

3.1.3

GNO's: "Geeft Nieuwe Oplossing" of "Geen Nuttig Onderzoek"

W.J. de Kogel

Plant Research International B.V., Postbus 16,
6700 AA Wageningen

GNO's, Gewasbeschermingsmiddelen van Natuurlijke Oorsprong is een verzamelnaam voor een diverse groep gewasbeschermingsmiddelen. Volgens het College voor de Toelating van Bestrijdingsmiddelen vallen hieronder: micro-organismen, feromonen, plantversterkers, plantaardige gewasbeschermingsmiddelen (plantextracten), mineralen en natuurlijke gassen.

Aan de hand van een aantal voorbeelden uit lopend onderzoek, o.a. gesubsidieerd door het LNV gewasbeschermingsprogramma 397 en het Productschap voor de Tuinbouw, zal een aantal potentiële GNO's de revue passeren.

Vaak wordt gesteld dat deze middelen een lager risicoprofiel en een hogere specificiteit dan chemische gewasbeschermingsmiddelen hebben. Dat is echter niet per definitie zo, vandaar dat het nodig is ook het risico van GNO's te beoordelen alvorens deze toegelaten kunnen worden als gewasbeschermingsmiddel. Deze toelating als gewasbeschermingsmiddel is in de praktijk een belangrijke hindernis voor het op de markt komen van GNO's. Hoge kosten in relatie tot een relatief kleine markt en de onvoorspelbaarheid van het toelatingsproces worden vaak gehoord als verklaringen waarom er maar zo weinig GNO's op de markt komen. Als al het onderzoek aan GNO's maar zo sporadisch in producten resulteert, kan dat leiden tot de stelling: "GNO: Geen Nuttig Onderzoek".

Er zijn echter verschillende ontwikkelingen gaande, zowel op het gebied van regelgeving/toelating als in het onderzoek die hier verandering in kunnen brengen. Zo zijn er de initiatieven "GENOEG Breed" en "BIOSUPPORT" die door het bundelen van kennis, het bijeenbrengen van marktpartijen en het begeleiden en subsidiëren van registraties, GNO's naar de markt trachten te begeleiden.

Een voorbeeld van een ontwikkeling op het gebied van regelgeving in de EU ligt in de toepassings sfeer van feromonen en andere lokstoffen. Tot voor kort vielen deze stoffen onder de bestrijdingsmiddelenwet wanneer ze in combinatie met pesticiden toegepast werden (Lure and Kill, attracticiden). Dit betekende dat zowel het pesticide als de lokstof onder de bestrijdingsmiddelenwet vielen. Het huidige standpunt van de EU is dat bij een combinatie van lokstof (feromon) en pesticide uitsluitend nog het pesticide on-

der de bestrijdingsmiddelenwet valt. Hierdoor ontstaat er een scala aan mogelijkheden om feromonen en andere lokstoffen in te zetten om effectieve toepassingen te ontwerpen waarbij het insect naar het pesticide wordt gelokt in plaats van dat het pesticide naar het insect moet worden gebracht. Mogelijk zijn hier enorme besparingen in middelengebruik mee te bewerkstelligen.

Ontwikkelingen in het onderzoek die de kansen vergroten dat GNO's hun weg naar de markt zullen vinden liggen vooral in de ontwerpsfeer en de voorscreening van potentiële GNO's. Onderzoekers zijn er zich de laatste jaren steeds meer bewust van geworden dat GNO's naast een bepaalde biologische activiteit op het doelorganisme ook aan andere criteria moeten voldoen om de marktkansen van een dergelijk middel te vergroten. Het gaat hier bijvoorbeeld om criteria met betrekking tot kweekbaarheid/productie of toxiciteit voor niet-doelorganismen. In de lezing zullen voorbeelden worden gegeven hoe men deze factoren al in een vroeg stadium in het onderzoek kan betrekken.

Al deze inspanningen zijn er op gericht om voldoende te kunnen oogsten van het onderzoek aan GNO's. Als na de onderzoeksfase ook de implementatie slaagt, kunnen we zeggen: "GNO: Geeft Nieuwe Oplossingen".

3.1.4

Perspectieven voor screening op resistentie tegen Botrytis zonder infectietoets

J.A.L. van Kan

Wageningen Universiteit, Laboratorium voor Fytopathologie,
Binnenhaven 5, 6709 PD Wageningen

Botrytis cinerea veroorzaakt grote schade in vele gewassen, zowel tijdens de teelt als in geoogste producten. De schade aan Nederlandse land- en tuinbouwproducten loopt jaarlijks waarschijnlijk in de miljarden Euro's. De mate van aantasting en schade wordt bepaald door vele factoren. Algemeen wordt verondersteld dat hoge luchtvochtigheid tijdens teelt, opslag of transport, een belangrijke toename van botrytis aantasting veroorzaakt. Ook genetische factoren hebben invloed op vatbaarheid van de plant. Er is geen volledige resistentie aangetoond, maar het wordt algemeen aangenomen dat cultivars in diverse gewassen verschillen kunnen vertonen in gevoeligheid voor botrytis, die genetisch bepaald worden. Veredeling op resistentie tegen botrytis wordt echter bemoeilijkt door gebrek aan een kwantitatieve ziekte-toets om vatbaarheid van plantengenotypes te verge-

lijken. Seizoens- en omgevingsfactoren hebben een grote (negatieve) invloed op de reproduceerbaarheid van ziekte-toetsen, die het moeilijk maakt om *Botrytis*-resistente genotypes te identificeren. Doelstelling van het onderzoek in ons laboratorium is om fundamenteel inzicht te verkrijgen in het infectieproces. Deze kennis kan benut worden om nieuwe bestrijdingsmethoden te ontwikkelen.

Botrytis is een necrotrofe schimmel, die waardplantcellen eerst doodt alvorens ze te koloniseren. Vanuit een primaire lesie groeit de schimmel uit in omringend weefsel en veroorzaakt daarbij rot. Twee factoren zijn voor *Botrytis* essentieel voor succesvolle infectie: 1. het vermogen om plantencellen te doden, en 2. het vermogen om plantenweefsel af te breken en te benutten voor eigen groei. Recent zijn twee typen schimmeleiwitten onderzocht die een belangrijke rol spelen in deze processen. Van het eerste type produceert *Botrytis* twee varianten. Beide eiwitten hebben geen (bekende) enzymactiviteit maar vertoont een sterk fytoxische werking. Toediening van eiwitoplossing aan bladweefsel leidt tot celdood in het weefsel in 24-48 uur, zichtbaar als een bruine, droge necrotische zone. Het werkingsmechanisme is nog niet opgehelderd. Het tweede type eiwit is een enzym dat pectine kan afbreken, en daardoor celwandafbraak en weefseldesintegratie veroorzaakt. Pectine afbraak vergemakkelijkt schimmelgroei door de celwanden in het weefsel en levert de schimmel voedingsstoffen.

Al deze eiwitten kunnen in vitro geproduceerd worden d.m.v. expressie in een gist. De eiwitten kunnen worden gezuiverd en vervolgens toegediend aan planten, door injectie in blad met een injectiespuit of door stengels of bladstelen in een buisje met eiwitoplossing te plaatsen. De fytoxische eiwitten veroorzaken celdood in blad van *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* en tuinboon (*Vicia faba*). Andere plantensoorten worden momenteel getest. Het pectinase kan in tuinboon al binnen vijf minuten volledige weefseldesintegratie veroorzaken, leidend tot afsterven van de geïnfilteerde weefselzone. In andere planten is de reactie op het pectinase langzamer maar uiteindelijk even duidelijk.

Onze hypothese is dat plantengenotypes die (volledige of gedeeltelijke) resistentie bezitten tegen de werking van deze eiwitten, minder vatbaar zullen zijn voor botrytis. Resistentie kan zich voordoen in het stadium van primaire lesievorming (celdood) of van lesie-uitgroei (celwand- en wefselafbraak). De beschikbaarheid van deze eiwitten biedt perspectieven voor screening van planten op botrytis resistentie zonder dat daarbij gebruik hoeft te worden gemaakt van ziekte-toetsen. Door een concentratiereeks eiwit te gebruiken kan een LD₅₀ bepaald worden. Vergelijking van de LD₅₀ waarden van verschillende genotypes kan een maat geven voor botrytis resistentie. Hoewel er resistentiemechanismen tegen botrytis

kunnen zijn die met deze screeningsmethode over het hoofd worden gezien, zou het voordeel van een simpel uitvoerbare én interpreteerbare toets met eiwitten de nadelen kunnen overtreffen. Kleine porties van beide eiwitten kunnen onder voorwaarden beschikbaar worden gesteld aan geïnteresseerde partijen voor haalbaarheidsstudies.

Het lopende onderzoek richt zich op diverse aspecten: specificiteit op meerdere plantensoorten, specificiteit op verschillende genotypes binnen één plantensoort, werkingsmechanisme, remming van werking.

Dit onderzoek wordt gefinancierd door Technologiestichting STW en Productschap Tuinbouw.

3.2 Detectie en identificatie technieken

3.2.1 Toepassingen van het pUMA systeem voor detectie van meerdere plantpathogenen in grond, water en lucht via één enkele toets

Peter Bonants, Marianna Szemes, Arjen Speksnijder, Carolien Zijlstra en Cor Schoen.

Plant Research International BV, Wageningen

Het is belangrijk om de aanwezigheid van schadelijke organismen in voedsel, water, grond en lucht of elk ander substraat vast te stellen voor de gezondheid en voor veiligheidsmanagement. Vele verschillende moleculaire technieken zijn voor de detectie van pathogenen beschreven, elk met zijn eigen protocol, evenals apparatuur, chemische reagentia en bovendien benodigde expertise. Als verschillende pathogenen tegelijkertijd moeten worden gedetecteerd, wordt deze benadering erg kostbaar. De (multiplicity) veelheid van beschikbare bepalingen voor detectie van een bepaald pathogeen leidt tot een gebrek aan consistentie tussen de diverse testlaboratoria in Europa en staat standaardisatie in de weg. Daarom wordt momenteel veel energie gestoken in het ontwikkelen van zgn multiplex testen: het tegelijkertijd detecteren van meerdere targets (pathogenen) in één monster. Micro-array technologie, waarin duizenden verschillende oligo's of eiwitten gespot kunnen worden op een vierkante cm, maakt het mogelijk dat in hetzelfde