

Symptoombeschrijving, detectie en bestrijding van krokusknolaaltje bij narcis Tête-à-Tête

Peter Vreeburg, Peter Vink, Joop van Doorn, Khanh Pham en André Korsuize

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
april 2007
PPO nr. 32 331062 00

© 2007 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.



Projectnummer: 32 331062 00

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

Adres : Prof. Van Slogterenweg 2, 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

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INLEIDING | 7 |
| 2 | SYMPTOMEN KROKUSKNOLAALTJE BIJ TÊTE-À-TÊTE | 9 |
| 2.1 | Inleiding | 9 |
| 2.2 | Materiaal en methode..... | 9 |
| 2.3 | Resultaten inventarisatie bedrijven en opplant | 9 |
| 2.4 | Resultaten monsters diagnostiek..... | 10 |
| 2.5 | Conclusies | 13 |
| 3 | ONTWIKKELING DNA-TOETS VOOR IDENTIFICATIE KROKUSKNOLAALTJE..... | 15 |
| 3.1 | Inleiding | 15 |
| 3.2 | Materiaal en methode..... | 16 |
| 3.3 | Resultaten..... | 16 |
| 3.3.1 | Isolatie DNA | 16 |
| 3.3.2 | Ontwikkeling PCR-toets..... | 17 |
| 3.3.3 | Toetsing op praktijkmateriaal..... | 19 |
| 3.4 | Conclusie | 19 |
| 4 | BESTRIJDING KROKUSKNOLAALTJE D.M.V. WARMWATERBEHANDELING | 21 |
| 4.1 | Inleiding | 21 |
| 4.2 | Materiaal en methode..... | 21 |
| 4.2.1 | Onderzoek 2004/2005..... | 21 |
| 4.2.2 | Onderzoek 2005/2006..... | 22 |
| 4.3 | Resultaten..... | 23 |
| 4.3.1 | Resultaten 2004/2005 | 23 |
| 4.3.2 | Resultaten 2005/2006 | 24 |
| 4.4 | Conclusie | 25 |
| 5 | DISCUSSIE | 27 |
| 5.1 | Symptomen en bestrijding | 27 |
| 5.2 | Toetsontwikkeling | 27 |
| 6 | COMMUNICATIE..... | 29 |
| | BIJLAGE 1 | 31 |

Samenvatting

In de eerste maanden van 2004 ontving PPO vanuit de buitenlandse pottenbroei monsters van Tête-à-Tête die aangetast waren met krokusknolaaltjes (*Aphelenchoides subtenuis* (Cobb)). Tot op dat moment was aantasting met krokusknolaaltje vooral bekend bij oa. Krokus, Allium en bij een enkele narciscultivar zoals Bridal Crown, maar niet bij Tête-à-Tête. De gewas- en bolsymptomen van krokusknolaaltje bij Tête-à-Tête waren niet of nauwelijks bekend. Niet uitgesloten werd dat het meer voorkwam, maar dat de uitval aan andere veel voorkomende ziekten werd toegeschreven. Tête-à-Tête is met een derde van het areaal zeer belangrijk en komt vaak voor in een vruchtwisseling met krokus.

Omdat het aantonen van het krokusknolaaltjes alleen mogelijk was met een microscoop door een deskundige, was behoefte aan een DNA-toets. Deze is betrouwbaar en ontwikkeling ervan is van belang voor alle gewassen die gevoelig zijn voor het krokusknolaaltje.

In dit onderzoek is gezocht naar herkenbare symptomen in teelt en broei, zijn de mogelijkheden van een warmwaterbehandeling zeer snel na rooien onderzocht, voorafgaande aan afbroei en is een snelle DNA-toets ontwikkeld om *Aphelenchoides subtenuis* aan te tonen.

Tête-à-Tête bleek geen makkelijk aan te tasten waardplant te zijn. Symptomen in het veld en tijdens de bewaring werden noch in de praktijk noch in onderzoek gevonden. Alleen bij afbroei werden bij besmette planten in beperkte mate symptomen gevonden: op het oog gave bollen met slechte beworteling, achterblijvende spruitgroei, bleek groene en soms bruine bladeren en bruine bolrokken, vooral rond de spruit. De blad- en bolaantasting kunnen verward worden met een aantasting door stengelaaltjes. Een warmwaterbehandeling van 4 uur 47°C kort na rooien kon zonder gewasschade voor afbroei worden uitgevoerd, mits voldoende voorwarmte werd gegeven.

Er is een snelle DNA-toets ontwikkeld, die zowel met zuivere aaltjes als met bolmateriaal werkt.

1 Inleiding

In het vroege voorjaar van 2004 ontving PPO vanuit de buitenlandse pottenbroei monsters van Tête-à-Tête die aangetast waren met krokusknolaaltjes (*Aphelenchoides subtenuis* (Cobb)). Tot op dat moment was aantasting met krokusknolaaltje vooral bekend bij krokus en Allium en in mindere mate bij enkele cultivars van wortel dragende iris, hardschalige tulpen, Camassia, Chionodoxia, Colchium, Erythronium en Gloriosa. Bij narcis was aantasting met krokusknolaaltje bij enkele cultivars bekend, echter nog niet bij Tête-à-Tête. In een proef waarin bollen temidden van aangetaste narcisbollen waren geplant, bleek dat de cultivars Ice Wings, Baby Moon, Actaea, Bridal Crown en de Tazetta-soorten Geranium, Cragford en Caniculatus door krokusknolaaltjes konden worden aangetast. De cultivar Tête-à-Tête en nog 12 andere cultivars werden niet zichtbaar aangetast maar mogelijk was een aantal cultivars toch aangetast zonder dat dit werd opgemerkt. In het verleden zijn al krokusknolaaltjes vastgesteld in monsters van de cultivars Sir Winston Churchill, Quince en Jumbie (beide cultivars van de zelfde oorsprong als Tête-à-Tête) en regelmatig in geïmporteerde Ziva's.

Omdat de gewas- en bolsymptomen van krokusknolaaltje bij Tête-à-Tête nauwelijks bekend zijn én omdat wat bekend is (deels) afwijkt van de symptomen bij de andere cultivars, is het aannemelijk dat krokusknolaaltje bij Tête-à-Tête veel meer voorkomt dan bekend is. Het is bovendien goed mogelijk dat uitval vaak aan andere ziekteverwekkers wordt toegeschreven, vanwege overeenkomstige symptomen. Zo kunnen tijdens afbroei de symptomen verward worden met die van stengelaaltjes, Botrytis en Penicillium.

Tête-à-Tête vertegenwoordigt eenderde van het areaal narcis en komt ook regelmatig voor in een vruchtwisseling met krokus (en soms Allium) en is daarmee verreweg de belangrijkste cultivar die bij zeer veel telers in het teeltplan voorkomt. Door de onbekendheid met krokusknolaaltje bij Tête-à-Tête én door het veelvuldig aanwezig zijn van opslag van zowel krokus als ook de relatief kleine bollenmaker Tête-à-Tête, kan een besmetting van de grond ongemerkt heel lang aanwezig zijn. Doordat meerdere gewassen waardplant kunnen zijn, komt de bestrijding op het veld door vruchtwisseling (3 jaar geen waardplant is afdoende) in gevaar.

Onlangs waren er grote problemen bij de export van Crocus en Allium door de aanwezigheid van krokusknolaaltjes. Gezien het belang van Tête-à-Tête, ook voor de export, moet dit worden voorkomen.

De bestrijding in de bol d.m.v. een warmwaterbehandeling moet binnen 1 week na rooien worden uitgevoerd, omdat deze anders niet meer effectief is; de standaard toegepaste, voorbehoedende warmwaterbehandeling geeft geen bestrijding, doordat deze te laat wordt uitgevoerd is en niet zwaar genoeg is. De behandeling die tegen stengelaaltjes wordt toegepast is wél goed, maar deze wordt over het algemeen pas later uitgevoerd (binnen 3 weken na rooien).

Het aantonen van het krokusknolaaltjes is lastig en geschiedt visueel met een microscoop. Het is gebleken dat de kans op een verkeerde diagnose, bij onvoldoende kennis en ervaring, hierbij groot is. Een zgn. DNA-toets is wel betrouwbaar en ontwikkeling ervan is van belang voor alle gewassen die gevoelig zijn voor het krokusknolaaltje.

Over het krokusknolaaltje, de symptomen, mogelijke waardplanten en de bestrijding ervan, leven nog vele vragen.

Het hieronder beschreven onderzoek had tot doel:

- symptoombeschrijving bij Tête-à-Tête
- het ontwikkelen van een snelle DNA-toets.
- een beperkt (gecombineerd) onderzoek naar bestrijding en schade door een warmwaterbehandeling bij Tête-à-Tête.

2 Symptomen krokusknolaaltje bij Tête-à-Tête

2.1 Inleiding

De gewas- en bolsymptomen van krokusknolaaltje bij Tête-à-Tête zijn nauwelijks bekend en wijken (deels) af van de symptomen bij de andere cultivars. In de praktijk worden de symptomen soms verward met die van stengelaaltjes, Botrytis en Penicillium. Voor vroegtijdige herkenning en de juiste bestrijding van het krokusknolaaltje is het van belang dat er een nauwkeurige omschrijving komt van de symptomen van het krokusknolaaltje.

Om tot een beschrijving van symptomen te komen is op de twee bedrijven, waar de monsters naar terug waren te herleiden, geïnventariseerd, zijn bollen opgeplant en is gebruik gemaakt van op PPO binnengekomen monsters vanuit de afbroei.

2.2 Materiaal en methode

Bij de bedrijven waarvan aangetoond besmette monsters in de broei zijn ontvangen, zijn op het veld en tijdens de bewaring, de partijen Tête-à-Tête gevolgd en is naar mogelijke symptomen gezocht. Van één van die bedrijven zijn mogelijk besmette bollen gebruikt voor onderzoek met warmwaterbehandelingen ter bestrijding, waarvan de bollen werden afgebroeid (zie hoofdstuk 4). Ook zijn die bollen opplant op PPO op een met krokusknolaaltjes besmet perceel ter beoordeling op symptomen. Monsters van verdachte of afwijkende planten van met name Tête-à-Tête die bij afdeling diagnostiek van PPO binnenkwamen, zijn onderzocht op krokusknolaaltjes. De beoordeling vond zowel visueel als microscopisch plaats.

2.3 Resultaten inventarisatie bedrijven en opplant

Bij de twee bedrijven waarvan besmette monsters uit de pottenbroei waren ontvangen, werden op het veld in 2004 geen symptomen gevonden. Na rooien werden in de schuur geen bollen gevonden waarin krokusknolaaltjes werden aangetoond door microscopisch onderzoek.

In de afbroei van bollen van die twee bedrijven werden in het volgende jaar 2005 geen gewassymptomen gevonden of gemeld via afnemers. Ook later op het veld in 2005 werden geen symptomen als gevolg van krokusknolaaltjes gevonden.

Bij opplant van bollen op een door Allium en krokus met krokusknolaaltjes besmet perceel op PPO, werden op het veld ook geen symptomen als gevolg van krokusknolaaltjes gevonden en ook na rooien werden geen bollen met symptomen gevonden. Bij afbroei van deze bollen in 2006 werden wel enkele bollen met symptomen gevonden in niet gekookte bollen (zie hoofdstuk 4). Bij de afwijkende planten en bollen werden wel de andere bekende aantastingen zoals Penicillium, Botrytis en bij opplant op PPO ook grote narcisvlieg gevonden.

In 2005 werden op de bedrijven ook geen aangetaste planten en bollen gevonden.

Alle verzamelde afwijkende planten bleken na microscopisch onderzoek vrij van krokusknolaaltjes te zijn.

In eerder onderzoek op PPO, waarbij een groot aantal cultivars werd opgeplant samen met zwaar aangetaste bollen, werden op het veld en kort na rooien ook geen aangetaste planten of bollen gevonden. Pas veel later in de bewaring werden alsnog aangetaste bollen gevonden bij de cultivars Actaea, Baby Moon, Geranium, Cragford, Canaliculatis, Bridal Crown en Ice Wings. Geen aantasting werd gevonden in de cultivars Golden Harvest, Dutch Master, Carlton, Ice Follies, Barrett Browning, Cheerfulness, Tresamble, Jack Snipe, Quail, Suzy, Minnow en Tête-à-Tête.

2.4 Resultaten monsters diagnostiek

Binnen gekomen monster en onderzoek hebben geleid tot de volgende omschrijving van de symptomen van krokusknolaaltje bij narcis en specifiek voor Tête-à-Tête:

Narcis

Zwaar door krokusknolaaltjes aangetaste narcisbollen hebben meestal een donkerder bruine huid en zijn minder goed gegroeid. Op het moment van rooien zijn de wortels van dergelijke bollen bruinrot en grotendeels afgestorven (foto 1). Op de plaats waar de wortels gezeten hebben, is het weefsel dan bruin en iets verkurkt (foto 2). Soms is de hele bolbodem verkurkt en van kloven voorzien. Meestal blijft het ziektebeeld hiertoe beperkt, maar soms zet de aantasting zich tijdens de bewaring voort in de bolrokken. De bolrokken kunnen soms ook al bij de oogst zijn aangetast. In dat geval is de buitenste bolrok vooral vanuit de inplantingsplaats of vanuit de groeischeuren licht- tot donkerbruin verkleurd. De ziekte is dan nauwelijks te onderscheiden van andere huidziekten. De loofbladeren vertonen meestal geen symptomen, maar tegen de rootijd vergelen kleine plekje in het gewas en sterven deze iets eerder af. Aangetaste bollen ontwikkelen na het planten nauwelijks wortels en vormen een magere plant die achter blijft in groei. Het krokusknolaaltje wordt vooral aangetroffen in cultivars van *N. tazetta*, *N. poeticus*, *N. jonquilla*, *N. triandrus* en sommige species. Voorbeelden zijn Van Sion, Geranium, Sir W. Churchill, Bridal Crown en Ice Wings. De ziekte is ook regelmatig aangetroffen in uit het mediterrane gebied afkomstige partijen narcis cultivar Paper White en Ziva.



Foto 1. Aantasting huid en wortels bij rooien Foto 2. Verkurking van de bolbodem

De aangetaste bollen worden gevonden in afbroeimonsers. Veruit de meeste monsters zijn afkomstig van Bridal Crown die op potten zijn afgebroeid en op PPO worden gebracht omdat ze deels niet of slecht beworteld zijn (foto's 3 en 4). Monsters narcis vanuit de teelt komen niet voor.



Foto 3. Geen wortels door aantasting



Foto 4. lele planten en niet of slecht wortelende planten

Tête-à-Tête

Bij de cultivar *Tête-à-Tête* komt echter ook een aantasting voor waarbij ogenschijnlijk gezonde, gave en stevige bollen tijdens de broeierij slecht bewortelen en de spruitontwikkeling achterblijft (foto's 5 en 6). Bij dergelijke bollen blijkt vaak dat de spruiten opgevouwen in de bol zitten en niet gemakkelijk uit de bol tevoorschijn kunnen komen. Tijdens de strekking blijven dergelijke spruiten deels in de bol steken. Het blad wat zich nog wel boven de bolneus ontwikkelt is vaak bleek groen of soms bruin van kleur. De spruiten worden in de bol omgeven door bolrokken die vanuit de top bruin tot crèmeachtig verkleurd zijn (foto's 7 en 8). De verkleuring van deze bolrokken loopt soms door tot aan de bolbasis. Daardoor ontstaat een ziektebeeld (foto's 9 en 10) dat verward kan worden met die van een aantasting door stengelaaftjes. Het bruine bolrokweefsel is in de bol vrijwel nooit begroeid met schimmels en vaak vanuit de top uitgedroogd.



Foto 5. Achterblijvende spruitontwikkeling



Foto 6. Achterblijvende spruitontwikkeling



Foto 7. Aantasting van de rok om de spruit



Foto 8. Aantasting van de rokken



Foto 9. Bladaantasting



Foto 10. Bladaantasting bij meerdere spruiten



Foto 11. Gewas- en bolsymptomen



Foto 12. Gewassymptomen bij bloei

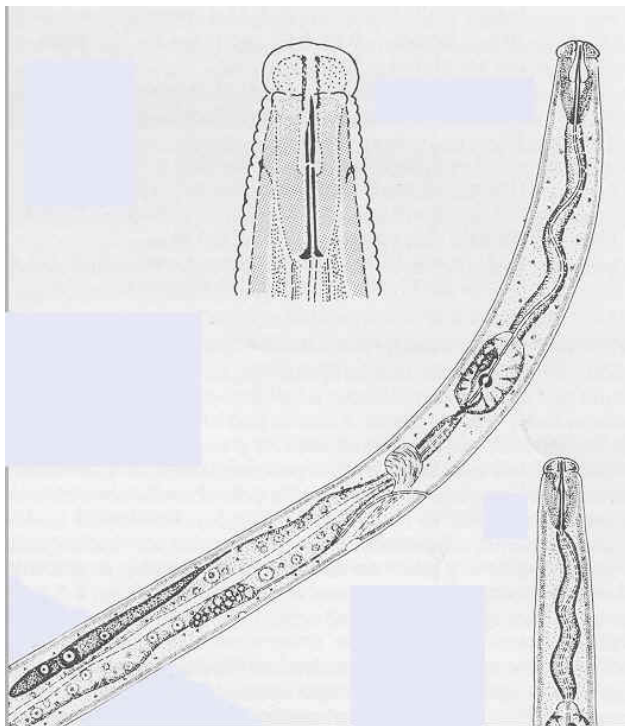
2.5 Conclusies

- Krokusknolaaltjes geven bij Tête-à-Tête geen of niet bekende symptomen op het veld.
- Selectie op bolsymptomen bij Tête-à-Tête na rooien is ook onmogelijk door het ontbreken van kenmerkende symptomen.
- Symptomen bij Tête-à-Tête en andere narcissen zijn afkomstig van afbroeimonsers.
- Slechte beworteling en symptomen in gewas en bol die verward kunnen worden met die van stengelaaltjes, zijn de belangrijkste kenmerken.
- Narcis en zeker ook Tête-à-Tête, is geen gevoelige waardplant die vanuit een besmette grond snel aangetast wordt.

3 Ontwikkeling DNA-toets voor identificatie krokusknolaaltje

3.1 Inleiding

Aantoning van krokusknolaaltje is lastig en geschiedt momenteel microscopisch. Gebleken is dat de kans op een verkeerde diagnose hierbij groot is. Een zeer goede microscoop, een expert en geluk dat er volgroeide individuen aanwezig zijn, zijn een vereiste voor een goede identificatie. Criteria als stilet- (prikker-) lengte, de vorm van de staart en aantal zijlijnen zijn moeilijk en vaak niet waarneembaar (zie figuur 1). Toetsing m.b.v. toetsplanten duurt te lang (vele weken) en antisera zijn moeilijk specifiek te maken tegen nematoden. DNA-technieken zijn mogelijk wel betrouwbaar omdat verschillen op soortniveau besloten liggen in het erfelijk materiaal. Het meest geschikt voor detectie is het ribosomale gebied in het DNA omdat soortverschillen vaak verscholen liggen in DNA-verschillen in dit gebied. Getracht is om voor de detectie van krokusknolaaltje een specifieke toets op te zetten die geen kruisreactie zal vertonen met andere nematoden van dezelfde familie of met andere soorten. Mogelijk komen namelijk niet-ziekteverwekkende soorten zoals *A. avenae* en *A. composticola* voor, waardoor vals positieve reacties worden verkregen.



Figuur 1. Opnames van een Aphelenchoides-soort, mogelijk een krokusknolaaltje. Aphelenchoides-soorten zijn gemiddeld 0.5-1.2 mm lang; diagnostische kenmerken zijn de stilet in de 'mond'-opening (linksboven), de locatie van de maag (midden) en andere karakteristieken die (zeer) moeilijk waarneembaar zijn voor de leek.

3.2 Materiaal en methode

In 2004 zijn goed gekarakteriseerde populaties krokusknolaaltje verzameld uit narcis en krokus. Ook zijn uit lelie en *Aconitum napellus* populaties van *A. fragariae* verzameld en uit tulpen populaties van *A. ritzemabosi* (beide bladaaltjes; verwant aan krokusknolaaltje). Tot slot zijn populaties van enkele niet verwante soorten nematoden verzameld, nl. het stengelaaltje en het destructoraaltje. Om de aaltjes te verzamelen is bol-/bladmateriaal in kleine stukjes (2-3 mm) gesneden en in steriel water opgenomen. Na 30 minuten 'incubatie' bij kamertemperatuur zijn uit het supernatant aaltjes verzameld.

Van de verzamelde populaties is DNA geïsoleerd en vervolgens, m.b.v. algemene primers, het DNA-gebied waarop de verschillen op soortniveau liggen (het zgn. ITS-gebied). Van het geïsoleerde DNA is de DNA-volgorde bepaald (sequencing) en op grond van de gevonden verschillen in DNA-volgorde zijn soortspecifieke primers ontworpen voor toepassing in PCR.

In 2005 is een PCR-methode ontwikkeld en getoetst op verschillende soorten en families nematoden om mogelijke kruisreacties uit te sluiten. Tevens is de gevoeligheid van de DNA-toets onderzocht en is onderzocht of de toets ook toepasbaar is op geïsoleerde nematodenmengsels die direct afkomstig waren uit plant-/knolmateriaal.

In 2006 is de robuustheid van de ontwikkelde DNA-toetst nader uitgetest op mengsels van aaltjes die uit blad- en knolmonsters verkregen waren.

De verschillende stappen zijn de toetsontwikkeling gevolgd:

Isolatie van DNA uit aaltjes en plantmateriaal

Hiervoor zijn verschillende methoden gebruikt, ondermeer de PureGene Genome DNA kit van Gentra.

Morfologische karakterisering van krokusknol- en andere aaltjes

Deze is uitgevoerd door DiagnostiekService van PPO-BBF. Hiervoor is een lichtmicroscop gebruikt bij 40-maal vergroting. Voor analyse van kenmerken van deze aaltjes is het handboek gebruikt (Sanwal 1961).

Karakterisatie van het ribosomale gebied van het krokusknolaaltje (ITS-gebied)

Het interessante gebied (het ribosomale gebied van de Aphelenchoides- soorten *A. subtenuis*, *A. ritzemabose* en *A. fragariae*) is via PCR met algemene ribosomale primers verkregen.

Cloning en sequencing van het ITS-gebied om verschillen op te sporen in het DNA

Deze PCR-fragmenten zijn gesequenced (firma BaseClear, Leiden) en de DNA-volgordes zijn verder geanalyseerd met software (ClustalW): vergelijking van de sequenties om verschillen te vinden die gebruikt konden worden voor ontwerp van specifieke primers voor de specifieke toets op krokusknolaaltje.

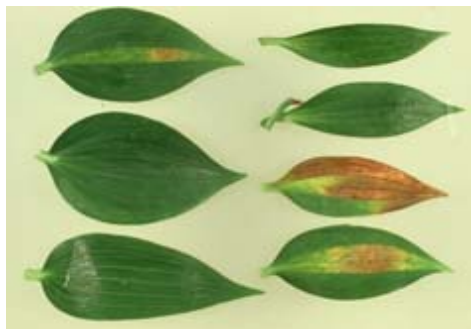
Ontwerp van primers en de PCR-toets

De primers zijn gebruikt in PCR en getest is of ze geen kruisreactie vertoonden met verwante of andere soorten nematoden. Na een PCR-reactie in een thermocycler zijn de DNA-fragmenten op een gel gebracht en zichtbaar gemaakt. Op grond van de aanwezigheid van een DNA-fragment van een bepaalde grootte werd vastgesteld of er krokusknolaaltje aanwezig was.

3.3 Resultaten

3.3.1 Isolatie DNA

Na verzameling en determinatie van krokusknolaaltjes en uit lelie en tulp, bladaaltjes (*A. fragariae* en *A. ritzemabosi*) is er DNA uit geïsoleerd uit. In eerste instantie zijn de symptomen op de plant gebruikt om de aaltjes te signaleren (zie figuur 2). Na optimalisatie (o.a. door verschillende DNA-isolatie kits te testen) werd zuiver DNA verkregen. Er was reeds een protocol ontwikkeld om DNA te isoleren uit stengelaaltjes.



Lelie



Dalia



Crocus



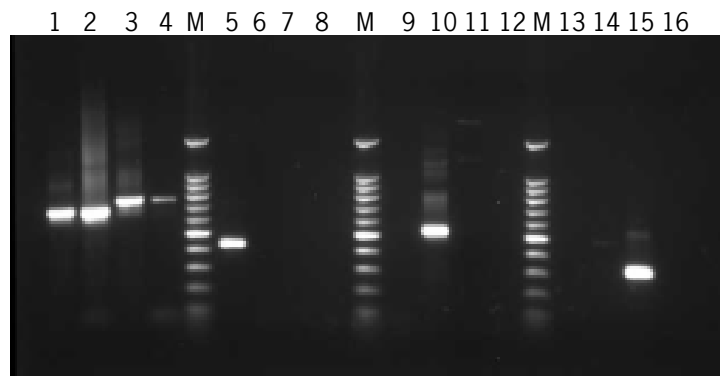
Pioen

Figuur 2. Symptomen veroorzaakt door *A. fragariae* (Lelie, Pioen) *A. ritzemabosi* (Dahlia) en *A. subtenuis* (Crocus).

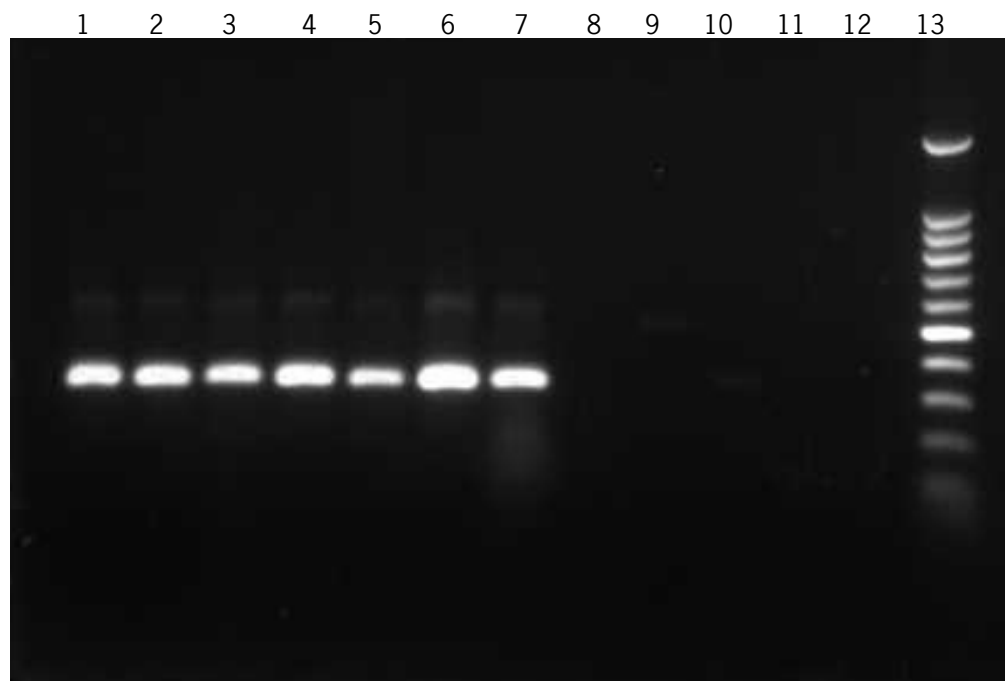
3.3.2 Ontwikkeling PCR-toets

Er zijn 2 toetsen ontwikkeld. De eerste toets herkent bijna alle Aphelenchoides-soorten doordat aan de hand van DNA-informatie uit een database (GenBank) en aan de hand van publicaties, zgn. algemene primers zijn ontwikkeld. Deze kunnen zowel krokusknolaaltjes als bladaaltjes herkennen en na PCR een DNA-fragment geven (figuur 3: kolom 1-3). Doordat dit algemene primers zijn, is kruisreactie met andere nematoden (zoals het stengelaaltje) mogelijk (figuur 3: kolom 4). In figuur 3, kolom 1-3, is te zien dat de verschillende Aphelenchoides-soorten verschillen in de ligging (grootte) van het DNA-bandje dat via PCR wordt gemaakt; dit komt doordat deze DNA-fragmenten per soort verschillen in samenstelling. Van deze verschillen is gebruik gemaakt voor de ontwikkeling van een tweede, specifieke toets.

Verkregen DNA-fragmenten zijn gesequenced en de informatie omtrent de DNA-volgorde is gebruikt om de specifieke toets op te zetten voor zowel krokusknolaaltjes als voor bladaaltjes. De primers zijn zo ontworpen dat deze alleen de genoemde soort kunnen herkennen en in de PCR-reactie een fragment geven. In figuur 3, kolom 15, is te zien dat alleen krokusknolaaltje wordt herkend, en niet de andere geteste Aphelenchoides-soorten. Ook krokusknolaaltjes-isolaten, afkomstig uit verschillende crocus-cultivars en uit *Allium*, reageren goed in de toets (zie figuur 4).



Figuur 3. DNA-fragmenten verkregen met verschillende soorten PCR. Met de algemene *Aphelenchoides*-primers Aphel For/Aphel Rev (kolom 1- 4); primers A.fra For/A.fra Rev (kolom 5- 8); primers A.rit For/A.rit Rev (kolom 9- 12) ; primers A.sub For/A.sub Rev kolom 13-16). M: 100 bp DNA ladder als referentie (Promega). Kolom 1, 5, 9, 13: *Aphelenchoides fragariae* uit lelie; kolom 2, 6, 10, 14: *Aphelenchoides ritzemabosi* uit tulp; kolom 3, 7, 11, 15: *Aphelenchoides subteruis* uit krokus; kolom 4, 8, 12, 16: *Ditylenchus dipsaci* uit narcis



Figuur 4. PCR resultaten verkregen met specifieke primers (A.Sub For/A.Sub Rev) voor krokusknolaaltjes en bladaaltjes. De witte bandjes zijn de DNA-fragmenten, uniek voor krokusknolaaltje; voor bladaaltjes is de toets negatief.

Kolom 1-5: krokusknolaaltjes-isolaten uit verschillende krokuscultivars resp. Remembrance, Ruby Giant, Flower Record, Geel, onbekend; kolom 6: krokusknolaaltjes uit *Allium*; kolom 7: krokusknolaaltjes uit narcis; kolom 8: Bladaaltjes uit lelie; kolom 9: Bladaaltjes uit *Aconitum*; kolom 10: Destructorlaaltjes uit narcis; kolom 11: Stengelaaltjes uit tulp; kolom 12: water; kolom 13: 100bp ladder (Promega)

3.3.3 Toetsing op praktijkmateriaal

Op laboratoriumniveau werkte de PCR-toets goed indien de aaltjes uit verdacht plantmateriaal waren geïsoleerd en het DNA vervolgens werd gezuiverd. Om een toets te hebben die sneller werkt is getracht de PCR-toets direct op (bol/knol)symptomen uit te voeren. Hoewel het toetsen van aaltjes die geïsoleerd zijn uit plantmateriaal beter ging, was het ook mogelijk om een positieve reactie te krijgen op verdacht bol/knolmateriaal waar direct DNA uit geïsoleerd was (geen figuur beschikbaar).

3.4 Conclusie

- Er is een goede PCR-toets op geïsoleerde krokusknolaaltjes
- Het was ook mogelijk om direct een toets uit te voeren op bol/knolmateriaal.

4 Bestrijding krokusknolaaltje d.m.v. warmwaterbehandeling

4.1 Inleiding

De bestrijding van krokusknolaaltjes in de bol d.m.v. een warmwaterbehandeling moet, zo is gebleken uit ouder LBO/PPO onderzoek, binnen 1 week na rooien worden uitgevoerd omdat deze anders niet meer effectief is. De standaard toegepaste, voorbehoedende, warmwaterbehandeling geeft geen bestrijding omdat deze te laat wordt toegepast en qua duur en/of temperatuur niet zwaar genoeg is. De warmwaterbehandeling die tegen stengelaaltjes wordt toegepast is wel goed, maar wordt over het algemeen iets later uitgevoerd (binnen 3 weken na rooien).

Gedurende 2 jaar is met leverbare bollen die afkomstig waren van een besmet partij resp. van een perceel dat besmet was met krokusknolaaltjes, onderzoek gedaan naar de bestrijding van krokusknolaaltjes via warmwaterbehandeling.

4.2 Materiaal en methode

4.2.1 Onderzoek 2004/2005

Het onderzoek is uitgevoerd met bollen (bolmaat 12/14) uit een praktijkpartij, dat besmet was met krokusknolaaltjes. Op 2 augustus 2004 zijn de bollen gerooid. Een deel van de spanen is teruggeplant op een perceel waarop het jaar ervoor krokussen geteeld waren die besmet waren met krokusknolaaltjes. Doel was hiervan meer kans op symptomen te krijgen. Gedurende het seizoen is het teruggeplante materiaal beoordeeld op de aanwezigheid van symptomen van krokusknolaaltjes. Een ander deel van de gerooide (leverbare) bollen is blootgesteld aan een aantal 'voor'-behandelingen (drogen op veld, breken, drogen bij 25°C, voorwarmte bij 30°C en voorweken in formaline) en aan een warmwaterbehandeling van 4 uur 47°C (zie tabel 1) om na te gaan of een warmwaterbehandeling mogelijk was zonder schade en/of welke voorbehandeling gegeven moet worden om de kookschade te voorkomen.

Er zijn 2 verschillende controlebehandelingen en 24 behandelingen, met variatie in droogduur op het veld, duur van de voorbehandeling en voorweken uitgevoerd. Bij de controlebehandelingen vond 'breken' en 'drogen bij 25°C' na de warmwaterbehandeling plaats, bij de andere behandelingen vóór de warmwaterbehandeling, d.w.z. na drogen op het veld. Breken is opgenomen omdat normaal na breken een langere wachttijd tot een warmwaterbehandeling nodig is ter voorkoming van schade door de warmwaterbehandeling en eventueel door de gebruikte ontsmettingsmiddelen..

Het voorweken werd in een 0,5% van een gebruikelijk desinfecterend middel uitgevoerd. De warmwaterbehandeling vond plaats in 0.5% desinfecterend middel + 0.25% captan + 0.25% Topsin M + 0.1% prochloraz. Afhankelijk van de behandeling werd de warmwaterbehandeling 7 tot 17 dagen na rooien gegeven.

Per behandeling zijn 2 herhalingen uitgevoerd.

De bollen zijn na de behandeling gedurende 6 weken bewaard bij 25°C en vervolgens tot opplanten bewaard bij 20°C. Na opplanten zijn de bollen gedurende 13-14 weken bewaard bij 5°C. Vanaf 26 januari (herhaling 1) en 4 februari (herhaling 2) zijn de bollen afgebroeid in de kas bij 16°C. Tijdens afbroei zijn het gewas en de bollen beoordeeld op symptomen van krokusknolaaltje; de bloemen zijn beoordeeld op schade door warmwaterbehandeling.

Tabel 1: De verschillende behandelingen die bollen van Tête-à-Tête vlak na roeien hebben gehad. Onderzoek 2004/2005

| | | Controle-behandelingen (2) | Experimentele behandelingen (24) |
|-----------------------------------|--------|-----------------------------------|--|
| Drogen op veld | Duur | ▪ 1 dag | ▪ 1 dag ▪ 5 dagen |
| Breken | Moment | - | ▪ na het drogen op het veld |
| Drogen bij 25°C | Duur | - | ▪ 1 dag (na breken) |
| Voorwarmte 30°C | Duur | ▪ 7 dagen | ▪ 5 dagen ▪ 7 dagen ▪ 9 dagen |
| Voorweken | Duur | ▪ Niet ▪ 4 uur + 20 uur nat | ▪ Niet ▪ 4 uur ▪ 4 uur + 20 uur nat houden ▪ 24 uur |
| Warmwaterbehandeling ¹ | | ▪ 4 uur 47°C | ▪ 4 uur 47°C |
| Breken | Moment | ▪ 1 week na ww ² | - |
| Drogen bij 25°C | Duur | ▪ 3 dagen na de ww | - |

¹ Excl. opwarmen

² ww = warmwaterbehandeling

4.2.2 Onderzoek 2005/2006

In 2005/2006 is het onderzoek herhaald. De behandelingen zijn hierbij voor een deel aangepast t.o.v. het onderzoek in 2004/2005.

Het onderzoek is uitgevoerd met leverbare bollen die afkomstig waren van een perceel, waarop in het jaar ervoor krokussen waren geteeld, die besmet waren met krokusknolaaltjes. Op 20 juli 2005 zijn de bollen gerooid. Gedurende het seizoen is het materiaal beoordeeld op de aanwezigheid van symptomen van krokusknolaaltjes. Een deel van de gerooide (leverbare) bollen is blootgesteld aan een aantal 'voor'-behandelingen (drogen op veld, breken, drogen bij 25°C, voorwarmte bij 30°C en voorweken) en aan een warmwaterbehandeling (zie tabel 2). Er zijn 2 verschillende controlebehandelingen uitgevoerd. De warmwaterbehandeling vond plaats in 0.5% desinfecterend middel + 0.25% captan + 0.25% Topsin M + 0.1% prochloraz. Afhankelijk van de behandeling werd de warmwaterbehandeling 7 tot 51 dagen na roeien gegeven.

Per behandelingen zijn 2 herhalingen uitgevoerd; alleen de controlebehandeling die niet gekookt werd, is in 4 herhalingen uitgevoerd.

Na de warmwaterbehandeling zijn de bollen bewaard bij 25°C, 1 week bewaard bij 23°C en 4½ week bij 17°C. Vervolgens zijn de bollen opgeplant en gedurende 4 weken bewaard bij 9°C en 9-10 weken bij 5°C. Vanaf 21 januari (herhaling 1) en 2 februari (herhaling 2) zijn de bollen afgebroeid in de kas bij 16°C. Tijdens afbroei is het gewas en de bollen, beoordeeld op symptomen van krokusknolaaltje; de bloemen zijn beoordeeld op schade door warmwaterbehandeling.

Tabel 2: De verschillende behandelingen die bollen van Tête-à-Tête vlak na roeien hebben gehad. Onderzoek 2005/2006

| | | Controle- Behandelingen (2) | Behandelingen (15) |
|-----------------------------------|--------|--|--|
| Drogen op veld | Duur | ▪ 5 dagen | ▪ 1 dag ▪ 5 dagen |
| Breken | Moment | ▪ na het drogen op het veld | ▪ na het drogen op het veld |
| Drogen bij 25°C | Duur | ▪ 6 weken | ▪ 1 dag ▪ 6 weken (3 beh) |
| Voorwarmte 30°C | Duur | ▪ niet | ▪ 5 dagen ▪ 7 dagen (3 beh) ▪ 9 dagen |
| Voorweken | Duur | ▪ Niet | ▪ Niet ▪ 4 uur ▪ 4 uur + 20 uur nat houden |
| Warmwaterbehandeling ¹ | | ▪ Niet ▪ 2 uur 45°C | ▪ 4 uur 47°C |

¹ Excl. opwarmen

4.3 Resultaten

4.3.1 Resultaten 2004/2005

Er werd geen enkel symptoom gevonden waarbij krokusknolaaltjes gevonden werden. Het gewas heeft geen enkele schade ondervonden van de warmwaterbehandelingen.



Foto 13. Overzicht van de behandelingen in veilstadium



Foto 14. Overzicht van de behandelingen in volle bloei



Foto 15. Geen enkele vorm van bloemschade door de vroege warmwaterbehandeling bij 4 uur 47°C.

4.3.2 Resultaten 2005/2006

Bij de niet gekookte controle behandelingen werden 4 planten (1,3%) gevonden waarin bij microscopisch onderzoek krokusknolaaltjes werden gevonden. Bij de warmwaterbehandelingen die na ca 7 weken werden gekookt werden ook enkele vergelijkbare afwijkende planten gevonden, maar daarin werden geen krokusknolaaltjes gevonden. In de vroeg gekookte behandelingen werd geen enkele plant gevonden, waarvan het vermoeden zou kunnen bestaan dat er krokusknolaaltjes in konden zitten.

Tabel 3. Het percentage door de warmwaterbehandeling beschadigde bloemen bij Tête-à-Tête, onder invloed van de voorbehandeling.

| voorbehandeling | 1 dag drogen op veld | | 5 dagen drogen op veld | | 5 dagen drogen op veld | |
|------------------|----------------------|---------|------------------------|---------|------------------------|---------|
| | breken en 1 dag 25°C | | | | | |
| | 5d 30°C | 9d 30°C | 5d 30°C | 9d 30°C | 5w 25°C + 7d 30°C | 6w 25°C |
| voorweken | | | | | | |
| niet | 20 | 1 | 4 | 0 | 0 | |
| 4 uur | 20 | 2 | 4 | 1 | 1 | |
| 4 uur/20 uur nat | 17 | 1 | 15 | 2 | 0 | |
| controle geen ww | | | | | | 0 |
| ww 2 uur 45°C | | | | | | 0 |

In tegenstelling tot 2004/2005 werd nu wel bloemschade door de warmwaterbehandeling gezien. De schade was het grootst na de snelst na het rooien (7 dagen) toegepaste warmwaterbehandeling. De warmwaterbehandeling na 9 dagen 30°C leidde tot minder bloemschade dan na een voorbehandeling van 5 dagen. De behandeling 5 dagen veld +1 dag 25°C + 5 dagen 30°C en het 4 uur voorweken gevolgd door 20 uur nat houden heeft ook veel bloemschade gegeven. De reden kan zijn dat een deel van het effect van de voortemperatuur teniet is gedaan door de periode voorweken bij een lagere temperatuur.



Foto 16. Kookschade in de bloemen na een warmwaterbehandeling met slechts 5 dagen 30°C.

4.4 Conclusie

- Door krokusknolaaltjes aangetaste planten (1,3%) werden alleen gevonden in de afbroei indien de bollen op besmette grond waren geteeld en niet waren gekookt vooraf aan de afbroei.
- De herkenbaarheid van de aantasting aan de hand van gewassymptomen was niet duidelijk.
- Schade aan de bloemen in de broei werd in 2005 niet, maar in 2006 wel aangetroffen. Daarbij bleek in 2006 in tegenstelling tot in 2005, een voortemperatuur van 5 dagen 30°C te kort te zijn geweest in vergelijking met 9 dagen 30°C.

5 Discussie

5.1 Symptomen en bestrijding

Er werden op de betreffende bedrijven noch in het gewas noch in de schuur symptomen gevonden. Ook in de afbroei het daar opvolgende jaar was dit het geval.

Dat er in 2004 geen symptomen op de bedrijven zijn gevonden kan een gevolg zijn geweest van de in 2003 uitgevoerde warmwaterbehandelingen en aanvullende maatregelen op de bedrijven in 2004 en 2005. Ook kan het zijn dat de gevonden aantasting in de broei slechts van een klein deel van de partij afkomstig was. Een van de bedrijven teelt veel Tête-à-Tête op verschillende percelen en het was niet geheel duidelijk van welk perceel de bollen kwamen met aantasting in de broei. In 2004 hebben de bedrijven een vroege zware warmwaterbehandeling uitgevoerd, mede naar aanleiding van de uitvoerige besprekingen in voorjaar 2004. Ook in de afgebroeide monsters (voorjaar 2005) en in het op besmette grond geplante materiaal van Tête-à-Tête werd in het gewas te velde in het voorjaar van 2005 geen aantasting gevonden. Bovendien werd in de proef in 2005/6 alleen een zeer beperkte aantasting in de niet gekookte bollen werd gevonden. Deze resultaten gaven aan dat de kans op aantasting na een warmwaterbehandeling gering is. Deze resultaten gaven aan dat Tête-à-Tête geen cultivar is die snel en massaal wordt aangetast. Er zijn blijkbaar specifieke omstandigheden bijvoorbeeld van een zeer hoge besmettingsdruk dat er wel een aantasting optreedt. Deze situatie kan het geval zijn bijvoorbeeld door het vele opslag van krokus dat soms tussen Tête-à-Tête kan worden aangetroffen. Soms is dit duidelijk aanwezig als opslag van vorig jaar en soms lijkt het zelfs met de narcissen weer gerooid en meegeplant te zijn, omdat het keurig in de regel terug te vinden is. Een goede opslagbestrijding en goede selectie in de schuur voor planten zijn hierbij van belang.

Door het ontbreken van voldoende ziek materiaal en duidelijke gewas- en bolsymptomen is het lastig gebleken om een duidelijke symptoombeschrijving te geven en is selectie dus niet mogelijk.

Het probleem van krokusknolaaltjes bij Tête-à-Tête lijkt gezien de resultaten van dit onderzoek waarschijnlijk wel mee te vallen.

5.2 Toetsontwikkeling

De ontwikkeling van een toets op krokusknolaaltje was gewenst opdat de tijdrovende microscopische analyse in de toekomst (meestal) achterwege kan blijven. Momenteel wordt bij de DiagnostiekService van PPO deze techniek al gebruikt. Door de verkregen informatie is het nu ook mogelijk op bladaaltjes te toetsen.

Ook internationaal gezien was een moleculaire toets op de verschillende soorten Aphelenchoides gewenst. Er is internationaal wel eens onenigheid over Aphelenchoides (schimmeletende soorten die als *A. fragariae* worden gedetermineerd), met als gevolg afkeuring van partijen planten. Er komen nog meer soorten voor die verondersteld worden niet schadelijk te zijn, zoals *A. composticola*. Wanneer deze per abuis voor een krokusknolaaltje worden aangezien, kan dit een vals-positieve uitslag tot gevolg hebben. Een Aphelenchoides-soort die wel schadelijk is, maar nog niet gevonden is in de bolgewassen, is *A. besseyi*. Er is niet onderzocht of deze kruisreageert met de specifieke primers van het krokusknolaaltje.

Het is een voordeel dat nu veel sneller op ruw plantmateriaal (versneden bol/knolsymptomen), na een totale DNA-isolatie een test uitgevoerd kan worden. Ondanks het feit dat er dan ook DNA van de plant bij zit, is er, door de specificiteit van de toets, toch een goede uitslag te verwachten.

6 Communicatie

Artikelen:

Peter Vink: Aaltjes verstoren groei potnarcis Tête-à-Tête, BloembollenVisie 31, 4 maart 2004, p 22

Peter Vreeburg en Peter Vink: Krokusknolaaltjes in narcis Tête-à-Tête, BloembollenVisie 38, 10 juni 2004, p. 22 en 23

Khanh Pham, Peter Vink en Peter Vreeburg DNA-toetsen maken snelle toetsen op blad- en krokusknolaaltjes mogelijk, BloembollenVisie 85, 30 maart 2006 p 20 en 21.

Khanh Pham, Peter Vink, Trees Hollinger, Peter Vreeburg en Joop van Doorn: Rapid molecular identification of *Aphelenchoides fragariae*, *A. ritzemabosi* and *A. subtenuis* infecting bulbous ornamentals in the Netherlands; XXVIII Symposium van de "European Society of Nematologistst", 5-9 juni in Blagoevgrad, Bulgarije.

Toelichting

Open dagen PPO broei februari 2005 en 2006: toelichting bij de afbroei van de kookproeven

Open dagen PPO veld mei 2005 en 2006: informatie over krokusknolaaltjes

Resultaten en informatie zijn meegenomen bij div lezingen over (stengel)aaltjes.

Bijlage 1

Literatuur

Ontwikkeling DNA-toets voor identificatie krokusknolaal

1. S. K. Ibrahim, R. N. Perry, P. R. Burrows, D. J. Hoop. 1994. Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of Nematology* 26(4): 412-421.
2. M. Mor, Y. Spiegel. 1993. Infection of Narcissus roots by *Aphelenchoides subtenuis*. *Journal of Nematology* 25(3): 476-479.
3. M. Marek, M. Zouhar, P. Rysanek, P. Havranek. 2005. Analysis of ITS sequences of nuclear rDNA and development of a PCR-based assay for the rapid identification of stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in plant tissues. *Helminthologia* 42(2): 49-56.
4. N. Vovlas, A. Minuto, A. Garibaldi, A. Troccoli, and F. Lamberti 2005. Identification and histopathology of the foliar nematode *Aphelenchoides ritzemabosi* (Nematoda: Aphelenchoidae) on basil in Italy. *Nematology* 7: 301-308.
5. K. C. Sanwal 1961. A key to species of the nematode genus *Aphelenchoides* Fischer, 1894. *Can J Zoology* 39: 143-148