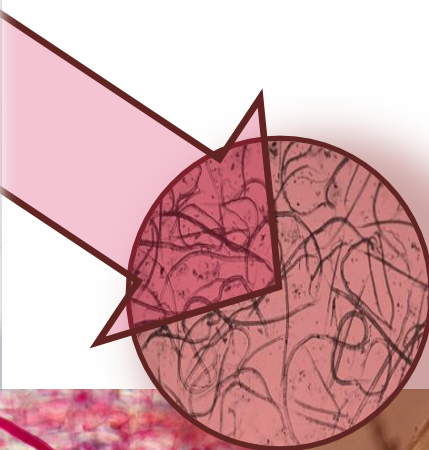


# Bemonstering *Ditylenchus dipsaci* in uien

- Protocol om snel en effectief aaltjes te detecteren in uien -



# Bemonstering *Ditylenchus dipsaci* in uien

Protocol om snel en effectief aaltjes te detecteren in uien

Ontwikkeld voor sorteer- & pakstations en exporteurs  
om het risico op *D. Dipsaci* in uien te verkleinen



**Stichting Afzetbevordering Ui**

**2010**

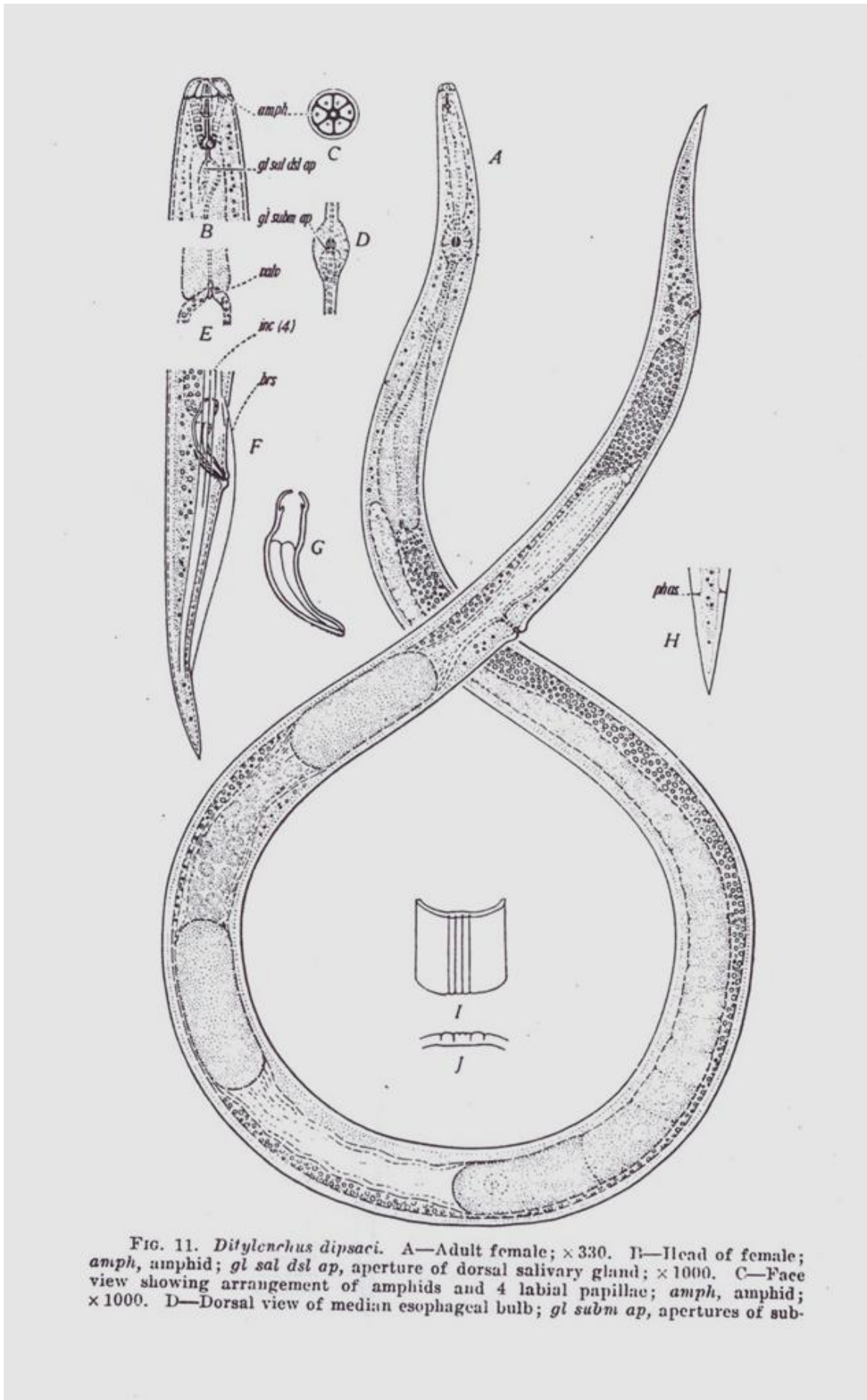
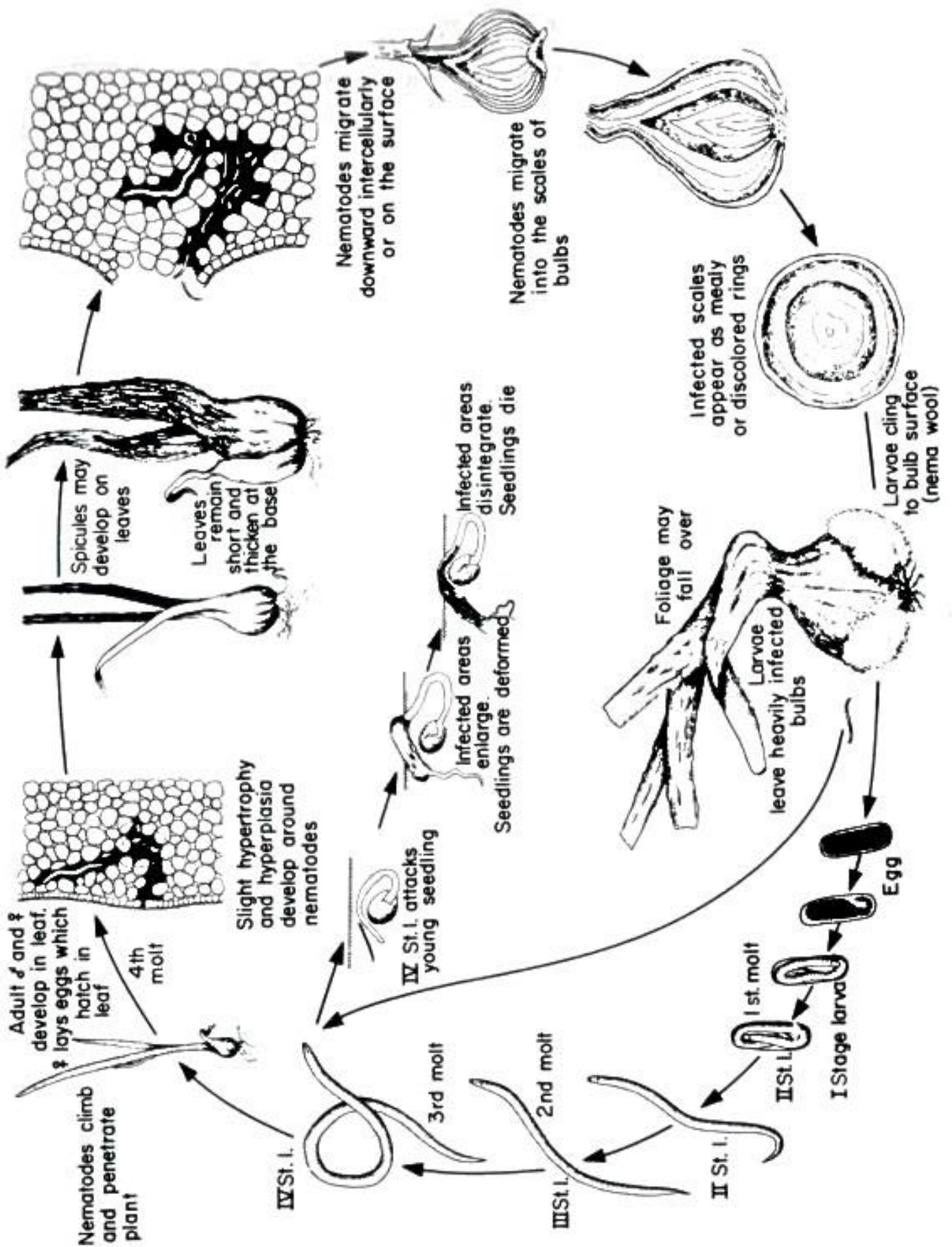


FIG. 11. *Ditylenchus dipsaci*. A—Adult female; × 330. B—Head of female; *amph*, amphid; *gl sal dsl ap*, aperture of dorsal salivary gland; × 1000. C—Face view showing arrangement of amphids and 4 labial papillae; *amph*, amphid; × 1000. D—Dorsal view of median esophageal bulb; *gl subm ap*, apertures of sub-

Figuur: *Ditylenchus dipsaci*, het stengelaaltje dat een risico vormt voor veel bestemmingen van de Nederlandse ui (Bron: [www.nematode.unl.edu](http://www.nematode.unl.edu))

Figuur: levenscyclus met de verschillende stadia, van het stengelaaltje (*D. dipsaci*) in uien (Bron: www.sardi.sa.gov.au)



## 1. Inleiding

Dit rapport is verschenen naar aanleiding van steeds frequenter voorkomende problemen met stengelaaltjes in uien. Enerzijds lijkt het probleem in het veld toe te nemen, maar bovenal stellen steeds meer landen specifieke eisen voor *Ditylenchus dipsaci*. Een aantal bestemmingen waar veel Nederlandse uien naar toe gaan kent zelfs een zogenaamde nul-tolerantie. Bovendien zouden landen die nu een te streng aaltjesbeleid voeren overtuigd kunnen worden door de zeer professionele aanpak van de Nederlandse uienketen. Immers, door de keten heen zijn er steeds momenten waarop gecontroleerd wordt op *D. dipsaci*.

Door de focus hierop te richten heeft Nederland een interessante marketingtool in handen. Immers, niet alleen het product, maar ook het ketenproces dient centraal te staan. Kwaliteit is breder dan alleen een harde, blanke ui. Nederland heeft dan ook qua kwaliteitsaspecten veel meer in huis dan alleen een mooi product.

Dit rapport gaat in op een eenvoudige methode waarmee individuele bedrijven snel en doelmatig partijen kunnen controleren op de aanwezigheid van aaltjes. Duidelijk moet zijn dat deze controles de officiële bemonsteringen en analyses niet kunnen vervangen, maar het risico dat een besmette partij wordt ingepakt en achteraf afgekeurd wel enorm verkleinen. Immers, de nieuwe bemonsteringsmethodiek is gericht op keuring van gereedstaand product. Het is dus zaak om het risico van besmetting zo klein mogelijk te maken.

Dit rapport is – naast deze inleiding – ingedeeld in vier hoofdstukken. In hoofdstuk 2 wordt kort en overzichtelijk ingegaan op het stengelaaltje zelf, wat betreft biologie, economische schade en preventie. Hoofdstuk 3 beschrijft de methode om monsters samen te stellen en deze vakkundig te onderzoeken met behulp van de microscoop die bedrijven besteld hebben via de SAU. Het laatste hoofdstuk gaat in op specifieke instellingen van de microscoop en specifieke instellingen voor het bestuderen van aaltjes. De eerste pagina's van dit rapport geven schematische overzichten van het organisme en haar levenscyclus, verderop verduidelijken foto's en figuren de begeleidende tekst.

## 2. *Ditylenchus dipsaci*

### (Wetenschappelijke) naam organisme

Wetenschappelijke naam: *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn),

Synoniemen: *Tylenchus dipsaci*  
*Ditylenchus phloxidis*  
*Ditylenchus fragariae*

Gebruikelijke namen: Stem nematode, stem and bulb eelworm, onion bloat, Nématode des tiges, Stengelälchen



### Geografische verspreiding

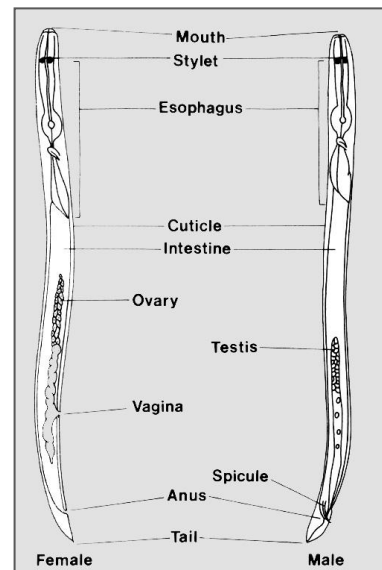
*D. dipsaci* komt vooral voor in de regio's met een gematigd klimaat. (Europa, Middellandse Zeegebied, Noord en Zuid Amerika, Noord en Zuid Afrika, Azië en Oceanië) en blijkt zich niet te kunnen handhaven in tropische regio's. *D. dipsaci* komt verspreid ook voor in Nederland. Er is geen data centraal beschikbaar waaruit afgeleid zou kunnen worden of er in Nederland teeltgebieden voorkomen waar besmetting significant hoger of juist lager is.

### Biologische karakteristieken

*D. dipsaci* is een slanke, transparante worm. Volwassen exemplaren zijn ongeveer 1,0 – 1,3 mm lang met een matig ontwikkeld hoofdskelet en een zeer kort stilet van ongeveer 10-12µm lang met afzonderlijke "basal knobs". De nematode wordt verder gekenmerkt door laterale strepen over het lichaam met vier insnijdingen en een scherpe staartvorm.

*D. dipsaci* is een endoparasiet die migreert vanuit de bodem in de ui zelf en voedt zich daar op parenchym celweefsel. Daardoor worden de midenlamellen afgebroken, waardoor de plant vervormd wordt (stengel, bladeren and bloemen), wat uiteindelijk leidt tot necrose, een rottende stengelaanzet en uiteindelijk tot gehele verrotting van de bol.

De levenscyclus van het organisme duurt bij een temperatuur van 15°C, ongeveer 20 dagen. Vrouwelijke aaltjes leggen tussen de 200 en 500 eitjes. Tijdens het vierde levensstadium kunnen de juveniele organismen (J4) samenklonteren en een zogenaamde "kluwen" vormen die jarenlang kan overleven in de bodem. De organismen kunnen ook overgedragen worden via het zaad. Met name in kleigrond kunnen de organismen jarenlang overleven. Koele vochtige condities bevorderen de infectie van jonge planten, door deze plantparasitaire nematode.

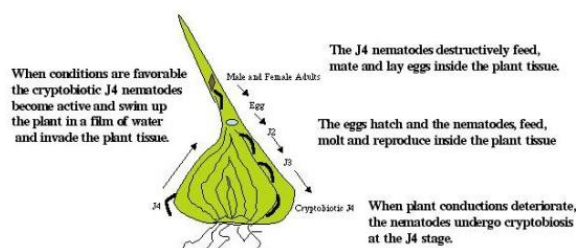


### Symptomen

*D. dipsaci* veroorzaakt aan de bol en de bladaanzet van de uienplant vervorming en zwellingen. De bladeren vertonen chlorose (vergeling) en zien er verwelkt uit. Delen van de plant sterven volledig af, de bolstoel scheurt open en vertoont een donkerder, krukachtige onderkant (necrose).

Jonge planten kunnen volledig afsterven bij een hoge infectiegraad. De binnenste rokken zijn over het algemeen zwaarder aangetast dan de buitenste (vleesachtige) rokken. Gedurende verloop van het seizoen worden de uienbollen zachter, scheuren

### Stem and Bulb Nematodes



verder open en verspreiden een penetrante geur, die gedurende eventuele bewaring de aanwezigheid van *D. dipsaci* verraadt. Bruinverkleuring, kurkvorming en sterke vergroeiingen zijn uiteindelijk het gevolg, waarbij de bol volledig geïnfecteerd is met duizenden aaltjes en kwalitatief volledig afgeschreven is.

### Infectieperiode en omstandigheden

De nematoden infecteren de jonge uienplantjes gedurende de groeiperiode op het veld. De meeste aantastingen vinden reeds plaats gedurende het voorjaar, waarna symptomen zich later in het seizoen steeds sterker manifesteren. *D. dipsaci* ontwikkelt zich het snelst bij een temperatuur tussen de 15 en 20°C en kan de plant ook binnendringen via huidmondjes (stomata).

Het grootste risico voor infectie is gedurende natte weersomstandigheden en gematigde temperaturen. Daarentegen blijken temperaturen beneden de 10°C en boven de 22°C een remmend effect te hebben op infectie, evenals droge weersomstandigheden wanneer geen vrij water in de grond aanwezig is wat de nematoden nodig hebben om zich te kunnen bewegen.

In gematigde klimatologische regio's neemt de dichtheid van de nematodenpopulatie vaak toe tijdens de herfst, om in de winter weer drastisch te dalen. Een hoge populatiedichtheid van meer dan 1 nematoden per ml grond kan een jong gewas compleet vernietigen.

### Economische impact

*D. dipsaci* is een van de meest gevreesde plantparasitaire nematoden. Vooral in regio's met een gematigd klimaat kan het organisme aanzienlijke schade aanrichten. Zonder goede monitoring, preventieve maatregelen en gezond uitgangsmateriaal kan de oogst volledig verloren gaan. Een perceel dat eenmaal besmet is, blijkt decennialang ongeschikt voor uienteelt. Weliswaar worden proeven uitgevoerd met biologische ontsmettingsmethoden, maar momenteel die zijn technisch en economisch nog niet afdoende en uit praktisch oogpunt veelal nog niet toepasbaar.

Schaalvergroting, onderlinge verhuur van percelen verhoogt het besmettingsrisico, doordat machines waaraan besmette grond zit de nematode van het ene naar het andere perceel kunnen overbrengen.

### Voorkomen en monitoren

Bodemanalyse is een goede methode om vooraf te weten of een perceel besmet is met *D. dipsaci*. In Nederland zijn verschillende laboratoria die geaccrediteerd zijn voor goede, snelle en relatief goedkope analysemethoden. Een toenemend aantal telers neemt reeds grondmonsters om risico's op besmette grond te verkleinen. Door de persistentie van het organisme, de brede waardplantenreeks, teeltintensivering, schaalvergroting en gebruik van huurpercelen neemt het risico op besmetting toe. Voor een relatief dure teelt zoals uien, is het aan te bevelen altijd een grondanalyse te laten uitvoeren, om onverwachte narigheid te voorkomen en financieel risico te beperken.

De verkregen analysegegevens blijven momenteel nog veelal bij de individuele telers, maar zouden via centralisatie een beeld kunnen geven over eventuele spreiding in risicogebieden. Dergelijke informatie kan mogelijk een aanzet zijn om te komen tot het aanwijzen van een zogenaamde "pest-free area". Mocht dit niet het geval zijn, dan zou de informatie wellicht gebruikt kunnen worden om op perceelsniveau aan te tonen dan de uien op een onbesmet perceel geteeld zijn. Bij voldoende waarborging zou dat kunnen betekenen dat voor dergelijke partijen uien bredere afzetmogelijkheden zijn, wat een gunstig effect heeft op de waarde van een dergelijke partij.

Voordat uienzaad in de commerciële verpakking verdwijnt is het reeds zes maal uitvoerig getest op *D. dipsaci*. Dat geeft aan dat ook zaadbedrijven het voorkomen van contaminatie via zaad enorm belangrijk vinden. Doordat iedere zaaizaadverpakking bovendien een uniek lotnummer draagt, is tracing door de keten mogelijk.

Gedurende het groeiseizoen is doorlopende monitoring van belang. Zeker wanneer de weersomstandigheden gunstig zijn voor ontwikkeling van het pathogeen. De bemonsteringsmethode die in dit rapport beschreven wordt, kan ook gebruikt worden om snel en effectief uitsluitel geven of een gewas inderdaad besmet is met stengelaaltjes. Indien dat het geval is, kunnen tijdig maatregelen genomen worden, zoals het vernietigen van een deel van het gewas of de keuze om een partij die op een besmet veld geteeld is niet te bewaren, maar zo snel mogelijk te verwerken. Door aan de afnemer aan te geven dat een partij mogelijk besmet is kan gezocht worden naar de best beschikbare bestemming. Immers, voor een toenemend aantal bestemmingen geldt een absolute nultolerantie voor *D. dipsaci*.

## Controle

Zoals aangegeven vormt uienzaad een potentiële besmettingsbron. Schoon en gecertificeerd uitgangsmateriaal is daarom een eerste vereiste, naast de verzekering dat uien op schone grond geteeld gaan worden. Het feit dat een perceel jarenlang “uienvrij” geweest is vormt voor *D. dipsaci* geen enkele garantie. Immers, de waardplantenreeks is heel breed, waarbij sommige planten wel vermeerderingsgewassen zijn, maar tolerant kunnen zijn waardoor geen symptomen waargenomen kunnen worden, terwijl de nematode zich wel degelijk vermeerdert.

Optimale bedrijfshygiëne is een steeds belangrijker item. Toenemende schaalvergroting waarbij machines op veel verschillende percelen worden ingezet, uitwisseling of gezamenlijk gebruik van materieel en wisselend gebruik van huurpercelen verhoogt het risico op besmetting van grond. Immers, besmetting via geïnfecteerde grond is één van de belangrijkste veroorzakers van verspreiding van *D. dipsaci*.

De nematode op zich verspreidt zich maximaal enkele meters per jaar in een perceel. Dat is fundamenteel anders dan bij insecten die soms lange vluchtafstanden bestrijken of plantpathogene schimmels waarvan sporen enkele kilometers verderop in een gewas terecht kunnen komen.

Daarnaast is een goede onkruidbestrijding van belang, omdat de nematode een zeer brede waardplantenreeks kent, waaronder ook een aantal onkruiden. Zonder dat specifiek uien geteeld worden, kan een besmetting dus aanzienlijk uitbreiden.

Chemische bestrijding is gezien milieutechnische en economische aspecten niet haalbaar. Bovendien zijn in Nederland geen chemische middelen op de markt die *D. dipsaci* effectief kunnen bestrijden. De focus blijft liggen op preventie en monitoring.

## Risicomanagement

Risicomanagement wil zeggen dat de risico's in kaart worden gebracht en via een actieplan zoveel mogelijk geëlimineerd worden, met afdoende borging. Gezond uitgangsmateriaal en een ziektevrije bodem zijn de eerste vereisten. Daarnaast zijn monitoring tijdens het groeiseizoen en strikte bedrijfshygiëne de enige maatregelen die genomen kunnen worden uitbreiding van het pathogeen te voorkomen.

Centralisatie van data over besmette percelen zou een goede aanzet kunnen zijn om te komen tot invulling van het begrip “pest free area”. Vele Nederlandse percelen zijn de achterliggende jaren door individuele telers bemonsterd op onder andere *D. dipsaci*. De resultaten blijven echter bij de teler en zijn dan ook nooit gezamenlijk geanalyseerd. Daarnaast zijn er honderden testresultaten van fyto-sanitaire inspecties bekend (KCB), die via tracking&tracing terug te voeren moeten zijn tot individuele percelen. Tezamen vertegenwoordigen al deze analyses een schat aan informatie, waar nooit iets mee gedaan is. Dat is jammer en zeker gezien de kosten die hiermee reeds gemaakt zijn, is het wellicht zinvol deze informatie verder uit te nutten om de exportpositie van Nederland verder te versterken.

Door de gegevens te centraliseren en grondig te analyseren zouden misschien een aantal bestemmingen geopend kunnen worden om uien te exporteren. Wanneer blijkt dat een “pest free area” niet realiseerbaar is, valt te overwegen of het begrip te verengen is naar “pest free production field”. Omdat het pathogeen *D. dipsaci*, zoals eerder aangegeven zich nauwelijks verspreidt kan dit een goede oplossing te zijn om aan de zogenaamde nultolerantie te kunnen voldoen. Zeker in combinatie met een interne bedrijfsscreening op het pathogeen zoals in dit rapport omschreven, al dan niet aangevuld met een fyto-sanitaire inspectie door een van overheidswege bevoegde autoriteit.

De interne screening, zoals in dit rapport omschreven zou, bij voldoende borging wellicht ook opgenomen kunnen worden als integraal onderdeel binnen het Reglement Interne Kwaliteitscontrole (RIK). Hoewel fyto-sanitaire zaken over het algemeen wel veel zwaarder wegen dan kwaliteitsaspecten als sortering, algemeen rot, beschadigingen en schot zoals die in de Europese kwaliteitsvoorschriften omschreven zijn en nader gespecificeerd in interpretatiedocumentatie. Desalniettemin is het zeker de moeite waard om dergelijke zaken verder te onderzoeken, indien blijkt dat de in dit rapport omschreven methode goed werkt en ook geborgd kan worden. Daarmee kunnen niet alleen kosten bespaard worden, maar het komt ook de efficiency ten goede.

Wanneer de uien eenmaal zijn geoogst kan selectieve bemonstering het risico verder verkleinen. Dit rapport gaat primair op dit onderdeel in. Door verdachte uienbollen als bedrijf zelf aan een snelle test te onderwerpen, wordt het risico dat een besmette partij wordt ingepakt voor een “aaltjesbestemming” sterk verkleind.

Tenslotte vinden keuringen plaats door het KCB, die als bevoegde instantie is aangewezen. Momenteel wordt gereedstaand product bemonsterd en verzegeld met een tie-wrap.



## 3. Bemonstering en screening

### 3.1 Monstername

1. Monstername gebeurt selectief door uien uit de te verpakken partij te nemen met een bruinverkleuring, wortelloze, krukachtige of vergroeide bolstoel.
2. Eventueel aanwezige grond wordt zorgvuldig verwijderd en de uien worden schoongespoeld met handwarm kraanwater.
3. De uien worden met een schoon mes ontdaan van bolstoel (onderkant ui en wortelkrans) en bladaanzet (net onder het staartje). In deze delen van de ui is de kans op het aantreffen van stengelaaftjes het grootst.
4. Deze delen van de ui worden op een schone ondergrond in fijne plakjes gesneden van 1-3 mm dik. Het is verstandig om uit een te verpakken partij uien één of meerdere deelmonsters samen te stellen van elk 2 – 4 uien.
5. De plakjes worden overgebracht in een schoon petrischaaltje, waarbij ongeveer een derde tot de helft van de bodem bedekt wordt (petrischaaltje van te voren leeg onder de microscoop leggen om te overtuigen dat het schoon is). Wanneer meerdere deelmonsters van *verschillende* partijen onderzocht worden is het zaak schoon en secuur te werken, zodat de kans op onderlinge besmetting van monsters minimaal is.
6. Er wordt met een schoon pipet handwarm water in het petrischaaltje gebracht (niet meer dan 1-5 mm water, waarbij de plakjes net onder het wateroppervlak liggen). Gebruik hiervoor altijd dezelfde schone pipet, om contaminatie zoveel mogelijk te voorkomen
7. De dunne plakjes ui worden met een schoon mes een paar maal aangedrukt en heen en weer geschoven, zodat de aanwezige aaltjes gestimuleerd worden om vanuit het plantenweefsel in het water terecht te komen.
8. Het geheel blijft 20-30 minuten staan bij kamertemperatuur, zodat de eventueel aanwezige aaltjes uit het weefsel kunnen komen.
9. Het petrischaaltje met uienplakjes wordt voorzichtig onder de microscoop gebracht (juiste instellingen en belichting).
10. Indien gewenst kan voorzichtig een klein beetje water van de bodem worden afgezogen met een pipet, en vervolgens overgebracht in het midden van een horlogeglas. Zo concentreren eventueel aanwezige nematoden zich in het laagste gedeelte van het horlogeglas en kunnen gedetermineerd <sup>\*)</sup> worden

<sup>\*)</sup> Indien er aaltjes in het monster aanwezig zijn is dat de zien als kleine “worpjes” die zich voortbewegen met een krachtige slag. Specifieke kenmerken voor *D. dipsaci*, zijn de transparantie van het lichaam, de lengte (1 - 1,3mm), zeer kort stilet met duidelijke knobbels, puntige staart en een vulvapositie die op 80% van de lengte ligt (vanaf de kop gerekend). Zie ook tekeningen en foto's in dit rapport  
Op zich is een precieze determinatie minder van belang omdat in de uien sowieso geen aaltjes mogen zitten. Een selectief monster, schoon werken, goed afspoelen van grondresten en het geheel even rustig laten staan zijn daarom meer van belang voor de betrouwbaarheid.

## 4. Microscopinstellingen

### 4.1 Algemeen Stereomicroscop:

- 2 paar oculairen (10x en 20x), twee objectieven (2x en 4x)
- Mogelijke vergrotingen: 20x, 40x en 80x
- Metalen statief met twee tubussen
- Grof focussysteem
- LED-verlichting (netadapter en batterijen meegeleverd<sup>\*)</sup>)
- Twee lampjes, voor belichting “op” en/of “door” het object
- Dimmer voor verlichting aan de zijkant van de objecttafel

<sup>\*)</sup> Doordat oplaadbare batterijen meegeleverd zijn en de verlichting (LED) zeer weinig stroom verbruikt is het mogelijk om in het veld ook direct monsters te bekijken om uitsluitsel te krijgen over onduidelijkheden/vragen. Dat geldt natuurlijk niet alleen voor aaltjes, maar ook voor andere ziekten en plagen zoals schimmels (bijv. witrot, fusarium, etc.) of insecten (bijv. larven van de uienvlieg, trips, etc).

### 4.2 Instellingen voor aaltjesdetectie

- Plaats het petrischaaltje voorzichtig op de objecttafel.
- Laat het even rusten, waardoor de meeste aaltjes naar de bodem zullen zakken.
- Zorg dat tussen de plakjes uien voldoende vrij water aanwezig is, waarin de aaltjes zichtbaar “zwemmen”.
- Begin bij de kleinste vergroting (oculairen 10x en objectief 2x).
- Stel de tubussen in op de juiste (oog)wijdte.
- Knijp het linkeroog dicht en stel scherp met de focusknop.
- Knijp het rechteroog dicht en stel scherp door aan de oculair te draaien.
- Nu zijn eventuele verschillen tussen de ogen gecompenseerd.
- Zet de verlichting op de juiste stand, zodat beide lampjes branden.
- Speel met de belichting tot de gewenste sterkte is verkregen.
- Schuif het petrischaaltje rustig heen en weer, zodat het water in beeld komt. In de uienplakjes zelf zijn aaltjes veel moeilijker waar te nemen.
- Zoek zachtjes door de waterdiepte naar het niveau waar de aaltjes zwemmen, door rustig aan de focusknop te draaien (Meestal bevinden de aaltjes zich op de bodem).
- Wanneer een aaltje gezien wordt, kan het objectief 4x voor worden gedraaid, zodat een vergroting van 40x verkregen wordt
- Kijk naar de karakteristieke kenmerken van het aaltje of het *D. dipsaci* betreft. Eventueel kunnen oculairen verwisseld worden, zodat een vergroting van 80x verkregen wordt om meer details waar te nemen. In dit rapport zijn duidelijke overzichtstekeningen opgenomen, waarin de specifieke lichaamskenmerken van het organisme beschreven worden.
- Voor een nauwkeuriger determinatie kan voorzichtig een beetje water met aaltjes afgezogen worden en in een horlogeglas overgebracht worden. Weefseldeeltjes van de plant belemmeren soms het zicht en ook stroming in het water en simpelweg meer zwemruimte voor de aaltjes, maken het kijken in een petrischaal iets lastiger dan op een horlogeglas.
- Wanneer een ui besmet is zwermen meestal tientallen tot honderden aaltjes door het petrischaaltje.
- Wanneer geen aaltjes gedetecteerd worden is het verstandig het petrischaaltje nog een uur te laten staan en daarna opnieuw te bekijken.
- Wanneer blijkt dat er in de selectief genomen monsters (verdachte uien) geen aaltjes aanwezig zijn, is het risico dat in de rest van partij aaltjes aanwezig zijn aanzienlijk kleiner geworden.
- Deze zelfstandige test geeft natuurlijk nooit 100% zekerheid, maar dat is inherent aan monsternamen. Voor 100% zekerheid zou elke ui bekeken moeten worden en dan blijft er weinig over wat uiteindelijk ingepakt kan worden. Daarom is selectieve monsternamen van verdachte uien wel erg belangrijk.
- Deze test kan ook de uiteindelijke keuring van gereedstaand product door het KCB niet vervangen of gezien worden als officieel erkende laboratoriumtest, maar vormt wel een belangrijke indicatie die snel en goedkoop zelfstandig uitgevoerd kan worden door de bedrijven.

## **RUIMTE VOOR AANTEKENINGEN:**