

Aantoonbaarheid van stengelaaltjes in tulp

Toetsen van tulpenuitschot op stengelaaltjes

R.H.L. Dees, J. van Doorn, P.J.M. Vreeburg

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Bloembollen, boomkwekerij & Fruit
PPO nr. 32 361144 00, PT nr. 14192
maart 2013

© 2013 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving. 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 DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Dit project is uitgevoerd in samenwerking met Blgg AgroXpertus te Wageningen

BLGG AGROXPERTUS



De bloembollensector investeert in dit project via het Productschap  Tuinbouw

Projectnummers:

PPO nr. 32 361144 00

PT nr. 14192

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, onderdeel van Wageningen UR
Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit**

Adres : Postbus 85, 2160 AB Lisse

: Prof. Van Slogterenweg 2

Tel. : +31 252 462121

Fax : +31 252 462100

E-mail : infobollen.ppo@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	5
1 Inleiding	7
2 Onttrekken van stengelaaltjes uit bollen: Douchen, dompelen en drogen	9
2.1 Pilot voor het douchen van tulpenbollen	10
2.1.1 Materiaal en methode	10
2.1.2 Resultaten	10
2.1.3 Conclusie en discussie	11
2.2 Pilot voor het onderdampelen van tulpenbollen	12
2.2.1 Hoeveel stengelaaltjes per bol	12
2.2.2 Bezinkproef	13
2.2.3 Het dompelen van tulpenbollen	14
2.3 Pilot detectie van stengelaaltjes na het drogen van tulpenuitschotbollen	15
3 Pilot 2011: kleinschalig toetsen van praktijkpartijen	17
3.1 Het toetsen van uitschottulpenbollen na kunstmatig besmetten.	17
3.1.1 Materiaal en methode	17
3.1.2 Resultaten	17
3.1.3 Conclusie en discussie	18
3.2 Het toetsen van met stengelaaltjes besmette partijen uit de praktijk	19
3.2.1 Materiaal en methode	19
3.2.2 Resultaten	19
3.2.3 Conclusie en discussie	20
4 2012 - pilot opschaling	21
4.1 Inleiding	21
4.2 Materiaal en methode	21
4.2.1 Pilot opschaling	21
4.2.2 Pilot voorspoelen	21
4.3 Resultaten	22
4.3.1 Pilot opschaling	22
4.3.2 Effect van voorspoelen	22
4.4 Conclusie en discussie	22
5 2012 - het toetsen van tulpenuitschotbollen op besmette bedrijven	23
5.1 Inleiding	23
5.2 Materiaal en methode	23
5.2.1 Het toetsen van praktijkpartijen	23
5.2.2 Het toetsen van kunstmatig besmette partijen	24
5.3 Resultaten	24
5.3.1 Het toetsen van partijen uit de praktijk voor een stengelaaltjes besmetting	24
5.3.2 Het toetsen van kunstmatig besmette partijen	25
5.4 Conclusie en Discussie	26
6 Algemene conclusie en discussie	27
6.1 Conclusie	27
6.2 Discussie	27
6.2.1 Vergelijking van de toets methoden	27
6.2.2 Mogelijkheden tot opschaling	28
6.2.3 Toetsverbetering	28
7 Communicatie en Output	31
Bijlage I. Werkprotocol tulpenuitschot	33
Bijlage II (PT 14192 TTR december 2010)	37

Samenvatting

Jaarlijks wordt er op een tiental bollenbedrijven tijdens de veld- en exportkeuringen een stengelaaltjes besmetting in tulpen gevonden. Bij enkele van deze bedrijven keert het stengelaaltjes probleem, ondanks dat de besmette partij wordt vernietigd en de grond wordt ontsmet, na één of meerdere jaren weer terug zonder dat nieuwe partijen zijn aangekocht. Het vermoeden is dat andere partijen op deze bedrijven een stengelaaltjes besmetting dan ook al langer symptomeloos met zich mee dragen.

Dit project had als doel een toets te ontwikkelen voor tulpenbollen om stengelaaltjes vroegtijdig aan te kunnen tonen. Dit lang voordat de eerste symptomen zichtbaar worden, zodat er minder versmering van het aaltje over het bedrijf kan plaatsvinden. De toets, die hiervoor binnen dit project werd ontwikkeld, is ontwikkeld op het toetsen van uitschotbollen. Deze bollen van mindere kwaliteit worden tijdens het uitzoeken van het plantgoed en het leverbaar weggegooid. Het voordeel van het gebruik van uitschotbollen is dat hierdoor geen goede plantgoed of leverbare bollen hoeven te worden gebruikt. Daarnaast wordt de kans op het aantonen van een besmetting met stengelaaltjes vergroot doordat juist de afwijkende bollen worden getoetst. Toetsen is noodzakelijk omdat stengelaaltjes symptomen in de bol visueel lastig te onderscheiden zijn van andere ziekten zoals symptomen van zuur in tulp (*Fusarium*).

Dit onderzoek toont aan dat uitschotbollen inderdaad als indicator gebruikt kunnen worden voor een stengelaaltjes besmetting in een partij tulpen. De methoden, die binnen dit project zijn onderzocht om de stengelaaltjes vrij te maken uit de bollen waren douchen, drogen en dompelen. Het dompelen van bollen bleek de meest effectieve methode. Tijdens het onderzoek werd deze methode gecombineerd met een gevoelige moleculaire PCR toets, ontwikkeld door Bggg AgroXpertus. Door de dompelmethode te combineren met de gevoelige Real-time PCR toets bleek het mogelijk om één zieke bol tussen 1000 gezonde bollen aan te tonen. De toets is daarnaast uitgetest met praktijkpartijen afkomstig van bedrijven met een eerder vastgestelde stengelaaltjes besmetting. Echter een groot probleem vormt het restmateriaal dat meekomt met de bollen en onvoldoende te scheiden is van de stengelaaltjes in het monster. Dit restmateriaal bestaat met name uit grond, bollen- en stromijten, die veel voorkomen op zure tulpen. Voor dit probleem zal eerst een oplossing gezocht moeten worden om de toets ook daadwerkelijk in de praktijk in te kunnen zetten.

1 Inleiding

Een groot probleem in de teelt van bloembollen van o.a. tulp, narcis en hyacint vormt een ziekte veroorzaakt door het stengelaaltje *Ditylenchus dipsaci*. Dit zelfde aaltje geeft ook in de tuinbouw en de akkerbouw problemen waar het bijvoorbeeld aardappel en uien aantast. Het beheersen van deze plantenziekte is belangrijk voor een gezonde teelt van bolgewassen.

Het aantal bedrijven dat per jaar wordt getroffen schommelt tussen de 20 en 50 en is relatief klein ten opzichte van het totaal aantal aan teeltbedrijven. Echter de financiële consequenties voor een individuele teler zijn groot. Stengelaaltjes vormen een quarantaine ziekte. Tulpenpartijen waarin een stengelaaltjes aantasting wordt gevonden moeten worden vernietigd en de grond waarop de partij heeft gestaan ontsmet.

De meeste aantastingen worden gevonden tijdens de veldkeuringen uitgevoerd door de bloembollenkeuringsdienst (BKD). Een enkele partij wordt ontdekt tijdens de exportkeuringen, die eveneens door de BKD wordt uitgevoerd. In 2009 werd in 18 partijen tulp een stengelaaltjes besmetting gevonden. Bij zes van deze partijen werd de besmetting vastgesteld tijdens de exportkeuring. Ondanks dat besmette partijen op de getroffen bedrijven worden vernietigd en de grond chemisch wordt ontsmet of geïnundeerd wordt op sommige van deze bedrijven, het jaar erop of met enige tussen jaren weer een besmetting aangetroffen. Herhaalde besmetting zou verband kunnen houden met besmette percelen die niet zijn gevonden, besmette spoel- en ontsmettingsbaden, besmette opslagruimte en schuurdelen (bv. aaltjeswol in stof), maar ook met de doorteelt van partijen met een verborgen besmetting. Het vermoeden bestaat dat vooral dit laatste een grote rol kan spelen en stengelaaltjes voor meerdere jaren in een partij aanwezig zijn, voordat symptomen zichtbaar worden.

Het doel van dit project was om voor deze verborgen besmettingen in partijen een gevoelige en betrouwbare toets te ontwikkelen om een besmetting vroegtijdig vast te kunnen stellen. Voorafgaand aan dit project zijn bedrijven benaderd die te maken hebben gehad met een besmetting. Uit deze enquête bleek, dat er behoefte was aan dit type toets (Punt 11C, PT 14192 tussentijdse rapportage december 2010, zie Bijlage II). Belangrijke eis hierbij was dat het mogelijk zou zijn één zieke bol tussen 1000 gezonde bollen te detecteren met een maximaal bedrag voor de toets van € 500,-. Dit bedrag is inclusief het voorwerk dat door de teler moet worden gedaan.

De doelstellingen voor het project waren dan ook als volgt:

- Vaststellen of uitschot een goede indicator is voor een stengelaaltjes besmetting in een partij
- Bepalen van de aantoonbaarheidsgrens van stengelaaltjes in tulpenbollen.

Voor de toets geldt, dat hoe eerder deze een besmetting kan detecteren in een partij hoe lager de vernietigingskosten zullen zijn. Voor plantgoed zijn deze kosten aanzienlijk lager dan voor leverbaar. Daarnaast kan met een toets voorkomen worden dat besmet plantgoed wordt geplant en grond besmet raakt.

Voor het project is besloten de toets te ontwikkelen op uitschot bollen die weggegooid worden bij het uitzoeken van het plantgoed. Een toets op het uitschot heeft een aantal belangrijke voordelen:

- De pakkans van het vinden van een mogelijke besmetting wordt vergroot doordat alleen wordt getoetst aan afwijkende bollen. Op deze manier worden bollen getoetst met de hoogste kans op een potentiële stengelaaltjes besmetting.
- De mogelijkheid om een groot monster zonder visuele selectie te kunnen toetsen.
- Voor de toets wordt materiaal gebruikt, dat al wordt weggegooid en niet het kostbare plantgoed
- Door toetsen aan het materiaal dat tijdens het uitzoeken wordt weggegooid liggen de bollen een langere tijd in de bewaring en hebben de stengelaaltjes een langere periode de kans om zich in de bol te vermeerderen en in aantal toe te nemen.

De uitschot bollen dienen hierbij dus als indicator voor een stengelaaltjes besmetting in de rest van het plantgoed.

Dit project richtte zich op de ontwikkeling van een methode om de stengelaaltjes in besmet uitschot op een efficiënte manier vrij te maken uit het materiaal zonder dat daarbij te veel restmateriaal meekomt. De methoden die voor het vrijmaken van de stengelaaltjes uit het uitschotmateriaal binnen dit project zijn onderzocht, waren het douchen, dompelen en drogen van bollen. Voor de detectie werd gebruik gemaakt van de gevoelige Real-time PCR toets van Blgg AgroXpertus, die o.a. gebruikt wordt om stengelaaltjes in grondmonsters aan te tonen.

Het project bestond uit twee fasen. De eerste fase bestond uit het toetsen van het uitschot op kleine schaal samen met de ontwikkeling van een werkprotocol. Dit betreft het werk uitgevoerd in 2011 en is beschreven in de Hoofdstukken 2 en 3. De tweede fase uitgevoerd in 2012 richtte zich op het opschalen van de aantallen bollen in een monster en het uittesten van het protocol op visueel gezonde partijen van bedrijven.

De bedrijven die hiervoor geselecteerd werden waren allen bedrijven waar datzelfde jaar tijdens de veldkeuring een besmetting met stengelaaltjes was geconstateerd of bij herhaling een stengelaaltjes besmetting op het bedrijf was aangetroffen. De resultaten hiervan staan beschreven in de Hoofdstukken 4 en 5.

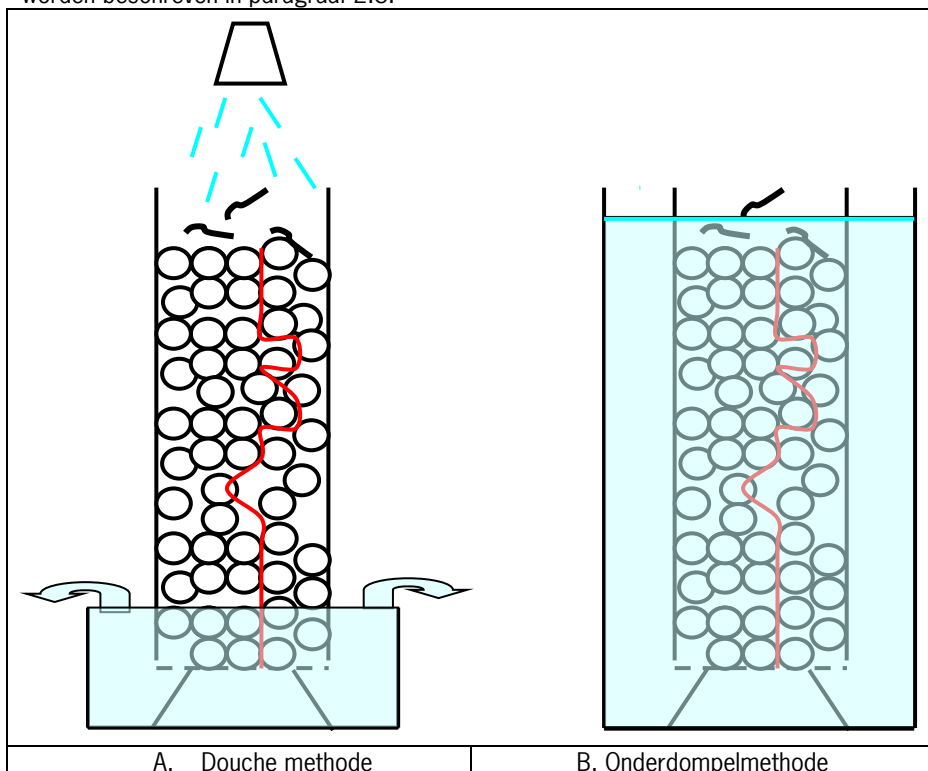
2 Onttrekken van stengelaaltjes uit bollen: Douchen, dompelen en drogen

Er zijn drie concepten getest. Dit waren douchen, dompelen en drogen van tulpenbollen.

Douchen en dompelen. Beide methoden maken gebruik van water. Het is bekend dat aaltjes vrijkomen uit plantenweefsel door deze kapot te snijden en in water te leggen (dompelen)¹. Daarnaast kunnen levende stengelaaltjes, maar ook andere aaltjes zoals wortellesieaaltjes, gelokt worden uit bijvoorbeeld wortels of plantenstengels door het materiaal in een regenapparaat of mistkamer te zetten ("douchen"). Door de vochtige omstandigheden in deze kamer "zwemmen" aaltjes uit het weefsel (Webster², 1965). Eenmaal buiten de wortel of een plantenstengel worden zij vervolgens met de fijne waterdruppels meegevoerd en in een opvangbakje gevangen. De extractie-efficiëntie van een mistkamer is hoger ten opzichte van dompelen; aaltjes blijven in betere conditie, zuurstofgebrek wordt voorkomen evenals het ophopen van afbraakproducten. Nadeel van een mistkamer is dat voor deze methode veel water nodig is.

Voor beide methoden is bepaald in hoeverre zij bruikbaar zouden zijn voor de extractie van stengelaaltjes uit grote aantallen tulpen uitschot bollen (§2.1 en §2.2) Vanwege de grote aantallen bollen (500 stuks in de pilot) zijn beide methoden enigszins aangepast. Een schematische tekening van de proefopstellingen is te zien in Figuur 1.

Drogen. Een belangrijk nadeel van het douchen of het dompelen van bollen is, dat de stengelaaltjes eerst op eigen kracht de bol moeten verlaten om te kunnen worden aangetoond. Niet alle aanwezige aaltjes zullen naar buiten worden gelokt. De aaltjes die achterblijven en in de bol blijven zitten gaan dus voor de analyse verloren. Indien een bol in zijn geheel voor de extractie gebruikt kan worden en daarmee alle aaltjes die in deze bol aanwezig zijn, zal de kans op detectie toenemen. Als alternatief is dan ook onderzocht of het mogelijk is de bollen in hun geheel te drogen, te malen en te analyseren op de aanwezigheid van stengelaaltjes. De resultaten hiervan worden beschreven in paragraaf 2.3.



Figuur 1 Schematische weergave van de proefopstelling voor douchen (A) en dompelen (B)

¹ EPPO quarantine pest. *Ditylenchus dipsaci*. Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003

² Webster JM 1962. The Quantitative Extraction of *Ditylenchus Dipsaci* (Kühn) From Plant Tissues By a Modified Seinhorst Mistifier. *Nematologica* 8 (4), 245-251

2.1 Pilot voor het douchen van tulpenbollen

2.1.1 Materiaal en methode

Een PVC buis met een diameter van 15 cm en een hoogte van 101,5 cm (de binnenbuis) aan één kant begrensd met geweven metaalgaas werd op 2 rolletjes in een opvangbak met een diameter van 19 cm en een hoogte van 10 cm geplaatst (*Figuur 1*). De binnenbuis werd vervolgens gevuld met 500 leverbare tulpen van de cultivar Strong Gold (bolmaat 10) en onder een douchekop geplaatst. Douchen vond plaats gedurende 1, 2 of 3 dagen. Aan de buizen gevuld met tulpen werden vervolgens stengelaaltjes toegevoegd of stengelaaltjes zieke tulpen. Voor de eerste pilot werden aan de geheel met bollen gevulde binnenbuis ongeveer 84000 stengelaaltjes toegevoegd. Stengelaaltjes werden halverwege of boven in de buis toegevoegd. Het water uit de opvangbak werd na twee dagen over een set van zeven geleid. Het residu van de zeven werd met kraanwater afgespoeld en voor 2-3 dagen op filter gezet, waarna het water microscopisch werd beoordeeld op de aanwezigheid van stengelaaltjes. Voor de tweede pilot zijn zieke bollen gebruikt, die aan de gezonde bollen werden toegevoegd, waarna extractie van de aaltjes op dezelfde manier plaatsvond. In deze pilot is in eerste instantie gewerkt met filters. Later in dit onderzoek is de methode aangepast, waardoor ook levenloze stengelaaltjes gedetecteerd konden worden.

2.1.2 Resultaten

Tabel 1 vermeldt de aantallen stengelaaltjes onderin de buis na één dag douchen. Het totaal aantal stengelaaltjes dat bij het begin van het experiment boven of halverwege de buis was toegevoegd ongeveer 84000.

Tabel 1. Aantallen stengelaaltjes in opvangbak na douchen

Behandeling	Aaltjes toegevoegd	Aantallen stengelaaltjes Aangetoond na één dag douchen
1	Bovenin	10240
2	Halverwege	7600

De resultaten uit Tabel 1 tonen, dat na één dag 12 % van de stengelaaltjes die bovenin en 10% van de stengelaaltjes, die halverwege de kolom waren toegevoegd in de opvangbak was opgevangen.

Gezien de grote doorstromingsnelheid van het water door de buis en daarmee het uitspoelen en dus verlies van stengelaaltjes uit de opvangbak is een tweede doucheopstelling getest. Hierbij werd een vernevelkop in plaats van een douchekop gebruikt. De vernevelkop sproeide een half uur per uur. Bij het testen van deze opstelling werden aan 500 tulpenbollen 335 stengelaaltjes bovenin de buis toegevoegd.

Tabel 2. Aantallen stengelaaltjes in de opvangbak Na 1, 2 en 3 dagen douchen met losse aaltjes

Incubatie tijd (dagen)	Aantallen stengelaaltjes
1	238
2	3
3	1 (6)

In totaal werden over de 3 dagen 248 stengelaaltjes teruggevangen. Dit is 72 % van de hoeveelheid stengelaaltjes die bij de start van het experiment was toegevoegd. Zes van deze stengelaaltjes (in de tabel tussen haakjes) werden teruggevonden na extra doorspoelen van de kolom met water aan het einde van het experiment op dag 3.

Hetzelfde experiment werd herhaald, maar nu met een aaltjeszieke tulpenbol. Deze werd net onder de bovenste laag tulpenbollen in de buis gelegd. Hier werd na 3 dagen slechts 0,7 % van de stengelaaltjes terug gevonden in de opvangbak (Tabel 3).

Tabel 3. Aantallen stengelaaltjes in de opvangbak na 1, 2 en 3 dagen douchen met een nevelkop/ met één zieke bol

Incubatie tijd (dagen)	Aantallen stengelaaltjes
1	5
2	9
3	4 (105)

(x) = aantal stengelaaltjes na doorspoelen

De meeste stengelaaltjes werden opgevangen na naspoelen van de buis op dag drie (109). De zieke bol is na het experiment in de mistkamer gezet om de resterende hoeveelheid stengelaaltjes in de bol te bepalen. In deze bol werden na de mistkamer-behandeling 18614 stengelaaltjes geteld. Dit aantal samen met de 123 stengelaaltjes uit de opvangbak maakt dat 18737 stengelaaltjes oorspronkelijk in de bol aanwezig waren. Slechts 0.7% kwam dus vrij door douchen.

2.1.3 Conclusie en discussie

De resultaten laten zien dat de extractie efficiency met de douche opstelling erg laag is. De oorzaak is waarschijnlijk tweeledig. Ten eerste is de RV in de binnenbuis mogelijk onvoldoende (en lager dan in een mistkamer) om de stengelaaltjes in grote aantallen uit het materiaal te lokken. Ten tweede lijken de neveldruppels onvoldoende in staat de stengelaaltjes mee te nemen naar beneden het opvangbakje in. Naspoelen vergroot de aantallen stengelaaltjes die vrij komen voor analyse. Het aantal stengelaaltjes na doorspoelen was beduidend hoger dan wanneer de binnenbuis niet werd gespoeld. De extractie van stengelaaltjes uit bollen door douchen volgens de hier gebruikte methode is onvoldoende. Derhalve vervalt deze extractie-methode voor verder onderzoek.

2.2 Pilot voor het onderdompelen van tulpenbollen

2.2.1 Hoeveel stengelaaltjes per bol

In een bekeerglasopstelling is getest hoe snel en welke percentage stengelaaltjes vrij komt uit een een stengelaaltjes zieke tulpen bol.

2.2.1.1 Materiaal en methode

Van stengelaaltjes verdachte tulpenbollen werden visueel beoordeeld op stengelaaltjes-symptomen door de opperhuid te verwijderen. Bij de beoordeling kreeg een zeer lichte aantasting een 1 en een zeer zware besmetting een 10. Vijf stengelaaltjes-zieke bollen werden in een bekeerglas onder water gezet, waarna gedurende drie dagen de aantallen stengelaaltjes die vrijkwamen uit de bollen werden geteld.

2.2.1.2 Resultaten

Tabel 4 geeft de graad van besmetting weer voor de vijf individuele bollen en de percentages stengelaaltjes die uiteindelijk vrijkwamen. Het percentage stengelaaltjes dat uiteindelijk uit de bol vrijkwam door dompelen t.o.v. het totale aantal stengelaaltjes in de bol varieert op dag 2 van 18 tot 52 %. De meeste stengelaaltjes kwamen vrij na 24 uur in water. Bij een jonge besmetting kwamen meer stengelaaltjes vrij dan bij een verder gevorderde besmetting. Dit wordt hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door het feit dat de buitenste vlezige rok van deze bollen meer was beschadigd.

Tabel 4. % gewekte stengelaaltjes na dompelen van de bollen op dag 1, 2 en 3

bol	mate van aantasting	% "gewekte" stengelaaltjes		
		dag 1	dag 2	dag 3
A	1	15	3	2
B	2	33	1	4
C	2-3	16	14	2
D	5	39	3	2
E	8	42	10	11

De resultaten uit

Tabel 4 laten zien dat door dompelen stengelaaltjes vrij komen uit de bol. De meeste stengelaaltjes komen binnen twee dagen na het onder water zetten van de bollen vrij. Op dag drie neemt het percentage dat vrijkomt al weer sterk af.

2.2.1.3 Conclusie

Het percentage stengelaaltjes dat vrijkomt uit een zieke bol na dompelen blijkt in de bekeerglasopstelling na twee dagen rond de 35 % te liggen. Gezien de hoge aantallen stengelaaltjes die normaliter in stengelaaltjes zieke tulpenbollen worden aangetroffen en de eenvoud van het dompelen van tulpen om stengelaaltjes uit een partij vrij te maken voor een teler lijkt de dompelmethode hiermee het beste te gebruiken. De volgende kanttekening is hierbij wel van toepassing. Om vooraf te kunnen bepalen of bollen al dan niet ziek waren, werd voor dit experiment de buitenste vlezige bolrok verwijderd. Door het ontbreken van de buitenste harde bolrok wordt het voor stengelaaltjes makkelijker om naar buiten te kunnen. Daarnaast werd het water in de bekeerglazen dagelijks ververs, waardoor vers zuurstofrijk water aan het bekeerglas werd toegevoegd. Anderzijds zal in de praktijk door langere bewaring het aantal stengelaaltjes in de bol hoog zijn en zal in het geval van uitschot bollen de buitenste rok vaak gescheurd zijn. Het ligt echter in de verwachting dat de extractie efficiency in de praktijk uiteindelijk lager ligt dan de 35 %, behaald in dit experiment, dat werd uitgevoerd onder de meest optimale omstandigheden.

2.2.2 Bezinkproef

Na het dompelen van de bollen en het vrijkomen van de stengelaaltjes in het water zal in de praktijk het volume aan water dat overblijft nadat de bollen zijn verwijderd te groot zijn om rechtstreeks stengelaaltjes te kunnen detecteren. De hoeveelheid water zal dus moeten worden verminderd. Voordat het grootste deel van het water wordt afgetapt zullen de aaltjes eerst de kans moeten krijgen naar de bodem van bijvoorbeeld een pallet box te zinken. De tijd die stengelaaltjes in deze matrix nodig hebben om te bezinken is getoetst in een maatcilinderopstelling.

2.2.2.1 Materiaal en methode

Een 23 cm hoge glazen maatcilinder werd gevuld met tulpenwater. Voor het tulpenwater werden bollen gedurende 3 dagen onder water gezet. Aan dit bruine, gele water werden vervolgens stengelaaltjes toegevoegd. Na zes uur werden de stengelaaltjes in de onderste 4 cm van de buis geteld en de aantallen stengelaaltjes in de bovenstaand 19 cm.

2.2.2.2 Resultaten

Tabel 5 toont de aantallen stengelaaltjes in de onderste 4 cm en bovenste 19 cm na een bezinktijd van 6 uur in het tulpenwater t.o.v. kraanwater. Het percentage laat zien hoeveel stengelaaltjes zich na 6 uur in de onderste 4 cm bevonden t.o.v. het totale aantal stengelaaltjes in de maatcilinder

Tabel 5. *Aantallen stengelaaltjes in de verschillende fracties "tulpenwater" na 6 uur bezinken*

Monster	Aantallen stengelaaltjes boven	Aantallen stengelaaltjes onder *	Totaal aantal stengelaaltjes	% bezonken stengelaaltjes na 6 uur
kraanwater A	40	614	654	94
kraanwater B	22	868	890	98
tulpenwater A	13	1265	1278	99
tulpenwater B	51	991	1042	95
tulpenwater C	10	1006	1016	99

* *Aantallen stengelaaltjes in de onderste 4 cm van de maatcilinder*

Het aantal stengelaaltjes op de bodem in het tulpenwater verschilde dus niet van het aantal stengelaaltjes op de bodem bij het kraanwater. Ook het aantal dode stengelaaltjes was gelijk 8,6 % zowel in het water als in het tulpenwater

2.2.2.3 Conclusie

Uit de resultaten blijkt dat met 6 uur minimaal 95 % van de stengelaaltjes in het tulpenwater is bezonken. De kolom water in een pallet box is hoger dan deze 21 cm. In de verdere procedure is een bezinkingstijd van 24 uur aangehouden.

2.2.3 Het dompelen van tulpenbollen

De resultaten met de bezinkproef en de dompelproef met zieke tulpenbollen in een bekersglasopstelling toonden aan dat extractie van nematoden via dompelen mogelijk is indien de stengelaaltjes voldoende tijd wordt gegeven uit de bol te “zwemmen” en te bezinken. Om de ontwikkelde methode ook op grotere schaal te toetsen is een kolomopstelling gemaakt, waarin 500 bollen tegelijk onder water werden gezet. De resultaten van deze experimenten worden hier beschreven.

2.2.3.1 Materiaal en methode

Een PVC buis met een diameter van 15 cm en een hoogte van 101,5 cm (de binnenbuis) aan één kant begrensd met geweven metaalgaas werd op 2 rolletjes in een buis (de buitenbuis) met een diameter van 19 cm en een hoogte van 106 cm geplaatst. De buitenbuis werd aan de onderkant afgesloten met een deksel (*Figuur 1*). De binnenbuis werd gevuld met 500 leverbare tulpen van de cultivar Strong Gold (mt. 10) en in de buitenbuis geplaatst. Deze bollen waren afkomstig van het zuidelijk halfrond. De bollen werden vervolgens voor 2 of 3 dagen onder water gezet. Voor de eerste pilot werden aan de met tulpenbollen gevulde binnenbuis 378 stengelaaltjes toegevoegd. Deze stengelaaltjes werden bovenin de buis toegevoegd. Na 2 dagen, waarin de bollen volledig onder water stonden, werd de binnenbuis met de bollen uit de buitenbuis gelicht. Vervolgens werden de bollen in schoon kraanwater nagespoeld door de met de bollen gevulde binnenkolom 10 x in het schone water op en neer te halen. Stengelaaltjes werden vervolgens uit de verschillende watermonsters geëxtraheerd door deze over een set zeven te gooien. Het residu van de zeven werd met kraanwater afgespoeld en voor 2-3 dagen op filter gezet, waarna het water microscopisch werd beoordeeld op de aanwezigheid van stengelaaltjes. Voor de tweede pilot zijn zieke bollen gebruikt, die aan de gezonde bollen werden toegevoegd, waarna extractie van de aaltjes op dezelfde manier plaatsvond.

2.2.3.2 Resultaten

Tabel 6 toont de aantallen teruggevonden stengelaaltjes van de in totaal 378 los toegevoegde stengelaaltjes danwel de aantallen stengelaaltjes teruggevonden na het toevoegen van een zieke bol.

Tabel 6. Aantallen stengelaaltjes geteld in kolomwater en spoelwater 2 dagen na het toevoegen van losse stengelaaltjes of een besmette bol aan een kolom met 500 tulpenbollen

Behandeling	Losse aaltjes	Zieke bol
kolomwater	203	3312
spoelwater*	95	1316

**Is het aantal stengelaaltjes dat extra wordt geteld door naspoelen*

Zowel na toevoegen van losse aaltjes als het toevoegen van één zieke bol werden aaltjes gedetecteerd. Voor het experiment met de losse stengelaaltjes werden 378 individuen bij de start toegevoegd. Van deze 378 stengelaaltjes werden in totaal 298 stengelaaltjes “teruggevangen”. Dit is 79% van het totale aantal toegevoegde stengelaaltjes. Voor het experiment met de zieke bol was dit 34 %. Deze percentages zijn inclusief de stengelaaltjes die vrijkwamen door het naspoelen van de bollen. Het naspoelen van de bollen is dus nodig en vergroot de efficiency, waarmee stengelaaltjes kunnen worden aangetoond.

2.2.3.3 Conclusie en discussie

De resultaten uit deze pilot waarbij losse stengelaaltjes of een zieke bol aan de kolom met 500 gezonde leverbare tulpenbollen werd toegevoegd, tonen aan dat het via de dompelmethode mogelijk is met een voldoende efficiency stengelaaltjes vrij te maken en aan te tonen in een monster. Uit dit experiment en de bekersglas experimenten blijkt dat ongeveer 30% van de stengelaaltjes uit de bol zal kruipen en zal worden aangetoond. 70% blijft in de bol achter als de dompelmethode wordt gebruikt. Deze experimenten zijn in mei met leverbare bollen uitgevoerd. Dit zijn andere bollen dan uitschotbollen, die meer schimmel en mijten zullen bevatten en sneller zullen gisten met als gevolg dat er sneller zuurstofgebrek zal zijn. In hoeverre dit protocol ook voor deze bollen is te gebruiken is onderzocht in Hoofdstuk 3.

2.3 Pilot detectie van stengelaaltjes na het drogen van tulpenuitschotbollen

2.3.1.1 Materiaal en methode

Zieke en gezonde uitschotbollen werden gedroogd en gemalen. De gemalen zieke en gezonde bollen werden hierna in verschillende verhoudingen met elkaar gemengd en gebruikt voor de DNA isolatie. De aantallen stengelaaltjes in de verschillende monsters is vervolgens bepaald met Real-time PCR.

2.3.1.2 Resultaten

Bij Real-time PCR is de Ct-waarde een maat voor de aantallen stengelaaltjes in een monster. Hoe lager de Ct-waarde hoe meer DNA van stengelaaltjes in een monster aanwezig is. Hoe hoger de Ct-waarde hoe lager het aantal stengelaaltjes in het monster. Tabel 7 toont de Ct-waarden met daarbij de aantallen stengelaaltjes in het oorspronkelijke monster. De maximale verhouding tussen materiaal van ziek: gezond bedroeg in deze opzet 1:29.

Tabel 7. Ct-waarden in de Real-time PCR, waarbij gezond en besmet materiaal in verschillende verhoudingen werd gemengd.

nr	Bolgewicht ziek (mg)	Bolgewicht gezond (mg)	Aantallen stengelaaltjes
			Real-time PCR
1	50	950	144 (Ct = 27.85)
2	250	750	1113 (Ct = 25.49)
3	1000	0	2525 (Ct = 23.72)
4	100	1900	325 (Ct = 27.04)
5	100	2900	306 (Ct = 27.14)
6	0	1000	0 (N/A)
7	0	0	0 (N/A)

7 = de water controle; N/A betekent Ct-waarde boven 40 = geen stengelaaltjes aangetoond.

Zoals uit Tabel 7 blijkt werden Ct-waarden tussen de 23 en 28 verkregen in de behandelingen waaraan ziek materiaal werd toegevoegd (nrs. 1 t/m 5). In alle mengsels werden dus stengelaaltjes aangetoond. De water controle en gezonde bol gaven een negatief resultaat in de PCR-toets.

2.3.1.3 Conclusie en discussie

Het drogen van bollen biedt een mogelijkheid om stengelaaltjes in bolmateriaal aan te tonen en heeft een belangrijk voordeel ten opzichte van bijvoorbeeld extractie met water. Bij deze laatste zullen stengelaaltjes zelf eerst actief uit de bol moeten kruipen. Dit zal altijd een percentage zijn. Voor de analyse gaan dus stengelaaltjes verloren. Indien bollen worden gedroogd en vermalen gaan geen stengelaaltjes verloren voor de DNA extractie. De kans op detectie wordt in theorie dus vergroot. Het drogen van grote aantallen uitschotbollen en vervolgens toetsen is niet haalbaar. De hoeveelheid materiaal is hiervoor te groot. Voor diagnostisch onderzoek waarbij één of enkele bollen getoetst dienen te worden is deze methode mogelijk wel in te zetten. Hoewel ook in dat geval het waarschijnlijk sneller zal zijn en goedkoper om een stukje bol rechtstreeks onder de microscoop te beoordelen.

3 Pilot 2011: kleinschalig toetsen van praktijkpartijen

3.1 Het toetsen van uitschottulpenbollen na kunstmatig besmetten.

3.1.1 Materiaal en methode

Aan gezonde uitschotbollen (440 tot 510 stuks) werden verschillende aantallen zieke tulpenbollen of losse stengelaaltjes toegevoegd. De bollen werden vervolgens, tenzij anders vermeld, voor twee dagen onder water gezet. Na twee dagen werd het water (nadat bollen waren nagespoeld) geanalyseerd op stengelaaltjes. I.t.t. de analyse in paragrafen 2.1 en 2.2 werden de monsters na de zeven niet op filters weggezet, maar rechtstreeks beoordeeld. De analyse werd dus uitgevoerd op zowel dode als levende stengelaaltjes. Monsters werden altijd visueel beoordeeld door 2 ml van de vloeistof microscopisch te onderzoeken. Een deel van de monsters is tevens geanalyseerd met Real-time PCR. Zieke bollen werden na dompelen voor twee dagen in de mistkamer gezet om het aantal stengelaaltjes dat zich nog in de bol bevond te kunnen bepalen.

3.1.2 Resultaten

Tabel 8 toont de resultaten van een besmettingsexperiment. Aan een monster werden 0, 100, 1000 of 10000 stengelaaltjes of vier of zes zieke tulpenbollen toegevoegd. Bij monster 2 werden de bollen vooraf kapot gemaakt om te zien of stengelaaltjes daarmee makkelijker uit de bol zouden komen en de detectiekans toe zou nemen.

Tabel 8. Aantoonbaarheid van stengelaaltjes via dompelen in kunstmatig met stengelaaltjes besmette tulpenmonsters.

nr.	Monstergrootte (bollen)	Aantal zieke bollen	Aantal stengelaaltjes bij start ²	Aantal stengelaaltjes aangetoond eind ³	
				Microscop	Real time PCR
1	440	4	n.v.t.	0	10 (Ct=31.67)
2 ¹	550	6	n.v.t.	16	n.v.t.
3	510	6	n.v.t.	20	442 (Ct=24.97)
4	450	n.v.t.	100	4	n.v.t.
5a	510	n.v.t.	1000	12	209 (Ct=26.09)
5b	510	n.v.t.	1000	23	245 (Ct=26.08)
6a	510	n.v.t.	10000	65	1389 (Ct=23.19)
6b	510	n.v.t.	10000	149	n.v.t.

¹ Bol in stukken; ² = aantal stengelaaltjes, dat bij begin van het experiment los bovenin de buis werd toegevoegd;

³ Aantallen stengelaaltjes die werden aangetoond. Voor de microscoop werd 2 ml geteld uit een 50 ml monster. De telling geeft alleen aan of er stengelaaltjes in het monster aanwezig waren. Voor de PCR staat tussen haakjes de Ct-waarde vermeld. Hoe hoger de Ct-waarden hoe minder stengelaaltjes in een monster. De methodiek achter de omrekening van Ct naar aantallen is voor deze matrix niet geoptimaliseerd. Hierdoor kunnen er verschillen bestaan in het werkelijke aantal en het berekende aantal. N.v.t. = niet uitgevoerd.

Zoals uit Tabel 8 blijkt, zijn in alle monsters stengelaaltjes gevonden. De stengelaaltjes werden door een microscopische telling en/of Real-time PCR vastgesteld. De telling met de microscoop is niet absoluut. Er wordt slechts een klein submonster geteld. Bij lage aantallen kunnen dus stengelaaltjes worden gemist. Voor de Real-time PCR wordt het hele monster meegenomen voor de analyse. De aantoonbaarheidsgrens lag in dit experiment bij 100 stengelaaltjes bij 450 bollen en één besmette bol tussen 85-100 bollen. Het kapot maken van de bollen lijkt geen duidelijk voordeel te hebben in het detecteren van de stengelaaltjes (behandeling 2 vs. 3).

3.1.3 Conclusie en discussie

De uitslagen voor het kunstmatig besmetten van tulpenuitschot bollen met losse stengelaaltjes danwel stengelaaltjes zieke tulpenbollen waren positief. Dit resultaat laat zien dat het met de dompelopstelling mogelijk is een zieke tulp bol te detecteren tussen 100 gezonde bollen. Het kapot maken van de bollen lijkt geen duidelijk voordeel te hebben in het detecteren van de stengelaaltjes (behandeling 2 vs. 3). Daarbij is het erg bewerkelijk de bollen eerst te halveren en levert het veel restmateriaal op in het uiteindelijke watermonster. Dit laatste is voor de analyse onwenselijk. Bij gebruik van hele bollen lijkt de pilot een bruikbare toets voor de praktijk op te kunnen leveren voor het detecteren van stengelaaltjes in uitschotbollen mits het aantal bollen van maximaal 500 stuks verder kan worden opgeschaald.

3.2 Het toetsen van met stengelaaltjes besmette partijen uit de praktijk

In hoeverre stengelaaltjes in natuurlijk besmette partijen kunnen worden aangetoond met de dompeltoets wordt hier beschreven.

3.2.1 Materiaal en methode

De procedure rondom het dompelen is gelijk aan de beschrijving in paragraaf 3.1.1. Nu werd de analyse echter uitgevoerd op het plantgoed, leverbaar of uitschot van twee partijen met een bekende stengelaaltjes besmetting. Het aantal bollen dat werd getoetst in de buisopstelling lag afhankelijk van de bolmaat tussen de 260 en 805 stuks. Behandelingen werden in twee herhalingen uitgevoerd bestaand uit twee monsternames uit dezelfde partij. Watermonsters werden microscopisch of door Blgg AgroXpertus via Real-time PCR geanalyseerd.

3.2.2 Resultaten

Tabel 9 toont het resultaat van de toets voor twee partijen met een bekende besmetting van stengelaaltjes. Van één partij werd zowel het uitschot, het leverbaar en het plantgoed getest. Van een tweede partij alleen het leverbaar.

Tabel 9. Aantoonbaarheid van stengelaaltjes in op stengelaaltjes afgekeurd tulpenuitschot, leverbaar en plantgoed.

nr.	Materiaal	Monstergrootte (bollen)	Aantal stengelaaltjes aangetoond	
			Microscop	Real time PCR ¹
1a	Uitschot Leverbaar partij 1 2 dagen onder water	340	8	687 (Ct = 25.86)
1b	Uitschot Leverbaar partij 1 2 dagen onder water	340	7	413 (Ct = 26.19)
2a	Uitschot Leverbaar partij 1 1 dag onder water	300	3	n.v.t.
2b	Uitschot Leverbaar partij 1 1 dag onder water	300	6	n.v.t.
3a	Leverbaar partij 1 2 dagen onder water	430	8	2262 (Ct = 23.83)
3b	Leverbaar partij 1 2 dagen onder water	430	19	2072 (Ct = 24.06)
4a	Plantgoed partij 1 2 dagen onder water	805	55	4476 (Ct = 22.97)
4b	Plantgoed partij 1 2 dagen onder water	805	1016	44010 (Ct = 19.67)
5a	Leverbaar partij 2 2 dagen onder water	260	59	n.v.t.
5b	Leverbaar partij 2 2 dagen onder water	260	Te veel om te tellen	n.v.t.

¹ Aantallen stengelaaltjes die werden aangetoond. Voor de microscoop werd 2 ml geteld uit een 50 ml monster. De telling geeft alleen aan of er stengelaaltjes in het monster aanwezig waren. Voor de PCR staat tussen haakjes de Ct-waarde vermeld. Hoe hoger de Ct-waarden hoe minder stengelaaltjes in een monster. De methodiek achter de omrekening van Ct-waarde naar aantallen is voor deze matrix niet geoptimaliseerd. Hierdoor kunnen er verschillen bestaan in het werkelijke aantal en het berekende aantal. N.v.t. = niet uitgevoerd.

In alle monsters konden middels de ontwikkelde toets stengelaaltjes gedetecteerd worden. De aantallen stengelaaltjes tussen de monsters die 1 of 2 dagen onder water hebben gestaan lijken niet erg te verschillen. Dit resultaat laat zien dat de incubatietijd (de tijd waarin de bollen onder water staan) mogelijk van twee dagen naar één dag teruggebracht kan worden.

In de monsters werden over het algemeen hoge aantallen stengelaaltjes aangetoond. Een monster met een Ct-waarde van 19.67 bevat hierbij meer stengelaaltjes dan een monster met een Ct-waarde van 24.06. De tellingen uit de microscopische analyse zijn niet absoluut en betreft een submonster uit een groter monster. De getallen zijn een indicatie of er veel of weinig stengelaaltjes in het monster zitten.

3.2.3 Conclusie en discussie

Uit de resultaten blijkt dat voor de partijen waar visueel een besmetting werd aangetoond ook de toets uitslag met de ontwikkelde dompelmethode positief is. Of de toets in staat is ook een aantasting in visueel gezonde bollen aan te tonen is hiermee nog onduidelijk. Voor een betrouwbare toets is opschaling van het aantal bemonsterde bollen echter nodig. Zowel in uitschot, leverbaar als het plantgoed van dezelfde partij konden met behulp van de toets stengelaaltjes worden aangetoond. Dit resultaat laat het zien dat uitschot als indicator kan dienen voor een besmetting in een partij.

Het redelijk vergelijkbare aantal stengelaaltjes gevonden in dezelfde partij na één of twee dagen laat zien dat de tijdsduur waarbij de bollen onder water staan mogelijk met één dag is te verkorten. In hoeverre dit wenselijk is zal verder onderzocht moeten worden aangezien uit de experimenten met het bekeerglas (paragraaf 2.2.1) bleek dat een incubatieduur van twee dagen het meest optimaal was.

4 2012 - pilot opschaling

4.1 Inleiding

De doelstelling voor 2012 was om op twee bedrijven, waar dat jaar tijdens de veldkeuring een besmetting met stengelaaltjes was geconstateerd, visueel gezonde partijen voor de opplant te toetsen op een eventueel latent aanwezige besmetting. De werkzaamheden voor de toets zouden hierbij m.u.v. de laboratorium test op het bedrijf door de teler zelf worden uitgevoerd. Op basis van de resultaten uit de pilot van 2011 werd hiervoor een protocol opgesteld, waarbij het aantal bollen werd vergroot van de maximaal 500 leverbare bollen naar ongeveer 10.000 bollen.

4.2 Materiaal en methode

4.2.1 Pilot opschaling

Gaasbalen van 60x80 cm werden gevuld met uitschot tulpenbollen en vervolgens in een pallet box gestapeld. Overeenkomstig het protocol uit 2011 werden de bollen vooraf niet gespoeld of gewassen. De pallet box met de bollen werd voor twee dagen onder water gezet. Na 48 uur werden de gaasbalen verwijderd en kregen de aaltjes 24 uur de tijd om naar de bodem te zinken. Hierna werd het bovenstaande water tot 8 cm afgetapt en de resterende vloeistof door middel van een pompje of emmer over een set zeven geleid, waarop de aaltjes werden opgevangen (Zie Bijlage I).

4.2.2 Pilot voorspoelen

Effect van voorspoelen op het pellet volume³: Van twee partijen werd een gaasbaal gevuld met 800 uitschot tulpenbollen vrij van stengelaaltjes, maar met een zware bollen- en stromijt aantasting. Bollen werden voorgespoeld door de gaasbaal 10 x op en neer te halen in een grote metselkuip (80L) voor 2/3 gevuld met water. En vervolgens verder verwerkt volgens protocol. Vervolgens werd het pellet volume van zowel het spoelwater als het dompelwater bepaald.

Effect van voorspoelen op het uitspoelen van stengelaaltjes: Drieduizend bollen van een stengelaaltjes besmette partij, vrij van mijten, werden gespoeld door de gaasbalen met de bollen 10 x op en neer te halen in een tot 2/3 met water gevulde metselbak van ongeveer 80 L. Na bezinken voor twee dagen werden de stengelaaltjes uit het water geëxtraheerd door dit over een set zeven gieten, waarop de stengelaaltjes bleven liggen. Het aantal stengelaaltjes werd microscopisch bepaald.

³ Pelletvolume: Het volume aan restmateriaal zoals grond, mijten etc, anders dan stengelaaltjes, dat na bezinken van het watermonster achterblijft op de bodem.

4.3 Resultaten

4.3.1 Pilot opschaling

De uitschot partij gebruikt in deze pilot had een zware mijten aantasting als gevolg van een zware aantasting door *Fusarium*. Het extraheren van stengelaaltjes uit het dompelwater met de ontwikkelde methode bleek door de grote aantallen mijten in deze partij onmogelijk. Levende en dode mijten dreven als een oranje zweem in grote dichtheden in het dompelwater en bedekten in een dikke laag de bodem. Deze mijten verstopten de zeven. Ook nam door de mijten de hoeveelheid restmateriaal sterk toe. Voor de DNA isolatie kan maximaal 100 ml pellet worden geanalyseerd. Door de grote aantallen mijten werd het pellet te groot en was een betrouwbare analyse niet mogelijk. Dit resultaat laat zien dat bij een (zware) aantasting met mijten een analyse op stengelaaltjes met deze methode en deze aantallen bollen niet mogelijk was. Mogelijk biedt het voorspoelen van bollen een oplossing. Dit is onderzocht en beschreven in paragraaf 4.3.2.

4.3.2 Effect van voorspoelen

In de praktijk blijkt dat grote aantallen mijten de extractie van stengelaaltjes uit uitschot onmogelijk maakt bij grote aantallen bollen. Mogelijk biedt het voorspoelen van de bollen een oplossing voor partijen, die zwaar zijn aangetast door mijten. Hiertoe werd van twee partijen één gaasbaal voorgespoeld en vervolgens van het spoel- en het dompelwater het volume aan pellet bepaald (Tabel 10).

Tabel 10. Pellet volumina van spoelwater en dompelwater na voorspoelen van de bollen

Monster	zeef	volume (ml) pellet spoelwater	volume (ml) pellet dompelwater	Totaal volume (ml) pellet van beide zeven	pellet reductie (%) door spoelen
I	middel	110	85	207.5	57
	fijn	7.5	5		
II	middel	50	135	205	29
	fijn	10	10		

Het pellet volume wordt door het voorspoelen gereduceerd. Voor partij I was dit een reductie met 57 %. Voor partij II lag dit percentage lager en werd het pellet volume met 29 % gereduceerd. Voorspoelen heeft dus een positief effect op het uiteindelijke volume van het pellet. Echter, het vereist een extra handeling. Een (klein) gedeelte van de stengelaaltjes zal daarnaast uitspoelen (resultaten niet getoond).

4.4 Conclusie en discussie

Mijten vormen een belangrijk probleem voor het opschalen van het aantal bollen in de toets. De mijten verstopten de zeven en zorgen ervoor dat het totale volume aan pellet voor de DNA isolatie sterk toeneemt. Dit maakt de toets bewerkelijk en leidt tot het verminderen van de gevoeligheid. Zowel de eieren, juvenilen als volwassen mijten geven problemen. Onderzoek naar het verminderen van de aantallen mijten door de bollen voor te spoelen laat zien dat dit een positief effect heeft op het eindvolume van het pellet voor de DNA extractie. Voorspoelen van de bollen leidde in experimenten tot een reductie van het pellet met respectievelijk 57 en 29 %. Deze reductie is echter (nog) niet voldoende om duizenden uitschot tulpenbollen tegelijk te kunnen toetsen zonder problemen. Daarbij, door voorspoelen gaat ook een (klein) deel van de mogelijk aanwezige stengelaaltjes voor analyse verloren. Voor een werkbare toets is dan ook aanvullend onderzoek nodig, dat zich richt op het reduceren van de aantallen mijten tijdens de bewaring en op alternatieve methoden voor het scheiden van de mijten en de stengelaaltjes.

Door de problemen met de mijten was het toetsen van de oorspronkelijk 20 partijen op twee bedrijven bij en door telers niet mogelijk. Een beperkt aantal partijen (acht in totaal) met een onbekende besmetting is alsnog op kleine schaal getoetst bij PPO. Dit om voor een aantal bedrijven met een besmette partij in 2012 toch te onderzoeken of in andere partijen op het bedrijf met deze methode toch vroegtijdig stengelaaltjes konden worden aangetoond. De resultaten hiervan staan beschreven in Hoofdstuk 5.

5 2012 - het toetsen van tulpenuitschotbollen op besmette bedrijven

5.1 Inleiding

Door de problemen met de mijten was het toetsen van de oorspronkelijk 20 partijen op twee bedrijven bij en door telers niet mogelijk. Een beperkt aantal partijen (tien in totaal) is op kleine schaal getoetst bij PPO. Het doel hierbij was om de ervaringen met de toets te vergroten, mogelijk andere bottlenecks te onderkennen en te zien of mogelijk toch op een besmet bedrijf in een goed gekeurde partij stengelaaltjes met de toets konden worden aangetoond.

5.2 Materiaal en methode

5.2.1 Het toetsen van praktijkpartijen

Van enkele bedrijven waar in het jaar 2012 door de BKD een stengelaaltjes-besmetting was aangetroffen werden van een aantal "gezonde" partijen uitschotbollen verzameld. In totaal ging het hierbij om 10 partijen, waaronder ter controle van de toets twee partijen met een besmetting. De bollen werden in gaasballen van 60x80 cm gepakt en volgens protocol getoetst op de aanwezigheid van stengelaaltjes (Zie bijlage I). In plaats van te werken met palletboxen werd er voor de partijen 1 t/m 9 gewerkt met metselkuipen met een inhoud van 80 L om de bollen in onder water te zetten. Voor partij 10 werd gewerkt met palletboxen. Afhankelijk van de problemen die voor een partij met mijten of grond werden verwacht, werden partijen facultatief voorgespoeld. Het aantal uitschotbollen bij het toetsen varieerde tussen de 900 en 7100 stuks. Binnen dit experiment is zowel leverbaar als plantgoed uitschot getest. Analyse van het pellet vond plaats bij Blgg AgroXpertus.

Tabel 11. *Overzicht van het uitschot getoetst in de praktijktoetsing*

Partij nr.	Voorspoelen	Materiaal	Aantal bollen
1	Ja	leverbaar	1353
2	Ja	leverbaar	988
3	Neen	plantgoed	2788
4	Neen	plantgoed	3471
5 ¹	Neen	leverbaar	1410
6	Ja	leverbaar	971
7	Ja	plantgoed	7142
8	Ja	leverbaar	991
9	Ja	leverbaar	1146
10A ²	Neen	leverbaar	3000
10B ²	Neen	leverbaar	3000

¹ = partij met een door de BKD vastgestelde stengelaaltjes besmetting, geen uitschot;

² = partij met een stengelaaltjes besmetting vastgesteld tijdens de export keuring
Betreft geen uitschot. Getoetst zijn 2 submonsters (A en B) van elk 3000 bollen.

5.2.2 Het toetsen van kunstmatig besmette partijen

Uitschot van een gezonde partij werd verdeeld over zes behandelingen. Bij deze bollen werden aan de verschillende gaasballen verschillende aantallen stengelaaltjes zieke tulpen- of narcisbollen toegevoegd. Het aantal met stengelaaltjes besmette tulpenbollen dat gebruikt kon worden voor deze experimenten was beperkt tot 4 stuks. Om toch een concentratiereeks te kunnen testen is het overgrote deel van de experimenten uitgevoerd met stengelaaltjes zieke narcissen. Aan de partijen zijn 3, 6 of 10 zieke tulpen of narcisbollen toegevoegd. Dit komt overeen met het aantonen van één zieke bol op respectievelijk 1000, 500 en 300 bollen in een monster. Bollen werden niet voorgespoeld en zijn volgens het protocol uit Bijlage I getoetst.

5.3 Resultaten

5.3.1 Het toetsen van partijen uit de praktijk voor een stengelaaltjes besmetting

In de eerste week van oktober 2012 zijn 10 partijen afkomstig van drie verschillende bedrijven volgens het ontwikkelde protocol getoetst. Het aantal te testen bollen (de monstergrootte) lag voor de verschillende partijen tussen de 971 en 7142 stuks. In theorie zou bij een homogene besmetting met deze monstergroottes en een 5 % faalkans respectievelijk één besmette bol op 250 en 2000 bollen aangetoond moeten kunnen worden. Met 3000 bollen zou theoretisch een besmetting van één zieke bol tussen 1000 gezonde bollen aangetoond moeten kunnen worden. Echter de praktijk leert dat een stengelaaltjes besmetting normaliter niet homogeen door een partij heen zit.

Tabel 12 toont voor verschillende partijen de toets uitslagen. Een aantal partijen werd voorgespoeld gezien de verwachte problemen met mijten en/of grond. Partij 1, 2 en 7 leverde hierbij ook na voorspoelen nog problemen in de procedure door verstopping van de zeven danwel vanwege het aanwezig zijn van een groot pellet tijdens de DNA extractie.

Tabel 12 *Het toetsen van leverbaar- en plantgoed uitschot op praktijkpartijen*

Partij nr.	Voorspoelen	Materiaal	Aantal bollen	Aantal stengelaaltjes ³	Opmerkingen
1	Ja	leverbaar	1353	0	Mijten
2	Ja	leverbaar	988	0	Mijten
3	Neen	plantgoed	2788	0	
4	Neen	plantgoed	3471	0	
5 ¹	Neen	leverbaar	1410	5	
6	Ja	leverbaar	971	0	
7	Ja	plantgoed	7142	0	Mijten
8	Ja	leverbaar	991	0	
9	Ja	leverbaar	1146	0	
10A ²	Neen	leverbaar	3000	11143	
10B ²	Neen	leverbaar	3000	23023	

¹ = een partij tulpen met een door de BKD te velde vastgestelde lichte stengelaaltjes besmetting (geen uitschot);

² = Leverbare tulpen (geen uitschot) afgekeurd bij de exportkeuring. Deze is getoetst in 2 herhalingen (A en B)

³ = Aantallen stengelaaltjes zijn berekend met een methodiek, die Ct-waarden naar aantallen omrekent. Deze methodiek is voor deze matrix nog niet gevalideerd.

Tabel 12 toont, dat ondanks voorspoelen mijten toch een probleem vormden (Partij nrs. 1, 2 en 7). Stengelaaltjes werden aangetoond in de controle partijen 5 en 10. In de overige partijen zijn geen stengelaaltjes aangetoond. Voor twee van deze partijen (3 en 9) werd in het onverdunde monster wel een hoge Ct-waarde gevonden, maar deze verdween bij het testen van de verdunning. Deze hoge Ct-waarde lag buiten de grenswaarde voor een besmetting en kan verklaard worden door remmende stoffen in het monster. Gezien het gebrek aan ervaring met deze toets en de nieuwe matrix kan echter niet volledig worden uitgesloten, dat in deze partijen toch een enkele

stengelaal aanwezig was. Het blijven volgen van de bedrijven in 2013 kan hierin mogelijk meer duidelijkheid geven.

5.3.2 Het toetsen van kunstmatig besmette partijen

Om te toetsen of een besmetting met één zieke bol op 1000 bollen kon worden aangetoond, werden aan 3000 tulpenuitschot bollen vrij van stengelaaltjes, stengelaaltjes zieke tulpen danwel narcisbollen toegevoegd. Tabel 13 toont de resultaten van dit experiment, waarbij de aantoonbaarheid werd getoetst van één zieke bol op 300, 500 en 1000 bollen. Bollen werden niet voorgespoeld.

Tabel 13 *Aantoonbaarheid van een zieke bol tussen 3000 gezonde bollen door middel van Real-time PCR*

Nr	Aantallen zieke bollen	Aantal stengelaaltjes	Opmerking
12	3 tulp (= 1 zieke bol op 1000 bollen)	784	zand
13	3 narcis (= 1 zieke bol op 1000 bollen)	3904	
14	6 narcis (= 1 zieke bol op 500 bollen)	1660	
15	9 narcis + 1 tulp (= 1 zieke bol op 300 bollen)	1120	zand
16	0	0	

Zoals uit Tabel 13 blijkt, werden in alle behandelingen (Nr.), waarbij zieke bollen aan gezonde bollen werden toegevoegd stengelaaltjes aangetoond. Dit betrof de fijne fractie. Voor twee monsters vormden zand een probleem voor de analyse. Uit de data blijkt, dat één zieke bol tussen 1000 gezonde bollen is aan te tonen.

De grove fractie wordt normaliter niet voor de analyse wordt gebruikt. De belangrijkste reden om de grove fractie niet te gebruiken is de sterke toename van het restmateriaal indien beide fracties worden geanalyseerd. In hoeverre stengelaaltjes achterblijven in de grove fractie is onderzocht voor behandeling 15. Tabel 14 toont het resultaat van de aantallen stengelaaltjes die bij monster 15 achterbleven op de grove zeef en de fijne zeef indien beiden apart werden opgewerkt.

Tabel 14 *Bepaling met Real-time PCR van de aantallen stengelaaltjes in de grove en fijne fractie*

Beh.nr.	Voorspoelen	Aantallen zieke bollen	Aantal stengelaaltjes	Opmerking
15fijn	Neen	9 narcis + 1 tulp	1120	zand
15grof	Neen	9 narcis + 1 tulp	168	zand

In dit betreffende monster gaat ±10 % van de stengelaaltjes verloren als alleen de fijne fractie wordt bemonsterd. Dit specifieke monster bevatte veel zand, dat voorkwam dat stengelaaltjes makkelijk door de grove zeef konden spoelen. Bij een schoon monster ligt dit percentage dus waarschijnlijk lager. Het verdient echter aanbeveling bij vuile monsters beide fracties te analyseren.

Om het aantal stengelaaltjes te bepalen dat niet in het te toetsen monster terecht was gekomen, zijn de zieke bollen, die aan het uitschot waren toegevoegd, na dompelen in de mistkamer gezet (Tabel 17).

Tabel 15. *Aantallen stengelaaltjes dat achterblijft in de bol na dompelen*

Partij nr.	# besmette bollen	# gezonde bollen	# stengelaaltjes	# stengelaaltjes/bol
12	3 tulp	3000	23200	7333
13	3 narcis	3000	8953	2984
14	6 narcis	3000	59033	9838
15	9 narcis + 1 tulp	3000	23581	2358

Uit Tabel 15 blijkt dat het aantal stengelaaltjes, dat niet uit de bol kruipt en dus voor analyse verloren gaat aanzienlijk is. Het percentage stengelaaltjes dat vrijkwam uit de bol door dompelen lag tussen de 3 en 30%.

5.4 Conclusie en Discussie

Uit de experimenten, waarbij zieke bollen aan gezonde uitschot tulpenbollen werden toegevoerd, blijkt dat één zieke bol tussen 1000 gezonde bollen gedetecteerd kan worden. Uit dezelfde resultaten blijkt echter ook dat het grootste deel van de stengelaaltjes niet uit de bol kruipt en verloren gaat voor analyse. Het zal sterk afhangen van de aantallen stengelaaltjes in een bol en de aantallen stengelaaltjes dat uit een bol zal kruipen of de zieke bol ook daadwerkelijk met Real-time PCR kan worden aangetoond. In een monster van 450 bollen, waaraan honderd stengelaaltjes werden toegevoegd, zijn stengelaaltjes aan te tonen; dit blijkt uit de eerdere besmettings experimenten uitgevoerd in 2011 (Tabel 8, paragraaf 3.1.2). Mogelijk dat de detectiegrens nog lager ligt. De mogelijkheid hiertoe zal echter sterk afhankelijk zijn van de hoeveelheid restmateriaal, dat in het monster aanwezig is.

In geen van de op het oog gezonde partijen, afkomstig van bedrijven met een stengelaaltjes besmetting in 2012, is een besmetting met stengelaaltjes aangetoond met de dompelmethode. Gezien het gebrek aan ervaring met deze toets kan echter niet volledig worden uitgesloten, dat in twee partijen toch een enkele stengelaa aanwezig was, gezien de hoge Ct-waarde die voor deze twee partijen werd gevonden. De hoge Ct-waarde kan echter ook door remmende stoffen in het monster zijn veroorzaakt. Voor een betere duiding van de uitslagen (negatief danwel positief) van de Real-time PCR is het belangrijk ook in 2013 de bemonsterde partijen te blijven volgen. De beide controle-partijen waren positief in de toets.

6 Algemene conclusie en discussie

6.1 Conclusie

Uitschot van tulpenbollen kan als indicator dienen voor een stengelaaltjes besmetting in een partij. Door middel van een dompelbehandeling kan een besmetting van één stengelaaltjes zieke tulpenbol op 1000 gezonde bollen worden aangetoond. De dompelmethode blijkt van de drie onderzochte methoden (dompelen, douchen en drogen) het beste toe te passen om stengelaaltjes vrij te maken uit het bolmateriaal. Deze methode vereist de minste handelingen en levert de hoogste efficiency voor het vrijmaken van de stengelaaltjes uit besmette bollen.

De dompelmethode is met tien praktijkpartijen in 2012 in de praktijk getoetst. Dit ging om partijen van bedrijven waar eerder dat jaar tijdens de teelt te velde in één of een paar partijen symptomen van stengelaaltjes waren gevonden. In twee partijen met een bekende besmetting werden stengelaaltjes aangetoond. In de overige acht, die ook op het veld symptoomloos waren, werd geen besmetting met stengelaaltjes aangetoond. Tijdens het toetsen van de praktijkpartijen bleek, dat grond en mijten problemen kunnen geven voor de toets. Deze bleken lastig te scheiden van de stengelaaltjes in het monster. Het ging hierbij vooral om partijen met veel zuur. Om de toets ook daadwerkelijk te kunnen gebruiken zal voor dit probleem eerst een oplossing moeten worden gevonden.

6.2 Discussie

6.2.1 Vergelijking van de toets methoden

Om stengelaaltjes vrij te maken uit de bollen zijn verschillende methoden toegepast. Deze methoden waren het douchen, dompelen of drogen van de bollen. In het onderzoek werden deze drie methoden gecombineerd met een zeer gevoelige moleculaire PCR toets. Deze was reeds ontwikkeld en in gebruik bij Bggg AgroXpertus en zou moeten leiden tot een werkbare en gevoelige toets om stengelaaltjes in het uitschot van tulpenplantgoed te kunnen detecteren.

De gehele toets (voorbewerking van de bollen en PCR) diende hierbij te voldoen aan de volgende criteria:

- Een hoge gevoeligheid voor het aantonen van de stengelaaltjes (één zieke bol op 1000 bollen moest aangetoond kunnen worden).
- Robuust en reproduceerbaar (= betrouwbaar)
- Een deel van het werk aan voorbereidingen zou door de teler gedaan moeten kunnen worden. Dit om de kosten van de toets te beperken, die maximaal op €350,- tot €500,- zijn vastgelegd. Dit is inclusief de voorbereiding bij de teler op het bedrijf.
- Binnen de toets moesten enkele duizenden bollen tegelijk binnen een monster getoetst kunnen worden. Dit omdat het aaltje soms pleksgewijs voorkomt en hierdoor de kans bij een beperkt aantal bollen op detectie afneemt.

Van de drie methoden bleek de pilot met het dompelen van bollen het meeste perspectief te bieden om verder te ontwikkelen. Douchen had als nadeel dat de stengelaaltjes niet efficiënt uit de bol vrij kwamen (zie §2.1.2). Bij drogen van bollen bleek het aantal bollen te klein, dat binnen een monster getoetst kon worden (zie §2.3.1.3). Dit naast de hoge kosten van het drogen en de beperkte mogelijkheden om de voorbereidende handelingen voor een dergelijke toets grotendeels op het bedrijf uit te voeren.

De bekerglasopstelling uit paragraaf 2.2.1, waarin individuele bollen voor maximaal drie dagen onder water werden gezet, liet zien dat 18-52 % van de stengelaaltjes gedurende de eerste twee dagen vrij kwam uit de bol. Dit liet zien dat dompelen een goede methode zou kunnen zijn. De omstandigheden waren niet geheel gelijk aan de latere gebruikte opstelling met 500-3000 bollen in een monster, aangezien het water in de bekerglasproef dagelijks werd afgegoten en ververs (om de stengelaaltjes, die vrij waren gekomen op te vangen en te kunnen tellen). Bovendien werden de bollen in deze opstelling ontdaan van hun huid en ging het in de opstelling om één enkele bol, waardoor zuurstofgebrek geen probleem was. Het gebrek aan zuurstof door de aanwezigheid van grote aantallen ademende bollen is waarschijnlijk één van de belangrijkste redenen, waardoor stengelaaltjes na een bepaalde tijdsduur niet meer vrij zullen komen uit de bol en dus verloren zullen gaan voor de toets. Een tweede belangrijke factor is de oppervlakte waaruit de aaltjes vrij kunnen komen door uit de bol te zwemmen.

De resultaten lieten echter zien dat een redelijk percentage van de stengelaaltjes middels dompelen vrij kon komen uit de bol en hiermee het dompelen van bollen als methode om stengelaaltjes vrij te maken uit de bollen mogelijk was. Voor de toets was het hierbij niet direct nodig, dat alle stengelaaltjes vrijkwamen (hoewel natuurlijk hoe meer hoe beter) aangezien de PCR toets die op dit materiaal werd gedaan zeer gevoelig is en een bol vaak hoge aantallen stengelaaltjes bevat.

Het toetsen met de dompelmethode van een klein monster (max. 500 bollen) liet in de pilot uit 2011 goede resultaten zien. Zowel het toevoegen van "losse" stengelaaltjes als stengelaaltjes zieke bollen (max. één zieke bol op 100 bollen) leidden tot een positieve toets uitslag (zie paragraaf 2.2.3.2). Daarnaast werden met de toets stengelaaltjes aangetoond in monsters van partijen met een bekende visuele besmetting. Dit toont aan dat het met de ontwikkelde toets mogelijk is een natuurlijke besmetting in een monster te detecteren. Het stuk maken van bollen voordat deze onder water werden gezet bleek niet nodig en geen extra positieve bijdrage te geven (zie paragraaf 3.1.2). Het stuk snijden van de bollen vooraf aan het dompelen heeft daarnaast ook een belangrijk praktisch bezwaar. Het is een extra handeling, die bewerkelijk is en daardoor ook niet goed in te passen in de werkzaamheden op het bedrijf in de betreffende periode.

6.2.2 Mogelijkheden tot opschaling

Op basis van de positieve resultaten uit 2011 werd een werkprotocol opgesteld voor het toetsen van een grotere hoeveelheden. Een samenvatting van deze methode staat hieronder puntsgewijs weergegeven. Voor het gehele protocol zie Bijlage I.

Werkprotocol:

- Uitschot van tulpenplantgoed wordt in gaasballen verpakt en in een pallet box onder water gezet.
- Na twee dagen worden de gaasballen na spoelen uit het water gehaald en weggegooid.
- Na één extra dag, waarin de aaltjes de kans hebben naar de bodem te zakken, wordt het water tot een dun laagje op de bodem gereduceerd door het bovenste gedeelte af te tappen.
- Het water op de bodem met de aaltjes wordt over zeven gefilterd en geanalyseerd met Real-time PCR.

Het opschalen naar grotere hoeveelheden bollen niet haalbaar met deze methode. Het toetsen op grote aantallen bollen is echter noodzakelijk voor een betrouwbare en gevoelige toets. De belangrijkste bottleneck voor het niet kunnen toetsen met grote aantallen is de hoeveelheid restmateriaal. Dit restmateriaal zorgt voor grote problemen op het moment dat meer dan 500 leverbare tulpenbollen worden getoetst. Restmateriaal kan zijn zand of mijten, maar ook gom van zure bollen. Van deze drie lijkt gom voor de minste problemen te zorgen. De problemen die door een te veel aan restmateriaal ontstaan zijn de volgende:

- De zeven raken snel verstopt, waardoor deze regelmatig moeten worden afgespoeld
- Een deel van de stengelaaltjes gaat verloren voor analyse, doordat zij door het restmateriaal worden gehinderd om door de grove zeef te spoelen.
- De hoeveelheid materiaal om te lyseren wordt groter en maakt het splitsen van monsters in submonsters nodig. Dit maakt de toets duur.
- Bij veel grond wordt de PCR reactie geremd. Hierdoor komen mogelijk positieve monsters toch negatief uit de PCR.
- Bij een monster met relatief veel restmateriaal (bv mijten) en relatief weinig stengelaaltjes wordt het stengelaaltjes DNA sterk verdund en kan hiermee onder de detectiegrens komen.

Voorspoelen vermindert de hoeveelheid restmateriaal (Tabel 10, paragraaf 4.3.2). Echter, bij grote aantallen mijten, die zeker zijn te vinden in uitschot dat zwaar is aangetast door zuur, is het effect onvoldoende. Daarnaast zal bij voorspoelen ook een deel van de stengelaaltjes met het voorspoelwater meegaan. Deze gaan verloren voor de toets. Dit aantal is echter relatief klein. Voor de afvoer van het voorspoelwater en de hygiëne op het bedrijf moet men hiermee echter wel terdege rekening houden. Men dient zich bewust te zijn, dat ook in dit spoelwater stengelaaltjes kunnen zitten.

6.2.3 Toetsverbetering

De meerwaarde van een toets op uitschot van plantgoed blijft. Tijdens de looptijd van het project bleek het echter niet mogelijk een betrouwbare toets op te leveren. Desalniettemin blijkt de ontwikkelde methode gevoelig. Eén zieke bol tussen 1000 gezonde bollen kon worden aangetoond. De grootste bottleneck vormt de grote hoeveelheid restmateriaal (mijten, grond) en het ontbreken van een goede methode om de stengelaaltjes hiervan te scheiden. Hiervoor zal eerst een oplossing gezocht moeten worden voor de toets ook in de praktijk en routinematig is in te zetten.

Daarnaast zal een oplossing gezocht moeten worden voor het dompelwater. Dit water kan residuen bevatten van chemische stoffen die tijdens de bewaring van de bollen worden gebruikt ter bestrijding van onder meer mijten. Bij het onder water zetten van de bollen komen deze residuen vrij. Hieruit volgt, dat het dompelwater als chemisch afval moet worden afgevoerd. Hetgeen erg kostbaar is.

Ook zonder betrouwbare toets op het uitschot van tulpenplantgoed staan de teler verschillende maatregelen ter beschikking om te proberen zijn teelt te vrijwaren van deze ziekte. Deze maatregelen kunnen een besmetting echter niet altijd voorkomen. Ontwikkeling van een aanvullende toets blijft dus ook voor de toekomst gewenst.

7 Communicatie en Output

- 12 oktober 2011- Toelichting resultaten vooronderzoek bij KAVB *Ditylenchus dipsaci* commissie
- 8 december 2011 - Bijeenkomst begeleidingscommissie onderzoek stengelaaltjes
- 10 februari 2012 - Poster en uitleg op Kennismiddag PPO in Lisse
- 15 febr. 2012 - Lezing stengelaaltjes samen met Martin van Dam op BolleNoord voor de AJK
- 23-27 september 2012 - Abstract en posterpresentatie 31st International symposium of the European society of nematologists (ESN), Adana (Turkije)
- 21 okt 2012 - Lezing stengelaaltjes voor studiegroep Julianadorp
- Januari-februari 2013 - negen lezingen voor spuitlicentiebijeenkomsten in Lisse, Julianadorp, Breezand, De Koog, Wognum, Limmen en Voorhout.



Partij-toets voor stengelaaltjes in tulp

Robert Dees¹, Joop van Doorn¹, Peter Vreeburg¹, Peter Veenhuizen², Renske Landeweert²
robert.dees@wur.nl; joop.vandoorn@wur.nl

Inleiding

Jaarlijks worden er tijdens veld en exportkeuringen bij tulpen partijen gevonden die zijn aangetast door het tulpenstengelaaltje en moeten worden vernietigd. Onderscheid tussen aaltjeszieke bollen en bollen aangetast door andere ziekten (bijvoorbeeld zuur) is bij uitzoeken soms lastig. In samenwerking met Blgg AgroXpertus werkt PPO aan de ontwikkeling van een praktijktoets om stengelaaltjes in tulpenuitschot te detecteren. Het doel: het vroeg detecteren van een besmetting van stengelaaltjes in plantgoed.

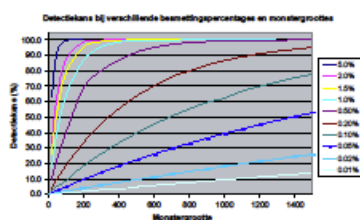
Voorwaarden van de toets:

- deels op het bedrijf zijn uit te voeren
- eenvoudig van uitvoering
- gevoelig
- geschikt voor grote aantallen bollen
- uitslag moet binnen een aantal weken bekend zijn

Principe boltoets

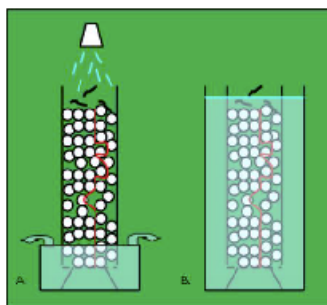
- Voor de toets worden uitschotbollen gebruikt
- Bollen worden op bedrijf onder water gezet (~2 dagen)
- Bollen worden uitgehaald en water wordt voor 24 uur weggezet om te bezinken.
- Bovenste deel wordt afgetapt, waarna de prut met eventuele aaltjes wordt aangeleverd voor toetsing.
- Detectie van stengelaaltjes vindt plaats met een moleculaire DNA toets op het lab.

Monstergrootte vs. detectiekans



Resultaten 2011

- Twee methoden zijn getest: douchen en dompelen
- Stengelaaltjes konden met de dompelmethode worden aangetoond in een monster van ± 500 gezonde bollen na toevoegen aan het monster van stengelaaltjes of enkele zieke bollen.
- Stengelaaltjes zijn met de dompelmethode aangetoond in uitschot afkomstig van besmette praktijkpartijen.



Geteste proefopstellingen: douchen (A) en dompelen (B)

Plannen 2012

- Bepalen gevoeligheid van de toets
- Opschalen monstergrootte in de toets
- Toetsen van verdachte partijen voor twee bedrijven

¹ Praktijkonderzoek Plant & Omgeving
Postbus 95, 2160 AD Lisse
Tel: 0353-462121
E-mail: info@wur.nl
Internet: www.ppo.wur.nl

Productschap Tuinbouw

BLGG AGROXPERTUS



² Blgg AgroXpertus
Postbus 170, 6700 AD Wageningen
Tel: 088- 976 1010
E-mail: info@blggagroxpertus.nl
Internet: blgg_agroxpertus.nl

Poster opendag, 10 februari 2012



Swim and sink: testing bulb lots for *Ditylenchus dipsaci*

Robert Dees¹, Joop van Doorn¹, Lia Sibbel², Peter Veenhuizen², Anne Sophie van Bruggen³ and Peter Vreeburg¹

Introduction

The stem nematode *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev is a major threat to flower bulb cultivation. This quarantine pest, mentioned on the EPPO A2 list, is one of the most devastating plant parasitic nematodes and causes major economic losses due to the extensive phytosanitary measures to be taken. *D. dipsaci* can infect e.g. *Narcissus*, *Hyacinthus*, *Allium*, *Tulipa* and closely related ornamentals. To cure infested bulbs, in some cases a heat treatment might be feasible; disinfecting soil is possible by using long term fallow, using chemicals or applying inundation. At the moment field inspections are carried out to detect infested bulb lots. If infested bulb lots can be detected before planting, infestation of bulb fields is prevented. A method for this early detection of *D. dipsaci* in bulb lots is presented.

Objective

This project aims to develop a simple, cheap and sensitive method to analyse large quantities (thousands) of tulip bulbs for (latent) infection of this nematode on farm within two weeks.

Experimental design

Pilot experiments were performed to test bulb lots for the presence of *D. dipsaci*:

- Tulip bulbs with a suspected infection were submerged in water (Figure 1). After a few days bulbs were discarded and the sediment was analysed for the presence of *D. dipsaci* either by microscope or with real time PCR.
- This set up was also used for spiking experiments using healthy bulb lots to which infected tulip bulbs or individual nematodes were added (Table 1).
- Detection of *D. dipsaci* was done by microscope and by (real time) PCR (Blgg AgroXpertus).



Figure 1. Experimental setup to assess suspected bulb lots for the presence of *Ditylenchus dipsaci*. To trace the nematode specific conditions are required to reduce the influence of rest material in the samples to be tested.



Figure 2. Pallet box used for the storage of flower bulbs, which can contain thousands of bulbs. These amounts will be tested in practice.

Results

Table 1. Recovery of *D. dipsaci* in spiked tulip samples as assessed by microscope and real time PCR. Samples were spiked either with individual nematodes or infested tulip bulbs.

Nr.	Batch size	Number of added		M	Real time PCR Ct-value	Estimated number of <i>D. dipsaci</i> in real-time PCR
		<i>D. dipsaci</i>	<i>D. dipsaci</i> Infested bulbs			
1	450	100	xx	[pos]	xx	xx
2A	510	1000	xx	[pos]	26.09	209
2B	510	1000	xx	[pos]	26.08	245
3A	510	10000	xx	[pos]	23.19	1389
3B	510	10000	xx	[pos]	xx	xx
4A	440	xx	4	[neg]	31.67	10
4B ¹	440	xx	4	[neg]	N/A	0
5A	550	xx	6	[pos]	xx	xx
5B	510	xx	6	[pos]	24.97	442
6A ²	340	xx	xx	[pos]	25.86	687
6B ²	340	xx	xx	[pos]	26.19	413

A/B = duplo samples; S = part of sample lost during process; # = suspected tulip lot; M = by microscope; [pos] = positive; [neg] = negative; N/A = no Ct = no *D. dipsaci*; xx = not tested.

Conclusion and discussion

- It was possible to detect *D. dipsaci* in suspected tulip lots and batches to which the nematodes artificially had been added.
- *D. dipsaci* could be detected microscopically or by real-time PCR in the sediment.
- The results show that it is possible to detect a *D. dipsaci* infestation in a sample of 400-500 bulbs. Optimization is necessary.
- For practical application at the growers farm with larger volumes of tulip bulbs this method is currently under investigation.

¹ Applied Plant Science
P.O. Box 85, 2160 AB Lisse
The Netherlands.
Email: joop.vandoorn@wur.nl



Bijlage I. Werkprotocol tulpenuitschot



Verpak tulpenuitschot in gaasballen. Zorg dat bollen vrij zijn van grond en mijten.



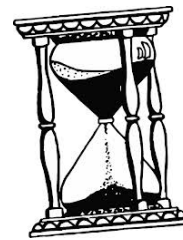
Spoel gaasballen door deze 10 x op en neer te halen in bak met water. Dit om mijten en aanhangende rommel weg te wassen.



Stapel gaasballen in een pallet box met een max. inhoud van 500 L (+/- 10-12 zakken)



Verzwaar gaasballen met extra gewicht van bv. stoeptegels. Dit om drijven van de gaasballen te voorkomen. Zorg dat het totaalgewicht aan bollen, gewichten en water het max. draaggewicht van 600 kg niet overschrijdt



2 dagen

Vul de pallet box met water. Plaats de pallet box buiten op een schaduwrijke plek. *Door de zuurstofarme omstandigheden in de kist zal er gisting met schuimvorming optreden. Zet de kist daarom niet in de volle zon.*

Laat de gaasbalen voor 2 dagen onder water staan

Controleer na een paar uur de waterstand en vul de pallet box eventueel bij met water tot alle bollen weer onder water staan. *Bij droge bollen zal het waterpeil zakken doordat ze water opnemen. De bovenste bollen kunnen hierdoor boven water komen te liggen.*



Na 2 dagen. Haal gaasbalen aantal keren heen en weer en haal deze uit het water.

Laat de gaasbalen 1 voor 1 uitlekken boven de pallet box en gooi de balen vervolgens weg



24 uur

Plaats de pallet box boven op een andere kuub kist (Dit om het bovenstaande water de volgende dag over te kunnen hevelen naar IBC vat)

Laat de pallet box met water zonder gaasbalen voor 24 uur staan. Niet korter. Dit geeft mogelijke aaltjes de tijd om naar de bodem te zinken.



Bevestig overhevelsling in de bak met bv. duck tape



Hevel het water tot **4-5 cm van de bodem** van de pallet box over in een IBC-vat. Voorkom hierbij dat het water in beweging komt. Dit voorkomt dat mogelijk aanwezige aaltjes opwervelen en worden meegezogen. *Het overhevelen van het water dient rustig te gebeuren, met een gestage stroom, omdat anders aaltjes op kunnen wervelen en mee worden opgezogen.*



Dezelfde of de volgende dag watermonsternamen door monsternemer

Bijlage II (PT 14192 TTR december 2010)

Tussentijdse rapportage

1. Datum 2 december 2010

2. Projecttitel: Aantonen tulpenstengelaaltje

3. Projectnummer PT: 14192

4. Intern projectnummer: 3236114400

5. Projectleider: J. van Doorn
Adres: Prof. van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse
Tel: 0252 - 462121
Fax: 0252 - 462100
Email: joop.vandoorn@wur.nl

6. Gewas: (indien van toepassing): tulp

7. Oorspronkelijke Looptijd project: 1 okt.2010 tot 15 november 2010 (go/no go moment)

8. Oorspronkelijke doelstelling van het project:

I. Vaststellen van de wenselijkheid en haalbaarheid van een boltoets op stengelaaltjes voor tulpenbollen bij tulpentelers en andere direct betrokkenen zoals BKD en taxatiecommissie en Blgg AgroXpertus (= go/no go voorwaarde)

II. Na vaststelling dat er behoefte is aan een toets en dat deze in principe haalbaar en uitvoerbaar is, wordt onderzoek uitgevoerd naar het bepalen van de aantoonbaarheidsgrens van stengelaaltjes in tulpenbollen en het opstellen van een protocol voor een toets in (uitschot van) tulpenbollen.

III. Alleen uit te voeren bij gebleken geschiktheid van het ontwikkelde bemonsteringprotocol, worden van 2 bedrijven die dat jaar een aantasting hebben en/of de afgelopen jaren regelmatig een besmetting hadden, uitschot van de andere partijen tulpen getoetst.

9. Periode waarover wordt gerapporteerd:

1 okt.2010- 5 november 2010

10. Korte beschrijving van activiteiten in de periode waarover wordt gerapporteerd:

- A. Het maken van een beschrijving van een toets op tulpenstengelaaltjes in visueel niet duidelijk aangetaste tulpenbollen.
- B. Nagaan wat een toets op tulpenstengelaaltjes in tulpenbollen zou gaan kosten
- C. Inventariseren van de wenselijkheid en mogelijkheden van een toets op stengelaaltjes, in visueel niet duidelijk aangetaste tulpenbollen op bedrijven met een besmetting van stengelaaltjes. Dit is uitgevoerd via een telefonische consultatie van een aantal partijen die belang hebben bij oplossingen voor en/of maatregelen tegen tulpenstengelaaltjes.

11. (Tussen-)resultaten behaald gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

A. Het maken van een beschrijving van een toets op tulpenstengelaaltjes in visueel niet duidelijk aangetaste tulpenbollen.

Bij de beschrijving van de toets en de voorgestelde handelingen op het bedrijf is ervan uitgegaan dat de toets wordt uitgevoerd op het uitschot van tulpen en dat daarin tenminste 0.1% zieke tulpenbollen (= aangetast door tsa) wordt aangetoond.

We gaan uit van een partij van 1 ha met 500.000 stuks leverbaar per ha waarbij gemiddeld 2% uitval optreedt; dit zijn 10.000 stuks bollen, veelal "zuur" (dit kan stengelaaltjes symptomen maskeren). In dit uitschot van 10.000 bollen moeten 10 zieke (= met stengelaaltjes besmette) bollen worden aangetoond. In dit rekenvoorbeeld: 0,1% in uitschot, is dus 0,02% in totaal per ha. Er zijn twee benaderingen mogelijk om de toets uit te voeren op de bollen van het uitschot; in het vervolgonderzoek zal dit verder worden uitgewerkt.

1. Dompelmethode

Uit onderzoek is aangetoond dat nematoden vrijkomen uit (al dan niet stukgesneden) tulpenbollen na onderdompeling in water. Hierbij kunnen grote aantallen bollen (1000 of meer, bv. een hele kuub kist) worden ondergedompeld; na een incubatieperiode van geschat 1-3 dagen kunnen in het waterbadbezinksel stengelaaltjes worden aangetoond via of microscopische analyse of via DNA-analyse.

In meer detail uitgewerkt:

- a. Uitgaande van 1000 bollen of een kuub kist: deze worden bv. op bedrijf in een gaasbak (of kuub kist dompelbak) in een waterbad ondergedompeld
- b. Na bv. 3 dagen wordt het bezinksel van het waterbad geogst, bijv. 50 l.
- c. Op een laboratorium wordt dit vervolgens bezinksel gefilterd; aanwezige stengelaaltjes zullen door een filter kruipen en opgevangen worden
- d. Deze laatste fractie wordt dan met de microscoop beoordeeld op aanwezigheid van stengelaaltjes, of er wordt van deze fractie DNA geïsoleerd en getest op *D. dipsaci* via een moleculaire toets (is beschikbaar).

2. Bemonstering bolbodem

Bij een tweede mogelijke aanpak worden alleen de bolbodem bemonsterd (meeste kans op stengelaaltjes) en worden deze submonsters samengebracht geanalyseerd na behandeling: levende aaltjes worden opgevangen en visueel danwel via een DNA-toets gedetermineerd.

Afhankelijk van de methode kan een deel van de voorbereiding van de bollen worden uitgevoerd door medewerkers van het bedrijf.

De hier beschreven methoden lijken perspectiefvol, maar moeten allebei eerst kritisch worden bekeken (Blgg AgroXpertus, BKD, PPO) alvorens met kleine partijen, gespiked met stengelaaltjes, experimenten worden gestart bij het vervolg van dit project.

B. Kosten van een toets op stengelaaltjes in tulpenbollen

De benodigde voorbereiding van de grote aantallen tulpenbollen uit het uitschot neemt de meeste tijd en inspanning in beslag. Dit is afhankelijk van de gekozen voorbereiding:

1. de zgn. water incubatiemethode / dompelmethode: het uitspoelen van stengelaaltjes uit (een steekproef van) het te testen uitschot in een waterbad en analyse van deze fractie, of
2. toetsen van een deel van elke bol: de bolbodem

We verwachten een prijs van 360-500€ per toets. We rekenen dan een uurprijs van 30€ voor bewerkingen als het verzamelen van het uitschot, het eventueel voorbereiden van deze bollen (stuksnijden), het dompelen in een waterbad, enz. Geschatte tijd daarvoor: 8-12 uur/ha. De toets op zich kost ongeveer 60-120€, afhankelijk van de resultaten uit het vervolgonderzoek waarin moet blijken of een microscopische analyse of een DNA-toets nodig is.

C. Inventarisatie wenselijkheid en haalbaarheid van een toets op tulpenstengelaaltjes

In de eerste fase van dit project heeft PPO nagegaan of de toets wenselijk is (zit men erop te wachten) en haalbaar is (qua prijs). Dit is een cruciale fase die op nadrukkelijk verzoek van de stengelaaltjescommissie is opgenomen in het voorstel. Ook het Bestuur van SBO heeft twijfels geuit of de telers zitten te wachten op een dergelijke toets.

Deze inventarisatie is uitgevoerd via telefonische benadering van telers en direct betrokken partijen als BKD, taxatiecommissie, zorgplichtcommissie, Productgroep tulp (voorzitter), gewasbeschermingshandel en adviseurs van DLV. De 15-18 geselecteerde bedrijven (zie tabel) waren afkomstig uit De Noord, De Zuid, Noordoostpolder en West-Friesland. Daarnaast is ook Blgg AgroXpertus als kennisdrager en uitvoerder van grondanalyse met stengelaaltjes bevestigd. De bedrijven werden geselecteerd i.s.m. de BKD uit bedrijven met en zonder een 'aaltjesverleden'. De volgende vragen zijn gesteld:

1. Heeft u behoefte aan een toets op tulpenstengelaaltjes in uitschot bij visueel niet aangetaste partijen tulpen op een bedrijf met een aantasting door stengelaaltjes?
2. Denkt u dat een dergelijke toets belangrijk is en gebruikt zal worden door de verschillende belanghebbenden?

In tweede instantie zijn 9 telers gevraagd in hoeverre de toets prijs van 360-500€ aanvaardbaar is, of een uitslagperiode van 14 dagen acceptabel is en in welke periode de uitslag bekend moet zijn.

In onderstaande tabel is weergegeven welke doelgroepen zijn ondervraagd, de aantallen geïnterviewden, het aantal malen dat men positief heeft geantwoord op de wenselijkheid van de toets en de aantallen "ja" of de toets in de ogen van de ondervraagden daadwerkelijk gebruikt zal gaan worden.

Doelgroep	Aantal geïnterviewden	Wenselijkheid toets	Gebruik toets
1. getroffen telers 2010	8	8	8
2. getroffen telers t/m 2009	5	5	5*
3. telers zonder aantasting	2 (5**)	2 (5**)	2 (5**)
4. stengelalencommissie-leden ¹⁾	5	5	5
5. adviserende personen	2	2	2

* Twijfel in geval van zeer veel partijen tulpen

** indien telers meegeteld worden die ook in de stengelaaltjescommissie zitten

¹⁾

De stengelaaltjescommissie bestaat deels uit tulpentelers

Er zijn 9 tulpentelers voor een tweede keer benaderd (waarvan 4 niet op zand telen). Zij zijn bevestigd over de prijs, de toets periode en het tijdstip waarop de uitslag bekend moet zijn:

- Allen waren positief, met de kanttekening dat de toets duur is.
- Geopperd wordt deze toets deels uit de algemene middelen te betalen.
- Men vindt het een goede zaak het voorwerk (uitzoeken, dompelen) zelf te kunnen uitvoeren om de uitgaven te drukken.
- Men wil in de toetsing ook graag uitschot van het plantgoed meenemen.
- De toetsperiode van 2 weken is akkoord.
- Men wil de uitslag voor 1 oktober hebben.
- Een aantal telers worstelt met de vraag of deze toets verplicht zou moeten worden.
- De consequenties van deze toets moeten goed overwogen en besproken worden.

Opmerkingen die tijdens de interviews zijn gemaakt over toetsen en het nut van een toets:

- Alle benaderde personen vonden een toets wenselijk en zouden deze gebruiken. De onzekerheid over en angst voor verdere verspreiding binnen het bedrijf kan men hiermee verminderen.
- Een toets kan helpen bij het verminderen van de kosten op termijn. Als de toets eerder partijen opspoort dan zullen de kosten van overname aanvankelijk hoger worden, maar op termijn (veel) lager. Dit kan het draagvlak voor de overnameregeling vergroten bij telers die niet op het zand telen.
- Goede afspraken zijn nodig over de gevolgen van een uitslag met stengelaaltjes:
 - o overname plantgoed?
 - o wat te doen met het leverbaar dat nog op het bedrijf staat of al bij de handel staat?

- leverbaar wel voor gebruik droogverkoop en broei maar niet voor opplant na afbroei?
- krijgt de grond waar de partij op heeft gestaan alsnog een besmetverklaring (i.v.m. eventuele ontheffing voor extra gebruik metam-natrium/dazomet)?
- is men verplicht te toetsen of kan dit als thuistoets zonder inmenging van de BKD/NVWA worden ingezet?
- Wat zijn de kosten van een toets en wie betaalt die (telerbelang en/of vakbelang)?
- Bij telers met een zeer groot aantal partijen lopen de kosten sterk op, dus verstandig omgaan met de keuze van wat wel en wat niet toetsen (indien herkomst besmetting duidelijk is, zoals nieuw aankoop of grondbesmetting).
- Wat is de betrouwbaarheid van de toets?
- Kan de toets ook gebruikt worden voor meer zekerheid bij aankoop van plantgoed?

12. Producten opgeleverd gedurende de periode waarover wordt gerapporteerd:

In deze fase van het project zijn geen producten opgeleverd.

13. Confrontatie van de uitgevoerde activiteiten met oorspronkelijk projectplan en fasering (gehele project tot op moment van rapportage):

De resultaten van deze inventarisatie worden in de stengelaaltjescommissie besproken en daar zal een besluit worden genomen over het wel of niet ontwikkelen van een toets. De inventarisatie is uitgevoerd conform de afspraak in het projectvoorstel.

14. Confrontatie met de go/no-go criteria uit het oorspronkelijke projectplan.

Criteria voor een "go" na fase 1: er moet behoefte zijn aan de toets, de toets moet een lage besmetting aan kunnen tonen en de te verwachten kosten moeten acceptabel zijn. Dit ter beoordeling aan de stengelaaltjescommissie.

Er is vastgesteld dat alle ondervraagden een behoefte signaleren aan een dergelijke toets en de kosten hoog, maar acceptabel vinden. De ondergrens die voorgesteld wordt (tenminste 0,1% in uitschot) lijkt in de gestelde aanpak door PPO haalbaar, maar vereist uiteraard onderzoek. De te verwachten kosten van de toets op zich (een DNA-toets) zullen niet hoog zijn (60-100€, gebaseerd op kosten bij de Blgg AgroXpertus); de benodigde voorbereiding van de grote aantallen tulpenbollen neemt meer tijd en inspanning in beslag maar kan op bedrijf worden uitgevoerd en daarmee de uitgaven drukken. De verwachte prijs bedraagt 360-500€ (inclusief DNA-toets), afhankelijk van de gekozen voorbereiding: toetsen van een deel van elke bol, de bolbodem, danwel wel het toetsen van het bezinksel van het waterbad (zgn. waterincubatie: het uitspoelen van stengelaaltjes uit (een steekproef van) het te testen uitschot in een waterbad en analyse van deze fractie). Dit moet blijken uit het vervolgonderzoek in overleg met Blgg AgroXpertus die heeft toegezegd te willen meedenken en hun DNA-toets op stengelaaltjes ter beschikking te stellen voor dit onderzoek.

15. Voorgestelde activiteiten voor de komende periode:

In de komende periode moet een protocol voor een toets in (uitschot van) tulpenbollen worden opgesteld en de gewenste aantoonbaarheidsgrens van stengelaaltjes in tulpenbollen behaald worden. Een tweede "go" is dan nodig voor het vervolg (voorjaar 2012). De toets moet dan voldoen aan de criteria van voldoende gevoelig en uitvoerbaar voor max. 500€. Van 2 bedrijven die dat jaar een aantasting hebben en/of de afgelopen jaren regelmatig een besmetting hadden, zal dan uitschot van de andere partijen tulpen getoetst worden.

16. Zijn er belangrijke wijzigingen in de uitvoering van het project die leiden tot verschuivingen in de financiering binnen het oorspronkelijke projectplan en budget? Zo ja kort toelichten.

Er zijn geen wijzigingen geweest in de eerste fase van dit project.

17. (Alleen in te vullen door afd. Onderzoek PT).

Opmerkingen van de onderzoek coördinator t.b.v. de begeleidingscommissie.