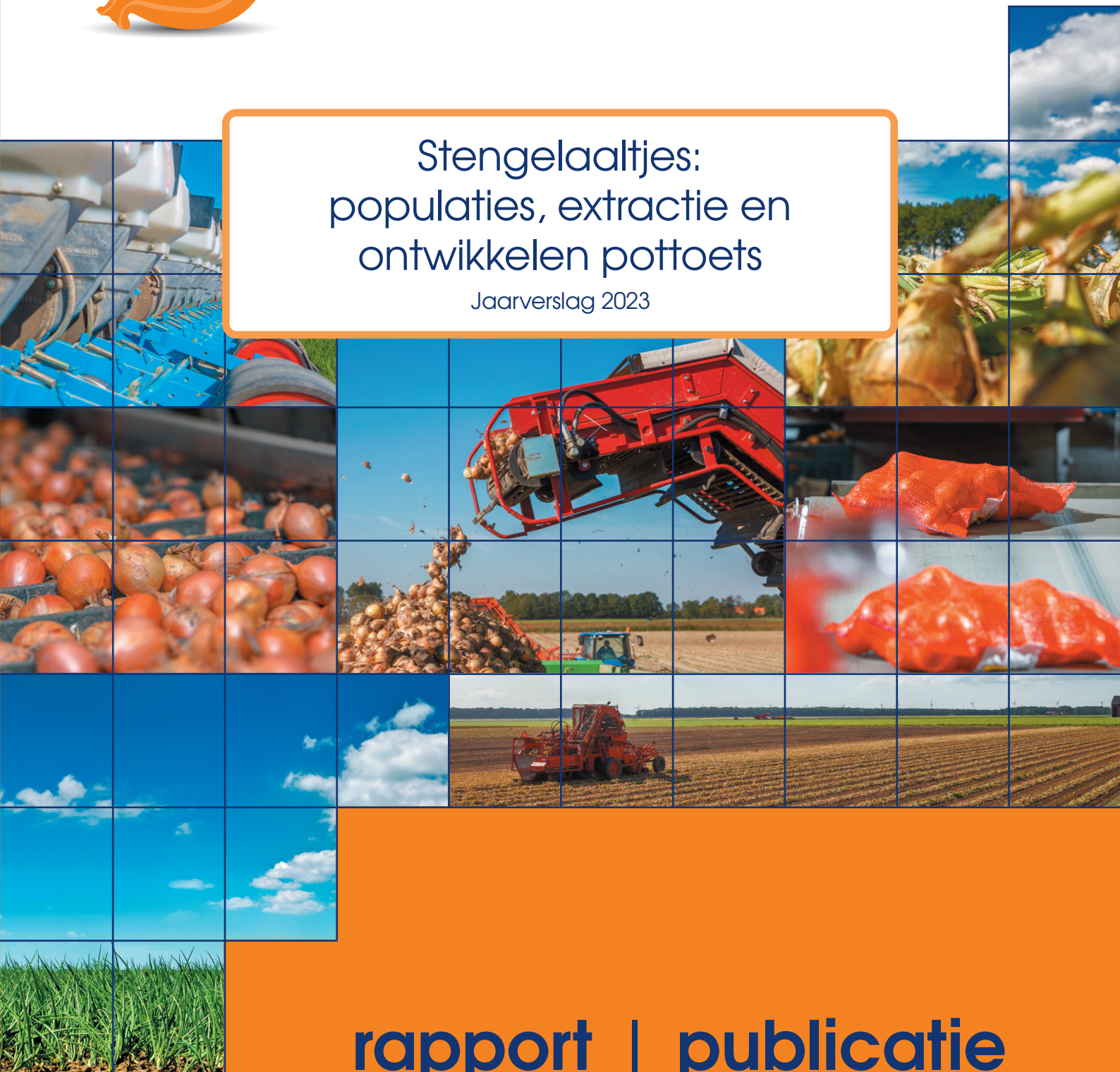




Stengelaaltjes: populaties, extractie en ontwikkelen pottoets

Jaarverslag 2023



rapport | publicatie

2024-04



Uireka is een uniek driejarig ketenproject met als doel het verbeteren van de kwaliteit en daarmee het versterken van de exportpositie van de Hollandse ui. Om dit te realiseren hebben ketenpartners de krachten gebundeld. Het project valt onder de Holland Onion Association wordt mede ondersteund door de Topsector Agrifood.

Uireka draait om innovatie en verbetering van de teelt en bewaring. Het project levert een pakket aan maatregelen op die ketenpartners in staat stellen om de kwaliteit nog beter te borgen.

De gezamenlijke organisaties hebben deze publicatie met de meeste zorg samengesteld. Zij zijn niet aansprakelijk voor schade die ontstaat door het uitvoeren van informatie uit deze publicatie.

Stengelaaltjes: populaties, extractie en ontwikkelen pottoets

Jaarverslag 2023

Slotbeschouwing over de gehele projectperiode 2020-2023

Uitgevoerd door: Pella Brinkman¹, Anja Kombrink², Misghina Goitom Teklu³ en Leendert Molendijk¹ (¹WUR-Open teelten, ²Hilbrands laboratorium, ³WUR-Agrosysteemkunde)

Uireka rapport nummer: 2024-04

Datum: juni 2024

Inhoudsopgave

Samenvatting

1	Inleiding en doel	9
2	Verzamelen populaties	10
2.1	Materiaal en methode	10
2.2	Resultaten	10
2.3	Discussie en conclusies	11
3	Activiteit stengelaaltjes na extractie	12
3.1	Materiaal en methode	12
3.2	Resultaten	12
3.3	Discussie en conclusies	14
4	Waardplantproef 2023 WUR Open teelten	15
4.1	Materiaal en methode	15
4.2	Resultaten	18
4.3	Discussie en conclusies	24
5	Waardplantproef 2023 HLB Wijster	26
5.1	Materiaal en methode	26
5.2	Resultaten	27
5.3	Discussie en conclusies	28
6	Inoculatie bij bloembollen	29
6.1	Materiaal en methode	29
6.2	Resultaten	29

6.3	Discussie en conclusies	31
7	Slotbeschouwing Uireka stengelaaltjes 2020-2023	32
8	Literatuur	35
	Bijlage 1. Samenstelling toetsgrond	38
	Bijlage 2. Data waardplantproef 2023 HLB	39
	Bijlage 3. Data proef inoculatie bloembollen	41
	Bijlage 4. Statistische analyse proef inoculatie bloembollen	43

Samenvatting (jaar 2023)

Stengelaaltjes vormen een lastig probleem, doordat ze een brede waardplantreeks hebben, al in lage begindichtheden in het voorjaar voor schade kunnen zorgen en het niet goed voorspelbaar is wanneer er problemen kunnen optreden. Ook bestaan er verschillende 'stengelaaltjesrassen', die morfologisch niet te onderscheiden zijn en deels verschillende waardplanten kennen. Hierdoor is het niet mogelijk om een sluitend advies te geven welke gewassen veilig kunnen worden geteeld en wat slimme gewasvolgordes zijn. Dit project dat in 2020 startte, beoogde informatie te krijgen over de volgende onderwerpen: 1) bodemeigenschappen die besmetting met stengelaaltjes bevorderen of in stand houden, 2) optimaliseren van extractie van het ruststadium van stengelaaltjes uit grond en 3) het ontwikkelen en uiteindelijk uitvoeren van een pottoets met verschillende stengelaaltjesrassen. In dit rapport zijn de resultaten van het onderzoek in 2023 beschreven.

Voor het verzamelen van populaties is van 2020-2023 bij controlerende instanties, erfbetreders en telers kenbaar gemaakt dat we op zoek zijn naar besmettingen met stengelaaltjes. Herhaaldelijk hebben Uireka, BO Akkerbouw en IRS in hun nieuwsbrieven gevraagd om een besmetting in plantmateriaal te melden, zowel in het groeiseizoen als bij de oogst. Het aantal meldingen was hoger in jaren met koelere en vochtigere weersomstandigheden. Daarnaast zijn, in samenwerking met de PPS 'Moleculaire karakterisering waardplantenstatus van stengelaaltjesrassen' bij WUR Laboratorium voor Nematologie, collega-nematologen in het buitenland benaderd. Gedurende de periode 2020-2024 zijn in Uireka 42 populaties uit plantmateriaal verzameld. Daarvan waren er 37 afkomstig uit verschillende regio's in Nederland en 5 uit het buitenland: Duitsland (1), Frankrijk (1), Italië (1) en Tsjechië (2). De verdeling van de populaties naar herkomst uit verschillende gewassen was onevenwichtig: ui (15), suikerbiet (8), narcis (6), knoflook (1), tulp (6), aardappel (4), spinazie (1) en hyacint (1).

Bij extractie van stengelaaltjes uit narcis en ui wordt soms een deel van de aaltjes inactief. Dit lijkt vooral op te treden wanneer een grotere hoeveelheid plantmateriaal wordt geëxtraheerd met een beperkte doorstroom van water. Wanneer dit probleem speelt, is het aan te raden om na bezinken van de aaltjes het water in de suspensie zo snel mogelijk te ververset.

De waardplantstatus van gewassen voor stengelaaltjes werd getoetst door de principes van Seinhorst te volgen: eerst werden de nematoden aan de grond toegediend, daarna werd het gewas gezaaid. Deze methode werd in 2022 met succes bij WUR | Agrosysteemkunde toegepast met een reeks van twaalf begindichtheden van 0; 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 en 32 stengelaaltjes per g droge grond. De stengelaaltjes werden zowel in de bovengrondse delen als in de wortels en de grond gevonden. Ui overleefde niet bij de hoogste begindichtheden. De toets werd in 2023 in kleinere vorm herhaald bij WUR | Open teelten. Peen, ui en veldboon werden gezaaid in grond met een reeks begindichtheden van 0; 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 en 1 stengelaaltje (populatie N1, afkomstig uit narcis) per g droge grond. Na 16-17 weken werd het aantal stengelaaltjes in de stengel, wortels en de grond bepaald. Waar in de eerdere proef een consistente infectie en hoge vermeerdering in veldboon en ui werden gevonden, lukte het niet om dit bij WUR | Open teelten te herhalen. Wel volgde de relatie tussen begin- en einddichtheid in deze proef hetzelfde patroon. Een toets bij

HLB met twee populaties stengelaaltjes in drie dichtheden (0,0625; 0,25 en 1 stengelaaltje per gram grond) op twee gewassen liet wel zien dat de methode mogelijkheden biedt om verschillen in waardplantstatus te toetsen, maar gaf ook geen consistente infectie. Om tot een algemeen bruikbare toets te komen, is het belangrijk om te weten welke factoren cruciaal zijn om een consistente infectie te bewerkstelligen. De toetsen bij HLB en WUR | Open teelten bevestigden dat stengelaaltjes niet alleen in bovengrondse delen voorkomen, maar ook in de wortels en de grond. Om een goed beeld te krijgen van de vermeerdering is het dus noodzakelijk om de aaltjes uit alle delen te extraheren.

1 Inleiding en doel

De schade door stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*) neemt de laatste jaren sterk toe. Stengelaaltjes zijn een probleem in meerdere belangrijke gewassen zoals ui, aardappel, suikerbiet, tulp en narcis. Voor individuele bedrijven kunnen de financiële gevolgen van een besmetting met stengelaaltjes groot zijn. Per december 2019 is de Quarantaine status van *Ditylenchus dipsaci* veranderd in die van een Regulated Non Quarantaine Pest (RNQP), met als consequentie dat na een vondst voortaan wel de partij besmet wordt verklaard, maar niet het perceel. Dit brengt als risico met zich mee dat een verhuurder van grond niet op de hoogte wordt gebracht van het voorkomen van stengelaaltjes op een perceel of dat telers het risico nemen en uitgangsmateriaal of gevoelige gewassen blijven telen op besmette percelen. Dit kan verdere verspreiding tot gevolg hebben.

Ondanks de RNQP-status en de grote problemen met dit aaltje is er onvoldoende kennis beschikbaar over de omstandigheden die tot infectie leiden of vestiging en natuurlijke sterfte beïnvloeden en zijn er weinig beheersmaatregelen voorhanden. Besmettingen voorkomen, vroegtijdig detecteren en het monitoren van gevonden besmettingen worden steeds belangrijker. Vanwege de brede waardplantenreeks zijn oplossingen binnen de vruchtwisseling moeilijk te vinden. Complicerende factor daarbij is dat deze aaltjessoort een twintigtal verschillende rassen kent die verschillen in waardplantenreeks. Morfologisch zijn ze niet te onderscheiden en moleculaire diagnostische technieken zijn niet beschikbaar. Bovendien bestaat er geen standaardprocedure voor het uitvoeren van een potexperiment om de waardplantstatus te bepalen. De mogelijkheden voor chemische bestrijding staan onder druk en hun effectiviteit is onzeker. Niet-chemische oplossingen zijn gewenst.

Leendert Molendijk en Hans Hoek (WUR|OT) hebben in augustus 2018 een eerste aanzet gegeven hoe onderzoek aan stengelaaltjes systematisch opgezet kan worden. Naar aanleiding daarvan is hen gevraagd samen met andere specialisten op aaltjesgebied een samenhangend programma te ontwikkelen. De Brancheorganisatie Akkerbouw heeft het initiatief genomen een samenhangend onderzoeksprogramma te ontwikkelen met als doel de telers van gereedschap te voorzien om besmetting te voorkomen of schade te beperken. Dit programma is 'Plan van Aanpak Stengelaaltjes' genoemd. Er is een stuurgroep opgericht die dit onderzoek heeft begeleid. Een deel van dit plan is uitgevoerd binnen de PPS Uireka 2.0 (LWV-1910; 2020-2023). De onderwerpen die in deze PPS verder zijn uitgewerkt, hadden als doel om:

- De huidige kennis te inventariseren over randvoorwaarden voor vestiging in de grond middels een literatuurstudie;
- Populaties te verzamelen ten behoeve van genetische karakterisering en waardplantonderzoek;
- Extractie van ruststadia van stengelaaltjes uit grond te optimaliseren;
- Een methodiek te ontwikkelen voor een pottoets om de waardplantstatus van gewassen te bepalen.

In dit rapport zijn resultaten uit 2023 van drie deelprojecten beschreven: verzamelen van populaties, activiteit na extractie en ontwikkelen van een pottoets ter bepaling van de waardplantstatus. De resultaten van het onderzoek uit 2020-2022 zijn in vier eerdere rapporten beschreven (Brinkman *et al.* 2021, 2022, 2023; Teklu *et al.* 2022).

2 Verzamelen populaties

Er wordt gesteld dat er verschillende 'rassen' stengelaaltjes bestaan, die verschillen in waardplantreeks (o.a. Seinhorst, 1956; Sturhan, 1969). De rassen zijn morfologisch niet van elkaar te onderscheiden, wat het opstellen van een bouwplan bemoeilijkt. Wanneer op moleculair niveau onderscheid is te maken tussen de rassen, is een gerichter teeltadvies mogelijk. In dit deelproject van Uireka 2.0 is het doel om een diverse groep populaties te verzamelen. In de PPS 'Moleculaire karakterisering waardplantenstatus van stengelaaltjesrassen' (LWV20.026) zal de reeks populaties moleculair worden gekarakteriseerd. Het doel is om in totaal dertig populaties te vinden uit de volgende vijf regio's:

1. Zeeland (uienras/bietenras),
2. Friesland (uienras),
3. Flevoland (uien/tulpenras),
4. de Zijpe NH (narcissenras/hyacintenras),
5. Wieringermeer (tulpenras).

2.1 Materiaal en methode

De besmette percelen werden via de reguliere laboratoria en andere kanalen opgespoord. In 2020, 2021 en 2022 werd hier bij telers en erfbetreders aandacht voor gevraagd en dat werd herhaald in 2023. In diverse bijeenkomsten met sectorvertegenwoordigers is genoemd dat we op zoek zijn naar stengelaaltjes (Uireka, BO Akkerbouw, Nematodenwerkgroep). Ook is in samenwerking met WUR Laboratorium voor Nematologie contact gezocht met onderzoekers uit het buitenland.

Om de kans te vergroten dat de stengelaaltjes in de populatie niet teveel van elkaar afwijken, werd plantmateriaal van een klein oppervlak verzameld. Bij voorkeur werden deze oorspronkelijke populatie gebruikt voor verder onderzoek. Het aantal stengelaaltjes dat uit het plantmateriaal werd geëxtraheerd, was echter niet altijd groot genoeg voor verder onderzoek. Wanneer het aantal te laag was, werden de stengelaaltjes eerst vermeerderd op veldboon of uienbollen. De populaties worden door WUR Laboratorium voor Nematologie moleculair gekarakteriseerd en daar bewaard in de collectie voor toekomstig onderzoek. Dat werk is gefinancierd uit de PPS 'Moleculaire karakterisering waardplantenstatus van stengelaaltjesrassen'.

2.2 Resultaten

In 2023-2024 zijn in dit project binnen Uireka 8 populaties uit plantmateriaal verzameld. Gedurende de gehele projectperiode 2020-2024 zijn binnen Uireka 42 populaties verzameld. Daarvan waren er 37 afkomstig uit verschillende regio's in Nederland en 5 uit het buitenland: Duitsland (1), Frankrijk (1), Italië (1) en Tsjechië (2). De verdeling van de populaties naar herkomst uit verschillende gewassen was onevenwichtig: aardappel (4), hyacint (1), knoflook (1), narcis (6), spinazie (1), suikerbiet (8), tulp (6) en ui (15).

2.3 Discussie en conclusies

Vermeerderen van stengelaaltjes is soms nodig om voldoende materiaal te verkrijgen voor onderzoek, maar kan invloed hebben op de genetische samenstelling van een populatie (Sturhan, 1969). WUR Laboratorium voor Nematologie heeft recent voor enkele populaties vergeleken of er genetische veranderingen optraden na vermeerderen op ui of veldboon. In dit onderzoek werden geen grote genetische veranderingen gevonden tussen de oorspronkelijke en de vermeerderde populaties (te Molder *et al.*, 2022). Mogelijk is het afhankelijk van de combinatie van populatie en gewas of er veranderingen optreden. We hebben er daarom voor gekozen om de aaltjes alleen te vermeerderen indien nodig en zo mogelijk de basispopulatie te bewaren.

Vanwege de droogte in 2020 en 2022 was het moeilijk om actieve populaties te vinden, ondanks de inspanningen om, zowel via contacten intern (collega's van HLB en WUR|OT) als extern, informatie over besmettingen in percelen te krijgen. Het jaar 2021 was natter en leverde meer populaties op. Het jaar 2023 had een droog begin van het groeiseizoen en een natte zomer en herfst, maar leverde wel een uitbreiding van het aantal populaties op. Het doel om in dit project minstens 30 populaties te verzamelen werd met het aanleveren van 42 unieke populaties ruimschoots gehaald. Het doel om populaties uit specifieke gewassen in de aangegeven regio's te verzamelen, bleek niet haalbaar. De PPS 'Moleculaire karakterisering waardplantenstatus van stengelaaltjesrassen' beoogt minstens 50 populaties te verzamelen en kan ook in 2024 nog nieuwe populaties ontvangen. Meldingen van actieve besmettingen kunnen worden gericht aan mark.sterken@wur.nl.

3 Activiteit stengelaaltjes na extractie

De ervaring bij WUR | Open teelten leerde, dat stengelaaltjes na extractie uit plantmateriaal soms inactief waren, vooral bij extractie uit narcis of ui. Bij WUR | Agrosysteemkunde waren stengelaaltjes na extractie steeds actief. Voor inoculatie van proeven is het van belang dat de aaltjes actief zijn om de plant te kunnen infecteren. Aangezien de oorzaak van inactiviteit niet duidelijk was, zijn enkele indicatieve proefjes gedaan met verschillende soorten plantmateriaal in verschillende hoeveelheden bij HLB, WUR | Agrosysteemkunde en WUR | Open teelten.

3.1 Materiaal en methode

Er werd gedroogd plantmateriaal van tuinboon (onbekende populatie) en narcis met stengelaaltjes (populatie N1) gebruikt. Het materiaal werd in stukjes van 0,5-1 cm lengte verdeeld en gemengd. Het materiaal werd verdeeld over de laboratoria en daar op de gebruikelijke wijze geëxtraheerd. Voor HLB is dit op een filter in petrischalen met water, voor de beide WUR-locaties op zeven in de mistkast. Na een extractieperiode van drie dagen werden de suspensies afgetapt en geteld. Bij HLB is er voor gekozen om alleen een algemene indruk van de beweeglijkheid van de aaltjes te geven en werden er geen tellingen verricht.

Bij WUR | Open teelten werd in drievoud 0,18-0,34 g gedroogde tuinboon en ca. 5 g gedroogde narcis per zeef geëxtraheerd. Door een misverstand werden na het aftappen de suspensies per plantensoort samengevoegd, waardoor er geen herhalingen waren. De suspensies werden in twee porties verdeeld, waarvan bij één portie na bezinken van de aaltjes het bovenstaande water wel en bij de andere portie niet werd ververs met schoon leidingwater. De stengelaaltjes werden op de dag van aftappen geteld en 1 en 4 dagen na aftappen. Vanwege het ontbreken van herhalingen was statistische analyse niet mogelijk.

In een tweede extractie werd per zeef 15 en 25 g narcis opgebracht, wat de gebruikelijke hoeveelheid is bij extracties. Deze suspensies werden op de dag van aftappen en 2 dagen later geteld. Op dag 2 werden bovendien de suspensies die in de koelkast waren bewaard nogmaals gepipetteerd, direct geteld en na ca. 5 uur bij kamertemperatuur te hebben gestaan geteld. Vanwege het ontbreken van herhalingen was statistische analyse niet mogelijk.

3.2 Resultaten

Bij HLB en WUR | Agrosysteemkunde waren de stengelaaltjes na extractie uit zowel tuinboon als narcis actief. Ook bij WUR | Open teelten waren de meeste stengelaaltjes actief na extractie uit een kleine hoeveelheid plantmateriaal (Tabel 3.1). Er bestond niet de indruk dat het verversen van het water in de suspensie invloed had op de beweeglijkheid van de stengelaaltjes of dat er veranderingen optraden in de tijd.

Tabel 3.1: Percentage actieve en inactieve stengelaaltjes bij extractie van 5 g gedroogde narcis of 0,18-0,34 g gedroogde tuinboon, na 0-4 dagen in een suspensie waarbij het water wel of niet was ververst (n=1). Resultaten van WUR | Open teelten.

Plant	Water ververst	Dag 0		Dag 1		Dag 4	
		Actief	Inactief	Actief	Inactief	Actief	Inactief
Narcis	Nee	96.0	4.0	97.2	2.8	97.9	2.1
	Ja	95.8	4.2	98.5	1.5	99.0	1.0
Tuinboon	Nee	97.9	2.1	98.2	1.8	98.5	1.5
	Ja	97.6	2.4	98.1	1.9	97.6	2.4

Bij extractie van grotere hoeveelheden plantmateriaal was er wel een effect (Tabel 3.2). Wanneer het water van de suspensies verkregen uit extractie van 15 of 25 g narcis niet werd ververst, leken er iets minder aaltjes actief te zijn dan wanneer het water wel werd ververst. Het verschil tussen wel en niet verversen van het water was groter na 2 dagen en groter bij extractie van 25 g dan bij 15 g narcis. Dit verschijnsel doet vermoeden dat stoffen uit narcis mogelijk remmend werken op de activiteit van de stengelaaltjes. Er is niet gecontroleerd of het effect omkeerbaar was, dat wil zeggen of de aaltjes weer actief konden worden of dat ze dood waren.

Wanneer de stengelaaltjes direct uit de koelkast werden geteld, was een groter deel van de aaltjes inactief dan wanneer de suspensie de gelegenheid kreeg om op te warmen (Tabel 3.3). Het was opmerkelijk dat een groter deel van de aaltjes actief was in de koud getelde suspensies waarvan het water niet was ververst dan in de suspensies waarvan het water wel was ververst. Dit resultaat is tegengesteld aan de verwachting en we hebben er geen verklaring voor. In de ververste suspensies leek een groter deel van de aaltjes na opwarmen tot kamertemperatuur actief te worden.

Tabel 3.2: Percentage actieve en inactieve stengelaaltjes bij extractie van 15 en 25 g gedroogde narcis, na 0-2 dagen in een suspensie waarbij het water wel of niet was ververst (n=1). Resultaten van WUR | Open teelten.

Hoeveelheid narcis (g)	Water ververst	Dag 0		Dag 2	
		Actief	Inactief	Actief	Inactief
15	Nee	93.9	6.1	60.1	39.9
	Ja	98.8	1.2	94.0	6.0
25	Nee	93.5	6.5	46.2	53.8
	Ja	97.8	2.2	95.4	4.6

Tabel 3.3: Percentage actieve en inactieve stengelaaltjes bij extractie van 15 en 25 g gedroogde narcis, na 2 dagen in een suspensie waarbij het water wel of niet was ververst. De aaltjes werden na bewaren in de koelkast gepipetteerd en direct geteld, of na ca. 5 uur opwarmen bij kamertemperatuur (n=1). Resultaten van WUR | Open teelten.

Hoeveelheid narcis (g)	Water ververst	Koel		Warm	
		Actief	Inactief	Actief	Inactief
15	Nee	40.9	59.1	80.0	20.0
	Ja	1.1	98.9	89.5	10.5
25	Nee	33.4	66.6	27.8	72.2
	Ja	2.7	97.3	90.3	9.7

3.3 Discussie en conclusies

Bij extractie van stengelaaltjes uit plantmateriaal zoals narcis of ui kunnen stoffen uit de plant een remmende werking hebben op de activiteit van stengelaaltjes. Dit effect speelt vooral wanneer grotere hoeveelheden plantmateriaal worden geëxtraheerd. Mogelijk speelt de hoeveelheid water die bij de extractie wordt gebruikt een rol. De mistkast van WUR | Agrosysteemkunde gebruikt een grotere hoeveelheid water dan die van WUR | Open teelten, waardoor bij Agrosysteemkunde remmende plantenstoffen mogelijk worden afgevoerd. Wanneer dit probleem speelt, is het aan te raden om of minder plantmateriaal te extraheren, of meteen na aftappen de suspensie te laten bezinken, het bovenstaande vocht af te zuigen en te vervangen door vers leidingwater.

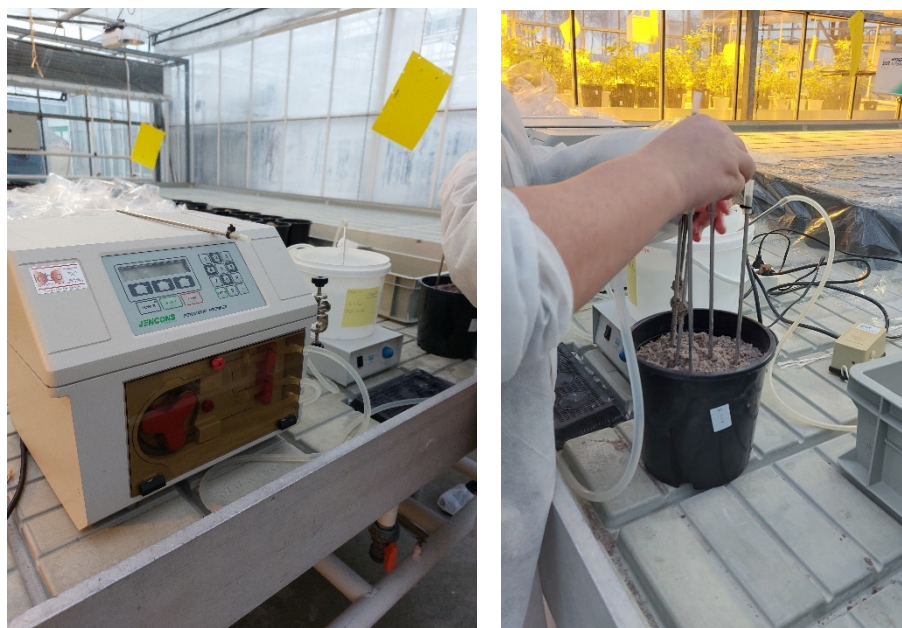
4 Waardplantproef 2023 WUR | Open teelten

Voor het uitvoeren van een pottoets is het belangrijk om te weten hoe de planten kunnen worden geïnoculeerd en onder welke omstandigheden het experiment het beste kan worden uitgevoerd. Er bestaan verschillende methoden om stengelaaltjes te inoculeren. Sommige auteurs gaan uit van inoculatie van de stengel (Whitehead *et al.* 1987; Vreeburg *et al.* 2014; Yavuzaslanoğlu 2020). Daarbij wordt geen rekening gehouden met de natuurlijke wijze van infectie, die via een besmetting in de grond verloopt. Andere auteurs inoculeren in de grond, direct op of op korte afstand van het zaad (Elgin *et al.* 1975; Vreeburg *et al.* 2014; Storelli *et al.* 2021). Dit bleek geen betrouwbare methode te zijn om peen, ui en veldboon te infecteren met stengelaaltjes (Brinkman *et al.*, 2022). Bovendien staat deze methode ver af van de veldsituatie, waarbij de aaltjes verspreid in de grond voorkomen. Voor het bepalen van de waardplantstatus van gewassen voor *Globodera* spp. en *Meloidogyne* spp. is een methode ontwikkeld waarbij de nematoden verspreid in de grond worden toegediend (respectievelijk Beniers *et al.*, 2015 en Teklu *et al.*, 2015). De veldsituatie wordt daarbij zoveel mogelijk nagebootst: de nematoden worden eerst toegediend aan de grond, waarna zaden worden gezaaid in een vergelijkbare dichtheid als in het veld. Aangezien de vermeerdering afhankelijk is van de begindichtheid, is het belangrijk om een reeks begindichtheden te toetsen (Seinhorst, 1964). In 2022 is met succes een waardplanttoets uitgevoerd bij WUR | Agrosysteemkunde, waarbij een dichtheidsreeks van stengelaaltjes is toegediend bij peen, ui en veldboon (Brinkman *et al.*, 2023). Om algemene toepasbaarheid van de methode te toetsen is dit experiment in kleinere vorm herhaald bij WUR | Open teelten. Bij de uitvoering van het experiment is ook aandacht geschonken aan de benodigde extractieduur van plantmateriaal in de mistkast. Verder is het effect van bewaren van potten met wortels en grond bij 4°C op de extractie van stengelaaltjes, omdat het bij grotere experimenten niet altijd mogelijk is om alle extracties meteen uit te voeren. Als laatste is de overleving van stengelaaltjes in potten zonder plant bepaald om een indruk te krijgen van de bijdrage van het inoculum aan de einddichtheid in de grond.

4.1 Materiaal en methode

Potten met een inhoud van 2 L werden gevuld met een equivalent van 2 kg droge toetsgrond met een vochtgehalte van 15% (w/w; Bijlage 1). De grond werd met een Jencons perimatic dispenser via naalden geïnoculeerd met 7 dichtheden stengelaaltjes afkomstig uit narcis (populatie N1; vooral stadium J4): 0; 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 en 1 per g droge grond. Dit komt overeen met een aantal van 0; 62,5; 125; 250; 500; 1000 en 2000 stengelaaltjes per 2 L-pot. Per pot werd 4 mL suspensie in elk van 6 naalden geïnoculeerd, waarbij de naalden omhoog werden getrokken om de aaltjes zowel horizontaal als verticaal over de pot te verdelen. Na het inoculeren werden de gewassen gezaaid: per pot 4 zaden peen ('Nerac'), 4 zaden ui ('Hylander') of 2 een nacht voorgeweekte zaden veldboon ('Banquis'). Per dichtheid en gewas werden 5 herhalingen ingezet. Dit resulteerde in 105 potten, die in de kas per gewas en dichtheid werden gerangschikt om kans op besmetting te verminderen. Naast de potten waarin de gewassen werden gezaaid, werden vijf potten van 500 mL geïnoculeerd met een

dichtheid van 4 stengelaaltjes per g grond. De kascondities waren 20-22°C overdag en 16°C 's nachts bij een daglengte van 16 uur. De potten werden wekelijks gewogen en aangevuld met water tot een vochtgehalte van 15%, waarbij tussentijds de grond op een vochtgehalte van 12-15% werd gehouden. De planten werden geoogst na 16-17 weken. Het experiment werd uitgevoerd in de kas van WUR | Open teelten in Lelystad.



Figuur 4.1. Inoculatie van de grond via naalden met een Jencons perimatic dispenser.

Tabel 4.1 Tijdschema van het experiment naar de vermeerdering van stengelaaltjes op peen, ui en veldboon.

Activiteit	Datum
Besmette narcis in de mistkast	17-02-2023
Datum van inoculeren van de grond	24-02-2023
Datum van zaaien	24-02-2023
Oogst extra potten (bepalen extractieduur)	16-05-2024
Oogst herhaling 1-2	19 en 20-06-2023 (stengel en wortels) 21-06-2023 (grond)
Oogst herhaling 3-5	26 en 27-06-2023 (stengel) 11-07-2023 (wortels) 11-07-2023 (grond)
Oogst extra potten (bewaarproef)	24-07-2023 (herhaling 1 en 2) 07-08-2023 (herhaling 3-5)

Bij de oogst werd de stengel van de plant afgeknipt en gewogen. De bol van de ui werd apart verwerkt. Vanwege ruimtegebrek in de mistkast werd eerst herhaling 1-2 geoogst (Tabel 6.1). Een week later begonnen ui en veldboon af te sterven en werd besloten de overige herhalingen te oogsten. Vanwege ruimtegebrek in de mistkast

werden de potten met wortels gedurende 2 weken bij 4°C bewaard tot verdere verwerking. De wortels werden uit de grond gezeefd, goed afgespoeld met water, droog gedept en gewogen. De peen werd gewogen en geschild met een dunschiller. De stengel en de wortels van elke plant werden in stukjes van 0,5-1 cm lengte geknipt en in zeefjes gedaan. De zeefjes werden gedurende 7 dagen (peen en ui) en 14 dagen (veldboon) in bakjes in een mistkast gezet. Elke week werd het water met de aaltjes in de bakjes afgetapt en bij 4°C bewaard.

De grond werd gemengd en er werd een submonster van 250 mL afgemeten. De grond werd opgespoeld met een Oostenbrinktrechter (van Bezooijen, 2006). De 500 mL grond uit de vijf potten zonder plant werd volledig opgespoeld. De suspensie met nematoden werd opgevangen en over een set van 3 zeven gegoten (75-45-45 µm). Na 72 uur werden de suspensies afgeschonken en bij 4°C bewaard. De stengelaaltjes werden geïdentificeerd en geteld bij een vergroting van 40×.

Extractieduur

Er werden twee potten met ui en twee potten met veldboon met de hoogste inoculatiedichtheid ingezet om de extractieduur van stengelaaltjes uit plantmateriaal in de mistkast te bepalen. Deze potten werden 11,5 week na de inoculatie geoogst op dezelfde manier als in voorgaande tekst beschreven. Stengels en wortels werden afzonderlijk in de mistkast geëxtraheerd. Na 1, 3, 6, 7, 10, 14, 17 en 20 dagen werden de suspensies afgetapt en volledig geteld. De gemiddelden werden geschat en een logistisch model werd gefit om de waarden van drie parameters van het model te schatten.

$$F_h(t) = \frac{C}{1 + \exp(-B(t-A))} \quad (1)$$

In het model staat C voor het maximale cumulatieve aantal geëxtraheerde aaltjes per hoeveelheid plantmateriaal, B voor de snelheid van extractie (relatieve waarde) en A voor de tijd tot de helft van de maximumwaarde C is bereikt.

Er werd een submonster van 250 mL grond opgespoeld met de Oostenbrinktrechter, waarbij het opgevangen materiaal van de zeven gedurende 3 dagen werd geïncubeerd op filter.

Koele bewaring

Vanwege ruimtegebrek in de mistkast kan het nodig zijn om potten gefaseerd te oogsten. Tijdelijk bewaren van potten met wortels en grond kan een uitkomst bieden. Het is daarbij de vraag of dit invloed heeft op het aantal stengelaaltjes dat uit de wortels en grond kan worden geëxtraheerd. Hiertoe zijn aan het experiment vijf potten met veldboon en ui met de hoogste inoculatiedichtheid (1 stengelaaltje/g droge grond) toegevoegd. Van deze potten zijn de bovengrondse delen tegelijk met de rest van het experiment verwerkt, maar zijn de potten met wortels en grond gedurende 5 weken bewaard bij 4°C. Daarna zijn de wortels en grond op dezelfde manier verwerkt als de rest van het experiment. Het effect van bewaren op het aantal geëxtraheerde stengelaaltjes in wortels en grond van veldboon en in grond van ui is getoetst met t-toetsen. Het was niet nodig om de gegevens voor analyse te transformeren.

Dataverwerking populatie-ontwikkeling en opbrengstverlies

Het populatiedynamische Seinhorstmodel is gebruikt om de populatie-ontwikkeling van stengelaaltjes op de verschillende gewassen te beschrijven. De twee populatiedynamische parameters maximale vermeerdering (a) en maximale populatiedichtheid (M) zijn geschat volgens de vergelijking

$$Pf = M \times Pi / (Pi + M/a) \quad (2)$$

Dit is het model van Seinhorst voor sedentaire nematoden met meerdere generaties per jaar (Teklu, 2018). Specificaties van de gedefinieerde parameters worden gegeven in Tabel 4.2.

Om de gegevens te analyseren en te modelleren is gebruik gemaakt van R versie 4.2.1 (R Core Team, 2022) en RStudio® versie 2022.07.0 (RStudio Team, 2022). Het populatiedynamisch model van Seinhorst zoals beschreven door Schomaker & Been (2013) werd gefit om de relatie tussen Pi en Pf te beschrijven en de parameters van het model werden geschat. De inverse van de hessiaan (de matrix van de tweede-orde partiële afgeleiden van de functie) werd gebruikt om de standaardfout van de parameters te schatten. Het gemiddelde en de variantie van de Pf werd berekend na logaritmische transformatie van de gegevens, waarna de waarden werden terug getransformeerd naar de lineaire schaal. De logaritme van nul is niet te bepalen. Om toch met een Pf -waarde van nul te kunnen rekenen, werden nulwaarden vervangen door $0.5 \times Pf_{\text{minimum}}$ (de helft van de minimale niet-nulwaarde van het object).

Het effect van de Pi op het opbrengstverlies werd bepaald met het opbrengstverliesmodel van Seinhorst (1965, 1998). De parameters tolerantielimiet (T) en de relatieve minimumopbrengst (m) werden geschat.

$$Y = Y_{\text{max}} \times m + (1 - m) \times 0,95^{Pi/(T-1)} \quad \text{voor } Pi > T \quad (3)$$

$$Y = 1 \quad \text{voor } Pi \leq T \quad (4)$$

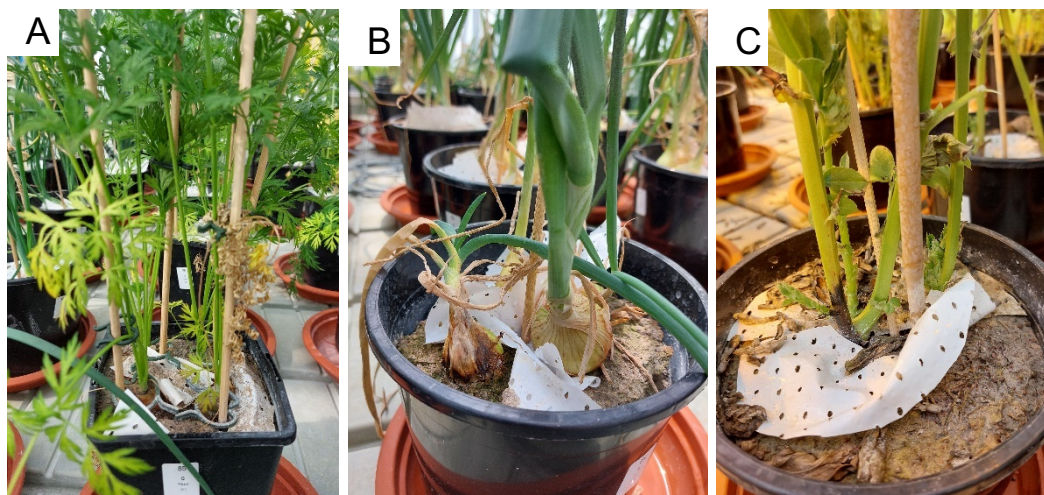
Tabel 4.2. Definitie van de parameters die werden gebruikt in het populatiedynamische model en het opbrengstverliesmodel van Seinhorst.

Term	Omschrijving	Dimensie
Pi	Nematodendichtheid bij planten/zaaien	aantal · (g droge grond) ⁻¹
Pf	Nematodendichtheid bij oogst	aantal · (g droge grond) ⁻¹
a	Maximale vermeerderingsfactor	-
M	Maximale populatiedichtheid	aantal · (g droge grond) ⁻¹
T	Tolerantielimiet	aantal · (g droge grond) ⁻¹
m	Relatieve minimumopbrengst	-

4.2 Resultaten

Bij peen waren gedurende de hele groeiperiode geen symptomen van infectie te zien (Fig. 4.2). De ui bleef 5,5 weken na inoculatie van hoge dichtheden soms achter in groei, maar niet in alle potten en niet alle planten in een pot. Bij veldboon begon na 5,5 weken in een aantal geïnoculeerde potten de stengelbasis donkerbruin te verkleuren, maar ook dit was geen consistent beeld. Na 10,5-13,5 weken waren de symptomen in

ui en veldboon duidelijker, maar nog steeds niet consistent in alle potten en alle planten in een pot.



Figuur 4.2. A) symptomloze peen 10,5 week na inoculeren, B) links aangetaste en rechts gezonde ui 13,5 weken na inoculeren en C) aangetaste veldboon met zwarte stengelbasis 10,5 weken na inoculeren.

Extractieduur

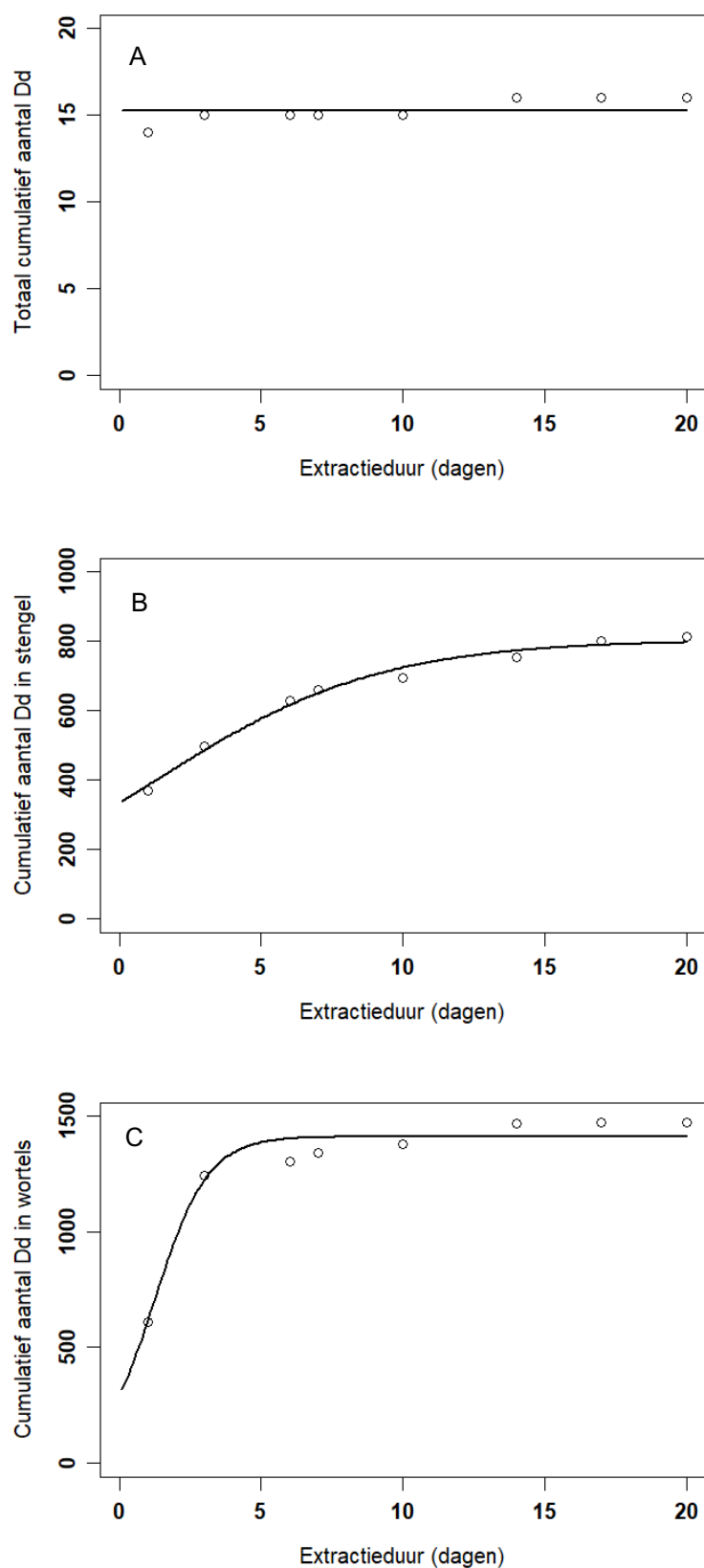
Bij de oogst 11,5 weken na het inoculeren en zaaien van ui was de extractie van stengelaaltjes uit het loof en de wortels dusdanig laag, dat de gegevens niet bruikbaar waren voor het bepalen van de extractieduur (Fig. 4.3). Bij veldboon verliep de extractie van stengelaaltjes uit de stengel trager dan uit de wortels. Uit de stengel van veldboon was na 10 dagen 85,6% en na 14 dagen 92,9% van de aaltjes geëxtraheerd van het totaal na 20 dagen. Uit de wortels van veldboon was na 10 dagen 93,6% en na 14 dagen 99,7% van de aaltjes geëxtraheerd van het totaal na 20 dagen. Deze resultaten komen goed overeen met de aard van het materiaal: stengels zijn stugger, waardoor de aaltjes er minder makkelijk uit kunnen komen dan uit zachtere wortels.

In de grond van de twee potten met ui werden gemiddeld 25 stengelaaltjes per pot gevonden. In de grond van de twee potten met veldboon werden gemiddeld 162 stengelaaltjes per pot gevonden. Bij beide gewassen was er een positieve relatie tussen het aantal stengelaaltjes in de grond en in de plant (data niet getoond).

Tabel 4.3. Schatting van de parameters in het logistische model van de mistkastextractie van stengelaaltjes uit veldboon.

Gewas	C	B	A	seC	seB	seA	R ²	Df
Veldboon stengel	803	0.256	1.34	21.6	0.0409	0.395	0.981	5
Veldboon wortels	1411	1.07	1.24	37.5	0.357	0.224	0.937	5
Veldboon totaal	2201	0.494	1.14	93.8	0.236	0.488	0.924	5

C: het maximale cumulatieve aantal geëxtraheerde aaltjes per hoeveelheid plantmateriaal, B: de snelheid van extractie (relatieve waarde) en A: de tijd tot de helft van de maximumwaarde C is bereikt.



Figuur 4.3. Mistkastextractie van stengelaaltjes uit A) loof en wortels van ui samen, B) stengel van veldboon en C) wortels van veldboon.

Koele bewaring

In ui werden nauwelijks stengelaaltjes aangetroffen in de wortels. Daarom werd alleen het effect van langer koel bewaren op het aantal geëxtraheerde stengelaaltjes uit de grond van ui en de wortels en grond van veldboon geanalyseerd. Er was geen significant effect van koel bewaren van de potten met wortels en grond op het aantal geëxtraheerde stengelaaltjes, waarschijnlijk vanwege de grote spreiding. Toch geeft het wel te denken dat er een tendens was van iets lagere aantallen stengelaaltjes in potten die gedurende 5 weken koel waren bewaard.

Tabel 4.4. Gemiddeld aantal stengelaaltjes geëxtraheerd uit grond en wortels (uitgedrukt per 10 g droge grond) bij onmiddellijke verwerking (16-17 weken na inoculeren) of na een 5-weekse periode van bewaren bij 4°C, met resultaten van een t-toets.

Gewas	Deel	Koel bewaren			t-waarde	p-waarde	df
		Ja	Nee				
Ui	Grond	4.7	15.9	a	-0.82	0.46	4
Veldboon	Wortels	0.20	0.46	a	-0.67	0.53	6
Veldboon	Grond	2.30	4.02	a	-0.95	0.37	7

Populatie-ontwikkeling

Niet in alle potten werden de planten ook daadwerkelijk geïnfecteerd met stengelaaltjes, zelfs niet bij de hoogste begindichtheid (Tabel 4.5). Wanneer een arbitraire grens van een totaal aantal van 5 stengelaaltjes in plantmateriaal per pot als geslaagde infectie wordt aangehouden, werd veldboon vanaf een Pi van 1,25 per 10 g grond meestal geïnfecteerd. Bij ui ontsnapten ook bij hogere begindichtheid veel planten aan infectie en in peen werden zelfs nauwelijks stengelaaltjes aangetroffen.

Tabel 4.5. Aantal potten met geslaagde infectie, waarin totaal minimaal 5 stengelaaltjes in de plant (stengel/loof, bol of wortels) werden gevonden, 16-17 weken na inoculatie van de grond (n=5). Tussen haakjes het aantal potten waarin slechts enkele (minder dan 5) stengelaaltjes in de gehele plant werden gevonden.

Begindichtheid per 10 g grond	Veldboon	Ui	Peen
0	0 (1)	0 (1)	0
0.3125	2	0	0
0.625	3	1 (2)	0
1.25	5	0 (1)	1 (3)
2.5	5	2 (4)	0 (2)
5	5	3	0 (3)
10	4 (5)	3 (4)	0

De stengelaaltjes werden zowel uit de stengel en de wortels van de gewassen geëxtraheerd als uit de grond. Er werden verschillende levensstadia van de stengelaaltjes gevonden, wat aangeeft dat ze zich hadden vermeerderd in de plant. Zowel bij ui als veldboon werd een groot deel van de stengelaaltjes in de bovengrondse plantendelen en in de grond aangetroffen (Tabel 4.6). Daarnaast werd ook een klein deel van de stengelaaltjes uit de wortels geëxtraheerd. Bij peen waren de verhoudingen

anders, maar gezien de zeer lage infectiegraad kan geen waarde worden gehecht aan deze gegevens.

Tabel 4.6. Deel van het totale aantal stengelaaltjes (gemiddeld, minimum en maximum) dat werd geëxtraheerd uit loof, bol, wortels en grond van drie gewassen, 16-17 weken na inoculatie van de grond.

Gewas	Dichtheid	Stengel	Bol	Wortels	Grond
Peen	0.3125	-	-	-	-
Peen	0.625	-	-	-	-
Peen	1.25	100 (100-100)	-	0 (0-0)	0 (0-0)
Peen	2.5	50 (0-100)	-	50 (0-100)	0 (0-0)
Peen	5	58 (0-100)	-	17 (0-67)	25 (0-100)
Peen	10	0 (0-0)	-	0 (0-0)	100 (100-100)
Ui	0.3125	-	-	-	-
Ui	0.625	0 (0-0)	50 (0-100)	50 (0-100)	0 (0-0)
Ui	1.25	0 (0-0)	25 (0-100)	0 (0-0)	75 (0-100)
Ui	2.5	59 (0-100)	0 (0-0)	1 (0-2)	41 (0-100)
Ui	5	37 (0-79)	15 (0-42)	0 (0-0)	48 (3-100)
Ui	10	26 (0-88)	2 (0-7)	1 (0-5)	71 (5-100)
Veldboon	0.3125	9 (0-16)	-	1 (0-2)	90 (84-100)
Veldboon	0.625	54 (0-83)	-	38 (0-100)	8 (0-19)
Veldboon	1.25	61 (46-83)	-	4 (0-9)	35 (10-52)
Veldboon	2.5	49 (28-97)	-	2 (0-4)	49 (3-72)
Veldboon	5	69 (52-80)	-	2 (0-8)	29 (15-47)
Veldboon	10	42 (0-61)	-	6 (0-26)	53 (33-100)

In de potten waarin wel stengelaaltjes waren geïnoculeerd maar geen gewas was gezaaid, was de overleving na 16-17 weken $1,4\% \pm 0,7\%$ (standaarddeviatie; $n=5$). In de potten waarin peen was gezaaid, het gewas waarin nauwelijks infectie van de plant optrad, was de overleving van het inoculum in de grond $0,04\% \pm 0,15\%$ (standaarddeviatie; $n=30$). In de meeste potten met peen werden na 16-17 weken geen stengelaaltjes gevonden. We hebben geen verklaring voor dit verschil.

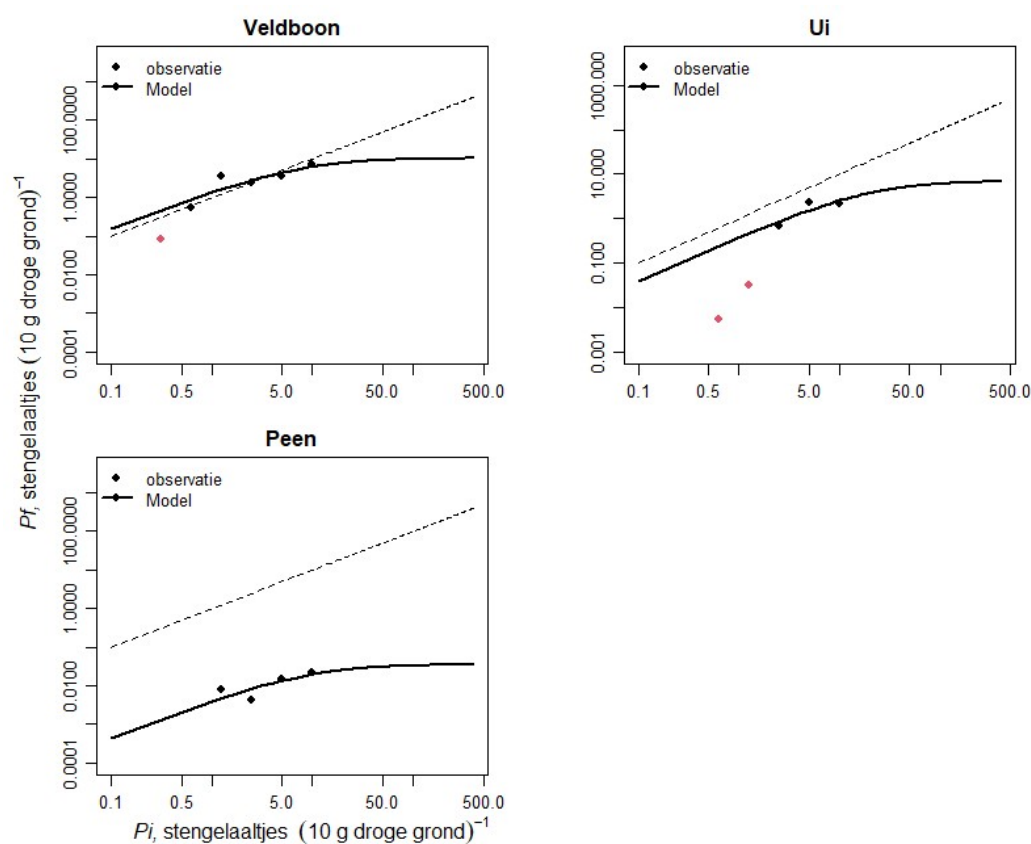
De begin- en einddichtheden van de aaltjes zijn weergegeven in grafieken, waarin een stippellijn de situatie weergeeft waarbij de begindichtheid gelijk is aan de einddichtheid (Figuur 4.4). Wanneer de einddichtheden beneden de stippellijn liggen, wordt een gewas als slechte waardplant beoordeeld.

De maximale vermeerdering a en populatiedichtheid M op peen was laag (Tabel 4.7). In de grafiek met begin- en einddichtheden ligt de door het model gefitte lijn ruimschoots beneden het equilibrium $P_f=P_i$ (Figuur 4.4). Dit geeft aan dat de stengelaaltjes zich niet of nauwelijks in het gewas hebben vermeerderd, wat betekent dat peen een slechte waardplant is voor de gebruikte populatie stengelaaltjes (populatie N1). Op ui werd een hogere maximale populatiedichtheid bereikt dan op peen, maar ook voor ui ligt de gefitte lijn onder de lijn $P_f=P_i$; dit was een onverwacht resultaat voor deze populatie stengelaaltjes (Tabel 4.7, Figuur 4.4). Voor veldboon was de maximale populatiedichtheid iets hoger en ligt de gefitte lijn op het equilibrium $P_f=P_i$. (Tabel 4.7, Figuur 4.4).

Tabel 4.7. Geschatte waarden van de parameters a (maximale vermeerdering) en M (maximale populatiedichtheid; aantal per 10 g droge grond) van het populatiedynamica-model van Seinhorst voor drie gewassen.

Gewas	a	M	SE_a	SE_M	R^2	N	Df
Peen	0.004	0.036	0.0039	0.060	0.30	4	2
Ui	0.40	7.1	0.26	14.0	0.52	3	1
Veldboon	1.54	10.5	0.73	10.0	0.66	5	3

SE: Standaardfout, R^2 : determinatiecoëfficiënt (maat voor verklaarde variantie), N: aantal waarnemingen, Df: aantal vrijheidsgraden.



Figuur 4.4. Relatie tussen de begin- (P_i) en einddichtheid (P_f) van stengelaaltjes 17 weken na inoculatie van veldboon, ui en peen. Alleen de zwart gekleurde zijn gebruikt voor fitten van het model. De stippellijn geeft de situatie weer waarin de P_f gelijk is aan de P_i (let op: getallen achter de punt zijn decimalen).

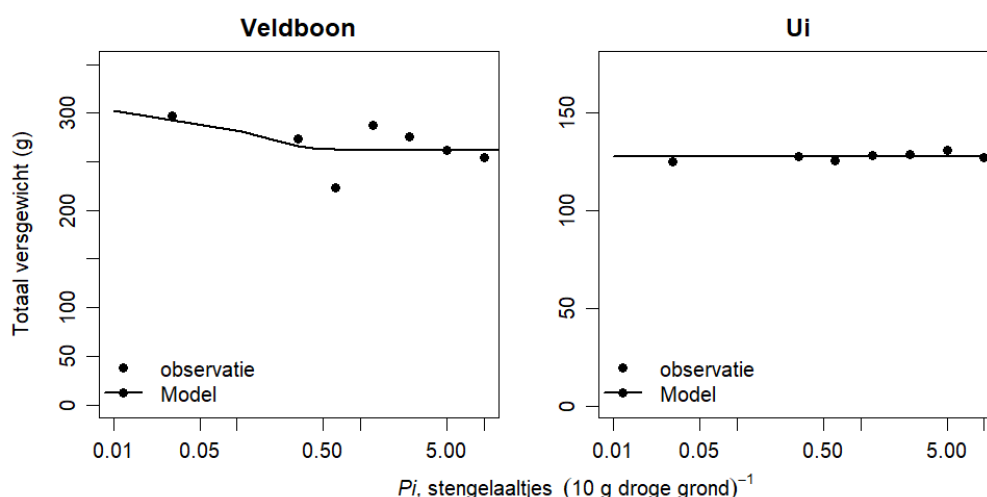
In deze proef was er mogelijk een lichte afname van het totale versgewicht van veldboon bij een hogere begindichtheid stengelaaltjes (Tabel 4.8, Fig. 4.5). Tegen de verwachting in was in ui geen effect te zien van de begindichtheid stengelaaltjes op het totale versgewicht. Wel was de R^2 van het model dusdanig laag, dat geen waarde gehecht kan worden aan de schattingen van de parameters. Voor peen was het niet

mogelijk om het effect op de plant te bepalen, omdat alleen het gewicht van het geëxtraheerde deel (bovenste deel van de peen met enkele cm stengel) was bepaald.

Tabel 4.8. Geschatte waarden van de parameters T (tolerantielimiet; aantal per g droge grond), m (relatieve minimumopbrengst) en $Y_{\max}$ (maximale opbrengst) van het opbrengstverliesmodel van Seinhorst voor drie gewassen. Waarden zijn gebaseerd op het totale versgewicht.

Gewas	T	m	$Y_{\max}$	$SE_{Y_{\max}}$	SE_T	SE_m	R^2	N	Df
Ui	0,000	0,98	131	NA	0,002	NA	-0,50	7	5
Veldboon	0,007	0,86	303	42	0,014	0,12	-0,06	7	5

SE: Standaardfout, R^2 : determinatiecoëfficiënt (maat voor verklaarde variantie), N: aantal waarnemingen, Df: aantal vrijheidsgraden.



Figuur 4.5. Relatie tussen de begindichtheid van stengelaaltjes en het totaal versgewicht (g) van de plant 16-17 weken na inoculatie van veldboon en ui. Om weergave op een logaritmische schaal mogelijk te maken, is $Pi=0$ als een waarde van 0,03 weergegeven.

4.3 Discussie en conclusies

Dit experiment heeft een aantal bevindingen uit het onderzoek van WUR | Agrosysteemkunde bevestigd. Ten eerste is bevestigd dat stengelaaltjes zowel in de bovengrondse plantendelen als in de wortels en de grond voorkomen. In dit experiment kwam slechts een klein deel van de stengelaaltjes in de wortels voor, gemiddeld 5% in ui en 7% in veldboon. Een veel groter deel van de stengelaaltjes werd uit de stengel en de grond geëxtraheerd. Het lage aantal stengelaaltjes in de wortels van ui is opvallend, omdat de wortels ontstaan uit de stengel (Brewster, 2008). De verdeling van de aaltjes over de compartimenten kan variëren gedurende de groeiperiode van de plant (Webster, 1964). Het is daarom aan te raden om in vervollexperimenten, wanneer de

waardplantstatus van een plant centraal staat, de stengelaaltjes uit zowel stengel, wortels als grond te extraheren.

Ten tweede liet inoculatie van een reeks dichtheden van stengelaaltjes in de grond eenzelfde patroon zien van de Pf (einddichtheid) ten opzichte van de Pi (begindichtheid). Toch waren de resultaten bij WUR | Open teelten teleurstellend. Er werd geen consistente infectie in alle potten bereikt, noch van alle planten in een pot. De vermeerdering van de stengelaaltjes in potten waarin planten wel werden geïnfecteerd, was lager dan verwacht. Ook was er nauwelijks effect van de stengelaaltjes op het versgewicht van ui, wat gezien de lage infectiegraad niet verwonderlijk is. Dit is een groot verschil met de resultaten van het experiment dat in 2022 bij WUR | Agrosysteemkunde werd uitgevoerd (Hoofdstuk 6 in Brinkman *et al.*, 2023). De resultaten zijn in tegenspraak met het gangbare beeld dat veldboon en ui goede waardplanten zijn en ui zeer gevoelig is voor schade door stengelaaltjes. Er kan daarom weinig waarde worden gehecht aan de berekeningen van de maximale vermeerdering en tolerantie. Een mogelijke oorzaak van de lage infectiegraad is de minder goed gecontroleerde kasomstandigheden bij WUR | Open teelten in vergelijking met de hightech faciliteiten van WUR | Agrosysteemkunde. Er kunnen ook kleine methodische verschillen een rol spelen, zoals exacte manier van inoculeren en water geven.

Dit experiment leverde geen bruikbare gegevens op om de extractieduur van stengelaaltjes uit plantmateriaal van ui te bepalen. Uit een eerder experiment bleek dat na 7 dagen 94,7% van de stengelaaltjes uit de ui was geëxtraheerd (Brinkman *et al.*, 2023). In dit experiment is daarom een extractieduur van 7 dagen aangehouden. Voor veldboon, een gewas met stugger materiaal, was een extractieduur van 14 dagen nodig om 92,9% van de stengelaaltjes uit de stengel en 99,7% uit de wortels te extraheren.

In dit experiment is geen significant effect van koel bewaren gedurende 5 weken op het aantal stengelaaltjes in de wortels en de grond aangetoond, maar er was wel een tendens dat het aantal stengelaaltjes iets lager was na koele bewaring. Gezien het lage aantal potten waarin een infectie van de plant werd gevonden en de lage infectiegraad is het niet mogelijk om een goed onderbouwde uitspraak over het effect van koele bewaring te doen.

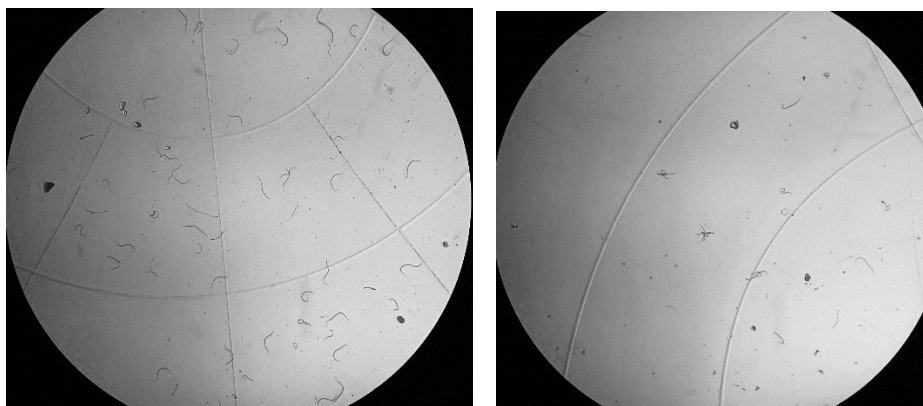
5 Waardplantproef 2023 HLB Wijster

Bij HLB in Wijster is een potproef ingezet om te onderzoeken of de vermeerdering van verschillende populaties van *D. dipsaci* uiteenloopt bij inoculeren in de grond bij verschillende gewassen. De resultaten van een vermeerderingsexperiment in 2022 suggereerden dat populaties afkomstig uit bolgewassen minder vermeerdering laten zien op ui en tuinboon dan populaties die geïsoleerd zijn uit de akkerbouwgewassen aardappel, ui en suikerbiet (Hoofdstuk 4 in Brinkman *et al.*, 2023). In de vermeerderingsproef werden de stengelaaltjes direct op de plant geïnoculeerd; in de uienbol of in de bladoksel van veldboon. In deze proef werd de inoculatie met *D. dipsaci* uitgevoerd door stengelaaltjes toe te dienen aan de grond, zoals eerder uitgevoerd bij WUR | Agrosysteemkunde in Wageningen (Hoofdstuk 6 in Brinkman *et al.*, 2023).

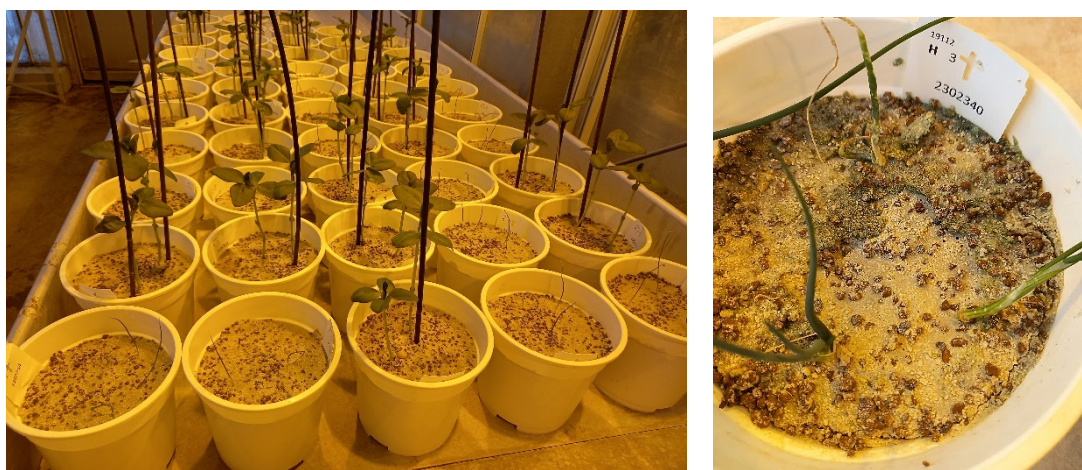
5.1 Materiaal en methode

Voor deze proef zijn twee populaties gebruikt: N1 afkomstig uit narcis en SB3 afkomstig uit suikerbiet (Fig. 5.1). Het inoculum voor de N1 populatie is verkregen uit ingedroogde narcisstukjes en het inoculum voor SB3 is verkregen uit gedroogde veldboon, waarop de oorspronkelijke populatie geïsoleerd uit suikerbiet is vermeerderd. De potten zijn gevuld met 2 kg toetsgrond (zilverzand: klei: hydrokorrels 4: 0,7: 1; zie Bijlage 1) en op 7 april 2023 geïnoculeerd met dichtheden van 0,0625; 0,25 en 1 stengelaaltje per gram grond. Direct na het inoculeren zijn de waardplanten veldboon (Banquis) en ui (Hylander) gezaaid. De proef is uitgevoerd in vier herhalingen. De planten zijn opgekweekt in de kas bij een constante temperatuur van 20°C. De planten zijn goed opgekomen, voor de tuinboon zijn twee planten per pot en voor de uien drie planten per pot gehouden (Fig. 5.2). Het vochtgehalte in de pot is zoveel mogelijk rond 12% gehouden door dagelijks water te geven van boven met een vernevelaar plantenspuit (in het weekend 1 dag zonder) en met een maatbeker om aan te vullen bij het wegen van de potten, 2 keer per week.

Na 9 weken, op 12 juni, is de proef geoogst en zijn van alle potten grond-, wortel- en plantmonsters genomen. Na het afknippen van de stengel en het zo goed mogelijk verwijderen van de wortels is de grond gemengd om een monster van 100 mL te nemen. De 100 mL grond is opgespoeld met de Oostenbrinktrechter. De extractie uit plantmateriaal verschilde voor ui en veldboon. Voor de extractie uit uien zijn alle wortels en stengels gebruikt. Voor veldboon is de onderste 30 cm van de stengel gebruikt, bij de zichtbaar geïnfecteerde planten was dat ruim boven de stengelverkleuring veroorzaakt door de infectie met *D. dipsaci*. Voor de veldboon is 20 g wortels op filter geplaatst. Het stengel- en wortelmateriaal is in stukjes van 0,5 cm geknipt en op een filter in een petrischaal met water geplaatst voor de extractie van vrijlevende aaltjes bij kamertemperatuur. De stengel- en wortelmonsters zijn na 7 dagen incubatie afgetapt en geteld. Het totaal aantal aaltjes in de wortel van veldboon is gebaseerd op de extractie van 20 g wortel. Omdat het totaal wortelgewicht niet gewogen is, zijn een aantal Pf-waardes voor de wortel van veldboon waarschijnlijk een onderschatting van het totale aantal stengelaaltjes. Dit verandert niets aan de algemene conclusies die getrokken kunnen worden uit deze proef.



Figuur 5.1. Inoculatie 7 april 2023. Narcispopulatie (N1) links: inoculum bestaat uit actieve aaltjes. Populatie suikerbiet SB3 rechts: inoculum bestaat uit actieve aaltjes die sterk willen 'samenklitten'.



Figuur 5.2. Ui en veldboon 2 weken na inoculatie (links) en infectie in ui 6,5 week na inoculatie (rechts).

5.2 Resultaten

De infectie van veldboon en ui door middel van inoculatie via de grond gaf een heel variabel beeld in de eindinfectie (Pf) (zie voor de ruwe dataset Bijlage 2). Binnen een object waren er potten waar de infectie wel succesvol was en resulteerde in een hoge Pf, terwijl in een andere pot de infectie niet succesvol was en een Pf van 0 tot 0,5 werd gevonden. Dit was dan vooral afhankelijk van hoeveel aaltjes nog werden teruggevonden in de grond. Uit de proef bleek echter wel duidelijk dat inoculatie met de populatie afkomstig uit suikerbiet vaker resulteerde in een succesvolle infectie en ook in een hogere vermeerdering op ui en veldboon (Tabel 5.1 en 5.2 en Bijlage 2). Inoculatie met de narcispopulatie resulteerde in geen enkel object in een Pf/Pi van boven de 1 en stengelaaltjes werden vrijwel uitsluitend gevonden in de grondmonsters, waarschijnlijk als overlevende aaltjes van de inoculatie. Statistische analyse van de Pf/Pi-waarden met 2-weg Anova gaf geen significante verschillen tussen populaties en gewassen.

Tabel 5.1: Gemiddeld aantal stengelaaltjes dat na 9 weken werd teruggevonden in de stengel, wortel en grond van de geïnoculeerde 2 kg-potten met ui en veldboon. De Pf/Pi is berekend met het totaal aantal getelde aaltjes per pot (n=4).

Pop.	Gewas	Inoculatiedichtheid 0.0625/g grond				Inoculatiedichtheid 0.25/g grond				Inoculatiedichtheid 1/g grond			
		Pf wortel	Pf stengel	Pf grond	Pf/Pi	Pf wortel	Pf stengel	Pf grond	Pf/Pi	Pf wortel	Pf stengel	Pf grond	Pf/Pi
N1	boon	0	0	30	0.2	1	4	115	0.2	3	6.5	380	0.2
N1	ui	0	0	25	0.2	0	0	170	0.3	0	0.25	595	0.3
SB3	boon	7	3	85	0.8	9	924	240	2.3	118	2103	615	1.4
SB3	ui	0	0	20	0.2	35	5023	495	11.1	2	2238	3090	2.7

Tabel 5.2. Aantal potten per object met een vermeerdering (Pf/Pi) boven de 1 en aantal potten waar stengelaaltjes zijn gevonden in de stengel (n=4).

Populatie	Gewas	Aantal potten met Pf/Pi > 1			Aantal potten met stengelinfectie		
		Inoculatiedichtheid/g grond			Inoculatiedichtheid/g grond		
		0.0625	0.25	1	0.0625	0.25	1
N1	boon	0	0	0	0	1	3
N1	ui	0	0	0	0	0	1
SB3	boon	2	2	1	2	3	4
SB3	ui	0	2	3	0	2	2

5.3 Discussie en conclusies

De variatie in succes van de infectie met stengelaaltjes was groot en de vermeerdering was laag, vooral bij inoculatie van de populatie uit narcis. Dit is een verschil met de consistente infectie in de waardplanttoets die was uitgevoerd door WUR | Agrosysteemkunde (Hoofdstuk 6 in Brinkman *et al.*, 2023). Mogelijk waren de omstandigheden in een minder goed geconditioneerde kas minder geschikt voor infectie. Vermoedelijk was het effect van oververhitting door zoninstraling in de periode april-begin juni beperkt. De resultaten wijzen er wel op dat de methode gebruikt kan worden voor toetsen van vermeerdering van populaties stengelaaltjes op verschillende gewassen, ofwel door aanpassen van de groeiomstandigheden, of door het vergroten van het aantal herhalingen per object.

Het is opvallend dat er in een aantal gevallen meer aaltjes werden teruggevonden in de grond dan dat er waren toegediend bij de inoculatie (Bijlage 2). Het lijkt er daarmee op dat stengelaaltjes na vermeerdering in de plant terugkeren in de grond, ook binnen een proefperiode van 9 weken waarbij de planten aan het einde van de proef nog niet dood zijn. Voor het uitvoeren van waardplanttoetsen is het dus belangrijk om ook grondmonsters te analyseren voor het bepalen van de totale eindbesmetting.

6 Inoculatie bij bloembollen

Voordat bloembollen in de kas in bloei worden getrokken, worden ze bij lagere temperatuur in de grond geïncubeerd om te wortelen. Dit brengt een complicatie met zich mee bij het uitvoeren van een waardplanttoets. Wanneer is een geschikt moment om stengelaaltjes in de grond te inoculeren: bij het planten van de bollen of bij verplaatsen naar warmere kasomstandigheden? Deze proef is uitgevoerd bij WUR | Open teelten.

6.1 Materiaal en methode

Potten van 2 L werden gevuld met 2016 g toetsgrond met een vochtgehalte van 12% (w/w; 1800 g droge grond; Bijlage 1). Op 22 februari 2023 werden in elke pot vier tulpenbollen ('Red van Eijk' maat 5-7) of één narcissenbol (cultivar onbekend, maat 14) geplant op een diepte van twee keer de bolgrootte. Ten tijde van planten waren de bollen al uitgelopen. De potten met tulp werden tot 8 maart 2023 (14 dagen) en de potten met narcis tot 29 maart 2023 (35 dagen) in een donkere koelcel bij 9°C bewaard om de bollen te laten wortelen. Na de koele bewaring werden de potten naar de kas verplaatst bij 20°C/16°C (16 uur licht/8 uur donker). Een deel van de potten werd net vóór het planten geïnoculeerd met stengelaaltjes, een deel bij verplaatsen naar de kas. Als controle werd een deel van de potten niet geïnoculeerd. Voorafgaand aan de koele bewaring werd het vochtgehalte van de grond op 15% gebracht. De proef werd uitgevoerd in vier herhalingen.

De potten met tulp werden geoogst op 1 mei 2023, na 52 dagen in de kas, omdat de planten begonnen af te sterven. De potten met narcis werden geoogst op 15 mei 2023, na 47 dagen in de kas, omdat de planten begonnen uit te bloeien. De planten werden voorzichtig uit de pot gehaald en de grond werd van de wortels geschud. De grond werd gewogen en gemengd en er werd een submonster van 250 mL (291 voor tulp en 300 g voor narcis) genomen voor extractie van stengelaaltjes. De grond werd opgespoeld met de Oostenbrinktrechter en het opgevangen materiaal op de zeven werd op een filter gebracht en gedurende 3 dagen bij 20°C geïncubeerd. De verse biomassa van de bladeren, de bollen en wortels (tulp met en narcis zonder aanhangende grond) van de planten per pot werden bepaald. Het plantmateriaal werd in stukjes van 1 cm geknipt en per plantdeel en pot in de mistkast gezet. De suspensies van de mistkast werden na 3 en 7 dagen afgetapt en afzonderlijk geteld. Bij de narcis werden na 3 dagen in de mistkast nauwelijks stengelaaltjes gevonden. Ter controle werden twee monsters na 7 dagen opnieuw afgetapt en geteld, maar hierin werden geen stengelaaltjes aangetroffen. Daarom werd besloten om de andere monsters niet te tellen. De gegevens werden per gewas geanalyseerd met een Anova gevolgd door een Tukey test in R versie 4.2.1 (R Core Team, 2022) en R studio versie 2022.7.0.548 (RStudio, 2022).

6.2 Resultaten

Bij oogst waren de wortels van narcis roze verkleurd, waarschijnlijk door aantasting met *Fusarium*. Er waren geen symptomen van aantasting door stengelaaltjes zichtbaar. Er

was geen significant effect van het toedienen van de stengelaaltjes op de biomassa van blad, bol en wortels van tulp en narcis.

In de wortels en de bol van de tulp, of in de aanhangende grond, kwamen naast stengelaaltjes ook *Aphelenchoides* sp. voor. Dit bemoeilijkte het tellen, omdat deze bij lage vergroting sterk lijken op juveniele stadia van stengelaaltjes. Zo nodig werd bij een hogere vergroting gecontroleerd.

Bij tulp was er bij oogst een significant effect van de inoculatie op het aantal stengelaaltjes in de bol (inclusief aanhangende grond) en in de grond (Tabel 5.1, Bijlage 4). De stengelaaltjes in de grond hadden dezelfde grootte als de aaltjes ten tijde van inoculatie. Gezien het feit dat het aantal stengelaaltjes in de grond het hoogste was in de potten die later waren geïnoculeerd, zullen dit overlevende aaltjes van het inoculum zijn. De variatie in aantallen was groot, waarbij vooral opviel dat er slechts één pot was waarin een groot aantal stengelaaltjes in het blad en in de wortels werd gevonden (Bijlage 3, pot nr. 7).

Bij narcis werden slechts sporadisch stengelaaltjes aangetroffen in de verschillende onderdelen van de plant en alleen in de potten die als laatste waren geïnoculeerd, bij het verplaatsen naar de kas. Bij narcis was het aantal stengelaaltjes in de grond het hoogste in de potten die bij het verplaatsen naar de kas waren geïnoculeerd (Tabel 5.1, Bijlage 4). In de potten die bij het planten van de bollen waren geïnoculeerd, werden alleen enkele stengelaaltjes gevonden in de grond (Tabel 5.1).

Tabel 5.1. Aantal stengelaaltjes in verschillende onderdelen van de plant (tulp en narcis) en in de grond per pot bij oogst. Potten waren 1) Niet geïnoculeerd of 2) geïnoculeerd ten tijde van Planten of 3) na een periode van koele bewaring bij verplaatsen naar de Kas. Gemiddelde en 0,95%-betrouwbaarheidsinterval. Letters geven significante verschillen aan binnen een onderdeel van een gewas.

Deel	Inoculatie	Tulp [#]				Narcis			
		Gem.		Btbh-interval		Gem.		Btbh-interval	
Blad	Niet	0.0	a	0.0	-	2.8	0.0	a	0.0 - 0.3
Blad	Planten	5.5	a	0.7	-	23.8	0.0	a	0.0 - 0.3
Blad	Kas	1.0	a	0.0	-	6.6	0.2	a	0.0 - 0.6
Bol	Niet	0.0	a	0.0	-	1.3	0.0	a	0.0 - 0.2
Bol	Planten	20.2	b	8.4	-	46.8	0.0	a	0.0 - 0.2
Bol	Kas	54.6	b	23.7	-	124.2	0.3	a	0.1 - 0.6
Wortel	Niet	0.0	a	0.0	-	5.2	0.0	a	0.0 - 0.2
Wortel	Planten	12.6	a	1.2	-	83.2	0.0	a	0.0 - 0.2
Wortel	Kas	12.8	a	1.2	-	84.5	0.1	a	0.0 - 0.4
Grond	Niet	0.0	a	0.0	-	1.8	0.0	a	0.0 - 0.9
Grond	Planten	6.1	b	1.5	-	19.2	0.7	a	0.0 - 2.2
Grond	Kas	68.0	c	23.3	-	194.6	215.2	b	110.8 - 417.1

[#] Voor tulp werden de bol en wortels met aanhangende grond geëxtraheerd, voor narcis werden bol en wortels eerst afgespoeld.

6.3 Discussie en conclusies

Bij de extractie van stengelaaltjes uit de bol en wortels van tulp was het beter geweest om eerst de aanhangende grond af te spoelen. Nu zijn weliswaar ook de aaltjes in de aanhangende grond geëxtraheerd en niet verloren gegaan, maar is niet vast te stellen of de stengelaaltjes zich daadwerkelijk in de bol of wortels bevonden.

In de potten die niet werden geïnoculeerd, werden geen stengelaaltjes aangetroffen. Dit duidt er op dat deze bollen op het moment van planten vrij waren van stengelaaltjes. Het is niet met zekerheid te stellen dat dit ook voor de bollen in de andere behandelingen gold, maar het geeft wel aan dat er geen hoge graad van infectie in de partij aanwezig was. We nemen daarbij aan dat de stengelaaltjes die bij oogst uit de plant werden geëxtraheerd afkomstig waren van het inoculum.

In slechts één pot met tulp trad onmiskenbaar infectie op van de plant en werden enkele honderden stengelaaltjes uit het blad geïsoleerd. In de andere potten werden één tot enkele aaltjes uit het blad van tulp geïsoleerd. De infectie van narcis kan als mislukt worden beschouwd met slechts één pot waarin twee aaltjes uit het blad werden geïsoleerd. Onder de geldende omstandigheden kan deze methode niet worden gebruikt om de waardplantstatus van tulp en narcis voor stengelaaltjes te bepalen.

Het is onduidelijk wat de oorzaak is van de lage infectiegraad. Infectie van tulp door besmet plantmateriaal door de grond te mengen werd eerder wel gebruikt om tulpen- en narcissenstengelaaltjes van elkaar te onderscheiden, maar er werd niet genoemd hoe succesvol deze methode was (Windrich, 1970). In een experiment met narcis in buizen met compost werden de planten wel door stengelaaltjes uit de grond geïnfecteerd (Hesling, 1967a). De bollen werden in de herfst in besmette grond geplant en buiten opgekweekt, beschermd tegen regen. Wel was ook in dit experiment de variatie tussen potten groot en trad soms wel infectie van het blad, maar niet van de bol op. Inoculatie laat in het seizoen resulteerde in een lagere en meer variabele besmetting, maar dit betrof inoculatie in de periode mei-juli (Hesling, 1967b). Mogelijk speelt het uitlopen van de bollen daarbij een rol.

7 Slotbeschouwing Uireka stengelaaltjes 2020-2023

Stengelaaltjes vormen een lastig probleem vanwege de brede waardplantreeks, het ontstaan van schade bij zeer lage begindichtheden en de onvoorspelbaarheid van het optreden van problemen. In het Plan van Aanpak Stengelaaltjes zijn kennislacunes geformuleerd, met een voorstel voor een gestructureerde onderzoeksplan (Tabel 7.1). Het doel hiervan is om telers handelingsperspectief te bieden bij de preventie en beheersing van besmettingen met stengelaaltjes. In de PPS Uireka 2.0 (LWV-1910) is gekozen om onderzoek te doen aan randvoorwaarden voor vestiging, het verzamelen van populaties ten behoeve van moleculaire karakterisering en waardplantonderzoek, extractie uit grond en het ontwikkelen van een pottoets ter bepaling van de waardplantstatus. Gedurende de loop van het project zijn jaarlijks de resultaten van het onderzoek in rapporten beschreven. Hieronder volgen de conclusies en aanbevelingen van het onderzoek uit de gehele projectperiode 2020-2023.

Tabel 7.1 Onderwerpen die in het Plan van Aanpak stengelaaltjes benoemd zijn om tot beheersing van het probleem te komen. Cursief de in dit project gekozen onderwerpen.

Activiteit	
1	CATT aardappelpootgoed
2	<i>Voorstudie randvoorwaarden vestiging</i>
3	Vastleggen/monitoring
4	Optimaliseren bemonstering
4.1	<i>Optimalisatie extractie uit monster</i>
5	<i>Ontwikkelen pottoetsmethode ter bepaling waardplantstatus</i>
6	Rasverschillen tolerantie voor aardappel
7	Waardplantstatus groenbemesters
8	Effectiviteit nematiciden
9	Anaerobe Grond Ontsmetting
10	Moleculaire karakterisering stengelaaltjesrassen
10.1	Constructie referentie genomen
10.2	Resequenzen van 100 <i>D. dipsaci</i> populaties tegen referentiegenoom
10.3	<i>Toetsen populaties op referentiegewassen</i>

Literatuurstudie randvoorwaarden voor vestiging

In de bestudeerde literatuur zijn geen nieuwe inzichten naar voren gekomen over factoren die bepalen of stengelaaltjes zich al dan niet vestigen in een perceel. In het algemeen wordt gesteld dat zowel de overleving als de activiteit van stengelaaltjes hoger is op de zwaardere gronden in vergelijking met zandgrond. Een vochtige bodem en niet te hoge temperatuur zijn bevorderlijk voor infectie. Het is niet duidelijk wat de rol van organische stof is op het besmettingsniveau. Er is weinig informatie beschikbaar over het effect van pH op stengelaaltjes. Wel zijn er sterke aanwijzingen dat micro-organismen en/of biochemische bestanddelen invloed hebben op de activiteit van stengelaaltjes. Het verdient aanbeveling om resultaten van lopend onderzoek bij WUR

Laboratorium voor Nematologie naar invloed van bodemleven op andere plantenparasitaire aaltjes af te wachten.

Verzamelen van stengelaaltjespopulaties

Bij een perceel met een besmetting uit het verleden is de dichtheid stengelaaltjes in de grond laag en daarmee de kans om ze uit de grond te extraheren klein. Daarom is het belangrijk dat er sprake is van een actieve populatie en hebben we voor het verzamelen van populaties naar besmet plantmateriaal gezocht. Voor het verzamelen van populaties is van 2020-2023 bij collega-nematologen, controlerende instanties, erfbetreders en telers kenbaar gemaakt dat we op zoek waren naar stengelaaltjesbesmettingen. Herhaaldelijke aandacht voor het onderwerp in nieuwsbrieven van Uireka, BO Akkerbouw en het IRS bleek nodig, zowel in het groeiseizoen als bij de oogst. Het aantal meldingen was hoger in jaren met koelere en vochtigere weersomstandigheden. In de PPS 'Moleculaire karakterisering waardplantenstatus van stengelaaltjesrassen' van WUR Laboratorium voor Nematologie worden de verzamelde populaties gekarakteriseerd. Oververtegenwoordiging van populaties uit bepaalde gewassen in specifieke regio's maakt conclusies over de achtergrond van gevonden genetische verschillen lastig. Een waardplanttoets is nodig om te bepalen of genetische verschillen ook samenhangen met verschillen in de mate van vermeerdering op verschillende gewassen.

Optimaliseren extractie stengelaaltjes uit grondmonsters

Het is niet gelukt om de efficiëntie van de zonale centrifuge methode voor het extraheren van inactieve stengelaaltjes te bepalen. Hiertoe was een methode nodig om stengelaaltjes in deze inactieve 'rusttoestand' te verkrijgen zonder dat ze in water meteen weer actief worden. Ondanks diverse pogingen is het niet gelukt om stengelaaltjes lang genoeg inactief te houden om de proef uit te kunnen voeren. Bij een volgende poging zou gedroogd plantmateriaal met stengelaaltjes gebruikt kunnen worden, al zal dan de spreiding in begin- en einddichtheid lastiger te controleren zijn. De extractie-efficiëntie van de zonale centrifuge voor actieve stengelaaltjes was vergelijkbaar met die van de Oostenbrinktrechter. Bij de keuze voor de ene of andere methode kunnen dan andere overwegingen een rol spelen, zoals aard of grootte van het monster of snelheid waarmee resultaten gewenst zijn.

Ontwikkeling van een pottoets ter bepaling van waardplantstatus

Om de waardplantstatus van gewassen te bepalen, is het nodig een toets te gebruiken waarbij een consistente relatie tussen begin- en einddichtheid kan worden vastgesteld. In de toets is uitgegaan van nematoden die aan de grond worden toegediend, zodat de resultaten te vergelijken zijn met gegevens van veldbemonsteringen. De gedachtegang hier achter is om zoveel mogelijk de condities in het veld na te bootsen. Houd bij de toets rekening met de volgende factoren:

- Inoculeer eerst de nematode, zaai of plant dan het gewas.
- Bereken het aantal zaden per pot aan de hand van de zaaidichtheid in het veld en de oppervlakte van de pot.
- Gebruik een voldoende grote pot.
- Gebruik grond met een groot watervasthoudend vermogen waaruit de aaltjes goed zijn te extraheren (toetsgrond: mengsel van zand, klei, gemalen kleikorrels en voedingsstoffen; Bijlage 1).

- Gebruik standaard groeicondities (18-20°C overdag en 16°C 's nachts bij een daglengte van 16 uur en 68-70% relatieve luchtvochtigheid).
- Laat de planten lang genoeg groeien, maar niet afsterven.
- Extraheer stengelaaltjes uit boven- en ondergrondse plantendelen en grond.
- Gebruik een referentie waarvan bekend is dat de combinatie van populatie en gewas een goede vermeerdering oplevert.
- Gebruik bij toetsen van akkerbouwgewassen minimaal een populatie afkomstig van een akkerbouwgewas en bij bloembollen een populatie afkomstig van een bloembolgewas.

Met deze methode werd een consistente infectie met stengelaaltjes bereikt. De populatiedynamische en opbrengstverliesmodellen van Seinhorst beschreven de gevonden einddichtheden en het effect op de groei van de planten goed. Herhalen van deze toets op twee andere locaties onder minder gunstige kasomstandigheden bleek een inconsistente infectie en lagere vermeerdering op te leveren. Wel lijkt de methode perspectief te bieden om verschillen in vermeerdering van populaties op verschillende gewassen te toetsen. Om tot een algemeen bruikbare toets te komen, is het belangrijk om te weten welke factoren cruciaal zijn om een consistente infectie te bewerkstelligen.

Vermeerdering

Er is een groot aantal aaltjes nodig om een waardplanttoets uit te voeren. Voor het vermeerderen van populaties stengelaaltjes is gebruik gemaakt van twee methoden: inoculatie in uienbollen en in bladoksels van veldboon. Beide methoden bleken te voldoen voor populaties afkomstig uit akkerbouwgewassen (aardappel, suikerbiet en ui). De vermeerdering van populaties afkomstig uit bloembollen (narcis en tulp) in ui en veldboon was minder goed.

Voortzetting van het onderzoek

Het bestaan van verschillende stengelaaltjesrassen die morfologisch niet zijn te onderscheiden, maar wel verschillen in waardplantreeks, vormt een probleem bij vormgeven van een slimme vruchtwisseling. In dit project is een aanzet gegeven om een pottoets te ontwikkelen waarmee de waardplantstatus van een gewas voor een populatie stengelaaltjes kan worden vastgesteld. BO Akkerbouw stelt extra financiering beschikbaar om de geschiktheid van deze toets om onderscheid te maken in de waardplantstatus van verschillende gewassen voor verschillende populaties vast te stellen. Deze toets zal worden uitgevoerd door WUR | Agrosysteemkunde en WUR | Laboratorium voor Nematologie. De resultaten van de toets zullen worden gerelateerd aan de genetische achtergrond van de stengelaaltjespopulaties, die is vastgesteld in de PPS 'Moleculaire karakterisering waardplantenstatus van stengelaaltjesrassen'. Als het mogelijk blijkt om genetische verschillen te relateren aan het vermogen om te vermeerderen op verschillende gewassen, biedt dit perspectief om een diagnostische toets te ontwikkelen om stengelaaltjesrassen te onderscheiden. Dit zou een belangrijke stap zijn om gerichte advisering van vruchtwisseling mogelijk te maken.

8 Literatuur

- Aaltjesschema. <https://www.aaltjesschema.nl> (geraadpleegd op 26-06-2023).
- Beniers, J.E., Teklu, M. G., Been, T.H. & Schomaker, C.H., 2015. Standard Operating Procedures (SOP); Methods for the estimation of partial resistance in the glasshouse of potato cultivars/genotypes against Potato Cyst Nematodes. Wageningen Research, Wageningen.
- Bezooijen, J. van, (2006). *Methods and techniques for nematology*: Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. <https://onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.library.wur.nl/doi/pdfdirect/10.1111/epp.12077>
- Blake, C.D., 1962. The etiology of tulip-root disease in susceptible and in resistant varieties of oats infested by the stem nematode, *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev: I. Invasion of the host and reproduction by the nematode. *Annals of Applied Biology*, 50, 703-712.
- Brewster, J. L. (2008). *The structure of edible alliums*. CABI Digital Library. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20083195850>
- Brinkman, P., Kombrink, A., Teklu, M.G., 2021. Stengelaaltjes: populaties, extractie en ontwikkelen pottoets; Rapportage proefjaar 2020. Holland Onion Association, Zoetermeer. Uireka rapport 2021-05. https://uireka.nl/wp-content/uploads/2021/06/rapport_2021-05_stengelaaltjes.pdf
- Brinkman, P., Kombrink, A., Teklu, M.G., Molendijk, L., 2022. Stengelaaltjes: populaties, extractie en ontwikkelen waardplanttoets. Rapportage proefjaar 2021. Holland Onion Association, Zoetermeer. Uireka Rapport 2022-04. https://uireka.nl/wp-content/uploads/2022/07/Rapport_2022-04_stengelaaltjes.pdf
- Brinkman, P., Kombrink, A., Teklu, M.G., Molendijk, L., 2023. Stengelaaltjes: populaties, extractie en ontwikkelen pottoets; Rapportage proefjaar 2022. Holland Onion Association, Zoetermeer. Uireka rapport 2023-08. <https://uireka.nl/wp-content/uploads/2023/12/Stengelaaltjes-populaties-extractie-en-ontwikkelen-pottoets-jaarrapportage-2022-.pdf>
- Elgin, J.H., Evans, D.W., Faulkner, L.R., 1975. Factors affecting the infection of alfalfa seedlings by *Ditylenchus dipsaci*. *Journal of Nematology*, 7, 380-383.
- EPPO, 2021. PM 7/148 (1) Guidelines for the management of nematode collections used for the production and maintenance of reference material. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, (51), 507-548. DOI: 10.1111/epp.12798
- Hesling, J.J., 1967a. Vertical migration of the narcissus stem eelworm in soil. *Plant Pathology*, 16 (1), 1-5. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1967.tb00351.x
- Hesling, J.J., 1967b. The effects of late-season attack on narcissus by stem eelworm. *Plant Pathology*, 16 (1), 11-17. DOI: 10.1111/j.1365-3059.1967.tb00353.x
- Molder, D. M. te, Ruitenbeek, J. S. van de, Riksen, J. A. G., Bakker, J., Smant, G., & Sterken, M. G. 2022. *Unravelling the race complex: A first look Into the population genetics of the stem nematode Ditylenchus dipsaci*. Poster session presented at ICN 2022 7th International congress of Nematology, Antibes Juan-les-Pins, France.
- R Core Team, 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

- Robertson, D., 1928. Observations on the disease of oats caused by the stem eelworm *Anguillulina dipsaci* (Kühn, 1857). *Annals of Applied Biology*, 15, 488-498.
- RStudio Team, 2022. RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA. URL <http://www.rstudio.com/>
- Schomaker, C.H. & Been, T.H., 2013. Plant growth and population dynamics. In: Perry, R.N. & Moens, M. (Eds). *Plant nematology*, 2nd edition. Wallingford, UK, CAB International, pp. 301-330
- Seinhorst, J.W., 1956. Biologische rassen van het stengelaaltje *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev en hun waardplanten. *Tijdschrift over Plantenziekten*, 62, 179-188.
- Seinhorst, J.W., 1964. Kwantitatief onderzoek over plantenparasitaire aaltjes. Intern IPO rapport.
- Seinhorst, J.W., 1965. The relation between nematode density and damage to plants. *Nematologica*, 11, 137-154.
- Seinhorst, J.W., 1998. The common relation between population density and plant weight in pot and micro plot experiments with various nematode plant combinations. *Fundamental and Applied Nematology*, 21 (5), 459-468.
- Storelli, A., Keiser, A., Kiewnick, S., Daub, M., Mahlein, A.-K., Beyer, W., & Schumann, M., 2021. Development of a new in vivo protocol through soil inoculation to investigate sugar beet resistance towards *Ditylenchus dipsaci* penetration. *Nematology*, 1-10. (Online advance article) doi:10.1163/15685411-bja10069
- Sturhan, D., 1969. Das Rassenproblem bei *Ditylenchus dipsaci*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft*, 136, 87-98.
- Teklu, M.G., 2018. Quantitative studies on potato genotypes and fodder radish varieties resistant to the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi*. PhD thesis, Wageningen University and Research.
- Teklu, M.G., Beniers, J.E., Been, T.H. & Schomaker, C.H., 2015. Standard Operating Procedures (SOP); Methods for the estimation of partial resistance in the glasshouse of potato cultivars/genotypes against Root-knot Nematodes. Wageningen Research, Wageningen.
- Teklu, M.G., Brinkman, P., Molendijk, L., 2022. Effect van bodemgesteldheid op de activiteit en de infectieusiteit van stengelaaltjes (*Ditylenchus dipsaci*); Resultaten uit literatuuronderzoek. Holland Onion Association, Zoetermeer. Uireka rapport 2021-08,. https://uireka.nl/wp-content/uploads/2022/03/rapport_2021-08_stengelaaltjes_bodemgesteldheid.pdf
- Viaene, N., Hallmann, J. & Molendijk, L.P.G., 2021. Methods for nematode extraction, in: Perry, R.N., Hunt, D. & Subbotin, S.A. (Eds.), *Techniques for work with plant and soil nematodes*. CABI Wallingford UK, pp. 12-41.
- Vreeburg, P., Dees, R., van Doorn, J. & de Boer, A., 2014. *Ecologie stengelaaltjes*. PPO Business Unit Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit.
- Wallace, H.R., 1962. Observations on the behaviour of *Ditylenchus dipsaci* in soil. *Nematologica*, 7, 91-101.
- Webster, J.M., 1964. Population increase of *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) in the narcissus and the spread of the nematode through the soil. *Annals of Applied Biology*, 53 (3), 485-492.

- Whitehead, A.G., Fraser, J.E. & Nichols, A.J.F., 1987. Variation in the development of stem nematodes, *Ditylenchus dipsaci*, in susceptible and resistant crop plants. *Annals of Applied Biology*, 111 (2), 373-383.
- Windrich, W. A., 1970. A rapid method for distinguishing the tulip and daffodil races of *Ditylenchus dipsaci* (Kuehn). *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 76 (2), 93-98. DOI: 10.1007/BF01974437
- Yavuzaslanoğlu, E., 2020. Tolerance and resistance of onion (*Allium cepa*) to stem and bulb nematode (*Ditylenchus dipsaci*). *Acta Horticulturae*, 1282, 43-48. doi:10.17660/ActaHortic.2020.1282.8

Bijlage 1. Samenstelling toetsgrond

Tabel 1. Samenstelling toetsgrond (1020 kg).

Product		Hoeveelheid
Kwartzand		725 kg
Hydrokorrels (fijngemaakt)		175 kg
Kleipoeder (kaolien)		120 kg
Steiner nutriënten	A	31,6 mL
	B	41,8 mL
	C	37,9 mL
	D	87,1 mL
	i.p.v. E en F: Easymix sierteelt (Easygrow)	38,76 g
Osmocote NPK-korrels (12:10:18)		1.02 kg

Tabel 2. Samenstelling Steiner nutriëntenoplossing.

	Stof	Concentratie	
A	MgSO ₄ .7H ₂ O	246 g/L	2N
B	KH ₂ PO ₄	136 g/L	1N
C	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	590 g/L	5N
D	KNO ₃	101 g/L	1N
E	MnSO ₄ .4H ₂ O	85 g	In 1 L water
	H ₃ Bo ₃	30 g	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	4.6 g	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.8 g	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1.3 g	Eerst oplossen in water, anders ontstaat er neerslag
F	Ijzer: 0.1 %-oplossing	(1 g/L)	Fe (DTPA) pH 7 (= ijzer cheleerder). Koel bewaren, Firma Brinkman b.v., Postbus 95, 's-Gravenzande).

Bijlage 2. Data waardplantproef 2023 HLB

De Pf van de wortel van veldboon is een onderschatting van het totaal, omdat de extractie is gedaan uit 20 g wortel en het totaal niet is gewogen (de wortels zijn niet random afgeknipt, maar de verdikte wortels en net onder de stengel zijn in ieder geval meegenomen in de extractie). Bij lage aantallen is het hele monster geteld en bij hoge aantallen zijn de aaltjes in 10 mL uit 100 mL suspensie geteld.

Monsternr	Populatie	Inoculatie aaltjes/g grond	gewas	Pf wortel	Pf stengel	Pf grond	Pf totaal	Pi/pot	Pf/Pi
(2302310)	Narcis	1	boon	0	7	360	367	2000	0.2
(2302311)	Narcis	1	boon	0	0	160	160	2000	0.1
(2302312)	Narcis	1	boon	13	12	520	545	2000	0.3
(2302313)	Narcis	1	boon	0	7	480	487	2000	0.2
(2302314)	Narcis	1	ui	0	0	520	520	2000	0.3
(2302315)	Narcis	1	ui	0	0	500	500	2000	0.3
(2302316)	Narcis	1	ui	0	0	420	420	2000	0.2
(2302317)	Narcis	1	ui	0	1	940	941	2000	0.5
(2302318)	Narcis	0.25	boon	0	0	0	0	500	0.0
(2302319)	Narcis	0.25	boon	2	16	220	238	500	0.5
(2302320)	Narcis	0.25	boon	0	0	200	200	500	0.4
(2302321)	Narcis	0.25	boon	0	0	40	40	500	0.1
(2302322)	Narcis	0.25	ui	0	0	60	60	500	0.1
(2302323)	Narcis	0.25	ui	0	0	140	140	500	0.3
(2302324)	Narcis	0.25	ui	0	0	300	300	500	0.6
(2302325)	Narcis	0.25	ui	0	0	180	180	500	0.4
(2302326)	Narcis	0.0625	boon	0	0	60	60	125	0.5
(2302327)	Narcis	0.0625	boon	0	0	60	60	125	0.5
(2302328)	Narcis	0.0625	boon	0	0	0	0	125	0.0
(2302329)	Narcis	0.0625	boon	0	0	0	0	125	0.0
(2302330)	Narcis	0.0625	ui	0	0	20	20	125	0.2
(2302331)	Narcis	0.0625	ui	0	0	0	0	125	0.0
(2302332)	Narcis	0.0625	ui	0	0	80	80	125	0.6
(2302333)	Narcis	0.0625	ui	0	0	0	0	125	0.0
(2302334)	SB	1	boon	318	320	220	858	2000	0.4
(2302335)	SB	1	boon	119	410	340	869	2000	0.4
(2302336)	SB	1	boon	12	7450	520	7982	2000	4.0
(2302337)	SB	1	boon	21	230	1380	1631	2000	0.8
(2302338)	SB	1	ui	0	0	1340	1340	2000	0.7
(2302339)	SB	1	ui	6	5150	620	5776	2000	2.9
(2302340)	SB	1	ui	1	3800	8200	12001	2000	6.0
(2302341)	SB	1	ui	0	0	2200	2200	2000	1.1

Monsternr	Populatie	Inoculatie aaltjes/g grond	gewas	Pf wortel	Pf stengel	Pf grond	Pf totaal	Pi/pot	Pf/Pi
(2302342)	SB	0.25	boon	30	2820	700	3550	500	7.1
(2302343)	SB	0.25	boon	1	2	120	123	500	0.2
(2302344)	SB	0.25	boon	0	0	80	80	500	0.2
(2302345)	SB	0.25	boon	4	875	60	939	500	1.9
(2302346)	SB	0.25	ui	20	41	400	461	500	0.9
(2302347)	SB	0.25	ui	0	0	200	200	500	0.4
(2302348)	SB	0.25	ui	1	8750	200	8951	500	17.9
(2302349)	SB	0.25	ui	118	11300	1180	12598	500	25.2
(2302350)	SB	0.0625	boon	0	0	140	140	125	1.1
(2302351)	SB	0.0625	boon	0	0	0	0	125	0.0
(2302352)	SB	0.0625	boon	0	1	40	41	125	0.3
(2302353)	SB	0.0625	boon	29	12	160	201	125	1.6
(2302354)	SB	0.0625	ui	0	0	0	0	125	0.0
(2302355)	SB	0.0625	ui	0	0	40	40	125	0.3
(2302356)	SB	0.0625	ui	0	0	0	0	125	0.0
(2302357)	SB	0.0625	ui	0	0	40	40	125	0.32
(2302358)	-	0	ui	0	0	0	0	0	0
(2302359)	-	0	boon	0	0	0	0	0	0

Bijlage 3. Data proef inoculatie bloembollen

Versgewicht in g van bol, blad en wortel van tulp en narcis (tulp met aanhangende grond) en aantal stengelaaltjes per pot na 3 dagen en 1 week extractie in de mistkast (bol, blad en wortels) en in de grond. De grond was geïnoculeerd met 1800 stengelaaltjes ten tijde van planten of bij verplaatsen naar de kas. Tulp 14 dagen koele bewaring bij 9°C, daarna 52 dagen in de kas. Narcis 35 dagen koele bewaring bij 9°C, daarna 47 dagen in de kas.

Nummer	Object	Gewas	Inoculatie	Bol-g	Blad-g	Wortel-g	Bol-3dg	Bol-1wk	Bol-tot	Blad-3dg	Blad-1wk	Blad-tot	Wortel-3dg	Wortel-1wk	Wortel-tot	Grond-tot	Totaal
1	A	Tulp	geen	15.3	0.13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	A	Tulp	geen	27.74	1.67	2.11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	A	Tulp	geen	24.79	0.83	4.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	A	Tulp	geen	23.05	1.95	2.55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	A	Tulp	geen	26.01	1.63	3.66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	B	Tulp	planten	22.24	1.52	1.99	80	0	80	1	0	1	10	0	10	0	91
7	B	Tulp	planten	18.1	0.87	2.15	10	0	10	350	17	367	630	70	700	20	1097
8	B	Tulp	planten	17.38	1.18	3.95	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	10
9	B	Tulp	planten	19.18	0.94	5.98	20	0	20	3	4	7	0	0	0	28	55
10	B	Tulp	planten	15.41	0.94	7.65	20	0	20	1	0	1	40	20	60	29	110
11	C	Tulp	kas	21.41	1.58	3.89	70	0	70	1	0	1	10	10	20	133	224
12	C	Tulp	kas	20.93	1.93	4.93	20	10	30	0	1	1	30	0	30	75	136
13	C	Tulp	kas	19.71	0.7	1.26	80	0	80	1	0	1	0	0	0	38	119
14	C	Tulp	kas	25.07	1.38	6.48	240	30	270	0	1	1	0	10	10	56	337
15	C	Tulp	kas	20.46	0.95	3.14	10	0	10	0	1	1	60	10	70	68	149
16	D	Narcis	geen	61.76	12.09	10.24	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	0	0
17	D	Narcis	geen	46.11	2.58	2.19	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	0	0



Nummer	Object	Gewas	Inoculatie	Bol-g	Blad-g	Wortel-g	Bol-3dg	Bol-1wk	Bol-tot	Blad-3dg	Blad-1wk	Blad-tot	Wortel-3dg	Wortel-1wk	Wortel-tot	Grond-tot	Totaal
18	D	Narcis	geen	38.55	3.97	1.67	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	0	0
19	D	Narcis	geen	37.25	6.63	5.11	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	0	0
20	D	Narcis	geen	45.09	6.55	5.45	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	0	0
21	E	Narcis	planten	58.67	12.67	8.84	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	0	0
22	E	Narcis	planten	53.27	10.57	9.88	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	12	12
23	E	Narcis	planten	45.21	4.57	2.21	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	0	0
24	E	Narcis	planten	54.83	13.45	7.98	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	0	0
25	E	Narcis	planten	44.07	9.7	11.12	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	0	0
26	F	Narcis	kas	47.06	10.97	7.33	1	0	1	0	NA	0	1	NA	1	177	179
27	F	Narcis	kas	52.08	6.84	5.94	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	197	197
28	F	Narcis	kas	42.82	0.87	0	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	276	276
29	F	Narcis	kas	46.43	4.83	2.86	0	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	170	170
30	F	Narcis	kas	50.09	8.06	10.02	1	0	1	2	NA	2	0	NA	0	282	285

Bijlage 4. Statistische analyse proef inoculatie bloembollen

Tabel 1. Resultaten van Anova en Kruskal-Wallis toets met effect van tijdstip van inoculeren (niet, bij planten of bij verplaatsen naar de kas) op het aantal stengelaaltjes in verschillende onderdelen van de plant en de grond ('Parameter') bij tulp en narcis. Significante resultaten zijn vetgedrukt.

Parameter	Tulp		Narcis			
	F _{2, 12}	P	Kruskal-Wallis chi-kwadraat	P	F	P
Totaal	41.1	0.0000			96.21	0.0000
Plant#	30.44	0.0000			2.608	0.1146
Blad	2.384	0.1344			1	0.3966
Bol	31.69	0.0000			2.667	0.1101
Wortel	3.275	0.0733	5.5352	0.0628	1	0.3966
Grond	19.62	0.0002			96.07	0.0000

Totaal van Blad, bol en wortels.

Script Anova en Tukey test (voorbeeld voor tulp, totaal aantal aaltjes):

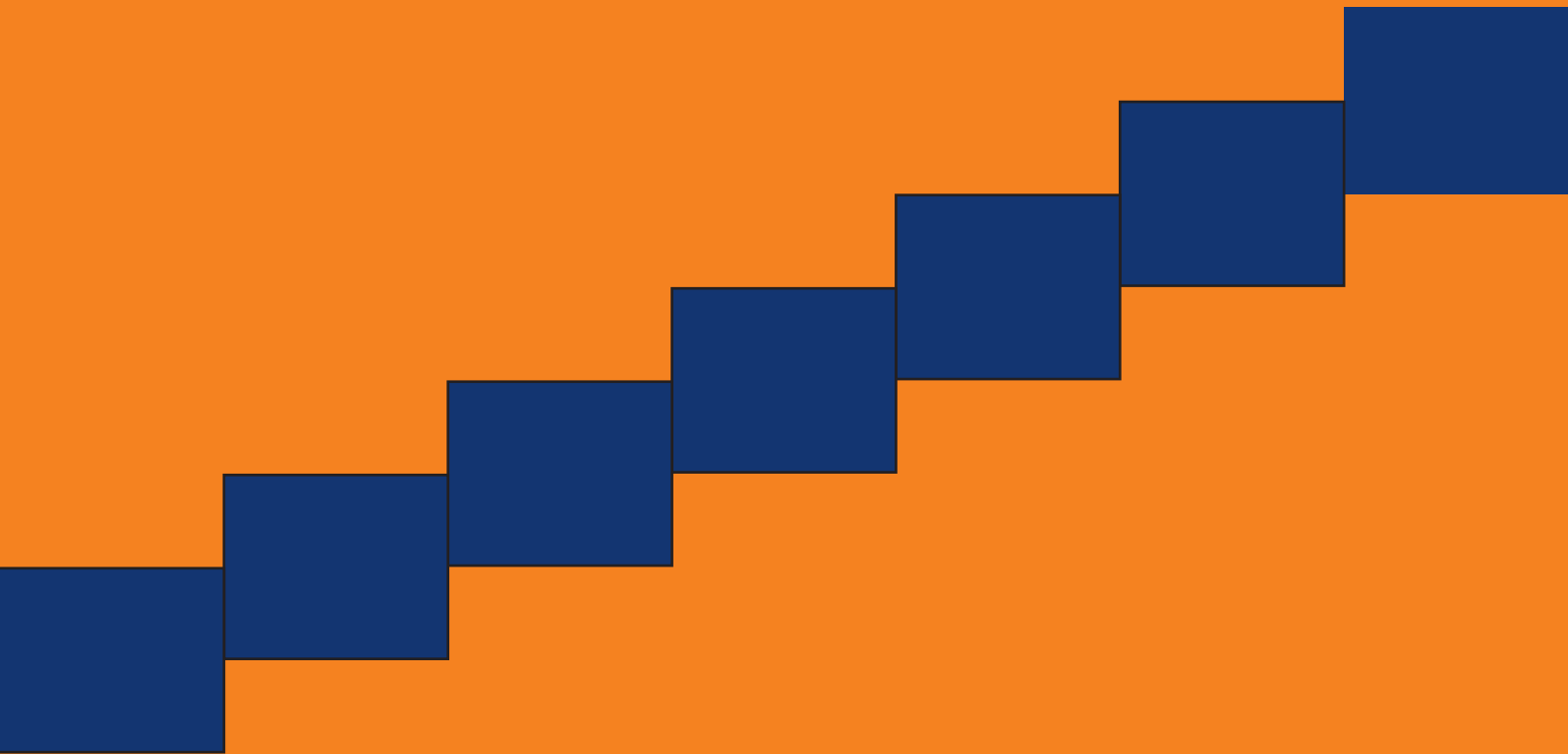
```
# Statistical test Tulp, total numbers
dfT <- df[df$Gewas == "Tulp", ]
View(dfT)
model <- lm(log10(Totaal + 1) ~ Inoculatie, data = dfT)
model
summary(model)
Aov <- Anova(model)
Aov

# check for normality of residuals
residuals_T <- residuals(model)
hist(residuals_T)
shapiro.test(residuals_T) # p > 0.05 means normal distribution
leveneTest(model) # check for homogeneity of variances

#Pairwise differences between treatments
diff_T <- emmeans(model, "Inoculatie", type = "response")
summ_T <- summary(diff_T)
Let_T <- multcomp::cld(diff_T, alpha=0.05, Letters=letters, reverse =
FALSE, sort=FALSE)
cld_T <- Let_T$.group
stat_T <- cbind(summ_T, cld_T)
stat_T
#Change heading cld_T1 to cld to be able to merge all results
colnames(stat_T)[7] <- "cld"
#write.csv(stat_T, "Bloembollen-Dd-Tulp-total-summary.csv")
```

Script Kruskal-Wallis test:

```
#Non-parametrische toets Tulp Wortel
kruskal.test(Wortel.tot ~ Inoculatie, data = dfT) # Comparison of
all inoculations
```



Dit is een uitgave van Ulreka, een initiatief van de Holland Onion Association.

Holland Onion Association
Louis Pasteurlaan 6
2719 EE Zoetermeer
Tel. + 31 79 368 11 00



is part of



www.uireka.nl

Ulreka 2.0 wordt mede mogelijk gemaakt door:



+ meer dan 70 ketenpartners!