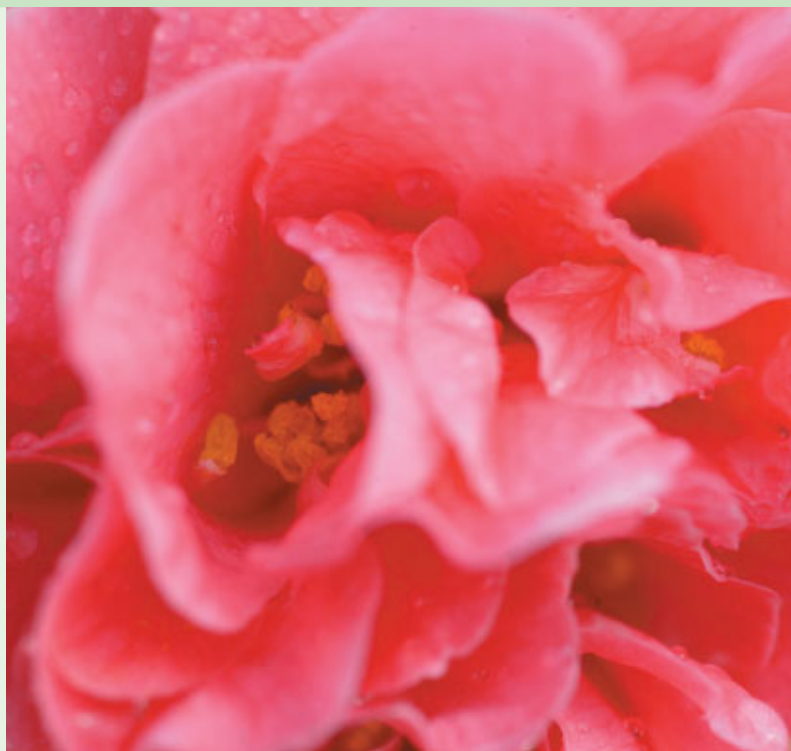
Het realiseren van een efficiënt en effectief fyto-sanitair beleid op basis van een gezamenlijke visie van overheid, bedrijfsleven en onderzoek:

- Zelfregulering en preventie in de keten.
- Meer onderbouwing en begrip maatregelen.
- Meer samenwerking en communicatie tussen overheid (inclusief Brussel) en bedrijfsleven.

Dit project is een vervolg op het project van 2004

Onderzoek

Uitgebreide ketenanalyse om concrete mogelijkheden van zelfregulering ten aanzien van plantgezondheid binnen de bloemisterij import- en exportketens te inventariseren. Deze activiteiten hebben geresulteerd in een aantal concrete cases voor vervolgonderzoek.



Resultaat workshop 14 september 2005: van 'Rupsje nooit genoeg' naar een vlinder met concrete cases.

Resultaten

- Fact sheets met keteninformatie toegespitst op zelfregulering plantgezondheid, uitgesplitst naar de volgende ketens:
 - o import uitgangsmateriaal uit derde landen,
 - o import snijbloemen uit derde landen,
 - o export uitgangsmateriaal naar derde landen,
 - o export eindproducten naar derde landen.
- Analyse van het inspectiesysteem in Nieuw-Zeeland, gericht op toepassingsmogelijkheden in Nederland.
- Twee concrete cases voor vervolgonderzoek in 2006:
 - A. Import: controle aan de bron.
 - B. Export: toezicht op controle.

De praktijk

Resultaten geven bedrijfsleven en overheid meer inzicht in de effecten en economische consequenties van verschillende vormen van zelfregulering. Deze informatie draagt bij aan de standpuntbepaling (en onderbouwing) over eventuele vervolgvormen van zowel overheid als bedrijfsleven.

Contact: Erick Westerman

LEI

Postbus 29703, 2502 LS Den Haag

T 070 33 58 330 / F 070 36 15 624

erick.westerman@wur.nl

www.lei.wur.nl

Risico-analyse en monitoring van plantenziekten in de keten

Ilya Surkov, Alfons Oude Lansink, Wopke van der Werf, Olaf van Kooten

Uitgangspunt

Nederland importeert veel sierteeltgewassen. Daarmee kunnen quarantaine ziekten en plagen ons land binnenkomen. Deze vormen een potentieel sterke bedreiging van de Nederlandse sierteelt-sector. Doel van dit project is het opzetten van een kwantitatief model ter optimalisering van de fytosanitaire inspectie en de monitoring van inspectiebeslissingen in de sierteeltproductieketen in Nederland.

Onderzoek

- Ontwikkeling conceptueel model om het besmettingsrisico te verminderen onder budgettaire beperkingen.
- Case study risico insecten in de Nederlandse bonsai-keten.
- Ontwikkeling praktisch toepasbare modellen voor optimale budget-toewijzing.
- Analyse van import-inspectiegegevens.



Fytosanitaire inspectie van verschillende sierteeltgewassen.

Resultaat

- Het conceptueel model resulteert in een theoretische basis voor praktisch toepasbare modellen voor budget-toewijzing.
- Het risico dat er door de import van bonsai-planten ernstige insectenproblemen ontstaan is klein. Het risico dat met bonsai-planten ingevoerde insecten zich verspreiden in andere delen van de sierteeltketen is ook klein. Dergelijke risico's zullen zich mogelijk eerder voordoen na her-export naar landen met een gunstiger klimaat.
- De ontwikkelde praktisch toepasbare modellen geven aan hoe een budget kan worden toegewezen voor fytosanitaire inspectie van producten die Nederland binnenkomen in afhankelijkheid van de gekozen doelstelling.

De praktijk

- Toepassing van het model leidt tot een betere fytosanitaire inspectie-beleid.
- De bonsai-keten case study geeft inzicht in het insectenrisico in een bepaalde Nederlandse import- en distributieketen.
- Empirische modellen geven indicaties voor praktische oplossingen bij het toewijzen van het inspectie-budget onder verschillende aannames en bij verschillende datasets.

Contact: Ilya Surkov

Business Economics, Wageningen University
Postbus 8130, 6700 EW Wageningen
T 0317 48 40 57 - F 0317 47 28 45
ilya.surkov@wur.nl
www.bec.wur.nl

Faag-display als bron voor diagnostische antistoffen

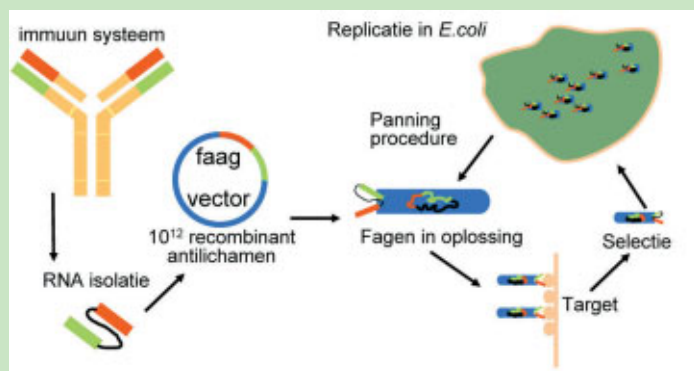
Arjen Speksnijder, Jules Beekwilder, Joop van Doorn

Uitgangspunt

In de land- en tuinbouw is er grote behoefte om snel en goedkoop pathogene schimmels en bacteriën te kunnen detecteren. Snelle vaststelling betekent grote milieuwinst en beperking van het opbrengstverlies van gewassen. Hiervoor wordt een groot aantal diagnostische tests toegepast, gebruikmakend van kwalitatief hoogwaardige antisera die vooral in konijnen opgewekt worden. Het probleem bij de conventionele antisera is dat plantenextracten soms een hoge achtergrond geven bij de detectie van virussen. Daarnaast zijn er weinig toetsen beschikbaar voor schimmels door problemen met kruisreactiviteit. Ook is samenstelling van sera heterogeen omdat productie vanuit bloed van proefdieren plaatsvindt. Faag-display, een laboratoriumtechniek waarmee via moleculaire technieken recombinant antilichamen worden geselecteerd/verkregen om ze vervolgens goedkoop en universeel te laten produceren door bacteriën of gist, biedt mogelijk een alternatief. Recombinante antisera zijn zeer specifiek en kunnen een oplossing bieden voor de achtergrond en kruisreactiviteitsproblemen. Daarbij is een goede zuivering mogelijk met een lage achtergrond van andere eiwitten. Dit is een belangrijk voordeel in nieuwe micro- en nano-technologie toepassingen.

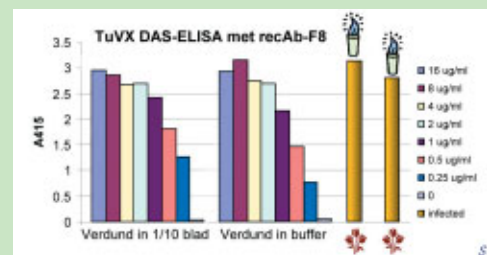
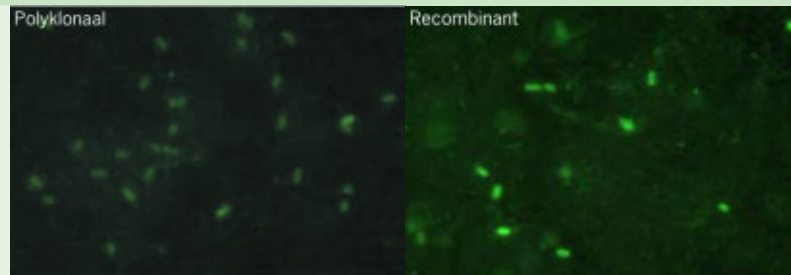
Onderzoek

- Ontwikkeling van procedures voor de selectie van specifieke fagen voor de herkenning van schimmelsporen.
- Ontwikkeling van een recombinant antilichaam voor de detectie van Tulp virus X.



Boven: Schema faag-display en selectie van recombinant antilichaam klonen.

Onder: Schema van de omkloning en expressie van recombinant antisera constructen.



Boven: Immuno-fluorescentie detectie van *Ralstonia solanacearum*. Het bestaand recombinant serum werkt goed maar is beperkt houdbaar.

Onder: Sandwich ELISA met een recombinant antilichaam voor de detectie van Tulp virus X. Een verdunningsreeks van het virus in bladmateriaal en in buffer is getest. Daarnaast is ook een praktijkmonster getoetst. De detectiemethode geeft een zeer lage achtergrond en lage detectiegrens.

Resultaten

- Er is inzicht verkregen in de productie en houdbaarheid van bestaande recombinante antisera.
- Er zijn procedures ontwikkeld voor de selectie van specifieke fagen voor de herkenning van schimmelsporen.
- In een demonstratieproject is een recombinant antilichaam ontwikkeld voor de detectie van Tulp virus X. Hierbij is gebruik gemaakt van verbeterde technologie. Het gebruik van de juiste faag-bank en strategie is cruciaal voor goede recombinante antisera.

De praktijk

Faag-display biedt een alternatief voor de huidige productie van diagnostische antisera. Volgens een nieuwe strategie kunnen recombinante antisera met een constante en verbeterde kwaliteit worden geproduceerd. Het gebruik van proefdieren kan hiermee worden teruggedrongen. Daarnaast zal de gedefinieerde productie van antisera in toekomst van groot belang zijn bij de ISO-certificering van diagnostiek binnen keuringsdiensten, PD en andere laboratoria.

Detectiemethode voor *Olpidium* in substraatteelt en grondmonsters

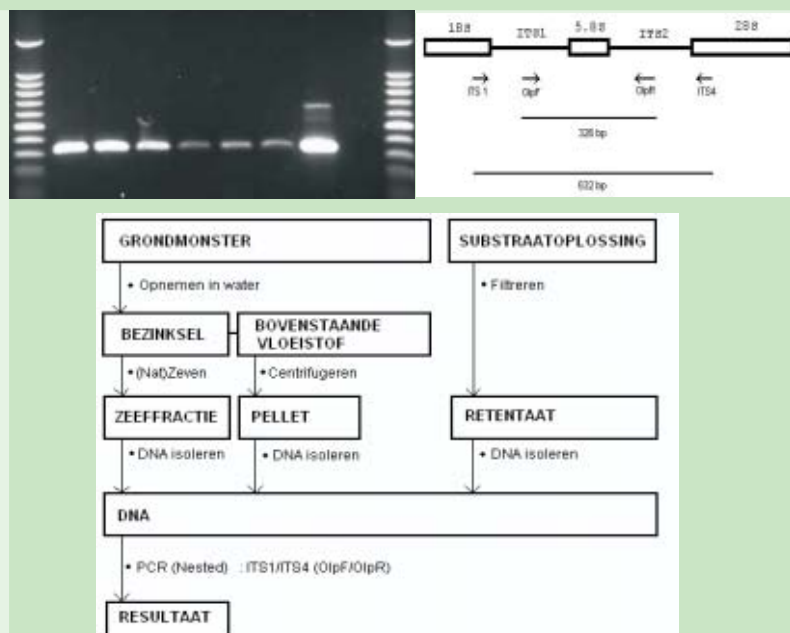
Khanh Pham, Vincent Bijman, René van der Vlugt, Joyce Schroot, Toon Derks

Uitgangspunt

Augustaziekte, een virusziekte in tulpen, wordt veroorzaakt door het *tabaksnecrosevirus* (TNV). In sommige jaren is de schade door deze ziekte aanzienlijk. Het virus wordt overgebracht door de bodemschimmel *Olpidium brassicae*. Om de ziekte zowel in het veld als tijdens de broei goed te kunnen waarnemen, is een toets op deze schimmel gewenst naast de al beschikbare ELISA-toets op het virus. Tot op heden kan de schimmel alleen indirect worden aangetoond via de wortels van een 'vangplant'. De schimmel wordt nu geïdentificeerd aan rustsporen in de wortels met behulp van een microscoop. Deze methode is erg arbeidsintensief en duur.

Onderzoek

Ontwikkeling van een PCR-methode voor de detectie van *Olpidium*. PCR-resultaten van *Olpidium*-detectie in watermonsters afkomstig van tulpen waterbroei.



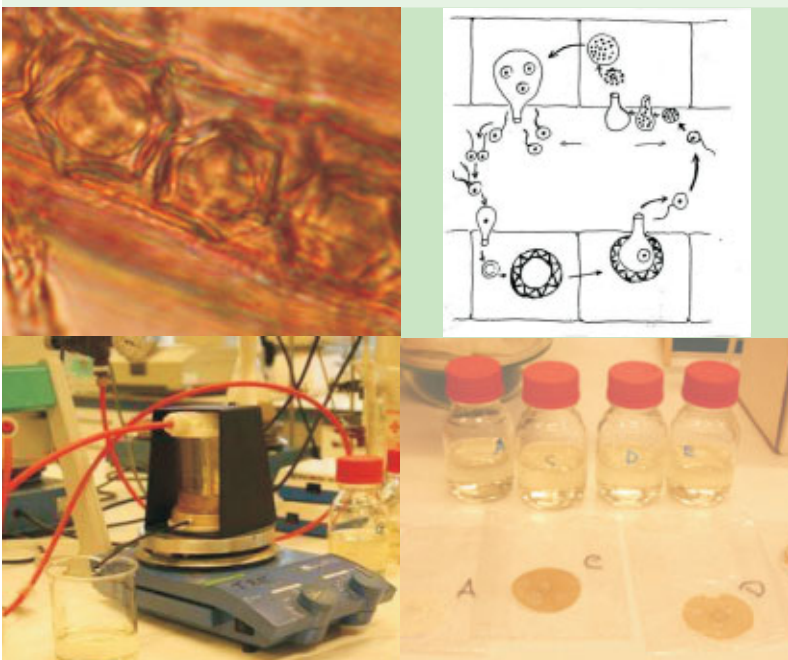
Linksboven: De PCR-resultaten van *Olpidium*-detectie in watermonsters afkomstig van tulpen waterbroei. Rechtsboven: Schematische representatie van de ribosomale genen van de *Olpidium* inclusief 'target area'. Onder: Overzicht van *Olpidium*-detectie in grond- en watermonsters.

Resultaat

Er is een laboratorium-methode voor het aantonen van *Olpidium* ontwikkeld. Met behulp van een filtratiemethode is PCR-detectie aan *in vivo* monsters mogelijk. Daarbij wordt onderscheid gemaakt tussen watermonsters en grondmonsters. Met de fracties verkregen uit de water- en grondmonsters wordt een DNA-analyse uitgevoerd.

De praktijk

De ontwikkelde methoden zullen worden gebruikt in het epidemiologisch onderzoek aan Augustaziekte in tulpen. Aanvullend onderzoek moet uitwijzen of de ontwikkelde methoden om *Olpidium*-besmetting van substraatoplossingen en gronden vast te stellen betrouwbaar genoeg zijn. Praktijkmonsters worden ter validatie van het proces meegenomen in het onderzoek.



Linksboven: Rustsporen van *Olpidium*. Rechtsboven: Levenscyclus van *Olpidium*. Linksonder: Het filterproces. Rechtsonder: Permeaat en retentat verkregen uit het filterproces.

Contact: Khanh Pham
Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
Postbus 85, 2160 AB Lisse
T 025 24 62 121 - F 025 24 62 100
khanh.pham@wur.nl
www.ppo.wur.nl

Flowcytometrie voor detectie en sortering van plantpathogenen

Jan van der Wolf, Jeroen Peters, Jan Bergervoet

Uitgangspunt

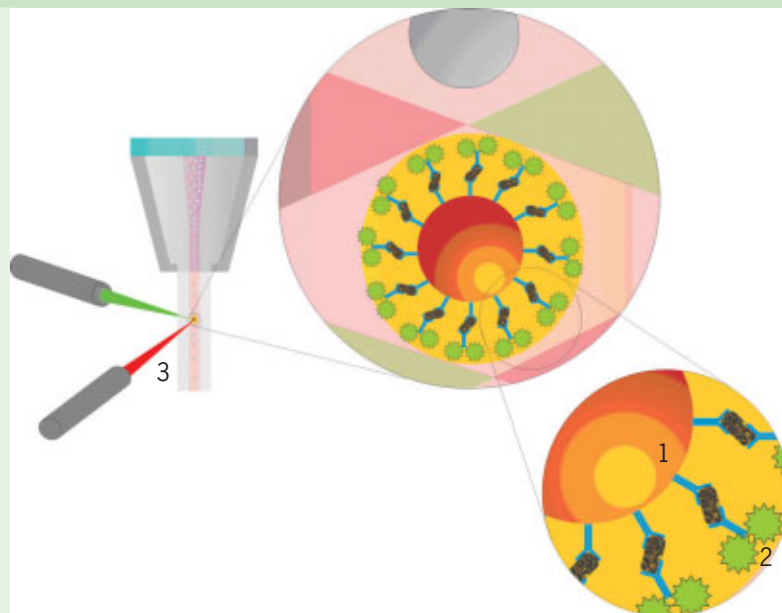
Voor flowcytometrische (FCM) detectie van plantpathogenen is gezocht naar methoden:

- die betrouwbaar, snel, kwantitatief en kosteneffectief zijn,
- die dode van levende organismen kunnen onderscheiden (vitaliteitskleuring),
- waarmee cellen en sporen gesorteerd kunnen worden voor validatie,
- waarbij meerdere pathogenen simultaan kunnen worden gedetecteerd (multiplex detectie).

Onderzoek

De volgende technieken werden geëvalueerd:

- FCM-analyse van bacteriën gekleurd met antistoffen, gemerkt met een fluorescent label (immuno-FCM).
- FCM-analyse van bacteriën en schimmelsporen na een vitaliteitskleuring met propidium jodide en SYTO9.
- Sortering van cellen na immuno-FCM.
- Multiplex detectie van virussen en bacteriën met behulp van de Luminex technologie.



Schematische weergave Luminex-detectie. 1. fluorescente beads voorzien van specifieke antistoffen reageren met bacterie- en/of virusantigenen in monstermateriaal, 2. secundaire antistoffen voorzien van Alexa532 reageren met gebonden antigenen, 3. beads worden geanalyseerd met een rode laser (beadadres) en groene laser (Alexa532).

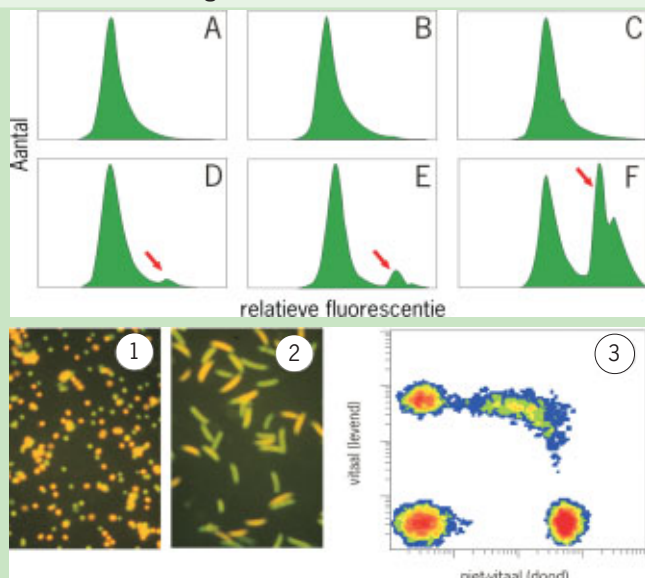
Resultaat

Effectieve flowcytometrische methoden voor:

- Immuno-FCM: detectielimiet van ca. $5 \cdot 10^4$ bacteriecellen per ml plantenextract, na een enkele filtratiestap.
- Vitaliteitskleuring: binnen 25 minuten kan de vitaliteit van cellen of sporen bepaald worden.
- Flow sorting: gesorteerde cellen kunnen gevalideerd worden door uitplaten of PCR.
- Luminex multiplex detectie: max. 100 pathogenen kunnen simultaan gedetecteerd worden; de gevoeligheid is vergelijkbaar met die van ELISA.

De praktijk

- FCM-analyse en -sortering kunnen worden gebruikt in onderzoek naar epidemiologie en beheersing van ziekten.
- De Luminex-technologie kan routinematig gebruikt worden voor snelle, kosteneffectieve en betrouwbare HTP-screening.



*FCM-detectiedrempels voor *R. solanacearum* in schilextract. A) buffer, B) 10^2 , C) 10^3 , D) 10^4 , E) 10^5 en F) 10^6 cellen per ml (rode pijl is de *R. solanacearum*-populatie). Sporen van 1) *Botrytis cinerea* en 2) *Fusarium culmorum* na vitaliteitskleuring. Rood gekleurde sporen zijn niet-vitaal en de groen gekleurde sporen zijn vitaal. In densitogram 3 is de distributie van niet-vitale en vitale sporen van *Botrytis cinerea* weergegeven.*

Genetische identificatie en detectie van *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc)

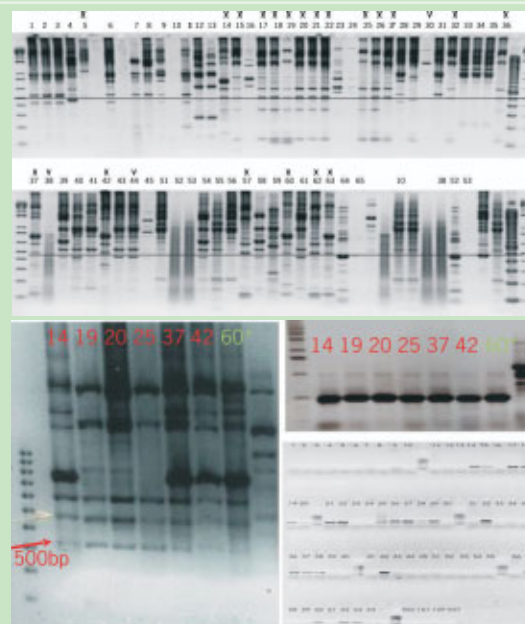
Arjen Speksnijder, Jan van der Wolf, Joop van Doorn

Uitgangspunt

Uit een hoog percentage zieke aardappelplanten wordt alleen Ecc geïsoleerd. Gevreesd wordt dat gespecialiseerde isolaten van Ecc in staat zijn ziekte te veroorzaken. Ook vanuit de bollenteelt komen signalen dat Ecc een mogelijke veroorzaker kan zijn van bacterierot. Dit kan grote consequenties hebben voor de keuring en monitoring. Door de grote serologische variatie van Ecc zijn er geen betrouwbare antistoffen beschikbaar. Daardoor kan er niet serologisch op dit pathogeen getoetst worden.

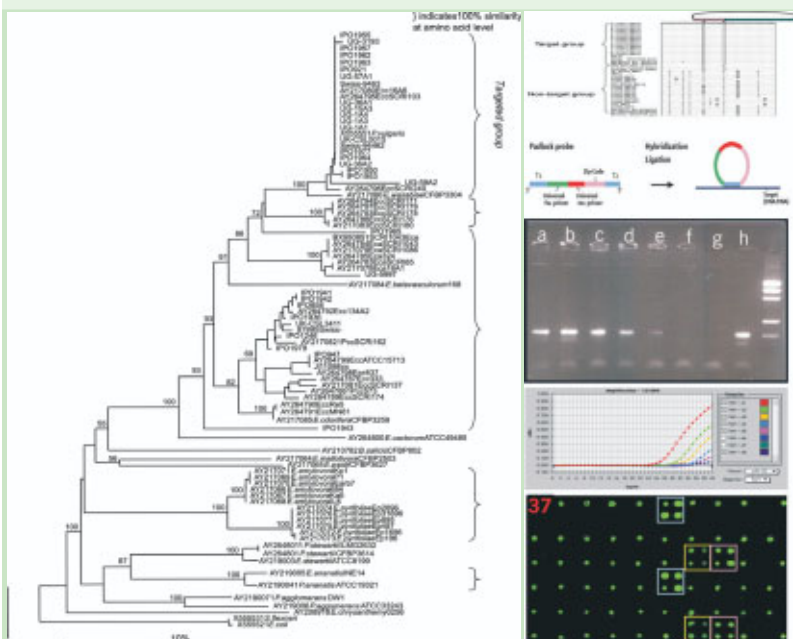
Onderzoek

Met genetische fingerprint-technieken wordt gezocht naar moleculaire merkers. Op basis van deze merkers kunnen specifieke moleculaire toetsen ontwikkeld worden voor keuringsdiensten en onderzoeksinstellingen.



Boven: REP-fingerprint-analyse van Ecc-isolaten en verwante soorten, identificatie van een gemeenschappelijke 500bp band.

Onder: Isolatie, PCR en sequentie bepaling van de gemeenschappelijke band van zeven isolaten. Ontwikkeling en validatie van een specifieke PCR.



* Phylogenetische analyse van *Erwinia*-isolaten op basis van *recA*-gen-sequenties.

* Identificatie van diagnostische sites op basis van *recA*-sequenties.

* Moleculaire detectie met Padlock-probe-technologie (PLP).

* Ecc-PLP-detectie met behulp van PCR, Taqman probe en Microarrays.

Resultaten

Ecc-isolaten uit bacteriezieke aardappelplanten zijn moleculair gekarakteriseerd. Er is een relatie met ziekte gevonden op basis van *recA*-sequentie-analyses en van een 500bp band in de REP-vingerprintanalyses. Op basis van het *recA*-gen is een padlock-probe-detectie ontwikkeld. Op basis van de 500bp band is een PCR-toets ontwikkeld.

In 2005 heeft een validatie van de PCR-toets plaatsgevonden. Bacteriezieke planten, waarin voorheen geen *Erwinia* aangetoond kon worden, geven voor het grootste deel positieve identificaties met de 500bp PCR. In de helft van deze planten kon de PCR bevestigd worden via herisolatie van Ecc.

De praktijk

De ontwikkeling van een detectiestrategie van Ecc heeft geleid tot positieve identificatie van bacteriezieke planten waarin voorheen geen *Erwinia* gedetecteerd kon worden. Ecc-detectie kan bijdragen aan een beter begrip van het bacterieziekprobleem in aardappelen en bloembollen en aan verbeterde detectie binnen de keten.

Contact: Arjen Speksnijder
Plant Research International B.V.
Postbus 16, 6700 AA Wageningen
T 0317 47 62 13 - F 0317 41 80 94
arjen.speksnijder@wur.nl
www.pri.wur.nl

Snelle en gevoelige *in planta* toetsen voor detectie van *Fusarium foetens* in begonia

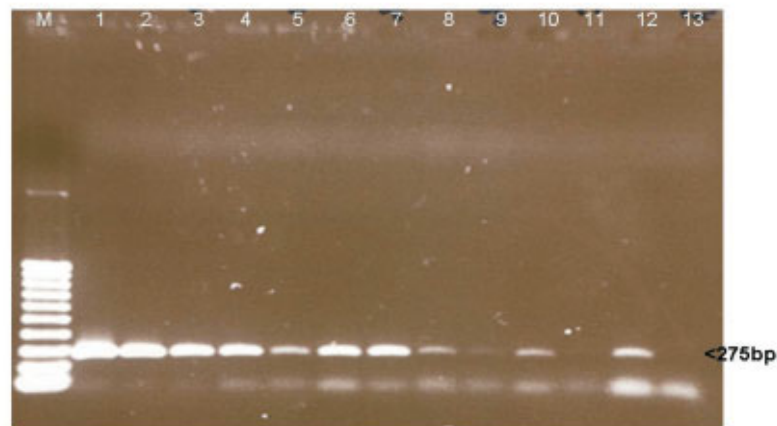
Carolien Zijlstra, Marjanne de Weerd, Ilse Heurneman, Gerard van Leeuwen, Hans de Gruyter, Linda Kox

Uitgangspunt

Fusarium foetens is een nieuw pathogeen van begonia. Deze schimmel is morfologisch moeilijk te onderscheiden van andere Fusaria en gangbare detectietesten zijn tijdrovend aangezien daarvoor de schimmel geïsoleerd en gekweekt dient te worden. Een snelle *in planta* toets voor detectie van deze schimmel is zeer wenselijk.

Onderzoek

- Ontwikkeling van een PCR die specifiek is voor *F. foetens*.
- Ontwikkeling van TaqMan die specifiek is voor *F. foetens*.
- Het testen van beide toetsen op DNA geïsoleerd uit reïncultures van Fusarium-soorten en uit begonia-planten.



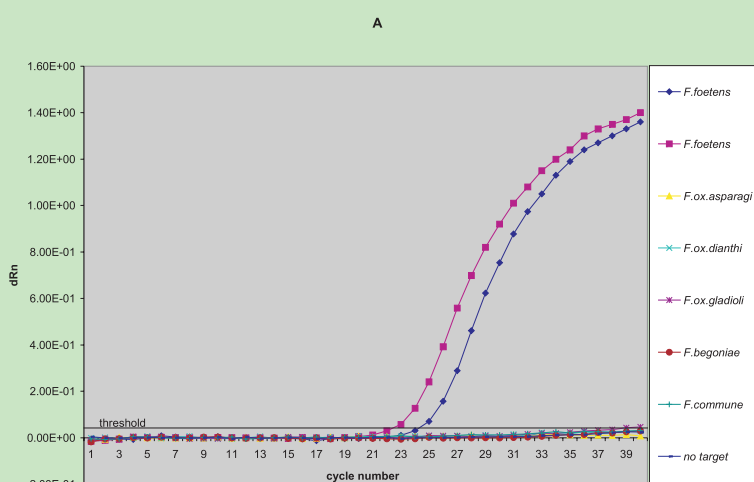
Detectie van *F. foetens* in verschillende delen van planten met *F. foetens* symptomen met behulp van een voor *F. foetens* specifieke PCR. De volgende monsters werden getest: van een plant met duidelijke symptomen de stengelbasis (laan 1) en blad (laan 2); van een plant met milde symptomen een deel van de stengel 3 cm boven de basis (laan 3), en 6, 9, 12 respectievelijk 20 cm boven de stengelbasis (lanen 4, 6, 7 respectievelijk 8), in de top (laan 9) en een bladsteeltje 3 cm boven de stengelbasis (laan 5); van een plant met net zichtbare symptomen de stengelbasis (laan 10); DNA van een symptoomloze plant (laan 11) en als positieve controle 10 µg DNA van *F. foetens* (laan 12). Laan 13 is water.

Resultaten

- De PCR-test amplificeert uitsluitend bij *F. foetens* een 275 bp fragment dat via gel-electroforese kan worden aangetoond.
- De ontwikkelde TaqMan-toets is eveneens specifiek voor *F. foetens* en maakt bovendien kwantificering mogelijk.

De praktijk

- Met de PCR-test kan binnen een halve dag worden aangetoond of een begoniaplant besmet is met *F. foetens* of niet. Met de TaqMan kan dit nog 1,5 uur sneller.
- De PCR-test is zeer toegankelijk aangezien deze gangbare apparatuur verlangt, zoals een PCR-machine en een gel-electroforese systeem.
- Voor de TaqMan-test is TaqMan-apparatuur nodig. Daarmee kunnen in één test heel veel monsters getest worden op aanwezigheid van *F. foetens*.



Amplificatiecurves van de ontwikkelde TaqMan-toets waaruit blijkt dat de toets wel bij *F. foetens* een FAM-sigitaal geeft maar niet bij verwante Fusarium-soorten.

Contact: Carolien Zijlstra
Plant Research International B.V.
Postbus 16, 6700 AA Wageningen
T 0317 47 61 55 - F 0317 41 80 94
carolien.zijlstra@wur.nl
www.pri.wur.nl

Moleculaire identificatie en detectie van Europese en Amerikaanse *Phytophthora ramorum* isolaten

Peter Bonants, Els Verstappen, Laurens Kroon, Hans de Gruyter, Linda Kox, Kelly Ivors

Uitgangspunt

Het genus *Phytophthora* bevat momenteel meer dan 70 soorten en het aantal neemt verder toe door intensievere bemonstering. *P. ramorum*, een van de nieuwe soorten, wordt beschouwd als een hoog fyto-sanitair risico. In Europa komt de ziekte hoofdzakelijk voor op *Rhododendron*, *Viburnum* en *Camellia*, hoewel recentelijk ook in openbaar groen de ziekte is aangetroffen in geïnfecteerde bomen.

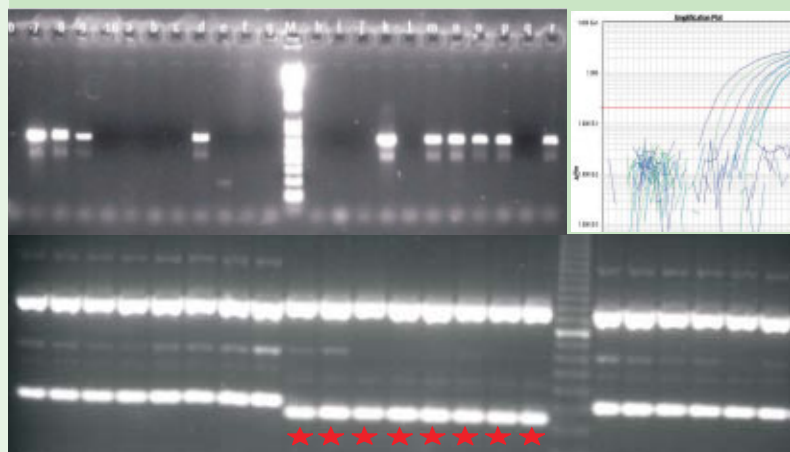
P. ramorum is een heterothallische soort en het is bekend dat er twee verschillende populaties bestaan: één in de VS (A2) en één in Europa (A1 mating type).

Maatregelen moeten worden genomen om verspreiding te voorkomen, alsmede de vermenging van beide types.

Onderzoek

De ontwikkeling van adequate identificatie- en detectiemethodes.

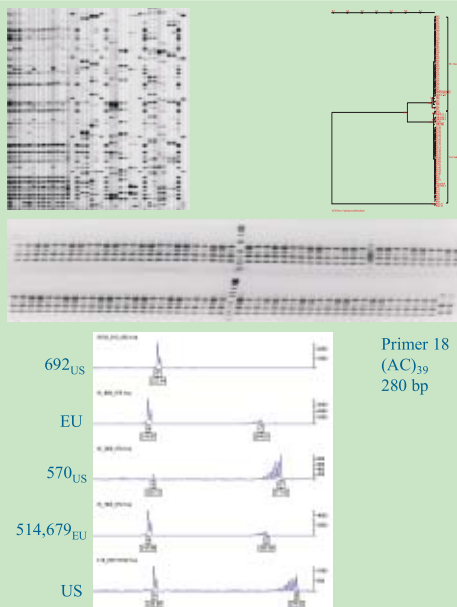
<i>P. ramorum</i> OakVS478	AGGTCAAATTCATTTTGGTT
<i>P. ramorum</i> OakVS479	AGGTCAAATTCATTTTGGTT
<i>P. ramorum</i> RhodEU233	AGGTCAAATCCATTTTGGTT
<i>P. ramorum</i> RhodEU98	AGGTCAAATCCATTTTGGTT
<i>P. ramorum</i> ViburEU474	AGGTCAAATCCATTTTGGTT



Figuur boven: Sequentieverschil van het Cox 1-gen voor een aantal EU en VS *P. ramorum* isolaten.

Figuur midden: ITS-PCR (links) op een aantal plantmonsters. TaqMan PCR amplificatie (rechts).

Figuur onder: -RFLP-patronen voor een aantal EU- en US- (*) isolaten van *P. ramorum*.



Figuur boven: AFLP-patronen van *P. ramorum* isolaten (links) en dendrogram (rechts).

Figuur midden: ISSR-patronen van EU- en US-isolaten van *P. ramorum*.

Figuur onder: Voorbeeld van SSR-profiel met primer 18 van diverse *P. ramorum* isolaten.

Resultaten

Enkele voorbeelden van de ontwikkelde methodes:

- A) AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism
- B) ISSR: Inter Simple Sequence Repeats
- C) Microsatellieten (SSR: Simple Sequence Repeats)
- D) Sequentie analyse van verschillende genen
- E) ITS-PCR en
- F) TaqMan PCR (real-time PCR)
- G) PCR-RFLP

De praktijk

Diverse moleculaire methodes zijn ontwikkeld om *Phytophthora ramorum* te identificeren en detecteren. Moleculaire verschillen tussen Europese en Amerikaanse isolaten van *P. ramorum* bestaan en kunnen met de beschikbare methodes worden gedemonstreerd.

Deze methodes geven de Plantenziektenkundige Dienst het benodigde gereedschap ter beheersing van dit pathogeen.

Kwantitatieve analyse risicobeheersing in de aardappelkolom

Bas Janssens, Jan Benninga, Herman Schoorlemmer, Marcel van der Voort, Alfons Oude Lansink

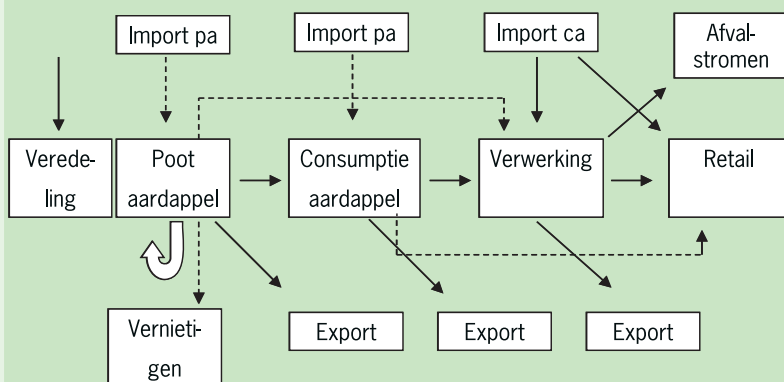
Uitgangspunt

Centrale vraag is om via kwantitatieve analyse inzicht te geven in de keten en met welk instrumentarium de controle op quarantaine-organismen het meest efficiënt kan worden uitgevoerd en geborgd.

Onderzoek

Het onderzoek omvat een analyse van:

- Processtappen en risico's in de aardappelketen.
- Volume- en informatiestromen.
- Gevolgen van quarantaine-organismen (gevarenanalyse).
- Identificeren van kritische controlepunten.
- Maatregelen, inclusief kosten, baten en risico's.
- Verantwoordelijkheden van verschillende ketenpartijen.



Vereenvoudigde weergave van productstromen binnen de aardappelkolom.

Resultaten

- Gedetailleerd overzicht van de omvang van bestaande volumestromen voor poot-, zetmeel- en consumptie-aardappelen.
- Gevarenanalyse voor het aardappelspindelknolviroïde (PSTVd) en het maïswortelknobbelaaltje (*Meloidogyne chitwoodi*).
- Processtappen en risico's van bovenstaande organismen per schakel in de aardappelketen.

De praktijk

Internationaal wordt op Nederland druk uitgeoefend om meer te inspecteren. Het bedrijfsleven streeft ernaar om inspecties zo efficiënt en effectief mogelijk te organiseren. Het onderzoek levert een bijdrage aan de behoefte aan kennis over fytosanitaire risico's binnen ketens.



Via transport van aardappelen kunnen quarantaine-organismen over grote afstand verplaatst en verspreid worden.

Contact: Bas Janssens

LEI

P.a. Postbus 2176, 8203 AD Lelystad

T 0320 29 35 29 - F 0320 29 35 95

bas.janssens@wur.nl

www.wur.nl

Voorstudie kosteneffectiviteitsmodel fyto-sanitaire maatregelen

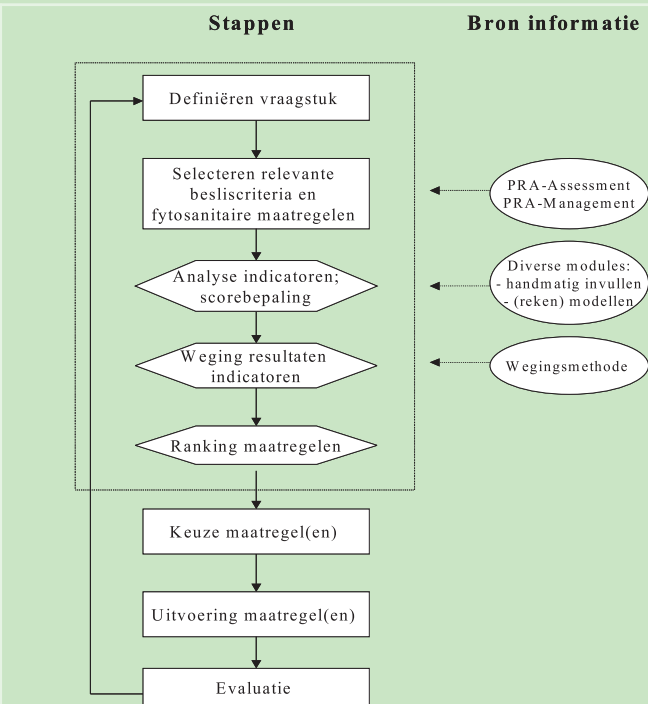
Bas Janssens, Alfons Oude Lansink, Erick Westerman

Uitgangspunt

Internationaal neemt de druk op Nederland toe om te inspecteren en strengere maatregelen te nemen. Terwijl het bedrijfsleven druk uitoefent om binnen de internationale kaders de fyto-sanitaire maatregelen efficiënt en doelmatig te organiseren. Beleidsmedewerkers van diverse directies van het Ministerie van LNV en de Plantenziektenkundige Dienst hebben behoefte aan een model of beslisschema voor goed onderbouwde keuzes gericht op een uitvoerbaar pakket van fyto-sanitaire maatregelen. Doel van het project is het formuleren van een plan van aanpak voor de ontwikkeling van een generiek model of beslisschema voor het bepalen van kosten, baten, uitvoerbaarheid en andere effecten van fyto-sanitaire maatregelen.

Onderzoek

1. Inventarisatie eisen en wensen gebruikersgroep.
2. Inhoudelijke verdieping/ontwikkeling raamwerk.
 - Internationaal beleidskader.
 - Keuze besliscriteria en maatregelen in concrete situaties.
 - Toepasbaarheid bestaande modellen.
 - Weging van scores op individuele besliscriteria.
3. Opstellen Plan van Aanpak.



Raamwerk kosteneffectiviteitsmodel (omkaderd door stippellijn).

Resultaten

Bovenstaand raamwerk is de basis voor het plan van aanpak, gericht op een stapsgewijze invulling van het kosteneffectiviteitsmodel. Gezien de complexiteit van de materie zullen concrete casestudies daarin een belangrijke rol gaan spelen. Grofweg zal eerst invulling gegeven worden aan de hoofdstructuur en de basisrekenregels in de modules. Vervolgens zullen verschillende modules, afhankelijk van de mogelijkheden en behoeften, verder gedetailleerd ingevuld worden.

De praktijk

Het resultaat van deze voorstudie vormt een goede en gedragen basis voor het ontwikkelen van een concreet model of beslisschema voor het nemen van fyto-sanitaire maatregelen.



Workshop 13 april 2005: inventariseren van beelden en behoeften.

Contact: Erick Westerman

LEI

Postbus 29703, 2502 LS Den Haag

T 070 33 58 330 / F 070 36 15 624

erick.westerman@wur.nl

www.lei.wur.nl