

gekort CcSNPV. Dit houdt in dat er één nucleocapside in een virusdeeltje zit, dit in tegenstelling tot het virus in Spod-X<sup>R</sup>, waar meerdere nucleocapsiden in een envelop zitten. Analyse van het DNA via DNA 'finger printing' (restrictie-enzymanalyse) gaf aan dat het hier om een nog niet eerder aangetoond baculovirus ging. Verdere analyse van het DNA liet zien dat het virus nauw verwant is aan een baculovirus van *Trichoplusia ni*. Rupsen van dit insect bleken ook vatbaar voor dit virus; rupsen van *S. exigua* overigens niet.

Het virale DNA is vervolgens in zijn geheel gesequenced en heeft een lengte van 149.622 basenparen. Annotatie van de CcSNPV genoomsequentie voorspelt 151 genen, waarvan er 24 uniek zijn voor CcSNPV en de resterende in een of meer andere baculovirussen voorkomen. Twee van de unieke genen zijn homoloog aan klasse II DNA fotolyases. Deze enzymen zijn betrokken bij het herstel van UV-schade in DNA door de cyclobutaan-pyrimidine-dimeren (CPDs), die ontstaan als gevolg van UV straling, met behulp van zichtbaar licht weer te ontvlechten tot twee aparte pyrimidines (thymidines). Dit proces staat bekend als fotoreactivering.

De centrale vraag is nu waarom dit baculovirus deze fotolyase genen heeft en in hoeverre deze de biologische activiteit van dit baculovirus beïnvloeden. Baculovirussen staan in de natuur bloot aan UV en worden hierdoor snel geïnactiveerd. Als gevolg van een baculovirusinfectie trekken rupsen vaak naar de top van het gewas, waardoor de kans op UV schade groot is. UV-gevoeligheid is een van de grootste problemen bij het gebruik van deze virussen in de praktijk (open veld) en wordt vaak opgelost door UV-beschermingsmiddelen aan preparaten toe te voegen. Naast chemische vervuiling draagt dit ook bij tot extra kosten bij een bespuiting. Om de vraag naar de rol van deze fotolyases in CcSNPV te kunnen beantwoorden is verder onderzoek nodig, bijvoorbeeld door deletie-mutanten van het virus te maken en het effect van deze deleties op de biologische activiteit te bepalen. Onze huidige hypothese is dat het bezit van deze DNA fotolyase-genen CcSNPV resistenter maakt tegen UV-licht en dat dit CcSNPV een groot ecologisch voordeel.

## **Aaltjesbeheersing met natuurlijke middelen; resultaten 2002-2005**

*F.C. Zoon, L.M. Poleij, A. de Heij,  
C. Hok-A-Hin, F. Araniti en C.J. Kok*

*Plant Research International, Postbus 16,  
6700 AA Wageningen, E-mail: frans.zoon@wur.nl*

Om de infectie van wortels door plantparasitaire aaltjes milieuvriendelijk te verminderen is gezocht naar natuurlijke stoffen en extracten die effect hebben op de activiteit of de oriëntatie van nematoden. Eerst zijn de stoffen getest in verschillende concentraties in een in vitro toxiciteitstest, waardoor een schatting van de effectieve dosis mogelijk was. Vervolgens zijn sommige natuurlijke middelen getest op dodende of afwerende effecten in grond en op fytotoxiciteit.

Ruim 100 stoffen en extracten werden getest in de in vitro toxiciteitstest voornamelijk met de aaltjessoorten *Pratylenchus penetrans* en *Meloidogyne chitwoodi*. Hieronder waren 40 extracten van cruciferen, een aantal extracten van verduurzaamd gras en van medicinale planten, lignosulfonaat complexen, organische zuren en etherische oliën.

Onder biofumigatie-gewassen (cruciferen) en wilde verwanten werd een handvol accessies geïdentificeerd waarvan de extracten een goede tot zeer goede remming van aaltjes gaven in vitro (50-97% inhibitie bij een haalbare veld dosis). Effectiviteit van biofumigatiegewassen in vitro lijkt vooral samen te hangen met hoge concentraties van het glucosinolaat Sinigrine, maar ook van combinaties van andere GSLs. In verband met de mogelijkheid van het ter plekke telen van deze gewassen werd de waardplantstatus van 'biofumigatie'-accessies voor 3 nematodensoorten (*Meloidogyne*, *Pratylenchus* en *Heterodera* spp) onderzocht. Binnen de meeste accessies konden per nematodensoort enkele resistente individuen worden gevonden, zodat er perspectief is voor selectie en resistentieveredeling.

Praktische toepassing van biofumigatie is op kleine schaal getest in kassen. Biofumigatie met 35-50 ton/ha vers gewas gaf tenminste 50% populatiereductie van *Meloidogyne* spp, en tot ca 90 % indien er enkele weken werd afgedekt met plastic.

Ook andere plantensoorten en gewasresten leveren nematotoxische stoffen. Van de andere niet-biofumigatie extracten waren vooral een medicinaal plantextract en bepaalde extracten van behandeld gras effectieve aaltjesremmers. Ook verscheidene natuurlijke organische stoffen, waren toxisch. Enkele waren al bij zeer lage dosis effectief. Etherische oliën hadden geen

VOORDRACHTEN

van alle effect als aaltjesremmers in tegenstelling tot literatuurgegevens. Sommige plantextracten en organische stoffen bleken repellent in vitro en in grond.

De mogelijkheid en de wijze van toepassing van veel natuurlijke stoffen hangt af van de het soort effect (doding en of repellence) en van fytoxiciteit. Sommige gewas-nematodecombinaties zijn al gebaat bij tijdelijke en of plaatselijke bescherming, terwijl andere een veel langduriger en uitgebreider belemmering van de infectie vereisen. Onderzoek zal zich nog moeten richten op de duurzaamheid van de effecten in grond, eventuele formulering en toelating. Ook combinaties van middelen en methoden en toepassingen buiten de grond, zoals behandeling van plantenpootgoed verdienen nadere aandacht.

## **Middagsessie Detectie, Haakzaal**

### **Ontwikkeling en routinematige implementatie van een moleculaire detectietechniek voor stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*) en witrot (*Sclerotium cepivorum*) in grondmonsters**

R. Landeweert<sup>1</sup>, H. Helder<sup>2</sup>, S. van den Elsen<sup>2</sup>, R. Staps<sup>1</sup>, N. Zwaardemaker<sup>1</sup>, J. Vos<sup>1</sup> en H. Keidel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Blgg Oosterbeek, Postbus 115, 6860 AC Oosterbeek

<sup>2</sup> Laboratorium voor Nematologie, Wageningen Universiteit, Postbus 8123, 6700 ES Wageningen

Duizenden grondmonsters afkomstig uit de Nederlandse akkerbouw worden jaarlijks door servicelaboratoria onderzocht op aanwezigheid van de nematode *Ditylenchus dipsaci* (het stengelaaltje, een quarantaine organisme) en de schimmel *Sclerotium cepivorum* (witrot). Het stengelaaltje is een plantparasitaire nematode die rot veroorzaakt in verschillende ui- en bolgewassen, terwijl witrot een sclerotienvormende schimmel is die rot veroorzaakt in ui-achtige gewassen.

In samenwerking met het Laboratorium voor Nematologie (WUR) heeft Blgg een moleculaire techniek ontwikkeld, gevalideerd en routinematig geïmplementeerd, waarmee zij *D. dipsaci* en *S. cepivorum* detecteert in grondmonsters afkomstig uit de uienteelt. Tijdens het ontwikkelen van beide testen is de specificiteit van de ontwikkelde primers uitgebreid getest tegen een brede achtergrond van nauw- en niet-ver-

wante nematoden en bodemschimmels. Ter validatie van beide moleculaire testen werden 2500 (voor *D. dipsaci*) en 500 (voor *S. cepivorum*) grondmonsters parallel microscopisch en moleculair geanalyseerd. De grondmonsters werden tussen januari en maart (2005) verzameld. De voortrajecten van monstername en -behandeling bleven, ten opzichte van de klassieke detectie, onveranderd. Detectieondergrenzen van zowel de klassieke als moleculaire testen zijn één *D. dipsaci* individu en één witrot sclerotium, tegen een achtergrond van bodemorganismen. Beide moleculaire testen zijn kwalitatief.

Voor *D. dipsaci* leverde klassieke- en moleculaire analyse van 2500 monsters in resp. 0,08% en 0,76% een positieve uitkomst op. Voor *S. cepivorum* leverde klassieke- en moleculaire analyse van 500 monsters in resp. 4,0% en 7,4% een positieve uitkomst op. De moleculaire test toont in beide gevallen vaker een besmetting aan dan de klassieke, microscopische detectie. Voor *D. dipsaci* wordt dit waarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat *D. dipsaci* in het vroege voorjaar voorkomt als adult met minder opvallende morfologische kenmerken, wat microscopische herkenning bemoeilijkt. Bij moleculaire detectie spelen morfologische kenmerken geen rol en is de aantoonbaarheid van *D. dipsaci* niet seizoensafhankelijk. De geringe grootte van witrot sclerotien maakt *S. cepivorum* per definitie lastig microscopisch detecteerbaar in grondmonsters. Het verleden laat dan ook zien dat op uienpercelen die na klassieke analyse 'witrot-vrij' waren verklaard in de praktijk soms toch besmettingen voorkwamen. Voor moleculaire detectie van witrot is het zorgvuldig openbreken van de harde sclerotien cruciaal. Wanneer het witrot-DNA eenmaal is vrijgemaakt, blijkt de moleculaire techniek zeer gevoelig en voldoet een hoger aantal witrotbesmettingen in grondmonsters aan de verwachting.

De moleculaire testen vervangen bij Blgg reeds de traditionele microscopische detectie van *D. dipsaci* en *S. cepivorum*. In de (nabije) toekomst verwacht Blgg een groot deel van haar nematodenonderzoek moleculair uit te voeren. Behalve het feit dat moleculaire detectie niet morfologieafhankelijk is, maken de moleculaire testen het ook mogelijk om in één analyse een compleet nematodenmonster (> 50.000 nematoden) te onderzoeken. Dit in tegenstelling tot de huidige microscopische praktijk, waarin vaak slechts een klein deel van een nematodenmonster daadwerkelijk bekeken en geïdentificeerd wordt. De inzet van moleculaire technieken zorgt er zo waarschijnlijk voor dat er vaker plant parasitaire nematoden zullen worden aangetroffen in grondmonsters. De implementatie van moleculaire detectiemethodieken is daarom onlosmakelijk verbonden aan een hernieuwde discussie rond beleid en regelgeving, in het bijzonder rond de detectie van quarantaine organismen.