

GWASBESCHERMING

Mededelingenblad van de Koninklijke Nederlandse Plantenziektkundige Vereniging

Gewasbescherming, jaargang 34

september 2003

NUMMER
5



*De toekomst van biologische bestrijding:
27 november 2003, WICC, Wageningen
pagina 175-176*

[KNPV]

Gewasbescherming

het mededelingenblad van de KNPV, verschijnt zes keer per jaar. Kopij voor nummer 6 inleveren voor 15 september 2003

Redactie

Pieter Oomen (PD), hoofdredacteur, e-mail: P.A.Oomen@minlnv.nl
 Willem Jan de Kogel (PRI), secretaris willemjan.dekogel@wur.nl
 Dirk-Jan van der Gaag (PPO-Naaldwijk) Dirk-Jan.vandergaag@wur.nl
 Corné Kempenaar (PRI) corne.kempenaar@wur.nl
 Jos Raaijmakers (WU-Fytopathologie) Jos.Raaijmakers@wur.nl
 Gitte Schober (WSM businessschool) Gitte.Schober@wur.nl
 Annet Zweep (Expertisecentrum-LNV) A.T.Zweep@eclnv.agro.nl
 Marianne Roseboom-de Vries, administratief medewerker

Redactie-adres

Postbus 31, 6700 AA Wageningen
 e-mail: m.roseboom2@chello.nl
 Telefonisch bereikbaar: 0317-483654

Internet

www.knpv.org
 www.gewasbescherming.info
 info@gewasbescherming.info

Abonnementen en lidmaatschappen

Het lidmaatschap van de KNPV is inclusief het abonnement op het tijdschrift Gewasbescherming (verschijnt 6x per jaar).

- lidmaatschap binnenland € 25,-
 - lidmaatschap buitenland € 35,-
 - lid-donateur (bedrijven en instellingen) € 65,-
 - student-lidmaatschap¹ € 12,50
- Abonnementen (voor bibliotheken e.d.):
- binnenland € 30,-
 - buitenland € 35,-
 - losse nummers (excl. verzendk.) € 6,-
- Abonnement EJPP
- Personen die lid zijn van de KNPV kunnen tegen gereduceerd tarief een abonnement verkrijgen op het European Journal of Plant Pathology (tarief 2003 € 98,-)

Lidmaatschappen en abonnementen lopen van 1 januari tot en met 31 december.

Ze kunnen op elk gewenst moment ingaan. Eventuele beëindiging dient voor 1 december schriftelijk te worden gemeld.

¹ Voor studenten aan universiteiten en hogescholen

Correspondentie

Alle correspondentie betreffende de leden-administratie en Gewasbescherming te richten aan de secretaris van de KNPV,
 Postbus 31, 6700 AA Wageningen.
 Aad.termorshuizen@wur.nl
 Postbank: 92 31 65, ABN-AMRO: 53.93.39.768, ten name van KNPV, Wageningen

Afbeelding voorpagina

Tomatenbloem wordt bevrucht door aardhommel (foto: Koppert B.V.). Zie ook bijdrage K. Altena c.s over Koppert Biological Systems in dit nummer.

Bestuur Koninklijke Nederlandse Plantenziektkundige Vereniging

voorzitter: G.H.J. Kema (PRI)
 A.J. Termorshuizen (BBS WUR), secretaris
 J.J. Bouwman (Nefyto), penningmeester
 Martijn Eggink (Optima Flora),
 P. Bodingius (Expertisecentrum-LNV),
 R.F. Mauritz (CAH, Dronten),
 P.A. Oomen (PD),
 R.Y. van der Weide (PPO-Lelystad),
 A.W. Wesselo (PD),
 J.P. Wubben (PPO-Aalsmeer), leden

KNPV werkgroepen

Bodempathogenen en bodem-microbiologie

voorzitter: mw. J. Postma (PRI)
 secretaris: A.J. Termorshuizen
 WU-Biologische bedrijfssystemen,
 Marijkeweg 22, 6709 PG Wageningen,
 e-mail: aad.termorshuizen@wur.nl

Fusarium

voorzitter: R.P. Baayen (PD)
 secretaris: J.J. Mes
 Moleculaire Celbiologie UvA, Kruislaan 318, 1098 SM Amsterdam
 e-mail: mes@bio.uva.nl

Phytophthora en Pythium

voorzitter: P.J.M. Bonants (PRI)
 secretaris: A.W.A.M. de Cock
 Centraalbureau voor Schimmelcultures,
 Uppsalalaan 8, Postbus 85167,
 3508 AD Utrecht
 e-mail: decock@cbs.knaw.nl

Onkruidkunde

voorzitter: M.J. Kropff (WU-TPE)
 secretaris: A.J.W. Rotteveel
 PD, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen
 e-mail: A.J.W.Rotteveel@minlnv.nl

Botrytis

voorzitter: J. Köhl (PRI)
 secretaris: J. van Kan, WU-Fytopathologie,
 Postbus 8025, 6700 EE Wageningen
 e-mail: jan.vankan@wur.nl

Phytophthora infestans

voorzitter: mw. F.P.M. Govers

De redactie van Gewasbescherming en het bestuur van de KNPV aanvaarden geen aansprakelijkheid voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij het gebruik van de gegevens die in deze uitgave zijn gepubliceerd. (WU-Fytopathologie)
 secretaris: H.T.A.M. Schepers
 PPO, Postbus 430, 8200 AK Lelystad
 e-mail: francine.govers@wur.nl

Rhizoctonia solani

voorzitter: P.H.J.F. van den Boogert (PRI)
 secretaris: J.H.M. Schneider IRS,
 Postbus 32, 4600 AA Bergen op Zoom
 e-mail: schneider@irs.nl

Meloidogyne

voorzitter: L.P.G. Molendijk (PPO)
 secretaris: T.H. Been
 PRI, Postbus 16, 6700 AA Wageningen
 e-mail: thomas.been@wur.nl

Pratylenchus

voorzitter: C.J. Kok (PRI)
 secretaris: C.G.M. Conijn
 LBO, Postbus 85, 2160 AB Lisse
 e-mail: cor.conijn@wur.nl

Trichodoridae en tabaksrattelvirus

voorzitter: F.C. Zoon (PRI)
 secretaris: mw. A.S. van Bruggen
 LBO, Postbus 85, 2160 AB Lisse
 e-mail: annesophie.vanbruggen@wur.nl

Graanziekten

voorzitter: G.J.H. Kema (PRI)
 secretaris: mw A.D. Hartkamp
 Productschap voor Granen, Zaden en Peulvruchten, Stadhoudersplantsoen 12,
 2517 JL Den Haag.
 E-mail: a.d.hartkamp@hpa.agro.nl

KNPV Commissies

Commissie Nederlandse Namen van Geleedpotige Dieren

voorzitter: K.W.R. Zwart
 secretaris: mw. L.J.W. de Goffau
 PD, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen
 e-mail: L.J.W.de.Goffau@minlnv.nl

Bijzondere Normcommissie 14: Nederlandse Namen van Plantenziekten

voorzitter: vacant
 secretaris: mw. J.W. Roenhorst
 PD, Postbus 9102, 6700 HC Wageningen
 e-mail: j.w.roenhorst@minlnv.nl

Commissie Terminologie

voorzitter: L. Bos
 secretaris: P.C. Scheepens
 PRI, Postbus 16, 6700 AA Wageningen
 e-mail: piet.scheepens@wur.nl

Richtlijnen voor auteurs zijn te vinden in het eerste nummer van deze jaargang en op de internetpagina.

Basisontwerp

Voorheen de Toekomst, Wageningen

Druk

Drukkerij Ponsen en Looijen, Wageningen

ISSN 0166-6495

De redactie van Gewasbescherming en het bestuur van de KNPV aanvaarden geen aansprakelijkheid voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij het gebruik van de gegevens die in deze uitgave zijn gepubliceerd.

De paardenkastanjemineermot *Cameraria ohridella*

Berend Aukema

Plantenziektenkundige Dienst Afd. Diagnostiek, Wageningen. E-mail: B.Aukema@pd.agro.nl

Op diverse plaatsen in het land verbruinen en verdorren de bladeren van de paardenkastanje halverwege de maand juli, waardoor voor deze bomen de herfst al lijkt te zijn aangebroken. Dit ongebruikelijke fenomeen wordt veroorzaakt door de rupsjes van een minuscule motje, dat zich sinds 1998 in korte tijd vanuit Zuid-Europa over ons land verspreid heeft.

Waardplanten

Waardplanten zijn de witte en de rode paardenkastanje (*Aesculus hippocastaneum* en *A. carnea*). Daarnaast zijn er incidenteel in lage dichtheden aantastingen gevonden op gewone en Noorse esdoorn (*Acer pseudoplatanus* en *A. platanoides*).

Levenscyclus

De poppen van de paardenkastanjemineermot overwinteren op de grond, in afgevallen bladeren van de waardplant. De eerste vlindertjes verschijnen van eind april tot begin mei, gelijktijdig met de bloei van de paardenkastanje. Na de paring zetten de vrouwtjes hun eieren verspreid af op de bovenzijde van de bladeren. Direct na het uitkomen van de eieren boren de rupsjes zich in het bladweefsel en vormen daar door hun vreterij opvallende blaasvormige, doorzichtige gangen - mijnen genaamd - die lichtbruin van kleur zijn.

De larven doorlopen vier stadia, gevolgd door een voorpopstadium en een popstadium. De verpoping vindt plaats in de bladmijnen, in cirkelvormige cocons van spinseldraden. Uit de poppen komen de vlindertjes van de nieuwe

generatie, die zich op hun beurt weer voortplanten. In Nederland kunnen zich achtereenvolgens twee tot drie generaties ontwikkelen, waarbij poppen van de derde generaties en soms van een deel van de tweede generatie overwinteren.

Uiterlijk

Het motje is 4-5 mm groot en heeft een opvallend kuifje. De voorvleugels zijn bedekt met glanzend koperkleurige schubben en een drietal wit-zwarte banden (foto). De geelgroene rupsjes leven in de lichtbruine, doorzichtige blaasmijnen en zijn opvallend gesegmenteerd. Door de aangetaste bladeren tegen het licht te houden, zijn ze goed te zien. De verpoping vindt plaats in de mijnen. De poppen van de overwinterende generatie zijn duidelijk als kleine verdikkingen in het blad te voelen.

Schade

Bij een massale aantasting overlappen de mijnen (tot wel 200 per blad) elkaar, waardoor hele bladeren kunnen verbruinen en voortijdig afvallen. Op korte termijn leidt dit niet tot schade, maar op lange-

re termijn kan de vitaliteit van aangetaste bomen daarvan te lijden hebben, waardoor ook andere aantasters zich kunnen gaan manifesteren. De symptomen kunnen verward worden met die van een algemeen in paardenkastanje voorkomende bruine necrotische vlekken van de bladvlekkenziekte *Guignardia aesculi* (schimmelinfectie). Maar de bruine necrotische vlekken van de bladvlekkenziekte worden omgeven door een opvallende, lichtgele necrotische ring, die bij de bladmijnen van de paardenkastanjemineermot ontbreekt.

Bestrijding

Bestrijding van de paardenkastanjemineermot is in het algemeen niet zinvol. De soort is zeer algemeen en verspreidt zich makkelijk, zodat herbesmetting niet te voorkomen is. De enige methode om de kans op besmetting in het voorjaar te verminderen is het 's winters opruimen en afvoeren van het afgevallen blad.



Een mottenpaar van de paardenkastanjemineermot, *Cameraria ohridella*. Foto: A. van Frankenhuisen.

ARTIKEL

Voortgang in de oplossing van de kleine-toepassingen-problematiek in Europa

Ton Rotteveel¹ en Vivian Powell²

¹Plantenziektenkundige Dienst, Postbus 9102 6700 HC Wageningen, e-mail A.J.W.Rotteveel@pd.agro.nl

²Horticultural Development Council, Verenigd Koninkrijk

Samenvatting

De Europese Commissie heeft de noodzaak erkend dat gebruik van gewasbeschermingsmiddelen ook in kleine teelten wordt toegelaten, en ook voor kleinere problemen in grote teelten. Het aantal beschikbare middelen voor kleine teelten was altijd al beperkt vanwege de hoge kosten voor ontwikkeling en toelating in relatie tot de bescheiden markt voor deze toepassingen. Het tekort aan toegelaten middelen veroorzaakt ziekte-, plaag- en onkruidproblemen op bedrijven. Dat leidt soms tot illegaal gebruik, toxicologische problemen en milieuverontreiniging. Om de situatie te verbeteren heeft de Europese Commissie een *Expert Group on Minor Uses* ingesteld. Deze Expertgroep bestaat uit leden uit het Verenigd Koninkrijk, Frankrijk, Duitsland, Portugal, Nederland, België en de Europese Commissie. De Expertgroep heeft twee coördinatoren benoemd: Frankrijk voor Zuid Europa en Nederland voor Noord Europa. De groep voert verschillende activiteiten uit. Eén hoofddoel is het verkrijgen van meer gewasbeschermingsoplossingen voor kleine teelten door de coördinatie van onderzoek (chemisch, niet-chemisch en geïntegreerd) en door een betere, op Europa gerichte harmonisatie bij de nationale toelatingsautoriteiten. Dit technische werk wordt gedaan in nauwe samenwerking met nationale

coördinatoren van alle Lidstaten, inclusief alle Oost Europese accessielanden. De coördinatoren organiseren het werk via de zogeheten Technische Groep. Deze Technische Groep bestaat vooral uit overheidsmensen die nauw samenwerken met telersorganisaties, met de chemische industrie en met andere belanghebbenden. Dit artikel beschrijft de gekozen benadering en de huidige stand van zaken. Het artikel is een Nederlandse bewerking van een bijdrage aan het eerste BCPC-symposium in Glasgow.

Inleiding

'Kleine toepassingen' van gewasbeschermingsmiddelen hebben vooral betrekking op tuinbouwgewassen die op kleine arealen worden geteeld, maar waarvan het product een hoge waarde heeft. Er zijn ook kleine toepassingen voor grote gewassen, en voor gewassen in ontwikkeling. De markt voor kleine toepassingen van gewasbeschermingsmiddelen is over het algemeen te klein om de hoge kosten van toelating terug te verdienen. Daarom worden er maar weinig toepassingen voor toelating aangevraagd door de industrie. Daarbij komt het feit dat deze gewassen veelal een hoge waarde vertegenwoordigen – wat de potentiële kosten voor toelatinghouders vergroot, in het bijzonder met het oog op verwachte claims bij schade

aan het gewas. De kosten van de residustudies, die vereist zijn voor toelating, dragen ook in sterke mate bij aan de geringe commerciële interesse voor toelating. Het grote tekort aan toegelaten middelen veroorzaakt problemen op de bedrijven omdat men sommige economisch belangrijke ziekten, plagen en onkruiden niet mag bestrijden. Dat leidt in sommige gevallen tot illegaal gebruik, met de bijbehorende risico's van toxicologische en milieuproblemen.

Op Europees niveau vergroot het lopende harmonisatieproces en de daarbij horende toelatingseisen het probleem. Gerichte actie om de problemen met kleine toepassingen te verlichten is daarom absoluut noodzakelijk, zowel op nationaal als internationaal niveau.

Nationale variatie

In de Europese Unie van vandaag kennen we een reeks van uiteenlopende nationale benaderingen op het gebied van kleine toepassingen en de toelatingen daarvoor. Deze variatie (alles binnen de EU-richtlijn) is te complex om in één artikel te beschrijven. Iets van deze benaderingen is terug te vinden in de publicaties van Meijer (2003), Pallut en Schmidt (1996), en Wise en Chapman (1997). De bewustwording van het kleine-teeltenprobleem is de laatste jaren

ARTIKEL

Plaats van de technische groep in de EU-structuur



zozeer gegroeid dat nationale regeringen en de Europese Commissie steeds meer bereid zijn een actieve rol te spelen bij het zoeken naar oplossingen.

De oorspronkelijke strikte taakverdeling tussen de gewasbeschermingsindustrie (onderzoek en aanvraag van toelatingen), overheden (evaluatie en toelating), en de telers (gebruikers) is nu grotendeels verlaten. Teliorsorganisaties zoals de *Horticultural Development Council* in het Verenigd Koninkrijk en LTO Nederland spelen een actieve rol. Sommige overheden in Lidstaten zijn erg actief in het ondersteunen van belanghebbenden bij het vinden en uitvoeren van oplossingen. Ook de industrie heeft aangegeven zich coöperatief en actief te willen opstellen bij het vergroten van het aantal beschikbare oplossingen voor kleine teelten.

Expert Group on Minor Uses

De Europese Commissie heeft de noodzaak van toelatingen voor kleine toepassingen van gewasbe-

schermingsmiddelen in grote en kleine gewassen erkend. De Commissie initieerde in 2002 een *Expert Group on Minor Uses* om de bestaande situatie te verbeteren. Deze Expertgroep bestaat uit leden vanuit het Verenigd Koninkrijk, Frankrijk, Duitsland, Portugal, België, Nederland en de Commissie. De opdracht is als volgt geformuleerd:

- Bewaak het kleine-toepassingsprogramma van de EU;
- Bewaak het werk van de Technische Groep en bekrachtig technische prioriteiten;
- Ontwerp criteria en principes voor de verschillende aspecten van het programma;
- Onderhoud contact met belanghebbenden (ECPA: *European Crop Protection Association*), ECCA: *European Crop Care Association*), en de Europese telersorganisatie (COPA) over zaken met betrekking tot kleine toepassingen;
- Onderhoud contact met internationale organisaties (OECD, EPPO) over dit onderwerp; neem deel aan internationale vergaderingen en bestudeer mogelijke samenwerking (bijvoorbeeld met de EPA: *Environmental Protec-*

tion Agency, uit de USA) als adviseurs voor de Commissie;

- Maak voorstellen en rapporten over de activiteiten voor de Werkgroep Wetgeving en de Commissie.

De inspanningen zijn gericht op het verkrijgen van meer gewasbeschermingsoplossingen voor kleine teelten, en wel door onderzoek te coördineren en door de verschillende nationale toelatinginstanties in de lidstaten op micro-niveau beter te harmoniseren. Samenwerking met de belanghebbenden, zoals de telersorganisaties en de industriële organisaties ECPA en ECCA, wordt gezien als essentieel voor succes. We verwachten dat de expertgroep praktische ideeën voor de verbetering van de EU-Richtlijn zal opleveren door kennis te nemen van de vele praktische problemen bij de procedures rond kleine toelatingen.

Technische Groep

De dit jaar opgerichte Technische Groep is belangrijk voor de coördinatie op EU-niveau. Deze groep

bestaat uit twee EU-coördinatoren (uit Frankrijk en Nederland) en uit de nationale coördinatoren van de deelnemende lidstaten. De opdracht aan de Technische Groep is als volgt omschreven:

- Coördineer de residu-onderzoekprogramma's van de lidstaten om overlappen te reduceren;
- Evalueer voorstellen voor gecoördineerd onderzoek waarbij EU-financiering betrokken kan zijn;
- Monitor de vooruitgang bij de ontwikkeling van alternatieven voor 'essentiële toepassingen';
- Ontwikkel ideeën voor noodzakelijke harmonisatie op basis- en nationaal niveau voor toelatingsprocessen;
- Onderhoud contact met de industrie om ondersteuning voor kleine toepassingen aan te moedigen;
- Rapporteer aan de expertgroep.

De Technische Groep is het werkpaard van de *Expert Group on Minor Uses* en heeft als taak om een groot aantal uitbreidingen van toelatingen voor gewasbeschermingsmiddelen in de Europese Unie veilig te stellen.

Huidige structuur en activiteiten

De Technische Groep werkt via twee groepen: één voor Zuid Europa, gecoördineerd door Frankrijk, en bestaande uit Frankrijk, Portugal, Spanje, Italië, Griekenland, de accessielanden Slovenië, Hongarije, Malta en Cyprus, en één voor Noord Europa.

De Noordelijke groep wordt door Nederland gecoördineerd en bestaat uit Nederland, Oostenrijk, Duitsland, België, Verenigd Koninkrijk, Ierland, Denemarken, Zweden en Finland en voorts uit de accessielanden Estland, Letland, Litouwen, Polen, Tsjechië en Slowakije. Om er voor te zorgen dat de ontwikkeling in Noord en Zuid Euro-

pa niet te zeer divergeert en om de coördinatie te verbeteren, nemen de coördinatoren deel aan elkaars vergaderingen en ontwikkelen ze gemeenschappelijke procedures voor coördinatie. In de toekomst zullen de coördinatoren ook verantwoordelijk zijn voor de coördinatie van een extrapolatiegroep voor (residu)gegevens en een databasegroep. Deze toegevoegde terreinen worden als van vitaal belang beschouwd voor de toekomstige prioriteitstelling in de technische groep, en beide zijn hard nodig. Helaas is de noodzakelijke financiering nog voor geen van beide gevallen verkregen.

De belangrijkste taak van de Technische Groep is de coördinatie en coöperatie te faciliteren en stimuleren. Individuele lidstaten zijn te klein om zelfstandig de nodige kleine toepassingen veilig te stellen, gezien de grote aantallen kleine gewassen en hun problemen. De economie dwingt tot samenwerking bij het verkrijgen van de noodzakelijke gegevens voor toelating, met name residugegevens. De Technische Groep wil behulpzaam zijn bij het opsporen van relevante informatie en de juiste partners voor onderzoek. Men is van mening dat het proces van vrijwillige wederzijdse erkenning een essentieel element zal zijn voor de toelatingen voor kleine toepassingen in Europa, tenminste indien de bureaucratische obstakels worden verwijderd. Toelatingen zullen vrijwel altijd de vorm hebben van uitbreidingen van bestaande toelatingen, op basis van extrapolatie van het dossier dat is gemaakt voor toelatingen in de grote gewassen. In een aantal afzonderlijke gewassen zullen echter aanvullende residugegevens noodzakelijk blijven.

Twee landen kunnen samenwerken aan een toepassing die is erkend als belangrijk voor beide. Zulke samenwerking is al tot stand gekomen tussen het Verenigd Koninkrijk en Duitsland. Deze heb-

ben enkele jaren geleden al een succesvolle samenwerking opgezet, die ook mede heeft geleid tot de totstandkoming van de *Expert Group on Minor Uses*.

Het is opmerkelijk dat er in bovenstaand geval sprake is van samenwerking tussen een overheidsorganisatie (de BBA, *Biologische Bundesanstalt* in Duitsland) en de door telers gefinancierde *Horticultural Development Council* in het Verenigd Koninkrijk. Dit bewijst dat zulke samenwerking tussen private en overheidsorganisaties uitstekend kan functioneren, zelfs over grenzen heen. EU-coördinatie is in dergelijke gevallen vooral relevant voor het beschikbaar maken van de verkregen informatie aan de andere lidstaten.

Het delen van informatie en gegevens is een sleutelfactor voor succes van de Technische Groep. Het belangrijk dat elke lidstaat in het begin kan aangeven welke belangrijke toelatingen in het eigen land ontbreken maar elders in Europa al bestaan. Het netwerk van nationale coördinatoren in de Technische Groep kan deze informatie leveren. Moeilijker is het delen van de gegevens. Het verwerven van gegevens is duur. Het gebruik van gegevens is daarom normalerwijze niet vrij. In plaats van rechtstreekse betaling kan uitruil van gegevens over verschillende gewassen worden gebruikt door geïnteresseerde partijen. Deze uitruil heeft het voordeel dat ze het aantal toegelaten toepassingen in beide landen kan bevorderen. Het is een taak van de Technische Groep om het delen van gegevens zoveel mogelijk te bevorderen. Het moet daarom voor de deelnemende partijen in het proces duidelijk zijn dat alle partners hun gegevens in dienen te brengen.

Knelpuntbepaling

Alle lidstaten kennen hun knelpunten in de gewasbescherming. De Fransen spreken van *empty*

uses, de Engelsen van *gaps* en de Duitsers van *Lücke*. Dit is een breder gebruik van de term *knelpunt* dan die in ons land wordt gehanteerd en die vooral betrekking heeft op recent vervallen, onmisbare toepassingen. De Europese knelpunten hebben evenzeer betrekking op al die gevallen waarvoor nooit een legale toepassing heeft bestaan. De Technische Groep is momenteel bezig met het maken van lijsten met prioritaire knelpunten in de lidstaten. Deze actie is belangrijk omdat deze knelpunten het middelpunt zullen vormen van de coördinatie-inspanningen en ook van samenwerking met de industrie die mogelijkheden biedt een knelpunt op te lossen met nieuwe chemie. De industrie heeft zijn interesse getoond voor het vaststellen van Europese prioriteiten bij kleine toepassingen - wat geen verbazing hoeft te wekken, gezien de commerciële waarde van dergelijke informatie. Op deze wijze heeft de Technische Groep problemen met vliegenplagen in groenten en fruit aangewezen als een eerste prioriteit. De firma Dow werd bereid gevonden tot samenwerking.

Vertrouwelijkheid

In veel gevallen zal de Technische Groep vertrouwelijke informatie onder ogen krijgen met betrekking tot conceptdossiers voor de toelating van gewasbeschermingsmiddelen. Dat vraagt om garantie van vertrouwelijkheid. Dit wordt verkregen door de Groep alleen te laten bestaan uit ambtenaren, en door de groepsleden een verklaring van vertrouwelijkheid te laten tekenen.

Wanneer het echter nuttig en noodzakelijk is, kunnen derden worden uitgenodigd voor specifieke agendapunten van de Technische Groepvergaderingen, bijvoorbeeld industrievertegenwoordigers die hun eigen actieve stoffen komen bespreken.

Selectiecriteria voor onderwerpen

Er zijn criteria vastgesteld voor de evaluatie van voorgestelde onderzoeksplannen en samenwerking. Deze criteria zullen worden gebruikt bij toekomstige Europese coördinatie van onderzoek, gericht op uitbreiding van toelatingen. De volgende criteria zijn vastgesteld:

1. de toepassing is van belang voor meer dan één lidstaat;
2. de (nieuwe of oude) actieve stof heeft een toelating in de relevante noordelijke en/of zuidelijke Europese zone;
3. de (oude) actieve stof is genotificeerd bij de Europese Commissie;
4. de eigenaar stemt in met de voorgenomen uitbreiding van gebruik, en is voornemens de formulering van de actieve stof die bestemd is voor deze uitbreiding op de markt te houden;
5. met betrekking tot voedingsgewassen: er is een MRL (*Maximum Residue Limit*) vastgesteld in tenminste één relevant gewas en er is voldoende ruimte in de ADI (*Acceptable Daily Intake*);
6. het voorgenomen gebruik vangt een *EU essential use*;
7. de verkregen data mogen vrij worden gebruikt in de lidstaten;
8. er is voldoende indicatie van werkzaamheid;
9. de toepassing is noodzakelijk om reden van landbouwkundige doelmatigheid, economische preventie van opbrengstderving en/of kwaliteitsderving, en/of noodzakelijk voor de voortzetting of ontwikkeling van geïntegreerde gewasbescherming in het betreffende gewas;
10. de toepassing maakt resistentie management mogelijk, noodzakelijk voor duurzaam gebruik van bestaande geïntegreerde gewasbescherming in het betreffende gewas.

Niet-chemische oplossingen

Gewasbeschermingsmiddelen voor kleine toepassingen zijn noodzakelijk omdat er een probleem bestaat in de gewasbescherming in het betreffende gewas. Indien alternatieve oplossingen kunnen worden gevonden waardoor het probleem ook effectief en efficiënt kan worden opgelost zonder toepassing van een gewasbeschermingsmiddel (bijvoorbeeld door toepassing van geïntegreerde gewasbeschermingstechnieken), is dat even welkom. De Technische Groep zal ook de mogelijkheden evalueren voor de ontwikkeling en toepassing van niet-chemische gewasbeschermingsoplossingen in kleine gewassen.

Database voor toelatingen in alle lidstaten

Op de eerste vergadering van de Technische Groep presenteerde Frankrijk zijn database voor alle kleine toepassingen. De afgevaardigden vonden de database uitstekend maar tegelijkertijd tekortschieten in twee aspecten: de database is Franstalig en betreft alleen Franse toepassingen. De coördinatoren hebben de conclusie getrokken dat er een aanzienlijke behoefte is aan een dergelijke database, en dat de beste vooruitgang kan worden geboekt door, lopende het coördinatieproces, de Franse database in het Engels te vertalen en geleidelijk uit te breiden met de toepassingen uit de rest van Europa.

Residuendatabase-project

Momenteel loopt een initiatief van de Engelse *Horticultural Develop-*

ment Council om een database op te zetten die gegevens zal bevatten van residuonderzoek dat al is gedaan ter ondersteuning van de toelating van kleine toepassingen. Men spant zich in om deze databank uit te breiden naar Europese schaal. Alleen Duitsland heeft tot dusverre ook gegevens ingebracht, terwijl België heeft toegezegd deel te nemen. Deze databank heeft dringend Europese financiering nodig om Europa-breed te kunnen worden opgezet. Voor de korte termijn zal deze bank alleen informatie over residugegevens betreffen, maar voor de lange termijn is het voornemen ook om deugdelijkheids- en selectiviteitsproeven op te nemen.

Engeland en Duitsland hebben via dit werk al overlappings in residugegevens vastgesteld die beide landen hadden verkregen voor dezelfde toepassing. De *Horticultural Development Council* was door deze database bovendien in staat om toelating voor kleine toepassingen te verkrijgen in het VK door toegang te vragen tot de Duitse proefverslagen, en deze verslagen te gebruiken voor de onderbouwing van toelating in het Verenigd Koninkrijk.

Het gebruik van zo'n databank zou aanzienlijk tijd en geld kunnen besparen en de kans op overbodige duplicatie van onderzoek kunnen verkleinen. Zo'n database zou een buitengewoon bruikbaar stuk gereedschap in het Europese coördinatieproces voor kleine toepassingen zijn.

Extrapolatieproject

De toelating van kleine toepassingen berust vrijwel altijd op de extrapolatie van gegevens vanuit andere toepassingen. In het gunstigste geval leidt dit tot de mogelijkheid van een toelating waarbij geen nieuwe (dure) gegevens nodig zijn. Er bestaat een Europees extrapolatiesysteem voor residugegevens en op de verschillende nationale niveaus zijn er extrapolatieregels voor deugdelijkheid. Toch lijken er meer mogelijkheden te zijn voor verdergaande extrapolatie voor residugegevens en er is zeker behoefte aan het koppelen van residu-extrapolatie aan deugdelijkheidsextrapolatie. Zo'n systeem zou helder laten zien welke gewassen gebruikt zouden moeten worden voor onderzoek om efficiënt toelatingen te krijgen voor kleine toepassingen. Het belang van dit werk zal sterk toenemen wanneer alle toepassingen herbeoordeeld worden ten behoeve van de nieuwe Europese MRL-vaststelling zodra de Europese Voedsel Autoriteit (EFSA) de enige autoriteit wordt die een MRL mag bepalen. Lidstaten mogen straks geen nationale MRL meer bepalen en het is nu al zeker dat vele oude, bestaande toepassingen de nieuwe eisen niet zullen overleven. Dit zal vele nieuwe knelpunten veroorzaken, opnieuw een grote vraag naar nieuw onderzoek en een risico van toekomstig illegaal gebruik. Hoe belangrijk dit project ook mag zijn: er is nog geen financiering verkregen. Een voorstel om alle MRLs die niet door gegevens worden onderbouwd op 0,01 mg/kg te stellen op 1 januari 2005 is momenteel in discussie in de EU. Het

is denkbaar dat sommige gewassen in de EU straks niet meer kunnen worden geproduceerd omdat er onvoldoende toelatingen zullen zijn. Als dit voorstel wordt aangenomen, inclusief het nu voorgestelde tijdtraject, zullen de industrie en andere belanghebbenden onvoldoende tijd hebben om alle extra residuonderzoek te doen om de kleine toelatingen in stand te houden.

Conclusie

De instelling van de *Expert Group on Minor Uses* en zijn technische subgroepen is een stap voorwaarts naar het bereiken van oplossingen voor problemen van kleine toepassingen en naar praktische harmonisatie van de toelating van gewasbeschermingsmiddelen in Europa. Sleutelfactor voor succes is de constructieve samenwerking van alle betrokken partijen: de Europese Commissie, nationale overheden, gewasbeschermingsindustrie, onderzoeksinstituten en vooral de telersorganisaties.

Literatuur

- A.C. Meijer, 2003. Minor uses: national and international activities. Proceedings Crop Protection Symposium Gent 2003, accepted. a.c.meijer@pd.agro.nl
- Pallut, W, and H.H. Schmidt, eds, 1996. 2nd International symposium on minor uses, Berlin, BBA. Parey Buchverlag, ISBN 3-8263-3129-X
- Wyse, C and P. Chapman, 1997. Recent developments in the management of the reducing portfolio of plant protection products available to European producers of minor crops. The 1997 Brighton Crop Protection Conference-Weeds, 3B-1: p 125-130.

Koppert Biological Systems: van pionier naar 'professional'

Koen Altena, Marlies Dissevelt en Adriaan van Doorn

Koppert Biological Systems B.V., Veilingweg 17, 2651 BE Berkel en Rodenrijs e-mail: kaltena@koppert.nl

De redactie van Gewasbescherming nodigt regelmatig bedrijven en organisaties uit om zich in het blad te presenteren aan de lezers. De redactie vraagt daarbij aan het bedrijf of organisatie om – zonder op de reclametoer te gaan - vooral in te gaan op de rol die bedrijf of organisatie speelt in de Nederlandse gewasbeschermingswereld, welke doelstelling of visie daarachter zit, en hoe de toekomst zich naar verwachting verder zal ontwikkelen. Koppert Biological Systems, zeer prominent binnen de Nederlandse gewasbescherming, bijt met onderstaande presentatie de bedrijvenspits af.

Introductie

In 1967 is het familiebedrijf opgericht door Jan Koppert, een komkommerteler, die op zoek was naar alternatieven voor de chemische bestrijding van plaaginsecten. De eerste natuurlijke vijand, die plaatselijk verhandeld werd, was de spintroofmijt *Phytoseiulus persimilis*. In de loop der jaren is het bedrijf uitgegroeid tot een internationaal opererend bedrijf, dat natuurlijke vijanden (ruim dertig verschillende soorten insecten, mijten, schimmels, aaltjes, bacteriën en virussen) en bestuivers produceert ten behoeve van de gewasbescherming en bestuiving van met name tuinbouwgewassen in beschermde teelten.

Koppert, wereldwijd marktleider op het gebied van biologische gewasbescherming en bestuiving, heeft elf dochterbedrijven (in België, Canada, Engeland, Frankrijk, Italië, Mexico, Nieuw-Zeeland, Slowakije, Spanje, Turkije en de Verenigde Staten) en levert haar producten deels direct aan telers, deels via distributeurs, in zo'n vijftig landen. In totaal werken wereldwijd circa 450 mensen bij Koppert Biological Systems.

De Benelux vormt voor Koppert een belangrijke (thuis)markt, waarbij de producten vnl. worden afgezet in vruchtgroentegewassen in kassen. Dit is inmiddels een stabiele markt, terwijl toepassing van natuurlijke vijanden in sierteeltgewassen hier een groeiende markt is.

De export van producten naar andere landen (waar ze ook met name worden ingezet in vruchtgroentegewassen) neemt jaarlijks toe.

In de voorbije vijftien jaar is duidelijk gebleken dat het gebruik van hommels voor de bestuiving van cultuurgewassen een duidelijke invloed heeft op de ontwikkeling van de geïntegreerde gewasbescherming. Met name in het buitenland vervullen de hommels dan ook een voortrekkersrol voor de toepassing van natuurlijke vijanden. In het verlengde daarvan worden de ontwikkelingen op het gebied van biologische bestrijding in de Nederland internationaal nauwlettend gevolgd en vormen zij een voorbeeld en referentie voor telers over de gehele wereld.

De totale omzet van Koppert be-

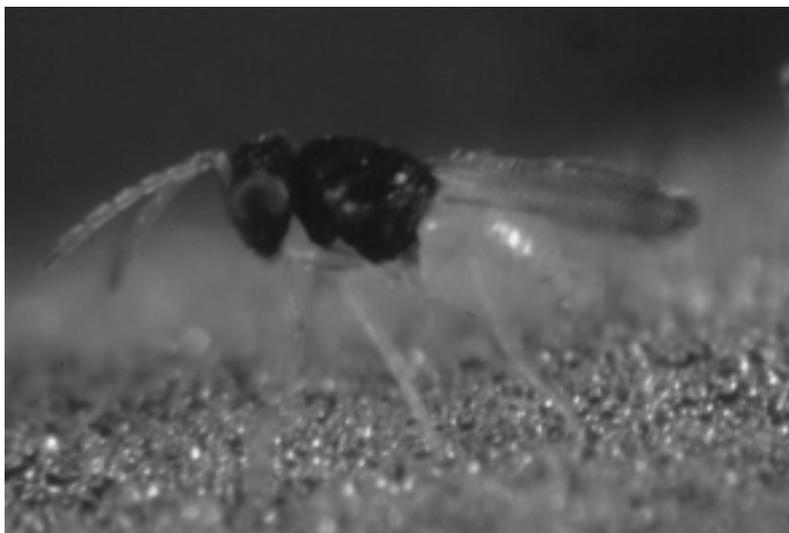
draagt momenteel ongeveer € 40.000.–, waarvan 30% behaald wordt in de Benelux.

Onderzoeksactiviteiten

De afdeling R&D-Biologischebestrijding bestaat circa 25 jaar. In 1988 is daarnaast de afdeling R&D-Pollination ontstaan, die zich bezighoudt met het bestuivingsonderzoek. Omdat de wens bestond meer te focussen op biologische ziektebestrijding is de afdeling R&D-Biologische bestrijding in 1999 gesplitst in R&D-Entomology en R&D-Microbials. De onderzoeksafdelingen beschikken over een eigen laboratorium, klimaatkamers en proefkassen. Naast onderzoek in Nederland wordt er ook lokaal onderzoek verricht door dochterondernemingen in Frankrijk (op twee locaties), Spanje en Engeland. Alle onderzoekers (in totaal ongeveer 25) functioneren op HBO/universitair niveau. Ook wordt jaarlijks gelegenheid geboden aan studenten (MBO/HBO/universiteit) uit binnen- en buitenland om onderzoek te doen in het kader van hun studie. Ter ondersteuning van de onderzoeksafdelingen is er een eigen bibliotheek, waarin literatuur uit binnen- en buitenland verzameld en toegankelijk gemaakt wordt.

Lange tijd is er voornamelijk onderzoek verricht naar biologische bestrijding van de belangrijke plagen in de groenteteelt onder glas

ARTIKEL



De sluipwesp Encarsia formosa (foto: Koppert B.V.)

ARTIKEL

in Noordwest-Europa (zoals Californische trips, kasspint, witte vlieg en rupsen van Turkse mot en Floridamot). De laatste jaren wordt de aandacht echter meer gericht op de mogelijkheden van biologische ziektebestrijding (meeldauw, *Botrytis* en bodemziekten) en bestrijding van plagen in groentegewassen in Zuid-Europa (bijvoorbeeld *Bemisia tabaci* in tomaat) en in de sierteelt in Noordwest-Europa (bijvoorbeeld spint en trips in roos en witte vlieg in gerbera). Daarnaast worden ook de mogelijkheden in 'nieuwe' markten als de bollenteelt (bollenmijt, wolluis, ziekten), vollegrondsgroenteteelt (onder andere trips, bladluis), grasvelden (engerlingen) en boomteelt (buxustopmijt, spint, meeldauw en bodemziekten) onderzocht.

Het economische belang van een bepaalde onderzoeksvraag wordt vooraf in kaart gebracht in samenwerking met de afdeling Marketing en Sales.

Het onderzoek vindt plaats in een logische volgorde: via laboratorium- en proefkasonderzoek naar praktijkonderzoek. Natuurlijk behaalt niet iedere onderzochte natuurlijke vijand de eindstreep tot eindproduct. De succesratio is echter vele malen hoger dan bij de ontwikkeling van chemische ge-

wasbeschermingsmiddelen. Als een bestrijder dit traject echter wel succesvol heeft doorlopen, dan wordt i.s.m. de afdeling Marketing en Sales een adviesprotocol voor de gebruikers opgesteld. Indien nodig volgt er een traject waarbij de implementatie in de praktijk wordt gevolgd. Daarnaast worden cursussen voor telers gegeven en worden er contacten onderhouden met onderzoeksinstituten en universiteiten om op deze wijze zo goed en up-to-date mogelijk advies te kunnen geven aan de gebruikers wereldwijd.

Voor de bestuivers geldt een vergelijkbare aanpak. Ook hier wordt gekeken naar toepassingsmogelijkheden in nieuwe gewassen, wat bijvoorbeeld geleid heeft tot de ontwikkeling van het product MACHOPOL, doosjes met alleen hommelmannen voor gebruik in met name de zaadteelt.

Er wordt ook veel onderzoek gedaan naar de neveneffecten van diverse middelen (chemische middelen en gewasbeschermingsmiddelen van natuurlijke oorsprong) op onze natuurlijke vijanden en bestuivers. Dit, omdat zij veelal in een omgeving moeten opereren, waarin ook andere (niet-biologische) gewasbeschermingsmiddelen worden gebruikt (IPM systeem). In sommige gevallen wordt

het effect van een bepaald middel onderzocht in samenwerking met de producent er van.

R&D-Entomology

Elke onderzoeker heeft een aantal specialismen vanuit een bepaalde plaag of bestrijder. Twee onderzoekers zijn specifiek belast met het uitvoeren van praktijkonderzoek. Een groot deel van de onderzoekscapaciteit van R&D-Entomology wordt besteed aan productie gerelateerd onderzoek. Het gaat hierbij om de ontwikkeling van massakweeksystemen, verbetering/borging van kwaliteit, verpakkingsmethoden, verhoging van leverzekerheid en kostprijbeheersing.

De laatste jaren komt het vaker voor dat ook de interactie tussen diverse natuurlijke vijanden onderzocht moet worden (*intraguild predation*).

R&D-Microbials

Speerpunten van deze onderzoeksafdeling liggen in de ontwikkeling van producten ter bestrijding van insectenplagen en ziekten, zoals echte meeldauw, *Botrytis* en bodemziekten. Enerzijds worden hierbij eigen producten ontwikkeld. Een voorbeeld hiervan is de ontwikkeling van een natuurlijk antimicrobieel enzymstelsel, dat in eerste instantie getest wordt op bestrijdingscapaciteit van echte meeldauw (curatieve werking), doch hopelijk uiteindelijk voor gebruik in een veel breder toepassingsgebied geregistreerd zal kunnen worden.

Anderzijds, in verband met de hoge kosten van registratie van microbiologische producten, wordt ook gekeken naar producten van derden, die of reeds geregistreerd zijn of waarvan in ieder geval een

groot deel van het registratiedossier aanwezig is. Zo verhandelt Koppert momenteel Mycostop (bacterie *Streptomyces griseoviridis* van Verdera, Finland) ter bestrijding van *Fusarium oxysporum* en *Pythium ultimum* in cyclaan en komkommer. De schimmel *Trichoderma harzianum* stam T-22 (geproduceerd door BioWorks, VS en geregistreerd in de Verenigde Staten, Canada en Turkije als biologisch fungicide) wordt momenteel door Koppert in Engeland, Noorwegen en IJsland op de markt gebracht als plantversterker. Het feit dat de registratierichtlijnen voor plantversterkers in de verschillende landen binnen de EU nog zeer van elkaar verschillen (voor zover deze richtlijnen al duidelijk zijn) werkt een snelle toelating van dit product in een groot aantal landen tegen. De registratie voor Nederland wordt over ongeveer een jaar verwacht.

Verder wordt onderzoek verricht naar verbetering van productieprocessen van schimmels, bacteriën en nematoden en naar kweekmogelijkheden van nieuwe nematodensoorten.

Koppert's doel is om effectieve, veilige, kwalitatief betrouwbare en geregistreerde bio-pesticiden op de markt te brengen. Bovendien moet het zowel voor Koppert als voor de teler economisch interessant zijn. Dat dit in het algemeen een moeilijke route is wordt weerspiegeld in het aantal beschikbare en succesvolle biologische bestrijdingsmiddelen op de markt.

R&D-Pollination

Momenteel wordt voornamelijk onderzoek gedaan op het gebied van productontwikkeling (verbetering van nestkast) en procesontwikkeling (verbetering kweekproces). Verder wordt ook onderzocht welke invloed bepaalde teeltomstandigheden (zoals belichting en

kasbedekking) hebben op het gedrag van hommels.

In het verleden is onder andere ook gekeken naar de mogelijkheden om hommels te gebruiken als vector voor de verspreiding van sporen van *Trichoderma harzianum* tegen vruchtrot (*Botrytis cinerea*) in aardbei en broodschimmel (*Mucor* spp.) in aubergine. Het idee om bloembezoekende insecten hiervoor in te zetten is al een jaar of tien oud. Al begin jaren negentig werden in de Verenigde Staten honingbijen ingezet bij de verspreiding van bacteriën tegen bacterievuur (*Erwinia amylovora*). Andere toepassingen volgden, zoals de verspreiding van *Gliocladium roseum*, *Trichoderma harzianum* en *Bacillus subtilis* tegen vruchtrot in aardbei, zonnebloem, tomaat en aubergine. Uit eigen onderzoek bleek dat hommels (net als honingbijen) goed in staat zijn voldoende schimmelsporen naar de bloemen over te brengen. Ook is in dit onderzoek een dispenser (verdeelbakje) ontwikkeld, waar-

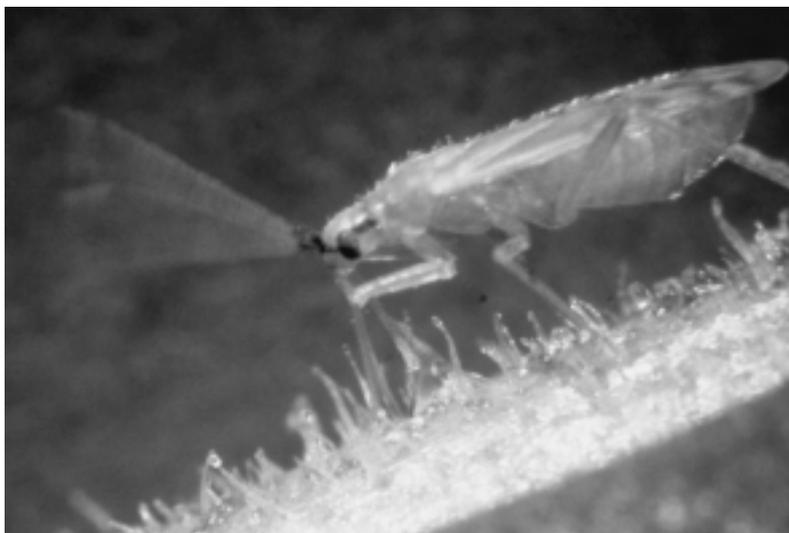
door de hommels goed in aanraking komen met de te transporteren schimmel voor ze de nestkast verlaten. In Zweden worden bestuivers al voor dit doeleinde gebruikt. In de meeste landen is het nodig deze schimmel en de bestrijdingswijze te registreren voor er gebruik gemaakt kan worden van deze elegante en innoverende manier van gewasbescherming. Echter aangezien dat een gecompliceerde en kostbare zaak is voor een niche-markt zal dat niet snel gebeuren.

Producten- en dienstenpakket

Inmiddels brengt Koppert ruim dertig natuurlijke vijanden en bestuivers op de markt. Voor zover ontwikkeld voldoen deze natuurlijke vijanden ruim aan de kwaliteitsnormen, opgesteld door de IOBC (International Organisation for Biological and Integrated Control). De afdeling Quality Control



Kaartje met door *Encarsia formosa* geparasiteerde wittevlieggoppen in tomaat (foto: Koppert B.V.)



De roofwants Macrolophus caliginosus (foto: Koppert B.V.)

ARTIKEL

toetst de natuurlijke vijanden continu aan de gesteld kwaliteitsnormen.

Daarnaast levert Koppert ook vangplaten, natuurlijke correctiemiddelen, feromoonvallen, virus-testkits, handleidingen, boeken en cursussen op maat. Een overzicht van producten en diensten, die Koppert wereldwijd levert ter (ondersteuning van de biologische) bestrijding van plagen en ziekten, is te vinden op Internet onder www.koppert.nl.

Samenwerking

Zowel op het gebied van wetenschappelijk als toegepast onderzoek wordt wereldwijd samengewerkt met instituten en universiteiten. Zo wordt er deelgenomen aan diverse nationale STW-projecten als ook aan internationale EU-projecten.

Op het gebied van toegepast onderzoek wordt samengewerkt met de PPO's te Naaldwijk en Aalsmeer (groente- en sierteelt), Boskoop (boomteelt), Lisse (bollenteelt), Lelystad (onder andere vollegrondsgroenteteelt), Hilvarenbeek (bestuiving) en Proeftuin Zwaagdijk (onder andere bloembollen- en vollegrondsgroenteteelt). Daar-

naast treedt Koppert ook als partner op in diverse andere projecten (zoals bv. van DLV FACET (Freesia, Begonia), LTO Nederland (Ruimte voor Groente, Functionele Agro Biodiversiteit) en GENOEG van CLM).

Op deze wijze kunnen vragen vanuit de praktijk goed ingebed worden in het lopende gewasbeschermingsonderzoek, uitgevoerd door de diverse instanties.

Koppert ontwikkelt producten op basis van geleedpotigen, micro-organismen en natuurlijke stoffen, die ze zelf probeert te ontdekken. De meeste producten worden echter ontwikkeld nadat screening en fundamenteel onderzoek zijn uitgevoerd door onderzoeksinstituten, waarna Koppert de haalbaarheid van ontwikkeling tot bruikbaar eindproduct voor de teler onderzoekt. Samenwerking vanaf een vroeg stadium is essentieel om een efficiënte productontwikkeling in al zijn aspecten voor elkaar te krijgen.

Toekomstvisie

Meer en meer landen stellen hoge eisen aan de import van natuurlijke vijanden. Er dient duidelijk te zijn of bepaalde (onder)soorten in het

land van introductie al voorkomen en de mogelijke risico's van introductie dienen onderzocht te zijn.

In Nederland is de vernieuwde Flora- en Faunawet actualiteit. Deze wet stelt dat het zonder ontlasting verboden is dieren te verhandelen. Hierdoor is het uitzetten van natuurlijke vijanden strafbaar geworden. Er wordt wel gewerkt aan een reparatiewetgeving (een AMvB of een convenant tussen overheid en bedrijfsleven), maar vermoed wordt dat deze wet er uiteindelijk toe zal leiden dat sommige natuurlijke vijanden, die goed presteren, vervangen dienen te worden door andere, vaak inheemse soorten, ook als deze lager scoren in bestrijdingscapaciteit. In het algemeen gesproken mag verwacht worden dat de nieuwe wet er toe zal leiden dat het ontwikkelen van nieuwe producten meer tijd en geld zal gaan vragen, aangezien er uitgebreider onderzoek plaats zal moeten gaan vinden naar de mogelijke risico's voor en effecten op het milieu dan voorheen het geval was.

Microbiologische producten (met uitzondering van nematoden) dienen, net als chemische gewasbeschermingsmiddelen, toegelaten te worden. De eisen die de verschillende landen aan toelating stellen zijn op dit moment niet erg uniform, hetgeen betekent dat het toelaten van microbiologische producten een kostbare en tijdrovende zaak is. Daarbij komt nog dat deze producten in het algemeen voor een relatief kleine markt ontwikkeld worden, waardoor het moeilijk, zo niet onmogelijk is om deze kosten ooit terug te verdienen. Het is dan ook zeer noodzakelijk om (binnen de EU) snel tot harmonisatie van toelatingsrichtlijnen te komen teneinde de ontwikkeling van milieuvriendelijke alternatieven niet verder te frustreren.

Voedselveiligheid staat momenteel erg in de belangstelling. Om voed-

Casus

Biologische bestrijding van witte vlieg in beweging

Witte vlieg soorten

Kaswittevlieg (*Trialeurodes vaporariorum*) is een algemeen voorkomende plaag in kasteelten. Het ontstaan van Koppert Biological Systems is nauw verweven met de bestrijding van de kaswittevlieg. In de zestiger jaren was dit een grote plaag in vooral komkommer en tomaat. De beschikbare chemische middelen werkten niet afdoende. De sluipwesp *Encarsia formosa* (EN-STRIP) bracht uitkomst en was daarmee jarenlang één van de belangrijkste producten van Koppert Biological Systems.

Sinds 1986 komt ook de katoenwittevlieg *Bemisia tabaci* voor, vooral in de sierteelt onder glas, maar ook in gewassen als tomaat en paprika. Op de achtergrond speelt mee dat er verschillende biotypen van *B. tabaci* voorkomen, maar voor de bestrijdingsstrategie speelt dit geen rol.

Historisch overzicht

E. formosa (foto 1) heeft gedurende ruim 25 jaar een succesvolle monopoliepositie gehad. Het product heeft in de loop van de tijd diverse verbeteringen ondergaan. Aanvankelijk werden de sluipwespenpoppen op komkommerblad geleverd. In 1978 werden de eerste kartonnen kaartjes geleverd (foto 2). Hiermee kon een schoon product met een vast aantal poppen worden geleverd.

Om de verdeling van de sluipwespen over een kas verder te optimaliseren, is het aantal poppen per kaartje verminderd en het aantal kaartjes per oppervlakte-eenheid verhoogd.

Sinds 1992 is de entomofage schimmel *Verticillium lecanii* onder de naam MYCOTAL op de Nederlandse markt. Om de effectiviteit te verhogen wordt toevoeging van ADDIT (een door Koppert ontwikkelde hulpstof op basis van een plantaardige olie) geadviseerd. Deze combinatie werkt prima in de groenteteelt als correctiemiddel, wanneer een haard van witte vlieg is ontstaan. In de sierteelt kan dit 'preventief' gebruikt worden, ook in combinatie met chemische middelen.

In 1994 kwam de roofwants *Macrolophus caliginosus* (MIRICAL, foto 3) op de markt. De reden hiervoor was onder meer dat de teelttemperatuur in tomaat met enkele graden was verlaagd (wat een negatief effect had op de ontwikkeling van *E. formosa*) en dat er meer blad werd geplukt, waarmee veel poppen van *E. formosa* werden afgevoerd. Deze algemene predator bleek succesvol te gebruiken in tomaat, komkommer en paprika tegen witte vlieg, maar draagt daarnaast ook bij aan de bestrijding van spint, motten eieren en mineervlieg.

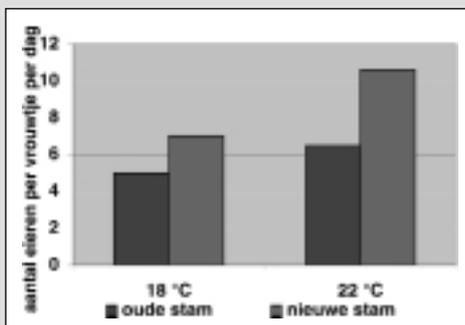
Dat biologische bestrijding niet per definitie veilig is, bleek toen deze wants voor forse bloemschade zorgde in gerbera en vruchtzetting bij bepaalde tomatencultivars nadelig beïnvloedde. Voor gebruik in gerbera wordt gezocht naar nieuwe wittevliegbestrijders, terwijl in tomaat alleen te hoge roofwantspopulaties in het najaar geremd moeten worden.

In 1994 kwam ook de sluipwesp *Eretmocerus californicus* (ERCAL) op de markt, die zowel kaswittevlieg als katoenwittevlieg bestrijdt. Deze sluipwesp doet meer aan gastheervoeding (predatie), parasiteert kleinere larven en werkt beter bij hogere temperaturen dan *E. formosa*.

Sinds enkele jaren luistert deze parasiet naar de naam *Eretmocerus eremicus*, maar de merknaam is onveranderd gebleven.

In 1999 werd een andere stam van *E. formosa* op de markt gebracht, die zowel bij lagere als bij hogere teelttemperaturen een betere eileg vertoont dan de oude stam (zie grafiek 1)

De sluipwesp *Eretmocerus mundus* (BEMIPAR) is de laatste nieuwkomer en dateert van 2002. Deze sluipwesp is een specialist in de bestrijding van katoenwittevlieg. In Zuid Europa is dit de belangrijkste bestrijder. Daar deze witte vlieg nu ook in Nederland voorkomt, is er hier veldonderzoek gedaan in het voorjaar van 2003. Dit onderzoek heeft aangetoond dat deze sluipwesp ook in Nederland succesvol is te gebruiken.



Grafiek 1. De invloed van (teelt-)temperatuur op de eileg van 2 stammen van *Encarsia formosa*

Onderzoek in beweging

Ondanks het succes van *E. formosa* bleken aanvullende bestrijders nodig om te komen tot een goede wittevliegbestrijding. Factoren als teelttechniek, klimaat, cultivar, schadedrempel en de beschikbaarheid van chemische correctiemiddelen zijn in hoge mate bepalend voor het succes van biologische bestrijding. Als één of meerdere van deze factoren wijzigen, dan kan het nodig zijn om de inzetstrategie van de bestrijders aan te passen. Als dit onvoldoende succes heeft, wordt er gezocht naar aanpassingen van een product. Tevens worden nieuwe bestrijders gezocht en getest.

Vernieuwingen zijn ook nodig wanneer er markten in andere landen worden aangeboord. Een hogere infectiedruk, een ander klimaat en de toelating voor een bepaalde natuurlijke vijand bepalen welke onderzoeksstrategie gevolgd moet worden. Hierdoor blijft het onderzoek naar alternatieve gewasbeschermingsmiddelen voortdurend in beweging.

sel op een veilige wijze te kunnen produceren is het nodig dat telers de beschikking hebben over voldoende gewasbeschermingsmethoden. Het huidige overheidsbeleid is erop gericht om het gebruik en de afhankelijkheid van gewasbeschermingsmiddelen te reduceren. Dit heeft tot gevolg gehad dat er in de afgelopen jaren veel milieubelastende middelen van de markt zijn verdwenen. Voor een deel zijn deze middelen vervangen door milieuvriendelijkere alternatieven, die goed passen in een geïntegreerd systeem. Dit heeft echter i.h.a. niet geleid tot een toename in het gebruik van natuurlijke vijanden, mogelijk deels vanwege het gebruiksgemak van de alternatieve middelen, deels vanuit kosten oogpunt.

Het (inter)nationale belang van moderne en milieuvriendelijke land- en tuinbouw wordt niet door iedereen ingezien. Als het ondernemersklimaat in Nederland verder verslechtert, dan zullen diverse telers uitwijken naar andere landen. Het is van belang

deze ontwikkelingen op de voet te volgen om daarmee te kunnen bepalen welke (onderzoeks-) prioriteiten de komende jaren gesteld moeten worden.

Beleid en onderzoek in Nederland

Onderzoek 'moet' innovatief, steeds weer grensverleggend zijn. Het geld, dat door de overheid voor onderzoek beschikbaar wordt gesteld, wordt voornamelijk besteed aan fundamenteel onderzoek (gekenmerkt door steekwoorden als genomics, proteomics en metabolomics en niet te vergeten de 'citatie-index'). Resultaten van dit onderzoek zijn echter niet direct toepasbaar voor de praktijk. Hiervoor is, in vervolg op het fundamentele onderzoek, toepassingsgericht onderzoek nodig, maar financiering hiervan ontbreekt helaas vaak.

Dit is een manco in het beleid, zeker in landbouwgericht onder-

zoek. Het bedrijfsleven alleen is niet in staat alle resultaten om te zetten in producten, adviezen *et cetera* voor de teler. Dit vraagt om een gezamenlijke inspanning van alle betrokkenen; pas dan leidt het geld en het beleid tot maatschappelijk relevante resultaten.

Stelling

Voor een duurzame ontwikkeling van gewasbescherming in Nederland moet het gewasbeschermingsonderzoek vooral een bijdrage leveren aan toepassingsgericht onderzoek voor de ontwikkeling van bedrijfszekere en betaalbare IPM-systemen, met daarin voldoende ruimte voor zowel biologische als selectieve, milieuvriendelijke middelen. Op deze wijze komen de onderzoeksresultaten van instellingen en bedrijfsleven ten goede aan de doelgroep - de telers. Hiervoor is financiering vanuit overheid en eindgebruikers noodzakelijk.

ARTIKEL

Levensvatbaarheid van *Ralstonia* en *Clavibacter* meetbaar met behulp van RNA-detectiemethoden

J.R.C.M. van Beckhoven en J.M. van der Wolf

Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen Jose.vanbeckhoven@wur.nl

***Ralstonia solanacearum* en *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, de veroorzakers van respectievelijk de bacterieziekten bruinrot en ringrot in de aardappel, zijn belangrijke ziekteverwekkers met een quarantaine status. Voor studie naar de epidemiologie van deze pathogenen zijn detectiemethoden die de vitaliteit van de bacteriecellen kunnen aantonen, zonder deze te hoeven kweken, van groot belang. Dit geldt in het bijzonder voor Rsol, waarvan bekend is, dat deze onder bepaalde condities cellen kan vormen in een toestand waarin deze 'viable but non culturable' zijn.**

In ons onderzoek hebben we detectiemethodes ontwikkeld gebaseerd op amplificatie van 16S rRNA sequenties met behulp van NASBA (nucleic acid sequence based amplification). De aanwezigheid van intact 16S RNA is namelijk een indicator voor de levensvatbaarheid van cellen. NASBA is een methode waarmee nucleïnezuren, maar in het bijzonder RNA-sequenties, efficiënt geamplificeerd kunnen worden. In NASBA worden enkelstrengs RNA-moleculen exponentieel geamplificeerd. Amplicons kunnen vervolgens gedetecteerd worden met behulp van agarose gelelektroforese en northern blotting. Wanneer NASBA gecombineerd wordt met een real-time detectie door middel van een fluorescente 'Molecular Beacon', spreekt men van AmpliDet RNA. Detectie van amplicons vindt plaats gedurende de amplificatie in een gesloten systeem, waardoor risico's van kruisbesmettingen vermeden worden.

Inleiding

Ringrot en bruinrot zijn bacterieziekten met een quarantaine status die veel schade kunnen aanrichten in de aardappelteelt. Ringrot komt vooral voor in koudere gebieden en wordt veroorzaakt door de Gram-positieve bacterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms). Bruinrot wordt veroorzaakt door de Gram-negatieve bacterie *Ralstonia solanacearum* (Rsol) en heeft in

het recente verleden grote economische schade aangericht in Nederland. Beide pathogenen kunnen latent aanwezig zijn in planten en knollen. Cms is bovendien in staat lange tijd te overleven op diverse materialen waardoor dit pathogeen onopgemerkt verspreid kan worden (Bonde, 1942; Nelson, 1978; Nelson, 1980).

Er zijn in het verleden verschillende detectiemethodes ontwikkeld voor zowel Rsol als Cms. Voor bei-

de pathogenen bestaan semi-selectieve media en zijn serologische methodes als ELISA, immunofluorescentie cell kleuring (IF) en immunofluorescentie colonie kleuring (IFC) beschikbaar. Het nadeel van deze methodes is dat ze of tijdrovend zijn of, in het geval van serologische detectie, dat vals-positieve resultaten kunnen ontstaan doordat er kruisreacties optreden met verwante organismen. Met name Cms kan moeilijk geïsoleerd worden, doordat de bacterie langzaam groeit en daardoor op agar media gemakkelijk door saprophyten overgroeid raakt. Door gebruik te maken van methodes die gebaseerd zijn op amplificatie van specifieke DNA sequenties zoals Polymerase Chain Reaction (PCR) kan een betere specificiteit en gevoeligheid behaald worden. Voor beide pathogenen zijn specifieke PCR primers geselecteerd (Seal *et al*, 1993; Mills *et al*, 1997). Echter, methoden gebaseerd op amplificatie van DNA kunnen geen dode van levende cellen onderscheiden. DNA kan namelijk lange tijd intact blijven nadat een cel sterft, evenals de antigenen die met behulp van IF en ELISA, gedetecteerd worden. Met behulp van deze methoden kan de vitaliteit van cellen dus niet vastgesteld worden. In uitplaatmethoden en IFC worden weliswaar levende kolonievormende cellen aangetoond, maar geen levende niet-cultiveerbare cellen (VBNC's).

ARTIKEL

(Bloomsfield *et al.*, 1998). Voor Rsol is reeds aangetoond dat deze bij lage temperaturen in water VBNC's vormt (Van Elsas *et al.*, 2001). Deze cellen kunnen niet op agarmedia uitgroeien, maar zijn nog wel in staat in de plant te groeien en bijvoorbeeld tomatenplanten ziek te maken. Er bestaat dus het gevaar dat VBNC's in uitplaatmethoden niet aangetoond worden maar wel infecties veroorzaken. Voor epidemiologische en ecologische studies is het dus belangrijk dat alle levende cellen, inclusief niet-cultiveerbare cellen, gedetecteerd worden. Een methode gebaseerd op de detectie van RNA sequenties kan hier uitkomst bieden.

AmpliDet RNA met gebruik van Molecular Beacons

AmpliDet RNA is een detectiemethode gebaseerd op de amplificatie van RNA door middel van NASBA, waarbij amplicons real time gedetecteerd worden met een fluorescerende probe, een zgn. Molecular Beacon (Leone *et al.*, 1998).

NASBA is een isothermische amplificatie-methode waarbij een enkelstrengs stukje 16S rRNA geamplificeerd wordt door de gezamenlijke werking van drie verschillende enzymen, AMV reverse transcriptase, RNase H en T7 RNA polymerase en 2 specifieke primers. De volledige reactie vindt plaats bij 41°C zodat geen thermocycler nodig is.

Een Molecular Beacon is een enkelstrengs oligonucleotide die in een steel/lus structuur gevouwen is. De lus is complementair aan de target RNA sequentie en de steel bestaat uit de twee complementaire 3' en 5' einden die samen een dubbelstrengs structuur vormen, waarbij één uiteinde van de steel gemerkt is met een fluorescerende

groep en het andere uiteinde met een uitdover (figuur 1). Wanneer de lus aan het target RNA bindt zal de steel openvrouwen en de uitdover van de fluorescerende groep verwijderd worden waardoor er een fluorescent signaal ontstaat (Tyagi en Kramer, 1996).

AmpliDet RNA wordt tegenwoordig met succes toegepast bij de detectie van zowel humane infectieziekten zoals HIV (Yates *et al.*, 2001; Van Beuningen *et al.*, 2001), als plantpathogenen zoals het aardappelbladrolvirus (PLRV) (Klerks *et al.*, 2001).

Detectie van Rsol en Cms met behulp van AmpliDet RNA

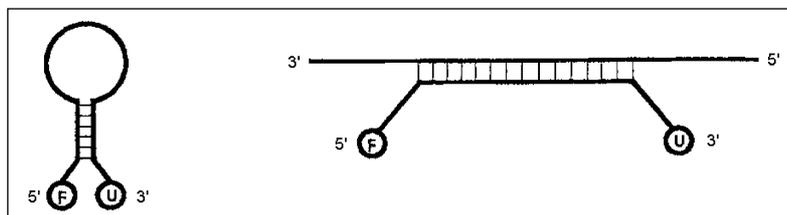
Er is reeds onderzoek gedaan naar de mogelijkheden van NASBA en AmpliDet RNA voor de detectie van Cms en Rsol (Bentsink *et al.*, 2002; Van Beckhoven *et al.*, 2002, Van der Wolf *et al.* in press). Specifieke primers en probes werden ontwikkeld aan de hand van alignments van 16S rRNA sequenties van deze pathogenen en verwante species. De gevoeligheid voor reïncultures van zowel Cms als Rsol bleek 10 cfu per reactie te zijn. Dit komt overeen met een detectie-grens van 500 cfu/ml extract. RNA detectie is dus ongeveer even gevoelig als de gangbare IF detectie waarbij ca. 1000 cfu/ml gedetecteerd worden.

RNA detectie als maat voor levensvatbaarheid van bacteriële cellen

Door Van Elsas *et al.* (2001) is aangetoond dat onder invloed van lage temperaturen cellen van Rsol in oppervlaktewater overgaan van een cultiveerbare naar een niet-cultiveerbare VBNC staat. Deze cellen zullen derhalve niet gedetecteerd kunnen worden met behulp van conventionele uitplaatmethoden. Besmettingen van het oppervlaktewater kunnen daardoor onopgemerkt blijven en een bedreiging vormen voor de aardappelteelt. Deze VBNC cellen zouden echter wel met behulp van RNA detectie aangetoond kunnen worden, omdat in vitale cellen RNA aanwezig is.

Voor verschillende micro-organismen is reeds aangetoond dat zowel mRNA of 16S rRNA als indicator gebruikt kan worden voor de levensvatbaarheid van cellen (Van der Vliet *et al.*, 1994; Simpkins *et al.*, 2000). RNases breken na de celdood het vrijgekomen RNA snel af terwijl het DNA langere tijd aantoonbaar blijft. Er is voor zowel prokaryote als eukaryote cellen eveneens een verband aangetoond tussen de hoeveelheid rRNA en de metabolische activiteit of integriteit van cellen (Hahn *et al.*, 1992; Lamattina *et al.*, 1998). rRNA kan dus als maat dienen voor de metabolische activiteit van cellen.

Het is bekend dat NASBA onder



Figuur 1. Structuur van een 'Molecular Beacon'. Wanneer er geen target aanwezig is (links), is de beacon gesloten en zal de uitdover (U) het fluorescente label (F) uitdoven. Wanneer de beacon echter aan de target gebonden is (rechts), opent de beacon en zal er een fluorescent signaal ontstaan (Tyagi and Kramer, 1996).

bepaalde omstandigheden naast 16S rRNA sequenties, ook de homologe rDNA sequenties kan amplificeren. Daarom is onderzocht of onder de door ons gekozen condities NASBA exclusief RNA en niet ook het relatief stabiele DNA amplificeerde. Hiervoor zijn drie verschillende methodes gebruikt:

1. De totale nucleïnezuur fracties (DNA en RNA) werden gezuiverd uit reïncultures van Rsol en Cms en vervolgens behandeld met RNase of DNase. Deze enzymen breken het respectievelijk het aanwezige RNA en DNA af. Als controle werd ook een gezuiverde onbehandelde nucleïnezuur fractie getest (zie tabel 1).
2. Reïncultures van Cms en Rsol werden gedood met behulp van een hitte-behandeling (30 minuten, 80° C) en de dode cellen werden vervolgens overnacht geïncubeerd bij kamertemperatuur. Het RNA dat na deze behandeling vrijkomt zou door eveneens vrijgekomen enzymen afgebroken moeten worden terwijl het stabiele rDNA intact blijft.
3. Reïncultures van Cms en Rsol werden gedood met behulp van natriumhypochloriet (0.5%) en vervolgens toegevoegd aan gezonde aardappelextracten. Uit deze extracten werd de totale nucleïnezuur fractie (DNA en RNA) gezuiverd en getest. Als controle werd na de zuivering aan een deel van de fractie gezuiverd RNA toegevoegd. Dit laatste om te bepalen of het natriumhypochloriet geen schadelijke effecten op de zuivering of NASBA hadden uitgeoefend.

Het aanwezige DNA en/of RNA

Tabel 1. Detectie van totale nucleïne-zuurextracten (DNA en RNA) afkomstig van 10⁷ cellen/ml *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus* en *Ralstonia solanacearum* na diverse behandelingen.

Behandeling	Aanwezige nucleïne-zuur na behandeling	Resultaat Cms	Resultaat Rsol
Geen	DNA en RNA	+	+
Dnase	RNA	+	+
Rnase	DNA	-	-
Hitte en overnacht incubatie bij kamertemperatuur	DNA	-	-
Behandeling met natrium hypochloriet	DNA	-	-
Extra RNA toegevoegd na natrium hypochloriet behandeling	DNA en RNA	+	+

werd geanalyseerd met behulp van agarose-gelelektroforese en daarna getest met AmpliDet RNA of, in het geval van Rsol, met NASBA en blotting (tabel 1). Het bleek dat alleen de monsters waarin RNA aanwezig was een positief signaal gaven in AmpliDet RNA. Dit geeft aan dat de NASBA onder de door ons gekozen condities geschikt lijkt te zijn voor het bepalen van de vitaliteit van Cms en Rsol cellen.

De levensvatbaarheid van Rsol werd eveneens getest door druppels water die 10⁸ cellen/ml Rsol bevatten op steriele ijzeren strips te laten drogen en de cellen op verschillende tijdstippen opnieuw te resuspendieren in 0.8 % NaCl. De monsters werden vervolgens getest in PCR en NASBA en uitgeplaat op TSA. Tot en met 4 uur na de start van het experiment waren levensvatbare cellen van Rsol aantoonbaar aanwezig. Echter na 24 uur waren de NASBA resultaten negatief en konden geen cultiveerbare cellen meer worden aangetoond. Het aanwezige DNA was

echter nog steeds detecteerbaar met behulp van PCR (tabel 2).

Toepassing van RNA detectie

Het is aangetoond dat detectiemethoden, gebaseerd op amplificatie van rRNA sequenties met NASBA, een hoge gevoeligheid bezitten en exclusief levende cellen van Cms en Rsol kunnen aantonen. Daardoor zijn deze methoden zeer geschikt voor de bepaling van de vitaliteit binnen een populatie en zodoende een uitstekend instrument bij ecologische studies naar de overleving en verspreiding van plantpathogene bacteriën en bij studies naar cellen in een levende, maar niet cultiveerbare staat.

Literatuur

- Bentsink, L., Leone, G.O.M., van Beckhoven, J.R.C.M., van Schijndel, H.B., van Gemmen, B. and van der Wolf, J.M., 2002, Amplification of RNA by NASBA allows direct detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in potato, Journal of Applied Microbiology **93**, 647-655
- Bloomsfeld, S.F., Gordon, S.A.B., Stewart, C., Dodd, E.R., Booth, I.R., and Power, E.G.M., 1998, The viable but non-culturable phenomenon explained, Microbiology **144**, 1-2
- Bonde, R., 1942, Ring rot in volunteer plants, American Potato Journal **19**, 131-133
- Elphinstone, J.G., Survival and possibilities

Tabel 2. Overleving van *Ralstonia solanacearum* op ijzeren strips gedetecteerd met behulp van NASBA, PCR en uitplaten op TSA.

Tijd (uren)	0	0.5	1	4	24	48	144
NASBA	+	+	+	+	-	-	-
PCR	+	+	+	+	+	+	+
Uitplaten	+	+	+	+	-	-	-

- for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates, *Potato Research* **39**, 403-410
- Hahn, D., Amann, R.L., Ludwig, W., Akkermans, A.D.L. and Schleifer, K.H., 1992, Detection of micro-organisms in soil after in-situ hybridization with rRNA-targeted fluorescently labelled oligonucleotides, *Journal of General Microbiology* **138**, 879-887
- Klerks, M.M., Leone, G.O., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F. and Schoen, C.D., 2001, Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of Potato leafroll virus and Potato virus Y in potato tubers. *Journal of Virological Methods* **93**, 115-125.
- Lamattina, L., Pinedo, M., Yudi, V.P., Pont-Lezica, R.F. and Conce, R.D., 1988, Estimation of rRNA synthesis and degradation rate in sequencing wheat leaves, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **260**, 285-292
- Leone, G.O.M., van Schijndel, H., van Gemmen, B., Russel Kramer, F. and Schoen, C.D., 1998, Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA, *Nucleic Acids Research* **26**, 2150-2155
- Mills, D., Russell, B.W. en Hanus, J.W., 1997, Specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by amplification of three unique DNA sequences isolated by subtraction hybridisation, *Phytopathology* **87**, 853-861
- Nelson, G.A., 1978, Survival of *Corynebacterium sepedonicum* on contaminated surfaces, *American Potato Journal* **55**, 449-453
- Nelson, G.A., 1980, Long-term survival of *Corynebacterium sepedonicum* on contaminated surfaces and in infected potato stems, *American Potato Journal* **57**, 595-599
- Seal, S.E., Jackson, L.A., Young, J.P.W. and Daniels, M.J., 1993, Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction, *Journal of General Microbiology* **139**, 1587-1594
- Simpkins, S.A., Chan, A.B., Hays, J., Pöpping, B. and Cook, N., 2000, An RNA transcription based amplification technique (NASBA) for the detection of viable *Salmonella enterica*, *Letters in Applied Microbiology* **30**, 75-79
- Tyagi, S. and Kramer, F.R., 1996, Molecular Beacons; probes that fluoresce upon hybridization, *Nature Biotechnology* **14**, 303-308
- Van Beckhoven, J.R.C.M., Stead, D.E. and Van Der Wolf, J.M., 2002, Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon, *Journal of Applied Microbiology* **93**, 840-849.
- Van Beuningen, R., Marras, S.A.E., Kramer, F.R., Oosterlaken, T., Weusten, J., Borst, G. and van de Wiel, P., 2001, Development of a high-throughput detection system for HIV-1 using real-time NASBA based on molecular beacons, *Proceedings - SPIE the International Society for Optical Engineering*. 4264, 66-71.
- Van der Vliet, G.M.E., Schepers, P., Schukink, R.A.F., van Gemen, B. en Klatser, P.R., 1994, Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 1959-1965
- Van Elsas, J.D., Kastelein, P., De Vries, P.M. en Van Overbeek, L.S., 2001, effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* by 2 in irrigation water, *Canadian Journal of Microbiology* **47**, 842-854
- Van der Wolf, J.M., van Beckhoven, J.R.C.M., De Haan, E.G., van den Bovenkamp, G.W. and Leone, G.O.M., Detection of specific *Ralstonia solanacearum* 16S rRNA sequences by AmpliDet RNA in which NASBA amplicons are monitored with the molecular beacon, *Journal of Applied Microbiology*, in press
- Yates, S., Penning, M., Goudsmit, J., Frantzen, I., van De Weijer, B., van Strijp, D. and van Gemen, B., 2001, Quantitative detection of Hepatitis B Virus DNA by real-time nucleic acid sequence-based amplification with molecular beacon detection, *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3656-3665.

Eriksson in de kuif gepikt; over een mycoplasma-theorie

J.C. Zadoks

Een historische controverse, vandaag van geen enkel belang, maar toch! Een als onjuist aangevoelde theorie is vaak een uitdaging tot nieuwe proeven om de theorie te falsifiëren en vormt aldus de kiem tot nieuwere en betere theorieën. Mycoplasma's bestaan al meer dan een eeuw en sinds ongeveer een halve eeuw kunnen ook planten daaraan lijden. De zweed J. Eriksson, in zijn tijd één van de meest vooraanstaande fytopathologen van de wereld, beschreef "latente kiemen" van de gele roest van tarwe in 1901 als "mycoplasma". Hij deed dat om de overwintering van de gele roest (*Puccinia [glumarum] striiformis*) te verklaren, want de lange winterse incubatietijden (tot 120 en meer dagen), zoals wij die nu kennen, wilden er bij hem nog niet in.

Hij had ongelijk. De even bekende brit H. Marshall Ward (van de kofieroest, Ceylon) toonde in 1903 aan dat Eriksson niet goed gekeken had. Eriksson's microscopische techniek was niet aan de maat; hij had haustoriën gezien en ze geïnterpreteerd als mycoplasma's. Eriksson gaf in 1903 toe dat zijn mycoplasma's eigenlijk haustoriën waren, maar hield vol dat korrelig materiaal in overigens normale cellen van tarweblad wel degelijk de chimaerische mengeling van de protoplasma's van schimmel en waard vertegenwoordigde die hij eerder "mycoplasma" had genoemd.

Niettemin, Eriksson voelt zich zo in de kuif gepikt dat hij zijn theorie

verfijnt en zijn critici bevecht. De argumenten van de tegenstanders raken zijns inziens de opnieuw gedefinieerde "kern" van de theorie niet. Het verschuiven van het zwaartepunt van een betoog is een bekende truuk om aan de bezwaren van een tegenstander te ontsnappen. Eriksson's toon wordt met de jaren scherper. Gaandeweg wordt F. Zack, een hooggeleerde opponent uit Wenen, nog even neergesabeld, terecht overigens. Biffen in 1905 pakte het anders aan. Hij vindt Eriksson's theorie moeilijk te vatten. Hij verricht kruisingsproeven met tarwerassen die vatbaar dan wel resistent zijn tegen gele roest (nu *Puccinia striiformis*). Zoals dat behoort bij wederzijds onderzoek deed hij reciproke kruisingen, dus hij kruiste moeder van ras A met vader van ras B en moeder B met vader A. Als wij in gedachten uitwendige besmetting met gele roest uitsluiten, en alleen inwendige besmetting met mycoplasma aanvaarden, dan zou bij reciproke kruisingen de resistentie, of althans de afwezigheid van ziekte, matернаal moeten vererven. Zulks is echter niet het geval. De afwezigheid van ziekte oftewel resistentie vererft matернаal evengoed als paternaal.

De mycoplasma-theorie zou dan alleen gehandhaafd kunnen worden met een hulp-hypothese inhoudende dat de "latente kiemen" van de gele roest ook via de generatieve kernen van het pollen overgaan naar het nageslacht, aldus Biffen. Hij kon dat niet geloven,

hoewel wij nu weten dat althans enkele virussen met pollen kunnen overgaan. Biffen wees op de uitwendige besmetting. Bij uitwendige besmetting bleven resistente nakomelingen resistent, ongeacht de herkomst van die resistentie, van moeders- of van vaderszijde. En zulks tot in de F3. Ondergetekende (1961) geeft Eriksson onbedoeld nog een trap na door experimenteel aan te tonen dat zeer lange incubatietijden (120 dagen en meer) bij gele roest in de winter zeer wel mogelijk zijn. Eriksson bevecht zijn opponenten krachtig maar zwijgt Biffen dood. Waarin een groot man klein kan zijn. Exit Eriksson met zijn mycoplasma-theorie.

Biffen, R.H. (1905) Mendel's law of inheritance and wheat breeding. *Journal of Science* 1: 4-48.

Eriksson, J. (1901/2) Sur l'origine et la propagation de la rouille des céréales par la semence. *Annales de Sciences Naturelles*, 8me Série, Botanique 14: 1-124 / 15: 1-160.

Eriksson, J. - 1903. Sur l'appareil végétatif de la rouille jaune des céréales. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 137: 578-580.

Eriksson, J. - 1903. The researches of Professor H. Marshall Ward on the brown rust on the bromes and the mycoplasma hypothesis. *Arkiv für Botanik* 1: 139-146. 41.722S125.

Eriksson, J. - 1910. F. Zach's cytologische Untersuchungen über die Rostflecken des Getreides - und die Mycoplasmatheorie. *Sitzungsberichte der kaiserlichen Akademie der Wissenschaften in Wien. Mathem.-naturw. Klasse* 119: 1043-1050. 41.722S354.

Zadoks, J.C. - 1961. Yellow rust on wheat, studies in epidemiology and physiologic specialization. *Tijdschrift over Plantenziekten (Netherlands/European Journal of Plant Pathology)* 67: 69-256.

COLUMN

Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus* and bacterial speck in *Arabidopsis*

Longxian Ran

Op 30 september 2002 promoveerde Longxian Ran aan de Universiteit Utrecht op het proefschrift getiteld 'Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus* and bacterial speck in *Arabidopsis* by fluorescent *Pseudomonas* spp. strains: conditions and mechanisms'. verdedigde. Promotor was Prof. dr ir L.C. van Loon (Universiteit Utrecht), en copromotores waren Dr. P.A.H.M. Bakker (Universiteit Utrecht) en Prof. Wu Guangjin (Central South Forestry College, Zhuzhou, Hunan, P.R. China).

Bacteriële verwelkingziekte van *Eucalyptus*

Bacteriële verwelkingziekte in *Eucalyptus*-bomen, veroorzaakt door *Ralstonia solanacearum*, is sinds de jaren tachtig een ernstig probleem in plantages in Zuid China. Op deze plantages worden vrijwel uitsluitend snelgroeiende soorten en lijnen met een hoge kwaliteit voor de papierproductie geteeld. Tot deze soorten behoren *E. grandis*, *E. urophylla* en hun hybriden, waarvan de meeste zeer vatbaar zijn voor bacteriële verwelking. Bovendien verliezen sommige lijnen hun resistentie bij teelt onder andere klimaatsomstandigheden of neemt de resistentie af tijdens de meer dan drie jaar durende vermeerdering door middel van weefselkweek of stekken. Er bestaan geen effectieve beheersmaatregelen tegen bac-

teriële verwelking in *Eucalyptus*. Met financiële steun van de Stichting voor Wetenschappelijk Onderzoek van de Tropen (WOTRO) en de Natural Science Foundation van China werd een onderzoek geïnitieerd naar mogelijkheden om bacteriële verwelking in *Eucalyptus* te onderdrukken door antagonistische stammen van fluorescerende *Pseudomonas* spp. Deze niet pathogene, wortelbewonende bacteriën kunnen diverse bodemgebonden ziekten onderdrukken. Sommige *Pseudomonas* stammen zijn effectief tegen door schimmels, bacteriën en virussen veroorzaakte ziekten, waarbij verschillende mechanismen, zoals concurrentie om ijzer, productie van antibiotica, of inductie van systemische resistentie (ISR) een rol spelen. Algemeen geaccepteerde voorwaarden voor succesvolle onderdrukking van bodemgebonden ziekten door deze wortelbewonende bacteriën zijn: actieve en langdurige kolonisatie van het worteloppervlak van de plant en effectieve expressie van ziekteonderdrukkende mechanismen.

Onderdrukking van bacteriële verwelking van *Eucalyptus* door antagonistische *Pseudomonas* spp.

In dit onderzoek werd biologische bescherming door verschillende,

goed gekarakteriseerde *Pseudomonas* stammen onderzocht in twee plant - pathogeen systemen. De gebruikte stammen waren *P. putida* WCS358r, *P. fluorescens* WCS374r, WCS417r en CHA0r en *P. aeruginosa* 7NSK2. Het vermogen van deze stammen om bacteriële verwelking in *Eucalyptus* en bacteriële bladplekkenziekte in *Arabidopsis thaliana*, veroorzaakt door *P. syringae* pv. *tomato* (Pst), te onderdrukken werd vergeleken. Eerst werd nagegaan in hoeverre de bacteriestammen bacteriële verwelking in *Eucalyptus* konden onderdrukken. Vervolgens werd nagegaan of ISR hierbij een rol speelt, door directe interacties tussen de ziekteonderdrukkende en de pathogene bacteriën uit te sluiten in een proefopzet waarbij de twee populaties van micro-organismen ruimtelijk gescheiden blijven. Dezelfde stammen werden daarna in het modelsysteem *Arabidopsis* – Pst bestudeerd om te onderzoeken in hoeverre salicylzuur (SA) productie door deze bacteriën een rol speelt bij ziekteonderdrukking.

In vitro analyse van antagonistische interacties tussen de wortelbewonende pseudomonaden en *R. solanacearum* liet zien dat de stammen WCS358r, WCS374r, WCS417r en 7NSK2 *R. solanacearum* antagoniseren door concurrentie om ijzer, terwijl groeiremming door stam CHA0r gebaseerd is op antibiose. Een mutant van WCS374r die gestoord is in de productie van het ijzerbindende siderofoor pseudobactine, remde

PROMOTIE

groei van *R. solanacearum* nog steeds onder ijzerarme omstandigheden. Dit suggereert dat een tweede siderofoor van WCS374r, pseudomonine, ook in staat is groei van het pathogeen te remmen.

Geen van de geteste stammen was in staat ziekte te onderdrukken wanneer ze samen met het pathogeen door de grond werden gemengd, of wanneer zaden met de bacteriën werden behandeld voordat de zaailingen werden overgeplant in grond, geïnoculeerd met *R. solanacearum*. Onderdrukking van de ziekte werd wel waargenomen bij behandeling van de wortels van zaailingen door dompelen in een bacteriesuspensie voor het overplanten in met het pathogeen besmette grond. Onder deze omstandigheden onderdrukte WCS417r bacteriële verwelking met 30 – 45 %. Behandeling van wortels met *P. putida* stam WCS358r verminderde de ziekte in lichte mate, terwijl een mutant van deze stam die niet langer pseudobactine produceert (PSB⁻) geen enkel effect had. Dit geeft aan dat concurrentie om ijzer door middel van siderofooren een bijdrage levert aan, maar niet voldoende is voor effectieve onderdrukking van bacteriële verwelking in *Eucalyptus*. Een genetisch gemodificeerd derivaat van WCS358r dat in staat is constitutief het antibioticum 2,4-diacetylphloroglucinol te produceren (WCS358::p_hl) onderdrukte de ziekte significant. Een combinatie van WCS417r en WCS358::p_hl verbeterde de ziekteonderdrukking echter niet in vergelijking met de effecten van de enkele stammen. Dit suggereert dat de stammen met elkaar interfereren in het wortelmilieu van de plant. Er werd geen correlatie gevonden tussen het vermogen van de *Pseudomonas* spp. stammen om *in vitro* groei van het pathogeen te remmen en *in vivo* bacteriële verwelking te onderdrukken.



Figuur 1. Bacterieslijm druipt uit een door *Ralstonia solanacearum* geïnfecteerde *Eucalyptus* zaailing.

Betrokkenheid van ISR bij de onderdrukking van bacteriële verwelking

Om de mogelijke betrokkenheid van ISR bij de ziekteonderdrukking te bestuderen, werd een bio-toets ontwikkeld waarin de *Pseudomonas* bacteriën en *R. solanacearum* niet met elkaar in contact konden komen. Omdat SA het plantenhormoon is dat verantwoordelijk is voor inductie van systemische resistentie in diverse plantensoorten, werd ook SA getest in *Eucalyptus*. Toediening van SA aan grond induceerde ISR tegen infectie door het pathogeen van de stengeltop, maar infiltratie van bladeren met een SA-bevatende oplossing niet. Daarentegen waren noch de *Pseudomonas* spp. stammen WCS374r, WCS417r, CHA0r en 7NSK2, die *in vitro* SA kunnen produceren, noch de niet SA producerende stam WCS358r, in staat ISR te induceren indien ze waren toegediend aan de grond. Twee stammen, WCS358r en WCS374r, induceerden wel ISR wanneer ze werden geïnfecteerd in bladeren onder aan de stengel. De

PSB⁻ mutant van WCS358r was niet in staat ISR te induceren. Dit suggereert dat het pseudobactine siderofoor de ISR inducerende determinant van WCS358r is in dit systeem. De ISR inducerende determinant(en) van WCS374r in dit systeem zijn vooralsnog onbekend. Productie van SA lijkt geen rol te spelen, aangezien een PSB⁻ mutant van WCS358r die getransformeerd is met het gencluster uit WCS374r dat synthese van SA bewerkstelligt, alsmede andere SA producerende bacteriestammen, niet in staat bleken resistentie te induceren.

In hoeverre kan SA productie een rol spelen bij door wortelbacteriën geïnduceerde ISR?

Of door bacteriën geproduceerd SA een rol speelt bij inductie van resistentie door de *Pseudomonas* spp. stammen werd onderzocht in het modelsysteem *Arabidopsis*-Pst. In dit systeem werden dezelfde stammen onderzocht als in de combinatie *Eucalyptus*-*R. solanacearum*. De stammen WCS374r,

PROMOTIE

WCS417r, CHA0r en 7NSK2 produceerden SA *in vitro* in standaard succinaat medium (SSM) in hoeveelheden variërend van 5 fg/cel voor WCS417r tot meer dan 25 fg/cel voor WCS374r. Het toevoegen van 200 µM FeCl₃ aan SSM onderdrukte de productie van SA door alle stammen volledig. De incubatietemperatuur had geen effect op de SA productie door WCS417r en 7NSK2. Daarentegen produceerden de stammen WCS374r en CHA0r meer SA wanneer ze bij 33 °C in plaats van bij 28 °C werden gekweekt. De door WCS417r, CHA0r en 7NSK2 geïnduceerde resistentie in *Arabidopsis* leek geassocieerd te zijn met hun vermogen SA te produceren, terwijl dat voor WCS374r niet het geval was. Echter, een mutant van 7NSK2 die geen SA meer kan produceren, was nog steeds in staat ISR te induceren. De betrokkenheid van SA bij ISR kon verder worden onderzocht door gebruik te maken van transgene NahG planten, die niet in staat zijn SA te accumuleren en daardoor het vermogen missen om ISR tot expressie te laten komen. In deze NahG *Arabidopsis* planten induceerden WCS417r, CHA0r en 7NSK2 wel resistentie. Ook WCS374r, mits opgekweekt bij 33 °C of 36 °C, induceerde resistentie in NahG planten, maar deed dit niet in ethyleen-ongevoelige *ein2* of de in de expressie van PR-eiwitten en ISR gestoorde *npr1* mutanten van *Arabidopsis*. Deze resultaten tonen aan dat SA niet de primaire determinant is van de inductie van ISR door deze bacteriestammen in *Arabidopsis*.

Invloed van fenolische zuren op wortelkolonisatie door bacteriën

De invloed van door plantenwortels uitgescheiden fenolische zuren op kolonisatie door *Pseudomonas* bacteriën en inductie van ISR werd eveneens onderzocht. Mutanten van WCS358r die niet in staat zijn specifieke fenolische zuren als substraat te gebruiken, werden met de ouderstam vergeleken met betrekking tot hun vermogen wortels te koloniseren en resistentie te induceren in *Arabidopsis*. In een gnotobiotisch systeem scheiden wortels van *Arabidopsis* een complex mengsel van fenolische verbindingen uit. In dit mengsel werden kleine hoeveelheden *p*-coumaar-, *p*-hydroxybenzoë-, protocatechu- en vanillinezuur geïdentificeerd. Populatiedichtheden van bacteriën van de ouderstam en de mutanten in de voedingsoplossing van het gnotobiotische systeem waren vergelijkbaar. Dit geeft aan dat onder deze omstandigheden fenolische zuren geen beperkende factor zijn voor groei van de bacteriën. Echter, in een potgrondsysteem koloniseerden de mutanten FAI1, FAI15 en VBHB, die gestoord zijn in het gebruik van respectievelijk *p*-coumaar-, vanilline- en *p*-hydroxybenzoëzuur, de wortels van *Arabidopsis* slechter dan de ouderstam. Ondanks de verminderde kolonisatie was het vermogen van de mutanten om resistentie te induceren tegen Pst onaangetast.

Conclusies

De rol van bacteriële determinanten bij de onderdrukking van plantenziekten lijkt afhankelijk te zijn van de plantensoort. Het pseudobactine siderofoor van WCS358r onderdrukt bacteriële verwelking in *Eucalyptus* zowel door concurrentie om ijzer als door inductie van ISR. Voor geen van de *Pseudomonas* stammen lijkt door de bacteriën geproduceerd SA een rol te spelen bij de inductie van ISR, noch in het *E. urophylla-R. solanacearum*, noch in het *Arabidopsis*-Pst systeem. Determinanten van stam WCS374r, die betrokken zijn bij inductie van resistentie in *Eucalyptus*, vergen nader onderzoek. Productie van 2,4-diacetylphloroglucinol door CHA0r en een derivaat van WCS358r, WCS358::p_hl, remde de groei van *R. solanacearum in vitro* sterk en consistent. Echter, alleen stam WCS358::p_hl onderdrukte bacteriële verwelking *in vivo*. De vraag of de stammen het antibioticum daadwerkelijk produceren in het wortelmilieu van *Eucalyptus* dient nader onderzocht te worden.

De in dit onderzoek waargenomen onderdrukking van bacteriële verwelking door specifieke *Pseudomonas* bacteriën via zowel directe interacties tussen de bacterie en het pathogeen als door de bacterie in de plant geïnduceerde ISR, opent mogelijkheden voor effectieve beheersing van de ziekte.

Pompen of verzuipen

I. Stergiopoulos, L-H. Zwiars en M.A. de Waard

Op 1 mei 2002 promoveerde aan de Wageningen Universiteit Lute-Harm Zwiars op een proefschrift getiteld: *ABC transporters of the wheat pathogen Mycosphaerella graminicola*. Op 20 januari 2003 promoveerde Ioannis Stergiopoulos op een proefschrift getiteld: *The role of the ATP-binding cassette (ABC) transporters in pathogenesis and multidrug resistance of the wheat pathogen Mycosphaerella graminicola*. Voor beide promovendi was Prof. dr. P.J.G.M. de Wit de promotor en Dr. M.A. de Waard (Wageningen Universiteit, Laboratorium voor Fytopathologie) de co-promotor.

Inleiding

Organismen worden in de natuur voortdurend blootgesteld aan toxische verbindingen. Men is bij deze bewering al snel geneigd te denken aan bestrijdingsmiddelen, zware metalen en andere contaminanten die door de mens bewust of onbewust in de natuur worden gebracht. Echter, levende organismen kunnen zelf ook nootroie producenten van giftige stoffen zijn. Zulke natuurlijk toxische verbindingen worden door veel prokaryoten en eukaryoten geproduceerd. In veel ecosystemen vindt een soort van chemische oorlogsvoering plaats. Producenten van natuurlijk toxische verbindingen proberen te overleven door in hun ecologische niche zoveel mogelijk concurrerende organismen te weren. Deze pogingen zijn niet altijd succesvol omdat organismen tijdens co-evolutie afweermechanismen hebben ontwikkeld waardoor zij ongevoelig zijn geworden voor toxische verbindingen. Weer (productie van giften) en afweer (resistentieontwikkeling tegen giften) vormen dus een belangrijke component van natuurlijke evenwichten.

Deze stelling geldt ook voor schimmels. Schimmels zijn bekende producenten van natuurlijk toxische stoffen als antibiotica, mycotoxinen, en toxinen die ne-

crose van waardplanten induceren. Schimmels staan echter zelf ook bloot aan natuurlijk toxische verbindingen die door andere organismen worden geproduceerd. Denk daarbij aan antibiotica die door concurrerende micro-organismen worden uitgescheiden en aan fungitoxische verbindingen die door planten vòdr (phytoanticipinen) en na infectie (fytoalexinen) worden gevormd. Door co-evolutie hebben plantenpathogene schimmels zich kennelijk met succes gewapend tegen fungitoxische verbindingen van hun waardplanten. Bekende mechanismen die hierbij een rol kunnen spelen zijn 1) afwezigheid van de aangrijpingsplaats, 2) modificatie van de aangrijpingsplaats, waardoor deze ongevoelig wordt, 3) detoxificatie, en 4) verminderde accumulatie door een verminderde opname. Beide proefschriften hebben betrekking op een recent ontdekt verdedigingsmechanisme dat berust op verminderde accumulatie door een verhoogde secretie. De secretie wordt mogelijk gemaakt door membraanpompen die toxische verbinding bij opname herkennen en per kerende post terug transporteren naar de uitwendige omgeving. Pompactiviteit voorkomt dat verbindingen in het cytoplasma accumuleren tot fungitoxische concentraties. Hoe hoger de activiteit des te lager de gevoeligheid van de schimmel voor

toxische verbindingen. Vandaar de naam van de titel van dit artikel: pompen of verzuipen.

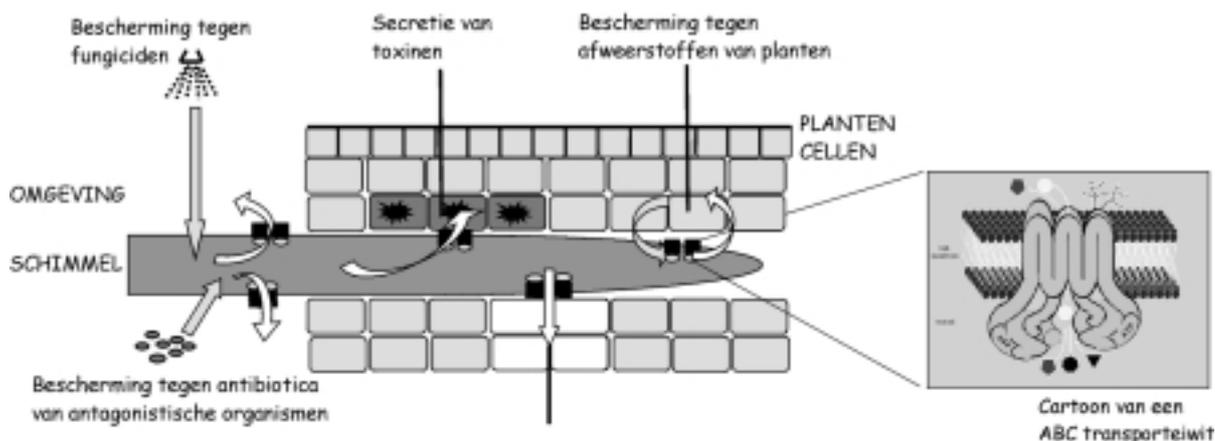
Een interessant aspect van membraanpompen is dat zij vaak een brede substraatspecificiteit bezitten. Als gevolg daarvan spelen membraanpompen niet alleen een rol bij bescherming tegen afweerstoffen van planten maar ook tegen synthetisch fungitoxische verbindingen. Dit impliceert dat membraanpompen een rol kunnen spelen bij de virulentie van plantenpathogenen, de effectiviteit van fungiciden kunnen beïnvloeden en een rol kunnen spelen bij multidrug-resistentie (MDR). MDR betekent een gelijktijdige resistentie-ontwikkeling van organismen tegen chemisch niet-verwante verbindingen en is vooral belangrijke bij resistentie van tumorcellen tegen antitumor medicijnen en van bacteriën tegen antibiotica.

Membranpompen van *M. graminicola*

Veel membraanpompen behoren tot de familie van de ATP-bindingcassette (ABC) transporteiwitten. ABC transporteiwitten bezitten ATP-bindingplaatsen waar, door hydrolyse van ATP, energie wordt gegenereerd om transport van substraten tegen een concentratiegradient over membranen mogelijk te maken. ABC transporteiwitten behoren tot één van de grootste genfamilies en komen in alle levende organismen voor. Doel van beide promotieonderzoeken was om genen die coderen voor ABC pompen van *M. graminicola* te kloneren en functioneel te analyseren. *M. graminicola* (anamorf *Septoria tritici*)

PROMOTIE

Mogelijke functies van ABC transporteiwitten in schimmels



is de veroorzaker van de septoria-bladvlekkenziekte op tarwe. Het pathogeen werd als studie-object gekozen omdat de ziekte in toenemende mate een bedreiging is van de tarweteelt, speciaal in gebieden met hoge luchtvochtigheid en gematigde temperatuur. Om die reden is een beter begrip van moleculaire mechanismen die tijdens de pathogenese een rol spelen en van resistentieontwikkeling tegen fungiciden essentieel. In totaal werden vijf ABC transportgenen gekloneerd (*MgAtr1-MgAtr5*). Het *open reading frame* van alle genen is ongeveer 4500 basenparen lang en codeert voor eiwitten (*MgAtr1-MgAtr5*) die een hoge mate van homologie bezitten met ABC transporters van andere schimmels en gisten. Met uitzondering van *MgAtr3* kan de expressie van alle genen geïnduceerd worden door natuurlijk en synthetisch toxische verbindingen, zoals antibiotica, secundaire metabolieten van planten (o.a. fytoalexinen) en azool fungiciden. Deze waarnemingen suggereren dat de transporteiwitten inderdaad een functie kunnen vervullen bij virulentie en gevoeligheid voor fungiciden.

Multidrug pompen

De functie van *MgAtr1-MgAtr5* werd allereerst onderzocht door

de gevoeligheid van mutanten van *Saccharomyces cerevisiae* (bakkergist), waarin deze genen tot expressie werden gebracht, te testen voor natuurlijk en synthetisch toxische verbindingen. De gisttransformaten vertoonden een duidelijke verminderde gevoeligheid voor chemisch niet-verwante verbindingen (azool fungiciden, antibiotica, en fungitoxische metabolieten van planten), hetgeen er op wijst dat de gecodeerde eiwitten functioneren als multidrug pompen met een verschillende doch overlappende substratspecificiteit. De functies van de transporteiwitten werden ook onderzocht door fenotypische karakterisering van knockout mutanten van *MgAtr1-MgAtr5* in *M. graminicola*. Voor de constructie van deze mutanten werd een transformatieprotocol ontwikkeld dat gebruik maakt van *Agrobacterium tumefaciens*. Een verhoogde gevoeligheid voor fungitoxische metabolieten van planten werd alleen voor knockout transformanten van *MgAtr5* aangetoond. De overige transformanten vertoonden geen fenotype. Waarschijnlijk is dit te wijten aan activiteit van andere ABC pompen die het verlies van het uitgeschakelde gen kunnen compenseren.

Biotoetsen met antagonistische bacteriën tonen aan dat de *MgAtr2* pomp van *M. graminicola* bescherming biedt tegen antibiotica

geproduceerd door *Pseudomonas* en *Burkholderia* spp. Deze waarneming is belangrijk omdat het impliceert dat ABC pompen ook belangrijk kunnen zijn bij de overleving van de schimmel tijdens de saprofytische fase van zijn levenscyclus.

Virulentie op tarwe

De functie van *MgAtr1-MgAtr5* werd verder geanalyseerd door de virulentie van knockout mutanten te bepalen op zaailingen van tarwe. De virulentie van knockout mutanten van *MgAtr4* bleek significant minder te zijn dan die van het wildtype en de overige knockout mutanten. Histopathologisch onderzoek van het infectieproces toonde aan dat *MgAtr4* mutanten substomatale ruimten slecht koloniseren. De groeikracht van de *MgAtr4* mutant op verschillende media *in vitro* was niet verminderd. Deze resultaten wijzen er op dat *MgAtr4* een virulentiefactor is van *M. graminicola* en het pathogeen mogelijkwijs beschermt tegen een nog onbekende fungitoxische afweerstof van tarwe. Dit verschijnsel is ook gerapporteerd voor ABC pompen van andere plantenpathogenen, waaronder *Botrytis cinerea*, *Gibberella pulicaris* en *Magnaporthe grisea*.

Gevoeligheid voor azoofungiciden

Eerder onderzoek met de schimmels *Aspergillus nidulans* en *B. cinerea* toonde aan dat laboratoriumstammen met verminderde gevoeligheid voor azoofungiciden, tevens multidrug-resistentie bezitten tegen uiteenlopende verbindingen. Dit fenotype bleek te correleren met overexpressie van specifieke ABC genen en een verminderde accumulatie van azoofungiciden ten gevolge van verhoogde secretie. Beide promotieonderzoeken toonden aan dat dit mechanisme bij *M. graminicola* minder duidelijk is. Azoofungicide laboratorium stammen vertoonden weliswaar een MDR fenotype maar de verminderde gevoeligheid kon niet duidelijk worden geassocieerd met overexpressie van een specifiek ABC gen. In één van de stammen werd een duidelijke overexpressie van

MgAtr1 gevonden en disruptie van het gen herstelde de wild-type gevoeligheid voor azoofungiciden, hetgeen suggereert dat *MgAtr1* een factor is die mede bepalend is voor azoofungicide gevoeligheid van *M. graminicola*. Ook in veldisolaten met een sterk uiteenlopende gevoeligheid voor azoofungiciden kon geen duidelijke correlatie tussen expressie van geïdentificeerde ABC genen en accumulatie van azoofungiciden worden vastgesteld. De resultaten wijzen er op dat meerdere mechanismen de verschillen in gevoeligheid van veldisolaten van *M. graminicola* beïnvloeden.

Conclusies en vooruitblik

De gegevens van beide proefschriften tonen aan dat ABC pompen van *M. graminicola* belangrijke functies bezitten bij de bescherming van het pathogeen

tegen fungitoxische afweerstoffen van planten. Dit verklaart waarschijnlijk de ontdekking dat de ABC pomp *MgAtr4* een virulentiefactor van de schimmel is op tarwe. Er werden ook aanwijzingen verkregen dat ABC pompen van belang kunnen zijn voor gevoeligheid en multidrugresistentie tegen azoofungiciden. Het huidige onderzoek is erop gericht om membraanpompen te vinden die in dit opzicht een meer uitgesproken rol vervullen. Identificatie van ABC pompen die fungeren als virulentiefactor kan leiden tot de ontwikkeling van een nieuwe generatie middelen die zelf geen fungitoxische activiteit bezitten maar plantenziekten beheersen door een verbeterde exploitatie van afweerreactie van waardplanten. Identificatie van zulke MDR pompen kan leiden tot de ontwikkeling van middelen die de effectiviteit van fungiciden verhogen en MDR resistentiemechanismen teniet doen.

PROMOTIE

De rol van ethyleenperceptie in resistentie tegen plantenziekten

Bart P.J. Geraats

Op 17 maart 2003 promoveerde Bart P.J. Geraats aan de Universiteit Utrecht op het proefschrift getiteld 'The role of ethylene perception in plant disease resistance'. Dit onderzoek maakte deel uit van een door ALW gefinancierd programma met de titel "The role of ethylene perception in acclimation to the biotic environment of plants: adjustment of growth during crowding and defense against opportunistic pathogenic microorganisms'. Promotor was Prof. Dr ir L.C. van Loon en copromotor Dr P.A.H.M. Bakker, beiden werkzaam bij de leerstoelgroep Fytopathologie van de Universiteit Utrecht.

claveren, veroorzaakte dit dezelfde ziektesymptomen, terwijl niet-gemodificeerde planten gezond bleven. Deze resultaten lieten zien dat de ethyleenongevoelige Tetr planten vatbaar zijn voor infectie door *P. sylvaticum*, terwijl niet-gemodificeerde tabak dat schijnbaar niet is.

In eerste instantie werd onderzocht in hoeverre andere in potgrond aanwezige micro-organismen eveneens ziekte kunnen veroorzaken in Tetr planten en of Tetr planten ook gevoeliger zijn voor verschillende bekende ziekteverwekkers van tabak. Bovendien werd nagegaan of Tetr planten beschermd kunnen worden tegen opportunistische ziekteverwekkers in de bodem door behandelingen waarvan bekend is dat ze resistentie in planten induceren, of met bacteriën die met ziekteverwekkers kunnen concurreren of ze remmen in hun activiteit.

Bodempathogenen van ethyleenongevoelige tabak en *Arabidopsis*

Uit spontaan ziek geworden Tetr planten konden verschillende schimmels (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Thielaviopsis basicola*) en oömyceten (*Pythium* soorten) worden geïsoleerd. Al deze isolaten veroorzaakten ziekte in Tetr tabak wanneer ze geïnoculeerd wer-

Ethyleen in planten

Gasvormig ethyleen is als hormoon werkzaam in planten. Het wordt door verschillende planteweefsels geproduceerd en reguleert diverse processen tijdens groei en ontwikkeling, zoals zaadkieming, stengel- en wortelgroei, bloei, en het rijpen van vruchten. Ethyleen is ook betrokken bij de reactie van planten op verschillende vormen van stress, zoals insectenvraat en infectie door ziekteverwekkers. De rol van ethyleen bij de interactie tussen planten en ziekteverwekkers is niet eenduidig. Blootstelling van planten aan ethyleen vóór infectie kan ziekteresistentie induceren, maar behandeling met ethyleen tijdens het infectieproces kan de ziektesymptomen juist verergeren.

Ethyleenongevoelige tabak vatbaar voor opportunistische *Pythium* spp.

Eerder was gevonden dat tijdens de overgevoeligheidsreactie van

tabak op tabaksmozaïekvirus (TMV) sterke ethyleenproductie plaatsvindt rond het moment van verschijnen van necrotische lesies. Om de rol van ethyleen nader te bestuderen, werden planten van de cultivar Samsun NN genetisch gemodificeerd (Tetr) met het dominante, mutante gen *etr1-1* uit *Arabidopsis thaliana* (zandraket), dat codeert voor een defect ethyleenreceptor-eiwit. Dit resulteerde in ongevoeligheid van de transgene Tetr planten voor het hormoon. Wanneer deze Tetr tabakspanten in gewone potgrond opgekweekt werden, ontwikkelden ze spontaan symptomen van verwelking en stengelrot, doordat hun wortels geïnfecteerd werden door opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in de grond. Controleplanten die niet genetisch gemodificeerd waren, ontwikkelden geen ziektesymptomen. Uit de stengels van geïnfecteerde Tetr planten werden verschillende schimmels en oömyceten (schimmelachtige micro-organismen) geïsoleerd. Wanneer één van deze oömyceten, *Pythium sylvaticum*, geïnoculeerd werd op niet-zieke Tetr planten die groeiden in grond die was gesteriliseerd door auto-

PROMOTIE

den op planten van zes weken oud die in geautoclaveerde grond groeiden. Niet-gemodificeerde controleplanten van dezelfde leeftijd ontwikkelden nooit ziektesymptomen wanneer ze op dezelfde manier geïnoculeerd werden. Echter, wanneer niet-gemodificeerde zaailingen van slechts twee weken oud werden geïnoculeerd, bleken zij wel vatbaar voor verschillende isolaten van *Pythium* en *T. basicola*. Niettemin werden Tetr zaailingen zieker dan niet-gemodificeerde zaailingen. Ook in *Arabidopsis* bleken ethyleen-ongevoelige mutanten vatbaarder te zijn voor *Pythium* en *T. basicola* dan normaal ethyleengevoelige controleplanten. Deze resultaten duiden erop dat ongevoeligheid voor ethyleen tot eenzelfde verstoring van resistentie leidt in tabak en in *Arabidopsis*.

Bovendien werd aangetoond dat Tetr tabaksplanten meer groei van *Pythium* toelaten dan niet-gemodificeerde tabak. Wanneer planten met even ernstige symptomen met elkaar werden vergeleken, bevatten de stengels van Tetr planten meer *Pythium* dan die van niet-gemodificeerde planten. Deze conclusie werd gebaseerd op de aanwezigheid van grotere hoeveelheden ribosomaal 5,8S RNA dat specifiek is voor *Pythium* in de Tetr planten. Blijkbaar zijn Tetr planten niet alleen gevoeliger voor ziekte veroorzaakt door *Pythium*, maar laten ze ook verhoogde stengelkolonisatie door deze oömyceet toe.

Moleculaire analyse van de wortel-microflora van tabak

Veel micro-organismen in de bodem kunnen niet geïsoleerd en gekweekt worden. Om toch een indruk te krijgen van de totale microflora op en in de plantewortel werd een moleculaire



Figuur 1. Stengelstukjes van controle (links) en Tetr tabaksplanten. De bladeren zijn volledig vergaan tengevolge van infectie door *Botrytis cinerea*. In de controleplanten stopte de groei van de schimmel bij het bereiken van de stengel, terwijl de Tetr planten volledig werden gekoloniseerd, resulterend in ernstige rot van de stengel.

benadering gebruikt, gebaseerd op een selectieve vermeerdering van een deel van het ribosomaal DNA van bacteriën, schimmels en oömyceten met behulp van de zogenaamde “polymerase chain reaction” (PCR). Het vermeerderde DNA wordt gescheiden met behulp van “denaturing” (DGGE) of “temperature” (TGGE) “gradient gel electrophoresis”, hetgeen resulteert in specifieke bandenpatronen. In principe is ieder bandje afkomstig van één micro-organisme en geeft het hele bandenpatroon een beeld van de aanwezige microbiële populatie. Met behulp van deze techniek werden de dominante micro-organismen in niet-gemodificeerde en Tetr planten, die òf in niet-geautoclaveerde òf in geautoclaveerde grond groeiden, met elkaar vergeleken.

Voordat zich spontaan ziektesymptomen ontwikkelden, bevatten de planten in niet-geautoclaveerde grond heel andere populaties bacteriën en schimmels dan planten in geautoclaveerde grond. Bij planten die in geautoclaveerde grond groeiden werden tot in een laat stadium geen oömyceten gevonden. Dit kan het uitblijven van spontane ziekteontwikkeling van Tetr planten in geautoclaveerde grond verklaren. De wortels van nog niet zieke niet-gemodificeerde en Tetr planten bevatten verschillende

populaties bacteriën en oömyceten. Wortels van niet-gemodificeerde en Tetr planten moeten daarom verschillen in morfologische en / of fysiologische eigenschappen die de ontwikkeling van diverse typen micro-organismen op het wortelstelsel beïnvloeden. Blijkbaar is de regulatie van deze eigenschappen afhankelijk van ethyleen.

Analyse van spontaan ziek geworden Tetr planten in niet-geautoclaveerde grond liet zien dat stengels van jonge planten voornamelijk door oömyceten werden gekoloniseerd, terwijl in stengels van oudere planten vooral echte schimmels aanwezig waren. Deze resultaten bevestigen de eerdere waarnemingen dat Tetr tabak in niet-geautoclaveerde grond gekoloniseerd kan worden door verschillende micro-organismen. Bovendien blijkt het type micro-organisme dat overheerst, afhankelijk te zijn van de leeftijd van de Tetr planten.

Gevoeligheid voor necrotrofe en biotrofe tabakspathogenen

Om na te gaan in hoeverre ook resistentie tegen bekende ziekteverwekkers van tabak verstoord is

PROMOTIE

Ziekteonderdrukking in ethyleen-ongevoelige tabak

door ethyleenongevoeligheid werd een aantal necrotrofe en biotrofe ziekteverwekkers getoetst op wortels en bladeren van niet-gemodificeerde en Tetr planten.

Over het algemeen bleken Tetr planten gevoeliger te zijn voor necrotrofe ziekteverwekkers, die symptomen van afsterving en rot veroorzaken, zoals de bacterie *Erwinia carotovora*, de schimmels *Botrytis cinerea*, *Cercospora nicotianae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, en *Thielaviopsis basicola*, en enkele oömyceten (*Pythium* soorten). In tegenstelling tot de verhoogde gevoeligheid voor necrotrofe ziekteverwekkers, was de gevoeligheid van Tetr planten voor de onderzochte biotrofe ziekteverwekkers (*Oidium neolycopersici*, *Peronospora tabacina* en TMV), die levende gastheercellen nodig hebben om zich te kunnen ontwikkelen, onveranderd of zelfs lager dan van niet-gemodificeerde tabak. In overeenstemming met waarnemingen van anderen bleken ethyleenongevoelige *Arabidopsis* planten eveneens gevoeliger voor necrotrofe dan voor biotrofe ziekteverwekkers. Ethyleenongevoelige tabak en *Arabidopsis* hadden beide een verlaagde activiteit van het enzym peroxidase, dat vaak geassocieerd wordt met ziekteresistentie. Blijkbaar verstoort ethyleenongevoeligheid in tabak en *Arabidopsis* dezelfde soort afweermechanismen en resulteert dit in een verhoogde mate van ziekte door necrotrofe ziekteverwekkers.

Tenslotte werd onderzocht of de verminderde resistentie van Tetr planten gecompenseerd kan worden door behandeling met chemicaliën of bacteriën die resistentie induceren, door overexpressie van specifieke afweergenen, of door toediening van wortelkoloniserende bacteriën die ziekteverwekkers in de bodem kunnen remmen. Het bespuiten van de bladeren van Tetr tabaksplanten met γ -aminoboterzuur (BABA), benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-thiocarbonzuur-S-methylester (BTH), methyljasmonaat (MeJA), of salicylzuur (SA) induceerde de expressie van genen die coderen voor zogenaamde "pathogenesis-related" (PR) eiwitten. Expressie van deze genen markeert de inductie van systemische resistentie in de plant. Behandeling met BTH of SA induceerde inderdaad resistentie tegen TMV in Tetr planten. Echter, geen van de behandelingen reduceerde het optreden van spontane ziektesymptomen bij Tetr tabak in niet-geautoclaveerde grond, of ziekte na inoculatie van Tetr planten in geautoclaveerde grond met *Pythium*. Ook overexpressie van de met resistentie tegen oömyceten in verband gebrachte PR genen *PR-1g*, *PR-5c*, of beide in transgene Tetr planten verhoogde de resistentie tegen *Pythium* niet. Overexpressie van *PR-1g* leek de ziekte-

ontwikkeling enigszins te reduceren, maar het effect was klein en wisselend.

Net als toediening van resistentie inducerende chemicaliën waren ook wortelbehandelingen met bacteriën, waarvan bekend is dat ze resistentie induceren in tabak en andere plantensoorten, niet effectief: wortelkolonisatie door *Pseudomonas fluorescens* isolaat WCS417r, *Pseudomonas putida* isolaat WCS358r, of *Pseudomonas aeruginosa* isolaat 7NSK2, beschermden de Tetr planten niet tegen *Pythium*. Ook wortelbehandeling met *Bacillus cereus* isolaat UW85, *Pseudomonas fluorescens* isolaat Q8r1-96, of transgene WCS358r bacteriën die een antibioticum produceren, beschermden de Tetr planten niet tegen ziekte, hoewel al deze bacterie-isolaten de groei van *Pythium* wel remden op een agarmedium. Deze resultaten laten zien dat het heel moeilijk is om de verhoogde vatbaarheid van ethyleenongevoelige Tetr tabaksplanten terug te dringen. Blijkbaar spelen ethyleeneffecten een belangrijke rol bij ziekteresistentie van planten tegen necrotrofe pathogenen. Het oplossen van de vraag welke verdedigingsmechanismen door ethyleen gereguleerd worden is belangrijk om te kunnen begrijpen waarom ethyleen-ongevoelige planten gevoeliger zijn voor ziekte en hoe resistentie kan worden bevorderd.

PROMOTIE

De rol van heterotrimere G-eiwitten in de ontwikkeling en virulentie van *Phytophthora infestans*

Maita J.M. Latijnhouwers

Op 29 april 2003 promoveerde Maita J.M. Latijnhouwers aan de Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'The role of heterotrimeric G-proteins in development and virulence of *Phytophthora infestans*'. Promotor was Prof.dr.ir. P.J.G.M. de Wit en co-promotor Dr.ir. E. Govers, beiden werkzaam bij de leerstoelgroep Fytopathologie van Wageningen Universiteit. Het onderzoek werd mede gefinancierd door de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO), gebied Aard- en Levenswetenschappen (ALW).

Inleiding

In Europa en de Verenigde Staten verscheen de Aardappelziekte voor het eerst in het midden van de negentiende eeuw. Sindsdien is een mogelijke uitbraak van de ziekte elk jaar weer een grote zorg voor aardappeltelers. Bij koel en nat weer is het risico voor een uitbraak het grootst. Het is dan bijna onmogelijk infecties in de hand te houden. Veredelaars proberen al tientallen jaren resistente cultivars te ontwikkelen maar dat heeft tot nu toe nog niet de resistente aardappel opgeleverd die tevens een goede vorm, grootte en smaak heeft van de aardappel die we gewend zijn te eten zoals bijvoorbeeld het 'Bintje'. Nu is bestrijding van de Aardappelziekte geheel afhankelijk van fungiciden die op grote schaal gebruikt worden. Het overheidsbeleid wenst echter dat gewasbescherming zo min mogelijk afhankelijk is van bestrijdingsmiddelen.

De ziekteverwekker die de Aardappelziekte veroorzaakt heet *Phytophthora infestans* en hoort taxo-

nomisch bij de oömyceten. De oömyceten vormen een klasse van eukaryoten waaronder pathogenen van dieren, insecten en planten vallen, alsmede een groot aantal saprophyten. Oömyceten lijken uiterlijk op schimmels. Ze zijn echter taxonomisch niet verwant aan schimmels en hebben het vermogen om planten te infecteren onafhankelijk van de echte schimmels verworven. Morfologisch vertonen ze veel gelijkenis met schimmels doordat ze ook hyfen en een netwerk aan mycelium kunnen vormen.

Heterotrimere G-eiwitten zijn zeer algemeen voorkomende signaaltransductiecomponenten die een rol spelen bij het vertalen van extracellulaire signalen naar intracellulaire. Cellen hebben G-eiwitten nodig om adequaat te kunnen reageren op veranderingen in omstandigheden buiten de cel. Dieren, planten, schimmels en andere lagere eukaryoten bezitten allemaal heterotrimere G-eiwitten. Sommige plantenpathogene schimmels hebben G-eiwitten waarvan is aangetoond dat ze be-

trokken zijn bij belangrijke processen in de normale ontwikkeling. Voorbeelden van zulke processen zijn de sexuele en asexuele voortplanting, en het vormen van infectiestructuren. Bovendien zijn G-eiwitten vaak onmisbaar voor de virulentie van de schimmel. Om beter te begrijpen welke processen ten grondslag liggen aan de ontwikkeling en virulentie van *P. infestans*, proberen we de functie van geconserveerde signaaltransductieroutes te ontrafelen. De signaaltransductieroute die gebruik maakt van heterotrimere G-eiwitten was de eerste die in dit kader onderzocht werd.

Expressie van $G\alpha$ en $G\beta$ subunitgenen tijdens de levenscyclus

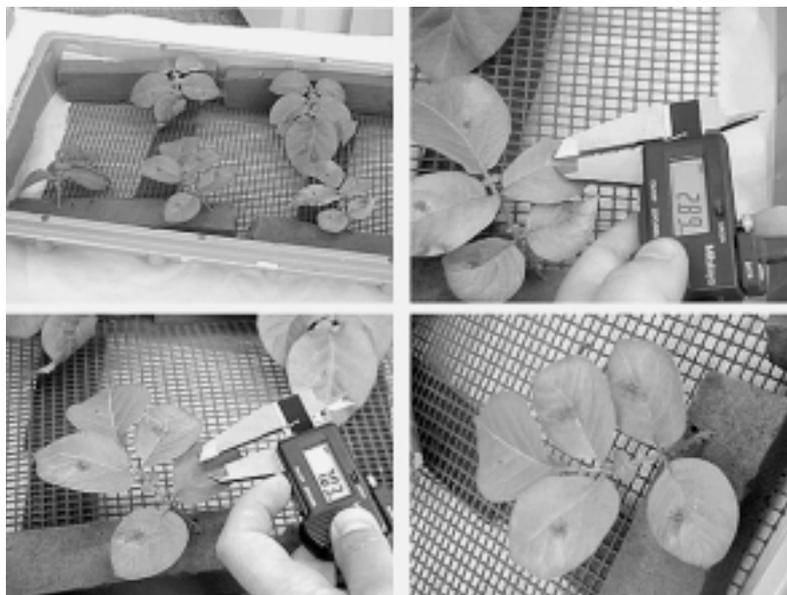
Heterotrimere G-eiwitten bestaan uit drie componenten, $G\alpha$, $G\beta$ en $G\gamma$. De aminozuurvolgorde van zowel $G\alpha$ als $G\beta$ is in hoge mate geconserveerd. Deze eigenschap hebben we gebruikt om de genen van *P. infestans* die coderen voor $G\alpha$ en $G\beta$ te isoleren. Met gedegegenerateerde oligonucleotiden die corresponderen met geconserveerde delen van $G\alpha$ werd door middel van de *polymerase chain reaction* (PCR) een fragment van een $G\alpha$ gen geamplificeerd. Het gen kreeg de naam *Pigpa1*. Een tweede gen

PROMOTIE

dat codeert voor $G\beta$, *Pigpb1*, werd geïsoleerd door gebruik te maken van een sequentie uit een gegevensbank van *expressed sequence tags* (ESTs), korte sequenties van complementair-DNA (cDNA) die gegenereerd zijn van messenger RNA (mRNA) uit mycelium. Deze sequentie was duidelijk zeer homolog aan genen uit andere organismen die coderen voor $G\alpha$'s. Het expressieniveau van *Pigpa1* en *Pigpb1* bleek afhankelijk te zijn van het ontwikkelingsstadium van *Pinfestans*. Beide genen komen hoog tot expressie in sporangia, de asexuele sporen van *Pinfestans*. In zoösporen en cysten zijn de expressieniveaus lager en *Pigpb1* komt slechts zeer laag tot expressie in mycelium. Van *Pigpa1* was geen mRNA detecteerbaar in mycelium.

De $G\alpha$ subunit bepaalt het zwemgedrag van zoösporen en is essentieel voor virulentie

Door extra kopieën van *Pigpa1* te introduceren in het genoom van *Pinfestans* bleek in enkele transformanten een mechanisme in werking te worden gesteld dat in het Engels 'gene silencing' heet. Door de *gene silencing* werd in deze transformanten het PiGPA1-eiwit niet meer gemaakt. In de transformanten waarin *Pigpa1* gesilenced was, vond de vorming van zoösporen in de sporangia minder efficiënt plaats dan in het wildtype. De zoösporen van het wildtype zwemmen normaal rechtuit en ze vormen aggregaten aan het vloeistofoppervlak. De zoösporen van de mutanten waarin *Pigpa1* gesilenced was veranderden veel frequenter van richting en ze zwommen niet naar het vloeistofoppervlak toe. Bovendien vormden ze geen aggregaten en vertoonden ze ook geen chemotaxis



Figuur 1 Infectie-essays op afgesneden aardappelbladeren om het virulentie fenotype van G -subunit mutanten van *P. infestans* te bepalen. Op 3, 4, 5 en 6 dagen na druppelinoculatie met zoösporen van mutante en wildtype *P. infestans* stammen werd de infectie-efficiëntie bepaald en de lesiegrootte gemeten.

in de richting van een gradient van aminozuren, hetgeen wel werd waargenomen bij zoösporen van het wildtype. Dit laat zien dat PiGPA1 betrokken is bij de regulatie van de bewegingen van de flagellen, bij de perceptie van externe signaalstoffen of bij beide. De mutanten vormden bovendien minder appressoria en de virulentie van de mutanten waarin *Pigpa1* gesilenced was, was ernstig aangetast (Figuur 1). Deze resultaten laten zien dat PiGPA1 belangrijk is voor de virulentie van *P. infestans*.

De $G\beta$ subunit is belangrijk voor sporulatie

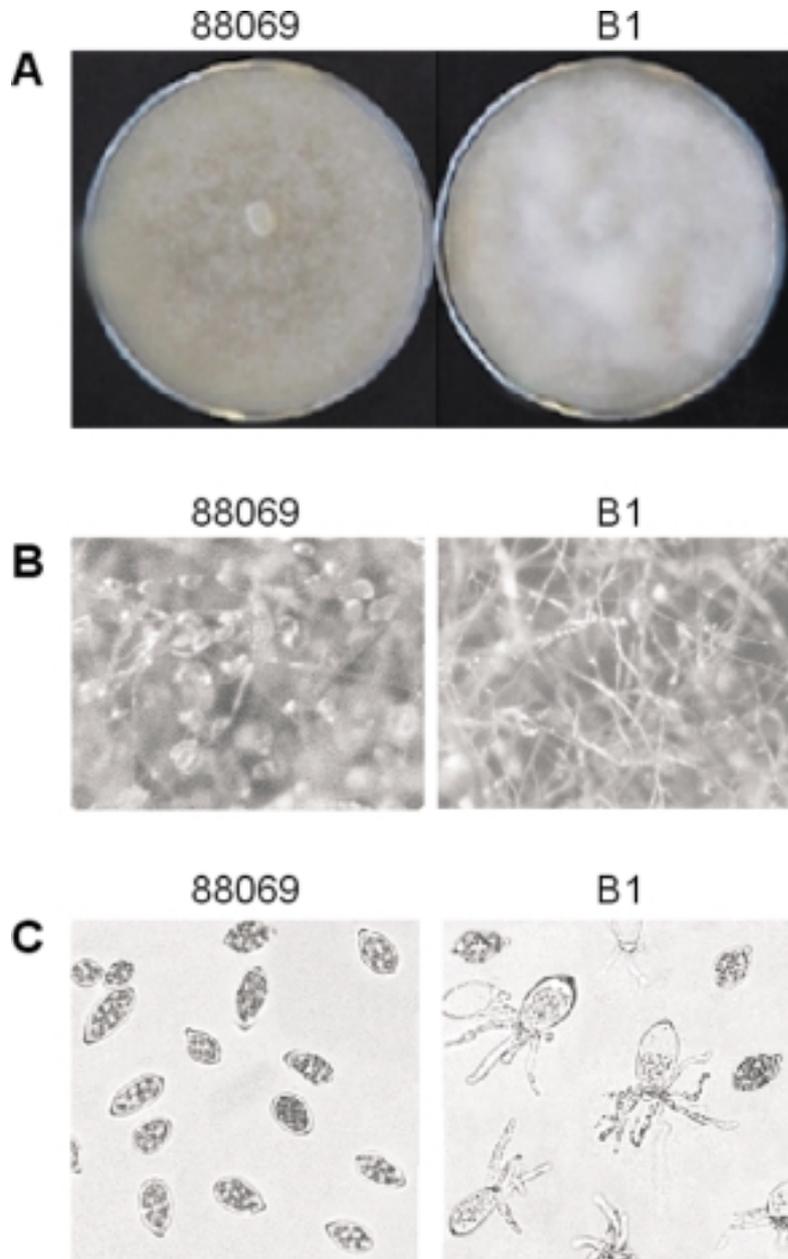
Er werden ook transformanten gegenereerd waarin het *Pigpb1* gen niet langer tot expressie kwam, oftewel, waarin *Pigpb1* gesilenced was. Daarvoor werden twee verschillende methoden gebruikt. Bij de ene werden protoplasten geproduceerd en deze werden vervolgens getransformeerd. In de andere methode werden zoösporen

getransformeerd met behulp van electroporatie. De eerste methode gaf een veel hogere silencingfrequentie dan de tweede methode. De mutanten waarin *Pigpb1* gesilenced was, waren duidelijk te onderscheiden van het wildtype wanneer ze op rogge-suiker agar groeiden (Figuur 2). Ze vormden zeer weinig sporangia (minder dan 1% van het wildtype-niveau in transformanten waarin *Pigpb1* volledig gesilenced was) en ze produceerden meer en langere hyfen. Verder bleek dat de expressie van *Pigpb1* in mycelium toenam als onvoldoende voedingsstoffen aanwezig waren. Daarmee lijkt het PiGPB1-eiwit een belangrijke schakel te zijn tussen voedselgebrek/schaarste en sporulatie.

De $G\alpha$ subunit regelt expressie van andere genen

Wanneer G -eiwitten worden geactiveerd, wordt een signaaltransductiecascade aangeschakeld. Het signaal bereikt de celkern en dit

leidt uiteindelijk tot veranderingen in de expressie van bepaalde genen. Naar verwachting kan PiGPA1 na activatie genen ook weer uitschakelen. Met andere woorden, de activatie is vaak tijdelijk. Om genen die gereguleerd worden door de G α subunit op te sporen werd de genexpressie in sporangia van de mutanten waarin *Pigpa1* gesilenced was, en ook in het wildtype, in kaart gebracht. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een analysemethode die in het Engels 'cDNA amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP)' genoemd wordt. Met deze techniek worden op grote schaal cDNA fragmenten geamplificeerd. Als interne controle werd ook genexpressie in mycelium van het wildtype in kaart gebracht. In totaal werden 77 geamplificeerde cDNA fragmenten opgespoord die aanwezig zijn in het wildtype maar afwezig waren in de mutanten waarin *Pigpa1* gesilenced was. Anderzijds waren 11 van deze fragmenten wel aanwezig in de mutanten maar afwezig in het wildtype. Het zou kunnen dat deze fragmenten genen vertegenwoordigen die gereguleerd worden door PiGPA1. Een aantal van de fragmenten (27) werd daarom geklooneerd en hun sequentie werd bepaald. Het bleek dat een aantal van de sequenties ook aanwezig was in een of meer van de *Phytophthora* EST databanken en een enkeling tevens in de DNA sequentiedatabank van het National Center for Biotechnology Information (NCBI). De expressiepatronen van de genen die coderen voor deze fragmenten werden geverifieerd met behulp van reverse transcriptase (RT)-PCR en northern blot analysis. De fragmenten zullen in de toekomst worden gebruikt om genen te vinden die processen sturen die niet meer normaal functioneren in de mutanten waarin *Pigpa1* gesilenced is, zoals bijvoorbeeld het zwemgedrag van de zoösporen, het vormen van apressoria en virulentie.



Figuur 2 Het fenotype van mutanten die geen G β subunit maken. (A) Tijdens groei op rogge-suiker agar ziet het mycelium van mutant B1 er veel luchtiger uit, met meer en langere hyfen dan de wildtype stam 88069. (B) Bij 50x vergroting zijn in de wildtype stam 88069 duidelijk sporangia zichtbaar. Mutant B1 vormt nauwelijks sporangia. (C) De sporangia die nog wel door mutant B1 worden geproduceerd zijn veelal misvormd. Bij 200x vergroting is te zien dat er meerdere hyfedraden uit een sporangium te voorschijn komen en dat sommige sporangia leeg zijn. Dit wijkt sterk af van het fenotype van sporangia van wildtype stam 88069 (uit Latijnhouwers & Govers, 2003, *Euk. Cell* 2: in druk).

Fosfolipase D

G-eiwitten kunnen ook andere signaaltransductiecomponenten reguleren waaronder fosfolipases.

Daarom werd de activiteit van het enzym fosfolipase D (PLD) in *P. infestans* nader onderzocht. PLD katalyseert de hydrolyse van fosfolipiden, zoals fosfatidylcholine of fosfatidylserine. Dit zijn fosfolipiden die veel voorkomen in cel-

PROMOTIE

membranen. Fosfatidylzuur (PA) en de kopgroep van het betreffende fosfolipide zijn de producten van de activiteit van PLD. In dierlijke systemen en mogelijk ook in planten zijn PLD en PA betrokken bij het transport van vesikels in de cel. Daarnaast wordt PA in planten vaak omgezet tot diacylglycerolpyrofosfaat (DGPP). Waarschijnlijk is dat nodig om het PA signaal op tijd uit te doven. Door sporangia, zoösporen, cysten en mycelium van *P. infestans* met een peptide te behandelen dat G-eiwitten activeert, mastoparan geheten, namen de niveaus van PA and DGPP toe. Zulke toenames in PA en DGPP kunnen veroorzaakt worden door PLD activiteit, maar ook door fosfolipase C (PLC)-activiteit. Nader onderzoek toonde aan dat mastoparan in sporangia van *P. infestans* PLD activeert en niet PLC. Ook tijdens de vorming van cysten uit zoösporen werd activatie van PLD waargenomen. Bovendien bleken alle stoffen die PLD activeren ook de vorming van cysten te activeren. Hieruit concluderen we dat PLD waarschijnlijk betrokken is bij de cystevorming.

Infectiestrategieën van oömyceten en schimmels

De morfologie van schimmels en oömyceten vertoont, zoals gezegd, veel overeenkomsten: het vegeta-

tief mycelium bestaat uit hyfen die topgroei vertonen en waarop sporulatie plaatsvindt. De twee groepen zijn echter niet aan elkaar verwant: tijdens de evolutie hebben oömyceten zich als een geheel onafhankelijk groep van organismen ontwikkeld en sinds enkele jaren worden oömyceten niet meer ingedeeld in het schimmelijk maar bij de protoctisten. Toch hebben beide groepen het vermogen ontwikkeld om planten te infecteren maar, gezien hun taxonomisch positie, moeten hun infectiestrategieën zich ook onafhankelijk ontwikkeld hebben. Na een vergelijkend literatuuronderzoek concluderen we dat de infectiestrategieën van beide pathogenen meer overeenkomen dan aanvankelijk werd aangenomen. Er zijn duidelijke overeenkomsten tussen infectiestructuren, virulentiefactoren en signaaltransductieroutes van oömyceten en schimmels. Er zijn uiteraard ook verschillen. Zo zijn in schimmels bepaalde groepen van virulentiefactoren gerapporteerd die dusver nog niet zijn aangetroffen in oömyceten. We concluderen dan ook dat convergerende evolutie van groot belang is geweest bij de ontwikkeling van het vermogen om planten te infecteren in oömyceten en schimmels.

Tot slot

Dit onderzoek heeft voor het eerst aangetoond dat signaaltransductie

via G-eiwitten een belangrijke rol speelt in de sporulatie en virulentie van *P. infestans*. Daarmee lijkt dit onderzoek een ingang te bieden voor de ontwikkeling van nieuwe bestrijdingsmiddelen die specifiek aangrijpen op componenten in deze signaaltransductieroutes in oömyceten. Het onderzoek bij de leerstoelgroep Fytopathologie richt zich nu op het identificeren van stoffen die de G-eiwitten in *P. infestans* aanschakelen ('upstream') en het analyseren van genen die door de G-eiwitten gereguleerd worden ('downstream'). De uitdaging voor de toekomst is om op basis van deze kennis nieuwe bestrijdingsmethoden voor de Aardappelziekte te ontwikkelen.

Literatuur

- Latijnhouwers, M., Munnik, T. & Govers, F. 2002. Phospholipase D in *Phytophthora infestans* and its role in zoospores encystment. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 939-946.
- Latijnhouwers, M. & Govers, F. 2003. A *Phytophthora infestans* G-protein β subunit is involved in sporangia formation. *Eukaryotic Cell* **2**: in press.
- Latijnhouwers, M., de Wit, P.J.G.M & Govers, F. 2003. Oomycetes and fungi evolved similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology* **11**: in press.
- Latijnhouwers, M., Ligterink, W., Vleeshouwers, V.G.A.A., van West, P. & Govers F. 2003. A $G\alpha$ subunit controls zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. Submitted for publication.
- Laxalt, A.M., Latijnhouwers, M., van Hulst, M. & Govers, F. 2002 Differential expression of G protein α and β subunit genes during development of *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet. Biol.*, **36**: 137-146.

Najaarsvergadering van de KNPV & 10-jarig jubileum van Artemis

*donderdag 27 november 2003
WICC, Lawickse Allee 11, Wageningen*

*De toekomst van biologische bestrijding
– conceptprogramma –*

Haakzaal

- 09.30 Ontvangst met koffie
09.55 Opening door voorzitter Artemis, Aad Vijverberg

Wetenschappelijke sessie

- 10.00 **Rudi Rabbinge** (Graduate Schools, WUR Wageningen)
Geïntegreerde gewasbescherming
- 10.25 **Marcel Dicke** (Entomologie, WUR Wageningen)
De geur van gewasbescherming: mogelijkheden voor integratie van veredeling en biologische bestrijding
- 10.50 **Jürgen Köhl** (PRI, WUR Wageningen)
Biologische bestrijding van bovengrondse ziekten: succes bepaald door ecologie en economie
- 11.15 Pauze
- 11.40 **Paul van den Boogert** (PRI, WUR Wageningen)
Toepassingsmogelijkheden van microbials: waar staan we over 10 jaar?
- 12.05 **Duopresentatie Directie Natuurbeheer** (LNV) / **Antoon Loomans** (PD, Wageningen)
Voorlopige titel: De bedreiging van de biologische bestrijding voor de fauna. De Europese benadering van dit dilemma gezien vanuit het beleid en de techniek.
- 12.30 Lunch

Haakzaal

- 13.30 **Guido Sterk** (Biobest, Westerlo)
Effecten van bestrijdingsmiddelen op non-target insecten
- 13.50 **Bart Sosef** (Sosef b.v., Honselersdijk)
De dilemma's van een toeleveringsbedrijf
- 14.10 **Eric Kiers** (Certis Europe, Maarssen)
De ontwikkeling en markt van GNO's
- 14.30 Pauze

Kleine Veerzaal

- Bas Nijhof** (Nijhof BGB)
Biologische bestrijding van plagen in openbare ruimten.
- Margareth van der Horst** (Houtman B.V., Boskoop)
Biologische aspecten van de geïntegreerde bestrijding in de boomteelt
- Anton Bom**, (Van Iperen, Westmaas)
Ontwikkeling van de geïntegreerde teelt in akkerbouw/groenten vollegrond: ploegen op rotsen

VERENIGINGSNIJEUWS

15.00	Bram de Hoop (PD, Wageningen) Beerse, Voorlopige titel: Problemen rond de export van producten in relatie met biologische bestrijders met speciale aandacht voor de export naar Japan	Dany Byleman (Janssen Pharmaceutica, België) Biologische bestrijding van plagen in de fruitteelt
15.20	Karel Bolckmans (Koppert Biological Systems) Uitdagingen voor de biologische bestrijding de komende vijf jaar, gezien vanuit de industrie.	Jan Hoogstrate (Agrifirm/TCN, Bleiswijk) Geïntegreerde gewasbescherming in de sierteelten onder glas met vallen en opstaan
15.40	Richard GreatRex (Syngenta Bioline, Essex, UK) Het Europees toelatingsbeleid van biologische bestrijders	Jos Looije (Looije Tomaten b.v., Maasdijk) Biologische bestrijding in de beschermde groenteteelt in Noord- en Zuid Europa
16.00	Borrel	

De teksten van het symposium zullen worden gepubliceerd in een speciale uitgave van Gewasbescherming, het orgaan van de KNPV. De teksten dienen klaar ingeleverd te worden uiterlijk 15 november 2003.

Aankondiging parallelsessie tijdens KNPV-najaarsvergadering: ParapluPlan *Phytophthora infestans*

Door de sterk toegenomen genetische variatie en het voorkomen van een seksuele cyclus, is het aanpassingsvermogen van *Phytophthora infestans* verder vergroot. Hierdoor is een grootschalige inzet van middelen nog steeds noodzakelijk. Voor een duurzame beheersing van *Phytophthora* is dus aanvullend onderzoek nodig. Naast lopend onderzoek heeft het ministerie van LNV extra financiële middelen beschikbaar gesteld om daar aan bij te dragen. De uitvoering van het onderzoek is in handen gegeven van de Kenniseenheid Plant van Wageningen-UR. Om te zorgen dat de onderzoeksresultaten aansluiten op de praktijk is het bedrijfsleven intensief betrokken bij de opzet van het onderzoek. Het Masterplan *Phytophthora* van LTO-Nederland is ook onderdeel van het **ParapluPlan**; zij zorgt voor de verspreiding van de kennis naar de praktijk en de implementatie.

De KNPV-werkgroep *P. infestans* wil tijdens deze najaarsvergadering de plannen voor nieuw op te zetten onderzoek presenteren en bediscussiëren. Op deze bijeenkomst, die als parallelsessie naast het hoofdprogramma wordt georganiseerd, zijn naast de leden van de werkgroep *P. infestans* ook andere belangstellenden van harte welkom.

Het onderzoek is verdeeld in zes thema's:

- Genomics *P. infestans*
- Genomics interactie aardappel en *P. infestans*
- Nieuwe bronnen van resistentie
- Epidemiologie *P. infestans*
- Populatiegenetica *P. infestans*
- *Phytophthora* toolbox

Huib Schepers,
Secretaris werkgroep *P. infestans*

Nieuws

~Deze nieuwsrubriek brengt items over gewasbescherming die de redactie interessant vindt. Belangrijke criteria voor plaatsing van het nieuwsitem zijn:

- het bericht moet relevant zijn voor de gewasbescherming,
- het mag geen reclameboodschap bevatten,
- het moet afkomstig zijn van een van de erkende agrarische nieuws-brennende tijdschriften, kranten, nieuwsbrieven, internetsites of autoriteiten
- het moet naspeurbaar zijn naar de oorspronkelijke bron, die waar mogelijk wordt weergegeven.

Opinies van individuen of belangenorganisaties en visies en andere interpretaties van actuele onderwerpen kunnen als citaat worden opgenomen mits de bron bekend is.

Disclaimer:

De redactie van Gewasbescherming besteedt bij het verzamelen van de informatie voor de rubriek Nieuws aandacht en zorg aan de juistheid van deze informatie, maar kan deze niet garanderen. De items in de rubriek Nieuws geven de zienswijze van de betreffende bron weer en uitdrukkelijk niet die van de redactie of van de KNPV. De redactie is niet verantwoordelijk en/of aansprakelijk voor eventuele fouten en onvolkomenheden in de verstrekte informatie.

Onderzoekers ontdekken resistentie tegen *Phytophthora infestans*

Op 14 juli werd in de online-editie van de *Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS) bekend gemaakt dat wetenschappers van de University of Wisconsin (UW)-Madison (Prof. John Helgeson) uit een wilde Mexicaanse aardappel een gen geïsoleerd en gekloond hebben dat aardappels beschermt tegen *Phytophthora*. Aardappels, genetisch gemanipuleerd met dit gen, bleken resistent te zijn tegen veel varianten van *Phytophthora infestans*. Door de afwijzende houding van Europa ten opzichte van genetische modificatie is het echter de vraag of de techniek ook wereldwijd toegepast gaat worden.

De resistentie werd ontdekt, toen in 1994 een nieuwe variant van

Phytophthora in de Verenigde Staten veel schade aanrichtte. Op het onderzoeksinstituut in Madison (UW-Madison's Hancock Agricultural Research Station) bleven alleen enkele wilde Mexicaanse aardappelplanten (*Solanum tuberosum*) en selecties daarvan onaangestast. Het onderzoek richtte zich vanaf die tijd op het vinden van het gen dat hiervoor verantwoordelijk is. Inmiddels is het gen geïdentificeerd, gekloond en onder laboratoriumomstandigheden succesvol overgebracht naar andere aardappelrassen. Grootschalige inzet van de techniek zou tot grote besparingen in het gebruik van bestrijdingsmiddelen kunnen leiden.

Het is volgens de onderzoekers echter vrijwel onmogelijk om de eigenschap via traditionele verdelingsmethodes over te brengen naar de huidige commerciële aardappelrassen. Wel kunnen er nieuwe rassen mee ontwikkeld worden. De onderzoekers willen op kleine schaal gemodificeerde aardappelrassen gaan ontwikkelen

voor gebruik in tuinen bij particulieren. Ze hopen dat de GM-techniek zich op den duur zo ontwikkelt dat deze geleidelijk door de consument geaccepteerd gaat worden.

Bron: *Seedquest*, 15 juli 2003
(www.seedquest.com/News/releases/2003/july/6192.htm)

Tabakswittevlieg in paprika goed te bestrijden met sluipwesp

Steeds meer bedrijven, met name in het westen van het land, hebben te maken met de wittevlieg. In veel gevallen gaat het alleen om de tabakswittevlieg (*Bemisia tabaci*), minder vaak betreft het alleen kaswittevlieg (*Trialeurodes vaporariorum*) of een mengpopulatie van beide soorten.

De basis voor de biologische aanpak van wittevlieg is een juiste wijze van scouten met vangplaten én gewaswaarnemingen en aan de hand daarvan tijdig inzetten van de juiste hoeveelheid bestrijders.

De sluipwesp *Eretmocerus mundus* bestrijdt de tabakswittevlieg goed. Dat blijkt uit ervaringen in onder meer Spanje en Frankrijk én in Nederland. Op een Nederlands proefbedrijf met paprika waar intensief wordt waargenomen liep de parasitering al op tot 90 procent. Ook in veel praktijksituaties komt dit al voor.

Als ondanks de inzet van de sluipwespen toch nog haarden ontstaan kunnen telers nog additionele biologische corrigerende maatregelen treffen. Met een hoge dichtheid van gele vangplaten tussen de koppen kunnen veel vol-

NIEUWS

wassen wittevliegen worden weggevangen. Daarnaast kan het aantal larven fors worden teruggebracht met biologische middelen.

Bron: Groenten & Fruit, 26 juni 2003

Veilig werken met bio-bestrijders

Het gebruik van biologische gewasbeschermingsmiddelen maakt de laatste jaren een forse groei door. Het gaat hierbij om middelen van natuurlijke oorsprong en om de biologische bestrijders die dienen als natuurlijke vijand van diverse insecten. Vooral in de tomaten, komkommer en paprika-teelt neemt de toepassing van deze middelen toe. Maar ook de bloemeteelt onder glas worden ze steeds meer gebruikt

Over het algemeen leeft in de praktijk het idee dat gewasbeschermingsmiddelen van natuurlijke oorsprong minder gezondheidsrisico's hebben dan chemische middelen. Er zijn aanwijzingen dat er een verhoogd risico op allergie is bij gebruik van deze zgn. bio-middelen. Ook de SER geeft in zijn Ontwerpadvies van 8 april 2002 aan dat het gebruik van biologische bestrijdingsmiddelen gezien moet worden als een nieuw beroepsrisico. Het rapport "Veilig werken met bio-bestrijders" is op te vragen bij de afdeling Documentatie van het Productschap; tel. 079 347 06 33

Bron: Productschap Tuinbouw, 25 juni 2003

527 hectare tulpen afgekeurd vanwege mozaïekvirus

De Bloembollenkeuringsdienst (BKD) heeft tot op heden 527 hec-

tare tulpen afgekeurd vanwege een te hoog percentage tulpenmozaïekvirus (TBV). Dat is bijna vijf procent van het totale tulpenareaal van 10.800 hectare. In 2002 werd 301 hectare afgekeurd op TBV en in 2001 372 hectare.

Camiel Maenhout, directeur van de BKD spreekt van een forse uitbreiding. Deze wordt volgens hem vooral veroorzaakt door de gunstige omstandigheden voor het virus. De schaalvergroting in de sector en het daarmee gepaard gaande tekort aan personeel spelen ook mee. De tijd die tulpenkwekers aan ziekzoeken kunnen besteden neemt daardoor af.

De Productgroep Tulp heeft ingestemd met het voorstel van de BKD voor een verplichte ELISA-toetsing. Wordt in het monster meer dan 3% TBV aangetoond, dan krijgt de teler geen toestemming om de partij te planten. Partijen waarbij ten aanzien van afbroei de herkomst en kwaliteit wel kan worden aangetoond door de teler vallen niet onder dit regime.

Bron: Agrarisch Dagblad/Bloembollenkeuringsdienst, 26 juni 2003

Limburgse aardbeienteelt kampt met schimmelziekte

In Zuid-Limburg kampt de aardbeienteelt op grote schaal met de schimmelziekte *Colletotrichum acutatum*. Volgens telersvoorman Wim Notermans uit Noorbeek is naar schatting veertig procent van de buitenteelt van het ras Elsanta niet meer te redden.

De schimmelziekte komt al jaren in de Nederlandse aardbeienteelt voor, maar duikt steeds vaker op. Dit seizoen hebben warm weer en regen tijdens de bloei van de plant gezorgd voor een forse uitbraak.

Maar ook besmet plantmateriaal heeft een aandeel in de toename van het probleem, denkt Johan Wander van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving (PPO). Met name in de doorteelt op de Limburgse lössgronden, waarbij de planten overwinteren, steekt de ziekte de kop op. Het laten overwinteren hoort bij de Limburgse teeltmethode. In de rest van Nederland wordt voornamelijk gebruik gemaakt van eenjarige planten.

Bron: Agrarisch Dagblad, 25 juni 2003

Agrobacterium tumefaciens in grond kan getoetst worden

Door een nieuwe PCR-toetsmethode is het mogelijk geworden om *Agrobacterium tumefaciens* in grond aan te tonen. Bemonsteringsstrategieën en teeltadviezen moeten hiervoor nog wel ontwikkeld worden. De mogelijkheid om *A. tumefaciens* aan te tonen is belangrijk omdat *A. tumefaciens* kwaliteitschade toebrengt en in sommige landen geldt als een quarantaineorganisme. In de BIO-PCR-methode wordt een extract van de tumor op een selectieve voedingsbodem gebracht en na incubatie worden de bacteriën van de plaat gespoeld en geanalyseerd, waarbij primers worden gebruikt die gericht zijn op het aantonen van de aanwezigheid van het tumorinducerende (Ti) plasmide van *A. tumefaciens*. De nieuwe methode blijkt ook goed te werken op tumoren waarin geen bacteriën meer aanwezig zijn. In extracten daarvan kan het Ti-plasmide ook met de nested PCR worden aangetoond. Kwekers van onder andere (rozen)onderstammen hebben nu de mogelijkheid om hun percelen te laten toetsen op het voorkomen van *A. tumefaciens* in grond. Voorlopig is nog onbekend hoe de uitslag van de toets kan worden ver-

taald naar een teeltadvies voor de praktijk

Bron: Naktuinbouw, juni 2003

CTB laat drie nieuwe gewasbeschermingsmiddelen toe

Het College voor de Toelating van Bestrijdingsmiddelen (CTB) heeft in zijn vergadering van 11 juni 2003 drie nieuwe gewasbeschermingsmiddelen toegelaten, waarvan twee 'gewasbeschermingsmiddelen van natuurlijke oorsprong' (GNO).

'CONTANS WG' (GNO), een schimmelbestrijdingsmiddel tegen *Sclerotinia* op basis van de 'werkzame stof' *Coniothyrium minitans*. Het middel wordt toegelaten in de teelt van winterkoolzaad en witlofpennen en in de groente- en sierteelt (vollegrond en onder glas).

'COMPITONE PLUS', een onkruidbestrijdingsmiddel op basis van de werkzame stof mecoprop-P. Het middel wordt toegelaten in de teelt van winter- en zomergranen (behalve triticale en rogge) en in de toepassingsgebieden grasland en grasvelden, gazons en sportvelden.

'ASEPTA NeemAzal-T/S' (GNO), een insecten- en mijtenbestrijdingsmiddel op basis van de werkzame stof azadirachtine. Azadirachtine wordt gewonnen uit de fameuze 'neem-tree' die veel voorkomt in aride gebieden in India en Afrika. Het middel wordt toegelaten in de teelt van bloemisterijgewassen, boomkwekerijgewassen en vaste planten, in de fruitteelt en in aardappelen.

Bron: College voor de Toelating van Bestrijdingsmiddelen, 12 juni 2003

Veel *Mycosphaerella*-aantastingen in komkommerteelt

De schimmel *Mycosphaerella* komt in verschillende delen van Nederland veel voor in komkommers. Dat heeft te maken met voor de schimmel gunstige weersomstandigheden en resistentie tegen bestrijdingsmiddelen.

De weersomstandigheden in april waren ideaal voor *Mycosphaerella*. In de ochtenden liep de temperatuur snel op. Er ontstond dan vaak condens op de komkommers door de koude nachten. Ook weinig stoken en snel luchten droegen bij aan de besmetting met de schimmel.

Voor de zomerteelt die begin mei werd geplant waren de weersomstandigheden ook niet gunstig. Wanneer er bij het donkere en regenachtige weer niet genoeg werd gestookt ontstonden grove bloemen die vertraagd afbleiden. De extra wortelvorming en worteldruk die daardoor werden veroorzaakt leidden opnieuw tot besmettingen met *Mycosphaerella*.

Bron: Groenten & Fruit, 12 juni 2003

Tientallen *Phytophthora*-haarden in Groningen en Drenthe

In de provincies Drenthe en Groningen zijn er al tientallen haarden van de besmettelijke aardappelziekte *Phytophthora infestans* geconstateerd. Het gaat daarbij vooral om percelen in de veenkoloniën. Naar verwachting zal het aantal besmettingen door het warme en vochtige weer snel toenemen. Waarschijnlijk hebben veel

akkerbouwers in Drenthe en Groningen niet op tijd bestrijdingsmiddelen toegepast.

Bron: Friesch Dagblad, 5 juni 2003

Uienteelt in West-Brabant kampt met valse meeldauw

In West-Brabant kampt de uienteelt met aantastingen van de schimmelziekte valse meeldauw (*Peronospora destructor*). Volgens de sector is er sprake van een ernstige situatie. De precieze oorzaak van de vroege uitbraak van valse meeldauw is nog niet bekend, maar ligt waarschijnlijk in besmet plantgoed.

Bron: <http://www.uienteelt.nl/>

Snelle diagnose van *Guignardia citricarpa* op citrusvruchten dankzij moleculaire test

Op verzoek van de Plantenziektenkundige Dienst heeft Plant Research International te Wageningen een moleculaire toets ontwikkeld voor snelle diagnose van black spot bij citrus. Deze ziekte wordt veroorzaakt door de quarantaineschimmel *Guignardia citricarpa*.

In de afgelopen jaren is de ziekte regelmatig aangetroffen in zendingen citrusvruchten uit landen op het zuidelijk halfrond. Zendingen waarbij verdachte symptomen worden aangetroffen worden vastgelegd voor diagnostisch onderzoek. In een aantal gevallen kan de diagnose onmiddellijk worden gesteld omdat er complete vruchtlichamen van de schimmel in de aangetaste plekken op de schil zitten.

NI EUWS
IN

In andere gevallen moest op last van de EU tot dusverre een vijfdaagse incubatietoets worden uitgevoerd. De moleculaire toets biedt een uitstekend alternatief voor de incubatietoets. De nieuwe toets vergt na ontvangst van de monsters in het laboratorium normaliter één werkdag. De overlast voor de handel is daarmee tot een minimum teruggebracht. De kosten van de snelle toets bedragen € 245,- per monster.

De Plantenziektenkundige Dienst en het ministerie van LNV hebben in de afgelopen jaren enerzijds onderzoek gefinancierd en uitgevoerd en anderzijds de besluitvorming in Brussel gestimuleerd om ten behoeve van de sector - een snellere afhandeling van verdenkingen van black spot mogelijk te maken. Binnen de EU is deze moleculaire toets voor snelle diagnose van black spot bij citrus inmiddels goedgekeurd. Verliezen als gevolg van langdurig vastleggen van zendingen kunnen dankzij de nieuwe toets worden geminimaliseerd

Bron: PD Nieuwsbrief 2003-2

Rhizoctonia in suikerbieten

Vanuit de zand- en dalgronden hebben we meldingen ontvangen over aantastingen door *Rhizoctonia*. De bodemschimmel veroorzaakt wortelbrand op jonge bietenplantjes en wortelrot op volwassen suikerbieten. Naast een sterke verlaging van het wortelgewicht zal het suikergehalte en verwerkingskwaliteit sterk dalen. Zorg er daarom voor dat er geen *Rhizoctonia* rotte bieten in de bietenhoop komen. Vermijd verspreiding van de ziekte. Het IRS adviseert om op percelen waar de besmetting zichtbaar wordt, aanaarden en mechanische onkruidbestrijding achterwege te laten.

Een andere maatregel tegen *Rhizoctonia* is een ruime vruchtwisseling, zonder de teelt van waardgewassen als schorseneren, waspeen, gras en maïs. Zorg ook voor een goede pH, bodemstructuur en bemesting van de bodem.

Bron: Instituut voor Rationele Suikerproductie, 9 juli 2003

Nefyto sluit zich aan bij Convenant Duurzame Gewasbescherming

De brancheorganisatie van fabrikanten en importeurs van gewasbeschermingsmiddelen, Nefyto, heeft een handtekening gezet onder het Convenant Duurzame Gewasbescherming om duurzame gewasbescherming in Nederland te stimuleren.

Nefyto zal zich richten op de verdere invulling van *Product Stewardship*, het ontwikkelen van praktijkoplossingen voor drinkwaterknelpunten (met VEWIN, Unie van Waterschappen en LTO Nederland) en op een transparante en zo veel mogelijk gesloten gewasbeschermingsketen (samen met AGRODIS en LTO Nederland). Nefyto zal verder nadruk leggen op het belang van goede randvoorwaarden voor het functioneren van het College voor de Toelating van Bestrijdingsmiddelen.

Bron: Nefyto, 3 juli 2003

Binnenlandse bijeenkomsten

27 november 2003

10-jarig jubileum van Artemis/
Najaarsvergadering van de KNPV: De toekomst van biologische bestrijding WICC, Lawickse Allee 11, Wageningen
Info: A.J. Termorshuizen, Biologische Bedrijfssystemen, Marijkeweg 22, 6709 PG Wageningen
e-mail: aad.termorshuizen@wur.nl.

Buitenlandse bijeenkomsten

4-7 september 2003

3rd International Symposium on Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacteria, Wooster, OH, Verenigde Staten
Info: P. Grewal, Dept. of Entomology, OSU, OARDC, 1680 Madison Ave., Wooster, OH 44691, Verenigde Staten.
E-mail: Grewal.4@osu.edu
Fax: 1-330-263-3686.
Phone: 1-330-263-3963.

8-9 september 2003

Slugs and Snails: Agricultural, Veterinary and Environmental Perspectives Canterbury Christ Church University College, Canterbury, Kent, Verenigd Koninkrijk
Info: Prof Georges Dussart, Ecology Research Group, Canterbury Christ Church University College, North Holmes Road, Canterbury, Kent, CT1 1QU, Verenigd Koninkrijk
Tel.: +44 (0)1227 767700;
Fax: +44 (0)1227 470442;
Email: gbd1@cant.ac.uk

8-11 september 2003

Society for General Microbiology – Genomics Conference UMIST, Manchester., Verenigd Koninkrijk
Info:
www.socgenmicrobiol.org.uk/meetings/

10-12 september 2003

International symposium on *Melampsora* rusts on *Salicaceae* Queens University Belfast, Noord-Ierland
Info: www.bspp.org.uk/meetings/melampsora.doc

17-19 september 2003

International Symposium on Greenhouse Tomato: Integrated Crop Protection and Organic Production. Avignon, Frankrijk
Info: Y. Trottin-Caudal, Centre Technique Interprofessionnel de Fruits et Légumes, 22, rue Bergère, 75009, Parijs, Frankrijk.
Tel.: +33 466011054
E-mail: TrottinY@ctifl.fr

21-25 september 2003

10th Workshop of the IOBC Global Working Group on Arthropod Mass Rearing and Quality Control, Montpellier, Frankrijk
Info: Ms. Mireille Montes de Oca, IOBC AMRQC Workshop, Agropolis International, Avenue Agropolis, F-34394 Montpellier Cedex 5, Frankrijk, Tel.: +33 467047530, Fax: +33 467047599, E-mail: iobc.workshop@agropolis.fr, web: www.AMRQC.org

8-10 oktober 2003

Meeting of the IOBC/WPRS Working Group 'Pesticides and Beneficial Organisms', Ponte de Lima, Portugal
Info: Dr. Heidrun Vogt, BBA, Institute for Plant Protection in Fruit Crops, Schwabenheimerstr. 101, D-69221 Dossenheim, Duitsland, Phone: +49 6221/8680530, Fax: +49 6221/8680515, E-mail: H.Vogt@bba.de or the local organizers: J. Raul Rodrigues and José Ribeiro, Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Convento do Refóios, 4990-706 - Ponte de Lima, Portugal, Tel.: +351 258 909 740, E-mail: oilb.beneficials@esapl.pt or raulrodrigues@esapl.pt. More information (programme, registration and accommodation): www.esapl.pt/web/oilb.beneficials/index.htm

13-15 oktober 2003

IOBC/WPRS Working Group; Integrated Protection in Field Vegetables, Deinze België
Info: S. Vidal, Institute for Plant Pathology and Plant Protection, Entomological Section, Griesbachstrasse 6, D-37077 Göttingen. Tel: +49-551-399744, -393730, fax: +49-551-393730, -3934187 E-mail: svidal@gwdg.de

16-18 oktober 2003

Association of Natural Bio-Control Producers Annual Conference, Niagara Falls, Ont, Canada
Info: ANBP, 10202 Cowan Hts. Dr., Santa Ana, CA 92705, Verenigde Staten. E-mail: execdir@anbp.org, Web: www.anbp.org, Fax/phone: 1-714-544-8295.

26-29 oktober 2003

Entomological Society of America, Annual Meeting, Cincinnati, Ohio, Verenigde Staten
Info: ESA, 9301 Annapolis Rd., Lanham, MD 20706-3115, USA, E-mail: esa@entsoc.org, Fax: 1-301-731-4538, Web: www.entsoc.org, phone: 1-301-731-4535

26-30 oktober 2003

Workshop of the IOBC Working 'Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate'. Agadir, Marokko
Info: A. Hanafi
E-mail: hanafi@marocnet.ma

10-12 november 2003

British Crop Protection Council International Congress – Crop Protection and Technology 2003. Glasgow, Verenigd Koninkrijk
Info: BCPC secretariat, c/o The Event Organisation Company, 5 Maudstone Buildings Mews, Bankside, London SE1 1GN Verenigd Koninkrijk
Tel: +44 1252 733072, Fax: +44 1252 727194
Email: md@bcpc.org, website: http://www.bcpc.org/

17-20 november 2003

British Crop Protection Council Conference (BCPC): Weeds. Glasgow, Verenigd Koninkrijk
Info: BCPC, 49 Downing Street, Farnham, Surrey, GU9 7PH Verenigd Koninkrijk
Tel: +44 1252 733072, Fax: +44 1252 727194
Email: md@bcpc.org, website: www.bcpc.org

26-29 november 2003

IOBC/WPRS Study Group 'Ecological Impact of Genetically Modified Organisms', 1st Meeting, Praag, Tsjechië
Info: Jörg Romeis, Swiss Federal Research Station for Agroecology and Agriculture (FAL), Zurich, Zwitserland,
E-mail: joerg.romeis@fal.admin.ch

30 november-5 december 2003

IOBC/WPRS Working Group Meeting, 'Protected Crops in Mediterranean Climate', Agadir, Marokko
Info: Dr. Abdelhaq Hanafi, Integrated Production and Protection Unit, Complexe Horticole d'Agadir, Institut Agronomique et Veterinaire Hassan II, BP. 18/S, Agadir, 80000 Marokko, Tel/fax 212 48 248152, E-fax 001 603 4572654, E-mail: Hanafi@iavcha.ac.ma. Web: www.iavcha.ac.ma/IOBC/congress.html, Convenor Dr. Cristina Castañé, Institut de Recerca I Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Ctra. De Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Spanje. Fax +34 937533954, E-mail Cristina.castane@irta.es

[ARTIKELN

De paardenkastanjemineermot <i>Cameraria ohridella</i> Berend Aukema	145
Voortgang in de oplossing van de kleine-toepassingenproblematiek in Europa Ton Rotteveel en Vivian Powell	146
Koppert Biological Systems: van pionier naar 'professional' Koen Altena, Marlies Dissevelt en Adriaan van Doorn	151
Levensvatbaarheid van <i>Ralstonia</i> en <i>Clavibacter</i> meetbaar met behulp van RNA-detectiemethoden J.R.C.M. van Beckhoven en J.M. van der Wolf	157

[COLUMN

Eriksson in de kuif gepikt; over een mycoplasma-theorie J.C. Zadoks	161
---	-----

[PROMOTIES

Suppression of bacterial wilt in <i>Eucalyptus</i> and bacterial speck in <i>Arabidopsis</i> Longxian Ran	162
Pompen of verzuipen I. Stergiopoulos, L.-H. Zwiers en M.A. de Waard	165
De rol van ethyleenperceptie in resistentie tegen plantenziekten Bart P.J. Geraats	168
De rol van heterotrimere G-eiwitten in de ontwikkeling en virulentie van <i>Phytophthora infestans</i> Maita J.M. Latijnhouwers	171

[VERENIGINGSNIEUWS

10-jarig jubileum van Artemis/Najaarsvergadering van de KNPV: De toekomst van biologische bestrijding	175
---	-----

[NIEUWS

Onderzoekers ontdekken resistentiegen tegen <i>Phytophthora infestans</i>	178
Tabakswittevlieg in paprika goed te bestrijden met sluipwesp	178
Veilig werken met bio-bestrijders	179
527 hectare tulpen afgekeurd vanwege mozaïekvirus	179
Limburgse aardbeienteelt kampt met schimmelziekte	179
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> in grond kan getoetst worden	179
CTB laat drie nieuwe gewasbeschermingsmiddelen toe	180
Veel mycosphaerella-aantastingen in komkommerteelt	180
Tientallen <i>Phytophthora</i>-haarden in Groningen en Drenthe	180
Uienteelt in West-Brabant kampt met valse meeldauw	180
Snelle diagnose van <i>Guignardia citricarpa</i> op citrusvruchten dankzij moleculaire test	180
<i>Rhizoctonia</i> in suikerbietten	181
Nefyto sluit zich aan bij Convenant Duurzame Gewasbescherming	181

[AGENDA	omslag 3
----------------------	----------