



---

# Valse meeldauw-vrij plantgoed van ui door warme luchtbehandeling

Teeltvoorschriften valse meeldauw-vrij verklaring; een alternatieve methode

A. Evenhuis, C.G. Topper, M.C. Krijger



**WAGENINGEN**  
UNIVERSITY & RESEARCH

---

---

# Valse meeldauw-vrij plantgoed van ui door warme luchtbehandeling

Teeltvoorschriften valse meeldauw-vrij verklaring; een alternatieve methode

A. Evenhuis, C.G. Topper, M.C. Krijger

Wageningen Plant Research

Dit onderzoek is in opdracht van ministerie van landbouw, natuur en voedselkwaliteit uitgevoerd door de Stichting Wageningen Research (WR), business unit Open teelten en business unit BioInteractions & Plant health, in het kader van beleidsondersteunend onderzoeksthema teeltvoorschriften [BO-43-011.05-001-WPR]

WR is een onderdeel van Wageningen University & Research, samenwerkingsverband tussen Wageningen University en de Stichting Wageningen Research.

Wageningen, Maart 2019

---

Rapport WPR-7340087100

---

A. Evenhuis, C.G. Topper & M. Krijger, 2018. *Valse meeldauw-vrij plantgoed van ui door warme luchtbehandeling; Teeltvoorschriften valse meeldauw-vrij verklaring; een alternatieve methode.* Wageningen Research, Rapport WPR-7340087100. 26 blz, 16 fig. , 2 tab. , 1 bijlage.

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/472259>

Trefwoorden: *Peronospora destructor*, *Allium spp*, *biotoets*, *SYBR-Green PCR*, *plantuien*

© 2019 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Open teelten, Postbus 16, 6700 AA Wageningen; T 0317 48 07 00; [www.wur.nl/plant-research](http://www.wur.nl/plant-research)

KvK: 09098104 te Arnhem  
VAT NL no. 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. 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 Stichting Wageningen Research.

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

Rapport WPR-7340087100

Foto omslag: Biotoets – PCR plantuien

---

# Inhoud

	<b>Samenvatting</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>7</b>
	1.1 Klankbordgroep	7
<b>2</b>	<b>Materiaal en methoden</b>	<b>8</b>
	2.1 Plantmateriaal	8
	2.2 Biotoets	8
	2.3 Biotoets-PCR	8
	2.4 Validatie Biotoets-PCR	10
	2.5 Warme luchtbehandeling WUR Open Teelten	11
	2.6 Warme luchtbehandeling praktijk	12
<b>3</b>	<b>Resultaten</b>	<b>13</b>
	3.1 Validatie Biotoets-PCR	13
	3.2 Warme luchtbehandeling cel-proef	14
	3.3 Warme luchtbehandeling praktijk	16
	3.3.1 Temperatuur	16
	3.3.2 Uitgroei	19
	3.3.3 Effect WLB op expressie valse meeldauw	20
	3.3.4 Effect WLB op valse meeldauw in plant opkweek	21
<b>4</b>	<b>Discussie en conclusies</b>	<b>22</b>
	4.1 Biotoets-PCR	22
	4.2 Warme luchtbehandeling cel-proef	22
	4.3 Warme luchtbehandeling praktijk	23
	4.4 Conclusies	24
	4.4.1 Validatie Biotoets-PCR	24
	4.4.2 Warme lucht behandeling cel-proef	24
	4.4.3 Warme lucht behandeling praktijkproef	24
	4.5 Aanbevelingen	24
	<b>Bijlage 1 Valse meeldauw-vrij verklaring plantgoed ui</b>	<b>26</b>

---



---

# Samenvatting

Het plantgoed van uien moet conform art 14d van de Regeling bestrijding schadelijke organismen vrij zijn van valse meeldauw. Deze teeltmaatregel kan als volgt omschreven worden: Om tweedejaars plantuien te mogen telen is een valse meeldauw-vrij verklaring nodig. Deze wordt afgegeven als bij de veldkeuring van eerstejaars plantuien of bij nacontrole (biotoets of warmtebehandeling) geen valse meeldauw wordt waargenomen. In de praktijk betekent dit dat als er bij de veldkeuring wel valse meeldauw wordt waargenomen maar er wordt na het uitvoeren van een biotoets geen aantasting geconstateerd, de verklaring alsnog wordt afgegeven. Wordt na uitvoering van de biotoets wel een besmetting gevonden dan kan door middel van een warmtebehandeling (dat is op dit moment een warm water behandeling uitgevoerd volgens het protocol van NAK tuinbouw) de valse meeldauw afdoende bestreden worden, waarna ook een valse meeldauw-vrij verklaring wordt afgegeven. Nadelen van een warm water behandeling zijn het moeten terugdrogen van de plantuien, verkleuring van de plantuien en mogelijke kruisbesmetting met ziekteverwekkers.

Uit eerder onderzoek door Wageningen University & Research, op verzoek van Productschap Akkerbouw, is gebleken dat warme luchtbehandeling valse meeldauw in plantuien ook kan bestrijden. Deze methode is echter nog niet gevalideerd en kan daarom nog niet als alternatief voor de warm waterbehandeling als teeltmaatregel worden geaccepteerd. Een van de uitdagingen is de zeer beperkte mate van natuurlijke besmetting. Zelfs plantuien afkomstig uit een valse meeldauw haard zijn meestal maar in beperkte mate (<1%) besmet. Dit geeft al aan dat alleen een betrouwbare uitspraak over het al of niet valse meeldauw-vrij zijn van een partij plantuien gedaan kan worden als met een voldoende groot monster wordt getoetst.

Op verzoek van het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit is in 2017 een onderzoek gestart naar de effectiviteit van warme luchtbehandeling ter bestrijding van valse meeldauw in plantuien in het kader van het project teeltmaatregelen. De te beantwoorden vragen:

a) welke temperatuur en behandelduur zijn noodzakelijk, b) validatie tot maatregel, c) combineren met PCR-methode.

Uit het onderzoek komt naar voren dat er een goede link is tussen de Biotoets-PCR en de traditionele biotoets. Komt in de biotoets valse meeldauw tot expressie dan wordt dat ook gevonden in de Biotoets-PCR. Het lijkt er zelfs op dat de Biotoets-PCR iets gevoeliger is dan de traditionele biotoets. De warme luchtbehandeling is op een praktijkbedrijf uitgevoerd van de heer Twisk i.s.m. DLV Advies. Het voordeel daarvan is dat de omstandigheden gelijkwaardig zijn aan de uiteindelijke manier waarop de behandeling wordt uitgevoerd. Het onderzoek werd uitgevoerd met 3 verschillende partijen die op 3 verschillende momenten werden behandeld. De partijen waren van nature besmet met valse meeldauw. De mate van valse meeldauw besmetting was 4.2%, 3.7% en 3.7% voor de 3 partijen, gebaseerd op het tot expressie komen in de biotoets. Gesteld kan worden dat dit een vrij hoog percentage is in vergelijking met waarnemingen in andere jaren.

Warme luchtbehandeling (41.5°C) gaf in alle gevallen een flinke reductie van het tot expressie komen van valse meeldauw. Sterker nog; in 2 van de 3 partijen werd geen valse meeldauw meer aangetoond in een biotoets en dit was ook het geval in de Biotoets-PCR. In de 2<sup>e</sup> praktijkpartij werd bij 1 plant (0.06%) na warme luchtbehandeling nog valse meeldauw waargenomen. Dit werd bevestigd door de Biotoets-PCR methode.

Werd de warme luchtbehandeling gestopt bij temperaturen onder de 41.5°C dan kon toch een enorme afname van valse meeldauw besmetting gevonden worden. Stoppen bij 38.5 °C gaf nog 0.2% expressie van valse meeldauw. Bij zowel 40°C als bij 41.5°C werd geen expressie van valse meeldauw meer waargenomen. Wel was er bij 40°C nog een signaal in de Biotoets-PCR. Mogelijk was de valse meeldauw als gevolg van de behandeling niet meer in staat om tot expressie te komen.

Al met al kan gesteld worden dat met de Biotoets-PCR valse meeldauw in plantuien goed kan worden aangetoond. Verder blijkt dat warme luchtbehandeling de mate van besmetting reduceert tot niet aantoonbaar of bijna 0. Bij een goed uitgevoerde warm water behandeling kan ook geen valse meeldauw meer aangetoond worden. Het zou nuttig zijn te formuleren in hoeverre de resultaten voldoende zijn opdat de methode hiermee gevalideerd is en daarmee de methode geaccepteerd kan worden voor het ziekte vrij maken van plantuien ten behoeve van een valse meeldauw-vrij verklaring.



---

# 1 Inleiding

Het plantgoed van uien moet conform art 14d van de Regeling bestrijding schadelijke organismen vrij zijn van valse meeldauw.

Deze zogenoemde teeltmaatregel heeft een verplichtend karakter en kan als volgt omschreven worden: Om tweedejaars plantuien te mogen telen is een valse meeldauw-vrij verklaring nodig. Deze verklaring wordt afgegeven door NAK tuinbouw als bij de veldkeuring van eerstejaars plantuien vlak voor de oogst of bij nacontrole (biotoets of warmtebehandeling) geen valse meeldauw wordt waargenomen. In de praktijk betekent dit dat als er bij de veldkeuring wel valse meeldauw wordt waargenomen maar er wordt na het uitvoeren van een biotoets geen aantasting geconstateerd, de verklaring alsnog wordt afgegeven. Wordt na uitvoering van de biotoets wel een besmetting gevonden dan kan door middel van een warmte behandeling (dat is op dit moment een warm water behandeling uitgevoerd volgens het protocol van NAK tuinbouw) de valse meeldauw afdoende bestreden worden, waarna ook een valse meeldauw-vrij verklaring wordt afgegeven. Nadelen van een warm water behandeling zijn het moeten terugdrogen van de plantuien, verkleuring van de plantuien en mogelijke kruisbesmetting met ziekteverwekkers. Uit eerder onderzoek door Wageningen University & Research, op verzoek van Productschap Akkerbouw, is gebleken dat warme luchtbehandeling valse meeldauw in plantuien ook kan bestrijden. Deze methode is echter nog niet gevalideerd. Een van de uitdagingen is de zeer beperkte mate van natuurlijke besmetting. Zelfs plantuien afkomstig uit een valse meeldauw haard zijn meestal maar in beperkte mate (<1%) besmet. Dit geeft al aan dat alleen een betrouwbare uitspraak over het al of niet valse meeldauw-vrij zijn van een partij plantuien gedaan kan worden als met een voldoende groot monster wordt getoetst

Op verzoek van het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit is in 2017 een onderzoek gestart naar de effectiviteit van warme luchtbehandeling ter bestrijding van valse meeldauw in plantuien in het kader van het project teeltmaatregelen. De te beantwoorden vragen:

a) welke temperatuur en behandelduur zijn noodzakelijk, b) validatie tot maatregel, c) combineren met PCR-methode.

## 1.1 Klankbordgroep

Het onderzoek is uitgevoerd in samenspraak en met medewerking van met de klankbordgroep:

- Carel Bouma, akkerbouwer
- Frans Claassen, NAK Tuinbouw
- Ben Kimmann, Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit
- Sjaak Twisk, akkerbouwer
- Harmen Ooijevaar, keurmeester, NAK Tuinbouw
- Harrie Versluis DLV Advies

De klankbordgroep heeft in 2017 twee keer vergaderd: 23 mei en 22 juni. In 2018 zijn de resultaten op 25 juni met de klankbordgroep besproken. Bij de vergadering op 23 mei 2017 is de biotoets bekeken. De andere vergaderingen vonden plaats op het bedrijf van de heer Twisk.



---

## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Plantmateriaal

Wageningen University and Research Open Teelten heeft in 2016 eerstejaars plantuien geteeld die besmet waren met valse meeldauw, veroorzaakt door *Peronospora destructor*.

### 2.2 Biotoets

De plantuien werden opgekweekt in bakken in de kas. Indien nodig werd er assimilatie belichting boven gehangen. Per bak werden 200 plantuitjes gepoot. Over het algemeen werden er 8 bakken met elk 200 plantuitjes ingezet. Het grootte aantal was nodig omdat de mate van besmetting van plantuien laag over het algemeen laag is, eerder in de buurt van 0,1% dan 1%.

Zodra de uien voldoende groot waren werden de omstandigheden zo ingericht dat de valse meeldauw tot sporulatie kon komen door een voldoende hoge RV aan te houden in de nacht. De volgende ochtend werden de planten bekeken op sporulatie. Sporulerende planten werden verwijderd. Deze procedure werd een aantal dagen achter elkaar herhaald. Hiermee werd gestopt op het moment dat secundaire infectie tot expressie kon komen. Het aantal gekiemde bollen en het aantal sporulerende planten werd geteld en het percentage infectie kan dan berekend worden.

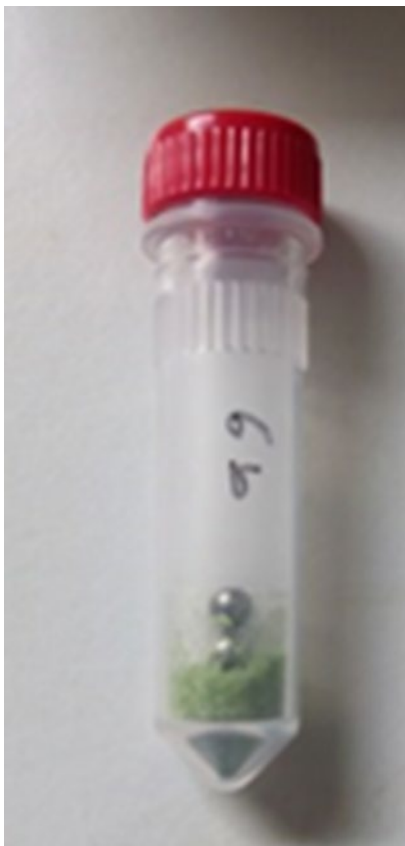
### 2.3 Biotoets-PCR

Bij een gecombineerde Biotoets-PCR werden net als in de biotoets de planten opgekweekt. Als valse meeldauw nog **levend** in de bol aanwezig is, zal het pathogeen meegroeien in het loof. In plaats van een visuele beoordeling van de opgeplante uitjes, worden halve pijpjes geknipt en met de PCR methode beoordeeld. Als de valse meeldauw dood is kan deze niet van de bol in het loof groeien dus alleen levende valse meeldauw groeit de pijpjes in. Deze methode combineert de voordelen van beide methoden. Met de biotoets-PCR wordt dus alleen levende aantasting gevonden, ook als die nog geen schimmelpluis heeft gevormd. Zodra de planten voldoende gekiemd zijn werd het loof afgeknipt. Het afgeknipte loof werd verzameld, zodanig dat er geen contaminatie tussen bakken optreedt. Dit materiaal werd vervolgens gevriesdroogd en gemalen (Figuur 1).



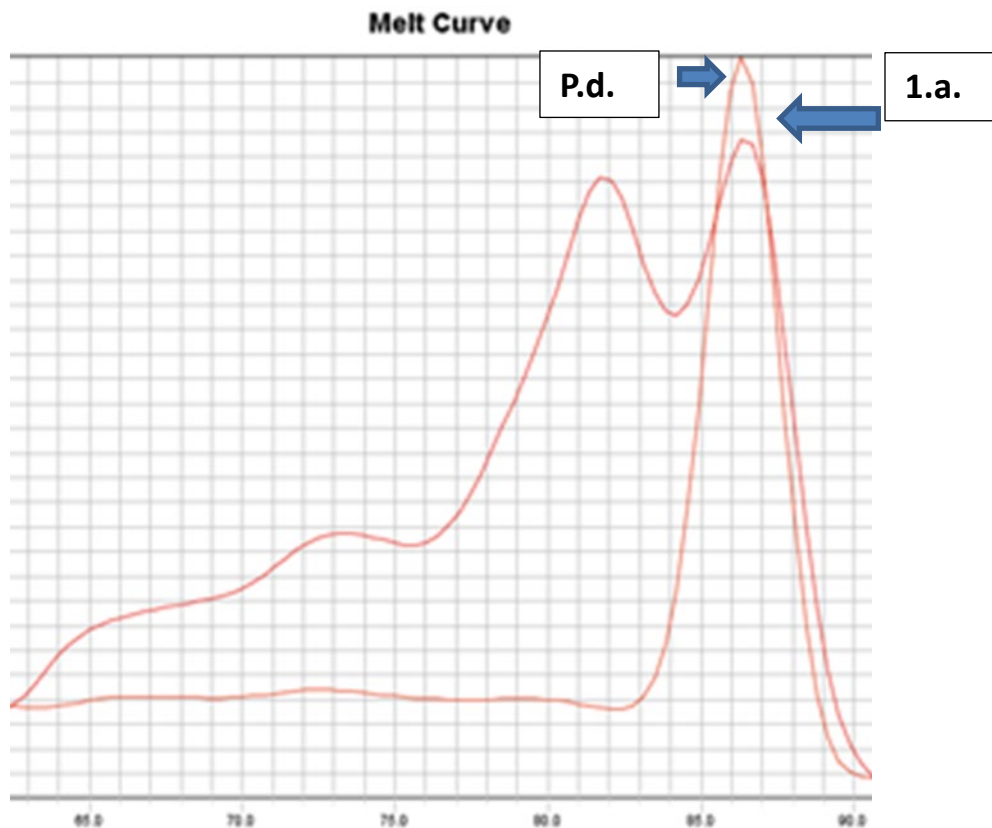
**Figuur 1** Gevriesdroogd en gemalen uien loof.

In opdracht van het Productschap Akkerbouw is een PCR ontwikkeld voor het aantonen van valse meeldauw veroorzaakt door *P. destructor* in de teelt van uien. Deze PCR werd gebruikt om te analyseren of de valse meeldauw in het loof aanwezig is. Het te toetsen materiaal werd goed gehomogeniseerd door te beat-beaten (Figuur 2).



**Figuur 2** Beat beaten van een sub monster van het afgeknipte uien loof.

Hieruit werd een monster van 10 mg genomen. De monsters worden in een SYBR-Green PCR getoetst op de aanwezigheid van DNA van *P. destructor*. Als referentie wordt een sporensuspensie van *P. destructor* getoetst. Figuur 3 laat een smeltcurve zien van de sporensuspensie (P.d.) en monster 1 a.



**Figuur 3** Smeltcurve met de referentie van sporen van *P. destructor* (P.d.) en een van de getoetste monsters.

## 2.4 Validatie Biotoets-PCR

Om de Biotoets-PCR te valideren zijn tweedejaars plantuien opgekweekt. In twee verschillende kasafdelingen werden 8 bakken met elk 200 uien gepoot. Deze uien werden opgekweekt. In een van de afdelingen werd sporulatie en expressie van uien niet gestimuleerd. In de andere afdeling werd expressie middels sporulatie wel gestimuleerd door van 2 mei tot 11 mei 's nachts te zorgen voor een hoge relatieve luchtvochtigheid door het vernevelen van water (misten). Het aantal geïnfecteerde plantuien dat tot expressie kwam via sporulatie werd dagelijks geteld.

Het uienloof van beide afdelingen werd per bak afzonderlijk geoogst op 11 mei. Het loof is op 12 mei ingezet om te vriesdrogen. Op 23 mei zijn de gevriesdroogde monsters gemalen. Van elke bak zijn er twee submonsters genomen. Op 13 juni is er een SYBR-Green PCR uitgevoerd op de verschillende monsters, zie boven.

De bakken met plantuien die niet blootgesteld werden aan verneveling (niet gemist), werden verder opgekweekt in de kas zodat hergroei ontstond. Na voldoende hergroei werden de bakken alsnog gemist en de mate van valse meeldauw aantasting bepaald.

## 2.5 Warme luchtbehandeling WUR Open Teelten

Vanwege de beperkte beschikbaarheid van plantuien werden 4 keer 200 plantuien in een testopstelling behandeld met warme lucht. De uien werden in een netzakje gedaan en vervolgens in een emmer in de stoof gelegd. Om de relatieve luchtvochtigheid op peil te houden werden de emmers in een bak met water gezet (Figuur 4). Vervolgens werden de plantuien blootgesteld aan een combinatie van temperaturen en behandelduur (Tabel 1).



**Figuur 4 Testopstelling voor warme luchtbehandeling.**

**Tabel 1 Partij plantuien blootgesteld aan warme luchtbehandeling bij verschillende temperatuur en behandelduur**

Object	temperatuur	behandelduur
A	Onbehandeld	-
B	38.5°C	18 uur
C	40°C	6 uur
D	40°C	48 uur
E	41.5°C	48 uur

---

## 2.6 Warme luchtbehandeling praktijk

De NAK-Tuinbouw heeft eerstejaars plantuien verzameld in de praktijk. Bij twee telers is materiaal verzameld in haarden van valse meeldauw. Partij 1 betref gele uien. Partij 2 rode uien. Het plantmateriaal is afgeleverd bij de teler die de warme luchtbehandeling heeft uitgevoerd. Daarnaast is plantmateriaal met een bekende valse meeldauw besmetting genomen afkomstig van eerstejaars plantuien geteeld door WUR Openteelten (P-AGV) in Lelystad. In totaal zijn er 9 partijen gemaakt (Tabel 2) van elk 1600 uien.

**Tabel 2 Partijen plantuien blootgesteld aan warme luchtbehandeling in de praktijk.**

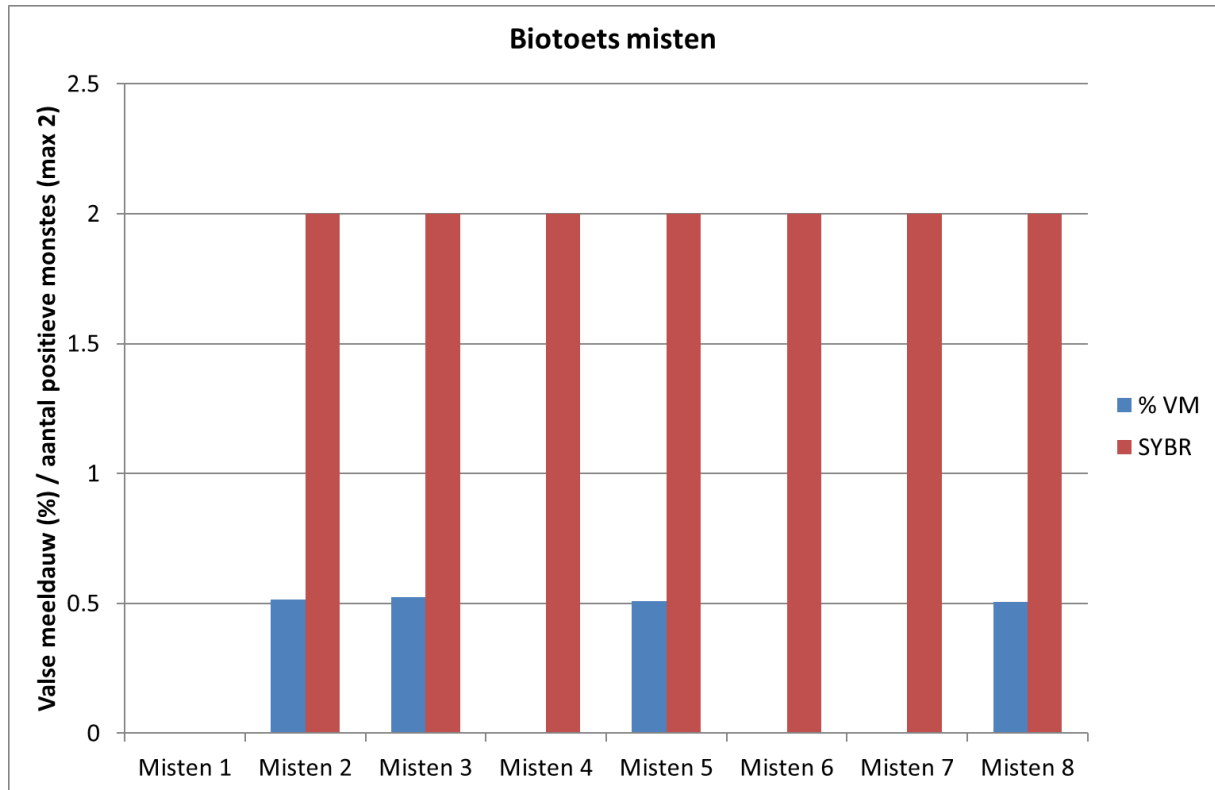
<b>Code</b>	<b>Objecten</b>	<b>behandeling</b>	<b>herkomst</b>	<b>uithalen</b>
<b>A</b>	Partij 1	onbehandeld	Praktijk	bij start
<b>B</b>	Partij 1	WLB	Praktijk	hele traject
<b>C</b>	Partij 2	onbehandeld	Praktijk	bij start
<b>D</b>	Partij 2	WLB	Praktijk	hele traject
<b>E</b>	Partij 7380 1	onbehandeld	AGV7380 1e teelt	bij start
<b>F</b>	Partij 7380 1	WLB	AGV7380 1e teelt	hele traject
<b>G</b>	Partij 7380 1	WLB	AGV7380 1e teelt	bij bereiken 38.5°C product
<b>H</b>	Partij 7380 1	WLB	AGV7380 1e teelt	bij bereiken 40°C product
<b>J</b>	Partij 7380 1	WLB	AGV7380 1e teelt	bij bereiken 41.5°C product

De partijen zijn op verschillende tijdstippen behandeld bij de heer Twisk. Partij 1 in augustus en begin september. Partij 2 in september. Partij 7380 (P-AGV) in oktober 2017. Voor objecten G, H en J zijn de monsters met plantuien tussentijds uitgehaald. Na afloop van de behandeling zijn de uien naar WUR Open teelten gebracht en daar in de bewaring gelegd tot het uitvoeren van de biotoetsen in januari 2018.

# 3 Resultaten

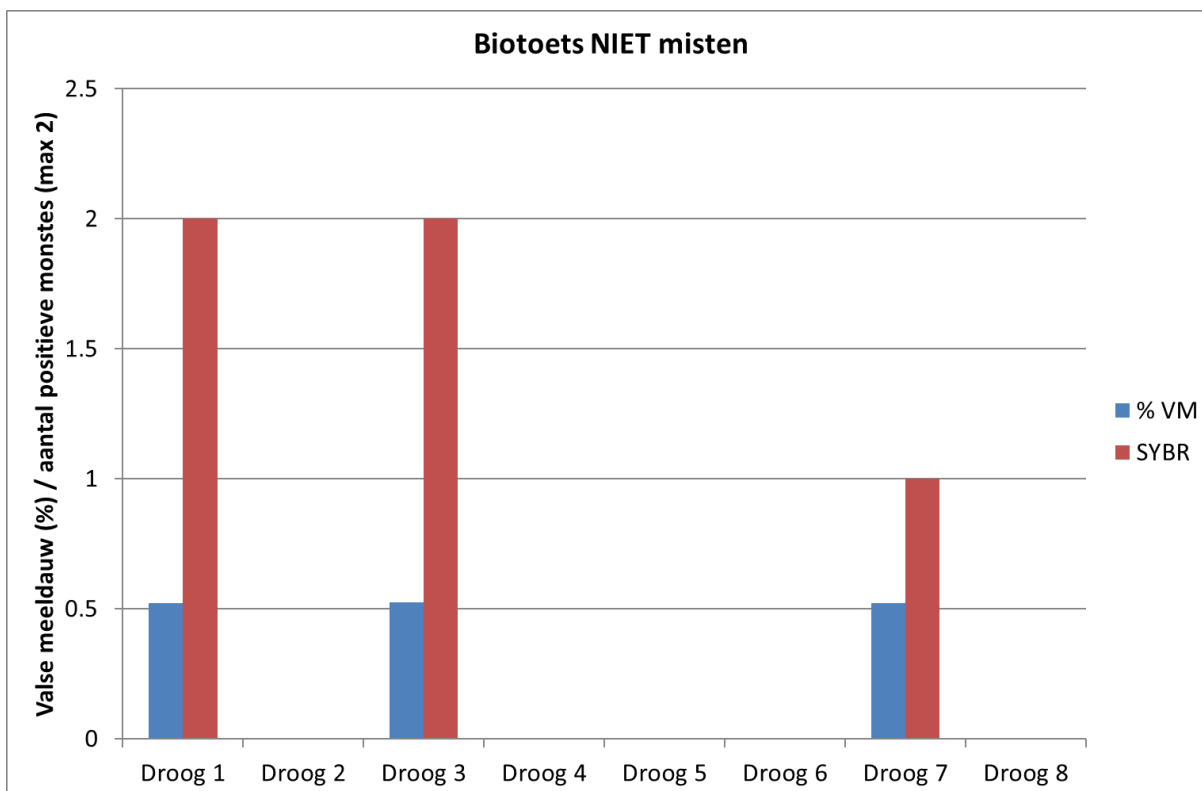
## 3.1 Validatie Biotoets-PCR

In de bakken die gemist werden kon 4 keer een met valse meeldauw aangetaste plantui worden aangetroffen op een totaal van 1600 uitgeplante plantuien. Werd vervolgens het loof bemonsterd en met de SYBR-Green PCR gecheckt of DNA van valse meeldauw aanwezig was dan kon dat in 14 van de 16 monsters, of wel in 7 van de 8 bakken, worden bevestigd (Figuur 5).



**Figuur 5 Het percentage met valse meeldauw aangetaste plantuien na misten (blauw) en het aantal monster waar valse meeldauw in is aangetoond met SYBR-Green PCR (rood). De loof monsters werden na het misten genomen.**

In de bakken die niet gemist werden voorafgaand aan bemonstering kon na achteraf misten 3 keer een met valse meeldauw aangetaste plantui worden aangetroffen op een totaal van 1600 uitgeplante plantuien. Werd voorafgaand met de SYBR-Green PCR gecheckt of DNA van valse meeldauw aanwezig was, dan was dat in 5 van de 16 monsters het geval. Dit kwam overeen met 3 van de 8 bakken. Dit waren ook de bakken waarin bij natoetsen valse meeldauw kon worden bevestigd via het tot expressie komen van de zieke plantuien door sporulatie (Figuur 6).



**Figuur 6** Het percentage met valse meeldauw aangetaste plantuïen droog opkweekt en achteraf gemist (blauw) en het aantal monster waar valse meeldauw in is aangetoond met SYBR-Green PCR (rood) voorafgaand aan het misten.

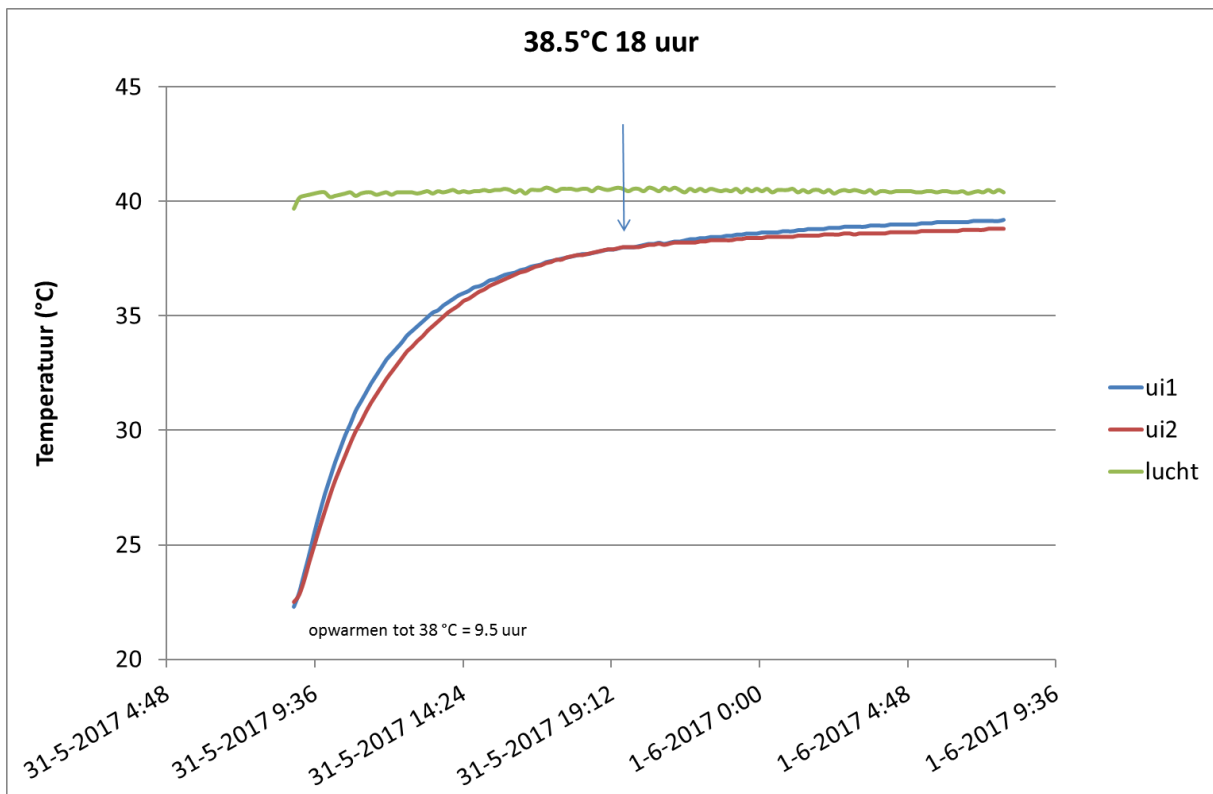
## 3.2 Warme luchtbehandeling cel-proef

De temperatuur tussen de plantuïen neemt zeer geleidelijk toe (Figuur 7). Als starttijd voor de behandelduur werd 0.5°C genomen beneden de streefwaarde. In dit geval was de partij plantuïen opgewarmd tot 38°C, 9,5 uur na inzetten. Het duurde nog 3,5 uur langer voordat de 38,5°C werd bereikt. Bij de behandelingen bleek dat de tijd tot het bereiken van de temperatuur van de starttijd en de streef temperatuur nogal verschillend kon zijn.

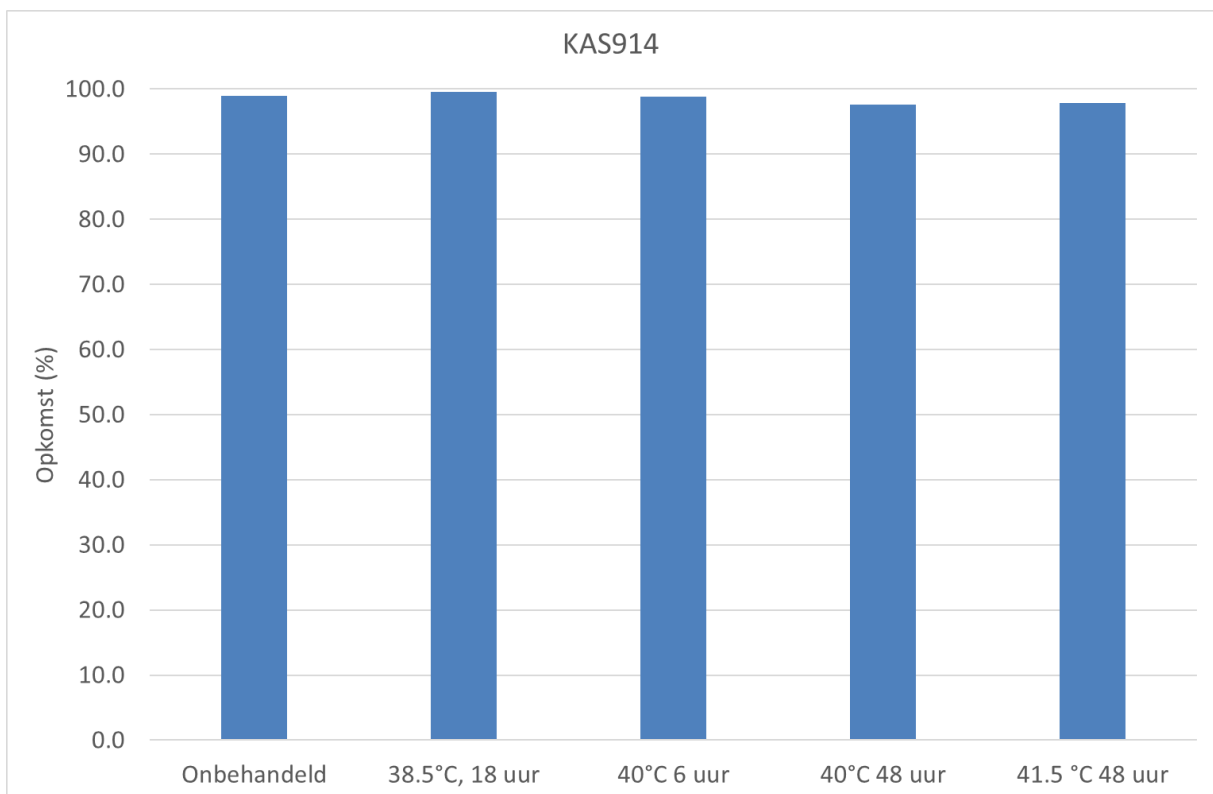
Bij plantuïen die met warme lucht behandeld waren en ook bij de onbehandelde controle werd geen valse meeldauw waargenomen. Met dit experiment kon geen uitspraak gedaan worden over de effectiviteit van de methode. Zowel met de Biotoets-PCR via het afknippen van het loof en vervolgens een SYBR-Green PCR als met de biotoets kon geen valse meeldauw worden aangetoond.

De hergroei werd niet of nauwelijks beïnvloed door de warme luchtbehandelingen. Er was een lichte trend waarneembaar dat het percentage hergroei achter bleef bij lange behandelduur (48 uur) en hogere temperaturen (Figuur 8).





**Figuur 7** Temperatuurverloop tussen de plantuien en de luchttemperatuur.



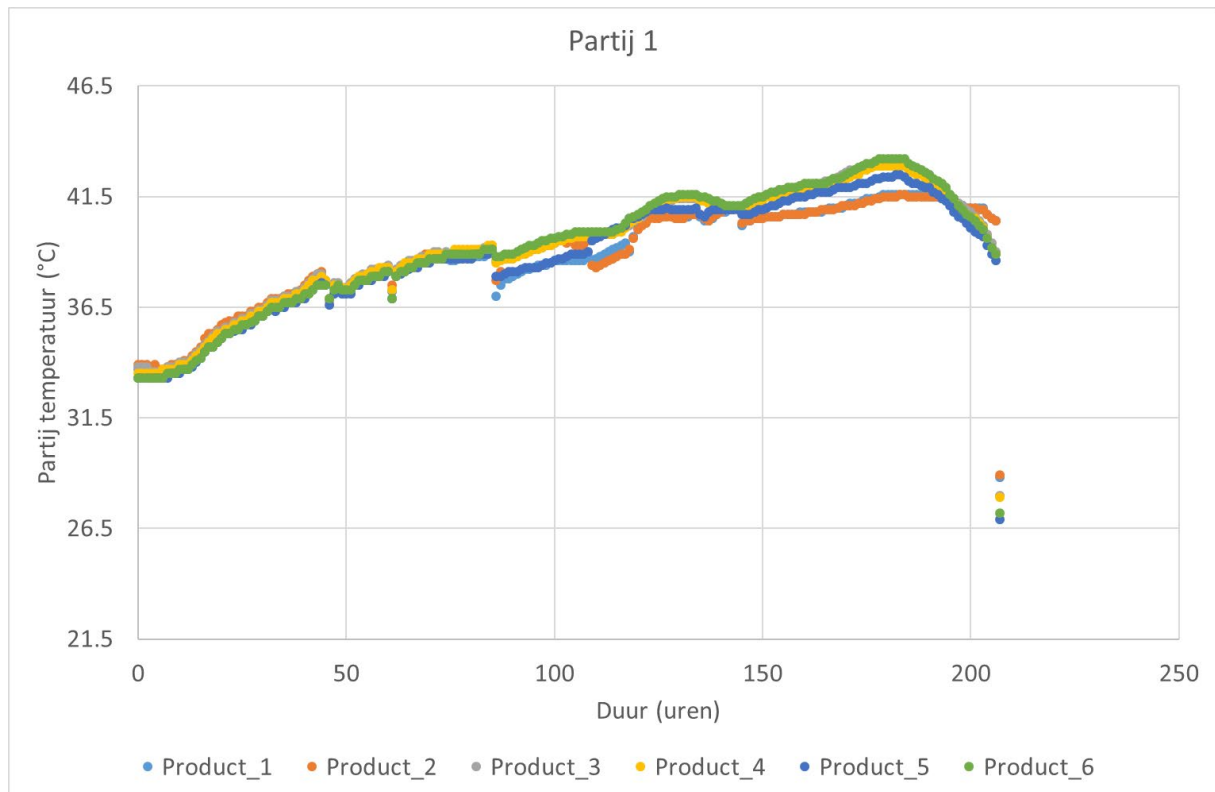
**Figuur 8** Hergroei uitgedrukt als opkomst percentage na warme luchtbehandeling van eerste jaarsplantuien.

### 3.3 Warme luchtbehandeling praktijk

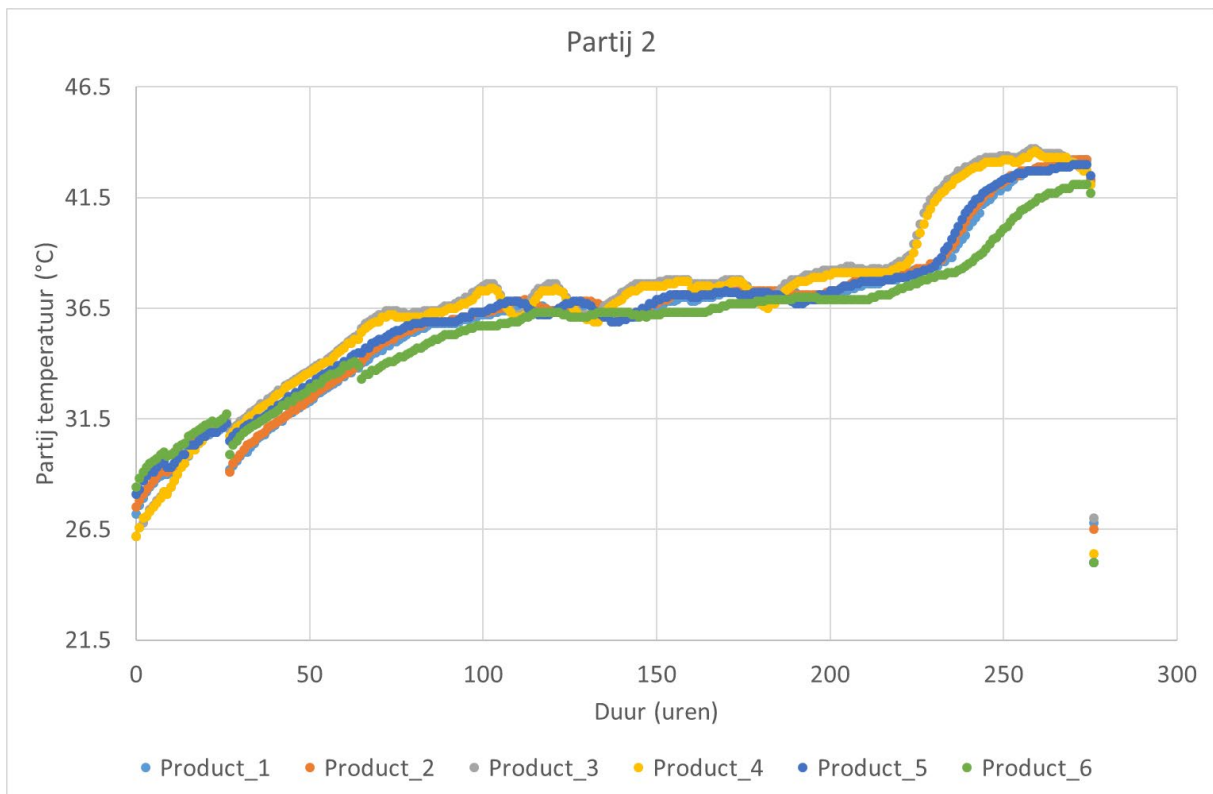
In de praktijk is 3 keer een warme luchtbehandeling uitgevoerd in 2017, met valse meeldauw besmette eerstejaars plantuien. De behandelingen zijn uitgevoerd bij het bedrijf van de heer Twisk in samenwerking met DLV Advies.

#### 3.3.1 Temperatuur

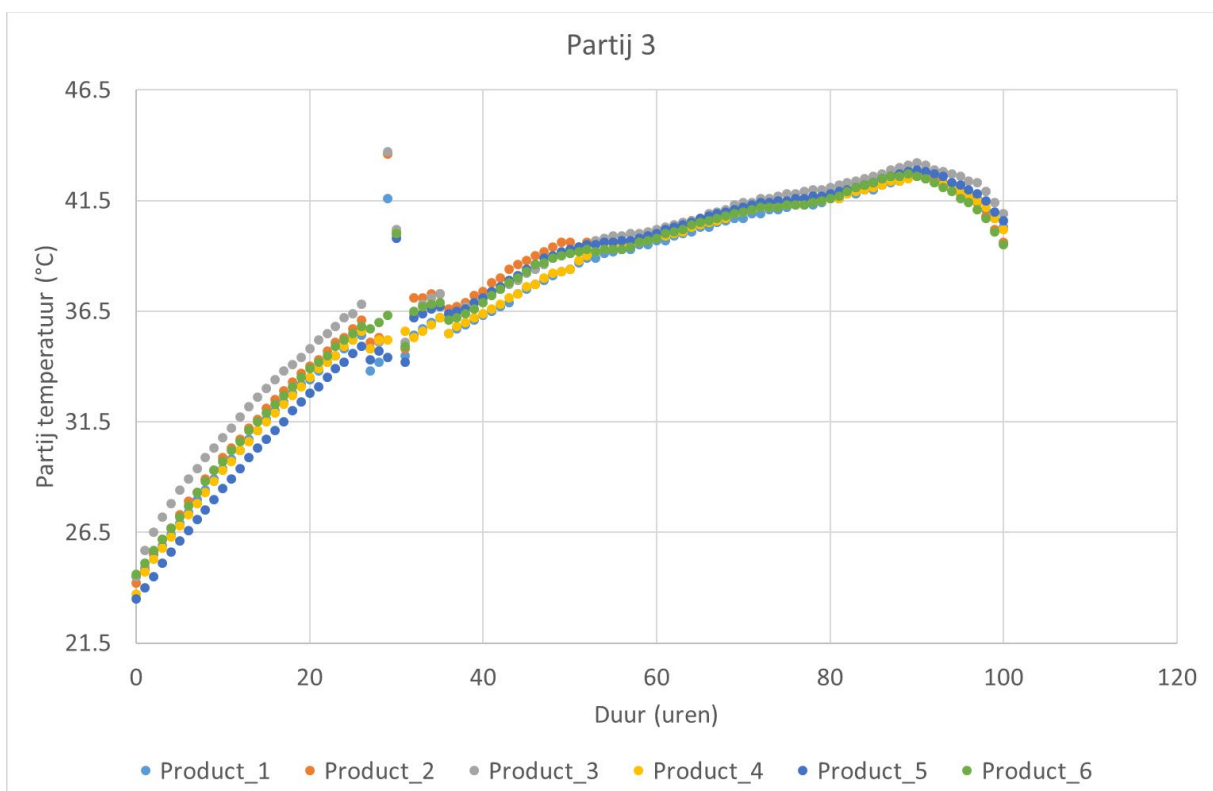
De plantuien zijn op 3 verschillende tijdstippen behandeld. De behandelduur varieerde per partij. Figuur 9, Figuur 10 en Figuur 11 geven het verloop van de producttemperatuur tijdens het opwarm proces van de 3 partijen. Figuur 12 en Figuur 13 geven een beeld van de uien van partij 1 en partij 2.



**Figuur 9 Verloop van de producttemperatuur, gemeten met 6 voelers verdeeld over de partij 1. Behandeling uitgevoerd tussen 28 augustus en 6 september.**



**Figuur 10** Verloop van de producttemperatuur, gemeten met 6 voelers verdeeld over de partij 2. Behandeling uitgevoerd tussen 6 en 18 september.



**Figuur 11** Verloop van de producttemperatuur, gemeten met 6 voelers verdeeld over de partij 3. Behandeling uitgevoerd tussen 9 en 13 oktober.



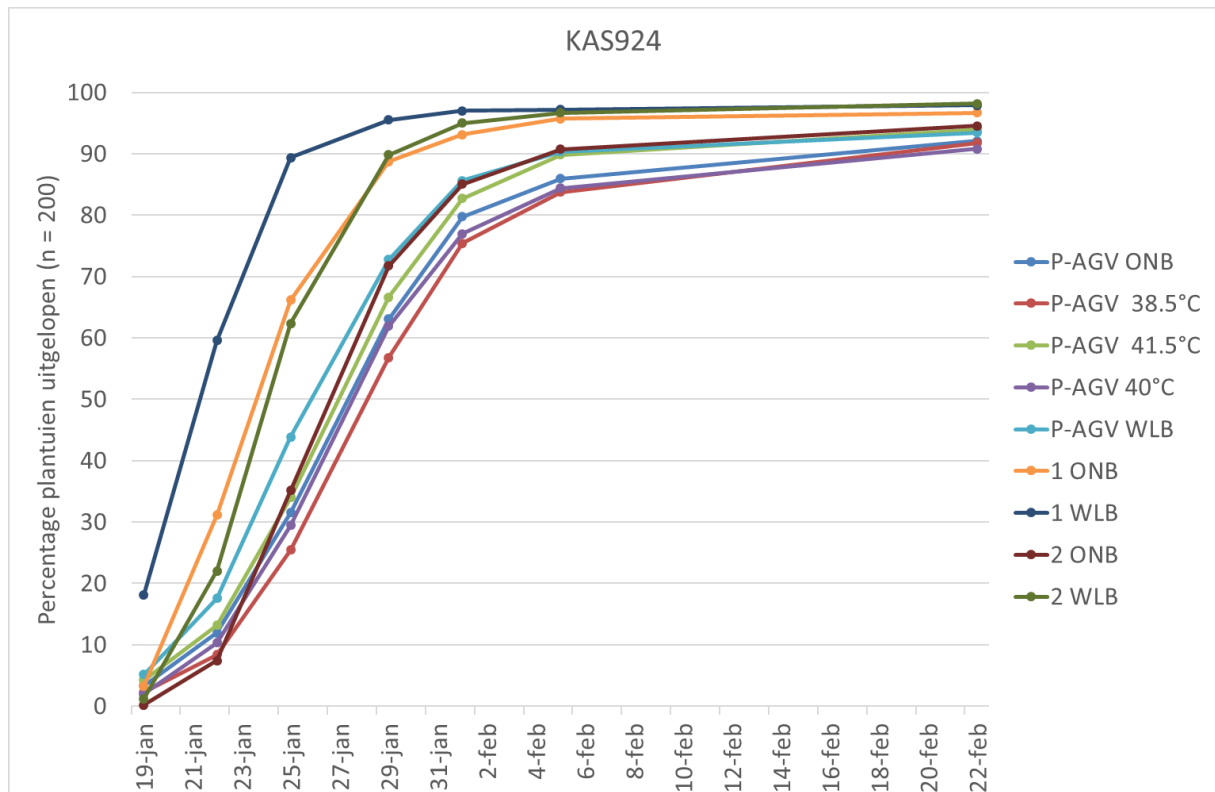
**Figuur 12 Partij 1 tijdens de behandeling**



**Figuur 13 Partij 2 tijdens de behandeling**

### 3.3.2 Uitgroei

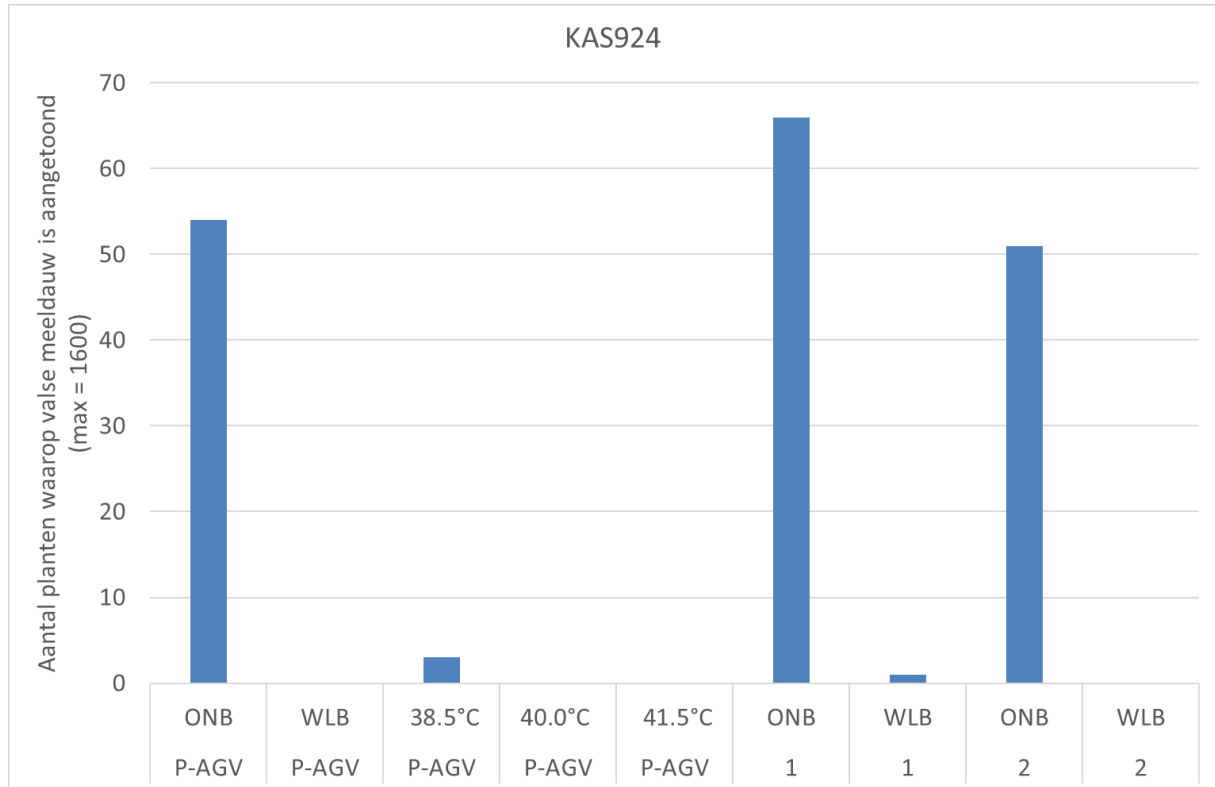
De uitgroei van de met warme lucht behandelde plantuien was sneller dan de niet behandelde uien (Figuur 14) bij praktijkpartij 1 en praktijkpartij 2. Bij de plantuien afkomstig van WUR Open Teelten was dat verschil niet zo duidelijk. De warme luchtbehandeling leidde niet tot schade in de groei.



**Figuur 14 Hergroei uitgedrukt als opkomst percentage na warme luchtbehandeling (WLB) van eerstejaars plantuien. ONB =onbehandeld. De partij P-AGV werd tussentijds uitgehaald bij het bereiken van verschillende temperaturen tijdens de behandeling.**

### 3.3.3 Effect WLB op expressie valse meeldauw

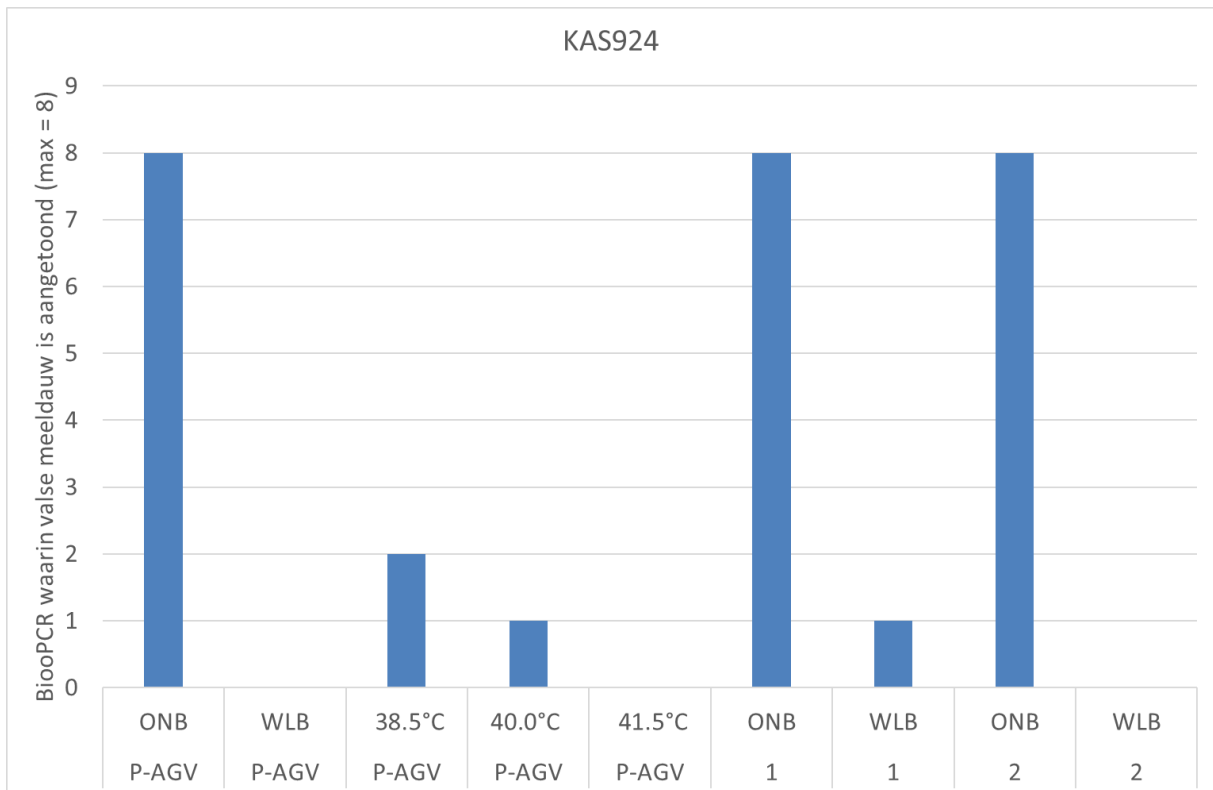
De mate van aantasting was in deze partijen verassend hoog, tot 4% van de planten in de onbehandelde controles (Figuur 15). WLB behandeling van partij 2 en de partij P-AGV gaf een volledige eliminatie van de expressie van valse meeldauw. In partij 1 bleek nog 1 plantui te sporuleren. Werd de partij P-AGV uit de bewaring gehaald zodra een temperatuur van 38,5°C werd bereikt dan bleek dat de vitaliteit van valse meeldauw al sterk afgenomen was. Werd langer gewacht met het uithalen dan kon geen valse meeldauw meer worden aangetoond in de biotoets.



**Figuur 15** Aantal met valse meeldauw besmette planten waargenomen in een biotoets op een totaal van ongeveer 1600 planten. ONB = onbehandeld, WLB = warme lucht behandeling, De partij P-AGV is tussentijds uitgehaald bij verschillende temperaturen.

### 3.3.4 Effect WLB op valse meeldauw in plant opkweek

De Biotoets-PCR bevestigde grotendeels het resultaat van de biotoets (Figuur 16). Echter werd de partij P-AGV uitgehaald op 40°C dan kon geen expressie in de biotoets meer worden gevonden, maar nog wel een signaal in de Biotoets-PCR.



**Figuur 16 Aantal bakken waarin in het bemonsterde loof valse meeldauw is aangetoond; het aantal ingezette bakken was 8.**



---

## 4 Discussie en conclusies

Het al of niet besmet zijn van tweede jaarsplantuien is belangrijk. Een goede toets is nodig om dit aan te kunnen tonen. Door een biotoets uit te voeren kan gecontroleerd worden of een eventuele besmetting vitaal is. De ziekteverwekker moet daarvoor van de bol naar het loof groeien. Onder gunstige omstandigheden kan de ziekte dan tot expressie komen. In het veld betekent dit een inoculum bron die de plantuien in de directe omgeving kan besmetten en mogelijk ook zaaiuien later in het seizoen. In een biotoets betekent het tot expressie komen van valse meeldauw dat het plantmateriaal niet vrij was van valse meeldauw en dat maatregelen moeten worden genomen conform de teeltvoorschriften. Het nadeel van de traditionele biotoets is dat de besmetting tot expressie moet komen en dat er visueel beoordeeld moet worden. Beide aspecten kunnen leiden tot het niet opmerken van een besmetting die er wel is. Een PCR kan latente besmetting goed aantonen. Echter deze methode maakt geen onderscheid tussen levend en dood, terwijl alleen een "levende" besmetting een risico vormt.

### 4.1 Biotoets-PCR

Het aantonen van valse meeldauw door de traditionele biotoets te combineren met een SYBR-Green PCR (biotoets-PCR) is goed mogelijk. De methode combineert de voordelen van de traditionele biotoets en de detectie met een PCR. Na het uitplanten kan alleen levende valse meeldauw uitgroeien naar de pijpjes. Als dus alleen de pijpjes worden bemonsterd en geanalyseerd dan weet je zeker dat je te maken hebt met een vitale besmetting. Door de analyse te doen met een PCR ben je niet meer afhankelijk van de omstandigheden in de biotoets en het tot expressie komen van de aantasting. De PCR toont ook niet zichtbare valse meeldauw aantonen.

De Biotoets-PCR lijkt niet alleen betrouwbaar, maar ook erg gevoelig. Een latent geïnfecteerde plantui in een partij van 200 plantuien kon op deze manier via het toetsen van het loof aangetoond worden. Het bleek al genoeg om de plantuien op te kweken zonder omstandigheden aan te leggen die het tot expressie komen van valse meeldauw kunnen bevorderen. Werd er wel gemist dan was het aantal positieve scores hoger. Dit heeft waarschijnlijk te maken met het feit dat sporulatie is opgetreden en dat als gevolg daarvan de sporen zich door de kasafdeling hebben verspreid. Mogelijk heeft dat geleid tot secundaire infecties. In elk geval zal een deel van de sporen geland zijn op het gewas. Bij het afknippen van het loof zijn ze vervolgens waarschijnlijk meegenomen in het monsters. Een alternatieve verklaring zou kunnen zijn dat door omstandigheden aan te leggen die gunstig zijn voor sporulatie de hoeveelheid mycelium in de uien groter is zonder dat dit tot expressie komt. Dat zou ook het groter aantal positieve monsters kunnen verklaren.

In het verleden is secundaire infectie in een biotoets vaker waargenomen. Secundaire infectie mag je 10 tot 14 dagen na sporulatie verwachten.

Indien een Biotoets-PCR wordt uitgevoerd is het van belang dat er geen kruisbesmetting kan optreden. Het laten uitgroeien van het loof zonder het aanleggen van omstandigheden die kunnen leiden tot symptoomexpressie lijken daarbij de beste methode. Uiteraard moet het gereedschap dat gebruikt wordt grondig schoon gemaakt worden (lees ontdaan van DNA) om te voorkomen dat een "besmetting" over gaat van het ene monster naar het andere monster via vervuild materiaal.

### 4.2 Warme luchtbehandeling cel-proef

De warme luchtbehandeling is relatief laat in het seizoen uitgevoerd, omdat eerst de methode van de Biotoets-PCR moest worden ontwikkeld. Het was de bedoeling om de plantuien gedurende verschillende tijden bloot te stellen aan 38,5°C, 40°C en 41,5°C. De opwarming van de uien verliep echter onregelmatig waardoor het moment dat de gewenste temperatuur werd bereikt niet goed van te voren kon worden vastgesteld. De duur dat de uien blootgesteld werden aan een bepaalde

---

temperatuur is daarom lastig vast te stellen. Wellicht een betere maat is de oppervlakte onder de opwarmingscurve te berekenen. Het effect van een warmtebehandeling hangt namelijk niet alleen af van de bereikte temperatuur, maar ook van de tijdsduur dat deze gehandhaafd wordt. De mate van besmetting van de uien was met 0,25% al laag te noemen (zie paragraaf 4.1). In deze toets kon in de onbehandelde controle geen valse meeldauw meer aangetoond worden. Hoewel in de warme lucht behandelde uien geen besmetting werd aangetoond kan niet worden geconcludeerd dat dit aan de behandeling lag. Het late tijdstip van uitplanten heeft mogelijk invloed gehad op de vitaliteit van valse meeldauw, waar deze niet meer kon groeien van de bol naar het loof. De negatieve effecten van de behandeling op hergroei waren beperkt.

### 4.3 Warme luchtbehandeling praktijk

De warme luchtbehandeling is op een praktijkbedrijf uitgevoerd. Het voordeel daarvan is dat de omstandigheden gelijkwaardig zijn aan de uiteindelijke manier waarop de behandeling wordt uitgevoerd. Het onderzoek werd uitgevoerd met 3 verschillende partijen die op 3 verschillende momenten werden behandeld. De partijen waren van nature besmet met valse meeldauw. De mate van valse meeldauw besmetting was 4,2%, 3,7% en 3,7% voor de 3 partijen, gebaseerd op het tot expressie komen in de biotoets. Gesteld kan worden dat dit een vrij hoog percentage is in vergelijking met waarnemingen in andere jaren.

Warme luchtbehandeling (41,5°C) gaf in alle gevallen een flinke reductie van het tot expressie komen van valse meeldauw. Sterker nog in 2 van de 3 partijen werd geen valse meeldauw meer aangetoond in een biotoets en dit was ook het geval in de Biotoets-PCR. In de 2<sup>e</sup> praktijkpartij werd bij 1 plant (0,06%) na warme luchtbehandeling nog valse meeldauw waargenomen. Dit werd bevestigd met de Biotoets-PCR.

Werd de warme luchtbehandeling afgebroken voordat de temperatuur van 41,5°C was bereikt dan kon toch een enorme afname van valse meeldauw besmetting gevonden worden. Stoppen bij 38,5 °C gaf nog 0,2% expressie van valse meeldauw. Bij zowel 40°C als bij 41,5°C werd geen expressie van valse meeldauw meer waargenomen in de biotoets. Wel was er bij 40°C nog een signaal in de Biotoets-PCR. Mogelijk was de valse meeldauw als gevolg van de behandeling niet meer in staat om tot expressie te komen, ondanks dat de omstandigheden gunstig waren. In dit geval is er wel mycelium vanuit de besmette bol het loof ingegroeid. Gesteld kan worden dat naarmate de behandelduur langer en de temperatuur hoger wordt, de mate van besmetting afneemt. In dit praktijkonderzoek werd gestreefd naar 41,5°C gedurende 6 uur. In de meeste monsters (23 van de 24) bleek dat afdoende te zijn. In 1 monster werd nog 1 plant met symptomen van valse meeldauw gevonden. Het is niet duidelijk of in dit geval de streef temperatuur bij dit monster niet helemaal, of niet lang genoeg, gehaald is. Gesteld kan worden dat warme luchtbehandeling de mate van besmetting reduceert tot niet aantoonbaar of bijna 0. Bij een goed uitgevoerde warm water behandeling kan ook geen valse meeldauw meer aangetoond worden.

---

## 4.4 Conclusies

### 4.4.1 Validatie Biotoets-PCR

- De mate van infectie van tweedejaars plantuinen (oogst 2016) die werd bepaald met de biotoets was met 0,25% laag (4 op de circa 1600 plantuinen).
- Met de SYBR-Green PCR kon valse meeldauw aangetoond worden in het loof, op bak niveau in dezelfde mate als in de biotoets, mits eerst de loofmonsters genomen werden en daarna het overgebleven plant materiaal werd gemist. Door 's nachts te misten (hoge luchtvochtigheid) werd expressie door middel van sporulatie gestimuleerd
- De SYBR-Green PCR gaf een overschatting van het aantal geïnfecteerde monsters als eerst werd gemist en daarna het loof geogst voor de PCR, mogelijk als gevolg van verspreiding en / of secundaire infectie van valse meeldauw.
- De Biotoets-PCR biedt daarmee potentie om de traditionele biotoets te vervangen als methode om besmetting van plantgoed vast te stellen. Wel moet er op gelet worden dat er geen omstandigheden aangelegd worden waarbij valse meeldauw tot expressie kan komen, om kruisbesmetting te voorkomen. De methode is in 2 jaren beproefd.
- De Biotoets-PCR combineert de voordelen van de traditionele biotoets waarbij alleen levende valse meeldauw gedetecteerd wordt met de voordelen van de PCR die ook een niet tot expressie gekomen besmetting signaleert.

### 4.4.2 Warme lucht behandeling cel-proef

- De effecten van temperatuur en behandelduur, onder laboratoriumomstandigheden, op de vitaliteit van valse meeldauw konden niet eenduidig worden vastgesteld omdat in de onbehandelde controle valse meeldauw niet tot expressie kwam.
- De mate van infectie van tweedejaars plantuinen (oogst 2017) was ongekend hoog met circa 4 %.
- Warme lucht behandeling onderdrukt de expressie van valse meeldauw. Naarmate de temperatuur hoger is en deze langer wordt aangehouden is het onderdrukkende effect sterker.

### 4.4.3 Warme lucht behandeling praktijkproef

- Warme luchtbehandeling onderdrukte de expressie van valse meeldauw volledig in partij 2 en partij P-AGV. In partij 1 kwam valse meeldauw in de vorm van sporulatie bij 1 plant tot expressie. Dit werd bevestigd in de Biotoets-PCR. Feitelijk is de warme luchtbehandeling onder praktijkomstandigheden 3 keer getoetst waarbij in 23 van de 24 monsters na behandeling geen besmetting meer kon worden aangetoond.

## 4.5 Aanbevelingen

- De warme luchtbehandeling in de praktijk lijkt een goed effect te hebben op het valse meeldauw-vrij maken van eerstejaars plantuinen. Het zou nuttig zijn te formuleren in hoeverre de resultaten voldoende zijn, zodat de warme lucht behandeling hiermee gevalideerd is. Als het antwoord daar ja op is dan zou daarmee de methode geaccepteerd kunnen worden voor het ziektevrij maken van plantuinen ten behoeve van een valse meeldauw-vrij verklaring. De methode zou hiermee een alternatief bieden voor de warmwaterbehandeling. Indien nodig en wenselijk kan het onderzoek herhaald worden. Mogelijk met nog hogere grenswaarden qua temperatuur om afdoding van valse meeldauw te krijgen, zonder verlies aan plantkwaliteit.
- Het zou nuttig zijn om een relatie vast te stellen tussen afdoding van valse meeldauw in eerstejaars plantuinen en de combinatie van behandelduur en temperatuur.



---

# Bijlage 1 Valse meeldauw-vrij verklaring plantgoed ui

## *Valse meeldauw-vrij verklaring.*

Er geldt een verbodsbepaling die er voor moet zorgen dat een 2<sup>e</sup>jaars plantuien teler met schoon uitgangsmateriaal begint.

Het is niet toegestaan om tweedejaars plantuien te telen zonder te beschikken over een, door Naktuinbouw afgegeven, beoordelingsrapport waaruit blijkt dat het uitgangsmateriaal "meeldauw-vrij" is. Naktuinbouw controleert zo kort mogelijk voor de oogst het (nog betrouwbaar te beoordelen) gewas eerstejaars plantuitjes op valse meeldauw. Als uit het beoordelingsrapport blijkt dat geen valse meeldauw is geconstateerd dan dient (een kopie van) dit rapport als bewijs voor de afnemende teler van tweedejaars plantuitjes dat het uitgangsmateriaal "schoon" is. Indien wel valse meeldauw **in het gewas** is geconstateerd maar bij nacontrole van het uitgangsmateriaal (op basis van een biotoets uitgevoerd door Naktuinbouw) blijkt dat de uitjes vrij van valse meeldauw zijn, kan de rapportage van de biotoets dienen als bewijs dat het uitgangsmateriaal "schoon" is.

Besmet bevonden eerstejaars plantuitjes kunnen alleen na het ondergaan van een warmtebehandeling op de (door Naktuinbouw) voorgeschreven wijze alsnog voor de teelt van tweedejaars plantuien worden gebruikt. Van deze behandeling dient de afnemende teler van tweedejaars plantuien eveneens een bewijs te kunnen overleggen.

Voor een actuele versie van de tekst verwijzen we u naar

<https://www.nvwa.nl/onderwerpen/teeltvoorschriften-akkerbouw-en-tuinbouw/teeltvoorschrift-valse-meeldauw-en-koprot>



To explore  
the potential  
of nature to  
improve the  
quality of life



---

Correspondentie adres voor dit rapport:  
Wageningen University & Research | Open  
Teelten  
Edelhertweg 1  
Postbus 430  
8200 AK Lelystad  
T (+31)320 29 11 11  
**[www.wur.nl/openteelten](http://www.wur.nl/openteelten)**

Rapport WPR-7340087100

---

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van stichting DLO en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.000 medewerkers en 9.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein.

De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

