



Natuurlijke middelen die de weerstand van planten kunnen verhogen

J.M. van der Wolf & S.P.C. Groot





Natuurlijke middelen die de weerstand van planten kunnen verhogen

J.M. van der Wolf & S.P.C. Groot

© 2005 Wageningen, Plant Research International B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Research International B.V.

Deze literatuurstudie is uitgevoerd binnen het kader van het beleidsondersteunend onderzoeksprogramma 'Verbetering van de kwaliteit van plantaardig uitgangsmateriaal voor biologische en duurzame landbouw (BO-04-003)'. Dit programma wordt gefinancierd door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit.

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 47 70 00
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : info.plant@wur.nl
Internet : www.plant.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
1. Introductie	3
2. Mechanismen van weerstandsbevordering	5
3. Natuurlijke middelen die weerstand kunnen versterken	7
3.1 Ruwe extracten	8
3.1.1 Bacterie-extracten	8
3.1.2 Schimmelextracten	9
3.1.3 Plantenextracten	10
3.2 Gezuiverde componenten	10
3.2.1 Carbohydraten	10
3.2.2 Chitine en chitosan	10
3.2.3 Onverzadigde plantaardige vetzuren	11
3.2.4 Organische zuren	11
3.2.5 Overige plantenmetabolieten	12
3.2.6 Schimmelproducten	13
3.2.7 Bladbemestingstherapie	13
4. Behandeling van zaden	15
5. Effect in de praktijk	17
6. Perspectieven op toelating	19
7. Perspectieven voor de biologische landbouw	21
Literatuur	23

Samenvatting

Er zijn een groot aantal natuurlijke middelen bekend die bij gewasbehandelingen weerstand in de plant kunnen induceren tegen een scala aan plantpathogene virussen, bacteriën en schimmels. Voorbeelden hiervan zijn ruwe extracten en gezuiverde componenten van schimmels, afgedode bacteriecellen en gezuiverde bacteriële celwandcomponenten, ruwe plantenextracten, (derivaten) van chitine of ligninen, organische zuren, vitamines, vetzuren, aminozuren en anorganische componenten zoals fosfaat en silicaat.

Sommige van deze middelen zijn ook effectief zaadbehandeling van zaad. Een voorbeeld hiervan is de behandeling van zaad met chitosan, een afbraakproduct van chitine, dat bij tomaat een bescherming geeft tegen *Fusarium oxysporum*, bij tarwe tegen *Fusarium graminearum* en bij gierst tegen valse meeldauw. Verder wordt bij behandeling van gierstzaad met proline, een aminozuur dat bij stress in planten wordt geïnduceerd, eveneens een verhoogde weerstand gevonden tegen valse meeldauw. Zaadbehandeling heeft als voordeel boven gewasbespuitingen dat slechts een klein volume actieve stof gebruikt hoeft te worden, en de behandeling in gesloten ruimte uitgevoerd kan worden.

Inductie van weerstand in de planten is interessant, omdat de (eco)-toxicologische risico's van weerstandsbevorderende middelen vaak klein zijn, de weerstand breedwerkend en systemisch is, er veelal een langdurig effect van de behandeling wordt gevonden en er moeilijk resistentie tegen opgebouwd kan worden. Weerstandsbevordering sluit goed aan bij de biologische landbouw, omdat het de intrinsieke eigenschappen van de plant benut. Een nadeel van het gebruik van weerstandsbevorderende middelen is dat ze vaak minder effectief zijn dan contact middelen. Verder is het tijdstip van toediening kritischer, omdat bescherming pas enkele dagen na toediening gevonden wordt.

Zaadbehandelingen met natuurlijke middelen, die niet op synthetisch chemische wijze zijn verkregen, kunnen in potentie ook toegepast worden in de biologische landbouw. Om een middel te mogen toepassen moet dit in de eerste plaats bij het College Toelating Bestrijdingsmiddelen (CTB) geregistreerd staan als gewasbeschermingsmiddel. Bij deze toelating is essentieel dat het gebruik geen (eco)-toxicologische risico's met zich meebrengt. Aanvullend geldt voor de biologische landbouw dat het middel toegestaan is onder EU verordening 2092/91, annex IIB. Deze lijst is op dit moment zeer statisch; er worden nauwelijks nieuwe middelen aan de lijst toegevoegd. Wel bereidt de Europese Commissie een herziening voor van regelgeving 2092/91. Wellicht geeft dat nieuwe mogelijkheden voor natuurlijke middelen die nu nog niet geaccepteerd zijn of waarvan het effect voorheen nog niet bekend was. Gebruik van middelen die de weerstand van planten kunnen verhogen binnen de biologische sector, zal in de toekomst afhangen van de beschikbaarheid van (kosten)effectieve middelen die geregistreerd zijn als gewasbeschermingsmiddel en die voor de biologische sector aanvaardbaar zijn.

1. **Introductie**

De weerstand van de plant tegen abiotische en biotische stressfactoren wordt bepaald door de genetische achtergrond van de plant en de interactie van de plant met het milieu. Door teeltmaatregelen kan de weerstand bevorderd worden, o.a. door verbetering van de bodemgesteldheid, grondbewerking en bemesting, het regelen van de vocht-huishouding in de grond, het tijdstip van planten, rotatieschema's en het optimaliseren van de plantdichtheid.

Vooraf jonge planten zijn gevoelig voor stress. Het gebruik van ziektevrij, kiemkrachtig zaad met een hoge stress tolerantie is dan ook essentieel voor de teelt van gezonde gewassen. De weerstand van (jonge) planten kan daarnaast verhoogd worden m.b.v. een aantal behandelingsmethoden, waaronder het gebruik van chemisch-synthetische middelen, gewasbeschermingsmiddelen van natuurlijke oorsprong (GNO's), niet-pathogene micro-organismen en fysische behandelingsmethoden. Deze weerstandsbevorderende middelen, ook wel 'elicitors' genoemd, kunnen op het gewassen worden toegepast, maar ook op het zaad.

Het gebruik van weerstandsbevorderende middelen biedt voor de productie van landbouwgewassen interessante mogelijkheden.

1. Vaak zijn deze middelen breed werkend, met een effect tegen virussen, bacteriën en schimmels.
2. Veel van deze middelen kennen een systemische werking, ook op delen van de plant die ruimtelijk gescheiden zijn van de behandelde delen.
3. Ze zijn vaak effectief gedurende een relatief lange periode tot aan de totale levensduur van de plant.
4. Het effect is gebaseerd op verschillende mechanismen in de plant, waartegen het pathogeen moeilijk resistentie kan opbouwen.
5. Van een aantal van deze middelen is bekend dat het gebruik hiervan geen ecotoxicologische risico's met zich meebrengt. In het algemeen leveren middelen die geen antimicrobiële werking hebben minder risico's op voor het milieu. Dit betekent dat toepassing ook geen gevolgen heeft voor de biodiversiteit.
6. Er wordt slechts een verdedigingsmechanisme geactiveerd en niets nieuws toegevoegd. In die zin sluiten weerstandsbevorderende handelingen goed aan bij het biologische gedachtegoed.
7. Er zijn middelen bij, die ook schadeherstel bij planten bevorderen, door weefsels gevoeliger te maken voor eigen groeiregulatoren (plantenhormonen) (Van der Krieken, 1995).

Elicitors bieden vaak wel minder bescherming dan synthetisch chemische gewasbeschermingsmiddelen. Verder is het tijdstip van toediening kritischer (Lyon & Newton, 1997). Bescherming wordt vaak pas een week na toediening verkregen. Tenslotte kan behandeling ook een negatief effect hebben op plantontwikkeling.

In dit overzicht wordt:

1. ingegaan op de achtergrond van weerstandsbevordering,
2. verschillende (categorieën) natuurlijke middelen beschreven die de weerstand kunnen bevorderen, met nadruk op middelen die geschikt zijn voor zaadbehandeling in de biologische landbouw, en
3. stilgestaan bij de regelgeving in Europa t.a.v. het gebruik van natuurlijke middelen in de biologische landbouw.

Er wordt specifiek aandacht besteed aan mogelijkheden voor behandeling van uitgangsmateriaal (zaden, stekken en kiemplanten). In deze studie wordt niet ingegaan op het gebruik van levende micro-organismen voor het induceren van weerstand.

2. Mechanismen van weerstandsbevordering

Er zijn verschillende natuurlijke vormen van weerstandsverhogende reacties bekend. Bij 'systemic acquired resistance' (SAR) wordt de weerbaarheid van de plant bevorderd als reactie op een beperkte infectie met een necrotiserende ziekteverwekker. Bij SAR wordt salicylzuur (systemisch) geaccumuleerd en ook een aantal pathogenese gerelateerde eiwitten, waaronder schimmelwand afbrekende enzymen zoals chitinasen en glucanasen. Verder spelen jasmonzuur en ethyleen een rol, omdat deze componenten de aanmaak van salicylzuur regelen. Toevoeging van salicylzuur aan de plant geeft hetzelfde effect als een ziekteverwekker.

Bij 'induced systemic resistance' (ISR) wordt de weerstand bevorderd door niet-pathogene rhizobacteriën. Ook hier vindt een systemische reactie plaats, die de weerstand tegen virussen, bacteriën en schimmels kan verhogen. In tegenstelling tot SAR, zijn er geen zichtbare symptomen zichtbaar bij de inductie van ISR door rhizobacteriën. Wel kan er onder invloed van rhizobacteriën, lignificatie van de plantencelwanden in de wortel plaatsvinden en de productie van waterstofperoxide worden geïnduceerd. Verder is ISR ook niet geassocieerd met de inductie van pathogenese gerelateerde eiwitten (Hoffland *et al.*, 1996). Bij organismen die ISR induceren, hoeft er geen direct effect van het organisme op de groei van de ziekteverwekker zichtbaar te zijn: niet in *in vitro* assays en ook niet *in planta*. Er is wel gespeculeerd dat in gronden van biologische bedrijven de dichtheden ISR inducerende rhizobacteriën groter zijn dan in conventionele landbouw (Hammerschmidt *et al.*, 2001). Behalve rhizobacteriën kunnen ook (de cultuurfiltraten van) sommige schimmels en mycorrhiza's ISR induceren (Hammerschmidt *et al.*, 2001). Hoewel verschillende signaal-transductie systemen ten grondslag liggen aan ISR en SAR, kunnen beide vormen van resistentie wel gelijktijdig geactiveerd worden, waardoor de resistentiereactie versterkt wordt (Van Wees *et al.*, 2000). Echter, soms werken resistentiemechanismen ook antagonistisch. Zo heeft men aangetoond dat chemische inductie van SAR, de weerstand van de plant tegen herbivoren kan verminderen (Stout *et al.*, 1999).

Geïnduceerde resistentie is vaak geassocieerd met een verhoogde capaciteit van de plant om het defensiemechanisme te mobiliseren en activeren. Dit proces wordt wel 'priming' genoemd (Conrath *et al.*, 2002). Hierbij speelt een specifieke regulator-gen (NPR1) een sleutelrol. Inductie van weerstand kan in de plant leiden tot een cascade van reacties, waaronder een overgevoelheidsreactie (HR-response), de vorming van vrije radicalen ('oxidatieve burst') (Svalheim & Robertsen, 1993), lignificatie van de celwanden, de vorming van extra celwanden op plaatsen waar het pathogeen de plant wil penetreren, de productie van fytoalexinen, en de accumulatie van pathogenese gerelateerde eiwitten (PR-eiwitten), waaronder eiwitten die een fungicide effect hebben (Hammerschmidt & Nicholson, 1999).

In het algemeen duurt het 1 tot 7 dagen voordat SAR of ISR effectief is. Bij ISR en SAR is een typische dosis-response relatie, zoals die bij antimicrobiële middelen gevonden wordt, vaak afwezig. Als het micro-organisme of het middel maar boven een bepaalde drempelwaarde aanwezig is, zal verhoging van de dosis geen extra effect geven. Vaak geldt de weerstandsbevordering van de 'elicitor' gedurende de hele levensduur van de plant, hoewel het effect geleidelijk aan wel minder kan worden (Liu *et al.*, 1995). De verkregen weerstand is niet specifiek en zal gelden tegen schimmels, bacteriën en virussen en incidenteel ook tegen insecten en nematoden (Hoffland *et al.*, 1996). De geïnduceerde weerstand is afhankelijk van het genotype van de plant, waarbij de resistentie vaker in een relatief vatbaar dan in een relatief resistente cultivar wordt opgewekt (Liu *et al.*, 1995).

Inmiddels is inductie van weerstand aangetoond bij meer dan 30 plantensoorten (Sticher *et al.*, 1997). Zowel in dicotyle als monocotyle planten kan de weerstand geïnduceerd worden.

3. Natuurlijke middelen die weerstand kunnen versterken

In Tabel 1 vindt u een overzicht van natuurlijke middelen die de weerstand kunnen versterken.

Tabel 1. Lijst van natuurlijke stoffen die weerstand kunnen induceren in land- en tuinbouwgewassen (o.a. gebaseerd op gegevens van het Scottish Crop Research Institute en De Rocha & Hammerschmidt, 2005).

Inducer	Plant	Pathogeen	Referentie
Schimmelcomponenten			
Myceliumextracten <i>Penicillium chrysogenum</i>	Katoen	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	Dong & Cohen, 2002
Elicitors uit gist	Sla	<i>Botrytis cinerea</i> en <i>Rhizoctonia solani</i>	Lyon <i>et al.</i> , 1995
Conidia <i>Botrytis cinerea</i>	Wortel	<i>Botrytis cinerea</i>	Harding & Heale, 1981
Elicitors <i>Verticillium dahliae</i>	Katoen		Dubery & Slater, 1997
Celwand component van <i>Phytophthora infestans</i> hyphae	Aardappel	<i>P. infestans</i>	Doke <i>et al.</i> , 1987; Cohen <i>et al.</i> , 1991
Eicosapentaenoic acid <i>P. infestans</i>	Aardappel	<i>P. infestans</i>	Lyon <i>et al.</i> , 1995
Arachidonic acid <i>P. infestans</i>	Aardappel	<i>P. infestans</i>	Doke <i>et al.</i> , 1987
Chitosan (ook uit celwand van schaaldieren en insecten)	Komkommer	<i>Pythium aphanidermatum</i>	El Ghaouth <i>et al.</i> 1994
Chitosan oligomeren	Tomaat	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>radicis-lycopersici</i>	Theriault, 1992
Undecagalacturonide <i>P. megasperma</i>	Komkommer		Svalheim & Robertsen, 1993
Bacteriecomponenten			
Wateroplosbare fractie van <i>Burkholderia cepacia</i>	Komkommer	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Park <i>et al.</i>
Lipopolysacchariden <i>Pseudomonas</i>	Anjer	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i>	Van Peer & Schippers, 1992
Lipopolysacchariden <i>Pseudomonas</i>	Radijs	<i>Fusarium</i> verwelking	Leeman <i>et al.</i> 1995
Sideroforen <i>Pseudomonas</i> (via binding ijzer)	Radijs	<i>Fusarium</i> verwelking	Leeman <i>et al.</i> , 1996
Sideroforen <i>Pseudomonas</i> (via binding ijzer)	Tabak	TNV	Maurhofer <i>et al.</i> , 1994
Lipopolysacchariden <i>Xanthomonas</i>	Radijs	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Newman <i>et al.</i> , 1995
Harpin, een hittestabiel eiwit uit <i>Erwinia amylovora</i>	Vele gewassen	virussen, bacteriën, schimmels	Wei <i>et al.</i> , 1992

Tabel 1. (vervolg)

Inducer	Plant	Pathogeen	Referentie
Plantencomponenten			
Extract van <i>Reynoutria sachalinensis</i> (Sachalinse duizendknoop) commercieel preparaat Milsana	Peper	<i>Botrytis cinerea</i>	Schmidt <i>et al.</i> , 1996
Extract van <i>Reynoutria sachalinensis</i>	Begonia	Meeldauw	Herger & Klingauf, 1990
Extract van <i>Reynoutria sachalinensis</i>	Tomaat	Meeldauw	Herger & Klingauf, 1990
Extract van <i>Reynoutria sachalinensis</i>	Komkommer	Meeldauw (<i>Sphaerotheca fuliginea</i>)	Herger <i>et al.</i> , 1988
Ammoniumlignosulfanaat	Tomaat en peper	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Abbasi <i>et al.</i> , 2002
Pulp papierverwerkende industrie in veenmos compost	Tomaat	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Pharand <i>et al.</i> , 2002
Oxaalzuur	Komkommer	<i>C. lagenarium</i>	Doubrava <i>et al.</i> , 1988
Salicylzuur	Komkommer	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Narusaka <i>et al.</i> , 1999
Salicylzuur	Kiwi	<i>S. sclerotiorum</i>	Reglinski <i>et al.</i> , 2001
Linoleic acid	Aardappel	<i>P. infestans</i>	Cohen <i>et al.</i> , 1991
Jasmonaat (Jasmonzuur en methyl jasmonaat)	Aardappel	<i>P. infestans</i>	Cohen <i>et al.</i> , 1993
Jasmonaat	Gerst	<i>Erysiphe graminis</i>	Schweitzer <i>et al.</i>
Riboflavine	Tabak	<i>Alternaria alternata</i> en TMV	Gozzo, 2003
Riboflavine	Aardbei	Meeldauw	Wang & Tzeng, 1988
Oligogalacturonide	Aardappel	<i>Erwinia carotovora</i>	Davis <i>et al.</i> , 1986
DL- β -aminobutyric acid (BABA)	Diverse gewassen	Diverse pathogenen	Jakab <i>et al.</i> , 2001
2-furoic acid (kan ook door bacteriën worden gemaakt)	Tomaat	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Miyazawa <i>et al.</i> , 1998
Anorganische natuurlijke componenten			
Fosfaat (commercieel beschikbaar als Phytogard)	Sla	<i>Bremia lactucae</i>	Pajot <i>et al.</i> , 2001
Fosfaat	Kool	<i>Peronospora parasitica</i>	Silué <i>et al.</i> , 2001
Fosfaat	Peper	<i>Leveillula taurica</i>	Reuveni <i>et al.</i> , 1998
Micronutriënten (boraat, koper, mangaan)	Komkommer	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Reuveni <i>et al.</i> , 1997
Silicaat	Cucumber	<i>Podosphaera xanthii</i>	Liang <i>et al.</i> , 2005

In de volgende paragrafen wordt dieper ingegaan op de verschillende categorieën middelen.

3.1 Ruwe extracten

3.1.1 Bacterie-extracten

Park *et al.* vond dat een bladbespuiting met een water oplosbare fractie van een extract van *Burkholderia cepacia* bacteriën (stam 923-87) ISR induceerde tegen anthracnose op komkommer, veroorzaakt door *Colletotrichum orbiculare*. Hierdoor werd het percentage bladoppervlak met lesies verlaagd van 40 naar 8%. Behandeling van het

blad verhoogde de productie van waterstofperoxide en een pathogenese gerelateerd eiwit (PR-1a) en veroorzaakte een overgevoeligheidsreactie.

Er zijn verschillende bacteriële componenten geïsoleerd die verantwoordelijk zijn voor een dergelijke weerstandsverhoging. Van ISR inducerende *Pseudomonas* soorten bleken de lipopolysacchariden (LPS) hiervoor verantwoordelijk. LPS-negatieve mutanten gaven geen ISR-reactie (Van Peer & Schippers, 1992; Leeman *et al.*, 1995, 1996). Ook de LPS van de ziekteverwekkende bacterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gaf een weerstandsverhoging door inductie van de glucanase activiteit in radijs (Newman *et al.*, 1995). De in de celwand verankerde lipide A fractie, bestaande uit vetzuren, was verantwoordelijk voor de inductie. Het naar buiten gerichte O-antigen, bestaande uit suikermoleculen, had geen effect bij behandeling van radijs zaailingen. De lipide A fractie van andere bacteriesoorten als *Escherichia coli* en *Salmonella minnesota* hadden geen effect op de glucanase activiteit.

Ook sideroforen kunnen verantwoordelijk zijn voor SAR inductie. Sideroforen zijn laagmoleculaire verbindingen die sterk ijzer binden. Met pyoverdines, sideroforen uit *Pseudomonas*, kon o.a. SAR in tabak geïnduceerd worden tegen het tabaksnecrose virus (Maurhofer *et al.*, 1994).

Sommige *Pseudomonaden* produceren salicylzuur, dat weerstandsbevorderend werkt. Salicylzuur-negatieve mutanten van de bacterie verloren deze eigenschap, terwijl ook tabaksplanten die getransformeerd waren met een salicylzuur-afbrekend enzym ISR-negatief waren (Delaney *et al.*, 1994). Mogelijk dat salicylzuur aan ijzer bindt en dat het complex als elicitor functioneert.

ISR kan worden geïnduceerd door Harpin, een zuur hittestabiel eiwit met een MW van 44 kD geproduceerd door de plantpathogene bacterie *Erwinia amylovora* (Wei *et al.*, 1992). Harpin kan worden gebruikt voor bladbehandelingen van verschillende plantensoorten, waar het zowel wortelgroei als een resistentiereactie induceert. Harpin is gepatenteerd en gecommmercialiseerd. Het wordt m.b.v. GMO's in grotere hoeveelheden geproduceerd en is in die vorm derhalve niet toelaatbaar in de biologische landbouw.

3.1.2 Schimmelextracten

Gedroogd afgedood mycelium van de schimmel *Penicillium chrysogenum* en waterextracten hiervan, waren in staat weerstand te induceren tegen *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* in katoenplanten (Dong & Cohen, 2002). De myceliumextracten hebben geen direct effect op deze pathogenen. Grond verrijkt met 0.25-2% van het mycelium gaf een bescherming van 32-75%, toevoeging van het waterextract (5%) aan grond een bescherming van 51-75%, terwijl behandeling van het zaad (24 uur, 5-10%) een bescherming van 28-35% gaf. Het *P. chrysogenum* extract gaf bij het aangieten van de wortelstelsels ook bescherming tegen *Fusarium moniliforme* in maïs en *F. oxysporum* f.sp. *melonis* in meloen (Gao *et al.*, 2001; Dong & Cohen, 2001). Bij bladbehandeling is de effectiviteit afhankelijk van het tijdstip van toediening.

Ook extracten van andere niet-pathogene schimmels kunnen als elicitor functioneren. Cultuurfiltraten van plantengroei stimulerende schimmels induceerden ISR tegen *Colletotrichum orbiculare*, door lignificatie van plantencelwanden (Koike *et al.*, 2001). Celwandextracten van gist kunnen weerstand induceren tegen o.a. valse meeldauw in sojabonen en gerst, en *Botrytis cinerea* en *Rhizoctonia solani* in sla (Lyon *et al.*, 1995). Behandeling induceert de activiteit van fytoalexinen. De formulering van het toegepaste middel is belangrijk voor de effectiviteit, met name het gebruik van een geschikte adjuvant. Echter, de relatie tussen de resultaten in laboratoriumproeven en veldexperimenten voor bestrijding van valse meeldauw in gerst was zwak.

Ook componenten van plantpathogene schimmels kunnen weerstand in planten induceren. Conidia van *Botrytis cinerea*, die d.m.v. een hittebehandeling afgedood waren, induceerden weerstand tegen *B. cinerea* op wortelschijven. Er werd na behandeling een versterkte verkurking van het weefsel en een accumulatie van fytoalexinen gevonden (Harding & Heale, 1981; Garrod *et al.*, 1982).

Uit *Verticillium dahliae* zijn niet-geïdentificeerde elicitors geïsoleerd, die naast een overgevoeligheidsreactie de productie van PR gerelateerde eiwitten en fytoalexinen induceerden in bladeren van katoen (Dubery & Slater, 1997). Schimmelextracten zijn relatief éénvoudig tegen lage kosten in grote hoeveelheden te produceren.

3.1.3 Plantenextracten

Ethanol-extracten van de plant *Reynoutria sachalinensis* gaven bij bladbespuitingen bescherming tegen echte meeldauw op begonia, tomaat en komkommer en tegen *Botrytis* op peper (Schmidt *et al.*, 1996; Herger & Klingauf, 1990, Herger *et al.*, 1988). Dit extract lijkt een laag risicoprofiel te hebben. Het gebruik hiervan voor bestrijding van ziekten en plagen is gepatenteerd en vermarkt onder de naam Milsana.

Bladbehandelingen met 4% ammoniumlignosulfonaat, een afvalproduct van de papierindustrie, gaf geïnduceerde weerstand in tomaat en peper tegen de bacterie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Abbasi *et al.*, 2002). Er werden geen fytoxische effecten waargenomen.

Bespuitingen van de onderkant van komkommerbladeren met extracten van spinazie of rabarber induceerde resistentie tegen *Colletotrichum lagenarium* (Doubrava *et al.*, 1988). Het effect hiervan was al zichtbaar 20-36 uur na de bespuiting. Oxaalzuur werd geïdentificeerd als de actieve component.

Behalve het gebruik van bladbespuitingen, kan ook het verwerken van plantenproducten in substraten leiden tot inductie van weerstand. Het gebruik van veenmos compost waar pulp en afval van de papierverwerkende industrie doorheen was gemengd gaf bij tomatenplanten een verhoogde resistentie tegen de bodemgebonden schimmel *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Pharand *et al.*, 2002). Behandeling resulteerde o.a. in de afzetting van lignine en callose in de celwanden van de vaatbundels in de wortel.

3.2 Gezuiverde componenten

3.2.1 Carbohydraten

Verskillende oligosacchariden kunnen fungeren als een elicitor voor systemische resistentie. Door afbraak van pectines tijdens de pathogenese worden er oligogalacturonides gevormd die resulteren in een accumulatie van fytoalexinen (Davis *et al.*, 1986). Het resultaat was afhankelijk van het molecuulgewicht van de oligogalacturonides.

Oligomeren van galacturonzuur en oligoglucanen, geïsoleerd uit *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*, waren in staat om in relatief lage concentraties (5-100 µg/ml voor undecagalacturonide en 0.1 µg/ml voor oligo-β-glucan) binnen 6-10 uur een sterke accumulatie van waterstofperoxide in komkommer hypocotylen te induceren (Svalheim & Robertsen, 1993). Peroxidasen zijn betrokken bij de lignificatie van plantencelwanden, en bij de cross-linking van hydroxyproline-rijke glycoproteïne en suberine precursors, processen die van belang zijn bij de weerbaarheid tegen schimmels.

Oligosacchariden zijn in het algemeen wateroplosbaar, weinig toxisch en relatief goedkoop te extraheren uit schimmel en plantmateriaal. Het gebruik van oligogalacturonides voor de beheersing van plantenziekten d.m.v. gewasbespuitingen is gepatenteerd, evenals methoden voor de extractie van deze verbindingen (Lyon *et al.*, 1995).

3.2.2 Chitine en chitosan

Chitine is een component van de celwand van schimmels, insecten en schaaldieren. Chitine kan ook weerstand in verschillende planten induceren. Resistentie tegen schimmelziekten door accumulatie van fytoalexinen en/of lignificatie na behandeling met chitine is aangetoond bij o.a. aardappel (*Phytophthora infestans*), tomaat (*Fusarium*

oxysporum), komkommer (*Pythium aphanidermatum*, en kool (*Plasmodiophora brassicae*) (Van der Krieken *et al.*, 1995). Soms werd er bij bladbehandeling een fytoxisch effect gevonden, zoals bij kool (Evans, 1993).

Chitosan bestaat uit oligomeren van β -1,4 glucosamines, die ontstaan na chemische (zuur-hydrolyse) of enzymatische afbraak van chitine. Chitosan komt in de celwand van bepaalde schimmels ook van nature voor, zoals bij *Mucor rouxii* (Wu *et al.*, 2005). De chitosan producten kunnen verschillen in gemiddeld molecuulgewicht en de mate van acetylering, maar binden als polykationen onder fysiologische condities allen sterk aan negatief geladen groepen van plant en pathogenen.

Net als chitine kan ook chitosan fungeren als elicitor. Met een concentratie van 3 $\mu\text{g/ml}$ werd de sporenkieming van de schimmel *Fusarium solani* effectief geremd door inductie van fytoalexinen in sojaboon (Keen *et al.*, 1983). Behandeling van tomatenzaad met chitosan induceerde SAR tegen *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Benhamou *et al.*, 1994). De zaden werden 15 min gedompeld in 0.1-1 mg/ml opgeloste chitosan en daarna gedroogd. De behandeling resulteerde in een vertraging van de ziekteontwikkeling, maar niet in een volledige bescherming van de kiemplant. Het effect was concentratie-onafhankelijk. Verder induceerde zaadbehandeling (15 min) met chitosan (2-8 mg/ml) weerstand tegen *Fusarium graminearum* in tarwe (Reddy *et al.*, 1999). Door deze behandeling werd ook de zaadkieming gestimuleerd. Na behandeling van gierst zaad met een formulering van Chitosan (Alexatm) werd een weerstandsbevordering gevonden tegen valse meeldauw (Sharatchandra *et al.*, 2004). Onder kascondities gaf de zaadbehandeling 48% bescherming. Met behulp van bladbespuitingen kon een bescherming van maximaal 71% gerealiseerd worden. Behandeling van sojabonen met gedepolymeriseerde chitine gaf een betere kieming, meer peulen, een hoger droge stof gehalte, een groter gewicht per boon (ca. 20%) en een lager percentage lage kwaliteit bonen dan de onbehandelde controle (Hirano *et al.*, 2000). Het chitine dat enzymatisch gedepolymeriseerd was, gaf een beter resultaat dan met zuur gehydrolyseerde chitine of dan carboxymethyl-chitine. Het groeibevorderende effect was positief gecorreleerd met chitinase activiteit in de boon tijdens de kieming.

Chitosan en chitine kunnen ook een direct antimicrobieel effect hebben. In een concentratie van 0.1% remde beide componenten de groei van de bacterie *Salmonella typhimurium* (Wu *et al.*, 2005). Chitosan had verder een effect op de regulatie van chitine synthase van *Fusarium oxysporum*. Chitine en chitosan kunnen ook een indirect bestrijdings-effect hebben via stimulering van het antagonisme. Chitinase producerende micro-organismen, die de celwand van pathogene schimmels kunnen aantasten, worden door de toevoeging van chitine en chitinase gestimuleerd.

Chitine en chitosan zijn goedkope bulkproducten. Chitosan kan uit chitine worden gemaakt zonder het gebruik van chemisch-synthetische middelen en kunnen beide als 'natuurlijk' beschouwd worden.

3.2.3 Onverzadigde plantaardige vetzuren

Vetzuren bleken in staat een systemische resistentie te kunnen induceren tegen *Phytophthora infestans* in aardappel (Cohen *et al.*, 1991). Van vijf onderzochte vetzuren bleken vooral arachidonzuur en eicosapentenonzuur effectief. Arachidonzuur is van nature aanwezig in de sporen en het mycelium van *P. infestans* en komt vrij in het plantenweefsel na infectie. Dit vetzuur kan worden beschouwd als een niet specifieke elicitor van *P. infestans* (Lyon *et al.*, 1995). Eicosapentanonzuur is in hoge concentraties (25%) aanwezig in visolie en kan daar goedkoop uit gewonnen worden. Bij een concentratie van 2 mg/ml werden aardappelplanten gedurende een periode van 12 dagen effectief beschermd (94-97% minder aangetast bladoppervlak), hoewel deze vetzuren wel op de behandelde bladeren necrotische vlekken veroorzaakten. Linolenic, linoleic en oleic acid waren minder fytoxisch maar gaven ook minder bescherming. De slechte water oplosbaarheid is een nadeel bij het gebruik van deze componenten.

3.2.4 Organische zuren

Salicylzuur bindt aan een receptoreiwit in de plant waardoor de productie van PR-gerelateerde eiwitten en SAR op gang komt. Behandeling met salicylzuur helpt tegen een range van pathogene virussen, schimmels en bacteriën in zowel monocotylen als dicotylen (Kessman *et al.*, 1994). Echter, salicylzuur wordt door de plant vrij snel geïmmo-

biliseerd door conjugatie tot β -glucosides, waardoor geen systemische verspreiding in de plant kan plaatsvinden. Salicylzuur is al in lage concentraties fytotoxisch en wordt niet voor gewasbespuitingen en zaadbehandelingen gebruikt (Jain *et al.*, 1989). Salicylzuur kan ook een direct effect hebben op pathogenen, zoals op de schimmel *Eutypa lata* (Amborabe *et al.*, 2002).

Behandeling van maïs zaad met ascorbinezuur, een antioxidant, stimuleerde zaadkieming en plantgroei (Asthana & Srivastava, 1978). Het vervroegde ook de bloei. Door deze snellere opkomst en groei kan zaadbehandeling met ascorbinezuur mogelijk effectief zijn tegen bodempathogenen. Behandeling met salicylzuur remde de zaadkieming juist. Er is in deze studie niet gekeken naar de inductie van weerstand.

Jasmonzuur is een natuurlijke groeiregulator, die o.a. betrokken is bij sluiting van stomata, veroudering van bladeren en ethyleenproductie bij vruchten. Behandeling van aardappel en tomaat met lage concentraties (62.5 $\mu\text{g/ml}$) jasmonzuur gaf locale bescherming, maar bij hogere concentraties (1 mg/ml) systemische bescherming tegen *Phytophthora infestans* (Cohen *et al.*, 1993). Acht dagen na behandeling was de bescherming nog steeds 77%. Het mechanisme van de bescherming bij deze Solanaceae is niet bekend. Behandeling met jasmonzuur gaf kortdurige bescherming (< 3 dagen) tegen meeldauw (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) in gerst (Schweizer *et al.*, 1993). Jasmonzuur induceert de vorming van een aantal eiwitten, waaronder het natuurlijke fungicide thionine. Ook jasmonzuur is fytotoxisch bij hoge doseringen (> 1 mg/ml). Het gebruik van jasmonzuur voor gewasbespuitingen is gepatenteerd.

DL- β -butyric acid (BABA) is een aminozuur, dat niet in eiwitten wordt ingebouwd en dat weinig in de natuur gevonden wordt (Jakab *et al.*, 2001). BABA is alleen in de exudaten van tomatenplanten gevonden. BABA is een sterke inducer van SAR in veel verschillende pathosystemen, waaronder veel schimmelziekten in groentegewassen (Pajot *et al.*, 2001; Silue *et al.*, 2002). BABA wordt systemisch in de plant getransporteerd en is fytotoxisch in een aantal gewassen. Commercieel verkrijgbare BABA is op chemisch wijze gesynthetiseerd en dus onaanvaardbaar voor de biologische sector. In hoeverre BABA ook op een kosteneffectieve wijze uit tomatenplanten gezuiverd kan worden, is niet bekend.

Oxaalzuur is ook geïdentificeerd als elicitor van weerstandsreacties bij planten. Deze stof komt in grotere hoeveelheden in rabarber voor (zie 3.1.3).

3.2.5 Overige plantenmetabolieten

2-Furoic acid (2FA) is een alkaloïde dat als metaboliet gevonden wordt in de plant *Erythroxylum dekindtii* (www.reciprocalnet.org). Dompeling van wortels in 10 μM 2FA induceerde resistentie in tomatenzaailingen en gaf een betere bescherming tegen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* dan salicylzuur (Miyazawa *et al.*, 1998). De werking berust op de activiteit van celwand gebonden peroxidase, die door de cross-linking van lignine en eiwitten zorgt voor een versterking van de celwand. In hoeverre 2FA op kosteneffectieve wijze als natuurlijk product is te winnen, kan niet gezegd worden. 2FA was zelfs in een concentratie van 1000 μM niet fytotoxisch.

Riboflavine is een plantaardig wateroplosbaar vitamine (B2) dat al in lage dosering (0.5 mM) SAR induceert tegen verschillende ziekten in tabak (*Alternaria alternata* en TMV), tegen *Phytophthora parasitica* in Arabidopsis en, in combinatie met methionine, metaalionen en een surfactant ook tegen meeldauw (*Peronospora* sp.) in aardbeiplanten (Gozzo, 2003; Wang & Tzeng, 1998; Dong & Beer, 2000). Riboflavine is een 'photosensitizer', dat actieve zuurstof produceert in aanwezigheid van reducerende substraten. Riboflavine veroorzaakt geen celdood in planten, maar reageert als een 'elicitor'.

3.2.6 Schimmelproducten

Sommige mycotoxinen, zoals fumonisine B1 uit *Fusarium moniliforme* en het AAL toxine uit *Alternaria alternata*, kunnen ook het resistentiemechanisme van planten activeren (Asai *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 2000). Het is duidelijk dat deze relatief toxische componenten niet voor toepassing als in zaadbehandelingen in aanmerking komen.

3.2.7 Bladbemestingstherapie

Behandeling van kiemplanten met (micro)nutriënten kan resulteren in inductie van weerstand (Reuveni & Reuveni, 1998). Behandeling van kool met fosfaat (K_2HPO_4 en K_3PO_4), gaf bescherming tegen meeldauw in bloemkool (Silué *et al.*, 2002). K_2HPO_4 , gecommmercialiseerd onder de naam Phytogard, gaf in een concentratie van ca. 40 ppm volledige bescherming tegen meeldauw (*Bremia lactucae*) in sla (Pajot *et al.*, 2001). Er werd een direct effect van fosfaat gevonden op de kieming van sporen. Daarnaast werd resistentie geïnduceerd die ten minste 15 dagen duurde, maar er werden geen PR eiwitten geïnduceerd. Dit zou er op duiden dat naast een direct mycotoxisch effect, er mogelijk sprake is van een ISR, maar zeker niet van een SAR respons.

Een enkele behandeling van komkommerbladeren met een micronutriënten oplossing van H_3BO_3 , $CuSO_4$ en $MnCl_2$ of van K_2HPO_4 gaf een sterke reductie van het aantal lesies veroorzaakt door echte meeldauw (*Phaerotheca fuliginia*) als gevolg van een SAR inductie (Reuveni *et al.*, 1997). Bladbespuiting van komkommer met K_2HPO_4 resulteerde in zichtbare necrotische lesies als gevolg van een overgevoeligheidsreactie (Orober *et al.*, 2002). Bij komkommer werd een verhoogde productie van salicylzuur en de vorming van superoxide en waterstofperoxide gevonden, wat duidt op een SAR inductie. Kaliumfosfaat reduceerde ook infecties van tomaat en peper met de bacterie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Abbasi *et al.*, 2002).

Kaliumsilicaat kan meeldauw in komkommer en druif reduceren bij een concentratie van 17 mM (Bowen *et al.*, 1992; Menzies *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 2005). Echter, kaliumsilicaat (K_2SO_3) wordt synthetisch gemaakt en is niet toegestaan in de biologische landbouw.

Behandeling van gierstzaad met 50 mM proline, een aminozuur met een secundaire aminogroep, gaf zowel in kas- als in veldexperimenten een goede bescherming tegen valse meeldauw, veroorzaakt door *Sclerospora graminicola* (Raj *et al.*, 2004). Inductie van resistentie werd ook gevonden drie dagen na bladbehandeling. De resistentie was aanwezig tijdens de gehele ontwikkeling van de plant. Proline had ook een positief effect op de gewasgroei en -ontwikkeling, en de zaadproductie.

Bladbemesting met compost extracten (niet gefermenteerd) of compost thee (gefermenteerd) kan ook weerstand in planten induceren (voor overzichtsartikelen: Litterick *et al.*, 2004 en Scheuerell & Mahaffee, 2002). Goede resultaten zijn o.a. behaald bij de bestrijding van *Xanthomonas vesicatoria* in tomaat (Al-Dhamani *et al.*, 2003). Een deel van het effect wordt veroorzaakt door gunstige micro-organismen die in de extracten aanwezig zijn, maar filter-gesteriliseerde extracten hebben ook een (geringer) effect. Het bestrijdingseffect van een behandeling van het blad met compost thee is in de regel minder dan van synthetische pesticiden.

In veel compostextracten is dierlijke mest verwerkt, waardoor in potentie ook humane- en veterinaire pathogenen via de extracten kunnen worden verspreid. Vermeerdering van de pathogenen tijdens de productie van compost thee is nooit vastgesteld, tenminste zo lang er geen extra nutriënten aan het compost worden toegevoegd. Het reproduceerbaar produceren van compost is lastig, waardoor een bestrijdingseffect moeilijk gegarandeerd kan worden. Verder blijkt er grote variatie te bestaan in de bestrijdingseffecten, afhankelijk van de productiewijze van de compost thee (ingrediënten, fermentatie, beluchting), van het pathogeen en ook van het seizoen. Soms ging een bestrijdingseffect gepaard met een productieverlies, mogelijk door toxische organische zuren die m.n. tijdens anaërobe fermentatie ontstaan. Of zaadbehandeling met (concentraten van) compost thee ook effectief kunnen zijn, is onbekend.

4. Behandeling van zaden

Zaadbehandelingen met componenten die weerstand induceren, kunnen leiden tot een verhoogde resistentie tegen plant pathogenen na kieming. Echter, de ervaringen met natuurlijke componenten zijn beperkt. In Hoofdstuk 3 zijn al voorbeelden genoemd van zaadbehandelingen met twee natuurlijke componenten, nl. chitosan (3.2.2) en proline (3.2.6), die bescherming gaven tegen verschillende pathogenen.

Verder is bekend dat behandeling van katoenzaad met het chemische SAR inducerende agens benzo [1,2,3,] thiadiazole-7-carbothioic acid (BTH=CGA 245704, Ciba Geigy) resulteert in inductie van weerstand tegen *Fusarium* verwelking (Allen, 2001). Deze inducer was ook in staat d.m.v. een zaadbehandeling Brassica's te beschermen tegen zowel de biotrofe schimmel *Peronospora parasitica* (valse meeldauw) en in mindere mate tegen de grondgebonden schimmel *Rhizoctonia solani* (Jensen *et al.*, 1998). Het beschermende effect was voor *P. parasitica* concentratie-onafhankelijk en voor *R. solani* sterk concentratie-afhankelijk. Zaadbehandeling van boon met BTH (1 mg/l, 5 min incubatie) beschermde bonen tegen *Colletotrichum lindemuthianum*, de veroorzaker van anthracnose (Birgirimana & Höfte, 2002). Inductie van weerstand was effectief in zowel gevoelige als resistente cultivars. Verder resulteerde zaadbehandeling (24 uur) van de ogenboon (*Vigna unguiculata*) in bescherming tegen *Colletotrichum destructivum*, wanneer de zaailingen 7 dagen na opkomst werden besmet met het pathogeen (Dada & Lucas, 2001). Behandeling leidde o.a. tot een verhoogde productie van phytoalexinen.

Op basis van de gepubliceerde informatie valt nog niet te voorspellen welke andere natuurlijke middelen d.m.v. zaadbehandeling weerstand kunnen induceren. De componenten moeten in lage concentraties al actief zijn, omdat slechts relatief kleine hoeveelheden, via een coating of in een pellet meegegeven kunnen worden aan het zaad.

5. Effect in de praktijk

Veel van de beschreven middelen zijn alleen onder gecontroleerde omstandigheden in de kas uitgetoetst. Hoewel de informatie wellicht direct toepasbaar is op planten die onder veldomstandigheden worden geteeld, moet bedacht worden dat deze planten vaak al te maken hebben met vele biologische en fysische stress factoren.

Hierdoor worden stress-gerelateerde metabolische routes wellicht al aangeschakeld. Het effect van de 'elicitors' kan verder afhankelijk zijn van de bemesting. De inductie van de PR eiwitten, chitinase, chitosanase en peroxidase, is in *Arabidopsis thaliana* sterk vertraagd bij een lage stikstof gift, hoewel de maximum activiteit niet significant verschilde (Dietrich *et al.*, 2004). Al genoemd is dat behandeling met 'elicitors' geen curatief effect heeft, en dat het tijdstip van behandeling kritisch is. Dit vereist een goede kennis van de epidemiologie van pathogenen en de beschikbaarheid van goed werkende waarschuwingssystemen. Verder reageren niet alle cultivars op gelijke wijze op 'elicitors' (De Rocha & Hammerschmidt, 2005). Dit is o.a. gevonden voor de chemische inducer Actiguard, in relatie tot het komkommer - *Didymella bryoniae* pathosysteem. Ook het groeistadium van de plant kan van invloed zijn op het effect van de inducer. Een voorbeeld hiervan is de resistentiereactie van bloemkoolplanten op Phytogard (fosfaat).

Besproeiing van jonge planten leidde niet tot een langdurige, systemische weerstand tegen valse meeldauw, maar wortelbehandeling van oudere planten wel (Bécot *et al.*, 2000). Een aantal PR eiwitten die in de plant geïnduceerd worden hebben allergene eigenschappen (Gozzo, 2003). Hier zal beter naar gekeken moeten worden voordat elicitors van geïnduceerde weerstand veel gebruikt gaan worden. Tenslotte vraagt een resistentiereactie ook energie van de plant. Soms vindt er, bij gebruik van elicitors, een lagere productie en een reductie van plantengroei plaats (Kuc, 1995; Heil, 2001). Dit speelt vooral een rol, bij lage stikstofcondities en in een bepaald ontwikkelingsstadium van de plant, zoals tijdens de vorming van scheuten bij tarwe (Heil *et al.*, 2000).

Weerstandsinducers kunnen ook in een geïntegreerde beheersingsstrategie gebruikt worden. Zo werd bacterie-bladvlekkenziekte op tomaat, veroorzaakt door *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, bestreden met specifiek werkende bacteriofagen in combinatie met acibenzolar-S-methyl, een synthetisch middel dat weer weerstand induceert (Obradovic *et al.*, 2005). De afzonderlijke componenten gaven geen of slechts een beperkt beschermend effect.

6. Perspectieven op toelating

Met onderzoek aantonen dat bepaalde natuurlijke middelen de weerstand van de plant kunnen verhogen is een eerste stap. Om het middel daadwerkelijk in de praktijk toe te kunnen passen zijn vervolgstappen essentieel.

Allereerst moet er een leverancier gevonden worden die de middelen op de markt wil zetten. Zo'n leverancier zal dat alleen doen als er voldoende markt voor is. Het kan zijn dat de biologische sector op zich zelf een te kleine markt is. De gangbare landbouw is echter ook geïnteresseerd in toepassing van meer duurzame middelen en dat kan de markt aanzienlijk vergroten. Sommige middelen zijn al op de markt en kunnen daardoor vaak snel toegepast worden, mits het middel ook wettelijk voor die toepassing gebruikt mag worden.

Om een middel als gewasbeschermingsmiddel te mogen toepassen moet het middel 'toegelaten' zijn. In Nederland wordt deze toelating op dit moment nog geregeld door de het College voor de Toelating van Bestrijdingsmiddelen (CTB). Met de harmonisatie van regelgeving binnen de EU, zal dit binnen enkele jaren op Europees niveau geregeld worden. De Europese Commissie is volop bezig met dit harmonisatieproces. Bij toelating wordt ook aangegeven voor welke toepassing het middel gebruikt mag worden. Dit kan bijvoorbeeld betekenen dat een middel wel is toegelaten voor bladbespuiting van planten, maar niet voor coating van zaden, of omgekeerd.

Voor nieuwe middelen waarvoor toelating aangevraagd wordt moet door de aanvrager een dossier geleverd worden met resultaten van (eco)-toxicologische studies. Het aanleggen van zo'n dossier kost in het algemeen veel geld en is in de praktijk een zeer hoge drempel voor het aanvragen van toelating, met name voor middelen voor een relatief kleine markt. Soms zijn er echter al gegevens voor zo'n dossier voor handen, wat de kosten kan drukken. Momenteel vindt er op het Ministerie van LNV en in Brussel een discussie plaats of er voor bepaalde groepen van (natuurlijke) stoffen misschien minder hoge dossier-eisen gesteld kunnen worden.

Naast de lijst met toegelaten middelen, kent het CTB ook een zogenaamde lijst 'Regeling Uitzondering Bestrijdingsmiddelen' (RUB). Deze lijst bevat middelen die bij een bepaalde dosering en toedieningswijze als veilig worden beschouwd. Een voorbeeld betreft etherische oliën die ook toegelaten zijn via het 'Warenwetbesluit aroma's'. Ook voor middelen op de RUB lijst geldt een beperking in de wijze van toepassing, zo mogen de genoemde etherische oliën alleen toegepast worden voor 'bestrijding van ziekten en plagen bij planten en plantaardige producten' door middel van 'dompelen of aangieten'. Het is nog niet duidelijk wat er bij de Europese harmonisatie van de regelgeving met de middelen op de RUB lijst gaat gebeuren.

7. **Perspectieven voor de biologische landbouw**

De perspectieven van natuurlijke middelen die de weerstand induceren in uitgangsmateriaal (zaden, stekken en kiemplanten) binnen de biologische landbouw hangen af van:

1. de acceptatie van het middel door de biologische sector,
2. het effect van het middel,
3. de kosteneffectiviteit,
4. wettelijke toelating van het middel door het College Toelating Bestrijdingsmiddelen (CTB) en de EU.

De regelgeving rond biologische productiemethoden kent haar eigen regels voor het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen. Op Europees niveau zijn deze regels vastgelegd in de EU verordening 2092/91. Bijlage II van de verordening vermeldt lijsten van middelen die toegelaten zijn in de biologische productiemethoden. Dit betreft in bijlage IIA de meststoffen en bodemverbeteraar, in IIB de bestrijdingsmiddelen, in IIC voedermiddelen, in IID toevoegingsmiddelen in diervoeding en IIE producten voor het reinigen en ontsmetten van gebouwen en installaties voor de veehouderij. Het aantal middelen op deze lijst is beperkt. Daarnaast zijn bepaalde middelen wel toegelaten voor gebruik in biologische veevoeding, maar niet voor de teelt van biologische gewassen. Dit betreft bijvoorbeeld azijnzuur en melkzuur voor de bereiding van kuilvoer.

Een zeer groot knelpunt van de annex IIB is dat de lijst in de praktijk zeer statisch is. Sinds het opstellen van de lijst in 1991 zijn er geen of nauwelijks nieuwe middelen aan toegevoegd en heeft er geen uitbreiding van de mogelijkheden voor toepassing plaatsgevonden. Ook de biologische sector zelf is zeer terughoudend in het stimuleren van plaatsing van nieuwe middelen op de lijst. De belangrijkste reden hiervan is dat de sector prioriteit legt bij 'een systeemgerichte benadering' en het gebruik van middelen alleen als laatste optie ziet. Dit houdt in dat men bij alle teelthandelingen zo veel mogelijk de weerbaarheid van het hele systeem tegen ziekten en plagen probeert te bevorderen. In de praktijk betekent dit dat veel natuurlijke middelen die wel nationale of Europese toelating hebben voor gebruik als gewasbeschermingsmiddel niet beschikbaar zijn voor de biologische landbouw omdat ze niet genoemd worden in annex IIB.

Op dit moment beraamt de Europese Commissie zich over herziening van de regelgeving 2092/91. Misschien ontstaat hiermee de mogelijkheid om nieuwe natuurlijke middelen ook sneller beschikbaar te maken voor de biologische teelt.

Kortom, voor het in de praktijk brengen van interessante middelen die de weerstand van de plant kunnen verhogen, zijn er drie belangrijke hobbels. Allereerst het marktperspectief om het product kostendekkend te produceren en verkopen, ten tweede is er de nationale of Europese toelating van het middel als gewasbeschermingsmiddel, ten derde gelden de beperkingen in de lijst van toegestane middelen voor de biologische productie. Bij de prioriteitstelling in het onderzoek naar middelen die in een biologische landbouw praktijk de weerstand van de plant kunnen bevorderen is het raadzaam om de volgende volgorde aan te houden:

1. effectiviteit van het middel,
2. commercieel perspectief,
3. toelating als bestrijdingsmiddel (perspectief en kosten) en
4. toelating voor toepassing in de biologische productiemethoden.

Voor wat betreft het laatste zou men kunnen stellen dat middelen die al in de lijst voor plantaardige toepassing staan de voorkeur hebben, maar deze lijst is zeer beperkt. Een volgende groep kandidaten zijn middelen die al voor ander toepassing in de biologische productie gebruikt mogen worden. Tenslotte kan men zoeken naar middelen van natuurlijke oorsprong die weliswaar (nog) niet op de lijst staan, maar wel stroken met de filosofie van de biologische landbouw.

Literatuur

- Abbassi, P.A., N. Soltani, D.A. Cuppels & G. Lazarovits, 2002.
Reduction of bacterial spot disease severity on tomato and pepper plants with foliar applications of ammonium lignosulfonate and potassium phosphate. *Plant Disease* 86, 1232-1236.
- Allen, S.J., 2001.
Genetic and induced resistance strategies for controlling *Fusarium* wilt of cotton. p. 59-60. In: Proc. Second Australian Soilborne Disease Symposium. Victoria, Australia.
- Al-Dahmani, J.H., Abbasi, P.A., Miller, S.A. & Hoitink, H.A.J., 2003.
Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of compost extracts under greenhouse and field conditions. *Plant Disease* 87, 913-919.
- Amborabe, B.E., P. Fleurat-Lessard, J.F. Chollet & G. Roblin, 2002.
Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure activity relationship. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 1051-1060.
- Asai, T., J.M. Stone, J.E. Heard, Y. Kovtun, P. Yorgey, J. Sheen & F.M. Ausubel, 2000.
Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12, 1823-1835.
- Asthana, J.S. & H.S. Srivastava, 1978.
Effects of presowing treatment of maize seeds with ascorbic acid and salicylic acid on seed germination, seedling growth and nitrate assimilation in the seedling. *Indian Journal of Plant Physiology* 21, 150-155.
- Bécot, S., E. Pajot, D. Le Corre, C. Monot & D. Silué, 2000.
Phytogard (K₂HPO₃) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. *Crop Protection* 19, 417-425.
- Benhamou, N. & G. Theriault, 1992.
Treatment with chitosan enhances resistance of tomato plants to the crown pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41, 33-52.
- Benhamou, N., P.J. Lafontaine & M. Nicole, 1994.
Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* 84, 1432-1444.
- Birgirimana, J. & M. Höfte, 2002.
Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. *Phytoparasitica* 30, 1-10.
- Bowen, P., J. Menzies, D. Ehret, L. Samuels & A.D.M. Glass, 1992.
Soluble silicon sprays inhibit powdery mildew development on grape leaves. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 117, 906-912.
- Cohen, Y., U. Gisi & E. Mosinger, 1991.
Systemic resistance of potato against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38, 255-263.
- Cohen, Y., U. Gisi & T. Niderman, 1993.
Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathology* 83, 1054-1062.
- Conrath, U., C.M.J. Pieterse & B. Mauch-Mani, 2002.
Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7, 210-216.
- Dada, A.O.L. & J.A. Lucas, 2001.
The plant defense activator acibenzolar-S-methyl primes cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seedlings for rapid induction of resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58, 199-208.
- Davis, K.R., A.G. Darvill, P. Albersheim & A. Dell, 1986.
Host pathogen interactions XXIX. Oligogalacturonides released from sodium polypectate by endopolygalacturonic acid lyase are elicitors of phytoalexins in soybean. *Plant Physiology* 80, 568-577.

- Delaney, T.P., S. Uknes, B. Vernooij, L. Friedrich & K. Weymann, 1994.
A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266, 1247-1250.
- De Rocha, A.B. & R. Hammerschmidt, 2005.
History and perspectives on the use of disease resistance inducers in horticultural crops. *Horttechnology* 15, 518-529.
- Dietrich R., K. Ploss & M. Heil, 2004.
Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment* 27, 896-906.
- Doke, N., N.A. Garas & J. Kuç, 1987.
Effect on host hypersensitivity of suppressors released during germination of *Phytophthora infestans* cystospores. *Phytopathology* 77, 35-39.
- Dong, H. & S.V. Beer, 2000.
Riboflavin induces disease resistance in plants by activating a novel signal transduction pathway. *Phytopathology* 2000, 801-811.
- Dong, H. & Y. Cohen, 2001.
Extracts of killed *Penicillium chrysogenum* induce resistance against *Fusarium* wilt of melon. *Phytoparasitica* 29, 421-430.
- Dong, H. & Y. Cohen, 2002.
Dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* induces resistance against *Verticillium* wilt and enhances growth of cotton plants. *Phytoparasitica* 30, 147-157.
- Doubrava, N.S., R.A. Dean & J. Kuc, 1988.
Induction of systemic resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum lagenarium* in cucumber by oxalate and extracts from spinach and rhubarb leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33, 69-79.
- Dubery, I.A. & V. Slater, 1997.
Induced defense responses in cotton leaf disks by elicitors from *Verticillium dahliae*. *Phytochemistry* 44, 1429-1434.
- El Ghaouth, A., J. Arul, J. Grenier, N. Benhamou, A. Asselin & Bélanger, 1994.
Effect of chitosan on cucumber plants; suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defence reactions. *Phytopathology* 84, 313-320.
- Evans, K.A., 1993.
Effects of the addition of chitin to soil on soil-borne pests and disease. *Proceedings of the Crop Protection Conference in Northern Britain, 1993, Dundee: The Association for Crop Protection in Northern Britain*, 189-194.
- Gao, J.P., B. Ben-Daniel & Y. Cohen, 2001.
Organic fertilizers of microbial origin enhance growth and reduce infection by *Fusarium moniliforme* of sweet corn. *Phytoparasitica* 29, 268 (Abstr.).
- Garrod, B., B.G. Lewis, M.J. Brittain & W.P. Davies, 1982.
Studies on the contribution of lignin and suberin to the impedance of wounded carrot root tissue to fungal invasion. *New Phytologist* 90, 99-108.
- Gozzo, F. 2003.
Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *J. Agric. Food chem.* 51, 4487-4503.
- Hammerschmidt, R. & R.L. Nicholson, 1999.
A survey of plant defense responses to pathogens. p. 55-71. In: *Induced plant defenses against pathogens and herbivores. biochemistry, ecology, and agriculture* (Agrawal, A.A., Tuzun, S. & Bent, E., eds). APS Press, St Paul, Minnesota.
- Hammerschmidt, R., J.P. Métraux & L.C. van Loon, 2001.
Inducing resistance: a summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases, Corfu, May, 2000. *European Journal of Plant Pathology* 107, 1-6.
- Harding, V.K. & J.B. Heale, 1981.
The accumulation of inhibitory compounds in the induced resistance response of carrot slices to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 18, 7-15.

- Heil, M., A. Hilpert, W. Kaiser & K.E. Linsenmir, 2000.
Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? *Journal of Ecology* 88, 645-654.
- Heil, M., 2001.
The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). *European J. Plant Pathol.* 107, 137-146.
- Herger, G., F. Klingauf, D. Mangold, E.H. Pommer & M. Scherer, 1988.
Efficacy of extracts of *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai (*Polygonaceae*) against fungal diseases, especially powdery mildews. *Nachrichtenblatt Deutschen Pflanzenschutzdienstes Braunschweig* 40, 56-60.
- Herger, G. & F. Klingauf, 1990. Control of powdery mildew fungi with extracts of the giant knotweed (*Reynoutria sachalinensis*). *Mededelingen-Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent* 55, 1007-1014.
- Hirano, S., M. Hayashi & S. Okuno, 2000.
Soybean seeds surface-coated with depolymerised chitins: chitinase activity as a predictive index for the harvest of beans in field culture. *J. Sci. Food Agric.* 81, 205-209.
- Hoffland, E., G.J. Niemann & J.A. van Pelt, 1996.
Relative growth rate correlates negatively with pathogen resistance in radish: the role of plant chemistry. *Plant Cell Environment* 19, 1281-1290.
- Jain R., M. Singh & D.J. Dezman, 1989.
Qualitative and quantitative characterization of phenolic compounds from lantana lantana-camara leaves. *Weed Science* 37: 302-307.
- Jakab, G., V. Cottier, V. Taquin, G. Rigoli, L. Zimmerli, J. Métraux & B. Mauch Mani, 2001.
β-Aminobutyric acid-induced resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 107, 29-37.
- Jensen, B.D., A. Olumide Latunde-Dada, D. Judson & J.A. Lucas, 1998.
Protection of Brassica seedlings against downy mildew and damping-off by seed treatment with CGA 245704, an activator of systemic acquired resistance. *Pestic. Sci.* 52, 63-69.
- Kessman, H., T. Staub, C. Hofmann, T. Maetzke & J. Herzog, 1994.
Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* 32, 439-459.
- Keen, N.T., M. Yoshikawa & M.C. Wang, 1983.
Phytoalexin elicitor activity of carbohydrates from *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* and other sources. *Plant Physiol.* 71, 466-471.
- Koike, N., M. Hyakumachi, K. Kageyama, S. Tsuyumu & N. Doke, 2001.
Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. *European Journal of Plant Pathology* 107, 523-533.
- Kuc, J., 1995.
Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 275-297.
- Leeman, M., J.A. van Pelt, F.M. den Ouden, M. Heinsbroek, P.A.H.M. Bakker & B. Schippers, 1995.
Induction of systematic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 85, 1021-1027.
- Leeman, M., F.M. den Ouden, J.A. van Pelt, F.P.M. Dirks & H. Steijl, 1996.
Iron availability affects induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 85, 1021-1027.
- Liang, Y.C., W.C. Sun, J. Si & V. Römheld, 2005.
Effects of foliar- and root-applied silicon on the enhancement of induced resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus*. *Plant Pathology* 54, 678-685.
- Litterick, A.M., L. Harrier, P. Wallace, C.A. Watson & M. Wood, 2004.
The role of uncomposted materials, composts, manures and compost extracts in reducing pest and disease incidence and severity in sustainable temperate agricultural and horticultural crop production – a review. *Critical reviews in plant sciences* 23, 453-479.
- Liu, L., J.W. Kloepper & S. Tuzun, 1995.
Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85, 1064-1068.

- Lyon, G.D., T. Reglinski & A.C. Newton, 1995.
Novel disease control compounds: the potential to 'immunize' plants against infection. *Plant Pathology* 44, 407-427.
- Lyon, G.D. & A.C. Newton, 1997.
Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? *Plant Pathology* 46: 636-641.
- Maurhofer, M., C. Hase, P. Meuwly, J.P. Mettraux & G. Defago, 1994.
Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84, 139-146.
- Menzies, J., P. Bowen, D. Ehret & A.D.M. Glass, 1992.
Foliar applications of potassium silicate reduce severity of powdery mildew on cucumber, muskmelon and zucchini squash. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 117, 902-905.
- Miyazawa, J., T. Kawabata & N. Ogasawara, 1998.
Induction of an acidic isozyme of peroxidase and acquired resistance to wilt disease in response to treatment of tomato roots with 2-furoic acid, 4-hydroxybenzoic hydrazide or salicylic hydrazide. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52, 115-126.
- Narusaka, Y., M. Narusaka, T. Horio & H. Ishii, 1999.
Comparison of local and systemic induction of acquired disease resistance in cucumber plants treated with benzothiadiazoles or salicylic acid. *Plant and Cell Physiology* 40, 388-395.
- Newman, M., M.J. Daniels & J.M. Dow, 1995.
Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defense-related gene expression in *Brassica campestris*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8, 778-780.
- Obradovic, A., J.B. Jones, M.T. Momol, S.M. Olson, L.E. Jackson, B. Balogh, K. Guven & F.B. Iriarte, 2005.
Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Disease* 89, 712-716.
- Orober, M., J. Siegrist & H. Buchenauer, 2002.
Mechanisms of phosphate-induced disease resistance in cucumber. *European Journal of Plant Pathology* 108, 345-353.
- Park, K., J.Y. Min, C.H. Kim & J.W. Kloepper.
Induction of systemic resistance in cucumber and tobacco plants by a bacterial cell surface fraction of *Burkholderia cepacia* strain 923-87. <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/park2.pdf>.
- Miyazawa, J., T. Kawabata & N. Ogasawara, 1998.
Induction of an acidic isozyme of peroxidase and acquired resistance to wilt disease in response to treatment of tomato roots with 2-furoic acid, 4-hydroxybenzoic hydrazide or salicylic hydrazide. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52, 115-126.
- Pajot, E. D. Le Corre & D. Silué, 2001.
Phytogard and DL- β -amino butyric acid (BABA) induce resistance to downy mildew (*Bremia lacucae*) in lettuce (*Lactuca sativa* L). *European Journal of Plant Pathology* 107, 861-869.
- Pharand, B., O. Carisse & N. Benhamou, 2002.
Cytological aspects of compost-mediated induced resistance against *Fusarium* crown and root rot in tomato. *Phytopathology* 92, 424-438.
- Raj, S.N., N.P. Shetty & H.S. Shetty, 2004.
Proline – an inducer of resistance against pearl millet downy mildew disease caused by *Sclerospora graminicola*. *Phytoparasitica* 32, 523-527.
- Reddy, M.V.B., J. Arul, P. Angers & L. Couture, 1999.
Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality. *J. Agric. food Chem.* 47, 1208-1216.
- Reglinski, T., G. Whitaker, J.M. Cooney, J.T. Taylor, P.R. Poole, P.B. Roberts & K.K. Kim, 2001.
Systemic acquired resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in kiwifruit vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58, 111-118.

- Reuveni, M., V. Agapov & R. Reuveni, 1997.
A foliar spray of micronutrient solutions induces local and systemic protection against powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginia*) in cucumber plants. *European Journal of Plant Pathology* 103, 581-588.
- Reuveni, R. & M. Reuveni, 1998.
Foliar-fertilizer therapy – a concept in integrated pest management. *Crop protection* 17, 111-118.
- Scheuerell, S.J. & W.F. Mahaffee, 2002.
Compost tea: Principles and prospects for plant disease control. *Compost Science Utilization* 10, 313-338.
- Schmidt, A., S. Eisemann, S. Strathmann, K.A. Emslie & B. Seddon, 1996.
Mode of action of extracts from giant knotweed (*Reynoutria sachalinensis*) on *Botrytis cinerea*, the causal organism of grey mould. *Federal biology Institute* 32, 421.
- Schweizer, P., R. Gees & E. Mosinger, 1993.
Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with the powdery mildew *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Plant Physiology* 1993; 102: 503-511.
- Sharatchandra, R.G., S.N. Raj, N.P. Shetty, K.N. Amruthesh & H.S. Shetty, 2004.
A chitosan formulation Alexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl gierst. *Crop Protection* 23, 881-888.
- Silue, D., E. Pajot & Y. Cohen, 2002.
Induction of resistance to downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower by DL- beta -amino-n-butanoic acid (BABA). *Plant Pathology* 51, 97-102.
- Sticher, L., B. Mauch-Mani & J.P. Métraux, 1997.
Systemic acquired resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 35, 235-270.
- Stone, J.M., J.E. Heard, T. Asai & F.M. Ausubel, 2000.
Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 12: 1811-1822.
- Stout, M.J., A.L. Fidantsef, S.S. Dufey & R.M. Bostock, 1999.
Signal interactions in pathogen and insect attack: systemic plant-mediated interactions between pathogens and herbivores of the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54, 115-130.
- Svalheim, O. & B. Robertsen, 1993.
Elicitations of H₂O₂ production in cucumber hypocotyls segments by oligo-1,4- α -D-galacturonides and an oligo- β -glucan preparation from cell walls of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Physiologia Plantarum* 88, 675-681.
- Van de Krieken, W., H.J. Bouwmeester & A.J. Haverkort, 1995.
Effect of elicitors on plant defense and plant development. *Nota* 45, AB-DLO.
- Van Peer, R. & B. Schippers, 1992.
Lipopolysaccharides of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98, 129-139.
- Van Wees, S.C.M., E.A.M. de Swart, J.A. van Pelt, L.C. van Loon & C.M.J. Pieterse, 2000.
Enhancement of induced resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8711-8716.
- Wang, S. & D.D. Tzeng, 1998.
Methionine-riboflavin mixtures with surfactants and metal ions reduce powdery mildew infection in strawberry plants. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123: 987-991.
- Wei, G., J.W. Kloepper & Tuzun, S. 1992.
Internal and external colonization of cucumber by bacteria which induce systemic resistance to *Colletotrichum orbiculare*. *Phytopathology* 2, 1108 (Abstr.).
- Wu, T., S. Zivanovic, F.A. Draughon, W. Conway & C.E. Sams, 2005.
Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. *J. Agric. Food chem.* 53, 3888-3894.

