

Ecologie stengelaaltjes

Peter Vreeburg, Robert Dees (tot 14/3/2014), Joop van Doorn (tot 1/9/2013) en Astrid de Boer

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving,
onderdeel van Wageningen UR
Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit
PPO nr. 3236115500/PT nr. 14876
September 2014

© 2014 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.

Projectnummer: 3236115500

PT14876

De bloembollensector investeert in dit project via het Productschap  Tuinbouw

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

Adres : Postbus 85, 2110 AB Lisse
: Prof. Van Slogterenweg 2, Lisse
Tel. : +31 252 2121
E-mail : info.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

Samenvatting.....	5
1 INLEIDING	7
2 HANDHAVING VAN STENGELAALTJES POPULATIES.....	9
2.1 <i>In vitro</i> kweek van stengelaaltjes op schijven winterpeen	9
2.1.1 Materiaal en methode winterpeenschijfjes	9
2.1.2 Resultaten	9
2.1.3 Samenvatting resultaten en discussie winterpeenschijfjes	10
2.1.4 Conclusie winterpeenschijfjes	10
2.2 Kweek en instandhouding van stengelaaltjes populaties op stelen van veldboon en tulp	11
2.2.1 Materiaal en methode veldboon en tulp.....	11
2.2.2 Resultaten veldboon.....	12
2.2.3 Resultaten tulp.....	14
2.2.4 Samenvatting resultaten en discussie veldboon en tulp	14
2.3 Conclusie handhaving populaties stengelaaltjes	15
3 KARAKTERISERING STENGELAALTJES	17
3.1 Verzamelen van stengelaaltjes populaties	17
3.2 Rasidentificatie door AFLP en Whole Genome Sequencing	17
3.3 Conclusie karakterisering stengelaaltjes	18
4 RASSEN ONDERSCHIED DOOR BOLTOETS OF KASTOETS	19
4.1 Alternatieve boltoets	19
4.1.1 Materiaal en methode boltoets.....	19
4.1.2 Resultaten boltoets	19
4.1.3 Samenvatting resultaten en discussie boltoets	21
4.2 Kastoets	22
4.2.1 Materiaal en methode kastoets	22
4.2.2 Resultaten kastoets	23
4.2.3 Samenvatting resultaten en discussie kastoets.....	24
4.3 Conclusie rassenonderscheid door boltoets of kastoets.....	25
5 AANBEVELINGEN.....	27

Samenvatting

Bij een besmetting met stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*) in bolgewassen is de economische schade groot, omdat het een quarantaine-organisme betreft. Binnen deze aaltjessoort zijn verschillende rassen te onderscheiden, met elk een andere waardplantenreeks. Het tulpenstengelaaltje heeft de breedste waardplantenreeks en is daarmee ook het meest gevreesde ras.

Om onderzoek te doen naar de overleving, verspreiding en bestrijding van stengelaaltjes, zijn technieken nodig voor rassenidentificatie, in stand houding en vermeerdering van de aaltjes. Het ontbreken van geschikte technieken vormt een grote belemmering voor het onderzoek. Dit project heeft nieuwe methoden opgeleverd voor de bewaring en detectie van (tulpen-)stengelaaltjes.

Voor het in stand houden van levende aaltjespopulaties is in de literatuur een methode beschreven met schijfjes winterpeen. Deze methode is getest met stengelaaltjes uit bolgewassen en bleek ongeschikt. Vermeerdering en in stand houding van de stengelaaltjes lukte wel op gedroogde, aangetaste stengels van tulp en veldboon, tot minimaal 15 maanden.

Voor het aantonen van tulpenstengelaaltjes werd in het verleden een boltoets met tulp gebruikt, maar deze toets voldeed niet. In dit project zijn diverse andere toetsmethoden uitgetest met verschillende gewassen, ontsmettingsbehandelingen, inoculatietechnieken en tijdstippen. Een methode met pottulpen, broeitulpen en een boltoets met hyacint en narcis kunnen geschikt gemaakt worden voor het aantonen van *tulpen*stengelaaltjes. Aanvullend onderzoek is nodig om de betrouwbaarheid van deze methoden te verhogen. Afhankelijk van de tijd van het jaar kan een keuze gemaakt worden voor de kastoets of de boltoets.

Ten behoeve van het rassenonderzoek is het DNA van negen nieuwe stengelaaltjespopulaties uit verschillende gewassen (tulp, narcis, Leucojum en Phlox) verzameld en toegevoegd aan de ingevroren collectie. Met de DNA-techniek AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) is het helaas niet gelukt om rassen volledig onderscheiden. Een nieuwe methode (whole genome sequencing) biedt meer mogelijkheden, maar kon binnen dit project niet worden getest voor stengelaaltjes o.a. vanwege de hoge kosten en het ontbreken van voldoende gekarakteriseerde populaties.

1 Inleiding

Stengelaaltjes vormen een hardnekkig probleem in de bollenteelt. Het bestaan van “rassen” (= populaties binnen de soort met een kenmerkende, smalle of brede waardplantvoorkeur) wordt al lang verondersteld, maar over aard, identificatie en verspreiding is vrijwel niets bekend. Omdat het tulpenras alle bolwaardplanten aantast, terwijl bijvoorbeeld het narcissenras alleen narcisachtigen aantast, maakt het nogal een verschil met welk stengelaaltjesras men te maken heeft. Het beheersen van dit probleem zou enorm geholpen zijn als eenvoudig de identiteit van een ras zouden kunnen vaststellen. Echter, qua uiterlijk zijn deze rassen onmogelijk te onderscheiden. Reguliere moleculaire methoden stellen ons wel in staat stengelaaltjes als soort te detecteren (ook in zeer lage dichtheden), maar rassen onderscheiden is iets wat wereldwijd nog niemand gelukt is. Dit komt o.a. omdat je voor het vinden van markers (ras-specifieke stukjes DNA) pure rassen in handen moet hebben – in het verleden zijn veel voor onderzoek gebruikte populaties waarschijnlijk mengsels van rassen geweest. Een andere verklaring voor het uitblijven van succes is dat men gekeken heeft naar zogenaamde “neutrale markers”: DNA fragmenten die niets met de waardplantvoorkeur te maken hebben. Om de interactie met waardplanten goed te kunnen bestuderen, is het vaststellen van de identiteit (welk ras/subsoort) van groot belang.

Stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*) hebben een quarantaine status en veroorzaken reeds bij zeer lage dichtheden schade aan o.a. bloembolgewassen en plantuien. Ze kunnen jaren in de bodem overleven. Binnen deze nematodensoort worden rassen onderscheiden op basis van verschillende voorkeur voor waardplanten. In dit project, dat een voortzetting is van een KB – project (Kennis Basis gefinancierd voor EZ) vanaf 2010, worden in 2013 en 2014 de volgende aspecten opgenomen:

- de beschikbare populaties handhaven en zo mogelijk aanvullen en nagegaan of instandhouding ook op andere wijze kan, dan nu op een groeiend gewas
- een mogelijke verbeterde biotoets (boltoets) op rassenonderscheid
- een mogelijke gewastoets op rassenonderscheid
- eerste stappen gezet richting moleculaire ras-identificatie.

2 Handhaving van stengelaaltjes populaties

Doel: in stand houden van een grote diversiteit stengelaaltjes. De huidige levende collectie aan stengelaaltjes populaties wordt in stand gehouden door de teelt van waardplanten op bakken met daarin met stengelaaltjes besmet duinzand of klei. Deze levende collectie kan worden gebruikt als referentiepopulaties voor karakterisering, voor onderzoek naar mogelijke beheersmaatregelen of onderzoek naar waardplantbereik. Hierbij bestaan risico's dat de populatie verdwijnt of vervuult raakt door de buiten omstandigheden en de continue teelt van een gewas, waardoor ook ander ziekten op de loer liggen. Binnen het project is onderzocht in hoeverre stengelaaltjes populaties ook *in vitro* op wortel of door kweek op veldbonen of tulpen in stand zijn te houden of te bewaren.

2.1 *In vitro* kweek van stengelaaltjes op schijven winterpeen

Op basis van een artikel door Kühnhold (2006)¹ is onderzocht of een populatie stengelaaltjes uit tulp en *Leucojum* zich konden vermeerderen in wortelschijven.

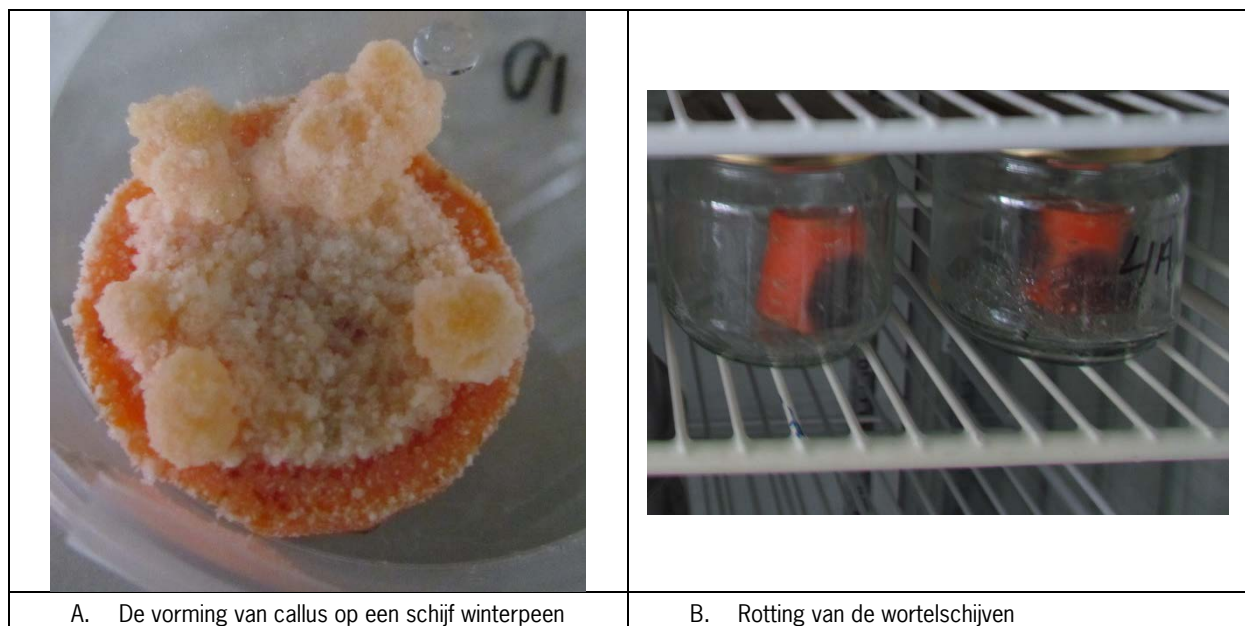
2.1.1 Materiaal en methode winterpeenschijfjes

Winterwortels uit een lokale supermarkt werden uitwendig ontsmet door deze eerst met zeep te wassen, te spoelen met kraanwater, af te doen met 70 % alcohol en vervolgens voor een half uur in een 0,5 % chloorbleek of 2% chloramine T oplossing te ontsmetten. Onder steriele omstandigheden werden de wortels in schijven gesneden van 1 cm (voor in petrischalen) of 4 cm (voor in 10 cm hoge glazen potten). Hiertoe werden zowel geschilde als ongeschilde wortels gebruikt. De petrischalen en potten werden weggezet bij 20°C om de schijven de kans te geven callus te vormen. Na drie weken werden de stengelaaltjes op de wortelschijven gebracht, waarbij per schijf 76 stengelaaltjes van een populatie uit tulp of 109 stengelaaltjes van een populatie uit *Leucojum* op de wortelschijf werden aangebracht. Als negatieve controle werd op de wortelschijven een druppeltje steriel demi water opgebracht.

2.1.2 Resultaten

Na ongeveer 3 weken vormde zich op de wortelschijven callus (Figuur 1 A). De callusvorming was echter niet eenduidig. Bij een gedeelte van de schijven werd geen callus gevormd. Daarbij rotte een aantal schijven weg (Figuur 1B). Het weggrotten was voor geschilde en ongeschilde wortelschijven gelijk, waarbij de besmetting grotendeels van binnenuit de wortel kwam. Wortelschijven die met drie weken callus vormden en op het oog gezond waren werden met stengelaaltjes geïnfecteerd en in de tijd voor de vermeerdering gevolgd. Echter ook deze schijven viel weg door rotting. Dit gold ook voor de water controle. Het experiment is herhaald met een nieuwe batch wortelen echter met een vergelijkbaar resultaat.

¹ Kühnhold, V., S. Kiewnick, R. A. Sikora (2006). Development of an *in vivo* bioassay to identify sugar beet resistance to the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. Nematology 8 (5): 641-645



Figuur 1. *In vitro* wortelcultuur

2.1.3 Samenvatting resultaten en discussie winterpeenschijfjes

Het is niet gelukt om op basis van het protocol beschreven Kühnhold (2006) met winterpeenschijfjes een *in vitro* kweek op te zetten, waarin stengelaaltjes populaties uit bolgewassen in stand konden worden gehouden. Het grootste probleem bleek hierin de latente besmetting van de wortelschijven met een schimmel, waardoor de *in vitro* kweek verontreinigd werd en het wortelweefsel wegrotte voordat de stengelaaltjes zich konden vermeerderen.

Om de methode werkend te maken zou nog veel onderzoek nodig zijn met bijvoorbeeld verschillend uitgangsmateriaal qua peen in de hoop dat er ook peen is waarbij geen rotting optreedt.

2.1.4 Conclusie winterpeenschijfjes

Winterpeenschijfjes zijn voorlopig geen geschikte methode om stengelaaltjes in stand te houden.

2.2 Kweek en instandhouding van stengelaaltjes populaties op stelen van veldboon en tulp

Van stengelaaltjes populaties uit tulp is bekend, dat zij zich kunnen vermeerderen op bonen. Voor overige stengelaaltjes rassen uit bloembolgewassen is dit niet of nauwelijks bekend. Binnen dit onderdeel is onderzocht of stengelaaltjes populaties van verschillende bolgewassen op deze manier in stand kunnen worden gehouden. Ook is onderzocht of stengelaaltjes in tulpenstelen overleven nadat de stelen zijn gedroogd. Het lang bewaren van bollen met stengelaaltjes gaat niet doordat de bollen veelal verloren gaan door aantasting en rotting door de aaltjes en/of mijten en/of door verdroging.

2.2.1 Materiaal en methode veldboon en tulp

Veldbonen

Veldbonen werden in de kas gezaaid in potgrond bij 20°C en na opkomst verspeend in 1 L potten met een diameter van 15 cm. Ongeveer drie weken na het zaaien werden de zaailingen geïnoculeerd door bij de twee oudste bladeren per bladoksel 100 stengelaaltjes aan te brengen. Het experiment werd twee keer uitgevoerd.

In **experiment 1** waren de stengelaaltjes populaties afkomstig uit tulp (2x; populaties A en F) en narcis 2x (populaties 5N en 57N). Populatie 57N bleek eerder in een waardplanttoets narcis wel, maar tulp niet aan te kunnen tasten. Stengelaaltjes werden opgelost in kraanwater, een 1,25 % w/v CMC of een 0,6 % w/v of 0,7 % w/v Gelrite oplossing. CMC en Gelrite hebben een verhoogde viscositeit t.o.v. water. De veronderstelling was, dat dit mogelijk de infectiekans van het aaltje op de plant kon verhogen. Oculaties in de bladoksel werden afgedekt met een nat wattenpropje indien de aaltjes in water waren opgelost. Bij de overige oplossingen werd de inoculatieplek niet afgedekt. Van een aantal planten werden ook aangetaste stengeldelen in stukjes geknipt, gedroogd bij 20°C in een papieren zak en daarna in een afgesloten plasticzakje in de koelkast bewaard en na ruim een jaar beoordeeld op overleving van stengelaaltjes.

In **experiment 2** waren de populaties afkomstig uit tulp (1x), narcis (2x), Leucojum (1), hyacint (1x) en Phlox (2x). Na vier weken zijn de veldbonen beoordeeld en afgeknipt. Elke behandeling bestond uit twee planten. Van één plant werd het aantal stengelaaltjes bepaald direct na afknippen voor de tweede plant na drogen. Voor het vaststellen van de aantallen stengelaaltjes in de stelen, werden deze in stukjes geknipt en voor twee dagen in de mistkamer gezet. Voor het drogen werden de stengels in een papieren zak gedaan, die voor een week bij 20°C werd weggezet. Bewaring van de gedroogde stelen gebeurde bij 6°C. De overleving werd bepaald na 15 maanden.

Tulp

Tulpenstelen besmet met twee verschillende populaties stengelaaltjes werden in stukken geknipt van 2 cm, gedroogd bij 20°C en vervolgens bij 6°C bewaard. De overleving van de stengelaaltjes werd bepaald na 1,5, 5 en 15 maanden.

2.2.2 Resultaten veldboon

Na besmetting met stengelaaltjes in de bladoksel van de veldboon werd veel aantasting waargenomen (Figuur 2. a en b).

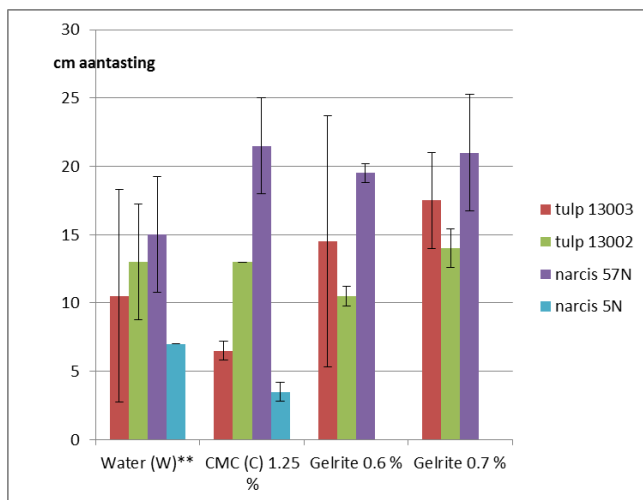
De meeste stengels vertoonden scheuringen op de plek van oculatie (Figuur 2b en 3). Narcis 5N gaf in vergelijking met de andere stengelaaltjes weinig symptomen. De aantasting zoals weergegeven in Figuur 4 geeft een momentopname. De aantasting was een week later soms iets meer en soms veel meer.



Figuur 2. Veldboon in de kas kunstmatig besmet met stengelaaltjes uit bloembolgewassen.



Figuur 3. September 2014. Links stengelstukjes van veldboon en rechts stengelstukjes van tulp, na ruim een jaar bewaring in plastic zakje in de koelkast.



Figuur 4. Mate van aantasting van stengel van de veldboon door verschillende stengelaaltjes en toevoegingen na inoculatie (op 20 juli 2013 (Narcis 5N niet toegepast met Gelrite).

Tabel 1 toont het resultaat van de tellingen van de aantallen stengelaaltjes in de stelen van veldboon vier weken na aanbrengen van het inoculum en na ruim een jaar.

Tabel 1. Aantallen stengelaaltjes in veldboon direct na het oogsten (juli 2013) en na een jaar bewaren (september 2014).

	Populatie			
Inoculum	Tulp A	Tulp F	Narcis 57N	Narcis 5N
juli 2013				
water	8040	2600	1820	n.v.t.
1,25 % CMC	3090	2180	4680	288
0.6 % Gelrite	4500	5880	4140	78
0,7 % Gelrite	8220	3150	5580	n.v.t.
september 2014				
water	n.v.t.	522	1044	n.v.t.
1,25 % CMC	1620	1332	2340	38
0.6 % Gelrite	2280	2560	3120	32
0,7 % Gelrite	2000	n.v.t.	2700	n.v.t.
Percentage overlevende stengelaaltjes na ruim een jaar				
water		20	57	
1,25 % CMC	52	61	50	13
0.6 % Gelrite	51	44	75	41
0,7 % Gelrite	24		48	

Beide populaties uit tulp hebben zich sterk vermeerderd. Ook narcis populatie 57N liet een sterke vermeerdering zien. Na inoculatie van narcis populatie 5N in CMC is het aantal stengelaaltjes licht toegenomen t.o.v. het aantal stengelaaltjes aan het begin van het experiment. Daarentegen is het aantal stengelaaltjes na inoculatie met Gelrite licht gedaald. Populatie 5N lijkt zich dus niet sterk te vermeerderen op veldbonen.

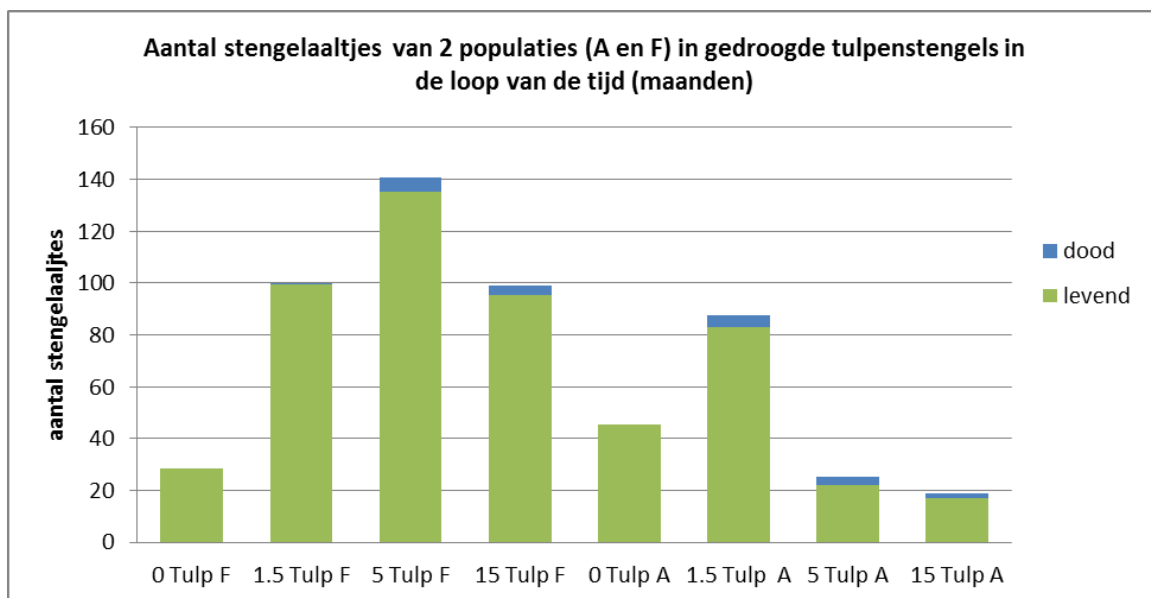
Er is geen duidelijk verschil tussen het succes op vermeerdering bij het gebruik van water, CMC of Gelrite. Het experiment is in het najaar van 2013 herhaald met tulpenpopulatie A en narcispopulatie 5N, evenals met een aantal populaties uit hyacint, Leucojum en Phlox. Dit experiment werd echter verstoord door het vroegtijdig bronsverkleuren en vervolgens vervroegd afsterven van de toetsplanten Figuur 2c. Uit dit onderzoek zijn dan ook geen betrouwbare resultaten verkregen.

Ofschoon het om andere planten gaat die juli 2013 en in september 2014 zijn beoordeeld op aantal levende stengelaaltjes, lijkt, na een jaar bewaren in gedroogde toestand in de koelkast, ongeveer de helft van de stengelaaltjes nog te leven.

Op veldboon werden ook nog enkele planten besmet met stengelaaltjes uit Phlox, Leucojum en hyacint (experiment 2). De stelen van de veldbonen werden nauwelijks aangetast en er werden ook weinig aaltjes teruggevonden. Na ruim een jaar bewaring werd dit ook bevestigd met bijna geen of weinig aaltjes die in leven waren. Niet uitgesloten is dat dit lag aan de (mogelijke mindere) vitaliteit van de aaltjes bij de start van dit onderzoek.

2.2.3 Resultaten tulp

De aantallen stengelaaltjes in de gedroogde zieke tulpenstengels zijn bepaald bij de start van het onderzoek en na 1,5 en 5 en 15 maanden. Figuur 5 toont het resultaat van deze tellingen. Daaruit blijkt dat veel stengelaaltjes, van de twee getoetste populaties, in aangetaste stengels na drogen en bewaren in de koelkast in staat zijn 15 maanden te overleven. Een duidelijke afname in de tijd was door de variatie in aantallen stengelaaltjes per plant en de beperkte opzet niet vast te stellen.



Figuur 5 Gemiddeld aantal stengelaaltjes in gedroogde tulpenstengels voor het drogen (0), en 1,5, 5 en 15 maanden na drogen.

2.2.4 Samenvatting resultaten en discussie veldboon en tulp

Populaties uit tulp en narcis blijken zich beiden te kunnen vermeerderen op veldboon. Populatie 57N bleek eerder in een waardplanttoets narcis wel, maar tulp niet aan te kunnen tasten. Onderscheid tussen tulp en narcis populaties door deze op veldbonen te zetten blijkt dus niet mogelijk.

Populatie 5N van narcis blijkt zich minder sterk te vermeerderen dan 57N. Hieruit blijkt dat er ook verschillen in populaties van narcis (of narcissenras?) te bestaan.

Na drogen van de stengelstukjes veldboon blijken stengelaaltjes na 15 maanden in de koelkast nog levensvatbaar. Dit maakt het inoculeren van veldbonen een goede methode om een levende collectie van stengelaaltjes uit bloembollen te bewaren.

Stengelaaltjes in gedroogde tulpenstengels en onder koele omstandigheden bewaard, bleken ook minimaal 15 maanden te kunnen overleven. Dit biedt perspectieven voor het voor langere tijd bewaren van stengelaaltjes uit tulp.

De vraag is hoe lang stengelaaltjes kunnen overleven in gedroogde stengels van veldboon en tulp.

Daartoe zouden gedroogde aangetaste stengeldelen nog langer moeten worden bewaard tot er geen overleving meer wordt gevonden. De overlevende stengelaaltjes zijn niet meer opnieuw op tulp of veldboon gezet om de vitaliteit te beoordelen. Dit zou nog wel moeten worden uitgevoerd om zeker te zijn dat dit een goede methode is om een populatie in stand te houden om weer te kunnen gebruiken als inoculum.

2.3 Conclusie handhaving populaties stengelaaltjes

- In stand houden van stengelaaltjespopulaties was:
 - Niet mogelijk op schijfjes winterwortel, omdat callusvorming variabel was en de wortelschijfjes weggroten
 - Minimaal 15 maanden mogelijk op geïnoculeerde veldboonstengels die na droging in de koelkast werden bewaard
 - Minimaal 15 maanden mogelijk in besmette tulpenstelen die na droging in de koelkast werden bewaard
- Veldboon is geen geschikt gewas om de verschillende stengelaaltjesrassen uit tulp en narcis te kunnen onderscheiden.
- Twee populaties uit tulp en één uit narcis vermeerderden zich sterk op veldboon, terwijl een andere populatie uit narcis zich veel minder sterk vermeerderde.

3 Karakterisering stengelaaltjes

Het in kaart brengen van de moleculaire verschillen tussen stengelaaltjes populaties uit bol- en akkerbouwgewassen is een belangrijke stap in het ontwikkelen van een betrouwbare toets voor het onderscheid van stengelaaltjes rassen. In dit project zijn nieuwe populaties verzameld en aan de bestaande collectie toegevoegd en is een oriëntatie uitgevoerd op de toepassing van whole genome sequencing als alternatief voor AFLP voor het vaststellen van ras specifieke markers.

3.1 Verzamelen van stengelaaltjes populaties

De bevroren collectie met individuele aaltjes is uitgebreid met 9 populaties afkomstig uit tulp (4x); narcis (3x), Phlox (1x) en Leucojum (1x). Dit materiaal kan gebruikt worden voor het valideren van een mogelijke PCR toets voor het onderscheiden van rassen. Voor drie populaties (2 tulp, 1 narcis) is naast individuele stengelaaltjes ook bulk materiaal verzameld. Het is niet gelukt om ook populaties uit akkerbouwgewassen te verkrijgen.

3.2 Rasidentificatie door AFLP en Whole Genome Sequencing

Met AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) is eerder de genetische variatie van verschillende stengelaaltjes populaties uit diverse bol- en akkerbouwgewassen onderzocht. Hiervoor werden over meerdere jaren stengelaaltjes verzameld uit tulp, narcis, hyacint, Phlox, aardappel, knoflook, sierui, consumptie ui en suikerbiet. Drie groepen werden geïdentificeerd:

Groep 1: Populaties uit narcis en tulp

Groep 2: Populaties uit hyacint

Groep 3: Populaties uit akkerbouwgewassen en Phlox

Dit onderzoek leverde eveneens een aantal kandidaat markers voor het ontwikkelen van een van specifieke DNA toets voor stengelaaltjes uit een groep. Binnen het voorgaande EL&I (EZ) project is geprobeerd een aantal van deze kandidaat markers te vertalen naar bruikbare markers voor een specifieke stengelaaltjes groep/ras in een DNA-toets, echter tot nu toe zonder het gewenste resultaat. Binnen dit project is onderzocht of whole genome sequencing een mogelijk alternatief zou kunnen zijn om uiteindelijk een toets te kunnen ontwikkelen.

Whole genome sequencing is een relatief nieuwe technologie die de laatste jaren steeds minder duur is geworden. Met whole genome sequencing kan de diversiteit die er op DNA-niveau tussen verschillende rassen/populaties bestaat, tot in de kleinste details zichtbaar worden gemaakt. Het voordeel is dat met deze techniek een groot aantal potentiële markers kan worden verkregen. De belangrijkste voor- en nadelen van deze techniek voor de toepassing staan in Tabel 2.

Tabel 2 Voor- en nadelen van de AFLP en Whole Genome sequencing technieken op een rij.

AFLP	Whole genome sequencing
Potentiele kandidaat markers gebaseerd op een groot aantal stengelaaltjes populaties (>20). Er zijn nog een paar potentiele kandidaten over. Het risico dat er geen bruikbare sequentie verschillen worden gevonden is echter groter dan met whole genome sequencing	Met de informatie kan een database worden opgebouwd, die is uit te breiden met informatie van andere rassen. Daarbij kan informatie relatief simpel worden omgezet in een toets.
	Doordat de DNA volgorde van het totale genoom wordt bepaald zal dit tot een groter aantal potentiele kandidaat markers leiden dan met AFLP (mogelijk te groot). Daarnaast biedt de techniek mogelijkheden tot een spin-off naar meer fundamentele vraagstelling m.b.t. de epidemiologie van stengelaaltjes. De techniek is echter nog nauwelijks voor aaltjes gebruikt.
	Er is geen referentie sequentie aanwezig.
	Op basis van een analyse op basis van 2 of 3 populaties worden altijd verschillen gevonden. De kans is erg klein dat deze meteen ook tot bruikbare markers leiden. Screening van meerdere populaties (15) uit verschillende gewassen is nodig om hieruit de juiste informatie te halen.

Op basis van deze inventarisatie, het beperkte aantal aanwezige populaties, waaronder het ontbreken van akkerbouw populaties voor whole genome sequencing en het aanzienlijke risico, dat met geen van de beide methoden bruikbare verschillen gevonden zouden worden en de hoge kosten, is besloten binnen dit project dit onderzoek niet voort te zetten. In overleg met de KAVB en PT is gekozen om het resterende bedrag in te zetten in het toepassen van tulpen en narcissen op pot in de kas na te gaan of dit eenvoudiger in te zetten is om rassen te kunnen onderscheiden (zie Hoofdstuk 4).

3.3 Conclusie karakterisering stengelaaltjes

- De collectie bevroren stengelaaltjes is met 9 populaties (uit tulp, narcis, Leucojum en Phlox) uitgebreid. Er werden geen stengelaaltjes uit akkerbouw verkregen.
- Twee methoden om stengelaaltjes beter te kunnen onderscheiden, namelijk AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) en whole genome sequencing zijn in theorie vergeleken. De laatste methode biedt wel meer mogelijkheden, maar is in overleg met KAVB en PT niet nader getest vanwege het ontbreken van voldoende gedefinieerde populaties stengelaaltjes, de risico's (nog nauwelijks gebruikt voor aaltjes) en de kosten.

4 Rassen onderscheid door boltoets of kastoets

Stengelaaltjes in bloembollen worden onderscheiden in verschillende rassen. In de praktijk wordt vaak de vraag gesteld of stengelaaltjes die in narcis of hyacint gevonden worden tulpenstengelaaltjes zijn. Immers als het stengelaaltjes van het tulpenras zijn dan kunnen alle waardplantbolgewassen worden aangetast. Voor dit onderscheid is in het verleden een boltoets met tulp ontwikkeld. Deze had veel last van *Penicillium* groei, waardoor de visuele beoordeling werd bemoeilijkt. Daarbij is de methode bewerkelijk en duurde de toets lang.

4.1 Alternatieve boltoets

Er is onderzoek gedaan naar een alternatieve boltoets, waarbij tulpenbollen vooraf werden ontsmet met chloor of Securo (300 g/l folpet +100 g/l pyraclostrobine). Securo heeft een goede duurwerking tegen o.a. *Penicillium*. Er is ook gekeken naar een andere manier van oculeren van de bol. Naast tulpen werden ook narcisbollen en zeer beperkt hyacintenbolletjes gebruikt.

4.1.1 Materiaal en methode boltoets

Bollen van tulp, hyacint of narcis werden niet of oppervlakkig gedesinfecteerd door deze voor 15 minuten te dompelen in 1,5 % Securo of 30 minuten in 2 % chloramine T oplossing en gedroogd. Na ontsmetting in chloramine zijn de bollen afgespoeld met kraanwater, daarna met demiwater nagespoeld en gedroogd. Bollen werden vervolgens besmet volgens een drietal methoden:

1. De “oude” wattenprop methode. De bollen werden hiervoor oppervlakkig verwond met een schuurpapiertje. Op het wondweefsel werden per bol 100 stengelaaltjes aangebracht, waarna de plek werd afgedekt met een vochtige wattenprop. Bollen werden voor 7 dagen bij 12°C in een geperforeerde plastic zak weggelegd. Hierna werden de bollen naar een papieren zak overgebracht en bewaard bij 20°C tot de beoordeling.
2. Plugjes methode. Met een klein boordje, werd een plugje uit de bol gehaald. Na het aanbrengen van de stengelaaltjes werd het gat opnieuw afgedicht met plakband of het plugje. Bollen werden bij 20°C weggelegd in een geperforeerde plastic zak tot beoordelen.
3. Visitatie methode. De neus werd half doorgesneden, waarna op het wondvlak de aaltjes werden aangebracht. De neus werd vervolgens weer gesloten en het wondvlak afgedicht met nagellak. Bollen werden tot beoordelen bij 20°C weggelegd in een geperforeerde plastic zak.

De stengelaaltjes, die voor dit experiment werden gebruikt waren afkomstig uit tulp, narcis (2x), Leucojum en hyacint. Het aantal stengelaaltjes van de Leucojum en de hyacint populaties was beperkt, waardoor niet alle behandelingen konden worden uitgevoerd. Per behandelingen werden ca. 4 bollen gebruikt.

Beoordeling op aantal levende stengelaaltjes was na 3 maanden, door de bollen aan stukken te snijden en 2 dagen in de mistkamer te zetten en vervolgens de stengelaaltjes te tellen.

4.1.2 Resultaten boltoets

De kunstmatig met stengelaaltjes geïnfecteerde bollen werden na 3 maanden beoordeeld op symptomen. Tabel 3 toont het resultaat van de tellingen van de behandelingen.

Tabel 3. Aantallen stengelaaltjes in de verschillende bollen na oculatie van verschillende populaties stengelaaltjes met de verschillende methoden. Beoordeling november 2013.

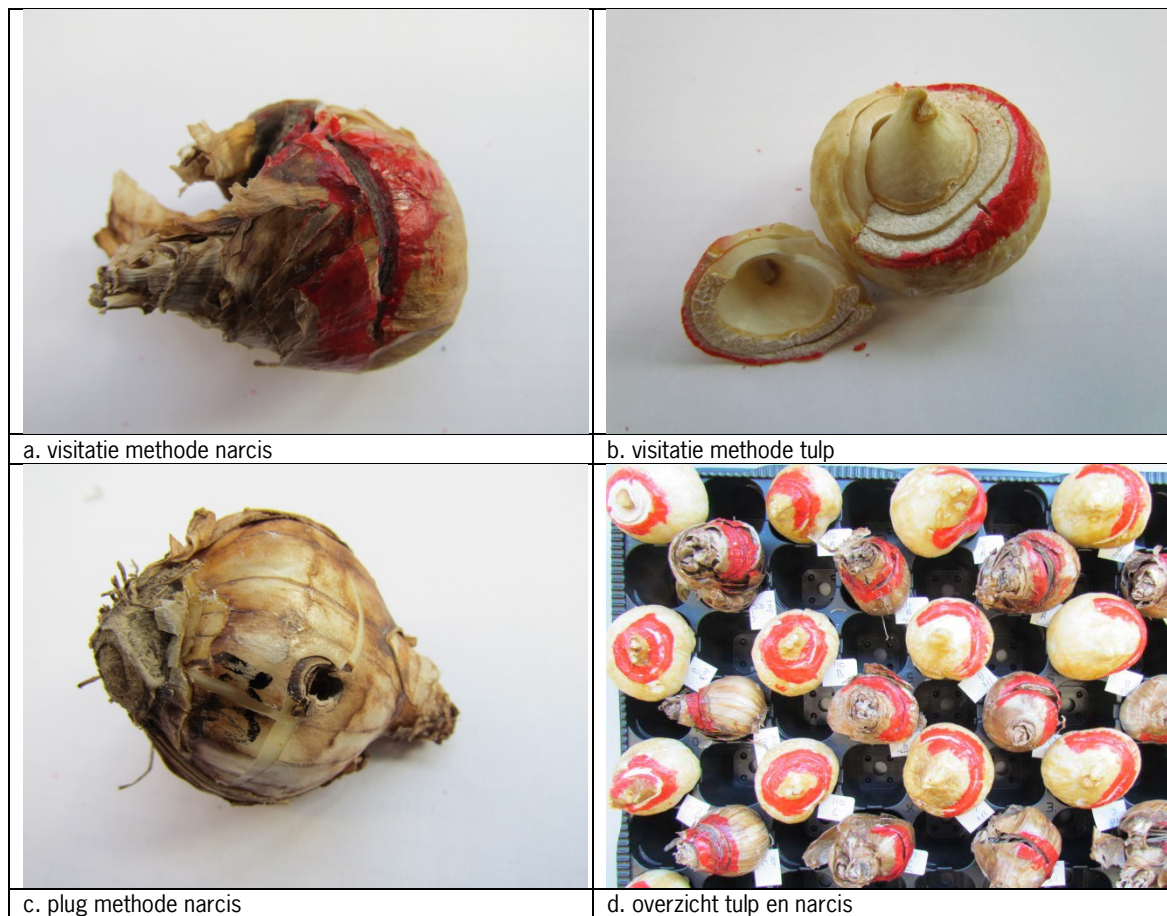
Bolmateriaal		Pop A tulp		Pop B Narcis		Pop C Leucojum		Pop D narcis		Pop E hyacint	
Gewas	Methode	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
tulp	oud	1	0	2	6	0	0	0	0	0	1
	plugje	0	0	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
	visiteren	1	1	15	101	5	0	4	26	XX	XX
narcis	oud	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
	plugje	1000	5000	2000	200	0	0	1	2	XX	XX
	visiteren	20000	1	50000	50000	0	0	1	0	XX	XX
hyacint	oud	0	5000	XX	XX	XX	XX	XX	XX	3	5
	plugje	1284	1840	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
	visiteren	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX

xx = niet uitgevoerd A en B zijn herhalingen van 1 bol.

Geen van de oculaties leidde na 3 maanden tot zichtbare symptomen aan de buitenkant van de bollen (Figuur 5). Symptomen waren wel zichtbaar in narcis nadat deze werden doorgesneden. Aangetaste bollen lieten donker bruine ringen zien. Bij de overige behandelingen en bolgewassen bleven de rokken van de bollen blank. Bij het inzetten van de proef bleek dat na het doorsnijden van de bol (visitatie behandeling) de bollen niet goed af te sluiten waren met nagellak. Bij tulp leidde dit tot het verkalken van de wondplek. Narcis bollen waren na bewaring erg droog. Desondanks werden hierin hoge aantallen stengelaaltjes aangetroffen. Bij de plug methode bleek het afdichten van de wond door plakband beter te werken dan het terugplaatsen van de plug. Tussen besmetten met een plugje of d.m.v. visiteren was geen duidelijk verschil. Ook tussen herhalingen waren de verschillen soms erg groot zoals te zien in de tabel.

Uit Tabel 3 blijkt, dat tulpenpopulatie A en narcis populatie B (57N) zich goed op narcis vermenigvuldigen. Daarnaast vermenigvuldigt tulpen populatie A zich ook op hyacint. De overleving op tulp is minimaal. Waardoor ook in de beproefde wattenproef methode de stengelaaltjes uit tulp zich niet goed vermeerderen is niet duidelijk. Ook de populatie C, D en E, respectievelijk afkomstig uit Leucojum, narcis en hyacint, doen weinig. Mogelijk speelt hier naast de omstandigheden een mogelijk mindere vitaliteit van de populaties een rol, omdat deze al voor langere tijd in de koelkast waren bewaard. Optimalisatie van de methode vereist meer onderzoek.

Ontsmetten had in dit onderzoek geen effect. Ook bollen die niet gedesinfecteerd waren met Securo of chloramine T bleven vrij van *Penicillium*.



Figuur 5 Impressie alternatieve boltoets.

4.1.3 Samenvatting resultaten en discussie boltoets

- Door het aanbrengen van stengelaaltjes op tulpenbollen, zelfs als ze afkomstig waren uit tulp, werd geen aantasting en vermeerdering van het aantal stengelaaltjes verkregen.
- Bij besmetting van bollen van narcis en hyacint werd soms wel een forse aantasting en vermeerdering waargenomen. Ook hier deden sommige populaties het echter niet goed. Mogelijk had dit met de vitaliteit van de diverse populaties te maken.
- De alternatieve boltoets op tulp zoals onderzocht en uitgevoerd binnen dit project vereist nog veel onderzoek om daadwerkelijk ingezet te kunnen worden voor het onderscheid van stengelaaltjes populaties uit bloembolgewassen. De methode die in hoofdstuk 4.2 aangegeven wordt met pottulpen biedt vooralsnog meer perspectief.

Aanbeveling:

Met narcis en hyacint zou de toets verder ontwikkeld kunnen worden, omdat stengelaaltjes uit tulp vaak wel goed vermeerderden op bollen van narcis en hyacint. Dan zou nagegaan moeten worden of een populatie uit narcis vermeerdert op hyacint en of een populatie uit hyacint vermeerdert op narcis, waarbij je dan in beide gevallen zou kunnen concluderen dat er (ook) tulpenstengelaaltjes aanwezig zijn. De beste toepassingswijze vereist ook nog meer onderzoek.

4.2 Kastoets

4.2.1 Materiaal en methode kastoets

Er zijn voorjaar 2014 twee cultivars volledig gekoelde tulp op pot aangeschaft, namelijk Inzell en Monte Carlo en daarnaast Tête-à-Tête op pot. Daarnaast zijn nog beperkt gekoelde tulpenbollen aangeschaft en op geplant op potgrond.

Verskillende stengelaaltjes populaties werden verzameld en op verschillende wijze bij de planten aangebracht, zie schema. De stengelaaltjes werden bij de tulpen in de oksel van het onderste blad aangebracht. Daarbij werd het blad al of niet licht beschadigd. Er werd bij één behandeling ook stengelaaltjes bij de steel vlak boven de bol aangebracht, waarbij iets grond ter afdekking werd gebruikt. Bij de Tête-à-Tête werden de stengelaaltjes onderin tegen de hoofdsteel vlak boven de bol aangebracht. De stengelaaltjes uit hyacint werden alleen op de tulpen aangebracht.

De stengelaaltjes waren afkomstig van aangetaste gewassen uit de praktijk (teelt en broei).

Per pot waren 5 bollen geplant. Per plant werden 100 stengelaaltjes aangebracht. Per behandeling waren er 4 potten = 4 herhalingen. Datum besmetting 24 april 2014.

Behandelingsschema:

stengelaaltjes herkomst	omstandigheden besmetting
tulp Ad Rem	onbeschadigd in oksel blad
tulp Ad Rem	in oksel blad en beschadigd
tulp Ad Rem	bij steel in de grond
Galanthus	onbeschadigd in oksel blad
Galanthus	in oksel blad en beschadigd
narcis Tête-à-Tête	in oksel blad en beschadigd
narcis Ice Follies (collectie)	in oksel blad en beschadigd
controle geen besmetting	onbeschadigd in oksel blad
controle geen besmetting	in oksel blad en beschadigd
controle geen besmetting	bij steel in de grond

De droog gekoelde tulpen werden diep geplant op potgrond en na een korte groeiperiode bij 9°C werden de stengelaaltjes boven de uitlopende spruit aangebracht. De aaltjes werden daarna afgedekt met een laag potgrond. Per pot werden 5 bollen geplant. Per behandeling 5 herhalingen. Per pot werden 1720 stengelaaltjes van tulp Ad Rem, 3580 stengelaaltjes van narcis Ice Follies en 4798 stengelaaltjes van Galanthus toegediend.

Behandelingsschema:

stengelaaltjes herkomst	
tulp Ad Rem	boven de geplante bol
Galanthus	boven de geplante bol
narcis Ice Follies (collectie)	boven de geplante bol
controle	

De potten met Monte Carlo, Inzell en Tête-à-Tête stonden in kas bij 15°C. Na inoculatie werd de RV hoog gehouden door de potten twee weken in een plastic tunnel te zetten. Hierdoor kregen de aaltjes meer kans de planten te infecteren.

Beoordeling op overleving en vermeerdering.

De pottulpen werden 4 juni 2014 boven de bol afgesneden en vrijwel geheel in de mistkamer beoordeeld op overleving. De geplante tulpen en de narcissen werden 16 juni 2014 boven de bol afgesneden. De tulpen werden geheel gebruikt en de narcissen tot 15cm blad/steellengte. Beoordeling op stengelaaltjes was na een verblijf van 3 dagen in de mistkamer.

Een cyclus bij 15°C duurt 19-23 dagen. De stengelaaltjes hebben dus met 6-8w voldoende tijd gehad zich te vermenigvuldigen. In de tabel is het aantal gevonden stengelaaltjes gedeeld op het aantal aangebrachte stengelaaltjes. Bij een waarde boven 1 zijn dus meer aaltjes terug gevonden dan aangebracht.

4.2.2 Resultaten kastoets

De pottulpen en potnarcissen groeiden snel uit en bloeiden snel. De plantontwikkeling van de pottulpen was sterk geremd door gebruik van groeieremmer waardoor de platen kort bleven.

Bij de pottulpen en de potnarcissen werden geen symptomen van stengelaaltjes in het gewas gezien. Bij de droog gekoelde bollen van tulp werden wel symptomen in het gewas gezien (Figuur 6).



Figuur 6 aantasting door stengelaaltjes bij droog gekoelde tulpen, waarbij de besmetting kort na opplant in de grond boven de spruit is aangebracht.

Korte tijd na het afsnijden van het loof werd nog door de neus van de narcisbol gesneden en daarbij werden regelmatig symptomen van stengelaaltjes (ringziek) waargenomen. Bij tulp was dat niet het geval.

Bij de pottulpen werd soms een duidelijke vermeerdering waargenomen, waarbij de variatie echter groot was (zie Tabel 4). Bij Inzell werden vaker een toename gezien dan bij Monte Carlo. Het beschadigen van de oksel bij het aanbrengen van de stengelaaltjes had een beperkt positief effect. Het aanbrengen bij de steel vlak boven de bol leidde niet tot het gewenste resultaat. De tulpen populatie vermeerderde zoals verwacht goed op tulp, maar ook bij beide narcispopulaties lijkt sprake te zijn van een menging met tulpenstengelaaltjes. De populatie uit Galanthus lijkt in mindere mate vermengd te zijn met tulpenstengelaaltjes.

Tabel 4. Vermeerdering van verschillende populaties stengelaaltjes bij 2 cultivars pottulpen.

Besmetting op pottulp Monte Carlo en Inzell besmetting in oksel onderste blad of bij steel

herkomst stengelaaltjes	oksel extra beschadigd of plaats	vermeerderingsfactor Monte Carlo			vermeerderingsfactor Inzell			verwachting ras stengelaaltje mede op basis van vermeerdering
		tussen	gemiddeld	aantal>1 van de 4	tussen	gemiddeld	aantal>1 van de 4	
tulp Ad Rem	nee	0,1-11,2	3,0	1	0-21,0	7,3	3	TSA
	ja	0,4-9,7	5,0	2	1,5-7,9	4,0	4	TSA
	bij steel	0,0-0,3	0,1	0	0-0,3	0,1	0	TSA
Galanthus	nee	0-0,6	0,2	0	0,1-0,3	0,2	0	NSA
	ja	0,3-0,9	0,5	0	0-1,6	0,7	2	NSA en 2xTSA?
narcis Tête-à-Tête	ja	0,3-2,1	1,0	1	0,2-10,3	4,2	3	NSA en 4xTSA?
narcis Ice Follies	ja	0,2-6,4	2,0	1	0,4-8,2	3,9	3	NSA en 4xTSA?

Bij het besmetten van Tête-à-Tête op pot werd in bij 50 -100% van de potten een vermeerdering waargenomen (Tabel 5). De verschillen in aantal stengelaaltjes tussen de herhalingen was soms erg groot (zie ook vermeerderingsfactor in Tabel 5). De werkelijke aantallen liggen nog hoger omdat later bleek dat er ook al stengelaaltjes in de bol aanwezig waren.

Het beschadigen bij het besmetten leidde tot een sterkere toename van het aantal aaltjes. Niet uitgesloten kan worden dat er ook tulpenstengelaaltjes bij de populaties *Galanthus* en narcis zitten.

Tabel 5. Vermeerdering van verschillende populaties stengelaaltjes bij potnarcis Tête-à-Tête.

Besmetting op narcis Tête-à-Tête en besmetting aangebracht onderin tegen hoofdsteel

herkomst stengelaaltjes	extra beschadigd	vermeerderingsfactor			verwachting ras stengelaaltje, mede op basis van vermeerdering
		tussen	gemiddeld	aantal>1 van de 4	
tulp Ad Rem	nee	0,4-10,2	3,8	3	TSA
	ja	0,2-94,1	40,0	2	TSA
<i>Galanthus</i>	nee	0,8-26,0	13,6	3	NSA en 3xTSA?
	ja	87,6-136,3	112,8	4	NSA en TSA?
narcis Tête-à-Tête	ja	2,7-21,6	9,4	4	NSA en TSA?
narcis Ice Follies	ja	81,9-203,2	141,5	4	NSA en TSA?

Bij de besmetting van de grond boven pas geplante broei tulpen werd bij de populaties uit tulp en narcis Ice Follies vermeerdering gevonden in de tulpen (Tabel 6). Bij de populatie *Galanthus* waarvan de meeste stengelaaltjes per pot waren aangebracht was de vermeerdering het geringst. Slechts in één van de vijf potten werden iets meer stengelaaltjes gevonden dan waren aangebracht.

Tabel 6. Vermeerdering van verschillende populaties stengelaaltjes bij opgeplante broeitulpen.

Besmetting op broeitulpen en besmetting aangebracht boven spruit in de grond

herkomst stengelaaltjes	vermeerderingsfactor			verwachting ras stengelaaltje mede op basis van vermeerdering
	tussen	gemiddeld	aantal>1 van de 5	
tulp Ad Rem	0-10,1	4,2	4	TSA
<i>Galanthus</i>	0-1,2	0,4	1	NSA en 1x TSA?
narcis Ice Follies	0,1-4,5	1,9	3	NSA en 3x TSA?

4.2.3 Samenvatting resultaten en discussie kastoets

Stengelaaltjes konden door inoculatie in de bladoksels bij pottulp of onderin bij de steel van potnarcissen het gewas aantasten en zich vermeerderen. Dat stengelaaltjes afkomstig uit *Galanthus* en narcis in staat waren zich te vermeerderen op pottulp wijst op de aanwezigheid van tulpenstengelaaltjes in die populaties. Het aanbrengen van een beschadiging van het weefsel bij de oksel/steel tijdens de inoculatie leidde tot meer vermeerdering. Inoculatie bij de steel vlak boven de bol bij pottulp leidde niet tot vermeerdering. Er was verschil in mate van aantasting tussen twee cultivars pottulp, hetgeen nog een aandachtspunt is. Uitgezocht moet nog worden of er inderdaad verschil is in mate van gevoeligheid tussen cultivars of dat dit een toevalligheid was en te maken heeft met de conditie van de planten. Inoculatie van potnarcis leidde tot een zeer forse vermeerdering van zowel stengelaaltjes uit narcis als uit tulp. Inoculatie boven pas geplante broeitulpenbollen leidde tot bladsymptomen in de tulpen. Stengelaaltjes uit *Galanthus* bleken maar een enkele keer te vermeerderen maar uit narcis veel vaker. De resultaten gaven wel vaak grote verschillen tussen de herhalingen aan, hetgeen deels ook een gevolg zou kunnen zijn van variatie in de populaties stengelaaltjes. De ene keer kan er in een besmetting met 100 stengelaaltjes per plant meer stengelaaltjes van het tulpenras aanwezig zijn dan de andere keer, waardoor bij tulp de ene keer meer vermeerdering plaats vindt dan de andere keer. In principe zou de methode met pottulpen geschikt gemaakt kunnen worden om na te gaan of er in een populatie stengelaaltjes uit narcis ook tulpenstengelaaltjes zitten. Onderzoek zou dan nog nodig zijn naar invloed cultivar, tijdstip in het jaar en duur van inoculatie tot beoordeling. De gebruikte pottulpen waren behandeld met een remstof om ze kort te houden. De vraag is ook of dit invloed heeft gehad. De vraag is ook of de methode jaarrond mogelijk zou zijn. De methode van op te planten gekoelde broei tulpen biedt ook mogelijkheden en zou ook nog verder onderzocht moeten worden.

4.3 Conclusie rassenonderscheid door boltoets of kastoets

Tulpenstengelaaltjes kunnen in elke waardplantbolgewas voorkomen. Als stengelaaltjes in een ander gewas dan tulp gevonden worden is het belangrijk te weten of daar ook tulpenstengelaaltjes bij zitten in verband met de brede waardplantenreeks. Gezocht wordt naar een toets om dit aan te tonen.

- Bij een boltoets worden stengelaaltjes in een bol geïnoculeerd en na enige tijd beoordeeld op vermeerdering van aantal stengelaaltjes
 - Een boltoets met tulpenbollen is niet gelukt en zal nog veel onderzoek vergen
 - Een boltoets met bollen van narcissen of hyacint, waarbij stengelaaltjes uit hyacint op narcisbollen worden getoetst en andersom, vergt ook nog onderzoek, maar lijkt meer perspectief te bieden dan met bollen van tulp omdat de stengelaaltjes op bollen van narcis en hyacint veel beter vermeerderden
 - De beste inoculatie wijze bij de boltoets is nog niet duidelijk
- Bij de kastoets worden pottulpen gebruikt, die in een bladoksel worden geïnoculeerd met stengelaaltjes of worden stengelaaltjes boven pas geplante gekoelde bollen van tulp aangebracht
 - Een kastoets met zowel pottulpen als met gekoelde bollen biedt mogelijkheden om na te gaan of er tulpenstengelaaltjes aanwezig zijn in populaties stengelaaltjes afkomstig uit bijvoorbeeld narcis
 - De kastoets vereist meer onderzoek om de mogelijkheden en beperkingen goed in beeld te brengen
- Afhankelijk van de tijd van het jaar zou een keuze gemaakt kunnen worden voor de kas- of de boltoets

5 Aanbevelingen

Praktisch kan het voor bedrijven van groot belang zijn om te weten met welk ras ze te maken hebben bij een aantasting in een ander gewas dan tulp. Van belang is ook te weten in welke mate het tulpenras zich heeft vermengd met de andere rassen.

Om het rassenonderscheid bij stengelaaltjes te kunnen maken zijn meerdere wegen mogelijk, echter alle mogelijkheden vergen nog meer onderzoek:

- Een boltoets met narcis en hyacint biedt meer mogelijkheden dan een boltoets met tulp, maar moet meer getest worden
- Een gewas/kastoets met pottulpen of op te planten broeitulpen biedt zeker mogelijkheden, maar moet verder geoptimaliseerd worden
- Een nieuwe DNA-techniek (whole genome sequencing) biedt meer mogelijkheden dan AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), maar ervaring met stengelaaltjes moet nog worden opgedaan
- Om stengelaaltjes voor onderzoekdoeleinden in stand te houden biedt bewaring in gedroogde stengels van veldbonen en tulp mogelijkheden, waarbij nog niet bekend is hoeveel langer dan de nu de geteste 15 maanden mogelijk is