

Beheersing van valse meeldauw in Impatiens

Jantineke Hofland-Zijlstra, Filip van Noort, Sabine Böhne, Sergio de la Fuente van Bentem¹, Kim Weijtmans¹
en Monica Sanders¹.



© 2010 Wageningen, Wageningen UR Glastuinbouw

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 Wageningen UR Glastuinbouw

Wageningen UR Glastuinbouw

Adres : Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk
: Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk
Tel. : 0317 - 48 56 06
Fax : 010 - 522 51 93
E-mail : glastuinbouw@wur.nl
Internet : www.glastuinbouw.wur.nl

Syngenta Seeds B.V.

Adres : Westeinde 62
Postbus 2, 1600 AA Enkhuizen

Inhoudsopgave

		pagina
	Samenvatting	1
1	Inleiding	2
	1.1 Aanleiding en doel van het onderzoek	2
	1.2 Uitvoering van het onderzoek	2
2	Literatuurstudie	4
	2.1 Valse meeldauw soorten in <i>Impatiens walleriana</i>	4
	2.2 Infectie en verspreiding	5
	2.3 Bestrijding	5
3	Moleculaire identificatie van valse meeldauw	8
	3.1 Doel	8
	3.2 Ontwikkeling van specifieke primers voor <i>Plasmopara obducens</i>	8
	3.3 Toetsing van ontwikkelde primers voor <i>Plasmopara obducens</i>	9
	3.4 Bepaling van DNA volgorde (sequentie)	10
	3.5 Conclusies	11
4	Systemische infectie door rustsporen (oösporen)	12
	4.1 Doel	12
	4.2 Opzet en uitvoering van de biotoets	12
	4.3 Resultaten & Conclusie	12
5	Toetsing van preventieve middelen tegen valse meeldauw	13
	5.1 Doel	13
	5.2 Opzet en uitvoering van tunnel- en veldproef	13
	5.3 Resultaten	15
	5.3.1 Kunstmatige besmetting met valse meeldauw (tunnelproef)	15
	5.3.2 Verloop van natuurlijke besmetting in het veld	19
6	Vervolgproef met Fy-taal	21
	6.1 Doel	21
	6.2 Opzet en uitvoering	21
	6.3 Resultaten	21
	6.4 Moleculaire detectie valse meeldauw	22
7	Discussie & Conclusie	23
	7.1 Moleculaire detectie van latente infectie	23
	7.2 Cruciale rol voor fosfaat en fosfiet	23
	7.3 Is verbetering van effectiviteit middelen mogelijk?	24
	7.4 Algemene preventieve maatregelen blijven noodzakelijk	24
	7.5 Conclusie	25
8	Aanbevelingen	26
	8.1 Aanbevelingen voor telers	26
	8.2 Aanbevelingen voor verder onderzoek	26
	Literatuur	27

Samenvatting

De éénjarige zomerbloeiër *Impatiens walleriana* vormt een belangrijk onderdeel in het assortiment van perkgoed. Ondermeer in 2007 waren er door de natte weersomstandigheden grote problemen met uitval door valse meeldauw in de consumentfase. Hierdoor kwam de vraag of er tijdens de opkweek niet meer preventieve maatregelen genomen kunnen worden om infectie door valse meeldauw onder vochtige omstandigheden te verminderen of te voorkomen. Daarnaast was het onbekend of de besmetting met valse meeldauw op Nederlandse locaties veroorzaakt wordt door één soort of meerdere soorten.

In een literatuurstudie is alle beschikbare informatie over valse meeldauw en mogelijkheden voor beheersen/bestrijding samengevat. Bemesting lijkt een belangrijke rol te spelen in de weerstand tegen valse meeldauw. In de tunnel- en veldproef werd daarom gekozen om te variëren met twee fosfaatsniveaus (0,2 mmol en 0,5 mmol) en om deze behandeling wel of niet te combineren met calciumchloride. Andere behandelingen die werden getoetst zijn een plantversterker (Fy-taal) met ondermeer de werkzame stof kaliumfosfaat en een aantal gewasbeschermingsmiddelen: Ortiva (azoxystrobin), Fenomenal (fenamidone en fosetyl-aluminium) en Ridomil Gold (Metalaxyl-M). Verlaging van het fosfaatsniveau naar 0,2 mmol gaf meer uitval van planten dan toediening van 0,5 mmol fosfaat. Wel of geen calciumchloride toedienen gaf geen verschil in uitval. Toediening van gewasbeschermingsmiddelen boodt geen volledige bescherming tegen valse meeldauw en hield de infectie hooguit twee weken tegen. Ridomil Gold en Fenomenal waren het meest effectief. De planten behandeld met de plantversterker bleven drie-vijf weken vrij van symptomen. De snelheid van infectie was afhankelijk van plantdichtheid, sporendruk en cultivar. Doseren van het middel op de pot is de veiligste methode die de minste kans op gewasschade geeft. Bij dosering van het middel bovenlangs is een lichte nabehandeling met water noodzakelijk en de werkingsduur is korter ten opzichte van een wortelbehandeling.

Door Syngenta Seeds is een moleculaire test ontwikkeld waarmee specifiek *Plasmopara obducens* in *Impatiens walleriana* is te detecteren. Hiermee is het mogelijk om (vroegtijdig) latente infecties van valse meeldauw in plantmateriaal of zaad op te sporen. De uitval lijkt veroorzaakt te worden door één soort valse meeldauw.

In biotoetsen is eveneens aangetoond dat rustsporen die aanwezig zijn in gedroogd stengelmateriaal (en achterblijven in de grond) zaailingen kunnen aantasten en dus een belangrijke infectiebron kunnen zijn in perken en tuinen.

Meegeven van een plantversterker met kaliumfosfaat tijdens de opkweekfase is een effectieve methode om het afweersysteem van *Impatiens* planten gedurende enkele weken te versterken, zodat deze ook in de fase bij de consument weerbaarder is tegen infectie door valse meeldauw. Aanbevolen wordt om doseringen van 0,5% of 1,0% van het plantversterkende middel toe te passen. Algemene maatregelen op het gebied van vochtbeheersing, hygiënische maatregelen en een goede bemesting blijven belangrijk om infectie door valse meeldauw te voorkomen.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding en doel van het onderzoek

De éénjarige zomerbloeiër *Impatiens walleriana* vormt een belangrijk onderdeel in het perkgoed-assortiment. De omzet in 2007 bedroeg 2,7 miljoen euro. In dat jaar waren er echter grote problemen met uitval bij de consument, veroorzaakt door valse meeldauw. Soorten van valse meeldauw zijn oömyceten (en strikt genomen geen schimmels), net als *Phytophthora infestans*, de veroorzaker van aardappelziekte. Door valse meeldauwinfectie rotten de planten bij ongunstige weerscondities met veel regen zeer snel weg. Bij aanhoudende problemen kan dit resulteren in imagoverlies en dat consumenten geen herhalingsaankopen van dit product meer doen. Dit kan leiden tot een flinke reductie van de omzet.

Hoewel het probleem zich pas uit bij de consument in de tuin, is de vraag of er tijdens de opkweek niet meer maatregelen genomen kunnen worden om expressie van de oömyceet onder vochtige omstandigheden te verminderen of beter nog te voorkomen. Hiervoor is het eerst nodig om te weten welke soort valse meeldauw precies de veroorzaker is van de uitval. Veel soorten van valse meeldauw zijn sterk waardplantspecifiek en verschillen in hun potentie om systemische (via de wortels/vaten/ zaad) of lokale infecties op het blad te veroorzaken. Daarnaast is het de vraag waar de belangrijkste bron van de latente besmetting plaatsvindt en of er in die productiefase effectieve maatregelen tegen valse meeldauw te nemen zijn. Hierbij kan gedacht worden aan andere bemestingsniveaus, middelen die de plantweerstand verhogen, substraatbehandelingen of zaadbehandeling.

In 2008 zijn veel verschillende soorten aangetast door valse meeldauw, maar er lijkt echter wel een verschil te zijn in gevoeligheid voor valse meeldauw. *Impatiens* Nieuw Guinea lijkt bijvoorbeeld resistent te zijn voor *Plasmopara obducens*. Dit kan een goed aanknopingspunt zijn om cultivars te veredelen die minder snel door deze ziekteverwekker uitvallen. De weg van inkruizing van resistente genen via de klassieke veredeling, zoals die veel gebruikt wordt door veredelaars kost echter nog vele jaren. De problemen met uitval door valse meeldauw in *Impatiens* zijn nu dusdanig ernstig dat eerst gezocht wordt naar oplossingen op kortere termijn.

Doelen van het onderzoek

1. Ontwikkeling van een methode voor moleculaire detectie van de ziekteverwekker in *Impatiens walleriana*.
2. Toetsen of sporen van valse meeldauw ook systemische infectie kunnen veroorzaken.
3. Ontwikkeling van een aanpak voor de beheersing van uitval door valse meeldauw bij *Impatiens walleriana* in de consumentenfase door toediening van preventieve middelen of maatregelen in de teeltfase.

1.2 Uitvoering van het onderzoek

Om zicht te krijgen op effectieve bestrijdingsmiddelen en –methoden voor beheersing van valse meeldauw in *I. walleriana* is eerst een literatuurstudie verricht om algemeen beschikbare kennis over valse meeldauw in *Impatiens* te verzamelen.

Door Syngenta Seeds B.V. is een moleculaire toets ontwikkeld voor detectie van de ziekteverwekker in *Impatiens walleriana* om vast te stellen welke valse meeldauw soort de uitval veroorzaakt. Het is namelijk onduidelijk of dezelfde soort valse meeldauw verantwoordelijk is voor alle uitbraken, of dat er meerdere soorten of rassen verantwoordelijk zijn voor de uitbraken op verschillende locaties. Van één van de monsters van Syngenta was vastgesteld dat de valse meeldauw soort *Plasmopara obducens* is. Het is van groot belang de genetische oorsprong van de verschillende monsters te achterhalen, om een goede remedie te formuleren.

In biotoetsen met kiemplanten eveneens uitgevoerd door Syngenta is vastgesteld of dit pathogeen bij Impatiens alleen lokale infecties veroorzaakt via sporen die op het blad binnendringen of ook systemische infectie kan veroorzaken. Een systemische infectie is bijvoorbeeld zaadoverdraagbaar of kan via de wortels of bladeren de vaten kan binnendringen en zich van daaruit door de hele plant kan verspreiden. Ook is het de vraag of de schimmel in grond kan overleven en of dat een potentiële besmettingsbron vroeg in het seizoen kan zijn. De verschillende infectieroutes zijn op kiemplanten getoetst in klimaatcellen.

In een kasproef bij Wageningen UR Glastuinbouw zijn een aantal behandelingen die uit de literatuurstudie naar voren zijn gekomen ingezet en een gedeelte van de planten werd hiervoor kunstmatig besmet. Drie verschillende variëteiten zijn getoetst. Na de opkweekfase zijn de planten die besmet waren overgebracht naar tunnels van Syngenta om de ontwikkeling in de consumentfase te volgen. Tevens zijn een aantal van deze behandelingen in het veld bij Syngenta uitgezet om het natuurlijke verloop van een infectie op de planten te beoordelen (deze waren niet kunstmatig besmet). De keuze van de behandelingen is overlegd met de telers van éénjarige zomerbloeiërs en LTO groeiservice. Uit de literatuurstudie kwam naar voren dat bemesting een belangrijke rol speelt in de weerstand tegen valse meeldauw, daarom is ervoor gekozen om te variëren met twee fosfaatsniveaus en om deze behandeling te combineren met wel of geen toevoeging van calciumchloride. Tevens is een plantversterker (Fy-taal) met ondermeer de werkzame stof kaliumfosfaat als behandeling toegediend. De overige behandelingen waren gewasbeschermingsmiddelen Ortiva (azoxystrobin), Fenomenal (fenamidone en fosethyl-aluminium), heeft nog geen toelating voor deze toepassing en Ridomil Gold (Metalaxyl-M).

In juli 2009 is een vervolgprouf gestart om te onderzoeken hoe de toedieningswijze van kaliumfosfaat is te verbeteren en welke dosering de minst nadelige gevolgen voor de plantkwaliteit heeft, maar nog wel effectieve bescherming biedt tegen valse meeldauw. Hiervoor zijn eveneens drie variëteiten getoetst. Een eerste inoculatie op 6 augustus resulteerde niet in symptomen van valse meeldauw. Waarschijnlijk omdat de omstandigheden nog niet vochtig genoeg waren. De tweede inoculatie op 25 september resulteerde pas in symptomen nadat de relatieve vochtigheid verhoogd was van 92% naar 100% gedurende drie dagen. De behandelingen met kaliumfosfaat zijn bij de tweede inoculatie niet herhaald.

2 Literatuurstudie

2.1 Valse meeldauw soorten in *Impatiens walleriana*

De laatste jaren is valse meeldauw in *Impatiens* een steeds groter probleem aan het worden. De ziekteverwekker wordt wereldwijd in *Impatiens* gevonden en gemeld in America, Australië, Canada, Azië (India) en diverse Europese landen (DL, UK, Italië en Slovenië (2008)). Er zijn twee valse meeldauwsoorten die *Impatiens* kunnen aantasten. De meest voorkomende valse meeldauw soort die in *Impatiens* aantasting veroorzaakt is *Plasmopara obducens*. De andere minder algemene soort is *Bremiella sphaerosperma*. Deze is morfologisch duidelijk te onderscheiden van *P. obducens*. Ook de symptomen op de plant zijn verschillend. *Plasmopara obducens* veroorzaakt een vergeling van het hele blad en de sporulatie aan de onderzijde wordt niet begrenst. *B. sphaerosperma* daarentegen geeft op het blad scherp begrensde lesies. *Plasmopara obducens* kan worden opgespoord via PCR technieken (Lane e.a. 2005).

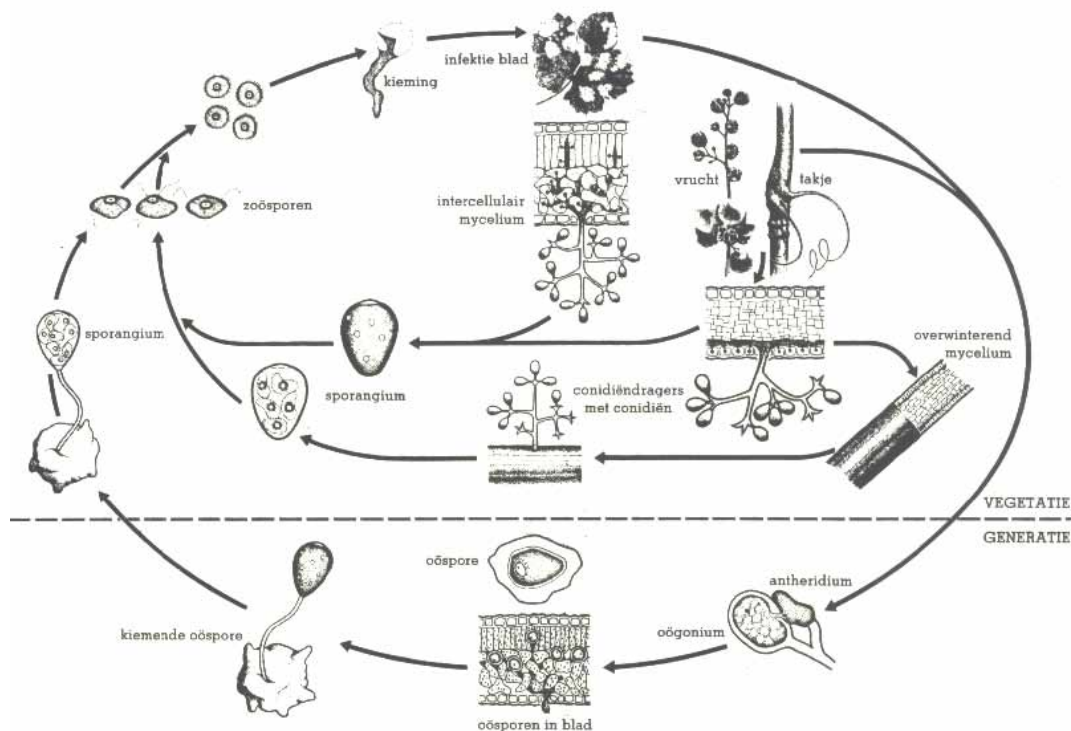
Symptomen kunnen onder optimale omstandigheden tussen 10-14 dagen optreden. Het meest karakteristieke symptoom van valse meeldauw is een witte poederachtige laag op de onderkant van het blad. Valse meeldauw kan echter ook lang zonder symptomen (latent) in de plant aanwezig zijn. Als gevolg van een locale infectie kunnen aangetaste bladeren lichter groen worden, geel verkleuren, groeiremming vertonen en bij ernstige aantasting kunnen zowel bladeren als bloemen afvallen.

Bij systemische aantasting door een besmetting vanuit het zaad of de grond verspreidt de aantasting zich in de plant door de vaatbundels. De vaatbundels kunnen hierdoor zwart verkleuren. Door een dergelijke aantasting blijven planten achter in groei. Ook hier worden de bladeren bleekgroen, vergelen, vervormen en vallen af. Planten die in een zeer jong stadium worden geïnfecteerd gaan meestal vroegtijdig dood.

2.2 Infectie en verspreiding

De sporen van de schimmel verspreiden zich via de lucht, met opspattend water of gronddeeltjes of door resten van besmet plantmateriaal (Figuur 2.1). Verspreiding door de lucht vindt massaal en explosief plaats vanaf sporulerende vlekken aan de onderkant van de bladeren. Sporen die op planten terecht komen kiemen als er minimaal 5 uur vrij water aanwezig is. Als de omstandigheden voor de sporen ongunstig zijn (geen vocht aanwezig) verliezen ze los van hun waardplant binnen 1-2 dagen hun levenskracht. Eénmaal in de plant is er voor de verdere ontwikkeling van de schimmel geen vrij water meer nodig. De optimumtemperatuur voor groei is 15-20°C. Sporulatie wordt ook bevorderd door lage bemestingsniveaus (bodem EC < 1.0).

In het plantmateriaal kan de schimmel ook persistente overlevingsstructuren (oösporen) vormen. Deze kunnen in afgestorven plantmateriaal en in de grond meer dan 10 jaar overleven. Oösporen kunnen vanuit de grond planten via de wortels aantasten en dan is er sprake van een systemische infectie. Verspreiding door middel van besmet zaad is eveneens mogelijk. De kans op verspreiding van valse meeldauw met stek is echter veel groter. Dit wordt versterkt door het feit dat de schimmel heel lang latent dus zonder uiterlijke symptomen in de plant aanwezig kan zijn.



Figuur 2.1 Levenscyclus valse meeldauw.

2.3 Bestrijding

Hygiënische maatregelen

Het handhaven van een goede hygiëne is erg belangrijk. Hieronder vallen maatregelen als: werkoppervlaktes en vloeren zo goed mogelijk schoonhouden, verwijderen van zieke planten in gesloten zakken en niet op een composthoop gooien, starten met schoon uitgangsmateriaal (stek en zaad), geen planten plaatsen op grond waar eerder besmette planten hebben gestaan), stomen van besmette grond, verwijderen van wilde Impatiens

soorten die rondom de kas staan om overdracht van infectie zoveel mogelijk te voorkomen, zoals groot springzaad (*I. noli-tangere*), klein springzaad (*I. parviflora*), reuzenbalsemien (*I. glandulifera*), Kaaps springzaad (*I. capensis*).



Figuur 2.1: Wilde *Impatiens* soorten in Nederland die infecties van *Plasmopara obducens* kunnen overdragen.
Van links naar rechts: groot springzaad, klein springzaad, Kaaps springzaad en reuzenbalsemien.

Resistentie

Plasmopara obducens is gevonden in wilde en gekweekte *Impatiens* soorten waaronder *Impatiens walleriana*, *I. noli-tangere* (groot springzaad) en *I. balsemina* in Australië, Europese landen, Azië en Noord Amerika. De schimmel lijkt in gekweekte soorten echter vrij specifiek *Impatiens walleriana* aan te tasten, maar lijkt niet in staat andere *Impatiens* soorten te infecteren, zoals *I. hawkeri* (Cunnington et al. 2008).

Wellicht dat de resistentie-eigenschappen uit *I. hawkeri* nog eens van toepassing kunnen zijn voor de resistentieveredeling in *I. walleriana*. Op korte termijn is er echter weinig perspectief op beschikbare resistente rassen. In het kweken van nieuwe soorten wordt veel gebruikt gemaakt van klassieke veredeling (zonder moleculaire technieken) waarbij selectie van ziekteresistentie een langdurig en tijdrovend traject is.

Kasklimaat, watergeefstrategie & bemesting

Met voldoende ventilatie is de relatieve vochtigheid in een kas laag te houden (<70%) en het gewas droog. Hierdoor neemt het risico van infectie al sterk af. Hogere temperaturen (> 20°C) vlak voordat de planten worden afgeleverd zijn eveneens gunstig. Luchtdoorstroming in het gewas (en minder condens op de bladeren) kan worden bevorderd door de planten wijder uiteen te zetten. Bij een aanwezige lokale infectie kan de verspreiding van sporen beperkt worden door planten onderdoor water te geven in plaats van bovenaf.

De rol van een goede bemesting is erg belangrijk in het voorkomen van een valse meeldauw infectie. Er is duidelijk aangetoond dat planten die voldoende voeding (met name fosfaat) krijgen minder snel worden besmet dan planten die ondervoed zijn. Fosfaat (PO_4^{3-}) heeft een belangrijk effect op versterking van het afweersysteem van de plant en de weerstand tegen binnendringing van ziekteverwekkers (Reignault & Walters 2007). Tevens kan de weerstand van de plant tegen valse meeldauw worden vergroot met een aantal andere voedingselementen. Valse meeldauw infecteert planten in eerste instantie via het binnendringen van openstaande huidmondjes. Planten reageren over het algemeen op ziekteverwekkers door de huidmondjes te sluiten, een proces waarin kalium een grote rol in speelt. Een aantal elementen kunnen elk een gunstige uitwerking hebben op het ziekteverloop van valse meeldauw. Vanuit de literatuur is bijvoorbeeld bekend dat koper (Cu), fosfor (P), calcium (Ca), mangaan (Mn), boor/borium (B) en silicium (Si) eveneens een positief effect kunnen hebben op resistentie in de plant tegen deze ziekteverwekkers (Reignault & Walters 2007, Reuveni et al. 1997).

Chemische gewasbeschermingsmiddelen

Chemische gewasbeschermingsmiddelen die effectief zijn tegen valse meeldauw zijn meestal systemische middelen op basis van: azoxystrobine (Ortiva), dimethomorf* en cyazofamid*, fosetyl-aluminium (Aliette, Fenomenal*), metalaxyl-M (Ridomil Gold, Folio-Gold*, Fubol Gold*). Middelen en werkzame stoffen met een asterisk zijn niet toegelaten in NL voor deze toepassing. Systemische middelen worden door de plant opgenomen en zijn daarom effectiever tegen een aantasting die al in de plant zit. Aliette kan zowel worden aangegoten als verspoten en versterkt evenals Ridomil Gold het afweermechanisme van de plant door een verhoging van het salicylzuur (Nemestothy & Guest 1990). Er is een risico van fytotoxiciteit aanwezig. Bij een aantal van de systemische fungiciden is er bovendien een grote kans op resistentie ontwikkeling van de schimmel. Hoewel er op dit moment nog geen resistente *Plasmopara obduscens* stammen zijn is het wel raadzaam om middelen met verschillende werkzame stoffen zoveel mogelijk af te wisselen. Er wordt geadviseerd om het gebruik van strobilurines te beperken tot 50% van de toegediende middelen. Producten met mancozeb (Fubol Gold, Kenbyo) op basis van een contactwerking, werken vooral preventief. Ze worden alleen naar boven toe getransporteerd, zodat een vroege behandeling nodig is om ook de oudere bladeren te beschermen. Gebruik van deze middelen is erg effectief en er is geen resistentie-risico aanwezig. Wel wordt aangeraden deze als bladbespuiting toe te dienen, omdat ze erg fytotoxisch kunnen zijn voor de wortels. Enkele middelen op basis van Metalaxyl-M worden geadviseerd als zaadbehandeling om aantasting van valse meeldauw in jonge plantmateriaal te voorkomen. Voor alle middelen geldt dat preventieve bestrijding effectiever is dan curatieve bestrijding.

Biologische antagonisten

Antagonisten die effectief zijn tegen bovengrondse aantasting van valse meeldauw zijn niet bekend.

Plantversterkende middelen

Er zijn een aantal middelen die als *plantversterker of weerstandverhogend middel* op de markt worden gebracht. Deze middelen zijn interessant uit milieu-oogpunt, omdat de effecten van de behandeling langdurig zijn en resistentie-opbouw moeilijk is. Een nadeel is dat de effectiviteit vaak minder is dan van de contactmiddelen zoals de chemische gewasbeschermingsmiddelen. Zo blijkt uit onderzoek dat een zaadbehandeling en bladbespuitingen met chitosan bij gierst bescherming geeft tegen valse meeldauw (Sharatchandra et al. 2004). Resistentie tegen valse meeldauw in kool na behandeling met chitine is aangetoond door Van der Krieken et al. (1995). Gierstzaad behandeld met proline heeft eveneens een verhoogde weerstand tegen valse meeldauw. Er zijn een aantal overzicht artikelen waarin wordt gemeld dat bladbemesting met niet-gefermenteerde compost extracten of met gefermenteerde compost thee weerstand kan worden geïnduceerd.

Van fosfieten (PO_3^{3-}) is de werking tegen valse meeldauw soorten in diverse gewassen aangetoond (Reignault & Walters 2007). In de plant zijn fosfieten erg mobiel (transport via hout- en zeefvaten), waardoor ze snel bescherming geven aan zowel de wortels als aan de bladeren bovenin. Fosfieten hebben een systemische werking waardoor ze effectief zijn tegen veel organismen in de groep van Oömycota, zoals *Pythium*, *Phytophthora* en valse meeldauw soorten. Het werkingsmechanisme is vooral gebaseerd op verhoging van het weerstandssysteem tegen binnendringing van schimmels (systemic acquired resistance) door ondermeer locale en systemische toename van salicylzuur die hierin een belangrijke rol speelt.

Het commerciële product Phytogard (K_2HPO_3) geeft ondermeer bescherming tegen valse meeldauw in sla (Pajot 2001) en bloemkool (Bécot et al. 2000). Daarnaast geeft toediening van het product aan de wortels langere bescherming doordat deze systemisch werkt dan wanneer deze alleen op de bladeren wordt toegediend en slechts een locale werking heeft (Bécot et al. 2000). In het middel Aliette vormt fosfiet ook een van de werkzame bestanddelen. De werkzame stof fosethyl-aluminium wordt ook wel aluminium-ethylfosfiet genoemd (Van den Berg 2001).

3 Moleculaire identificatie van valse meeldauw

3.1 Doel

Aantonen van latente infecties in plantmateriaal of zaad door ontwikkeling van een specifieke detectiemethode voor valse meeldauw in *Impatiens walleriana*.

3.2 Ontwikkeling van specifieke primers voor *Plasmopara obducens*

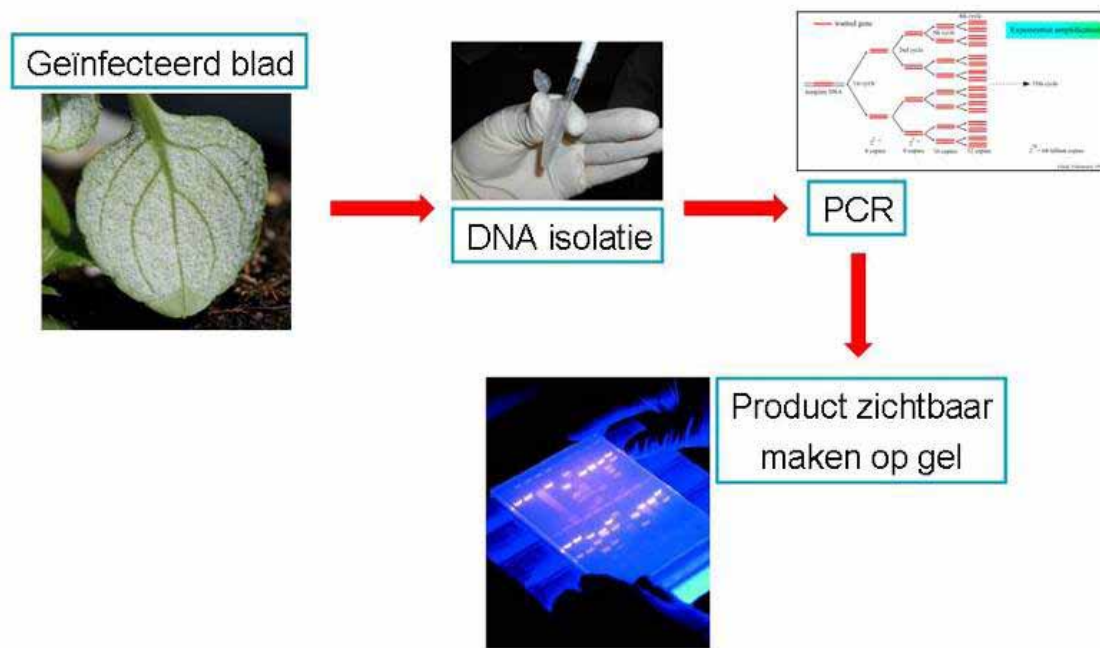
De detectiemethode (zie schematisch overzicht in Figuur 3.1) is gebaseerd op PCR, een DNA vermeerderingsmethode dat gebruik maakt van kleine stukjes DNA (zogenaamde 'primers') die specifiek passen op een stukje DNA van het organisme dat gedetecteerd moet worden. Voor de ontwikkeling van de toets zijn 5 combinaties van deze primers getest. Twee daarvan zijn mogelijk specifiek voor *Plasmopara obducens* (*Impatiens* valse meeldauw), twee andere combinaties zijn aspecifiek, en zullen andere soorten valse meeldauw en zelfs plant DNA detecteren, en één is specifiek voor zonnebloem valse meeldauw (Tabel 1).

Tabel 1. Primer combinaties gebruik voor de ontwikkeling van een PCR-gebaseerde methode voor specifieke detectie van valse meeldauw in *Impatiens* (*Plasmopara obducens*).

primer combinatie	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER	VERWACHTE LENGTE (BP)	DNA FRAGMENT	VERWACHTE SPECIFICITEIT	REFERENTIE
1	POBD-F	POBD-R	308	Partial 28S rDNA (LSU) ¹	<i>Plasmopara obducens</i>	Identieke regio als PHAL-F en PHAL-R
2	POBD-F	POBDn-R	325	Partial 28S rDNA (LSU) ¹	<i>P. obducens</i>	POBDn-R downstream van POBD-R
3	NL1	NL4	~800	Partial 28S rDNA (LSU) ¹	Niet specifiek, ook plant rDNA	Lane et al. 2005 (Plant Pathology 54: 243)
4	ITS1-O	LR-O	~1900	ITS1 ² , 5.8S, ITS2	Niet specifiek	Thines et al., 2005 (European Journal of Plant Pathology 112: 395–398)
5	PHAL-F	PHAL-R	308	Partial 28S rDNA (LSU) ¹	<i>P. halstedii</i> (zonnebloem valse meeldauw; syn. <i>P. helianthi</i>)	loos et al., 2007 (Plant Pathology 56: 209–218)

¹28S rDNA/LSU: Het nucleaire DNA coderend voor large ribosomal subunit. ²ITS, internal transcribed spacer

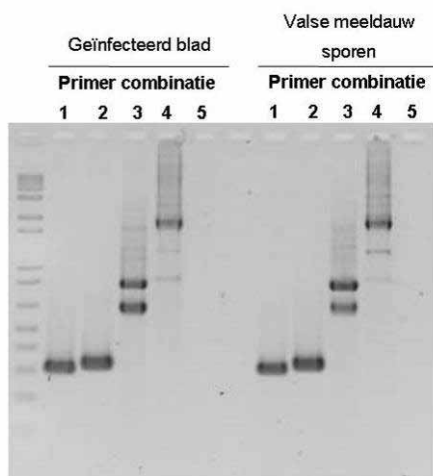
Ontwikkeling van moleculaire toets



Figuur 3.1: Ontwikkeling van een moleculaire toets verloopt via de volgende stappen. Eerst is een zichtbaar geïnfecteerd blad nodig waarop alleen de ziekteverwekker aanwezig is. Hiervan wordt schimmelmateriaal (sporen) verzameld en in een oplossing gebracht die het DNA van de schimmel isoleert. Dit DNA wordt veelvuldig vermeerderd met behulp van een polymerase chain reactie (PCR). Vervolgens wordt het product zichtbaar gemaakt op een gel doordat de verschillende eiwitten van het DNA variëren in de doorlooptijd onder invloed van elektroforese. Elke soort geeft op een bepaalde hoogte in de gel een specifiek patroon (bandje). Door de verschillende bandjes te vergelijken zijn de soorten te onderscheiden.

3.3 Toetsing van ontwikkelde primers voor *Plasmopara obducens*

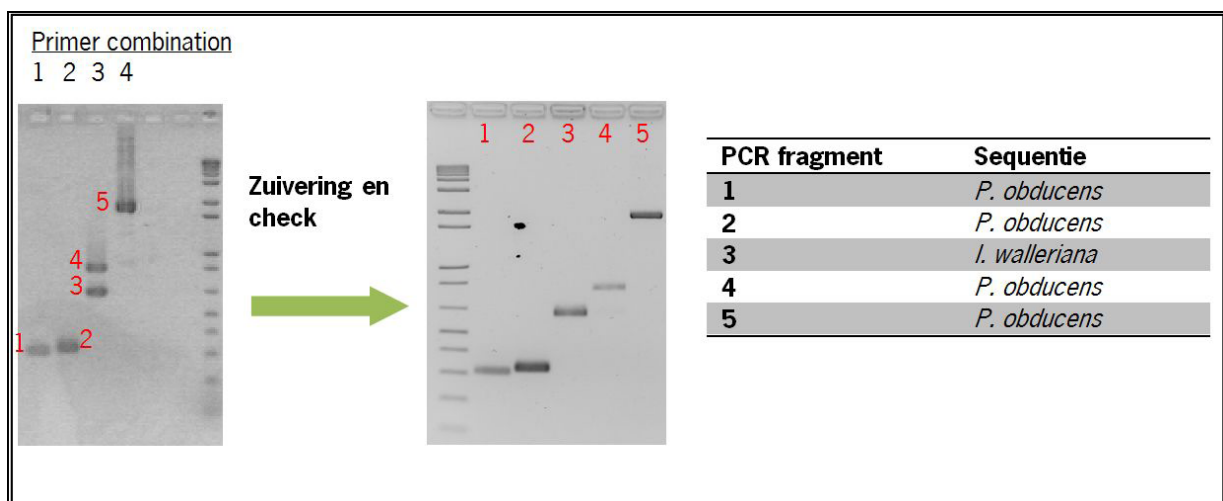
Alle vijf primercombinaties uit Tabel 1 zijn getest op geïsoleerd DNA van een *I. walleriana* blad dat geïnfecteerd was met valse meeldauw en op opgezuiverde sporen van valse meeldauw. Primer combinaties 1-4 gaven DNA fragmenten die qua lengte (Tabel 1) te verwachten waren (Figuur 3.2). Primer combinatie 5 gaf geen fragment, hetgeen verwacht was omdat deze combinatie specifiek voor zonnebloem valse meeldauw is (Figuur 3.2). In een vervolgprouf werd aangetoond dat primer combinaties 1 en 2 niet valse meeldauwen van spinazie, sla en zonnebloem aantoonde. Niet geïnfecteerde *I. walleriana* en Nieuw Guinea Impatiens gaven geen PCR product bij primers 1 en 2. Dit bewijst dat de PCR producten verkregen met primer combinaties 1 en 2 specifiek voor *P. obducens* zijn.



Figuur 3.2: Resultaten van PCR toets. De gekozen primer combinaties 1 en 2 die specifiek zijn voor *Plasmopara obducens* geven een duidelijke reactie met geïsoleerd DNA van van een *I. walleriana* blad dat geïnfecteerd was met valse meeldauw en met valse meeldauw sporen die op *Impatiens* aanwezig zijn. Primer combinatie 5 gaf geen fragment, omdat deze combinatie specifiek is voor valse meeldauw in zonnebloem.

3.4 Bepaling van DNA volgorde (sequentie)

De DNA fragmenten die geamplificeerd worden door primer combinaties 1-4 zijn geïsoleerd en gecontroleerd op een DNA gel (Figuur 3.3). Vijf fragmenten zijn naar het bedrijf Baseclear gestuurd om de DNA volgorde (sequentie) te laten bepalen van deze fragmenten. Hieruit kwam naar voren dat alle primer combinaties DNA van *P. obducens* hadden geamplificeerd, en dat primer combinatie 3 ook plant DNA amplificeert. Deze resultaten bevestigen de verwachte resultaten en tonen aan dat de valse meeldauwsoort die verantwoordelijk is voor de uitval in *Impatiens* specifiek is te detecteren.



Figuur 3.3. Zuivering en sequentie bepaling van geamplificeerde DNA fragmenten.

3.5 Conclusies

De resultaten van de PCR toetsen hebben aangetoond dat twee primer combinaties (1 en 2) specifiek het DNA van valse meeldauw (*P. obducens*) in Impatiens kunnen detecteren. Primercombinatie 2 geeft een betere amplificatie van *P. obducens* DNA en lijkt daarmee het meest geschikt voor robuuste identificatie. Primercombinatie 3 (niet specifiek, detecteert ook Impatiens DNA) kan als controle dienen om te bepalen of het geïsoleerde DNA van goede kwaliteit is.

4 Systemische infectie door rustsporen (oösporen)

4.1 Doel

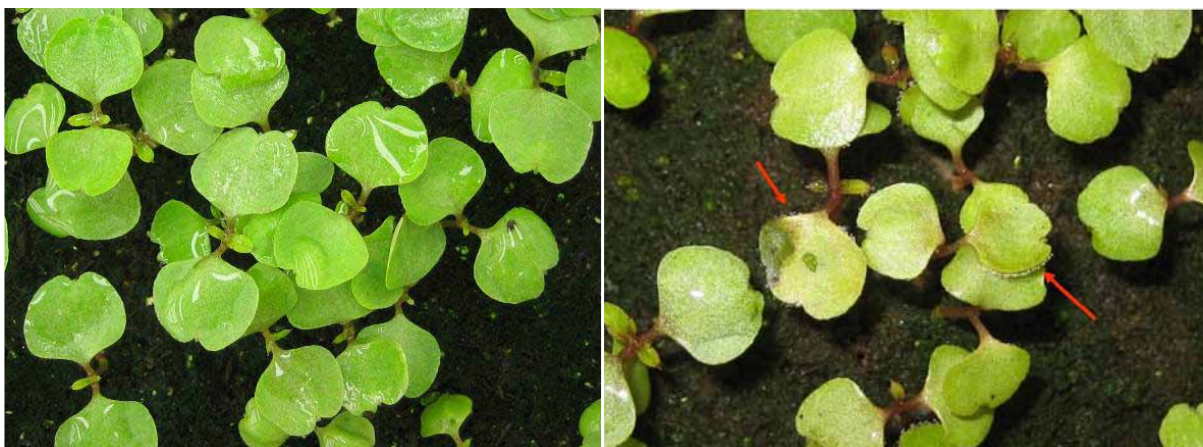
Doel van dit onderzoek is om na te gaan of systemische infectie van valse meeldauw door rustsporen (oösporen) mogelijk is.

4.2 Opzet en uitvoering van de biotoets

In het voorjaar van 2009 een biotoets uitgevoerd met kiemplanten. Gedroogd stengelmateriaal van *Impatiens* (met rustsporen erin) werd gedroogd en door substraat gemengd. Op dit substraat en op een controle substraat waar geen stengelmateriaal doorheen was gemengd, is *I. walleriana* gezaaid. Het materiaal werd weggezet in afgesloten plastic kweekbakken (20 x 35 cm) bij een temperatuur van 15-18°C. Hierdoor bleef de luchtvochtigheid hoog (rv > 95%) en werd verspreiding van infectie voorkomen.

4.3 Resultaten & Conclusie

Na 2-3 weken werd alleen sporulatie (zoösporen) van valse meeldauw waargenomen op bladeren van *Impatiens* zaailingen die groeiden op het substraat met geïnfecteerd stengelmateriaal (Figuur 4.1). De zaailingen op het controle substraat vertoonden geen sporulatie. De rustsporen werden gevonden in de stengels van ernstig aangetaste planten. Hiermee is aangetoond dat rustsporen die aanwezig zijn in gedroogd stengelmateriaal (en achterblijven in de grond) zaailingen kunnen aantasten en dus een belangrijke infectiebron kunnen zijn in perken en tuinen. Deze kennis is een belangrijke stap vooruit, omdat er nu ook onderzoek kan plaatsvinden met besmette grond en effecten van bestrijdingsmethoden op reductie van primaire infectie vanuit een besmette grond.



Figuur 4.1: *Impatiens walleriana* zaailingen 14 dagen na inzaai op schone grond (links) of grond waarin stengelmateriaal met oösporen (rechts) is gemengd.

5 Toetsing van preventieve middelen tegen valse meeldauw

5.1 Doel

Doel is om effectiviteit van preventieve middelen te testen voor de beheersing van uitval door valse meeldauw bij *Impatiens walleriana* in de consumentfase door toediening van in de teeltfase.

5.2 Opzet en uitvoering van tunnel- en veldproef

Bij Syngenta Seeds in Enkhuizen zijn in week 13 *Impatiens walleriana* planten gezaaid van drie cultivars: 'Lilac', 'Rose' and 'Salmon' (Syngenta). In week 16 zijn ze verspeend en overgebracht naar de kassen van WUR Glastuinbouw in Bleiswijk. Eén week later zijn de eerste meststofbehandelingen toegediend. Bij één serie zijn in week 21 (vlak voor aflevering in de consumentfase) de planten besmet en zijn een dag later de behandelingen met bestrijdingsmiddelen toegediend. Bij de tweede serie zijn dezelfde behandelingen toegediend, maar vond de besmetting vier weken later plaats (wk 25) om het effect van nawerking van de middelen te toetsen. Een derde serie kreeg eveneens dezelfde behandelingen als serie 1 en 2, maar deze planten werden niet kunstmatig besmet. In week 22 (25 mei) zijn alle planten overgebracht naar Syngenta (Figuur 5.1). De eerste twee series zijn in tunnels geplaatst, om de kans van besmetting te minimaliseren. De derde (onbesmette) serie werd in het veld uitgezet om het proces van natuurlijke infectie te volgen. Elke serie zijn 24 planten van elke cultivar per behandeling getoetst.

Tabel 5.1: Overzicht van behandelingen met preventieve middelen tegen valse meeldauw. Toegepast tijdens de opkweek van *Impatiens walleriana* en voor de besmetting van planten met valse meeldauw.

Behandelingen	hoeveelheid	Voeding	Toediening valse meeldauw	Opmerking
Controle (niet behandeld)		Uit vaste bak	nee	
Controle (niet behandeld)		Uit vaste bak	ja	
Verlaagd fosfaat pg-mix en daarna standaard fosfaat in voedingsoplossing	0,2 mmol /0,5 mmol	pg mix en voedingsopl.	nee	
Verlaagd fosfaat pg-mix en daarna standaard fosfaat in voedingsoplossing	0,2 mmol /0,5 mmol	pg mix en voedingsopl.	ja	
Verlaagd fosfaat voedingsopl. Zonder calciumchloride	0,2 mmol	voedingsoplossing	nee	
Verlaagd fosfaat voedingsopl. Zonder calciumchloride	0,2 mmol	voedingsoplossing	ja	
Verlaagd fosfaat voedingsopl. Met calciumchloride	0,2 mmol	voedingsoplossing	nee	
Verlaagd fosfaat voedingsopl. Met calciumchloride	0,2 mmol	voedingsoplossing	ja	
Plantversterker met kaliumfosfiet (1%)	1%		nee	Schade op bloem en blad
Plantversterker met kaliumfosfiet (1%)	1%		ja	Schade op bloem en blad
Ridomil Gold (Syngenta)	12.5 ml in 100 l water		nee	
Ridomil Gold (Syngenta)	12.5 ml in 100 l water		ja	
Fenomenal (Bayer)	250 g per 100 l water		nee	heeft nog geen toelating voor deze toepassing
Fenomenal (Bayer)	250 g per 100 l water		ja	heeft nog geen toelating voor deze toepassing
Ortiva (Syngenta)	80 ml / 100 l water		nee	
Ortiva (Syngenta)	80 ml / 100 l water		ja	

Besmetting met valse meeldauw vond plaats door een suspensie van zoösporen over de bladeren te verspuiten met een concentratie van 5×10^4 sporen/ml. De sporen waren afkomstig van besmette Impatiens bladeren die in 2008 verzameld waren. Voor het bevorderen van de infectie zijn de planten gedurende 24 uur afgedekt met plastic. In de tunnels bij Syngenta zijn de tunnelcondities extreem vochtig gehouden om eveneens een snel verloop te krijgen van de infectie in de 'consumentfase'.

Na de eerste zichtbare symptomen in de controleplanten zijn alle behandelde planten beoordeeld op aan- of afwezigheid van valse meeldauw. Dit werd na één week nog een keer herhaald. Besmetting is duidelijk te herkennen aan helder wit schimmelpluis onderop het blad en planten die sterk hun bladeren en bloemen verliezen.



Figuur 5.1: Planten vlak voor aflevering bij de WUR Glastuinbouw na toediening van de behandelingen.

5.3 Resultaten

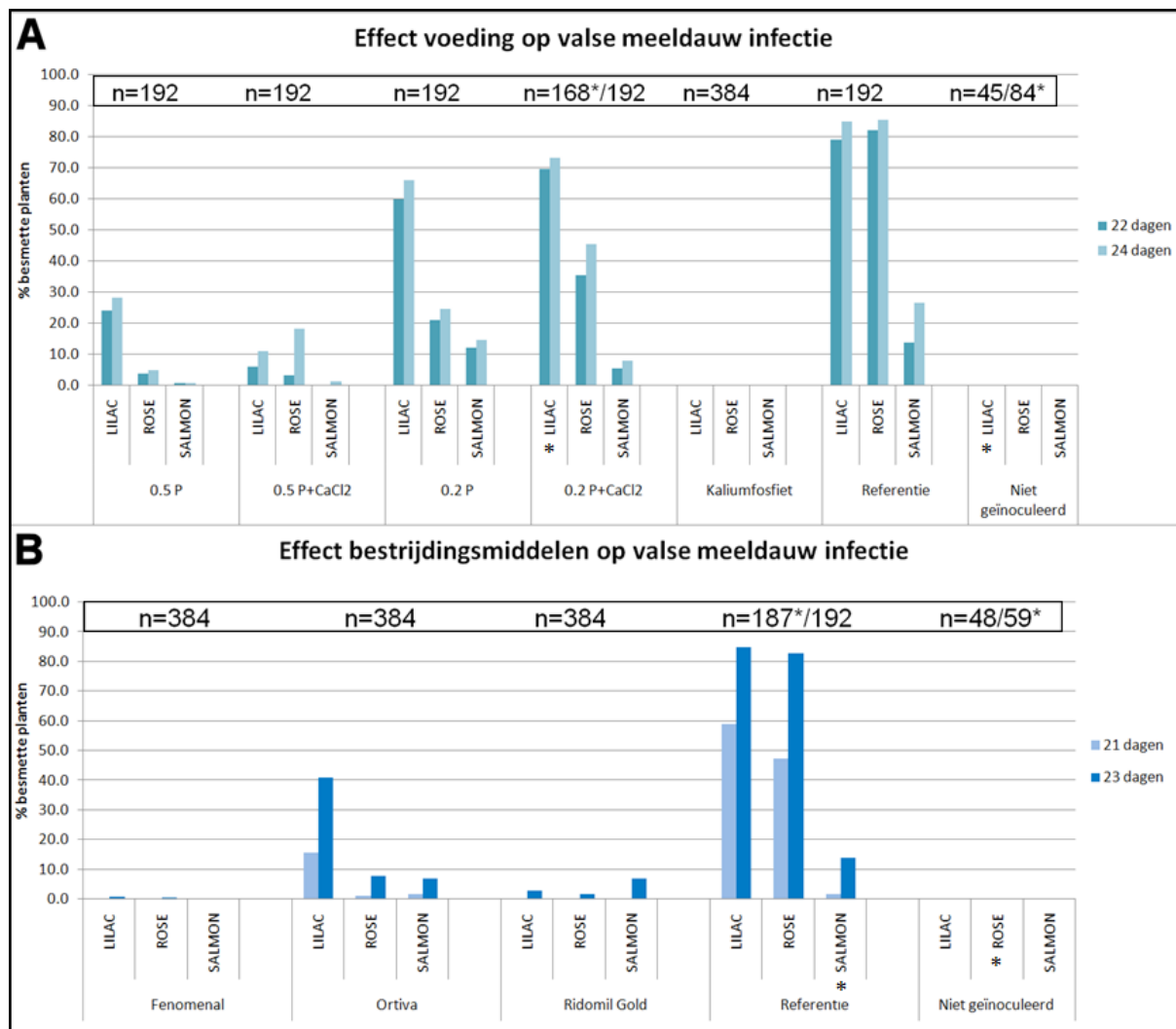
5.3.1 Kunstmatige besmetting met valse meeldauw (tunnelproef)

5.2.1.1. Effectiviteit van middelen tegen valse meeldauw



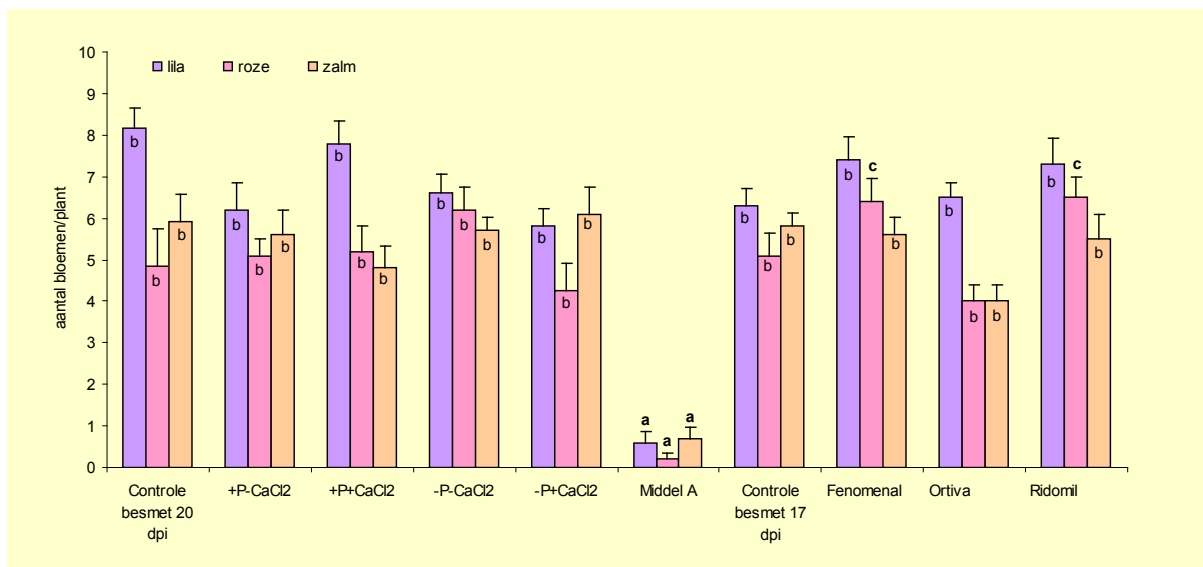
*Figuur 5.2: Links: Impatiens planten uitgezet in de tunnel van Syngenta Seeds in Enkhuizen.
Rechts: symptomen van infectie met valse meeldauw.*

Na 14 dagen raakten de eerste planten zichtbaar geïnfecteerd met valse meeldauw (Figuur 5.2) en na 22 dagen waren er duidelijke verschillen tussen de behandelingen. De planten die niet kunstmatig waren besmet vertoonden geen infectie, dus er waren kennelijk geen andere meeldauwsporen aanwezig dan die zelf waren aangebracht (Figuur 5.3). In de behandelingen met minder fosfaat (0,2 mmol) waren meer zieke planten aanwezig dan in de behandelingen met een normaal fosfaatsniveau (0,5 mmol). Bij de gevoeligste cultivar ('Lilac') was dit echter nog steeds een uitval van 20%. De zalmkleurige cultivar ('Salmon') leek de minst gevoelige voor meeldauw. De effecten van wel of geen calciumchloride toedienen zijn minder groot en wisselend. Bij de 'Lilac' en 'Rose' cultivar lijkt er een toename in gevoeligheid te zijn, terwijl de 'Salmon'-cultivar juist minder gevoelig lijkt te worden.



Figuur 5.3: (A) Effect van meststoffen en een plantversterker met kaliumfosfiet op valse meeldauw infectie 21 en 23 dagen na inoculatie. $P^+ = 0,5$ mmol P, en $P^- = 0,2$ mmol P. (B) Effect van gewasbeschermingsmiddelen op valse meeldauw infectie 21 en 23 dagen na inoculatie.

De plantversterker met kaliumfosfiet geeft opvallend genoeg geen enkele aangetaste plant (Figuur 5.3). Wel is er sprake van bladschade en verlies van knoppen en bloemen (Figuur 5.4. en 5.5). De planten blijven eveneens achter in de groei en gedrongen van vorm. Uit latere proeven blijkt dat dit sterk te maken heeft gehad met toediening van het middel op het blad zonder na te spoelen met water.



Figuur 5.4: Aantal bloemen per behandeling van besmette *Impatiens* planten 17 en 20 dagen na inoculatie. Verschillende letters geven betrouwbare verschillen aan tussen behandelingen ($P < 0.05$).

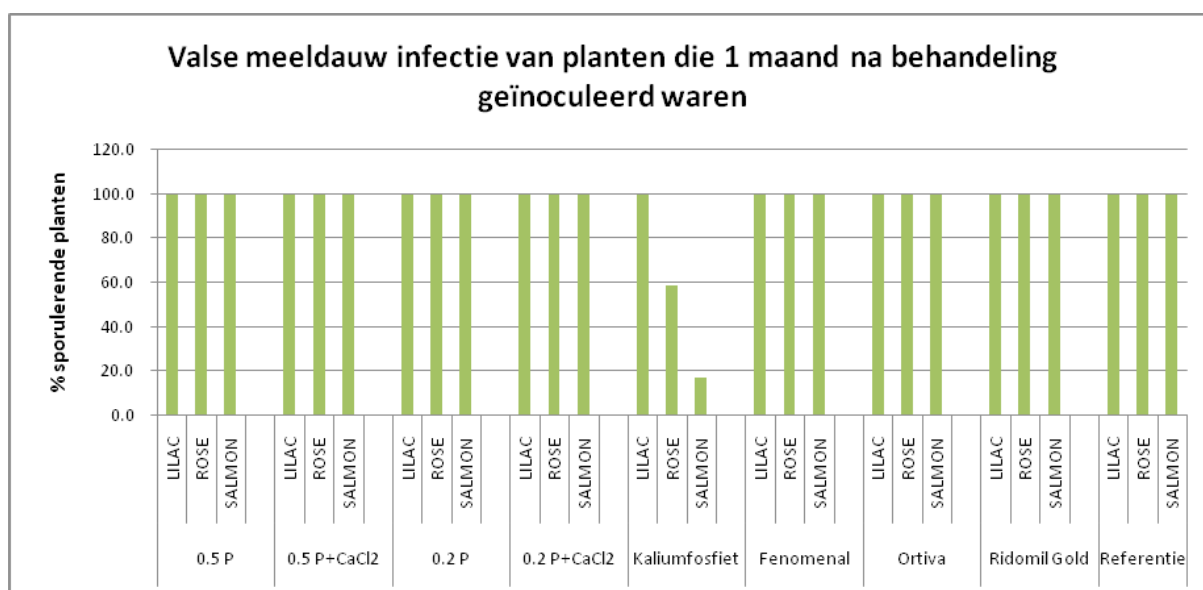


Figuur 5.5: Behandeling met een plantversterker met kaliumfosfiet gaf in de eerste proef bladschade en verlies van bloemen (rechts). Op de foto links staat een onbehandelde plant.

In de behandelingen met bestrijdingsmiddelen gaf Ortiva als eerste planten te zien die besmet waren geraakt (Figuur 5.6), terwijl Fenomenal en Ridomil Gold langer de plant bescherming boden tegen infectie. Behandeling met Ridomil Gold gaf de planten langere bloemstelen in vergelijking met de andere planten. Alleen twee-drie weken na de eerste planten met symptomen, waren alle planten van alle behandelingen besmet geraakt en bleven alleen de planten die behandeld waren met plantversterker vrij van infectie. Deze bood een bescherming van ongeveer vijf weken.

5.2.1.5 Werkingsduur van de middelen tegen valse meeldauw

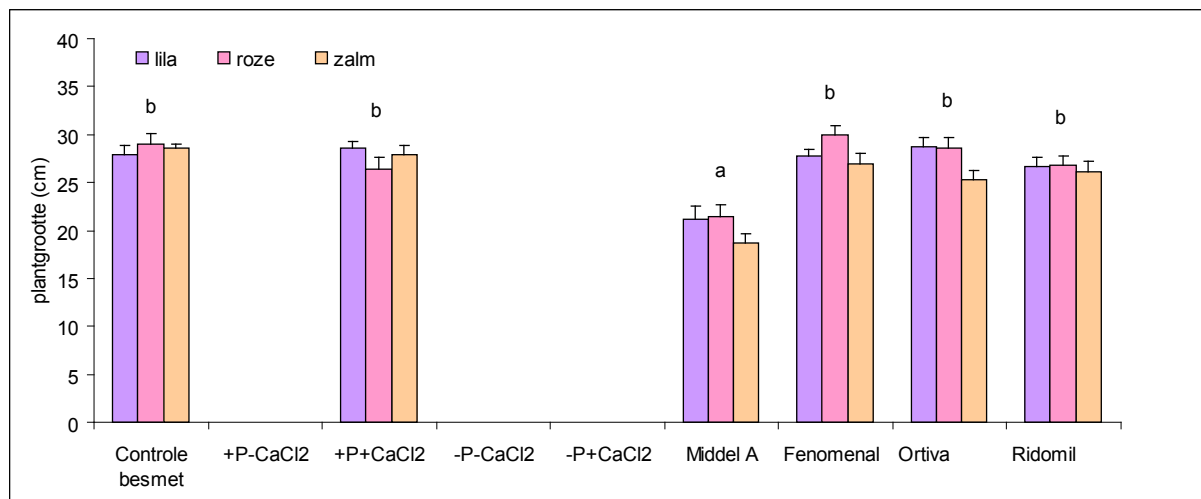
Om te onderzoeken hoe lang de verschillende behandelingen effect hebben op valse meeldauw infectie, zijn planten een maand na de (laatste) behandeling geïnoculeerd met valse meeldauw sporen. Alleen de plantversterker met kaliumfosfiet gaf nog een redelijke bescherming bij de roze en zalm cultivars, alle andere middelen/behandelingen gaven geen bescherming meer (Figuur 5.6). Het is wel van belang te vermelden dat de planten in een ruimte met veel sporulerende planten stonden en dat de ziektedruk hierdoor dus erg hoog was tijdens de proef. Naast de primaire infecties treden er dan ook secundaire infecties op. Aangezien de planten drie weken na inoculatie geteld zijn, kan dit effect hebben gehad op de uitval door valse meeldauw.



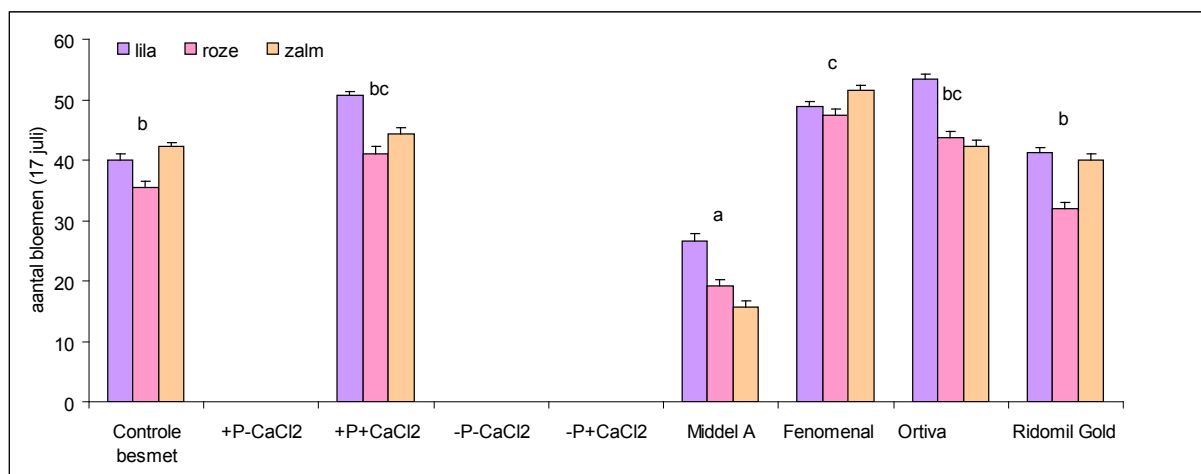
Figuur 5.6: Duur van het effect van gewasbeschermingsmiddelen en voeding op valse meeldauw infectie. De inoculatie is uitgevoerd na 1 maand na de (laatste) behandeling. De infectie is gemeten 21 dagen na inoculatie.

5.3.2 Verloop van natuurlijke besmetting in het veld

De resultaten in de veldproef zijn vergelijkbaar met die van de besmette planten in de tunnels. Vanwege de grote aantallen planten zijn van de voedingsbehandelingen alleen +P+CaCl₂ en de plantversterker met kaliumfosfiet meegenomen. De middelen Fenomenal, Ortiva en Ridomil gaven slechts twee weken een bescherming. De plantversterker gaf gedurende vijf weken een bescherming tegen meeldauw, daarna werden de planten toch besmet. Ook in deze proef waren planten die behandeld waren met de plantversterker kleiner en produceerden minder bloemen (Figuur 5.7 en 5.8).

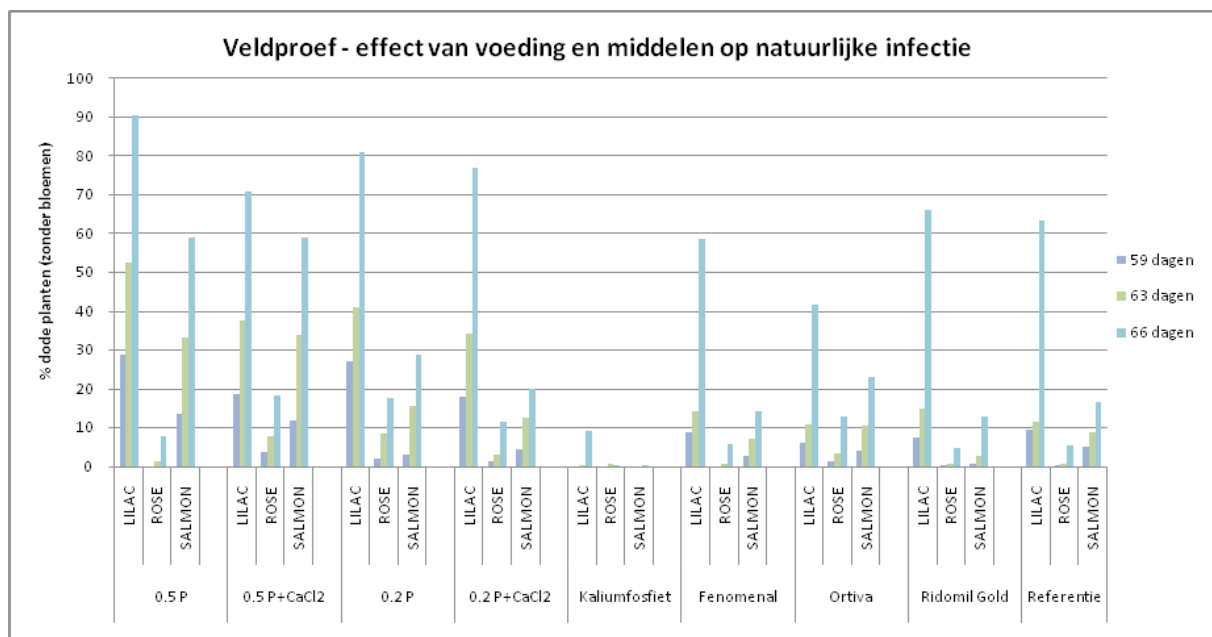


Figuur 5.7: Gemiddelde plantgrootte (cm) van *Impatiens* in de veldproef (17 juni 2009). Verschillende letters geven betrouwbare verschillen aan tussen behandelingen ($P < 0.05$).



Figuur 5.8: Geschatte aantal bloemen per plant in de veldproef (17 juli 2009). Verschillende letters geven betrouwbare verschillen aan tussen behandelingen ($P < 0.05$).

Het veld raakte via natuurlijke weg besmet gedurende de eerste helft van juli 2009. Eind juli waren alle planten van alle behandelingen in meer of mindere mate besmet geraakt, te zien aan de witte sporen op het onderkant van de bladeren. Omdat er qua besmettingsgraad geen grote verschillen waren, is het aantal planten gemeten dat alle bloemen verloren had, en zich dus in de eindfase van de infectie bevonden. Hieruit kwam duidelijk naar voren dat de planten die met kaliumfosfiet behandeld waren een langdurig, positief effect lieten zien in het veld (Figuren 5.9 en 5.10).



Figuur 5.9: Verloop van natuurlijke infectie in het veld. Aangezien alle planten van alle behandelingen geïnfecteerd waren, zijn verschillen bepaald tussen de behandelingen door planten te tellen die alle bloemen hadden verloren. De drie tellingen zijn 59, 63 en 66 dagen na het uitplanten uitgevoerd.



Figuur 5.10: Verschil tussen planten in de veldproef die wel (links) of geen (rechts) kaliumfosfiet behandeling gehad hebben.

6 Vervolgproef met Fy-taal

6.1 Doel

In juli is een vervolgproef gestart met *Impatiens walleriana* om te onderzoeken hoe de toedieningswijze van een plantversterker kaliumfosfiet is te verbeteren en welke dosering de minst nadelige gevolgen voor de plantkwaliteit heeft, maar nog wel effectieve bescherming biedt tegen valse meeldauw.

6.2 Opzet en uitvoering

In de vervolgproef zijn drie variëteiten van *I. walleriana* getoetst: 'Dizire stardust', 'Dizere salmon' en 'Dizire red'. Toediening van de plantversterker gebeurde door 0,1: 0,5: 1,0 en 2,0% Fy-taal op het blad te spuiten met en zonder nabehandeling van water na een half uur en door toevoeging aan de pot.

Een eerste inoculatie op 6 augustus resulteerde niet in symptomen van valse meeldauw. Waarschijnlijk omdat de omstandigheden nog niet vochtig genoeg waren. De tweede inoculatie op 25 september resulteerde pas in symptomen nadat de relatieve vochtigheid verhoogd was van 92% naar 100% gedurende drie dagen. De behandelingen met kaliumfosfiet zijn bij de tweede inoculatie niet herhaald.

6.3 Resultaten

Vier weken na de tweede inoculatie zijn met name de controleplanten van Dizere salmon ernstig aangetast door valse meeldauw (Figuur 6.1). Behandeling met 0,1% plantversterker gaf bij dezelfde cultivar op een paar planten toch nog een lichte aantasting van een of twee blaadjes met sporulatie. Echter op de planten die met 0,5 en 1,0% plantversterker behandeld waren, groeide na vijf weken nog steeds geen valse meeldauw. In deze proef waarbij de plantversterker is aangegoten op de pot zijn geen schadelijke bijwerkingen van het middel waargenomen. In de behandelingen waarbij de plantversterker op de bladeren werd gespoten, was er alleen lichte bladschade als er niet was nabehandeld met water.



Figuur 6.1: *Impatiens* planten van Dizere salmon die behandeld waren met de plantversterker (0,5 en 1,0%) vertoonden vijf weken na besmetting nog geen infectie met valse meeldauw (rechts), terwijl de onbehandelde controleplanten die eveneens besmet waren sterke ziektesymptomen vertoonden, zoals groeiremming en verlies van bladeren en bloemen.

6.4 Moleculaire detectie valse meeldauw

Een aantal planten zijn tevens onderzocht op de aanwezigheid van latente infecties van valse meeldauw. Gedurende de proefperiode van vijf weken bleven de planten zonder de aanwezigheid van wit pluis op de bladeren. Onderstaande tabel laat zien dat planten die nog niet overgaan tot sporulerende kolonies van valse meeldauw wel latent geïnfecteerd kunnen zijn. De behandeling met plantversterker voorkomt dus kennelijk niet dat de plant geïnfecteerd raakt, maar remt wel de ontwikkeling van de schimmel zodanig dat het wit op de onderkant van de bladeren niet snel ontwikkeld wordt.

Primer combinatie	Specificiteit	Grootte (bp)
1 - POBD-F + POBDn-R	<i>Plasmopara obducens</i>	325
2 - NL1 + NL4	Plant (DNA controle)	630

Cultivar	Kaliumfosfiet	Uitslag	Sporulatie op blad
zalm	controle	besmet	ja
wzalm	0%	besmet	heel licht
zalm	0,1%	besmet	nee
zalm	1%	besmet	nee
rood	0%	licht besmet	nee
rood	1%	ziektevrij	nee
rood/wit	0%	zeer licht besmet	nee
rood/wit	1%	besmet	nee

Figuur 6.2: Aanwezigheid van latente infectie in planten die geen zichtbare symptomen hadden.

7 Discussie & Conclusie

7.1 Moleculaire detectie van latente infectie

Door Syngenta Seeds is een specifieke primer voor *Plasmopara obducens* ontwikkeld. Hiermee is het mogelijk geworden om in plantmateriaal al in een vroeg stadium de aanwezigheid van deze valse meeldauwsoort aan te tonen. Tijdens de teelt en bij de consument zijn veel cultivars van *Impatiens walleriana* al wel besmet door een latente aanwezigheid, maar deze zijn nog niet altijd zichtbaar in de vorm van wit schimmelpluis. Dit komt pas tot uiting als er voldoende vocht tussen het gewas aanwezig is om de sporen te laten kiemen (bijvoorbeeld in een periode met veel regen).

In een volgend onderzoek kan van deze moleculaire techniek gebruik gemaakt worden om een duidelijker onderscheid te maken tussen behandelingen die voorkomen dat de ziekteverwekker de plant infecteert en tussen behandelingen die de groei van de ziekteverwekker in de plant vertragen waardoor deze minder snel symptomen geeft. In dit onderzoek gaven de behandelingen met kaliumfosfiet bijvoorbeeld een verhoogde weerstand waardoor de groei van valse meeldauw in de plant vertraagd werd, maar infectie werd niet voorkomen. Hierdoor blijft het belangrijk om ook aan de algemene preventieve maatregelen te werken zoals een lage plantdichtheid, voldoende bemesting (fosfaat), verwijderen van ziek plantmateriaal om de ziektedruk laag te houden en bovenal om te zorgen voor een droog gewas.

In de praktijk liggen er met deze specifieke primer voor *P. obducens* kansen voor het screenen van uitgangsmateriaal zoals stekken. Eén van de maatregelen die Syngenta komend seizoen zal nemen is om een begin te maken met het toetsen van hun startersmateriaal van *I. walleriana* om besmetting op te sporen.

7.2 Cruciale rol voor fosfaat en fosfiet

Dit onderzoek heeft opnieuw het belang van een goede bemesting aangetoond in de strijd tegen valse meeldauw. Verlaging van het fosfaatgehalte naar 0,2 mmol bleek meer uitval te geven dan het normale fosfaatiniveau. Van fosfaat is in de literatuur ook bekend dat het een belangrijke rol speelt bij allerlei plantprocessen die de plant weerbaarder maken tegen ziekteverwekkers en met name die in de groep van Oömyceten zitten (*Pythium*, *Phytophthora* en diverse valse meeldauwsoorten, zoals *Bremia* en *Peronospora*). Verhoging van het fosfaatgehalte boven 0,5 mmol is vanuit vermindering van gevoeligheid voor ziektes wenselijk, maar vanuit milieu-oogpunt niet. In de loop der jaren is er al een stevige discussie gevoerd om het fosfaatgehalte onder de 1 mmol te krijgen. Wellicht dat extra bladbemesting van fosfaat hier nog een rol in kan spelen, omdat dit minder belastend is voor het milieu (Reuveni & Reuveni 1998).

Calcium kan een rol spelen bij het openen en sluiten van de huidmondjes waardoor valse meeldauw de plant binnendringt, maar in deze proeven bleek het aan- of afwezig zijn van calciumchloride geen belangrijke factor te zijn.

Kaliumfosfiet werd in de proeven als directe concentratie van het middel Fy-taal toegediend. Hiervan staat slechts op het etiket vermeld dat het P_2O_5 en K_2O bevat. De overige stoffen en het gehalte aan PO_3^{3-} zijn echter niet bekend. Hierdoor is het moeilijk inschatten hoeveel fosfiet er nu werkelijk gegeven is aan de behandelde planten en welk deel van het effect wordt veroorzaakt door het gehalte fosfaat in plaats van fosfiet.

In de proeven is wel duidelijk aangetoond dat *Impatiens* planten die preventief een behandeling met Fy-taal kregen langer weerbaar werden tegen een infectie van valse meeldauw in vergelijking met de onbehandelde besmette controleplanten en planten die behandeld waren met systemische fungiciden zoals Ridomil Gold, Ortiva en Fenomenal (heeft nog geen toelating). De duur van de bescherming varieerde bij de verschillende proeven tussen 3-5 weken.

Van Ridomil Gold is ook bekend dat het afweermechanisme van een plant kan verhogen, maar éénmalige toediening blijkt een geringer effect te hebben dan een éénmalige dosering met kaliumfosfiet. In de literatuur is van het product Phytogard (K_2HPO_3) eveneens beschreven dat fosfieten slechts eenmaal bij de wortel gedoseerd hoeven te worden voor een langdurige werking (> 30 dagen) tegen valse meeldauw in bloemkool (Bécot et al. 2000). Toediening van Phytogard aan de bladeren gaf een veel kortere werking (tenminste 15 dagen) en slechts een zwakke inductie van β -1,3 glucanase activiteit en PR2-eiwitten die eveneens een rol spelen in de plantweerstand.

Bij toediening van kaliumfosfiet aan de wortels kan de inwerkingsduur ook nog van belang zijn. In het onderzoek van Bécot et al. (2000) werden de wortels wel een hele nacht in de fosfiet-oplossing gehouden om zoveel mogelijk de opname van fosfiet-ionen te bevorderen. Bij toediening van kaliumfosfiet is het dus van belang dat er zo min mogelijk uitspoeling plaatsvindt. Laat de wortels daarvoor eerst een beetje interen, zodat ze daarna goed het middel kunnen opnemen.

De timing van een toepassing van kaliumfosfiet aan de bladeren is eveneens erg belangrijk. Zodra planten namelijk knoppen hebben gevormd, laten ze deze vallen. Hiervoor is het aan te bevelen om alleen een bladtoepassing te geven aan jonge plantstadia, voordat ze knoppen hebben gevormd. Bij de oudere plantstadia met bloemen is het aan te raden om over te gaan op een worteltoepassing.

7.3 Is verbetering van effectiviteit middelen mogelijk?

In het huidige onderzoek zijn de fungiciden en plantversterker enkelvoudig toegediend zonder deze bij te mengen met andere middelen. Dit heeft als voordeel dat de rechtstreekse fytotoxische effecten van de middelen beoordeeld kunnen worden. Aan de andere kant kunnen combinaties van middelen elkaar in de werking versterken. Hiervan zijn een aantal voorbeelden bekend in de literatuur.

Een hogere effectiviteit van fosfaatopname via het blad is bijvoorbeeld te verwachten wanneer Tween 20 aan de oplossing worden toegevoegd. Dit verbetert de hechting van fosfaat-ionen aan het bladoppervlak en het binnendringen van de huidmondjes (Reuveni et al. 1998). In onze proeven is de kaliumfosfiet zonder extra toevoegingen toegepast wat misschien een kortere werkingsduur heeft gegeven dan mogelijk is.

Door fosfaattoedieningen af te wisselen met fungicide-behandelingen is soms een effectievere werking mogelijk dan met alleen fosfaatbehandeling zoals beschreven is met de behandeling van echte meeldauw op de bloemen van mango en de vruchten van nectarines (Reuveni en Reuveni 1995).

Ook zijn combinaties denkbaar tussen fosfiettoediening aan de wortels en fosfaatbehandelingen als bladbemester.

7.4 Algemene preventieve maatregelen blijven noodzakelijk

Valse meeldauw is typisch een klimaatziekte die alleen toeslaat als de omstandigheden gunstig zijn. Belangrijkste voorwaarde voor kieming is vocht. Dit is vocht in de omgeving en op het gewas. Minimaal 4-5 uren aaneengesloten periode van condens is noodzakelijk voor kieming. Maatregelen die tijdens de teelt een vochtig microklimaat verminderen zijn: lage plantdichtheid, rustige watergeefstrategie (niet te snel de planten willen bevochtigen vlak voor aflevering) en een lage luchtvochtigheid (< 85%).

Hygiënische maatregelen zijn eveneens van groot belang. Start met schoon uitgangsmateriaal en verwijder zieke planten meteen. Dit betreft ook wilde planten die tot de Impatiens familie horen, zoals groot en klein springzaad en reuzenbalsemien. Als een perceel besmet is geraakt met zieke planten, dient deze eerst gestoomd te worden voordat er een nieuwe teelt op kan beginnen. Ook afdekken van afvalhopen is belangrijk om de sporendruk in de lucht laag te houden. Oösporen kunnen in resten plantmateriaal en in grond meerdere jaren blijven overleven. Tenslotte blijft een goede voeding belangrijk, omdat valse meeldauw verzwakte planten eerder infecteert dan sterke gezonde planten.

7.5 Conclusie

Door Syngenta Seeds is een specifieke primer voor *Plasmopara obducens* ontwikkeld. Hiermee is het mogelijk geworden om in plantmateriaal van *Impatiens walleriana* al in een vroeg stadium de aanwezigheid van deze valse meeldauwsoort aan te tonen. Tevens is aangetoond dat rustsporen die aanwezig zijn in gedroogd stengelmateriaal (en achterblijven in de grond) zaailingen kunnen aantasten en dus een belangrijke infectiebron kunnen zijn in perken en tuinen.

Een goede bemesting blijft belangrijk in de strijd tegen valse meeldauw. Verlaging van het fosfaatgehalte naar 0,2 mmol blijkt meer uitval te geven dan het normale fosfaatsniveau van 0,5 mmol, terwijl toediening van calciumchloride geen verschil uitmaakt. Systemische fungiciden zoals Ridomil Gold, Ortiva en Fenomenal (heeft nog geen toelating) geven slechts één-twee weken bescherming afhankelijk van plantdichtheid, sporendruk en cultivar. Meegeven van een plantversterker met kaliumfosfiet (0,5 en 1,0%) tijdens de opkweekfase lijkt een effectieve methode om het afweersysteem van planten van *I. walleriana* gedurende drie-vijf weken te versterken, zodat deze ook in de fase bij de consument weerbaarder is tegen infectie door valse meeldauw. Doseran van het middel op de pot is de veiligste methode die de minste kans op gewasschade geeft en een nawerking heeft van drie-vijf weken. Bij dosering van het middel bovenlangs is een lichte nabehandeling met water noodzakelijk en de werkingsduur is korter ten opzichte van een wortelbehandeling.

Algemene maatregelen op het gebied van vochtbeheersing, hygiënische maatregelen en een goede bemesting blijven belangrijk om infectie door valse meeldauw te voorkomen.

8 Aanbevelingen

8.1 Aanbevelingen voor telers

- Begin met schoon uitgangsmateriaal en schone grond. Laat het eventueel controleren op latente infectie.
- Zorg voor een goede voeding met voldoende fosfaatbemesting (0,5-1,0 mmol) en bodem EC > 1.0.
- Hou de plantdichtheid laag, zodat er voldoende ventilatie tussen de planten mogelijk is of ventileer voldoende boven het gewas.
- Hou de relatieve luchtvochtigheid laag (< 85%) en zorg dat het gewas niet langer dan 3 uur achtereen vochtig blijft.
- Verwijder ziek plantmateriaal meteen in een afgesloten zak.
- Dek afvalhopen af, zodat sporendruk in de omgeving laag blijft.
- Geef indien mogelijk onderdoor water in plaats van bovenlangs.
- Doseer een plantversterker met kaliumfosfaat bij de wortels (0,5 of 1,0% Fy-taal) in het opkweekstadium vlak voor aflevering. Bij dosering van het middel op het gewas is licht naspoelen met water noodzakelijk om schade aan het gewas te voorkomen. Bovendien voorkomt dosering aan planten in een jong stadium verlies van bloemknoppen. Hou rekening met twee weken hersteltijd.
- Wissel het gebruik van fungiciden af om resistentie-ontwikkeling te voorkomen.

8.2 Aanbevelingen voor verder onderzoek

- De gecombineerde effecten van plantversterkers, chemische middelen en voeding kunnen elkaar versterken, maar hier is vervolgonderzoek voor nodig.
- Een voorstel hiervoor is in december 2009 bij het Productschap Tuinbouw ingediend en door de PAC en sectorcommissie groenten en fruit positief beoordeeld. WUR Glastuinbouw en Syngenta Seeds bv. zullen in 2010 verder gaan met vervolgonderzoek naar het beheersen van valse meeldauw in *Impatiens walleriana*.

Literatuur

Anoniem.

Downy mildew on Impatiens (2006). Plant Health. Defra, UK

Anoniem.

Downy mildew. <http://www.goldsmithseeds.com/pdf/IMPATIENS.pdf>

Anoniem.

Plasmopara obducens (a downy mildew of Impatiens)

http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/deleted%20files/fungi/Plasmopara_obducens.doc

Bécot, S., E. Pajot, D.L. Corre, C. Monot and D. Silué (2000)

Phytogard® (K₂HPO₃) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew in crucifers.
Crop Protection 19: 417-425.

Castalanelli, C. (2008)

Downy mildew of Impatiens. Department of Agriculture and Food. Garden note 321.

Cunnington, J.H., R. Aldaoud, M. Loh. W.S. Washington en G. Irvine (2008).

First record of *Plasmopara obducens* (downy mildew) on impatiens in Australia.
Plant Pathology 57 (2), 371.

De Rocha, A.B. & R. Hammerschmidt (2005)

History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops.
Horttechnology 15: 518-529.

Downy mildew of Impatiens caused by *Plasmopara obducens* (2006).

State of Victoria. Department of Primary Industries. Exotic Pest information, p. 1-2.

Hausbeck, M. K. Professor and Extension Specialist,

Department of Plant Pathology, Michigan State University.

Lane, C.R., P.A. Beales, T.M. O'Neill, G.M. McPherson, A.R. Finlay, J.E. David, O. Constantinescu and B. Henricot (2005).

First report of impatiens downy mildew (*Plasmopara obducens*) in the UK Plant Pathology 54 (2), 243.

McPherson, G.M. (2008)

Downy mildew devastates Impatiens.

<http://www.stc-nyorks.co.uk/Documents/Latestnews/Downy%20Mildew%20Devastates%20Impatiens%201%2012%2008.pdf>

Nemestothy, G.N. & D.I. Guest (1990)

Stimulation of phenylalanine ammonia lyase activity, ethylene biosynthesis and phytoalexin accumulation in tobacco infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* following treatment with fosetyl-Al.
Physiological and Molecular Plant Pathology 37: 207-219.

- Pajot, E.D. (2001).
Phytogard and DL-beta amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*).
European Journal of Plant Pathology 107, 861-869.
- Reignault, Ph., D. Walters (2007).
Topical application of inducers for disease control. In: Induced resistance for plant defense.
D.Walters, A. Newton, G. Lyon (eds.) Blackwall Publishing.
- Reuveni, M. and R. Reuveni (1995)
Efficacy of foliar sprays of phosphates in controlling powdery mildews in field-grown nectarine, mango trees and grapevines. Crop Protection 14:311-314.
- Reuveni, M., V. Agapov and R. Reuveni (1997)
A foliar spray of micronutrient solutions induces local and systemic protection against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) in cucumber plants. European Journal of Plant Pathology 103:581-588.
- Reuveni, R. and M. Reuveni (1998)
Foliar-fertilized therapy – a concept in integrated pest management. Crop Protection 17:111-118.
- Sharathchandra, R.G., S. Niranjan Raj, N.P. Shetty, K.N. Amrutesh and H. Shekar Shetty (2004).
A chitosan formulation Alexatm induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl gierst. Crop Protection 23, 881-888.
- Van der Berg, G. (2001).
Kaliumfosfiet is vóór alles een plantversterker. De boomkwekerij 22: 12-13.
- Van der Wolf, J.M & S.P.C. de Groot (2005).
Natuurlijke middelen die de weerstand van planten kunnen verhogen. PRI Nota 372.
- Van der Krieken, W., H.J. Bouwmeester en A.J. Haverkort (1995).
Effect of elicitors on plant defense and plant development. Nota 45 , AB-DLO
- Wegulo, S.N., S.T. Koike, M. Vilchez and P. Sanchez (2004).
First report of downy mildew caused by *Plasmopara obducens* on Impatiens in California.
Plant Disease 88(8), 909.
- Van der Wolf, J. M & S.P.C. Groot (2005)
Natuurlijke middelen die de weerstand van planten verhogen. PRI B.V. Wageningen, Nota 372. p. 28.

