



# Sierteelt in de Biobased Economy

Screening van siergewasextracten op werking voor de plantgezondheid en de farmacie

Eric Poot<sup>1</sup>, Marieke van der Staaij<sup>1</sup>, Jantineke Hofland<sup>1</sup>, Ric de Vos<sup>2</sup>, Henri Korthout<sup>3</sup> en Annelies Schulte<sup>4</sup>

Rapport GTB-1387

1. Wageningen UR Glastuinbouw, 2. Wageningen UR BioScience, 3. Fytagoras, 4. Explant Technologies



## **Referaat**

In het kader van de Topsector Tuinbouw & Uitgangsmaterialen PPS "Sierteelt in de Biobased Economy", hebben Royal FloraHolland, Kenniscentrum Plantenstoffen, Wageningen UR Glastuinbouw, Wageningen UR Bioscience, Fytagogas en Prisna onderzoek gedaan naar de perspectieven van plantenextracten en -stoffen uit siergewassen als gewasbeschermingsmiddel, als plantversterker en als middel tegen obesitas. De nadruk lag op de effectiviteit van plantenextracten tegen de belangrijkste ziekten en plagen in de glastuinbouw. Er zijn een aantal extracten gevonden met werking tegen meeldauw, botrytis, bladluis, spint en trips. Van de extracten zijn metaboliëprofielen gemaakt met LCMS. In een oriënterende screening zijn enkele plantenextracten gevonden met potentiële werking tegen obesitas.

## **Abstract**

The public-private funded project "Ornamentals in the Biobased Economy" was conducted by Royal FloraHolland, Kenniscentrum Plantenstoffen, Wageningen UR, Fytagogas and Prisna. In this project, bioactivity in plant extracts against the most important pests and diseases in greenhouse cultivation were tested. In bioassays, extracts with bioactivity against powdery mildew, botrytis, aphids, spider mite and thrips were found. With LCMS, metabolic profiles of the extracts were generated. Furthermore explorative experiments with plant extracts for crop resilience were conducted, and also plant extracts were tested in a bioassay for fat metabolism in obesitas.

Deze activiteit is mede gefinancierd uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en Innovatie (TKI's) van het ministerie van Economische Zaken, TKI Tuinbouw.

## **Rapportgegevens**

Rapport GTB-1387

Projectnummer: 3742190901

PT nummer: 14968

T&U nummer: KV1310-083

## **Disclaimer**

© 2016 Wageningen UR Glastuinbouw (instituut binnen de rechtspersoon Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek), Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk, Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk, T 0317 48 56 06, F 010 522 51 93, E [glastuinbouw@wur.nl](mailto:glastuinbouw@wur.nl), [www.wageningenUR.nl/glastuinbouw](http://www.wageningenUR.nl/glastuinbouw). Wageningen UR Glastuinbouw.

Wageningen UR Glastuinbouw aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

## **Adresgegevens**

### **Wageningen UR Glastuinbouw**

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 48 56 06

F +31 (0)10 522 51 93

# Inhoud

	<b>Woord vooraf</b>	<b>5</b>
	<b>Samenvatting</b>	<b>7</b>
<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>9</b>
	1.1 Toepassingsgebieden	9
	1.1.1 Gewasbescherming	10
	1.1.2 Plantversterking	10
	1.1.3 Farmacie	10
	1.2 Doel	10
	1.3 Projectorganisatie	11
<b>2</b>	<b>Aanpak</b>	<b>13</b>
	2.1 Literatuurstudie	13
	2.2 Verzamelen plantmateriaal	14
	2.3 Maken van extracten	14
	2.4 Biotoetsen gewasbescherming	14
	2.4.1 Ziekten en plagen	15
	2.4.2 Infecteren planten	15
	2.4.3 Bepaling effectieve dosering	15
	2.4.4 Waarnemingen	15
	2.4.5 Uitvoering proeven	17
	2.5 Biotoetsen plantweerbaarheid	18
	2.5.1 Test op snelle werking (besmetting na 3 weken)	19
	2.5.2 Gewasmetingen	20
	2.6 Analyse van de inhoudsstoffen	20
	2.7 Screening werking tegen obesitas	20
<b>3</b>	<b>Resultaten</b>	<b>23</b>
	3.1 Resultaten database studie	23
	3.2 Plantmateriaal	24
	3.3 Resultaten gewasbeschermingswerking	25
	3.4 Resultaten plantweerbaarheid	27
	3.5 Resultaten metabolietprofilering	30
	3.6 Resultaten screening extracten op werking tegen obesitas	32
<b>4</b>	<b>Conclusies en discussie</b>	<b>35</b>
	4.1 Gewasbescherming	35
	4.1.1 Gewaskeuze	35
	4.2 Plantversterking	37
	4.3 Metabolietanalyse	37
	4.4 Obesitas screening	37

<b>5</b>	<b>Aanbevelingen voor vervolg</b>	<b>39</b>
5.1	Gewasbescherming	39
5.1.1	High throughput bioassay	39
5.1.2	Formulering van het middel	39
5.1.3	Businessmodel	40
5.2	Plantversterking	40
5.3	Obesitas	40
	<b>Literatuur</b>	<b>41</b>
	<b>Bijlage 1 Matching bioactieve extracten met geslachtenlijst van de extractenbibliotheek</b>	<b>43</b>
	<b>Bijlage 2 Klimaatgegevens gewasbeschermingstesten</b>	<b>45</b>

# Woord vooraf

Royal FloraHolland gelooft in de toegevoegde waarde van de biobased economy voor de sierteeltsector. Ze heeft in 2013 bij het Productschap Tuinbouw een subsidieaanvraag ingediend voor 'Business kansen voor de sierteelt in de biobased economy', en het PT heeft die aanvraag gehonoreerd. Royal FloraHolland heeft het vorm gegeven in onder meer een onderzoek naar de potentiële waarde van plantenstoffen uit siergewassen, geteeld door de leden van Royal FloraHolland, voor verschillende hoogwaardige toepassingen. Samen met het Kenniscentrum Plantenstoffen heeft Royal FloraHolland aan Wageningen UR Glastuinbouw gevraagd om dit verder uit te werken. Royal FloraHolland, Kenniscentrum Plantenstoffen en Wageningen UR Glastuinbouw hebben het plan ingediend bij de Topsector Tuinbouw & Uitgangsmaterialen om er een Publiek-Privaat Samenwerkingsproject van te maken; de Topsector heeft dit gehonoreerd.

Het consortium van Royal FloraHolland, Kenniscentrum Plantenstoffen en Wageningen UR heeft samen met de bedrijven Fytagoras, Prisma en Explant Technologies het PPS project uitgevoerd. De nadruk is gelegd op het screenen van plantextracten op bioactieve werking tegen de belangrijkste ziekten en plagen in de tuinbouw. De resultaten hiervan liggen voor u in dit rapport.

We zetten als consortium in op een vervolgtraject van deze screeningsfase. We hebben er vertrouwen in dat er op afzienbare termijn gewasbeschermingsmiddelen op basis van plantenstoffen uit siergewassen op de markt zullen verschijnen. Het mes snijdt dan aan twee kanten: siertelers hebben er een business kans bij, en de tuinbouw krijgt nieuwe "groene middelen" ter beschikking om op duurzame wijze de risico's van ziekten en plagen te beheersen.

Bij deze willen we de telers bedanken, die plantmateriaal hebben opgekweekt en aangeleverd waarvan we extracten hebben gemaakt. Ook willen we de Extractenbibliotheek van het Kenniscentrum Plantenstoffen bedanken voor het aanleveren van een aantal extracten.

Rachid Maghnouji – Royal FloraHolland  
Jan Smits – Kenniscentrum Plantenstoffen  
Eric Poot – Wageningen UR Glastuinbouw





# Samenvatting

Planten bevatten tienduizenden plantenstoffen. Hiervan kunnen een aantal van waarde zijn voor koopkrachtige markten, zoals de farmacie, lifestyle en agrochemie. De Nederlandse sierteeltsector, met haar enorme diversiteit aan soorten en rassen, zou in principe een interessante leverancier van stoffen voor deze markten kunnen zijn. Hiermee kan nieuwe business worden gegenereerd.

Royal FloraHolland en Kenniscentrum Plantenstoffen hebben samen met Wageningen UR een publiek-privaat gefinancierd project binnen de Topsector Tuinbouw & Uitgangsmaterialen uitgevoerd. Hierin is, met hulp van Fytagoras en Prisna, onderzoek gedaan naar de perspectieven van plantenstoffen uit siergewassen als gewasbeschermingsmiddel. Gestart is met de resultaten van een literatuurstudie, die door Fytagoras al voor het Kenniscentrum Plantenstoffen was uitgevoerd. Op basis hiervan zijn planten geselecteerd, waarvan op basis van literatuur activiteit verwacht werd tegen de belangrijkste ziekten en plagen in de glastuinbouw: echte meeldauw, botrytis, bladluis, spint en trips. Tevens moesten deze siergewassen bij Royal FloraHolland aangevoerd worden. Verder is gekeken of deze plantextracten ook een effect hebben als plantversterker tegen echte meeldauw. Het voordeel van plantversterkers ten opzichte van gewasbeschermingsmiddelen is de eenvoudigere toelatingsprocedure.

Omdat we in het kader van dit project de beschikking hadden over voldoende plantextracten, en er een geschikte bioassay voorhanden was, zijn de extracten tevens gescreend op activiteit tegen obesitas. Van alle plantextracten zijn metabolietprofielen gemaakt. Na verdere opsplitsing van (geselecteerde) bioactieve plantextracten in combinatie met de uitkomsten van de biotoetsen van de verkregen fracties, zou achterhaald kunnen worden welke stoffen uiteindelijk verantwoordelijk zijn voor de gevonden bioactiviteit.

Er zijn van 20 soorten planten opgekweekt. Hiervan zijn in totaal 50 extracten gemaakt (oplossingen in ethanol). Belangrijke randvoorwaarde was dat de planten minstens de laatste drie maanden voor de oogst niet behandeld waren met chemische gewasbeschermingsmiddelen. Omdat dit voor niet alle gewenste siergewassen in de praktijk mogelijk was, is in een aantal gevallen jong materiaal doorgekweekt bij Wageningen UR Glastuinbouw in Bleiswijk. Vanwege praktische redenen is ook gebruik gemaakt van extracten die door het Kenniscentrum Plantenstoffen in het kader van de extractenbibliotheek zijn gemaakt.

De extracten zijn in de verschillende assays getoetst, waarbij vergelijkingen met controle behandelingen zijn gemaakt, voor de gewasbeschermingstoets bijvoorbeeld onbehandeld, chemische controle, water en ethanol. Door trial-and-error is bepaald, hoe sterk de extracten verdund konden worden om verschillende resultaten te kunnen scoren.

Uiteindelijk zijn voor alle schimmels, insecten en mijten extracten gevonden, die voor minstens 50% een gewasbeschermingseffect lieten zien. De chemische controles scoorden meestal 100% of net iets minder. Toch bieden de scores van meer dan 50% in dit stadium van het onderzoek perspectief voor nader onderzoek en ontwikkeling. Voor verder onderzoek zou een high throughput screeningsmethode een welkom alternatief zijn voor de in onderhavig project gebruikte klassieke bioassay. Qua timing bevindt het project zich in een fase dat de businesscase goed doordacht moet worden. We denken hierbij bijvoorbeeld aan een rol voor een organisatie op coöperatieve grondslag. Afhankelijk van de gekozen vorm, zouden telers, eventueel veredelaars, fabrikanten en leveranciers van groene gewasbeschermingsmiddelen nadrukkelijker bij het traject betrokken moeten worden.

De plantversterkingstoetsen lieten nauwelijks verschillen zien. Mogelijk speelt hierbij een rol dat de extracten op basis van ethanol zijn toegepast. In eventueel vervolgonderzoek zouden ook andere oplosmiddelen gebruikt moeten worden. Ook zou dan ook naar genexpressie en het ontstaan van beschermende eiwitten gekeken kunnen worden.

De screening op activiteit tegen obesitas (in het modelorganisme *C. elegans*) leverde drie extracten op met een positief effect (aanwijzingen dat de vetopbouw geremd werd), maar ook één met een opvallend negatief effect (bevorderde juist de vetopbouw). De resultaten uit deze oriënterende screening zouden in een breder opgezet onderzoeksprogramma meegenomen kunnen worden.





# 1 Inleiding

Vanuit de farmaceutische, agro(chemische), kleur-, geur- en smaakstoffen, cosmetica, voedings(supplementen) en de veevoeder(additieven) industrieën is er vraag naar nieuwe 'groene' moleculen met een door deze marktsegmenten gewenste werkzaamheid. Planten bevatten tienduizenden stoffen: een breed scala aan moleculen die als grondstof of bouwsteen kunnen dienen voor deze markten. De Nederlandse sierteelt, met duizenden verschillende soorten en cultivars, heeft daarmee een enorm potentieel aan mogelijk werkzame plantenstoffen voor deze marktsegmenten. Op basis van rassenkeuze, teeltoptimalisatie, gecontroleerde teelt en optimaal oogststadium (en op termijn veredeling), kan de tuinbouw – als leverancier van hoogwaardige plantenstoffen – een belangrijke partner worden van de bovengenoemde industrieën. Daarmee komt een voor de tuinbouw geheel nieuw business model in beeld 'de plant als producent van groene hoogwaardige grondstoffen'. Dit levert niet alleen nieuwe economische activiteit, maar draagt ook bij aan de duurzame ontwikkeling en maatschappelijke positionering van de Nederlandse glastuinbouwsector.



**Figuur 1** Potentiële nieuwe business voor plantenstoffen uit siergewassen.

## 1.1 Toepassingsgebieden

De potentiële toepassingen van plantenstoffen uit siergewassen zijn legio. De focus binnen dit onderzoek is door de opdrachtgevers gelegd op gewasgezondheid. Het mes snijdt hierbij aan twee kanten: enerzijds krijgt de sector nieuwe business voor een nieuwe markt, anderzijds gaat ze op een duurzame manier bijdragen aan de risicobeheersing en verduurzaming ten aanzien van ziekten en plagen in haar eigen voortbrengingsproces. De plantenstoffen kunnen gewonnen worden uit reststromen van de teeltbedrijven of later in de keten, maar eventueel kunnen planten ook speciaal voor deze toepassing worden geproduceerd. Naast gewasgezondheid hebben de opdrachtgevers om een bredere verkenning gevraagd naar bioactieve stoffen in de belangrijkste siergewassen voor toepassingen in hoogwaardige markten, met name de farmacie. In een aanpalend onderzoek is gekeken naar de mogelijkheden voor kleurstoffen. Zie Figuur 1 voor een schematische weergave.

### 1.1.1 Gewasbescherming

De focus van de studie ligt zoals gezegd op het zoeken naar potentieel interessante stoffen in sierteeltgewassen die actief zijn tegen de belangrijkste ziekten en plagen in de glastuinbouw. Planten bevatten van nature stoffen die hen beschermen tegen ziekten en plagen. Verschillende soorten maken daartoe verschillende stoffen aan, in verschillende gehalten, en met verschillende effectiviteit, maar ook binnen soorten zijn er verschillen. Zelfs per ras kunnen er verschillen tussen individuele planten optreden: tuinders kennen allemaal voorbeelden van een plant in hun kas die gezond blijft terwijl de rest eromheen wordt aangetast, of andersom.

De glastuinbouwsector staat voor de grote uitdaging om de meest duurzame tuinbouwsector ter wereld te worden. De sector streeft daarbij naar een vrijwel emissie- en residuvrije productie met een sterk verminderde afhankelijkheid van chemische gewasbeschermingsmiddelen. Op het gebied van gewasbescherming zijn er veel nationale en internationale ontwikkelingen en doelen. De belangrijkste daarvan zijn opgenomen en beschreven in 2<sup>e</sup> nota gewasbescherming 'Gezonde Groei, Duurzame Oogst' (Anonymous 2013). Daarnaast hebben zij te maken met een toename van bovenwettelijke eisen gestuurd vanuit de markt en neemt de maatschappelijk druk toe voor minder verbruik en emissie van (chemische) gewasbeschermingsmiddelen.

Binnen deze ontwikkeling op het terrein van de gewasgezondheid past de ontwikkeling en toepassing van "groene middelen". Om dit te versnellen, heeft het ministerie van Economische Zaken in 2014 een zogenaamde Green Deal afgesloten met LTO, Natuur & Milieu, Bionext, Artemis en Nefyto, NVWA en Ctgb (Dijksma 2014). Groene gewasbeschermingsmiddelen zijn middelen van natuurlijke oorsprong met een laag risico voor mens, dier, milieu en niet-doelwit organismen. Groene middelen passen bij uitstek in een integrale aanpak van gewasgezondheid. Hierbij staat een weerbare plant centraal, gekweekt in een weerbaar en robuust teeltsysteem, gebruikmakend van slimme en innovatieve technologieën en met inzet van een effectief en duurzaam middelenpakket.

### 1.1.2 Plantversterking

Recent kan het versterken van de weerbaarheid van de plant op grote belangstelling rekenen. Anders dan de klassieke gewasbeschermingsroute, waarbij ziekten en plagen via directe werking worden bestreden, werkt de route van plantweerbaarheid indirect: de plant wordt door een bepaalde interventie aangezet tot het verhogen van zijn eigen afweer tegen ziekten en plagen. Middelen die de plant aanzetten tot verhoogde weerbaarheid, worden ook wel plantversterkers genoemd. De toelating van plantversterkers is eenvoudiger dan die van gewasbeschermingsmiddelen. In dit project is ervoor gekozen om beide trajecten te verkennen.

### 1.1.3 Farmacie

In dit project staat de toepassing van plantenstoffen in het plantgezondheid domein centraal. Door voldoende plantextract van diverse siergewassen te verzamelen, is het mogelijk om ook de toepassing op een andere hoogwaardige markt te verkennen: als het ware "hoogwaardige bijvangst".

In overleg met de opdrachtgever is in de projectgroep besloten om de sierplantgewassen te screenen op activiteit tegen obesitas, gebruikmakend van het modelorganisme *Caenorhabditis elegans*. Obesitas is een volksgezondheidsprobleem met veel maatschappelijke aandacht. Middelen van plantaardige oorsprong die tegen effectief tegen obesitas kunnen worden ingezet, zouden de sierteeltsector niet alleen een economisch voordeel kunnen opleveren vanwege de nieuwe markt, maar zou ook het imago van de sector een sterk positieve impuls kunnen geven.

## 1.2 Doel

Ontwikkelen van groene middelen voor de gewasgezondheid uit plantextracten.

Belangrijke (kennis)vragen zijn onder meer:

- Uit welke commercieel belangrijke sierteeltgewassen kunnen extracten met bioactiviteit tegen belangrijke ziekten en plagen in de glastuinbouw gewonnen worden? Uit welke plantendelen?
- Welke (combinaties) van plantenstoffen zijn daarvoor verantwoordelijk?
- Kunnen plantextracten ook via indirecte werking door verhoging van de plantweerbaarheid een waardevolle functie in de plantgezondheid leveren?
- Welk traject moet doorlopen worden, voordat daadwerkelijke praktijktoepassing plaats kan vinden en business tot stand komt?

Nevendoel is het screenen van de verzamelde plantextracten op activiteit tegen obesitas.

## 1.3 Projectorganisatie

Het project is gefinancierd uit zowel publieke als (collectief) private middelen in het kader van de Topsector Tuinbouw en Uitgangsmaterialen. Het project is bij Tuinbouw & Uitgangsmaterialen bekend onder nummer KV 1309 083. De private middelen bestond zowel uit een cash bijdrage als een in-kind bijdrage. De cash bijdrage is afkomstig van Royal FloraHolland. Royal FloraHolland kon hiervoor een beroep doen op middelen van het voormalige Productschap Tuinbouw. Het Productschap Tuinbouw had deze middelen aan Royal FloraHolland toegekend onder PT-projectnummer 14968 ("Businesskansen voor de sierteelt in de biobased economy"); onderhavig project is een van de projecten waar Royal FloraHolland deze PT middelen aan besteed heeft. De private in-kind bijdrage is geleverd door Royal FloraHolland en Kenniscentrum Plantenstoffen. De publieke financiering was afkomstig uit de zogenaamde "TKI Toeslag". Binnen de programmering van de Topsector Tuinbouw & Uitgangsmaterialen is dit project begin 2015 onder de Koepel PPS "Nieuwe business met groene hoogwaardige plantenstoffen uit de tuinbouw" geplaatst.

Royal FloraHolland en Kenniscentrum Plantenstoffen hebben samen met de stichting DLO van Wageningen UR een consortium gevormd voor de uitvoering van dit project. Vanuit DLO hebben de businessunits Wageningen UR Glastuinbouw en Wageningen UR Bioscience, beide onderdeel van PPO/PRI, aan het project bijgedragen. Tevens zijn voor onderdelen derde partijen ingeschakeld: de bedrijven Fytagoras en Prisma. Er is een projectgroep geformeerd, waarin vertegenwoordigers van alle genoemde partijen participeerden. De projectleiding was in handen van Royal FloraHolland, Kenniscentrum Plantenstoffen en Wageningen UR Glastuinbouw. Prisma heeft in de loop van 2015 haar bedrijfsactiviteiten beëindigd; de werkzaamheden alsmede participatie in de projectgroep zijn overgenomen door Explant Technologies.



## 2 Aanpak

In het project is een aanpak gevolgd, waarbij getrechterd is van een grote hoeveelheid in de literatuur genoemde potentiële mogelijkheden, via selectie op economische en pragmatische gronden, naar selectie op bio-activiteit. De aanpak staat schematisch weergegeven in Figuur 2.



**Figuur 2** Schematische weergave van de gevolgde aanpak.

### 2.1 Literatuurstudie

De eerste stap bestond uit een literatuurstudie naar de meest kansrijke sierteeltgewassen tegen de belangrijkste ziekten en plagen in de Nederlandse (glas)tuinbouw. Als basis zijn de volgende bronnen gebruikt:

- Fytagoras rapport in opdracht van het Kenniscentrum Plantenstoffen (Korthout and Holtman 2013).
- Lijst van geslachten uit de extractenbibliotheek van het Kenniscentrum Plantenstoffen.

Ad a: In deze businesscase studie is aan de hand van beschikbare gegevens (rapporten, wetenschappelijke literatuur, databases) geïnterpreteerd welke zuivere stoffen van plantaardige oorsprong of plantaardige extracten een preventieve of curatieve werking hebben tegen enkele belangrijke ziekten en plagen waarmee de Nederlandse glastuinbouw te maken heeft. Hierbij is gekeken naar trips, witte vlieg, luis, aaltjes (wortelknobbelaaltjes), schimmels (fusarium, botrytis en phytophthora) en bacteriën (Erwinia, Clavibacter, Pseudomonas). Ook is geïnterpreteerd in hoeverre de grootste afvalstromen van de Nederlandse tuinbouw (9 belangrijkste sierteeltgewassen en 10 opengronds tuinbouwgewassen) een bron kan zijn voor de winning van deze stoffen of extracten.

Ad b: In het kader van het project 'Extractenbibliotheek', geïnterpreteerd door het Kenniscentrum Plantenstoffen is er een lijst van 950 geslachten met 1300 soorten opgesteld die in de extractenbibliotheek vertegenwoordigd zijn.

Uit de businesscase studie inhoudsstoffen voor preventie of bestrijding van pathogenen is een lijst met enkele honderden planten gegenereerd die een gerapporteerde werkzaamheid hebben tegen een of meerdere plagen zoals vermeld onder "ad a". Echter in deze lijst kwamen weinig namen voor van planten die in ruime mate in de Nederlandse glastuinbouw worden geteeld of waarvan grote (rest) stromen bekend zijn bij veilingen en/of verwerkende bedrijven. Daardoor is er besloten om op geslachten-niveau te kijken in hoeverre er overlap bestaat tussen de planten uit deze lijst en het assortiment dat bij Royal FloraHolland wordt aangevoerd. De overlap bestaat uit 80 verschillende planten met diverse activiteiten tegen ziekten en plagen in de glastuinbouw. In bijlage 1 is deze overlap weergegeven.

De lijst met de overlap is vervolgens volgens twee criteria verder ingedikt:

- Selectie op gerapporteerde werkzaamheid tegen de vijf belangrijkste ziekten en plagen in de glastuinbouw. Uit expert consultancy is gebleken dat de top vijf bestaat uit de schimmels botrytis en (echte) meeldauw en de plagen trips, spint en luis.
- Selectie op voldoende aanvoer bij Royal FloraHolland. In overleg met Royal FloraHolland is geïnventariseerd van welke planten er voldoende aanvoer te verwachten is, hetzij uit reststromen van veilingen en verwerkers, hetzij uit gerichte teelten tegen lage kostprijs door telers.

Uiteindelijk is een selectie gemaakt van 20 kansrijke gewassen waaruit perspectiefvolle extracten verwacht werden.

## 2.2 Verzamelen plantmateriaal

In 2014 is Royal FloraHolland gestart met het benaderen van telers van de 20 geselecteerde gewassen, met de vraag of zij bereid waren deel te nemen en de gewassen wilden telen. Hieraan was een belangrijke voorwaarde verbonden, namelijk dat de planten zonder chemische gewasbeschermingsmiddelen en zwavel moesten worden opgekweekt.

Voor een aantal gewassen was dit geen probleem. Daarin worden standaard al niet of nauwelijks chemische middelen toegepast. Plantmateriaal in oogstrijp stadium werd bij de betreffende telers opgehaald, en bij Prisna afgeleverd voor verdere verwerking.

Voor andere gewassen zoals bijvoorbeeld gerbera en roos lag dit niet zo eenvoudig. Van een aantal gewassen is om deze reden in een zeer jong stadium plantmateriaal naar Wageningen UR Glastuinbouw locatie Bleiswijk gehaald, en daar verder opgekweekt zonder chemische gewasbeschermingsmiddelen.

Van alle gewassen is door de telers aangegeven of er gewasbeschermingsmiddelen waren toegepast, welke dit waren en wanneer ze waren toegepast.

Gedurende de looptijd van het project bleek dat er niet van ieder geselecteerd gewas er geschikt plantmateriaal voorhanden was. Voor deze gewassen is contact opgenomen met de Extractenbibliotheek van het Kenniscentrum Plantenstoffen. Voor onderhavig project is plantmateriaal verzameld en verwerkt op een identieke wijze als voor de extractenbibliotheek is gedaan. Via de extractenbibliotheek is de lijst met de 20 geselecteerde soorten uiteindelijk compleet gemaakt.

## 2.3 Maken van extracten

De extracten zijn gemaakt door Prisna op het laboratorium in Leiden. De verzamelde plantmaterialen werden indien mogelijk verdeeld per orgaan, zoals bloemen, wortels, bol, bladeren en stelen. In sommige gevallen werden bladeren en stelen samengevoegd als "groene delen".

Het plantmateriaal werd verdeeld in porties van 50g en ingevroren bewaard bij -80°C tot verdere verwerking. Voor de extractie werd een portie van 50g ondergedompeld in N<sub>2</sub> (l) en vervolgens tot een fijn poeder gemalen met een Waring Blender. Van het gemalen plantmateriaal werd 40g afgewogen en gesuspenseerd in 96% ethanol (gedenatureerd ethanol met 1% methyl-ethyl-keton (MEK)); voor extractie werden de suspensies ca 24 uur geïncubeerd bij kamertemperatuur op een schudder. Na de incubatietijd werden de extracten verkregen door centrifugatie en filtratie. De ethanol concentratie in de eind-extracten wordt geschat op gemiddeld 80%. De extracten werden opgeslagen bij -80°C tot levering.

## 2.4 Biotoetsen gewasbescherming

De extracten zijn door Wageningen UR Glastuinbouw in Bleiswijk getest op de vijf belangrijkste ziekten en plagen in de glastuinbouw. De gehanteerde methodiek is de standaard methodiek die voor deugdelijkheidsonderzoek van gewasbeschermingsmiddelen wordt toegepast, zie bijvoorbeeld (Staaïj and Groot 2013).

### 2.4.1 Ziekten en plagen

De schimmelziekten Botrytis en echte meeldauw (*Sphaerotheca fuliginea*) zijn in veel gewassen een probleem en hiertegen worden nog (veel) chemische gewasbeschermingsmiddelen in gezet. Biologische middelen zijn onvoldoende beschikbaar.

Bladluizen (*Myzus persicae* (perzikluis) en *Aphis gossypii* (katoenluis)), trips (*Frankliniella occidentalis* (Western Flower Trips)) en spint (*Tetranychus urticae* (Red Spider Mite)) zijn de plagen waarop de extracten zijn getest. Perzikluis is zeer algemeen voor komend in veel gewassen. Ook Katoenluis komt in veel gewassen voor in de glastuinbouw; daarbij werd deze luis in de literatuur specifiek genoemd bij verschillende extracten. Ondanks dat voor deze plagen biologische bestrijders beschikbaar zijn, moet regelmatig corrigerend worden ingegrepen bij explosieve ontwikkeling van de populaties. Dit gebeurt met chemische middelen.

Alle ziekten en plagen werden gekweekt bij Wageningen UR Glastuinbouw in Bleiswijk. Spint, bladluizen, trips en echte meeldauw op planten (in vivo). Deze planten worden ook speciaal opgekweekt bij Wageningen UR Glastuinbouw en zijn niet in aanraking geweest met chemische gewasbeschermingsmiddelen. Ook in de kweken werden geen chemische gewasbeschermingsmiddelen toegepast. Botrytis werd in het laboratorium gekweekt op schaal (in vitro) en was afkomstig van gerbera of tomaat.

### 2.4.2 Infecteren planten

De testen zijn uitgevoerd op jonge plantjes; Botrytis op tomaat, echte meeldauw, katoenluis en trips op komkommer en perzikluis, trips en spint op paprika. De keuze voor deze planten is gebaseerd op het feit dat de opkweek kort is waardoor infectie met (andere) ziekten en plagen gering is en geen risico bestaat dat de planten besmet raken met chemische gewasbeschermingsmiddelen. Daarnaast wordt het effect van de extracten op de ziekten en plagen getest in de natuurlijke habitat van de ziekten en plagen, waardoor effecten, anders dan van de extracten, kunnen worden uitgesloten.

Alle plantjes werden kunstmatig geïnfecteerd waarbij op één blad de ziekte of plaag werd aangebracht. Afhankelijk van de snelheid van de ontwikkeling van de populatie werden twee tot zeven dagen daarna de behandeldelingen met de extracten (curatief) uitgevoerd met uitzondering van Botrytis. Deze schimmelziekte werd aangebracht direct nadat de planten waren behandeld (preventief).

### 2.4.3 Bepaling effectieve dosering

Tijdens de eerste proeven werd bepaald bij welke dosering de extracten effectief werden. Gestart werd met 1 ml extract per liter water en 10 ml/L in proeven met echte meeldauw en perzikluis. Het effect van deze doseringen was nihil. De dosering werd verhoogd naar 100 ml/L en 200 ml/L. De laatste dosering gaf effect en hiermee zijn alle daarop volgende proeven uitgevoerd.

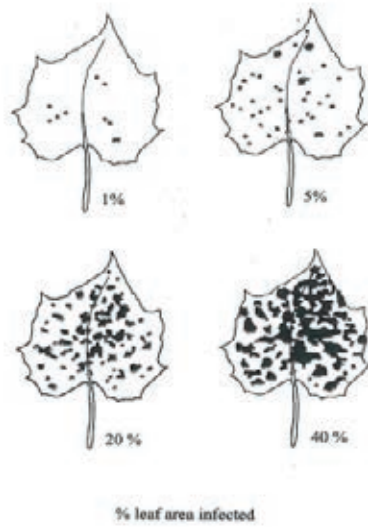
### 2.4.4 Waarnemingen

Echte meeldauw op komkommer:

Hierbij werd per blad het percentage geïnfecteerd bladoppervlak genoteerd volgens EPPO richtlijn PP1/57(3) "Efficacy evaluation of fungicides. Powdery mildews on cucurbits and other vegetables", zie Figuur 3.

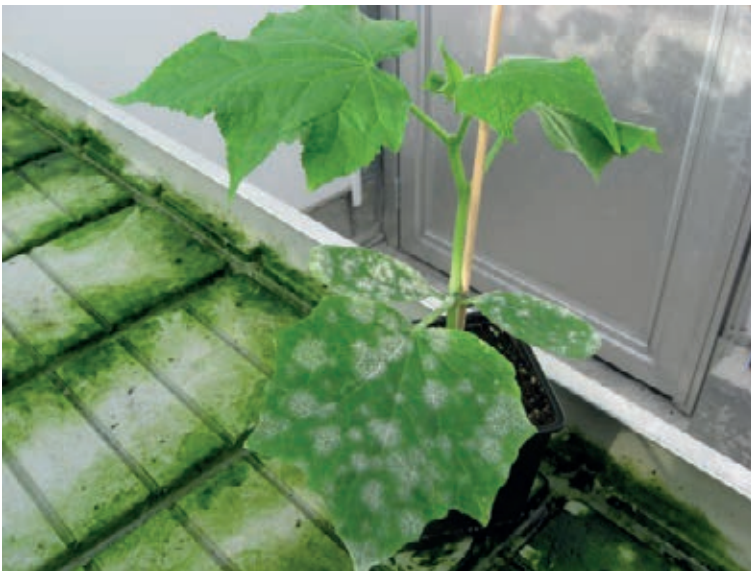


Diagram on cucumber powdery mildew infection



**Figuur 3** Beoordeling aantasting door meeldauw.

Voorafgaand aan de behandelingen werd de aantasting per plant per blad genoteerd. Een week na uitvoeren van de behandelingen vond de eerste beoordeling plaats en bij een aantal proeven volgde weer een week later nog een tweede beoordeling. Dit om na te gaan of de meeldauw ook werd geremd op de niet geïnfecteerde bladeren.



**Foto 1** Geïnfecteerd bladoppervlak door echte meeldauw in komkommer.

Botrytis op tomaat:

Hierbij werd de aantasting genoteerd volgens categorieën; 1 = licht, 2 = matig, 4 = ernstig en 6 = zeer ernstig. Daarnaast werd de lengte van de laesies gemeten (uitgroei). De beoordeling van het effect van de extracten vond één week na uitvoeren van de behandelingen plaats.

Spint op paprika:

Hierbij werd het aantal dode en levende mijten genoteerd 3 dagen na uitvoeren van de behandelingen, waarna het percentage doding werd berekend.

Trips op paprika en komkommer:

Hierbij werd het aantal levende tripsen genoteerd 2 dagen na uitvoeren van de behandelingen.

Perzikluis op paprika:

Hierbij werd het aantal levende en dode luizen genoteerd 3 dagen na uitvoeren van de behandelingen.

Katoenluis op komkommer:

Hierbij werd het aantal levende en dode luizen genoteerd 3 dagen na uitvoeren van de behandelingen.

De resultaten van de extracten in de proeven met bladluizen, spint en trips werden gecorrigeerd voor de mortaliteit in de onbehandelde of met water behandelde objecten.

#### 2.4.5 Uitvoering proeven

In iedere proef lagen naast de behandelingen met de extracten een onbehandeld, een waterbehandeling, een chemische controle, verschillende behandelingen met extracten waarvan de werking bekend was (onder de codenamen Prisma A, Prisma N, FytaX) en ethanol. De chemische controles waren triflumizole (Rocket EC, 150 g/L) voor echte meeldauw, cyprodinil+fludioxonil (Switch, 37,5%+25%) voor Botrytis en pyrethrinen+piperonylbutoxide (Spruzit Vloeibaar, 40 g/L+ 160g/L) voor de plagen.

Per ziekte en plaag worden hieronder de verschillende proeven vermeld. De extracten per proef staan vermeld in Bijlage 1.

- Met echte meeldauw zijn vijf proeven uitgevoerd; november 2014, januari, maart/april, april en oktober 2015.
- Met Botrytis zijn vier proeven uitgevoerd; januari, maart, april en december 2015.
- Met perzikluis zijn drie proeven uitgevoerd; december 2014, september en november 2015.
- Met katoenluis zijn drie proeven uitgevoerd; mei, augustus en oktober 2015.
- Met trips zijn drie proeven uitgevoerd; april, augustus en december 2015.
- Met spint zijn drie proeven uitgevoerd; februari, juli en november 2015.

De behandelingen werden buiten het kascompartiment uitgevoerd om te voorkomen dat ook andere planten tijdens het spuiten werden geraakt.



**Foto 2** Uitvoeren bespuiting.

De bespuitingen werden uitgevoerd met een Birchmeier handsprit (zie Foto 2). De dosering van alle extracten was 200 ml/L (eindconcentratie ethanol: 20%). Van de chemische controles werden de op het etiket aanbevolen doseringen toegepast.

Zowel de bovenkant als de onderkant van de bladeren werden behandeld. Per proef werden 3 tot 5 planten per behandeling gebruikt. De restanten spuitvloeistof per behandeling werd in iedere proef teruggemeten en genoteerd.

In de proeven met *Botrytis* werden op de planten beschadigingen (laesies) aangebracht. Deze werden met de extracten behandeld. Daarna werden de plekken geïnfecteerd met een sporensuspensie van de schimmel. De luchtvochtigheid in een kascompartiment met kleine planten is laag. Om te voorkomen dat aantasting met *Botrytis*, ondanks kunstmatig infecteren, uitbleef werd gedurende minimaal twee dagen de luchtvochtigheid in het kascompartiment verhoogd tot 90%.

De klimaatgegevens over de periode van november 2014 tot en met oktober 2015 zijn gelogd door de meetbox van de klimaatcomputer van Wageningen UR Glastuinbouw. Grafieken met de klimaatgegevens zijn opgenomen in Bijlage 2.



**Foto 3** Afmeten hoeveelheid spuitvloeistof.

## 2.5 Biotoetsen plantweerbaarheid

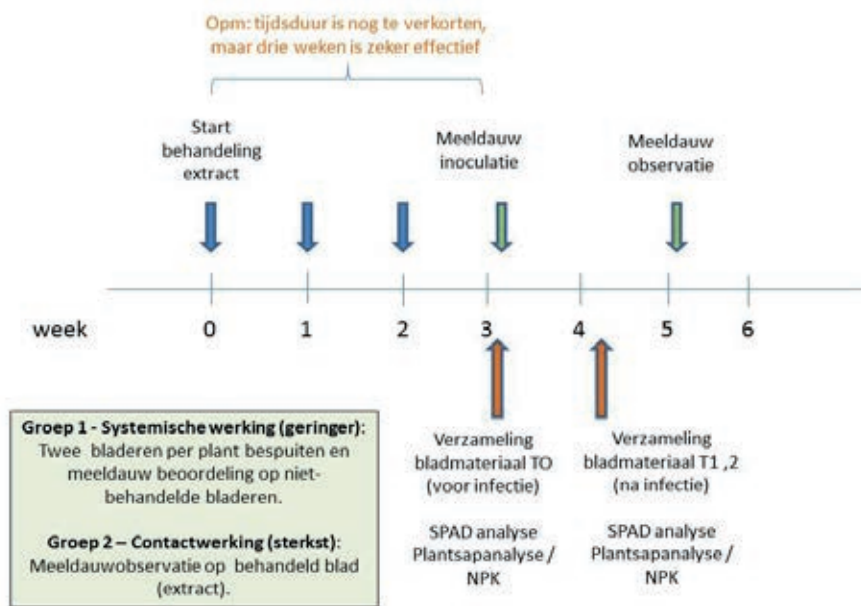
Om de potentie van preventieve en systemische werking van plantextracten te toetsen, is bij Wageningen UR Glastuinbouw in Bleiswijk een eerste verkenning gedaan op activiteit tegen de schimmel echte meeldauw (*Sphaerotheca fuliginea*). Er is een beperkte hoeveelheid extracten getest, bij de selectie hiervan is de keus gevallen op extracten waarbij in de proeven met contactwerking een activiteit tegen de schimmel meeldauw en/of *Botrytis* is vastgesteld.

Een preventieve werking betekent dat het extract voorafgaand aan de meeldauwbesmetting wordt aangebracht. Bij de meeste natuurlijke producten gebeurt dit driemaal (1 x per week). Daarbij kan sprake zijn van een directe contactwerking op de behandelde bladeren of van een systemische werking op niet-behandelde bladeren. In deze test zijn daarom alleen de onderste twee bladeren voorbehandeld met de extracten. Na drie weken zijn de planten (behalve onbesmette controleplanten) besmet met meeldauw.

In deze proef is ook getoetst of de extracten het natuurlijke afweersysteem tegen meeldauw in extra paraatheid brengen. Dit verloopt via de hormonale afweerroute systemic acquired resistance, SAR. Bij een plant die is geïnfecteerd met meeldauw is dit aan te tonen door via eiwitmetingen een verhoging van natuurlijke afweerreacties te bepalen voor en na infectie. Hiervoor is het nodig om op twee tijdstippen (voor en na infectie) bladmateriaal te verzamelen. Zie Figuur 4. De watercontrole wordt achterwege gelaten omdat dit alleen van toepassing is bij een curatieve bestrijding.

Voor de selectie van behandelingen is een keuze gemaakt uit een aantal extracten met een bewezen contactwerking: hierbij hebben we gekeken naar eerdere resultaten uit onderhavig project en de literatuur. Uit de literatuur komt ook een werking van Aloë vera tegen meeldauw naar voren. Deze plant heeft van nature al een hoog gehalte aan salicylzuur (SA). Daarnaast beschrijven Wilson *et al.* (1997) dat een tijm-soort ook vluchtige stoffen af kan scheiden die remmend werken op de sporenkieming van *Botrytis*. *Thymus hiemalis* scheidt vluchtige stoffen af die remmend werken op sporenkieming in een range van 3-50% binnen 1-2 dagen. En bij 100% kiemen de sporen helemaal niet meer.

In totaal zijn er 20 behandelingen ingezet met elk 20 planten. Van elke behandeling zijn 10 planten in een klimaatkast geplaatst en 10 planten in een kas met natuurlijk daglicht. Van vijf planten in de klimaatkast zijn uit elke behandeling individuele bladmonsters verzameld voor SA analyse en LCMS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) profilering. Hiervoor zijn op twee tijdstippen bladmonsters verzameld (T0 – voor infectie en T1 – na infectie).



**Figuur 4** Tijdschema van activiteiten voor toetsing van de systemische werking van plantextracten.

### 2.5.1 Test op snelle werking (besmetting na 3 weken)

Bij deze proef zijn jonge gerbera potplanten ingezet (5 weken na zaaien) op potgrond substraat (Jiffy Flush fine, 15% perlite). Per plant zijn twee bladeren onderin behandeld met het extract (vanwege de geringe hoeveelheid extract). Omdat niet voor alle extracten evenveel materiaal voorradig was, is gewerkt met verdunningen. De behandeling met Aloë vera is onverdund uitgevoerd met een eigengemaakt extract van planten die uit het tuincentrum zijn gehaald. Alle behandelingen zijn wekelijks gedurende drie weken uitgevoerd. In de vierde week zijn alle planten besmet met meeldauw en twee-drie weken later beoordeeld op meeldauw. Voor beoordeling van de preventieve systemische werking worden niet-behandelde bladeren beoordeeld. Hierbij is gebruik gemaakt van de index van Spencer (1977) gebruikt: 0 = 0; 1 = 0,1-2%; 2 = 2-5%; 3 = 5-20%; 4 = 20-40%; 5 = > 40% van het bladoppervlak bedekt met meeldauw.

## 2.5.2 Gewasmetingen

Na afloop van de proefperiode is het vers gewicht van de planten bepaald.

Het bladgroen in de gerberaplanten is gemeten met behulp van een chlorofyl meter (SPAD). De mate van chlorofyl, bladgroen, die een blad produceert, blijkt in veel proeven met meeldauw een positieve relatie te vertonen met de gevoeligheid voor meeldauw: meer bladgroen (hogere SPAD waarde), is vaak gerelateerd aan meer meeldauw. Zowel behandelingen als externe klimaatcondities (licht) kunnen de SPAD waarde beïnvloeden. Voor de meting van afweereiwitten, de zg. glucanases, is van alle behandelingen bladmateriaal verzameld en in de vriezer bij -80 °C opgeslagen. Dit kan eventueel later nog nader worden geanalyseerd.

## 2.6 Analyse van de inhoudsstoffen

Wageningen UR Business Unit Bioscience van PPO/PRI in Wageningen is verantwoordelijk voor het analyseren van inhoudsstoffen in de extracten, om uiteindelijk te kunnen achterhalen welke stoffen verantwoordelijk zijn voor de gedetecteerde bioactiviteit(en).

Het plantenrijk omvat >100.000 inhoudsstoffen. Met name de zogenaamde secundaire plantenstoffen, betrokken bij afweer tegen biotische en abiotische stressfactoren, zijn zeer variabel en grotendeels familie-, soort-, weefsel- of zelfs variëteit-specifiek. Vanwege deze grote complexiteit en variatie in polariteit, van uiterst hydrofiel (polair) tot uiterst lipofiel (apolair), als ook grote spreiding in hun concentraties (van pg tot mg per gram weefsel) is het onmogelijk alle inhoudsstoffen aanwezig in een plant of plantenextract met 1 soort extractie of analyseplatform te onderzoeken. Vanwege het beperkte budget en focus van het totale project op de te testen bioactiviteiten, is gekozen voor 1 type analyse op een platform dat het meest geschikt is voor analyse van niet-vluchtige secundaire plantenstoffen in de ethanol extracten, namelijk HPLC (High Performance Liquid Chromatography) gekoppeld aan diodearray detectie én hoge resolutie massaspectrometrie (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry: LCMS). Met deze gevoelige methode kunnen per extract in principe honderden metabolieten gedetecteerd worden, met per soort zowel uit literatuur reeds bekende inhoudsstoffen als heel veel momenteel nog onbekende stoffen.

De ethanol extracten van de diverse siergewassen of weefsels werden aangeleverd nadat ze getest waren op hun bioactiviteit door Wageningen UR Glastuinbouw. De extracten zijn bij Wageningen UR Bioscience tot hun analyse opgeslagen bij -80°C. De extracten zijn als zodanig, dus zonder verdere voorbereiding, gebruikt voor de LCMS analyse. Het gebruikte systeem was een Dionex HPLC, een Luna C18 reversed phase kolom (Phenomenex), een UV/Vis-diodearray detector (Thermo) en een Q-Exactive Orbitrap FT-MS (Thermo). Per extract is 5 µl geïnjecteerd en de inhoudsstoffen in de extracten werden allereerst zoveel mogelijk gescheiden op de kolom (LC) en daarna gedetecteerd met de diodearray detector, voor hun UV-Vis absorptiespectrum informatie, en vervolgens met de massaspectrometer (MS) voor hun accurate massa.

Van alle plantensoorten is tevens een tabel gemaakt met plantenstoffen die beschreven zijn in deze soorten. Dit is gedaan aan de hand van Dictionary of Natural Products (DNP) database (<http://dnp.chemnetbase.com/dictionary-search.do?method=view&id=151376&si=&>) en de KNApSACK (KS) database ([http://kanaya.naist.jp/knapsack\\_jsp/top.html](http://kanaya.naist.jp/knapsack_jsp/top.html)).

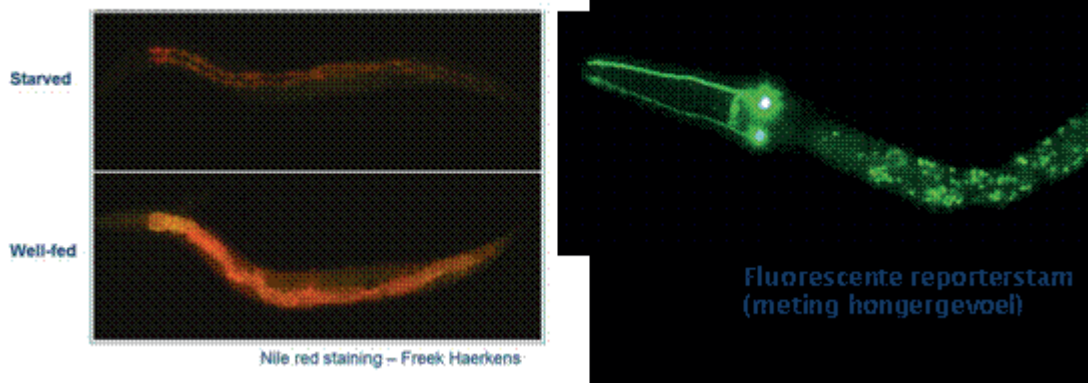
## 2.7 Screening werking tegen obesitas

Naast mogelijke biocide toepassingen (insecticide, fungicide) is er ook gekeken in hoeverre extracten van- of stoffen uit de geselecteerde gewassen een mogelijke toepassing hebben in de farmaceutische industrie. Fyttagoras heeft in nauwe samenwerking met de Hogeschool Arnhem en Nijmegen (HAN) een screeningsplatform opgezet voor het screenen van planten en het identificeren van de bioactieve componenten op basis van het diermodel *C. elegans*. Voor een groot aantal ziektebeelden (obesitas, diabetes, kanker, veroudering, neurodegeneratieve ziekten, toxiciteit) zijn de processen die leiden tot deze ziekten in *C. elegans* in hoge mate vergelijkbaar met de mens. Daarnaast is dit diermodel ethisch verantwoord en toepasbaar op high-throughput basis (dus in te passen in de gerobotiseerde High-throughput screeningsplatforms van de farmaceutische industrie).



In dit project ligt de focus op het screenen van de geselecteerde planten op een werking op het vetmetabolisme. Hierbij kan worden gemeten op een vetverlagend / vetopbouw-remmend effect (anti-obesitas) of op een verhogend effect (anorexia of aansterken voor b.v. HIV patiënten en kankerpatiënten).

### Vetkleuring



**Figuur 5** Vetkleuring (Nile red) en activiteit kleuring (meting hongergevoel) in *C.elegans*.





## 3 Resultaten

### 3.1 Resultaten database studie

Op basis van de literatuurstudie voor Kenniscentrum Plantenstoffen, de lijst met geslachten voor de Extractenbibliotheek, een selectie op gewassen met aanvoer bij Royal FloraHolland en een selectie op gerapporteerde bioactiviteit tegen insecten en schimmels, is de volgende lijst samengesteld.

Tabel 1

*Geselecteerde siergewassen met gerapporteerde bioactiviteit tegen insecten en schimmels.*

Plant	Orgaan	Gerapporteerde werking	Gerapporteerd organisme
<i>Allium moly</i>	bol	Fungicide	fusarium
	bloem	Fungicide	fusarium
	stam	Fungicide	fusarium
<i>Carex</i>	plant	Fungicide	fusarium
	bloem	Fungicide	fusarium
<i>Chrysanthemum</i>	bloem	Insecticide	
	plant	Insecticide	
<i>Cyperus</i>	plant	Fungicide	phytophthora
	bloem	Fungicide	phytophthora
<i>Freesia</i>	bloem	fungicide/insecticide	
	plant	fungicide/insecticide	
<i>Gerbera</i>	plant	fungicide/insecticide	
	bloem	fungicide/insecticide	
<i>Gloriosa</i>	wortelstok	Fungicide	
<i>Hedera helix</i>	plant	Fungicide	fusarium
<i>Laurus nobilis</i>	blad	Insecticide	witte vlieg
<i>Lilium</i>	bloem	Fungicide	
	blad	Fungicide	
	bol	Fungicide	
<i>Ocimum basilicum</i>	blad	Insecticide	katoenluis
<i>Rosa</i>	bloem	fungicide/insecticide	
	plant	fungicide/insecticide	
<i>Salix caprea</i>	blad	Fungicide	phytophthora
	tak	Fungicide	phytophthora
<i>Solanum dulcamara</i>	zaad	Fungicide	fusarium
	stengel	Fungicide	fusarium
	blad	Fungicide	fusarium
<i>Tanacetum vulgare</i>	plant	Insecticide	katoenluis
	bloem	Insecticide	katoenluis

Plant		Orgaan	Gerapporteerde werking	Gerapporteerd organisme
	<i>parthenium</i>	plant	Insecticide	katoenluis
		bloem	Insecticide	katoenluis
<i>Trifolium</i>	<i>spp.</i>	plant	Insecticide	witte vlieg
		bloem	Insecticide	witte vlieg
<i>Tulipa</i>		plant	fungicide/insecticide	
		bol	fungicide/insecticide	
		bloem	fungicide/insecticide	
<i>Vinca</i>	<i>minor</i>	plant	Fungicide	fusarium
<i>Viola</i>	<i>odorata</i>	plant	Fungicide	phytophthora
		bloem	Fungicide	phytophthora
<i>Thymus</i>	<i>vulgaris</i>	plant	Fungicide	echte meeldauw

## 3.2 Plantmateriaal

Van de gewassen uit de tabel is in de literatuur melding gemaakt van bioactiviteit tegen schimmels en/of insecten. Echter er staat niet welk ras is gebruikt. Omdat verschillende genotypen binnen een soort verschillende bioactiviteit kunnen hebben, is niet gegarandeerd dat het in onderhavig project verzamelde plantmateriaal ook daadwerkelijk de beschreven bioactiviteit laat zien. Om te kunnen controleren dat de methodiek van opkweek, extractie, biotoetsing en metaboliëtoprofilering werkt, is besloten een aantal planten aan de lijst toe te voegen, waarvan *Prisna* en *Fytgoras* uit eerder onderzoek weten dat ze bioactieve werking hebben. Deze kennis is afkomstig is uit confidentiële background. De namen van de betreffende planten zijn niet aan de opdrachtgever en het projectteam medegedeeld; derhalve zijn ze onder code aan de lijst toegevoegd.

Tabel 2

*Plantextracten met eerder bewezen bioactiviteit die ter controle zijn toegevoegd.*

Controle	Orgaan	Activiteit
<i>Prisna A</i>	bol	Insecticide
<i>Prisna N</i>	bol	insecticide
<i>Fyta X</i>	plant	fungicide

Het verzamelen van materiaal uit de lijst heeft praktisch de nodige voeten in de aarde gehad. Een aantal telers stelden direct plantmateriaal ter beschikking. Vanuit sommige teelten kon het eindproduct worden betrokken, omdat er tijdens de teelt geen chemische gewasbescherming was gebruikt. Van een aantal gewassen was het onmogelijk om chemievrij eindproduct te krijgen. Daarvan is jong materiaal opgehaald en chemievrij bij Wageningen UR in Bleiswijk doorgeteeld.

Van twee soorten zijn geen extracten gemaakt, omdat bleken niet op enige schaal bij Royal FloraHolland te worden aangevoerd (*Allium moly*, *Solanum dulcamara*). Van een gewas was de teler niet bereid om plantmateriaal voor dit project af te staan, met als argument dat al genoegzaam bekend is dat de plant salicylzuur bevat met fungicide werking (*Salix caprea*). Van een aantal gewassen kon er in de periode dat de biotoetsen uitgevoerd moesten worden, geen plantmateriaal worden verzameld. Met het Kenniscentrum Plantenstoffen is overeengekomen, dat er materiaal uit de extractenbibliotheek kon worden gebruikt (*Tanacetum*, tulp, *Trifolium*, tijm, viooltje en *basilicum*).

Uiteindelijk zijn er van de volgende plantendelen extracten gemaakt, die in de biotoetsen en in de metaboliëtoprofilering zijn gebruikt.

Tabel 3

Overzicht van de gemaakte extracten.

	Plant	Nederlandse naam	bloem	blad/ stengel	wortel/ knol/ bol	totaal
1	Carex	Zegge		1	1	2
2	Chrysanthemum	Potchrysan	1	1	1	3
3	Cyperus	Parapluplant		1		1
4	Freesia	Freesia (wit)	1	1	1	3
5	Gerbera jamesonii	Potgerbera (rood, wit, oranje-rood, geel, roze)	5	5	5	15
6	Gloriosa	Klimlelie		1	1	2
7	Hedera	Klimop		1	1	2
8	Laurus nobilis	Laurier		1		1
9	Lilium	Lelie	1	1	1	3
10	Ocimum basilicum	Basilicum		1		1
11	Rosa	Potroos (rood en roze)		2	2	4
12	Tanacetum parthenium	Moederkruid		1		1
13	Tanacetum vulgare	Boerenwormkruid		1	1	2
14	Thymus vulgaris	Tijm		1		1
15	Trifolium arvense	Hazenpootje		1		1
16	Tulipa	Tulp		1	1	2
17	Tulipa gesneriana	Tulp (tuintulp)		1		1
18	Tulipa subpraestans	Tulp (tuintulp)		1	1	2
19	Vinca minor	Maagdenpalm (blauw)		1		1
20	Viola odorata	Maarts viooltje	1	1		2
21	Prisna A				1	1
22	Prisna N				1	1
23	Fyta X			1		1
	Totaal					53

### 3.3 Resultaten gewasbeschermingswerking

Bij de beoordeling van de extracten op effect moest minimaal een percentage van 50% bestrijding of beheersing worden behaald t.o.v. onbehandeld om als "hit" te worden aangemerkt. In de volgende tabel staan de resultaten vermeld van alle extracten met een "hit". De extracten die wel getest zijn maar waarmee geen hit werd gescoord zijn niet in de tabel opgenomen.

Tabel 4

Resultaten van de biotoetsen op directe werking tegen schimmels en insecten.

Extract	Echte meeldauw	Botrytis	Perzik luis	Katoen luis	Spint	Trips
Triflumizool	x					
Cyprodinil + fludioxonil		x				
Pyrethrinen + piperonylbutoxide			x	x	x	x
B001	x	x				
B002	x	x				
B003	x	x				
B004	x	x				
B005				x	x	
B007				x		x
B008		x				
B009		x			x	
B010		x				
B011	x		x	x	x	
B012				x	x	
B013		x	x	x		
B014			x	x		x
B015	x	x	x	x		
B016	x					
B017	x	x		x	x	x
B019	x	x			x	
B020	x	x				
B022	x	x				
B023		x				
B024	x	x				
B025		x				
B027	x					
B030						x
B033	X					
B034		x				
B036	x					
B037				x		
B038				x		x
B039				x		x
B040					x	x
B041				x		
B042					x	

Extract	Echte meeldauw	Botrytis	Perzik luis	Katoen luis	Spint	Trips
B044	x					
B045		x				
B046		x				x
B047	x					
B049	x					
Prisna A	x					
Prisna N	x					
Fyta X	x					

De controle behandelingen "water" en "ethanol" leverden zoals verwacht nergens een hit op. Daarom staan ze ook niet in de tabel. De chemische controles scoorden zoals verwacht overall een hit: 100% effect bij de insecten en mijten en vrijwel 100% bij de schimmels.

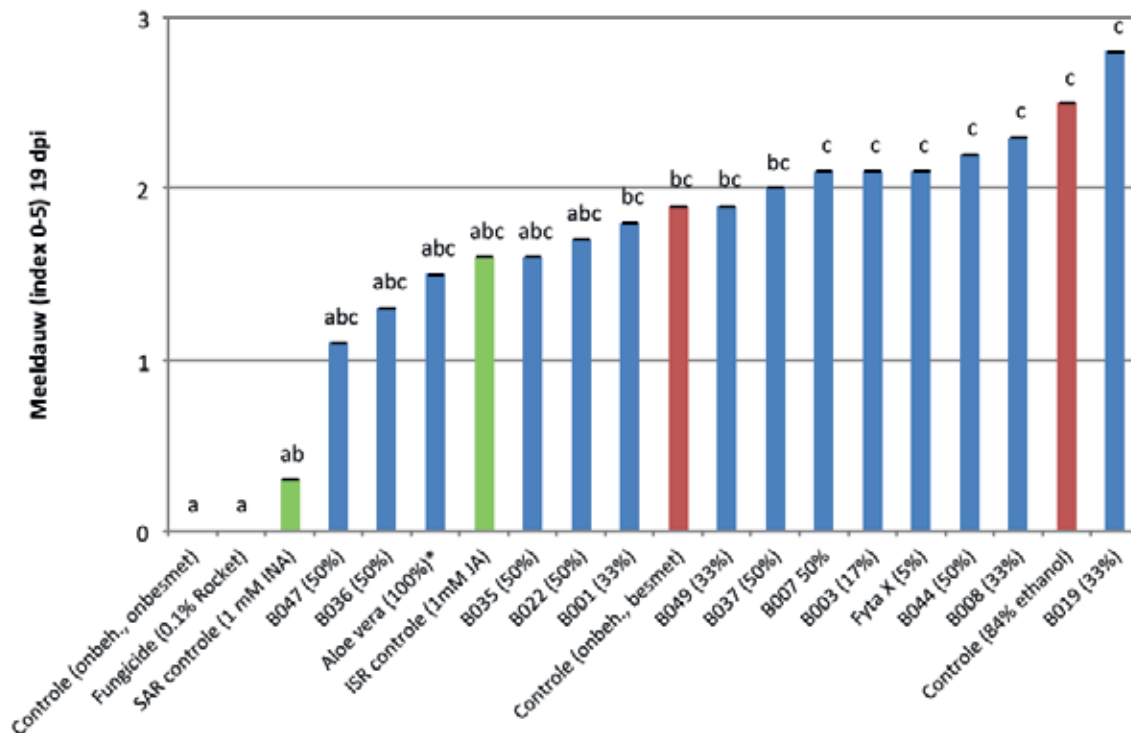
Opvallend was dat de controles Prisna A en Prisna N geen effectiviteit lieten zien tegen de insecten en de mijten, terwijl dit juist de reden was om ze in het onderzoek mee te nemen. Min of meer toevallig zijn beide producten wel meegenomen in een proef met meeldauw, en daar bleken ze wél activiteit te vertonen. Fyta X, waarvan vooraf bekend was dat er activiteit tegen meeldauw zou zijn, bleek dit ook inderdaad te hebben.

Van de extracten van de verzamelde siergewassen zijn de volgende scores genoteerd:

- Verschillende extracten hebben een werking tegen zowel de schimmels als tegen insecten en mijten.
- Verschillende extracten hebben een werking op de schimmelziekten.
- Extracten van één bepaald gewas had ook effect, maar dit was wisselvallig: in de ene proef werd wel een effect vastgesteld, maar in een andere niet.
- Een aantal extracten toonden activiteit tegen de verschillende insecten en mijten.
- Ook bij de insecten en mijten werden bij één gewas wisselende resultaten gevonden: de extracten hiervan hadden in de ene proef wel en in een andere proef minder effect.

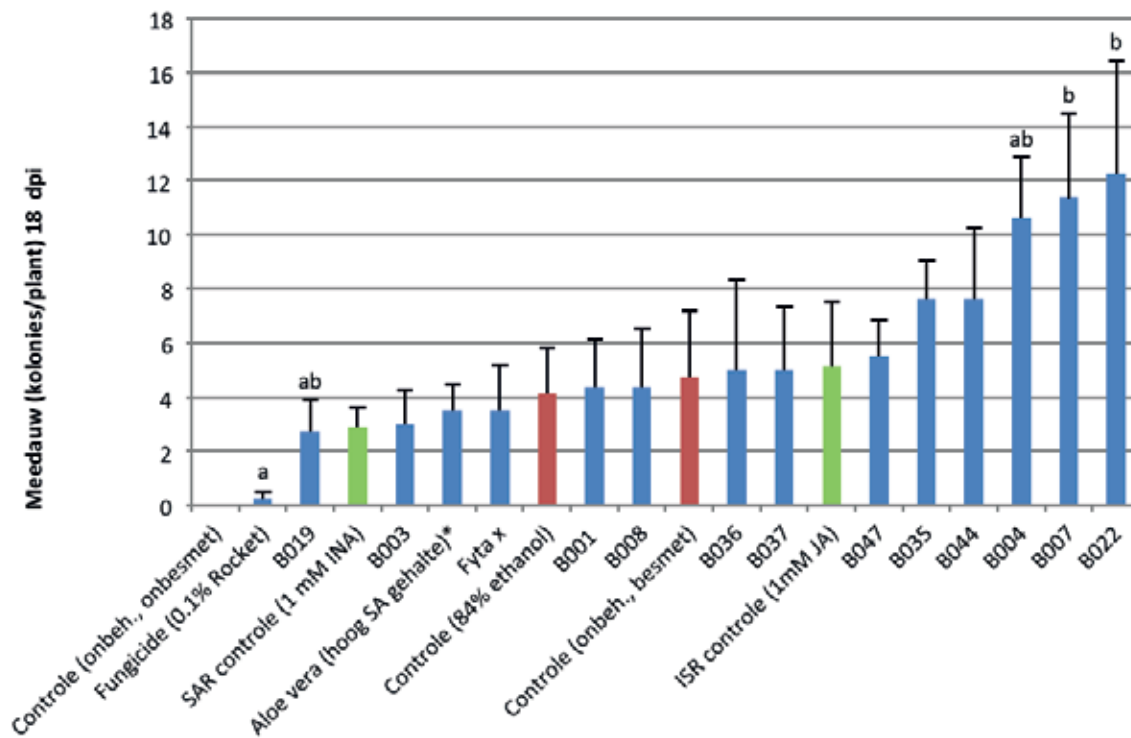
### 3.4 Resultaten plantweerbaarheid

Figuur 6 en Figuur 7 geven de resultaten weer van de meeldauw ontwikkeling op de gerbera potplanten in de klimaatkast en in een gewone kas met natuurlijk daglicht. In de klimaatkast laat geen enkele behandeling met een plantextract een sterke vermindering van meeldauw zien ten opzichte van de onbehandelde controle. Er zijn een aantal plantextracten met een lichte vermindering van meeldauw gevonden, waaronder *Aloë vera*. Alleen de behandeling met INA geeft een verlaagd infectieniveau en dit is overeenkomstig met andere testresultaten in potgerbera. De behandeling met jasmonzuur heeft zoals verwacht geen effect op de ontwikkeling van meeldauw.



**Figuur 6** Ontwikkeling van meeldauw in de klimaatkast (18 dagen na infectie) na preventieve behandeling van gerbera potplanten met verschillende plantextracten en weerbaarheidsverhogende stoffen. Kolommen geven het gemiddelde weer per behandeling en de standaardfout. Verschillende letters geven significante verschillen aan tussen behandelingen ( $P < 0.05$ ). Achter de behandeling met een plantenextract is de toegepaste verdunning vermeld.

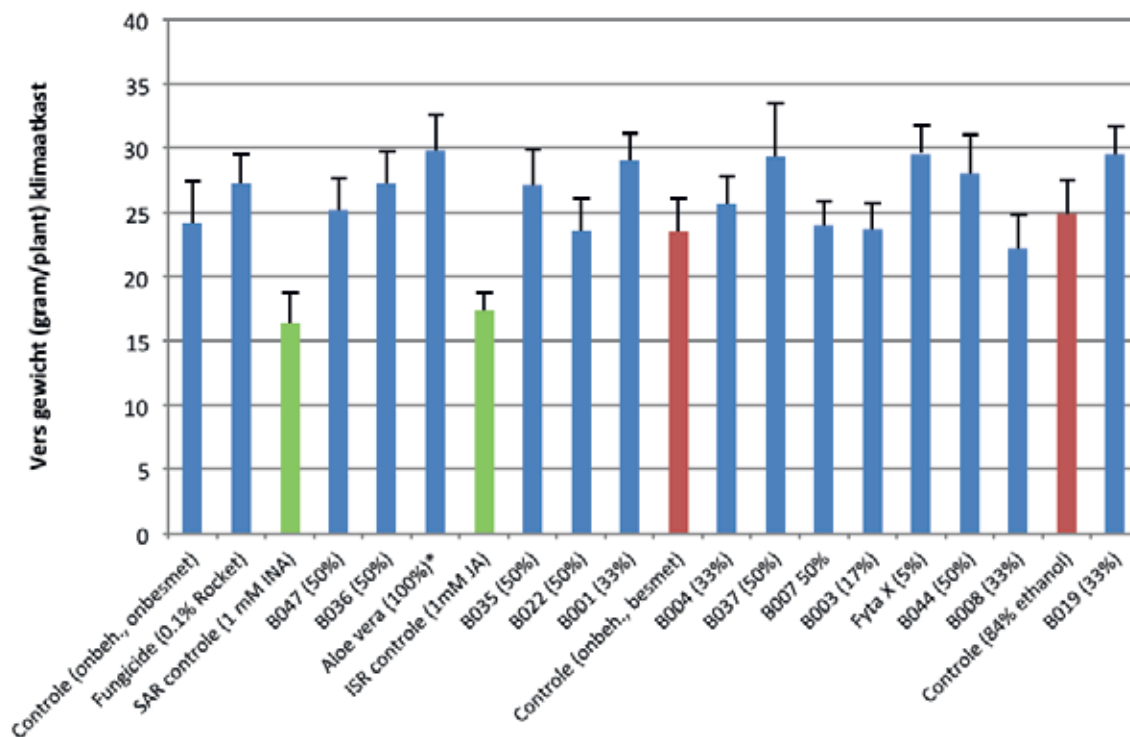
Opvallend is dat wanneer de planten in een kas met natuurlijk daglicht worden geplaatst dat de meeldauwontwikkeling dan eerder tot ontwikkeling komt dan in de klimaatkast. En dat de onderlinge volgorde van de behandelingen met plantextracten eveneens lijkt te verschuiven (bijv. B019). Hoewel de klimaatsinstellingen zo gelijk mogelijk zijn gehouden, krijgen de planten door het natuurlijke daglicht wel een betere groei ten opzichte van de klimaatkast waar met kunstlicht wordt gewerkt. Dit kan van invloed zijn op de behandelresultaten. Tegelijkertijd zien we dat de behandelingen met INA zowel in de klimaatkast als in de kas een vergelijkbare vermindering van aantasting geven ten opzichte van de onbehandelde controle.



**Figuur 7** Ontwikkeling van meeldauw in een kas met natuurlijk daglicht (12 dagen na infectie) na preventieve behandeling van gerbera potplanten met verschillende plantextracten en weerbaarheidsverhogende stoffen. Kolommen geven het gemiddelde aan per behandeling en de standaardfout. Verschillende letters geven significante verschillen aan tussen behandelingen ( $P < 0.05$ ).

Het versgewicht is alleen bepaald van de gerberaplanten in de klimaatkast. Dit betrof ook planten waarvan al materiaal (2 gram) was verzameld voor de metabolietanalyse. In grote lijnen wordt het versgewicht niet sterk beïnvloed door behandelingen met plantextracten, maar wel na behandeling met INA en jasmonzuur. Dit komt overeen met gegevens uit andere proeven met INA en potgerbera. Verdere data analyse geeft verder geen relatie aan tussen meeldauwinfectie en vers gewicht of meeldauwinfectie en bladgroenwaardes.





**Figuur 8** Vers gewicht van gerbera potplanten die in de klimaatkast waren opgekweekt met verschillende plantextracten en weerbaarheidsverhogende stoffen. Kolommen geven het gemiddelde weer per behandeling en de standaardfout.

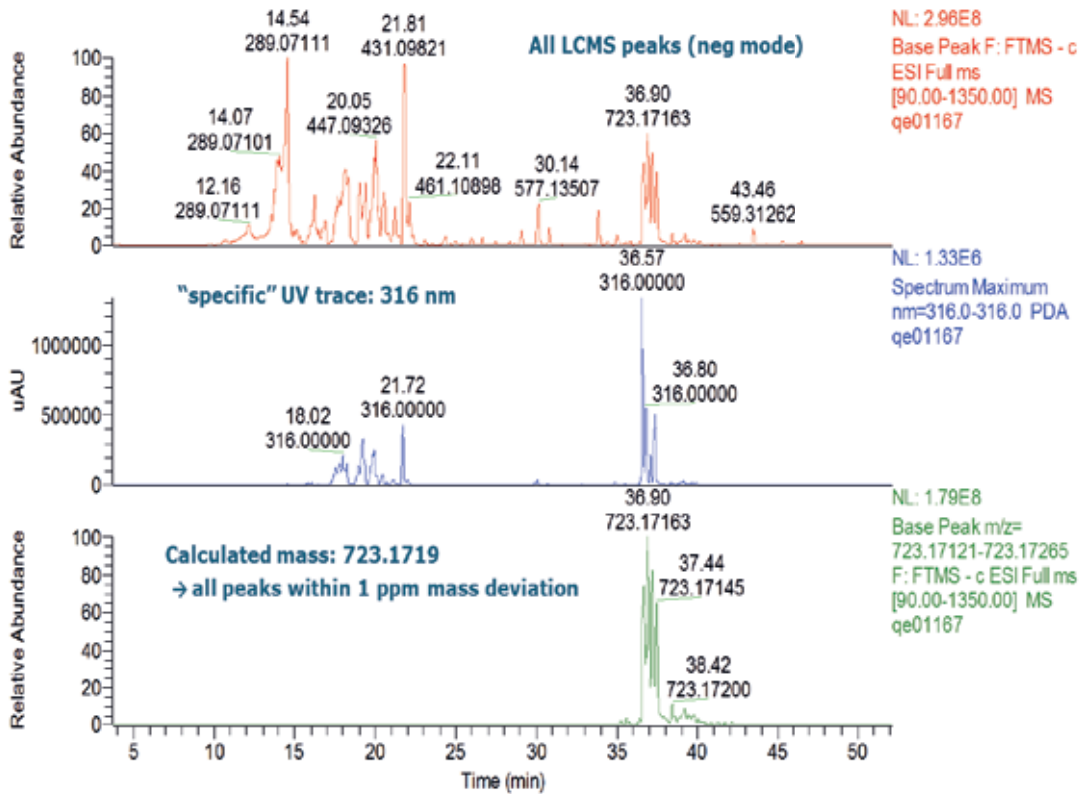
### 3.5 Resultaten metabolietprofilering

Van elke bekende plantenstof is de elementaire formule, en dus de verwachte accurate massa, per definitie bekend en deze kan daarmee opgezocht worden in de LCMS chromatogrammen. Maar omdat meerdere stoffen exact dezelfde elementaire formule kunnen hebben, en dus exact dezelfde massa hebben, is het zonder vergelijking met authentieke standaard niet zomaar mogelijk de precieze chemische structuur toe te wijzen aan LCMS pieken met dezelfde elementaire formule (Figuur 9).

Verder zijn er van sommige plantenextracten nauwelijks gegevens beschikbaar over inhoudsstoffen: van Freesia is alleen 3-methyl-3decen-2-one (C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>O) beschreven in de Dictionary of Natural Products (DNP), geen enkele in KNApSAcK (KS).

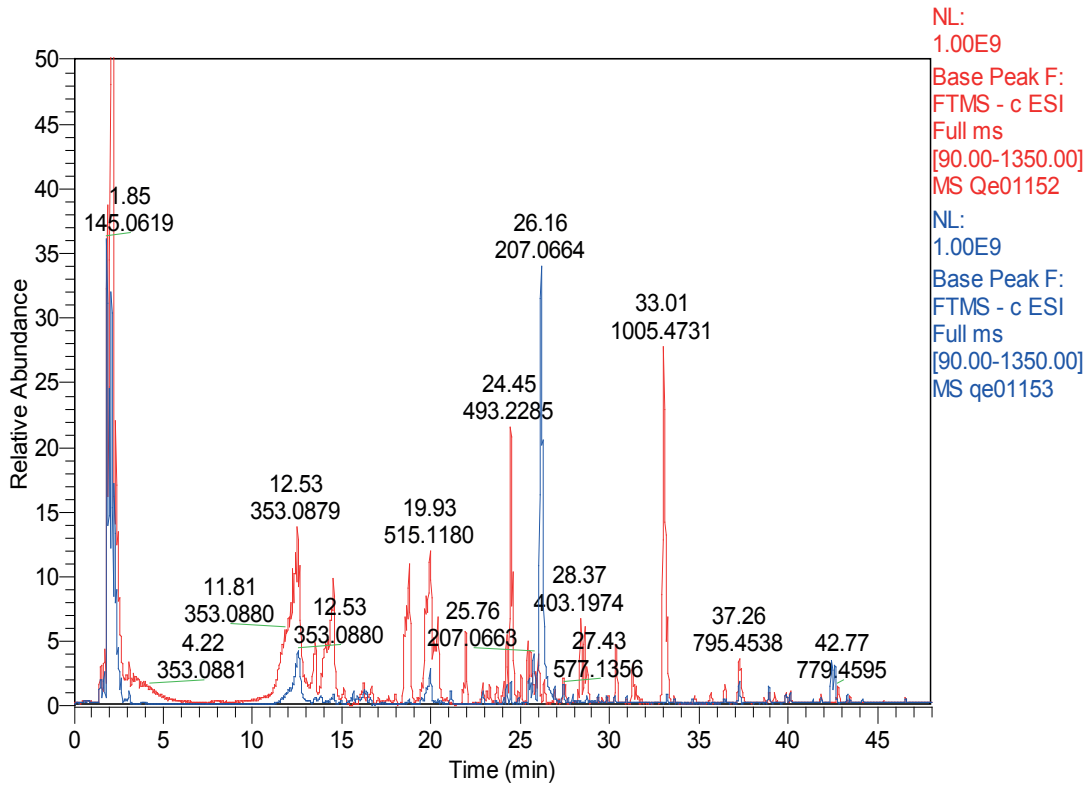
Van elk extract is een dergelijk LCMS profiel gegenereerd, zowel voor positief als negatief geladen moleculen. De profielen blijken verschillen sterk te verschillen tussen plantensoorten, maar ook binnen weefsels van dezelfde soort. Een voorbeeld van de laatste is te zien in Figuur 10, dat de extracten van blad en wortels van klimop (*Hedera helix*) toont. In beide extracten zijn enkele honderden verschillende inhoudsstoffen detecteerbaar (negatieve geladen ionen), maar hun annotatie is niet rechttoe rechtaan te vergelijken met wat in de literatuur bekend is over de betreffende plant. Bijvoorbeeld de piek met massa 353.0879 op retentietijd 12.53 minuten komt overeen met een elementaire formule van C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>, waarvan 28 verschillende vormen beschreven staan in de DNP waarvan 1 in *Hedera*; scopoletine-glucoside. Desalniettemin blijkt deze specifieke LCMS piek overeen te komen met de bekende plantenstof chlorogeenzuur (geverifieerd met authentieke standaard), een stof die dus nog niet eerder is beschreven voor *Hedera*. De piek op retentietijd 26.16 minuten met massa 207.0664 heeft de formule C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> waarvan maar liefst 153 verschillende vormen bekend zijn in de DNP database, maar geen enkele in *Hedera*.

Gezien het grote aantal specifieke inhoudsstoffen dat gedetecteerd kon worden in elk plantextract, waarvan er vele nog niet eerder beschreven zijn, is het voorsnog onmogelijk om (een combinatie van) bioactieve stoffen aan te wijzen. Hiervoor is een gedetailleerde metaboliet-vergelijking van actieve en niet-actieve weefsels van dezelfde plantensoort (weefsels of variëteiten) nodig, of een verdere opsplitsing van de bioactieve extracten in metabolietfracties (fractionering) gekoppeld aan nieuwe bioactiviteit toetsen van deze fracties.



**Figuur 9** Deel van LCMS chromatogram van het ethanol extract van *Laurus* blad (bovenste lijn). Nummers boven pieken verwijzen naar retentietijd en accurate massa (negatief geladen moleculen:  $[M-H]^-$ ). In de DNP is 2''-4''-di-O-p-coumaroylafzelin ( $C_{39}H_{32}O_{14}$ ) gerapporteerd als antimicrobieel; minimaal 4 pieken (isomeren) in dit extract blijken overeen te komen met zowel de berekende accurate massa 723.1719 binnen 1 ppm massa-afwijking (groene lijn) als UV-absorptie bij 316 nm (blauwe lijn).

RT: 0.00 - 48.00

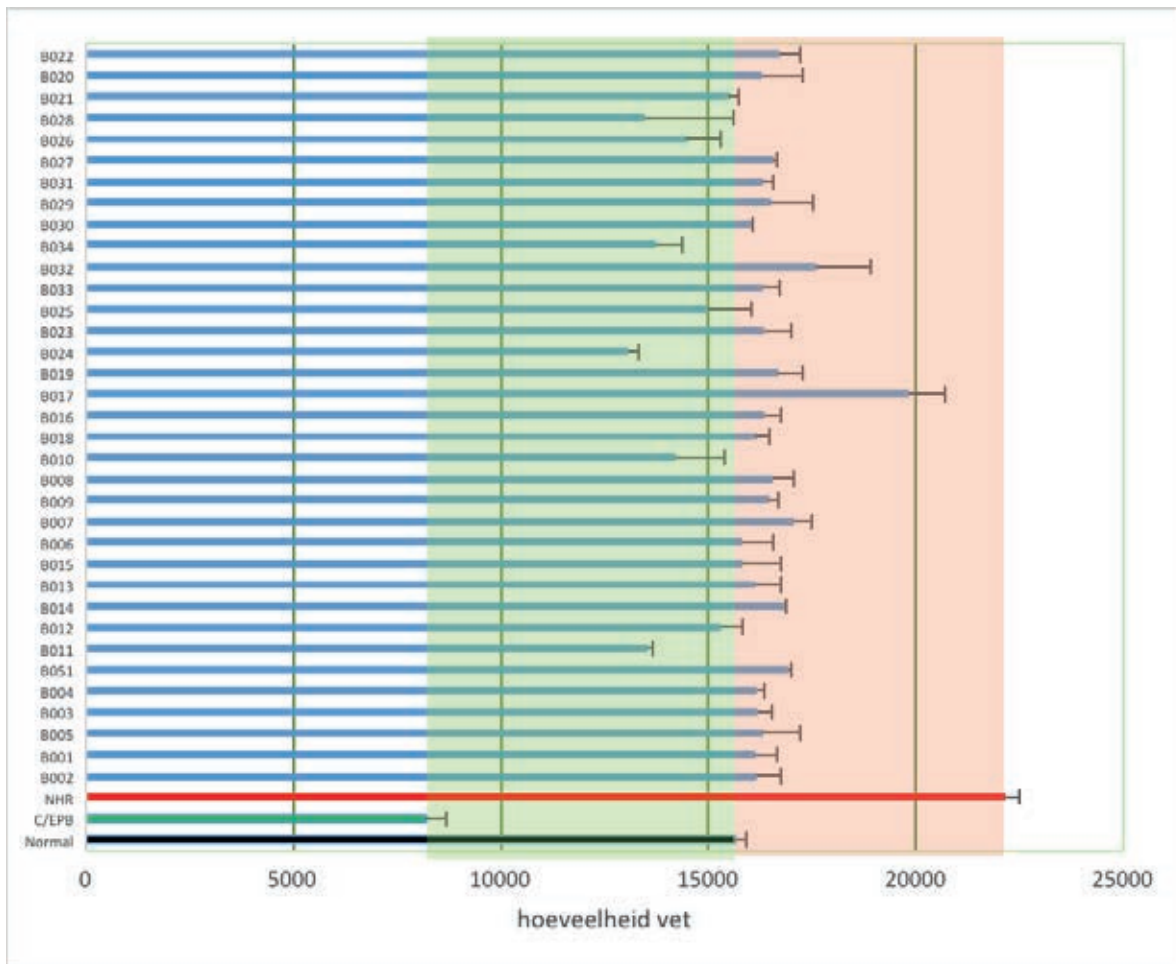


**Figuur 10** LCMS chromatogrammen van de ethanol extracten van blad (rode lijn) en wortels (blauwe lijn) van klimop (*Hedera*). Chromatografische retentietijd (in minuten) staat op X-as, detector response op Y-as (zelfde schaal voor beide extracten). Nummers boven pieken verwijzen naar retentietijd en accurate massa (negatief geladen moleculen:  $[M-H]^-$ ).

### 3.6 Resultaten screening extracten op werking tegen obesitas

De resultaten van de screening op effecten van plantextracten op het vetmetabolisme bij het modelsysteem *C. Elegans* staan weergegeven in Figuur 11.

Gebleken is dat enkele extracten van de geselecteerde gewassen een significant effect hebben op het vetmetabolisme in het diermodel *C. elegans*. Onder meer B011, B024 en B034 hebben een vetopbouw remmend (anti-obesitas) effect. Naast extracten met een vetopbouw-remmend effect valt het extract van de stengel van B017 op door haar vetopbouwende effect.



**Figuur 11** Effect van plantenextracten op vetopbouw in *C. elegans*. Normal (zwarte balk): normale vetopbouw zonder toevoegingen; C/EPB (groene balk): controle voor geïnduceerde verlaagde vetopbouw; NHR (rode balk); controle voor geïnduceerde verhoogde vetopbouw. Groen gebied: range anti-obesitas activiteit; rode gebied: range verhoogde vetopbouwende activiteit.



## 4 Conclusies en discussie

### 4.1 Gewasbescherming

Verschillende extracten hebben een werking tegen zowel de schimmels als de insecten en mijten. Verschillende extracten hebben een werking op de schimmelziekten, maar niet tegen insecten en mijten. Verschillende extracten hebben een werking tegen insecten en mijten, maar niet tegen schimmels. Een aantal extracten gaven in sommige toetsen wel een werking tegen schimmels of tegen insecten en mijten te zien, maar in andere niet. De werking van de plantextracten is minder effectief dan de chemische controles; maar waar een "hit" genoteerd is, lag de werking boven de 50%. Een beperkt aantal van de meest effectieve extracten scoorden een werking van ongeveer 75%. De extracten hebben geen fytotoxiciteit laten zien, met andere woorden: de planten hebben geen negatieve effecten van de behandeling ondervonden. In deze fase van het onderzoek en ontwikkelingstraject bieden deze resultaten perspectief.

Het in-vivo toetsen van middelen op gewasbeschermingseffectiviteit op jonge planten geeft in principe de beste voorspelling van werkzaamheid in een praktijksituatie. De toets is door jarenlange ervaring gevalideerd en wordt gebruikt in formele toelatingsprocedures. Wel bleek de uitvoering van de biotoetsen zeer arbeidsintensief en ook veel doorlooptijd in beslag te nemen. Tevens zitten er randvoorwaarden aan met betrekking tot het omgevingsklimaat. In de winter zijn dergelijke toetsen minder goed bruikbaar door zowel de trage groei van de planten als de lage ontwikkelingssnelheid van de ziekten en plagen. Ook in de zomer, bij extreem zonnig en warm weer, zijn er beperkingen aan de uitvoering van dergelijke toetsen.

Omdat er binnen soorten grote rasverschillen kunnen zijn, en bijvoorbeeld ook de teeltomstandigheden van invloed zijn op het secundair metabolisme en daarmee de gehaltes van plantenstoffen, zouden er bij interessante "hits" nog vele biotoetsen uitgevoerd kunnen worden om beter inzicht te krijgen in de bioactiviteit als gewasbescherming. Ook zijn er vele mogelijkheden te bedenken van het mixen van extracten, om meer effectieve middelen te genereren. Hiervoor zijn in beginsel enorme hoeveelheden combinaties te maken, die ook allemaal in biotoetsen getest zouden moeten worden. Tenslotte zijn in de zoektocht naar het precieze molecuul, dan wel de combinatie van moleculen, die verantwoordelijk zijn voor de bioactiviteit in een extract, zijn nog vele biotoetsen nodig in het proces van fractioneren en opzuiveren.

Het moge duidelijk zijn dat de mogelijkheden met de in onderhavig project gebruikte biotoetsen, sterk budget gelimiteerd zijn. High-throughput screening methoden zouden een belangrijk alternatief kunnen zijn, mits de resultaten daarvan uiteraard voldoende verklarend zijn voor de bioactiviteit in praktijk omstandigheden.

#### 4.1.1 Gewaskeuze

Zelfs als er een high-throughput screening methode beschikbaar komt, is het gezien de grote hoeveelheid mogelijk te screenen extracten en het gelimiteerde budget van belang om te kiezen voor een beperkt aantal combinaties van gewassen en doel-organismen.

Criteria hierbij zijn:

1. Waar is over een aantal jaar het meeste behoefte aan?
2. Welke extracten zijn het meest effectief qua gewasbescherming?
3. Welke extracten zijn de relatief goedkoopste om te maken?
4. Welke extracten zijn het beste beschikbaar?

- Ad 1. Momenteel is van de onderzochte plagen trips de belangrijkste plaag: het is een probleem in veel gewassen en moeilijk te bestrijden. Het vermoeden is dat dit ook de komende jaren nog wel zo zal blijven. Verder dreigen de neonicotinoïden als gewasbeschermingsgroep te verdwijnen. Hierdoor zal in sommige gewassen een probleem ontstaan met bladluis (en ook met witte vlieg). Van de schimmels lijkt meeldauw momenteel het grootste probleem. Wel komen er nieuwe biologische middelen op de markt; het is daardoor lastig in te schatten wat de urgentie op termijn zal zijn.
- Ad 2. Op basis van de resultaten van dit onderzoek, kunnen keuzes gemaakt worden op basis van verwachte effectiviteit per target organisme.
- Ad 3a. Plantonderdelen waar relatief veel biomassa van aangemaakt wordt zoals bladeren, zijn economisch gezien interessanter dan waar weinig biomassa van wordt aangemaakt zoals bloemen en wortels (uitgaande van vergelijkbare effectiviteit).
- Ad 3b. Daarnaast verschillen de kostprijzen van de verschillende siergewassen door onder meer verschillende kosten van uitgangsmateriaal, arbeid, energie en toegerekende vaste kosten. KWIN (Vermeulen 2014) geeft hier informatie over, maar alleen voor de grotere tuinbouwgewassen.
- Ad 4. De teeltarealen in Nederland (CBS data) geven een indicatie van het beschikbare volume aan product. Preciezer zullen de aanvoercijfers op de bloemenveilingen zijn, maar deze zijn niet openbaar.

In onderstaande tabel staat het probleemorganisme waarvoor we in de nabije toekomst de meeste vraag naar nieuwe middelen voor verwachten (het 1<sup>e</sup> criterium), in de meest linkse kolom (trips). Per kolom (ziekte of plaag) hebben de extracten een rangnummer gekregen, waarbij niet meer dan de top drie extracten per ziekte of plaag is vermeld. De rangnummering per kolom is als volgt tot stand gekomen. Als eerste is naar de effectiviteit in het huidige onderzoek gekeken: het extract met het meeste effect scoort rangnummer 1, enzovoorts. (criterium 2). Als meerdere extracten min of meer vergelijkbare effectiviteit vertoonden, is gekeken naar het materiaal waarvan het extract gemaakt is: stengels en bladeren scoren hoger dan wortels of bloemen (criterium 3a). Op deze wijze kon per ziekte en plaag één nummer 1 en één nummer 2 worden vastgesteld.

Tabel 5

*Rangnummering van extracten op basis van effectiviteit tegen het betreffende doelorganisme, en de relatieve hoeveelheid biomassa van het plantorgaan waarvan het extract is gemaakt.*

Extract	Trips	Luis	Spint	Meeldauw	Botrytis
B014	1	1			
B017	2		1	1	1
B046	3				
B013		2			
B015		3			
B011			2		
B001				2	2
B012			3		
B005			3		
B004				3	3
B003					3

Een verdere verfijning is niet gemaakt, waardoor er bij sommige ziekten en plagen meerdere nummers drie zijn gevonden. Indien verfijning in een later stadium nodig blijkt, kan gekeken worden naar kostprijs (criterium 3b) en eventueel nog naar beschikbaarheid (criterium 4).



## 4.2 Plantversterking

Meermalige behandelingen met plantextracten geeft geen negatieve ontwikkeling op de gewasgroei. De preventieve en systemische werking van plantextracten ter preventie van meeldauw lijkt vooralsnog beperkt. Tegelijkertijd zijn er bepaalde behandelingen met plantextracten die de planten juist gevoeliger maken voor meeldauw. Het werkingsmechanisme hierachter moet nader onderzocht worden.

Opvallend is ook dat de controlebehandeling met 84% ethanol (niet verdund) de aantasting lijkt te verergeren. Ervaringen uit onderzoek door Explant Technologies (Schulte 2015) heeft geleerd, dat ethanol ook in zeer geringe concentraties de genexpressie kan beïnvloeden. Hierdoor kunnen pathways voor de vorming van beschermende eiwitten beïnvloed worden. Het is daarom van belang om in een eventueel vervolg goede controles qua solvent in het onderzoek mee te nemen.

De effecten op hormonale afweerreacties tegen meeldauw (glucanase analyses) zijn niet in onderhavig project bepaald. Wel is er materiaal verzameld; indien er (financiële) gelegenheid komt, kunnen deze analyses alsnog worden gedaan. De resultaten daarvan zijn van belang voor het ontwerp van een vervolgprouf, waarin combinaties worden aangelegd van plantextracten die enig systemisch effect vertonen of een goede contactwerking zodat synergistische combinaties zijn op te sporen.

## 4.3 Metabolietanalyse

Het blijkt dat identificatie van inhoudsstoffen zeer tijdrovend is. Gezien het beperkte budget hiervoor is het nodig om een duidelijke selectie te maken op basis van bio-activiteit gemeten aan deze extracten of op basis van literatuurgegevens. Gezien de grote variatie in inhoudsstoffen tussen soorten en tussen weefsels is het nuttig te richten op verschillen in inhoudsstoffen tussen actieve en inactieve extracten die verder zeer vergelijkbaar zijn (bijvoorbeeld genetisch nauw-gerelateerde variëteiten van hetzelfde gewas). Ook kunnen bioactieve extracten verder worden gefractioneerd en deze kleinere fracties getest op hun bio-activiteit en samenstelling inhoudsstoffen (klassieke 'bioactivity-guided fractionation'). Dit vergt echter een groot aantal bioactiviteit toetsen.

## 4.4 Obesitas screening

Van de geselecteerde gewassen hebben vier extracten een significant effect op het vetmetabolisme in het diermodel *C. elegans*. Daarvan zijn er drie met een anti-obesitas effect en er is er één met een vetopbouwend effect. Opvallend is dat extracten van andere rassen binnen dezelfde soort of zelfs andere plantendelen van dezelfde plant dit effect niet hebben. Op zich is dat niet verontrustend. Vaak is een exacte samenstelling van stoffen noodzakelijk om een biologisch effect te genereren. Die exacte samenstelling is sterk afhankelijk van ras en teeltomstandigheden. Kleine variaties in teeltomstandigheden kunnen al bepalend zijn in hoeverre een plant/extract wel of niet werkzaam is. Om hier meer zicht op te krijgen is het belangrijk om alle stoffen die gecorreleerd zijn aan het vet verlagende effect in kaart te kunnen brengen. Een metabolomics aanpak is hierbij een interessante optie. Metabolomics en het diermodel *C. elegans* vormen een uitstekende combinatie omdat je high-throughput kunt screenen en omdat de foutmarges in de uitleesparameters bij *C. elegans* erg klein zijn. Omdat bij een metabolomics aanpak honderden, veelal onbekende, metabolieten gedetecteerd kunnen worden, is een ruime variatie in bioactiviteit over een groot aantal samples voorwaarde om toevalstreffers uit te kunnen sluiten.

Naast extracten met een vetopbouw-remmend effect valt ook een extract op door haar vetopbouwende effect. Ook dit is farmaceutisch gezien erg waardevol voor toepassingen voor anorexia en voor het aansterken bij bv HIV patiënten of patiënten na een zware operatie of chemokuur.

In deze proef is in eerste instantie gescreend op de vetopbouwende of vetopbouw-remmende potentie van een extract. Bij een positieve hit kan *C. elegans* vervolgens worden ingezet om te bepalen hoe het extract werkt, via welk mechanisme. Minder vet kan bijvoorbeeld het resultaat zijn van minder opslag van vet, van vetafbraak, maar bijvoorbeeld ook van minder honger gevoel.

Van *C. elegans* is een bibliotheek beschikbaar van alle 18.000 genen. Van deze 18.000 genen zijn er 160 genen in kaart gebracht die een rol spelen in het vetmetabolisme en die een homoloog hebben in de mens. De activiteit van elk van deze genen is via RNAi heel specifiek te onderdrukken. Hierdoor kan op een snelle manier in kaart worden gebracht welke genen betrokken zijn bij het vetopbouwend of vetopbouw-remmende effect van de bovengenoemde planten. Als deze genen in kaart zijn gebracht kan vervolgens de route worden bepaald die leidt tot deze effecten en kan voorspeld worden hoe het extract bij de mens zal werken. Inmiddels is het systeem op basis van diermodel *C. elegans* ook draaiende voor diabetes T2, kanker en toxiciteit.

# 5 Aanbevelingen voor vervolg

## 5.1 Gewasbescherming

Onderhavig project heeft aangetoond dat er perspectieven zijn voor de toepassing van extracten dan wel plantenstoffen uit siergewassen in de gewasgezondheid. Het ligt dan ook voor de hand om vervolgstappen te zetten, die uiteindelijk tot daadwerkelijk praktijktoepassing moeten gaan leiden. Daarbij zijn een aantal zaken van belang, die hieronder worden beschreven.

### 5.1.1 High throughput bioassay

Voor de verschillende vervolgstappen is het aan te bevelen na te gaan, of een goedkoper en sneller alternatief voor biotoets beschikbaar is, dan wel ontwikkeld kan worden. Wageningen UR Bioscience en Wageningen UR Glastuinbouw gaan momenteel na, wat de mogelijkheden zijn voor een high throughput biotoets voor het testen van middelen en plantextracten tegen insecten. Een van de mogelijkheden is een koppeling te maken tussen de LCMS scheidingstechniek, zoals in dit rapport is beschreven, met video-trackingtechnieken om het gedrag van insecten te volgen op een waardplant behandeld met en zonder plantextract. een dergelijk video tracking systeem is al getoetst bij luizen, trips en witte vlieg, zie oa (Kloth *et al.* 2015). Er is een aanvraag gedaan bij Technology Hotel regeling van ZonMW voor financiële ondersteuning bij de ontwikkeling van dit systeem. De uitslag wordt in het 1<sup>e</sup> kwartaal van 2016 verwacht.

### 5.1.2 Formulering van het middel

Op voorhand was het de bedoeling om middels fractionering, opzuivering en biotoetsen vast te stellen, welke moleculen verantwoordelijk zijn voor activiteit tegen bepaalde ziekten of plagen. Dit is een kostbaar en langdurig proces, mede door de vele biotoetsen die daarmee gepaard gaan, waarvan de kans op succes op voorhand niet vast staat. Het kan namelijk heel goed zijn dat een extract met een combinatie van verschillende moleculen effectiever is dan een enkel opgezuiverd molecuul. Daarnaast bestaat de kans dat een enkel molecuul chemisch dan wel via een biochemisch platform (bijvoorbeeld met gisten) veel goedkoper en eenvoudiger geproduceerd kan worden dan via plantextracten.

Gedurende het onderzoek zijn oriënterende gesprekken gevoerd met bedrijven die gewasbeschermingsmiddelen op de markt brengen. Van hen willen we graag weten hoe belangrijk het is om het exacte molecuul te weten. Voor registratie als gewasbeschermingsmiddel lijkt dit een must, maar wellicht zijn er andere mogelijkheden die voor zowel deze bedrijven als de telers van siergewassen commercieel gezien aantrekkelijk genoeg zijn. Deze oriënterende gesprekken zullen worden voortgezet. Daarbij wordt onderzocht of ook dit type bedrijven aan het consortium voor vervolgonderzoek kunnen worden toegevoegd, en onder welke voorwaarden.

In het kader van de formulering van het product lijkt ook nog veel te winnen. In onderhavig project zijn de extracten op basis van ethanol gemaakt en vervolgens met water verdund. Van gewasbeschermingsmiddelen is bekend, dat hulpstoffen de werking van de stoffen sterk kunnen vergroten, denk bijvoorbeeld aan uitvloeiers, hechters, verdampingbeperkers, pH stabilisatoren etc, zie bijvoorbeeld (Ruiter 2012).

### 5.1.3 Businessmodel

Vanwege de perspectieven die in onderhavige studie reeds zijn aangetoond, verdient het aanbeveling om goed na te denken over het businessmodel waarin de toepassing van plantextracten dan wel plantenstoffen uit siergewassen in de gewasgezondheid kan worden gegoten. Vanwege het publieke en collectieve karakter van het onderzoek tot nu toe, is het uitgangspunt bij dit model een vorm waarbij de collectieve Nederlandse sierteeltsector optimaal zou moeten kunnen profiteren. Een model dus, waarbij op voorhand nog geen exclusieve posities worden verleend, niet aan fabrikanten en leveranciers van de gewasbeschermingsmiddelen, maar ook niet aan individuele kwekers en/of verdelingsbedrijven. Het ligt derhalve voor de hand om coöperatieve constructies te verkennen. Royal FloraHolland kan als coöperatie hierbij wellicht een goede rol spelen.

## 5.2 Plantversterking

De perspectieven uit het plantversterkingsonderzoek waren niet zo veelbelovend als die uit het gewasbeschermingsonderzoek. Het dient echter aanbeveling om nog een aantal toetsen uit te voeren, waarbij extracten niet alleen op basis van ethanol maar ook op basis van andere draagstoffen toegevoegd dienen te worden. Het verdient aanbeveling om in een dergelijk vervolg ook te kijken naar de genen, metabolieten en eiwitten, om de werking van de middelen goed aan te kunnen tonen.

Het voordeel van deze vorm van bevordering van de gewasgezondheid ligt in de toelating: de toelating van middelen voor plantversterking is eenvoudiger, goedkoper en sneller dan die van gewasbeschermingsmiddelen.

## 5.3 Obesitas

De screening tegen obesitas in onderhavig onderzoek heeft interessante resultaten opgeleverd. Het verdient aanbeveling om deze resultaten in een breder palet van onderzoek naar werking van plantenstoffen tegen obesitas te plaatsen. Zo vindt er momenteel onderzoek plaats in het kader van de Topsector Tuinbouw & Uitgangsmateriaal, waarbij de perspectieven van het gewas *Dioscorea* worden onderzocht. Een gestructureerde aanpak, op basis van literatuuronderzoek en duidelijke referenties waartegen de resultaten van individuele extracten dan wel moleculen kan worden afgezet, lijkt een verstandige aanpak. Dit zal buiten de scope vallen van een eventueel vervolg op onderhavig project.

# Literatuur

Anonymous (2013)

*Gezonde groei, duurzame oogst; Tweede notaduurzame gewasbescherming periode 2013 tot 2023*, Den Haag: Ministerie van Economische Zaken.

Dijksma, S. (2014)

*Laag-risico gewasbeschermingsmiddelen*, Den Haag: Ministerie van Economische Zaken.

Kloth, K., Broeke, C. T., Thoen, M., Hanhart- van den Brink, M., Wieggers, G., Krips, O., Noldus, L., Dicke, M. and Jongsma, M. (2015)

'High-throughput phenotyping of plant resistance to aphids by automated video tracking', *Plant Methods*, 11(4).

Korthout, H. and Holtman, W. (2013)

*Business case inhoudstoffen voor preventie of bestrijding van pathogenen*, Leiden: Fytagoras.

Ruiter, H. d. (2012)

'Hulpstoffen in gewasbescherming', [online], available: <http://www.lltb.nl/stream/hulpstoffen-in-gewasbescherming-hans-de-ruiter-surfaplus>

Schulte, A. (2015)

*Effect ethanol op metabolisme in relatie tot merkers*, unpublished.

Staaij, M. v. d. and Groot, E. d. (2013)

*Testing the efficacy of pesticides against thrips, *Franliniella occidentalis**, Wageningen: Wageningen UR.

Vermeulen, P. C. M. (2014)

*Kwantitatieve Informatie voor de Glastuinbouw : Kengetallen voor Groenten - Snijbloemen - Pot- en perkplanten teelten. Editie 23 (KWIN 2014-2015)*, Bleiswijk: Wageningen UR Glastuinbouw.



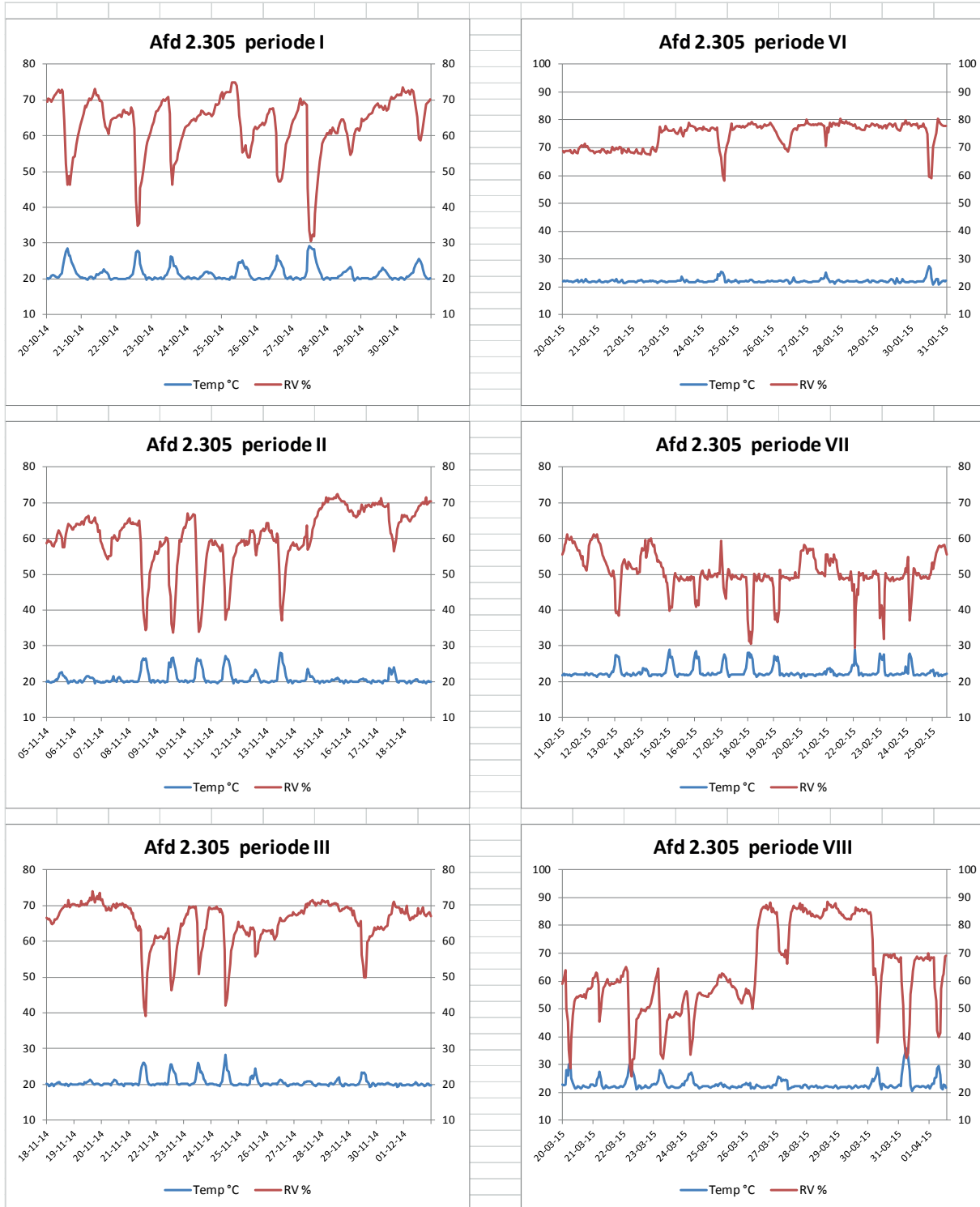
# Bijlage 1 Matching bioactieve extracten met geslachtenlijst van de extractenbibliotheek

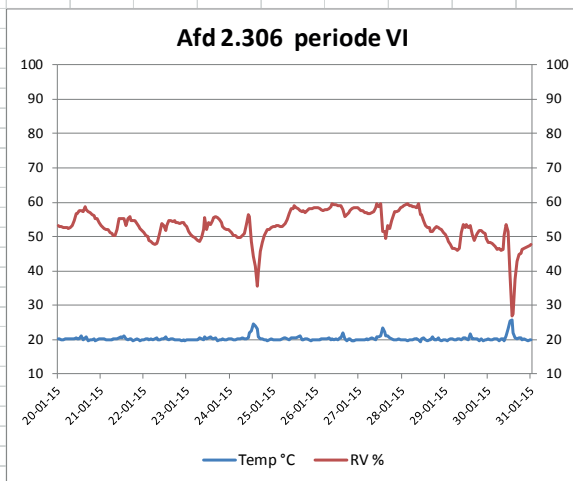
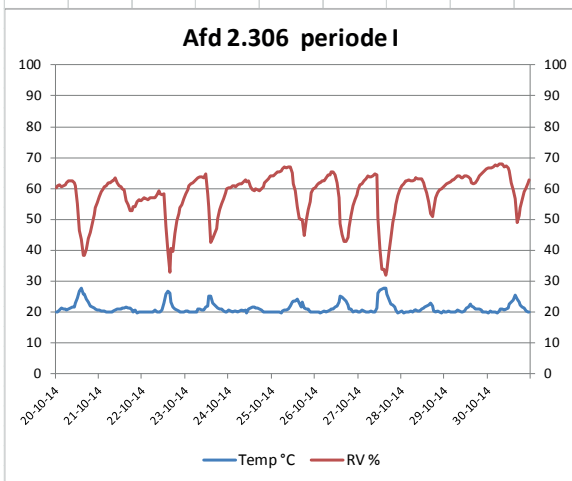
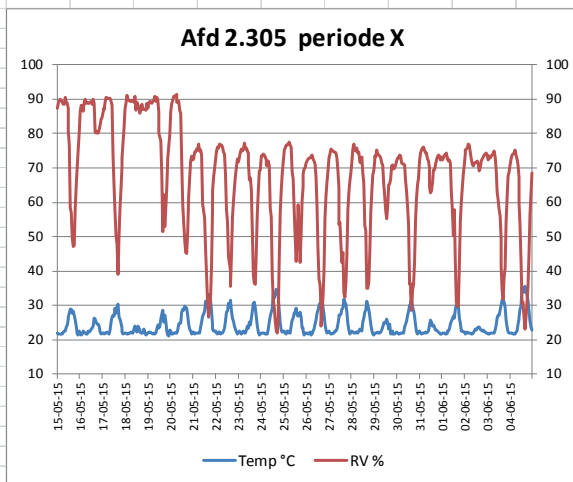
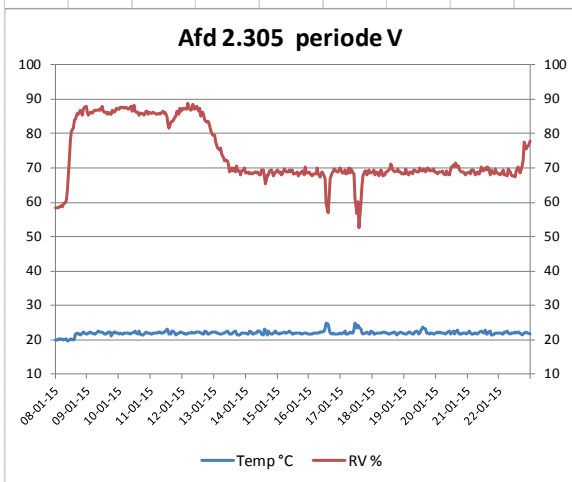
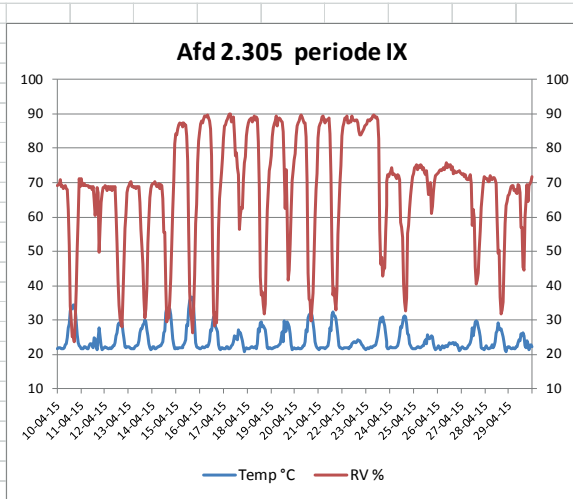
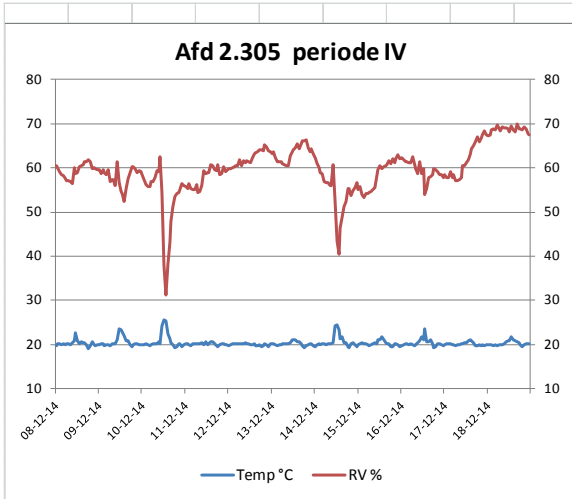
geslacht	soort	deel	Werking	specificiteit
Acacia	concinna	vrucht	Nematicide	meloidogyne incognita
Achillea	millefolium	zaad	nematicide	meloidogyne incognita
Ageratum	conyzoides	blad	nematicide	meloidogyne incognita
Andropogon	muricatus	wortel	anti-bacterieel	pseudomonas mangiferae
Anthericum	liliago	zaad	fungicide	fusarium culmorum
Artemisia	absinthium	blad	nematicide	meloidogyne incognita
		cina	nematicide	meloidogyne incognita
		dracunculus	fungicide	botrytis allii
Amaryllis	belladonna	bol	fungicide	botrytis cinerea
		bol	fungicide	fusarium oxysporum
		plant	fungicide	fusarium solani
Allium	moly	plant	fungicide	fusarium solani
	sativum	bol	anti-bacterieel	Erwinia carotovora
Andropogon	muricatus	wortel	anti-bacterieel	xanthomonas campestris
Arabis	albida	plant	fungicide	fusarium solani
Aubrieta	deltoides	plant	fungicide	fusarium oxysporum
Berberis	julianae	zaad	fungicide	fusarium solani
Caesalpinia	crista	blad	nematicide	meloidogyne incognita
Cannabis	sativa	blad	nematicide	meloidogyne incognita
Callistemon	lanceolatus	blad	fungicide	fusarium oxysporum
Carex	lacustris	plant	fungicide	fusarium roseum
Carum	carvi L.	vrucht	anti-bacterieel	Erwinia carotovora
				xanthomonas vasicatoria
				Pseudomonas syringae
				Pseudomonas reactans
				Pseudomonas viridiflava
Chaenomeles	japonica	ess.olie	insecticide	witte vlieg
		vrucht	fungicide	fusarium solani
Cichorium	intybus	zaad	nematicide	meloidogyne incognita
Corylus	avellana	bloemknop	fungicide	fusarium solani
Crinum	moorei	bol	fungicide	botrytis cinerea
			fungicide	fusarium oxysporum
Curcuma	longa	wortel	anti-bacterieel	Erwinia carotovora
			anti-bacterieel	xanthomonas citri
				xanthomonas malvacearum
Cyperus	rotundus	wortel		pseudomonas solacearum
			anti-bacterieel	xanthomonas campestris
			anti-bacterieel	pseudomonas mangiferae
Danaea	elliptica		fungicide	phytophthora capsici
Eucalyptus	camaldulensis	blad	anti-bacterieel	Erwinia carotovora
			anti-bacterieel	xanthomonas campestris
			fungicide	pseudomonas solacearum
Ficus	spp.	ess. Olie	insecticide	witte vlieg
	religiosa	blad	fungicide	fusarium oxysporum

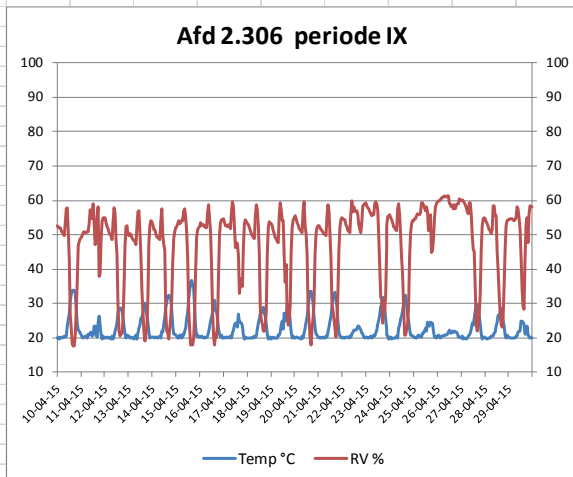
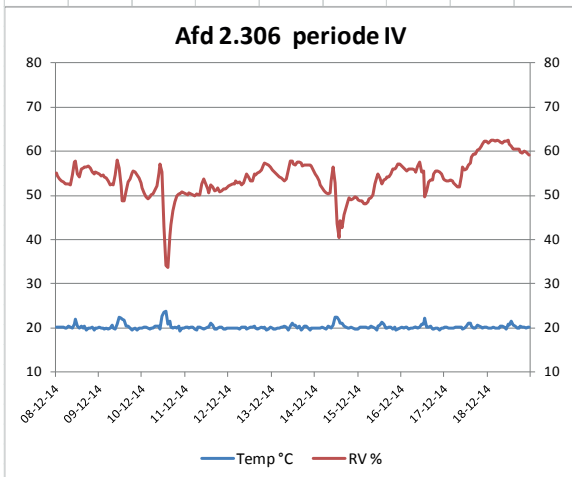
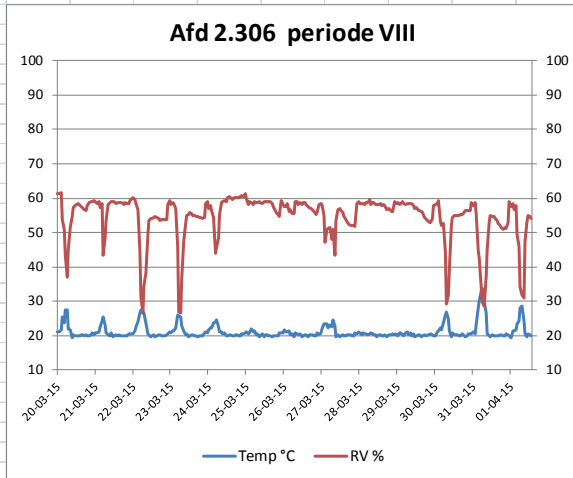
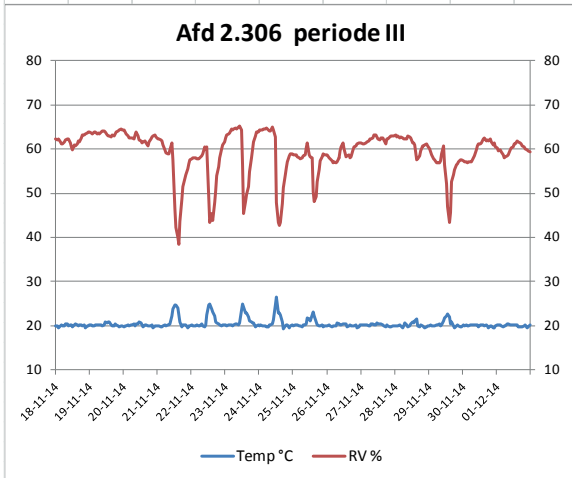
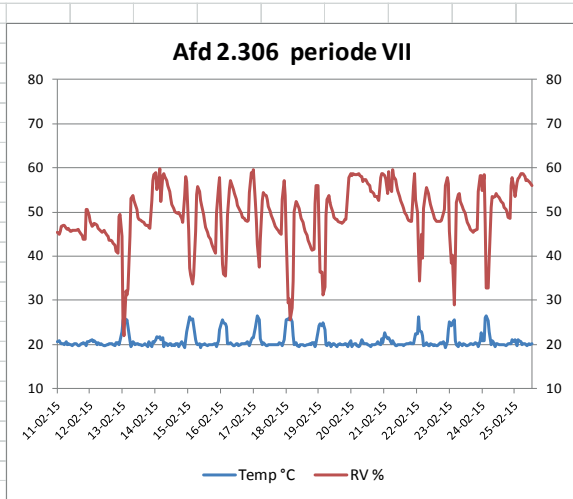
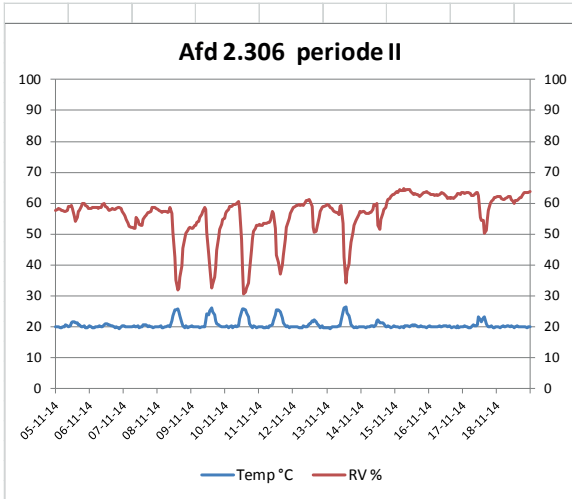
Filipendula	erecta	wortel	fungicide	fusarium solani
	ulmaria	plant	fungicide	fusarium oxysporum fusarium roseum fusarium solani
Geranium	robertianum	plant	fungicide	fusarium oxysporum
Glycyrrhiza	glabra	bast	nematicide	meloïdogyne incognita
Hedera	helix	stam	fungicide	fusarium oxysporum fusarium roseum fusarium solani
				botrytis cinerea
Hymenocallis	littoralis	bol	fungicide	fusarium oxysporum
Juniperus	sabina	hout	fungicide	xanthomonas campestris pseudomonas mangiferae
	macropoda		anti-bacterieel	witte vlieg
Laurus	nobilis	ess.olie	insecticide	fusarium oxysporum
Lychnis	flos-cuculi	plant	fungicide	fusarium culmorum
Malus	florentina	zaad	fungicide	fusarium culmorum fusarium solani
	sylvestris	vrucht	fungicide	witte vlieg
Mentha	balsamea	ess.olie	insecticide	meloïdogyne incognita
	piperita	blad	nematicide	witte vlieg
	pulegium	ess.olie	insecticide	witte vlieg
	spicata	ess.olie	insecticide	witte vlieg
Nephrolepis	rivularis		anti-bacterieel	Erwinia carotovora xanthomonas campestris pseudomonas solacearum
			anti-bacterieel	meloïdogyne incognita katoenluis
Ocimum	sanctum	blad	nematicide	katoenluis
			insecticide	fusarium culmorum
Origanum	canum	blad	insecticide	fusarium moniliforme fusarium solani phytophthora capsici
	montanum	plant	fungicide	fusarium oxysporum fusarium roseum fusarium solani
	minutiflorum	blad	fungicide	Erwinia carotovora xanthomonas campestris pseudomonas solacearum
Polygala	vulgaris	plant	fungicide	Erwinia carotovora xanthomonas campestris pseudomonas solacearum
Polypodium	phlebodium		anti-bacterieel	Erwinia carotovora
Pteridium	aquilinum		anti-bacterieel	Erwinia carotovora xanthomonas campestris pseudomonas solacearum
			anti-bacterieel	Erwinia carotovora xanthomonas campestris pseudomonas solacearum
	inaequalis		anti-bacterieel	Erwinia carotovora xanthomonas campestris pseudomonas solacearum
	vittata		anti-bacterieel	Erwinia carotovora xanthomonas campestris pseudomonas solacearum
Phyllanthus	emblica	blad	nematicide	meloïdogyne incognita
Plantago	ovata	zaad	nematicide	meloïdogyne incognita
Ranunculus	repens	plant	fungicide	phytophthora carotovora
Robinia	pseudoacacia	zaad	anti-bacterieel	Pseudomonas syringae
Rhus	typhina	zaad	fungicide	fusarium culmorum fusarium solani
			fungicide	fusarium moniliforme phytophthora capsici
Salvia	fruticosa	blad	fungicide	phytophthora cinnamomi
Salix	caprea			xanthomonas campestris pseudomonas mangiferae
Sassafras	albidum	hout	anti-bacterieel	phytophthora capsici
Satureja	thymbra	blad	fungicide	phytophthora capsici

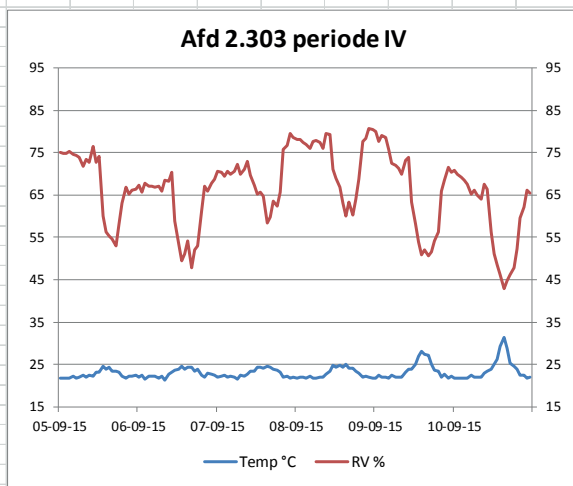
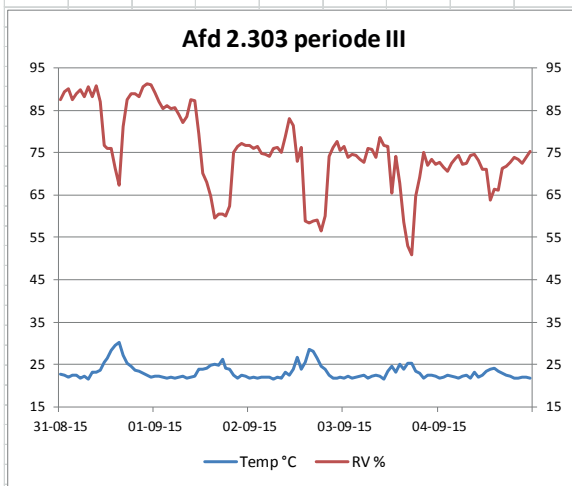
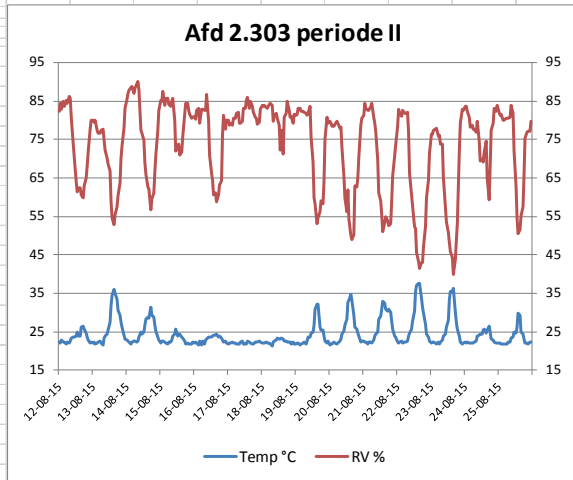
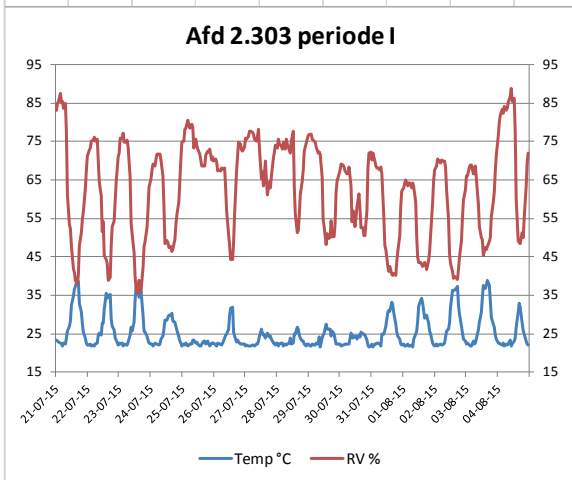
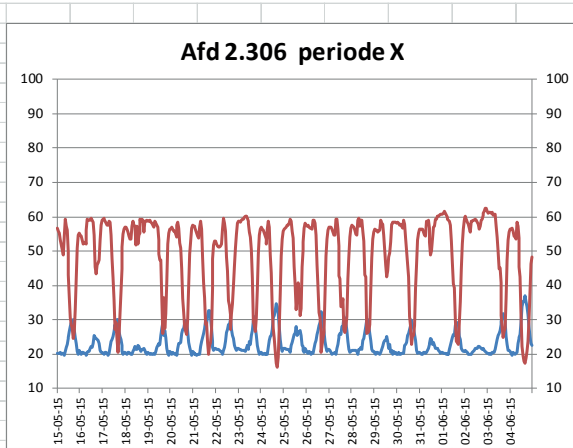
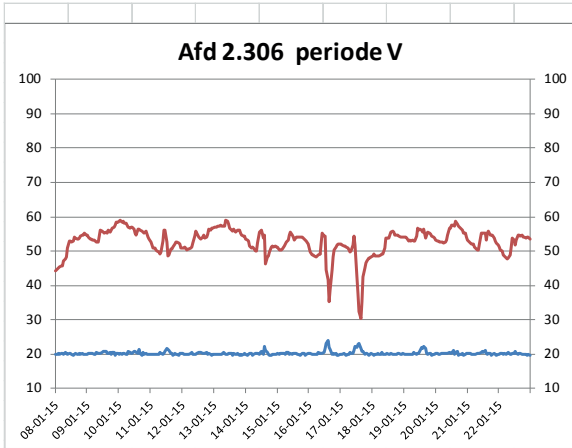


# Bijlage 2 Klimaatgegevens gewasbeschermingstesten















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



Wageningen UR Glastuinbouw  
Postbus 20  
2665 ZG Bleiswijk  
Violierenweg 1  
2665 MV Bleiswijk  
T +31 (0)317 48 56 06  
F +31 (0) 10 522 51 93  
[www.wageningenur.nl/glastuinbouw](http://www.wageningenur.nl/glastuinbouw)

Glastuinbouw Rapport GTB-1387

Wageningen UR Glastuinbouw initieert en stimuleert de ontwikkeling van innovaties gericht op een duurzame glastuinbouw en de kwaliteit van leven. Dat doen wij door toepassingsgericht onderzoek, samen met partners uit de glastuinbouw, toeleverende industrie, veredeling, wetenschap en de overheid.

De missie van Wageningen UR (University & Research centre) is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen UR 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 UR 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.