

Plantenstoffen en Plantweerbaarheid

PT projectnummer: 14761.01

PT projecttitel: Consultancy Plantstoffen en Plantweerbaarheid

Datum okt 2012
Auteur(s) Henrie Korthout

Exemplaarnummer 1
Oplage 3
Aantal pagina's 31
Aantal bijlagen

Gefinancierd door:



Productschap **Tuinbouw**

Inhoudsopgave

1	Inleiding.....	3
2	Stressfactoren bij planten.....	5
2.1	Biotische stress factoren en secundair metabolisme	5
2.1.1	Signaalmoleculen bij biotische stressfactoren	6
2.1.2	Secundaire metabolieten betrokken bij biotische stress.....	8
2.1.3	Biosynthese routes geïnduceerd tijdens biotische stress.....	9
2.1.4	Induced Systemic Resistance.....	17
2.2	A-biotische stress.....	18
2.2.1	A-biotische stressfactoren.....	19
2.2.2	Inductie a-biotische stress resistentie:	21
3	Toepassingsmogelijkheden in de praktijk	23
3.1	Plantweerbaarheid met betrekking tot biotische stressfactoren	23
3.1.1	Inductie van ISR	23
3.1.2	Inductie van SAR.....	24
3.1.3	Verwonding van de plant.....	24
3.2	Plantweerbaarheid met betrekking tot a-biotische stressfactoren	25
3.2.1	Behandeling met biocontrolfungi	25
3.2.2	Behandeling met zwavel.....	25
3.2.3	Cross-tolerance bij signaaltransductieroutes a-biotische stress	25
4	Referenties	28

1 Inleiding

De plant bezit van nature een complex mechanisme om zich te beschermen tegen bedreigende invloeden uit zijn omgeving. Immers een plant kan niet vluchten bij veranderende weersomstandigheden of wanneer de plant wordt aangevallen door bijvoorbeeld insecten. Dit complex mechanisme bevat onder andere het induceren van genen (eiwitten) die er voor zorgen dat specifieke stoffen worden aangemaakt die de plant beschermen. Deze specifieke stoffen worden aangeduid met **secundaire metabolieten**. Het proces dat verantwoordelijk is voor het aanmaken van deze secundaire metabolieten wordt secundair metabolisme genoemd. De plant kent naast het secundaire metabolisme ook het primair metabolisme waarbij energie CO₂ en water wordt omgezet in biomassa. Het primaire en secundaire metabolisme zijn met elkaar in evenwicht maar zijn wel min of meer elkaars tegenpolen. Als de omstandigheden optimaal zijn (bv in een kas) zal het primaire metabolisme volop draaien waarbij zoveel mogelijk energie wordt omgezet in biomassa. Het secundaire metabolisme draait dan op lage toeren omdat er geen of weinig bedreigingen zijn. Bij stress (veranderende weersomstandigheden, aanval van pathogenen) schakelt de plant over van primair naar secundair metabolisme; de plant groeit veel minder en er worden secundaire metabolieten aangemaakt om de plant te beschermen.

Iedere plant is in staat om een breed scala aan secundaire metabolieten te produceren. Een aantal daarvan is soort specifiek. Door de grote diversiteit in het plantenrijk betekent dit dat er een enorme diversiteit aan secundaire metabolieten geproduceerd kan worden. Op dit moment zijn er zo'n 100.000 verschillende secundaire metabolieten in kaart gebracht. Een groot aantal hiervan is zo complex van structuur dat het door de chemische industrie nooit nagemaakt kan worden. Mens en dier hebben van oudsher ook altijd gebruik gemaakt van deze secundaire metabolieten die door de plant geproduceerd worden. Naast een beschermende rol voor de plant hebben veel secundaire metabolieten ook een geneeskrachtige waarde of zijn ze attractief voor de mens en dier als kleur-, geur- of smaakstof.

De laatste jaren zijn secundaire metabolieten weer volop in de belangstelling komen staan. Enerzijds komt er vanuit de maatschappij steeds meer belangstelling voor duurzame en natuurlijke producten, anderzijds biedt het breed scala aan de complexe structuren nieuwe mogelijkheden voor de ontdekking van nieuwe geneesmiddelen. Het onderzoek naar secundaire metabolieten is daarom in de afgelopen jaren ook in een enorme versnelling geraakt. Echter het merendeel van het huidige onderzoek naar secundaire metabolieten is voornamelijk gericht op toepassingen met betrekking tot de gunstige effecten van secundaire metabolieten voor de mens. Toch kan de kennis afkomstig van deze onderzoeken zeer waardevol zijn het begrip van het secundair metabolisme in de plant en de mogelijke toepassingsmogelijkheden in de tuinbouw.

In de tuinbouw komt het gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen steeds meer onder druk te staan. Echter het bestrijden van stressfactoren (bijvoorbeeld veroorzaakt door pathogenen) is noodzakelijk om voedselproductie in de toekomst te kunnen blijven garanderen. Begrip en controle over het secundaire metabolisme in de plant, met als doel om de plant van nature weerbaarder te maken tegen stressfactoren, kan een belangrijke oplossing zijn voor dit probleem. Hierbij kan men denken aan het behandelen of spuiten van planten met natuurlijke stoffen (bv. hormonen of derivaten daarvan) om de weerbaarheid te induceren. Maar er zijn ook hele andere mechanismen bekend die toegepast kunnen worden om planten weerbaarder te maken. Hierbij kan men gebruik maken van het immuunsysteem van de plant. Hoewel op het eerste gezicht planten en dieren wezenlijk anders zijn, lijken er toch interessante overeenkomsten te bestaan die van toepassing zijn op het verbeteren van de weerbaarheid bij zowel de mens (en dier) en de plant gebruikmakend van het immuunsysteem. Bij mens en dier kan het immuunsysteem verbeterd of geactiveerd worden via inenting. Ook bij planten zijn vergelijkbare methodes toepasbaar om planten weerbaarder te maken voor schadelijke pathogene. Nederland beschikt over een vooraanstaande wetenschappelijke reputatie op dit gebied. Ook kunnen planten hulp van de omgeving in roepen in geval van een pathogene aanval. Dit principe staat bekend als “cry for help”. Hierbij wordt na een pathogene aanval door de plant de hulp ingeroepen van het “ecosysteem” (vaak nematoden, insecten) waarbij de plant stoffen afscheidt die als lokstof fungeren voor deze organismen die de pathogenen vervolgens onschadelijk maken. De inzet van sluipwespen is hiervan een goed praktijkvoorbeeld

Er lijken dus verschillende uiteenlopende mogelijkheden te zijn om planten via een natuurlijke weg weerbaarder te maken gebruikmakend van hun secundaire metabolisme. In dit rapport zal een overzicht worden gegeven over de huidige “state of the art” met betrekking tot kennis over het secundaire metabolisme (welke stoffen, hoe en wanneer worden ze gemaakt) en secundaire metabolieten in relatie tot plant weerbaarheid. Hoewel veel onderzoek naar secundaire metabolieten in relatie tot plantweerbaarheid is uitgevoerd op zogenaamde “wetenschappelijke modelgewassen” zoals *Arabidopsis* en tabak zijn veel beschreven mechanismen generiek en dus toepasbaar bij gewassen zoals we die kennen in de Nederlandse glas- en tuinbouw.

Uit deze kennis zullen enkele veelbelovende toepassingsmogelijkheden voor de Nederlandse tuinbouw gedestilleerd worden om planten weerbaarder te maken door gebruik van secundaire metabolieten.

2 Stressfactoren en productie van secundaire metabolieten bij planten

De stressfactoren die een rol spelen bij planten worden doorgaans in twee categorieën ingedeeld: de biotische- en de a-biotische stressfactoren. Onder biotische stressfactoren vallen die factoren die een biologische of ecologische oorsprong hebben; soorten of andere soorten die een invloed hebben op het leven van een bepaalde soort. De meest bekende voorbeelden hiervan zijn schimmels, insecten, parasieten, microben die leven ten koste van een bepaalde plant. Onder a-biotische stressfactoren vallen de stressfactoren die geen biologische maar een externe milieu oorsprong hebben zoals licht, temperatuur, luchtvochtigheid, zout, zuurgraad en beschikbaarheid van water.

De bescherming van de plant tegen stressfactoren door het aanschakelen van het secundaire metabolisme voor de productie van de juiste secundaire metabolieten is vaak erg specifiek. Bij biotische stressfactoren zijn vaak andere secundaire metabolieten betrokken dan bij a-biotische stressfactoren. Het secundaire metabolisme betrokken bij biotische en a-biotische stressfactoren zullen daarom in dit hoofdstuk afzonderlijk worden behandeld.

2.1 Biotische stress factoren en secundair metabolisme

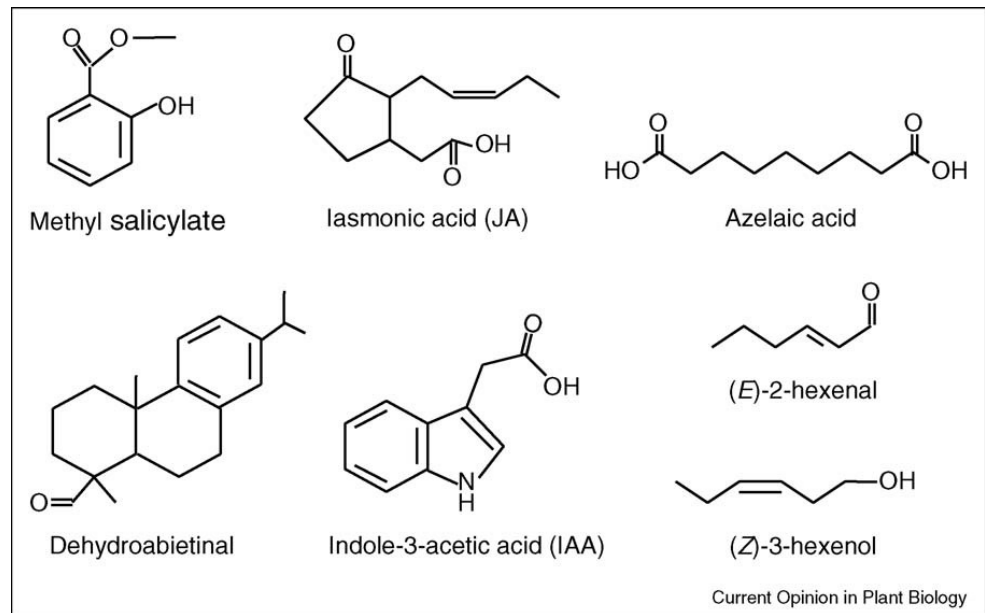
Zoals in de inleiding al is aangegeven bezitten planten een complex mechanisme om zich te beschermen tegen biotische stress factoren zoals infecties (pathogenen) of vraatzucht door insecten (herbivoren). Bij aanval door pathogenen of herbivoren wordt het afweermechanisme in werking gezet om de schade zoveel mogelijk te beperken tot de plek van de aanval om zo te voorkomen dat de gehele plant (of populatie planten) sterft. Het aanschakelen van een dergelijk afweermechanisme door schadelijke pathogenen wordt ook wel AR (Acquired Resistance) genoemd [1]. Interessant is dat een soortgelijk mechanisme ook kan worden aangeschakeld door interactie met organismen die niet schadelijk maar juist voordelig zijn voor de plant. Dit wordt IR (Induced Resistance) genoemd (zie 2.1.4) [2]. Zowel AR als IR kunnen lokaal van karakter zijn (d.w.a. de inductie van beschermende eiwitten en metabolieten is beperkt tot de plek van infectie) als systemisch (inductie in de gehele plant). Bij systemische inductie spreekt men van SAR (Systemic Acquired Resistance) en van ISR (Induced Systemic Resistance). Met name de manipulatie via het ISR van de plant wordt al een belangrijke strategie gezien om de weerbaarheid van planten op een natuurlijke manier te verhogen. Hier zal in paragraaf 2.1.4. meer gedetailleerd op worden ingegaan.

Bij systemische inductie vindt er een signaaloverdracht plaats van de plek van infectie naar andere delen van de plant of naar andere planten waarbij signaalmoleculen zijn betrokken. Dit wordt in onderstaande paragraaf verder besproken.

2.1.1 Signaalmoleculen bij biotische stressfactoren

Een van de eerste stappen bij schade door vraatzucht of pathogene infectie is de productie van signaalmoleculen. Deze signaalmoleculen zorgen voor de inductie van genexpressie met vervolgens de vorming van eiwitten en metabolieten die het afweermechanisme activeren.

In figuur 1 staan de belangrijkste signaalmoleculen weergegeven die op dit moment bekend zijn.



Figuur 1: Signaalmoleculen voor het aanschakelen van het afweermechanisme bij planten na inductie biotische stress

Er kunnen twee klassen signaalmoleculen worden onderscheiden; (1) niet vluchtige signaalmoleculen die het signaal door de plant zelf transporteren en (2) vluchtige signaalmoleculen die het signaal door de lucht naar naburige plantendelen (of eventuele dicht bijzijnde planten) transporten met als doel om het afweermechanisme aan te schakelen en te voorkomen dat er elders schade optreedt.

2.1.1.1 Niet vluchtige signaalmoleculen

Onder de klasse niet vluchtige signaalmoleculen vallen de zuren Salicylzuur (SA), Jasmoonzuur (JA) en Azelaic acid.

Salicylzuur wordt over het algemeen via het floeem door de plant getransporteerd b.v. na infectie door pathogenen (virussen, bacteriën en/of schimmels). Salicylzuur wordt geproduceerd via de phenylpropanoid biosynthese route (zie paragraaf 2.1.3.3). Over het algemeen is het zo dat salicylzuur een rol speelt bij de verdediging (opbouw weerbaarheid) via het doden van de pathogenen (“biotrofe” micro-organismen) die de plant koloniseren. SA is als signaalbetrokken betrokken bij SAR.

Jasmoonzuur wordt over het algemeen via de vaatbundels getransporteerd na verwonding of vraat door predatoren [4]. Jasmoonzuur wordt geproduceerd via de oxylipine route (zie paragraaf 2.1.3.2.). In tegenstelling tot salicylzuur is jasmoonzuur meer gericht is het doden van met name pathogenen die de plantencel doden door het afscheiden van toxines of lytische enzymen (“necrotrofe” micro-organismen). Daarnaast is jasmoonzuur voornamelijk betrokken bij biotische stresssituaties (verwonding, elicitors) en over het algemeen niet bij a-biotische stress [24]. Jasmoonzuur is (samen met ethyleen) als signaalmolecuul betrokken bij ISR.

Azelaic acid is een zuur die via de vaatbundels door de plant wordt getransporteerd. De werking van azelaic acid heeft waarschijnlijk te maken met inductie van Salicylzuur [3].

2.1.1.2 Vluchtige signaalmoleculen

Naast de niet vluchtige zijn er ook vluchtige signaalmoleculen. Zowel salicylzuur als jasmoonzuur kunnen ook voorkomen als vluchtige component in de vorm van methylesters; MeSa (Methyl-Salicylzuur) en MeJa (Methyl Jasmoonzuur). MeSa en MeJa zorgen er via de lucht voor dat de boodschap dat de plant wordt aangevallen bij andere plantendelen en eventuele planten in de directe nabijheid terecht komt. Naast dit waarschuwend effect zorgen deze stoffen er ook voor dat bij deze planten bepaalde genen worden aangeschakeld die de weerbaarheid van de plant verhogen. Dit kunnen genen zijn die coderen voor de productie van secundaire metabolieten maar ook kleien peptiden die als intermediair dienen voor het aanschakelen van het afweersysteem [6]. Zo zijn in *Arabidopsis* een aantal kleine peptiden gevonden die en in hoge mate tot expressie komen wanneer de planten besproeid worden met methyl jasmonaat en/of met methyl salicylzuur waarbij vervolgens het afweersysteem geactiveerd wordt [7].

Naast MeSa en MeJa kunnen er ook nog andere vluchtige moleculen geproduceerd worden die een brede werking hebben in het afweermechanisme. Deze componenten worden in de literatuur vaak vaak aangeduid met de term Green Leaf Volatiles (GLV). Enkele voorbeelden hiervan zijn (*E*)-2-hexanal en (*Z*)-3-hexanol (figuur 1). Deze stoffen die o.a. geproduceerd worden na verwonding van het bladoppervlak werken ook indirect bij het aanschakelen van het afweermechanisme [5] Terpenoiden (zoals dihydroabietinal in figuur 1) vallen ook onder de GLV's .

Terpenoiden en de biosynthese ervan worden in paragraaf 2.1.3.3. uitgebreid besproken. Tot slot zijn er ook nog vluchtige componenten (in de literatuur

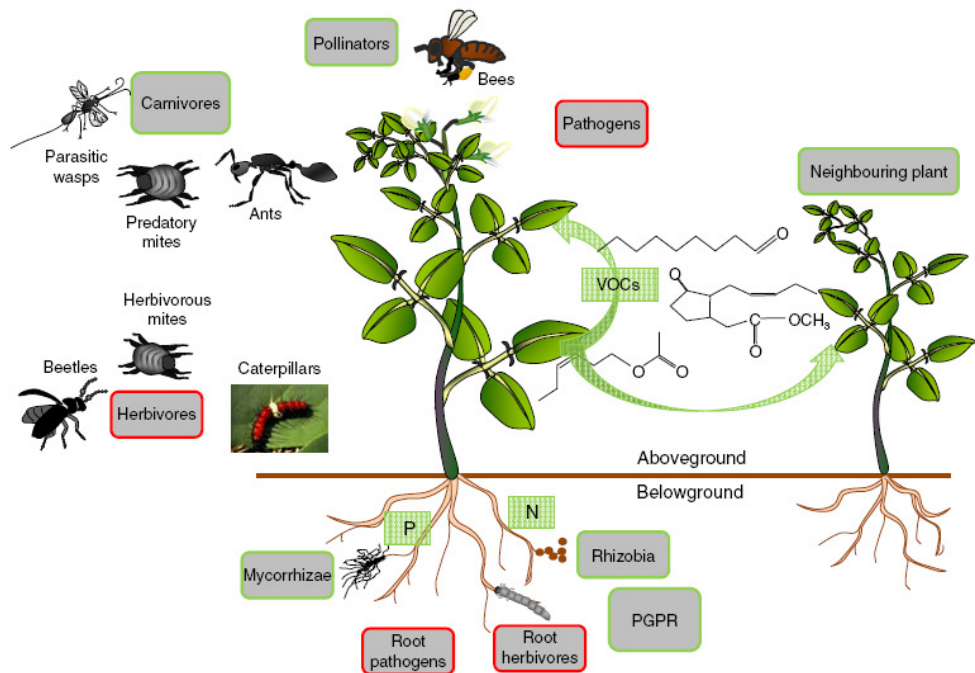


Fig.2: Overzicht herkomst biotische stressfactoren en signaaloverdracht via vluchtige stoffen (VOCs). Figuur afkomstig uit referentie 27.

2.1.2 Secundaire metabolieten betrokken bij biotische stress.

De signaalmoleculen zoals in paragraaf 2.1.1 besproken hebben direct (en soms indirect) effect op de expressie van genen die coderen voor eiwitten die een belangrijke rol spelen in de biosynthese van beschermende secundaire metabolieten op gang brengen. Er zijn in de literatuur erg veel stoffen secundaire metabolieten terug te vinden waarvan het beschermende effect is aangetoond. In deze paragraaf zal een geïllustreerd overzicht worden gegeven van de belangrijkste metabolieten die worden geproduceerd bij biotische stress terwijl in de volgende paragrafen een overzicht wordt gegeven van de belangrijkste biosynthese routes van deze beschermende metabolieten.

Classificatie van en werking van secundaire metabolieten

Alkaloiden: zijn neurotoxines en werken over het algemeen in op de neurale netwerken van predatoren (herbivoren, carnivoren): Kunnen ook ingrijpen op DNA-niveau,

NPPA (Non-protein amino acids): zijn kleine peptiden die transport van aminozuren en inbouw van aminozuren (in eiwitten) blokkeren,

Cyanogenic glucosides: stoffen die op zich niet toxisch zijn maar komen ze in contact met het enzym β -glucosidase (bv bij celbeschadiging) dan worden ze omgezet waarbij het giftige HCN vrijkomt. HCN blokkeert de mitochondriale activiteit (energievoorziening van een organisme)

Glucosinolaten: ook glucosinolaten zijn niet zo giftig maar komen ze in contact het enzym myrosinase dan ontstaat het giftige mosterdolie. Mosterdolie lost membranen van de pathogenen (bacteriën, schimmels) op en inactieveert eiwitten (enzymen), receptoren en DNA door middel van binding.

Terpenoiden: stoffen die integreren in membraansystemen van bijna alle pathogenen (bacteriën, schimmels, insecten, nematoden) waardoor lekkage van de membranen veroorzaakt wordt. Ook kunnen met terpenoiden een grote verscheidenheid aan structuren gebouwd worden waardoor bepaalde stoffen (hormonen, neurotransmitters) structureel nagebouwd kunnen worden waardoor signaalroutes van de pathogenen verstoord of geblokkeerd kunnen worden. Vluchtige terpenoiden hebben ook een belangrijke rol als signaalmolecuul (zie 2.1.1.2.)

Saponines: zijn combinaties van terpenen of steroïden met glucosides (suikers) waardoor ze de eigenschappen van zowel de terpenen/steroïden als de suikers hebben. Hierdoor zijn ze zeer gevaarlijk omdat ze in bijna alle membraansystemen kunnen integreren

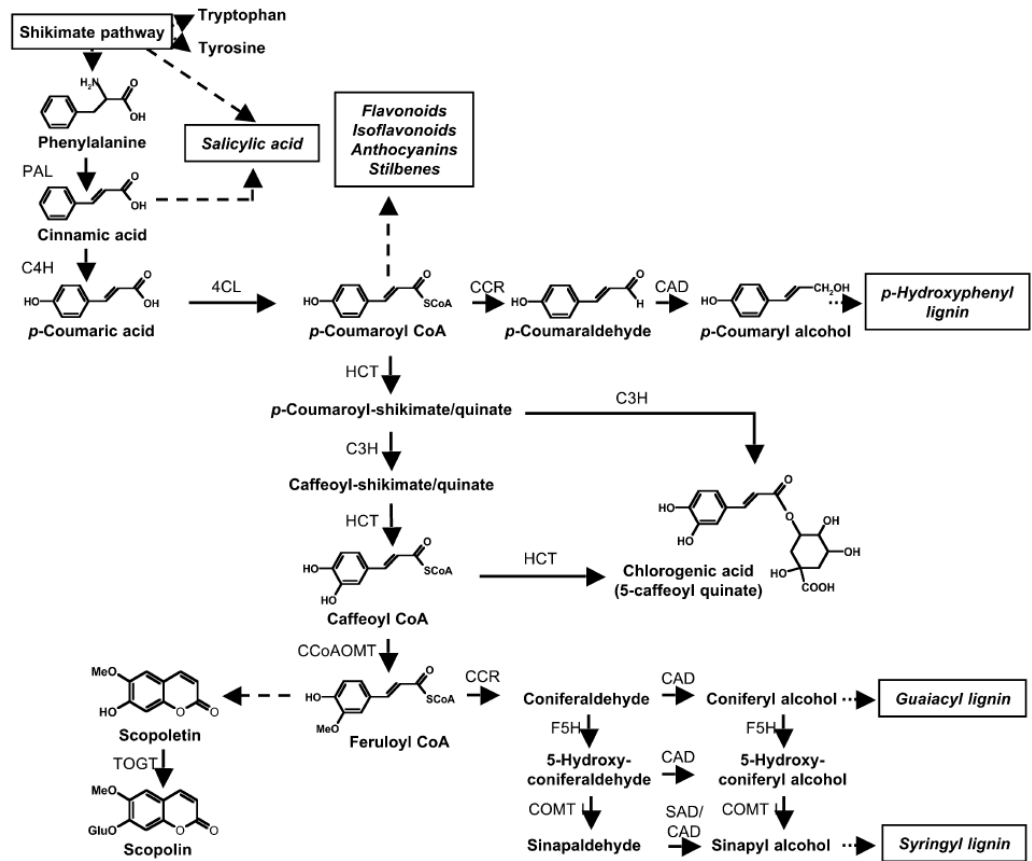
Polyketides (anthraquinones): interfereren met Na^+ - en K^+ -ATPases (leegloop predatoren door diaree) en binden aan DNA

Phenylpropanoiden / flavonoiden : Grote groep van phenyl-houdende stoffen waaronder ook de coumarines, furanocoumarines, isoflavonen, stilbenes, anthocyanen, catechines en tannines vallen. Door hun phenylgroepen kunnen deze stoffen goed aan eiwitten (enzymen) en DNA binden en ze hierdoor inactiveren.

2.1.3 *Biosynthese routes geïnduceerd tijdens biotische stress*

2.1.3.1 *Phenylpropanoid biosynthese-route*

De phenylpropanoïde route is specifiek voor planten. Via deze route kunnen tal van stoffen geproduceerd worden die betrokken zijn bij het afweermecanisme van de plant bij een pathogene aanval. Stoffen die geproduceerd worden tijdens of vlak na een pathogene aanval worden phytoalexines genoemd. Stilbenes, coumarines en isoflavonoiden zijn groepen van secundaire metabolieten die vallen onder de phytoalexines en die worden geproduceerd via de phenylpropanoïde route (zie figuur 3) . Naast phytoalexines zijn er ook stoffen met antimicrobiële werking die altijd in de plant aanwezig zijn (ongeacht pathogene aanval). Deze stoffen worden phytoanticipines genoemd. Via de phenylpropanoïde route worden ook flavonoiden en salicylzuur geproduceerd. Phenylpropanoiden beiden een beschermende werking aan de plant enerzijds omdat ze antimicrobieel zijn, anderzijds omdat ze de celwand versterken via verestering [12].



Figuur 3 Schematisch overzicht Phenylpropanoïde biosynthese-route (ref 12) Enzymen zijn: 4CL, 4-coumarate ligase; C3H, coumaratehydroxylase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; CAD, cinnamyl alcoholdehydrogenase; CCoAOMT, caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase; CCR, cinnamoyl coenzyme A reductase; COMT I, caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase; F5H, ferulate 5-hydroxylase; HCT, hydroxycinnamoyl transferase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; SAD, sinapyl alcohol dehydrogenase; TOGT, tobacco glucosyltransferase.

In de literatuur zijn een aantal methodes beschreven om the phenylpropanoid biosynthese route in planten te induceren:

1. Inductie phenylpropanoïde biosynthese route door pathogene aanval

De inductie van de phenylpropanoïde route b.v. na een pathogene aanval, begint bij de activatie van het enzym PAL (phenylalanine ammonia-lyase). PAL wordt vaak gezien als een van de key-enzymen bij inductie van productie van secundaire metabolieten na

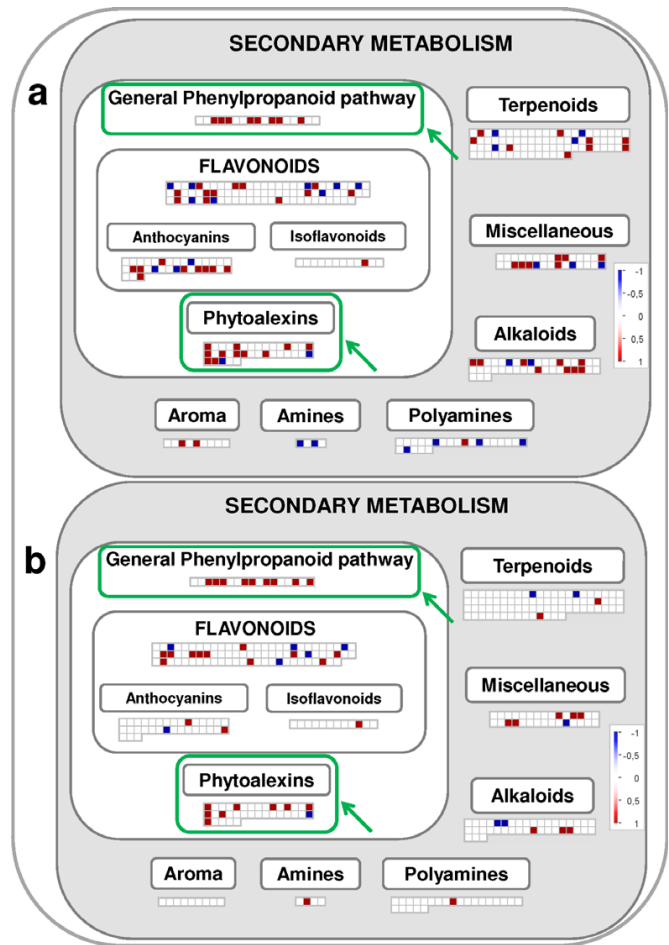
een pathogene aanval. Inductie van PAL resulteert enerzijds in zowel de productie van beschermende metabolieten (coumarines zoals caffeoyl-quinic acid) op de plek van de aanval als de productie van het signaalmolecuul SA voor het aanschakelen van het afweermechanisme elders in de plant. Experimenten in tabak waarbij het enzym PAL tot overexpressie werd gebracht resulteerden inderdaad in een verhoogde vorming van coumarines en een verhoogde resistentie tegen de schimmel *C.nicotianae* [13].

2. inductie phenylpropanoide biosynthese route via UV bestraling

Genen in de phenylpropanoide route worden ook geïnduceerd door UV-B straling [11]. Bij buitenteelten en teelten in kas is aangetoond dat verhoogde UV bestraling de planten weerbaarder maakt tegen abiotische stressfactoren zoals koude, hitte, hoog licht, droogte en zoutstress (ref 11 en verwijzingen hierin). Hoewel niet helemaal eenduidig is uit een aantal experimentele studies gebleken dat UV-B bestraling een stimulerende invloed heeft op de expressie van een aantal genen die ook betrokken zijn bij de plantweerbaarheid tegen pathogenen [11]. Deze genen zijn PAL, chalcone synthase, chitinase, β -1,3-glucanase, lipoxygenase, stilbene synthase en pathogen related (PR) eiwitten. Inductie van deze genen vindt snel plaats, al na 30 minuten na UV behandeling. UV straling leidt ook tot de expressie van een aantal genen als gevolg van DNA schade. Echter de inductie van de genexpressie betrokken bij de opbouw van weerbaarheid tegen pathogenen lijkt los te staan van DNA schade [11].

Bij een studie waarbij bladeren van de druif (*Vitis vinifera*) werden bestraald met UV-B (lage en hoge dosis) is het effect op de inductie van de genexpressie van genen betrokken bij de phenylpropanoïde biosynthese route in kaart gebracht [19]. Hieruit bleek dat een aantal genen uit de biosynthese route inderdaad verhoogd tot expressie werden gebracht (zie figuur 4). Een aantal van deze genen zijn betrokken bij de productie van anthocyanins, flavonols, quercetin and kaempferol.

Figuur 4. Invloed UV-B bestraling op genexpressie van betrokken bij de productie van secundaire metabolieten bij het blad van de druif. A: hoog UV-B, B: laag UV-B. Rode punten: genen die verhoogd tot expressie komen, blauwe punten: genen die verlaagd tot expressie komen t.o.v. niet behandelde bladeren (ref 19)



3. inductie phenylpropanoide biosynthese route via elicitors

Elicitors zijn stoffen die van buitenaf op de plant worden aangebracht om biosynthese routes van secundaire metabolieten te induceren. Voorbeelden van elicitors zijn gistextract, membranen van bacteriën maar ook signaalmoleculen zoals jasmonaat. In celcultures van *Medicago truncatula* is aangetoond dat behandeling (=toevoeging) van jasmonaat (in de vorm van Methyl jasmonozuur (MeJa)) en gistextract leidde tot een verhoogde productie van β -amyrine [14]. Vanuit deze stof, die via de phenylpropanoide biosynthese route wordt aangemaakt, worden beschermende triperpene saponines geproduceerd zoals sojasapogenol B- en E glycosides. Toevoeging van gistextract leidde met name tot een toename van de Formononetin en Afrormosin (twee isoflavone aglycones) en shikimic acid, een belangrijke basisstof in de phenylpropanoide biosynthese route. In sojaboon werd aangetoond dat toediening van een celwand-glucan elicitor (PWC) gemaakt uit het pathogeen *Phytophthora sojae* leiden tot de productie van het phenylpropanoide glyceolline. Glyceolline een bekend phytoalexine [21].

4. Inductie phenylpropanoide biosynthese route via humus

Humus bestaat uit een set van organische zuren en basen met verschillende grootte als gevolg van microbiële afbraak van organisch materiaal in de grond. Humus wordt vaak toegepast in de tuinbouw als groeibevorderaar. Bij hydroponic (teelt op water) culturen van maïs werd aangetoond dat humus afkomstig geproduceerd door aardwormen de expressie van het eiwit PAL induceren [16]. Bij 1 mg C per liter werd een toename van PAL activiteit gemeten van 337%. Zoals in bovenstaande paragraaf al is beschreven leidt inductie van PAL tot de productie van beschermende metabolieten en de productie van het signaalmolecuul SA. In dit experiment kon ook een significante toename van het gehalte aan phenylpropanoïde biosynthese route producten zoals flavonoiden en fenolische componenten worden gemeten.

5. Inductie phenylpropanoïde biosynthese route via verwonding

Herhaaldelijke verwonding van planten leidt tot de inductie van een aantal belangrijke enzymen die enerzijds betrokken zijn bij de wondheling maar anderzijds bij het aanschakelen van het afweermechanisme. Bij verwonding spelen de signaalmoleculen Jasmoonzuur en ethyleen spelen een belangrijke rol.

6. Inductie phenylpropanoïde biosynthese route andere methodes.

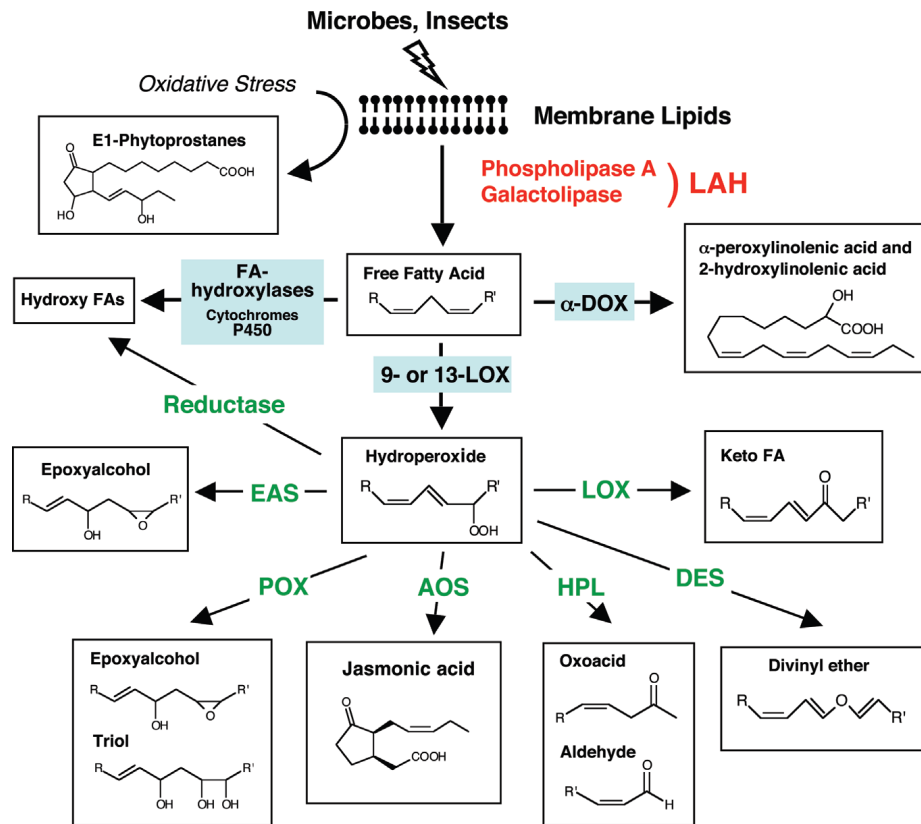
In de literatuur worden nog andere methoden beschreven die de phenylpropanoïde biosynthese route beïnvloeden. Bij soja werd aangetoond dat het frequent verwijderen van “sinks” (zoals jong fruit en jonge uitlopers) leidde tot de inductie van tal van genen die gerelateerd zijn aan de weerbaarheid bij biotische en a-biotische stress en de phenylpropanoïde biosynthese route [17]. Dit leidde tot een verhoogde productie van isoflavonoiden.

Bij celcultures van de druif (*Vitis vinifera*) werd aangetoond dat een verhoogde concentratie sucrose in het medium leidde tot een significante verhoging van de productie van phenylpropanoïden zoals stilbenes, anthocyanen, en catechines [18]. De verhoogde productie was het resultaat van de inductie van de expressie van PAL en andere belangrijke enzymen in de phenylpropanoïde biosynthese route zoals chalcone synthase, chalcone-flavone isomerase en stilbene synthase.

Bij tomaat kon worden aangetoond dat behandeling van de zaden, zaailingen of baldmateriaal met de bacterie *Pseudomonas fluorescence* leidde tot een verhoogde expressie van het gen PAL waarbij een verhoogde resistentie tegen tomato spotted wilt virus (TSWV) kon worden bewerkstelligd [20].

2.1.3.2 Inductie van de oxylipin biosynthese-route

Oxylipins bestaan uit meervoudig onverzadigde vetzuren waaraan via een enzymatisch reactie zuurstof wordt toegevoegd. (en overzicht van de enzymen die hierbij zijn betrokken staat weergegeven in figuur 5).



Figuur 5 Schematisch overzicht van de oxylipin route (ref 12). Enzymen zijn: AOS, allene oxide synthase; DES, divinyl ether synthase; EAS, epoxy alcohol synthase; FA, fatty acid; HPL, hydroperoxide lyase; LOX, lipoxygenase; α -DOX, α -dioxygenase

De rol van oxylipines bij de weerbaarheid is vergelijkbaar met die van phenylpropanoiden: enerzijds hebben oxylipines een antimicrobiële werking tegen de pathogenen, anderzijds is het de precursor voor een belangrijk signaalmolecuul zoals jasmonzuur (zie figuur 5).

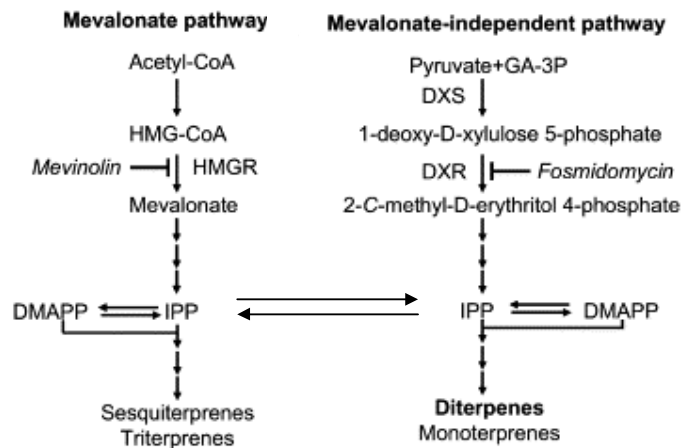
Inductie oxylipine biosynthese route:

In de literatuur zijn verschillende methoden beschreven die leiden tot de inductie van de oxylipine biosynthese pathway die vaak betrekking hebben op verwonding en elicitoren (zie tabel 1 en ref 25).

Toedienen van jasmonaat in de vorm van Methyljasoonzuur (MeJa) is een van de methoden om de expressie van genen van deze biosynthese route te induceren. Behandeling van bladeren van de tabaksplant, komkommer en *Arabidopsis* leidde tot een verhoogde expressie van de genen lipoxygenase en hydroperoxide lyase waardoor vluchtige stoffen als Hexanal, E-2-hexenal, Z-3-hexenyl acetate en Z-3-hexen-1-ol geproduceerd werden [23]. Zoals beschreven in 2.1.1. spelen deze stoffen een belangrijke rol bij de signaaloverdracht voor het aanschakelen van het afweermecanisme. In bladeren van de passievrucht werd aangetoond dat verwonding van de bladeren leidde tot een verhoogde expressie van het AOS (Allene Oxide Synthase). AOS is een van de belangrijke enzymen in de oxylipine biosynthese route die leidt tot de productie van jasmoonzuur [26]

2.1.3.3 De terpenoid biosynthese-route

Terpenoiden zijn metabolieten met een beschermende functie voor de plant tegen (a)biotische stress (bv stress als gevolg van foto-oxidatieve schade) . Terpenoiden kunnen worden aangemaakt via de mevalonate route en via de in methylerythritol 4 – fosfaat (mevalonaat onafhankelijke) route (zie figuur 6).



Figuur 6: productie van terpenoiden via mevalonate en mevalonate onafhankelijke biosynthese route

Inductie van de terpenoid biosyntheseroute vindt veelal plaats via jasmoonzuur en salicylzuur en signaal routes of door mechanische verwonding. Jasmoonzuur en wordt

geproduceerd via de oxylipine biosynthese route (zie paragraaf 2.1.3.2). Dit betekent dat de inductie van de terpenoïde biosynthese route gekoppeld is aan de oxylipine route. Inductie van de terpenoïde biosynthese route kan naast jasmoonzuur ook door andere producten of intermediären van de oxylipine biosyntheseroute worden geïnduceerd, zoals door PDA (phytodienoic acid) [25]. Jasmoonzuur is een van deze signaalmoleculen en is veelal betrokken bij de productie van monoterpenen en sesquiterpenen.

In een studie naar de weerbaarheid tegen droogtestress van de plant *Cistus creticus* is aangetoond dat de enzymen Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR in de mevalonate biosynthese route) en 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS in methylerythritol 4-fosfaat biosynthese route) de limiterende enzymen zijn voor de productie van terpenoïden. Juist deze enzymen worden verhoogd aangemaakt bij behandeling met Jasmoonzuur en/of salicylzuur en door mechanische verwonding [10].

Omdat de terpenoïde biosynthese route via signaalmoleculen zoals jasmoonzuur, en PDA gekoppeld is aan de oxylipine biosyntheseroute is de productie van terpenoïden vaak het gevolg van verwonding of vraatzucht. Door het gebruik van elicitors kunnen verwonding en vraatzucht worden nagebootst. In tabel 1 staat een voorbeeld het effect van het gebruik van elicitors op de productie van vluchtige terpenoïden weergegeven

Naast stimulatie van via de oxylipine biosynthese route (jasmoonzuur, salicylzuur, PDA, elicitors) zijn er nog andere stimuli beschreven die effect hebben op de inductie van de terpenoïde biosynthese route. Uit experimenten met algen is gebleken dat de expressie van verschillende genen betrokken bij de productie van terpenoïden (carotenoïden in het bijzonder) wordt geïnduceerd door verhoogde lichtintensiteiten [22]. Zo werd een verhoogde expressie gevonden voor de genen coderend voor lycopene cyclase, phytoene synthase, phytoene desaturase en carotenoid hydroxylase hetgeen resulteerde in de verhoogde productie carotenoïden. Verhoogd aanbod van blauw licht resulteerde in de verhoogde productie van astaxanthine in het bijzonder .

De vluchtige componenten spelen ook een rol bij “cry for help”. Zo is bekend dat vraatzucht aan de wortel van maïs door larven van kevers leidt tot de productie van het vluchtige β -caryophellene. Deze stof fungeert als lokmolecuul is voor nematoden [27].

Table 1. Effects of different elicitors and inhibitors of the jasmonate biosynthesis on the induction of volatile biosynthesis in lima bean leaves

Elicitor/Inhibitor Treatment	DMNT	TMTT	Other Volatiles	Endogenous JA Level	Reference
Cellulysin					
50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	+ ^a	-	++ ^b	\uparrow ^c	Piel et al. (1997)
Phenidone	-	-	-	ND ^d	
DIECA	-	-	-	ND	
Linolenic acid					
2 mM	+	++	-	ND	
Phenidone	-	-	-	ND	
<i>n</i> -Propyl gallate	-	-	-	ND	
PDA					
0.1 mM	+	+++ ^e	-	ND	
1.0 mM	+	+++	+	ND	
JA					
1.0 mM	+	-	++	ND	Boland et al. (1995)
Coronatine					
0.1 mM	++	+++	+++	(\uparrow) ^f	Boland et al. (1995)
Phenidone	++	+++	+++	ND	
DIECA	++	+++	+++	ND	
ln-Ile					
1.0 mM	+	-	++	(\uparrow)	Krumm et al. (1995)
Phenidone	+	-	++	ND	
DIECA	+	-	++	ND	
Lin-Ile					
2 mM	+	+++	-	ND	
Phenidone	-	-	-	ND	
<i>n</i> -Propyl gallate	-	-	-	ND	
Lin-Gln					
2 mM	+	+++	-	ND	
Phenidone	-	-	-	ND	
<i>n</i> -Propyl gallate	-	-	-	ND	
Water, control	-	-	-	(\uparrow)	
Water, detergent	-	-	-	(\uparrow)	

^a+, Minor components (<5%). ^b++, Byproducts (5% → 20%). ^c \uparrow , Transient upregulation.
^dND, Not determined. ^e+++ , main product(s) \geq 20% (usually base peak of the chromatogram).
^f(\uparrow), Minor increase due to mechanical wounding.

Tabel 1: effect van verschillende elicitors (kolom 1) op de productie van vluchtige terpenoiden (DMNT: 4,8-dimethylnona-1,3,7-triene en TMTT: 4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene en andere vluchtige terpenoiden) geïnduceerd componenten (intermediaire) uurt de oxylipine biosynthese route [ref 25].

2.1.4 Induced Systemic Resistance.

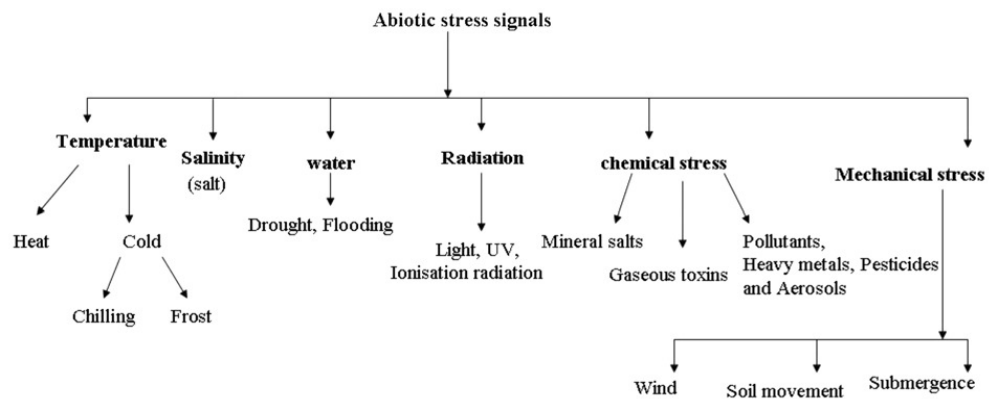
Induced **S**ystemic **R**esistance (ISR) is een interessante manier om planten op een “vriendelijke” manier weerbaar te maken tegen pathogenen. Zoals bij de inleiding van dit hoofdstuk al is besproken is ISR een afweermecanisme tegen pathogenen dat geïnduceerd wordt bij interactie tussen niet pathogene microorganismen en de plant (vaak wortelomgeving). Deze niet pathogene organisme hebben er baat bij dat de plant waarmee ze een symbiotische interactie hebben optimaal groeit. Mocht de plant niet optimaal presteren scheiden deze niet pathogene organismen bepaalde stoffen af die de plant doet denken dat er een pathogene aanval plaats vindt. De plant reageert hierop door de ISR mechanisme aan te schakelen. Vaak gaat dit aanschakelen van het ISR niet verder dan het zogenaamde “primen” van de plant [2]. Dit is min of meer

“vergelijkbaar” met het inenten bij mensen. Er gebeurt zichtbaar heel weinig bij de plant maar zodra er een echte pathogene aanval plaats vindt reageren de planten veel sneller en effectiever op de pathogene aanval. Planten zijn dus weerbaarder gemaakt. ISR is een afweermechanisme dat niet specifiek is en dus werkzaam is tegen een breed scala aan virussen, schimmels en insecten. Daarnaast is het afweermechanisme stabiel en eenmaal geïnduceerd blijft actief gedurende de levensduur van de plant [2]. Rhizobacteria zijn een bekende bron om ISR te induceren. Voorbeelden hiervan zijn sommige Pseudomonas en Bacillus soorten. Van Pseudomonas is aangetoond dat ze ISR induceren in o.a. bonen, radijs, rijst, tomaat en anjer [2].

Inductie van ISR gebeurt via de signaalmoleculen jasmoonzuur en ethyleen. Dit leidt tot versterking van de celwand, productie van eiwitten en secundaire metabolieten zoals de antimicrobiële phytoalexins

2.2 A-biotische stress

A- biotische stress wordt in tegenstelling tot biotische stress niet veroorzaakt door pathogenen maar door omgevingsfactoren zoals temperatuur (hitte, koude, vorst), vochtigheid, licht (bv UV), zouten (verzilte bodems, overstromingen zeewater), zware metalen, verzuring of alkalisering van de bodem of osmotische factoren (zie figuur 7)



Figuur 7. Overzicht van mogelijke a-biotische stressfactoren (ref 28)

Evenals bij biotische stress, zal de plant op deze stress situaties reageren door de expressie van genen te induceren die uiteindelijk leiden bescherming van de plant. De genen die geïndiceerd worden kunnen grofweg in 3 categorieën ingedeeld worden:

1. genen die coderen voor eiwitten die directe bescherming bieden aan de plant zoals heatshock-eiwitten, antivries eiwitten, detoxificerende eiwitten, osmo-beschermende eiwitten etc.

2. genen die coderen voor eiwitten die een rol spelen bij de signaaloverdracht (MAPK-kinases, fosofolipases etc)
3. genen die coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij de reductie van beschermende stoffen zoals secundaire metabolieten.

De inductie van genen voor de productie van beschermende metabolieten is vaak niet specifiek voor een bepaalde stress situaties. Verschillende stress situaties leiden vaak tot de productie van dezelfde secundaire metabolieten. Dit fenomeen wordt in de literatuur vaak aangeduid met “cross-tolerance”. Sucrose is een van de metabolieten die in elke a-biotische stress situatie verhoogd geaccumuleerd wordt. Betaines (polyols en suikers) zijn stoffen die in verhoogde mate worden aangemaakt onder diverse stress omstandigheden. Dit ter bescherming van de watermantel van essentiële eiwitten gedurende de stress [29]. GABA (gamma aminoboterzuur) is een metaboliet die snel in verhoogde mate wordt aangemaakt tijdens stress. De waarschijnlijke functie van GABA tijdens stress is (1) handhaving van de cellulaire pH, (2) bescherming tegen oxidatieve stress, (3) als osmoregulator en (4) als signaalmolecuul [29]. BCAA zijn aminozuren (valine, leucine, isoleucine, lysine, threonine, methionine) die samen met GABA in verhoogde mate worden geproduceerd onder stress [29].

Cross-tolerance zou een interessante optie kunnen zijn om planten weerbaarder te maken voor bepaalde stressfactoren. (zie hoofdstuk 3).

2.2.1 *A-biotische stressfactoren*

Er zijn verschillende factoren die a-biotische stress bij planten kunnen veroorzaken. In onderstaande paragrafen zullen de belangrijkste stressfactoren aan bod komen:

2.2.1.1 *Zoutstress*

Zoutstress is een van de belangrijkste en meest bedreigende a-biotische stress situaties en leidt tot dehydratatie van de cellen en verwelking van de plant. In de literatuur is veel terug te vinden over de productie van beschermende metabolieten bij verschillende gewassen. Een overzicht staat weergegeven in tabel 2

stress	metabolieten	gewas
zoutstress	Sorbitol GABA Flavonoids Jasmonic acid Polyphenol Tropane alkaloids Anthocyanins Trigonelline Glycinebetaine Polyamines Oryza Glycine betaine sucrose en zetmeel	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Sesamum indicum L</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Cakile maritima</i> <i>Datura innoxia</i> <i>Grevillea spec</i> <i>Glycine max</i> <i>Trifolium repens</i> <i>Oryza sativa</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Cenchrus pennisetiformis</i>
droogtestress	Glycosides Morphine alkaloids Trigonelline Glucosinolaten Chinolizidin alkaloids Epicatchines Betulinic acid Rutine flavonoids Anthocyanins Chlorogenic acid Rosemarinic acid	<i>Scrophularia ningpoensis</i> <i>Papaver somniferum</i> <i>Glycine max</i> <i>Brassica napus</i> <i>Lupinus angustifolius</i> <i>Camellia sinensis</i> <i>Hypericum brasiliense</i> <i>Hypericum brasiliense</i> <i>Prisms sativum</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Hekianthus annuum</i> <i>Savia Miltiorrhiza</i>
Zware metalen	betalains Tropane alkaloids	<i>Beta vulgaris</i> <i>Brugmansia candida</i>
Koude stress	suikeralcoholen jasmonaat melatonine polyamines	<i>alle planten</i> <i>Pinus pinaster</i> <i>Cucumis sativus L.</i> <i>Triticum aestivum L.</i>
hittestress	carotenoiden ginsenoside	<i>Brassicaceae</i> <i>P. quinquefolius</i>

Tabel 2: productie van secundaire metabolieten in verschillende plantensoorten als gevolg van zoutstress [29]

2.2.1.2 Waterstress;

Onder waterstress vallen zowel droogtestress als stress als gevolg van overvloedige hoeveelheden water. Naast zoutstress in waterstress door het veranderende klimaat, een van de meest bedreigende stress situaties voor de voedselproductie. Een overzicht van de metabolieten die verhoogd worden aangemaakt onder droogtestress staan weergegeven in tabel 2. Overvloedige hoeveelheden water (overstromingen) heeft voornamelijk invloed op de beschikbaarheid van zuurstof. Bij te weinig zuurstof moet er via een alternatieve route energie worden geproduceerd met als bijkomstigheid dat er toxische stoffen als bijproduct van deze alternatieve route geproduceerd worden hetgeen leidt tot stress.

2.2.1.3 Temperatuurstress:

Onder temperatuurstress wordt verstaan koude stress, warmtestress en sterke temperatuurschommelingen. Koudestress leidt over het algemeen tot de productie van suikeralkoholen, suikers en laagmoleculaire stoffen die als antivriesmiddel dienen. Ook leidt koudestress tot een verhoogde lignineproductie om de celwanden sterker te maken. Meer specifieke metabolieten die worden geproduceerd onder koude en warmtestress staan vermeld in tabel 2.

2.2.1.4 Lichtstress:

Een verhoogd lichtaanbod leidt over het algemeen tot de productie van beschermende pigmenten zoals anthocyanen. UV-licht (UV-B) leidt tot de productie van flavonoiden door een verhoogde activiteit van het enzym PAL (*zie ook 2.1.3.1.*)

2.2.1.5 Zware metalen

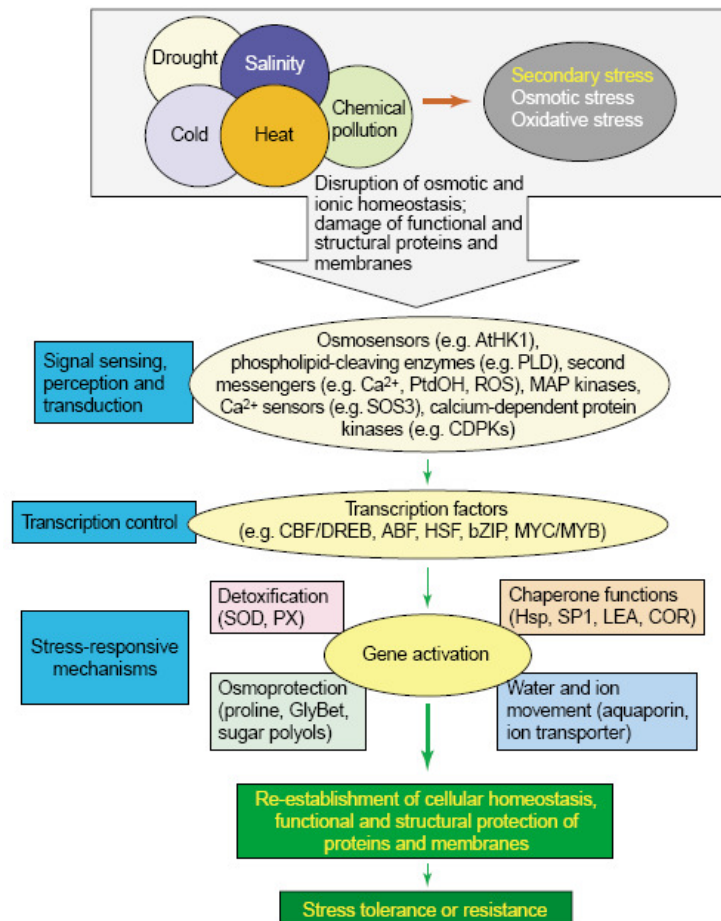
Zware metalen (ionen) zoals Nikkel, Cadmium, Ijzer, Koper, Zink, Mangaan in de bodem leidt tot de productie van verschillende detoxificerende metabolieten. Een overzicht is weergegeven in tabel 2.

Combinatie van bovenstaande stress situaties. Vaak vindt er een combinatie van bovenstaande stressfactoren plaats, bv zout en waterstress (bij overstromingen met zeewater), droogte en hittestress etc.

2.2.2 Inductie a-biotische stress resistentie:

Over het algemeen hebben planten die tolerant zijn tegen abiotische stress situaties een verhoogde productie van polyamines [29]. Behandeling met polyamines (spermine, putrescine) zou een mogelijkheid kunnen zijn om bij planten resistentie tegen abiotische stress te stimuleren. Behandeling van planten met MeJa wordt ook vaak genoemd als mogelijkheid om planten te beschermen tegen abiotische stressfactoren omdat MeJa betrokken is bij de productie van vele secundaire metabolieten (zie paragraaf 2.1.1.2.).

Veel genen betrokken bij de inductie van stresstolerantie bij abiotische stress zijn in kaart gebracht. Dit betreft genen die betrokken zijn bij detectie stress, signaaloverdracht, directe bescherming van vitale eiwitten en productie van secundaire metabolieten. Een overzicht staat weergegeven in figuur 8. Vandaar dat er veel veredelingsprogramma's zijn opgestart om planten te selecteren met een natuurlijke verhoogde expressie van dit soort genen. Omdat de nadruk in deze studie niet ligt op veredeling zal hier niet verder op worden ingegaan. Voor meer informatie wordt verwezen naar referentie 29.



Figuur 8. Globaal overzicht van genen/eiwitten betrokken bij verschillende stadia van abiotische stress tolerantie (ref 29)

3 Toepassingsmogelijkheden in de praktijk

In hoofdstuk 2 is een overzicht gegeven van de wetenschappelijke literatuur met betrekking tot mogelijkheden voor inductie `natuurlijke` plantweerbaarheid. Op basis van deze literatuurgegevens zullen in dit hoofdstuk enkele voorbeelden worden gegenereerd hoe natuurlijke weerbaarheid in de praktijk kan worden geïnduceerd.

3.1 Plantweerbaarheid met betrekking tot biotische stressfactoren

3.1.1 *Inductie van ISR*

Zoals in paragraaf 2.1.4. al is aangegeven is ISR (Induced Systemic Resistance) een van de meest veelbelovende manieren om plantweerbaarheid op een natuurlijke manier te induceren. Voornamelijk het primen van gewassen, waarbij een parallel getrokken kan worden naar het inenten bij mensen en dieren, is hierbij een interessant gegeven. Inductie van ISR in kan toegepast worden bij een breed scala aan gewassen (niet gewasspecifiek) en geeft volgens de geraadpleegde literatuurbronnen een plant-levenslange bescherming.

3.1.1.1 *Biologische Inductie van ISR*

Inductie van ISR kan via natuurlijke weg plaatsvinden, dwz via non-pathogene rhizobacteriën. Voorbeelden hiervan zijn stam EXTN-1 van *Bacillus amyloliquefaciens* (getest op modelplanten als tabak en Arabidopsis [30]), stam SE34 van *Bacillus pumulis* (tomaat), stam 89B-61 van *Pseudomonas fluorescens* (tomaat). Daarnaast zijn er ook voorbeelden beschreven van het gebruik van cultuurfiltraten van bacteriën zoals van *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora boehmeria*, en *Magnaporthe grisea* [30]. Ook zijn er goede resultaten bereikt met het dippen van plantmateriaal in *Pseudomonas fluorescens* [20]

3.1.1.2 *Niet biologische Inductie van ISR*

Er zijn een aantal stoffen bekend waarbij is aangetoond dat ze ISR induceren.

- hormonen (vnl. Jasmoonzuur, MeJA, Ethyleen)
- stoffen afkomstig uit bacteriën zoals lipopolysaccharides, sideroforen (pseudobactines, pyochelines), flagella [2]
- antibiotica: pyovcyanin, 2,4-diacetylphloroglucinol [2]
- metabolieten: N-acylhomoserine lactones, 2,3-butanediol [2]

3.1.1.3 *Inductie van ISR via fosfaten*

Het gebruik van fosfaten zoals K_2HPO_4 en KH_2PO_4 en K_3PO_4 leidt tot de activatie van het enzym PAL en daarmee tot de inductie van ISR. Behandeling met fosfaten was

succesvol bij komkommer ter bescherming tegen verschillende ziekten anthracnose door *Collectotrichum lagenarium* [31]. Bij komkommers geteeld op hydrocultuur leidde de toediening van 20 ppm fosfaat tot een 80-92% reductie van meeldauwinfectie. Behandeling van rijst met fosfaten leidde tot de reductie van de infectie door de schimmel *Pyricularia oryza* en een toename van de oogst tussen 12-32%. Behandeling van gerst met fosfaten leidde tot een 70% reductie van infectie door meeldauw en een toename van 12% in de oogst [31]

3.1.2 *Inductie van SAR*

Bij inductie van SAR zijn in tegenstelling tot ISR wel pathogenen betrokken die schadelijk zijn voor de plant. Daarnaast moet worden gerealiseerd dat de inductie van SAR (aanschakelen genen, eiwitten en metabolieten) de plant energie kost dit in tegenstelling tot ISR waar dat veel minder het geval is. Toch wordt in de literatuur de (gecontroleerde) inductie van SAR gezien als een van de mogelijkheden tot inductie van natuurlijke weerbaarheid. Net zoals bij ISR kunnen bij gecontroleerde inductie van SAR zowel organismen betrokken zijn als natuurlijke stoffen

3.1.2.1 *Biologische Inductie afweermecanisme (SAR)*

Een pathogene aanval leidt tot de inductie van het afweermecanisme SAR. Hierbij treedt er wel schade op op de plek van infectie die mogelijk ongewenst is. In de literatuur worden voorbeelden genoemd waarbij behandeling van planten door een combinatie van verzwakte pathogenen samen met het signaalmolecuul salicylzuur een synergistisch effect heeft op de inductie van SAR met verminderde schade aan het gewas.

3.1.2.2 *Niet biologische inductie van SAR*

Er zijn tal van stoffen zonder tussenkomst van pathogenen SAR kunnen induceren. Elicitors van schimmels (bv gistextract) celwandpolymeren van schimmels en bacteriën en stoffen die het effect van SA nabootsen worden vaak in de literatuur genoemd. Enkele belangrijke voorbeelden zijn:

BABA (β -hydroxyboterzuur) is een van deze stoffen. Behandeling van tomaat, peper en tabak met BABA die leidt tot de productie van PR (pathogen related) eiwitten die betrokken zijn het afweermecanisme tegen pathogenen alsmede de productie van chitinase en glucanase [31].

Benzothiadiazole is een synthetische stof die SAR kan induceren als alternatief voor het spuiten van fungiciden tegen schimmels zoals meeldauw [32]. Benzothiadiazole wordt al grootschalig toegepast en is commercieel verkrijgbaar onder de naam BION.

Oligosaccharide zoals N-acetylchito-oligosaccharides en β -1,3-glucans werken als elicitors en kunnen op gewassen als spray worden aangebracht. Bij tomaat leidde behandeling met deze stoffen tot een verhoogde bescherming tegen kroon- en wortelrot en bij zaailingen tot bescherming tegen *Fusarium oxysporum* [31]. Dit soort producten is ook commercieel te koop (chitosan; Glycogenesys Inc. (Boston)).

3.1.3 *Verwonding van de plant*

Bij verwonding van de plant wordt vraat van predators nagebootst. Zoals in Hoofdstuk 2 al is beschreven leidt verwonding tot de productie van Jasmoonzuur en het vluchtige

MeJA als signaalmolecuul voor andere plantendelen waarbij beschermende secundaire metabolieten worden geproduceerd en/of stoffen die andere organismen aantrekken om de predators te verjagen of te doden (“cry for help”). Vluchtige componenten. In de praktijk zouden planten stelselmatig op een lichte manier kunnen worden verwondt om het afweermechanisme van de plant zelf aan te schakelen. Een andere optie zou zijn om enkele planten van een populatie op te offeren waardoor bescherming van andere planten plaats kan vinden via de vluchtige signaalmoleculen. Dit zou ook bereikt kunnen worden door het vernevelen van MeJa of MeSa boven een gewas.

3.2 Plantweerbaarheid met betrekking tot a-biotische stressfactoren

3.2.1 *Behandeling met biocontrolfungi*

Er is aangetoond dat de zogenaamde biocontrol fungi (BCF) zoals *Trichoderma* soorten (harzianum, en T22) en *Sebacinales* soorten planten weerbaarder kunnen maken voor a-biotische stress situaties zoals zoutstress, droogtestress, temperatuurstress en osmotische stress [8]. Bij o.a. tomaat en maïs werd aangetoond dat behandeling van zaden of de grond met *Trichoderma harzianum* resulteerde in een verhoogde resistentie tegen droogtestress [8]. Planten waarvan de bladeren behandeld waren met *Piriformaspora indica* bleken weerbaarder tegen zoutstress [8]. Maïsplanten en tomatenzaden behandeld met *Trichoderma harzianum* bleken ook een verhoogde resistentie te hebben tegen warmte en koude stress [8].

3.2.2 *Behandeling met zwavel*

Zwavel: Tijdens biotische en a-biotische stress situaties worden er zwavelhoudende afweer- componenten gemaakt (SDC's: **S**ulfur-containing **D**efence **C**ompounds) geproduceerd via de o.a. jasmonaat signaal route [9]. Onder deze SDC's vallen eiwitten zoals Glutathione (GSH) en secundaire metabolieten zoals bv de glucosinolaten.. GSH is belangrijk om de plant te beschermen tegen reactieve zuurstofmoleculen (Reactive oxygen species; ROS) die geproduceerd als response op een aanval van plant pathogenen. Glucosinolaten (o.a. bekend uit koolsoorten (Brassicaceae) zijn belangrijke moleculen bij de verdediging tegen plant pathogenen. Glucosinolaten worden bij de aanval door het zwavelhoudende eiwit glucosinolaat-thioglucosidase omgezet in veelal vluchtige secundaire metabolieten met een antimicrobiële werking zoals, isothiocyanaten, thiocyanaten, oxazolidine-2-thiones en nitril-en epithionitril-achige stoffen [9]. Naast glucosinolaten worden er ook zwavelhoudende phytoalexines geproduceerd zoals brassinine en camelexine [9]. Experimenten hebben aangetoond dat in koolgewassen met zwaveltekort meer pathogene infecties voor komen terwijl bij verhoogd zwavelaanbod bij de teelt van raapzaadoliegewassen juist leidt tot verminderde pathogene infectie [9].

3.2.3 *Cross-tolerance bij signaaltransductieroutes a-biotische stress*

Het fenomeen cross tolerance heeft betrekking op het feit dat signaaltransductieroutes die geïnduceerd worden door a-biotische stress niet specifiek zijn voor één bepaalde

stress-situatie. Van deze mogelijkheid kan gebruik worden gemaakt. Mocht bij zoutstress dezelfde signaaltransductieroute worden geïnduceerd als bij waterstress dan kunnen planten die tolerant zijn voor waterstress door gecontroleerde toediening van waterstress ook tolerant gemaakt worden voor zoutstress.

4 Conclusie

In de literatuur is erg veel informatie beschikbaar over secundaire metabolieten in relatie tot plant weerbaarheid. Deze literatuur is veelzijdig van aard. Veel literatuur betreft onderzoek naar specifieke effecten van specifieke stress situaties op specifieke modelgewassen zoals *Arabidopsis*, tabak en tomaat. Uitgaande van de literatuur lijken er prima praktijkkansen te zijn voor het verhogen van de plantweerbaarheid door middel van inductie van het secundaire metabolisme. Het ontwikkelen van praktijktoepassingen met betrekking tot inductie van ISR en SAR lijken hierbij veruit het meest belovend.

In Nederland is veel hoogwaardige kennis en expertise aanwezig met betrekking tot ISR en SAR. Nederland is ook de grondlegger van het onderzoek naar ISR (prof. van Loon, Universiteit Utrecht). Interessant is dat bijvoorbeeld in Brazilië (land met een zeer sterk groeiende en grote opkomende economie) grootschalig wordt ingezet op het verhogen van de plantweerbaarheid via ISR. In Nederland is momenteel een grootschalig onderzoek gaande naar substraten die de plantweerbaarheid verhogen (gefinancierd door Productschap Tuinbouw) waarbij het gebruik van bacteriën die ISR induceren ook als een van de aandachtsvelden in het onderzoek zal worden meegenomen [33].

Inmiddels zijn er ook tal van producten op de markt die ISR of SAR induceren. Een van de belangrijkste daarvan is BION (werkzame stof benzothiadiazole). Ondanks het groot aantal wetenschappelijke publicaties over ISR en SAR en de producten die op de markt zijn voor inductie van ISR en SAR is het inzicht wat er precies in de plant gebeurt en hoe dat vertaald kan worden naar betrouwbare praktijktoepassingen nog beperkt. Het zou zeer wenselijk zijn dat er via een gericht onderzoek meer duidelijkheid komt hoe goed de verschillende producten, die plantweerbaarheid induceren via ISR of SAR, in een praktijksituatie scoren en hoe de efficiëntie zich verhoudt ten opzichte van de efficiëntie van reguliere bestrijdingsmiddelen. Dit zou de teler meer vertrouwen moeten geven in het gebruik van zo'n product. Hierbij kan worden gedacht aan een wetenschappelijke studie, waarbij het effect van een aantal reeds bestaande ISR of SAR inducerende middelen op moleculair niveau wordt bestudeerd (welk effect heeft het op de verschillende genen en secundaire metabolieten die een rol spelen bij plantweerbaarheid en hoe generiek is het mechanisme) gekoppeld aan een praktijkstudie waarbij de kennis uit de wetenschappelijke studie in de praktijk wordt getoetst.

5 Referenties

1. Vlot AC, Klessig DF, Park S-W: Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr Opin Plant Biol* 2008, 11:436-442.
2. Van Loon LC: Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 2007, 119:243-354.
3. Shah J., Plants under attack: systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology* 2009, 12:459-464
4. Lee GI, Howe GA: The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant J* 2003, 33:567-576.
5. Heil M, Silva Bueno JC: Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proc Natl Acad. Sci U S A* 2007, 104:5467-5472.
6. Janeway CA, Jr, Medzhitov R (2002) *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
7. Huffaker A, Ryan CA: Endogenous peptide defense signals in Arabidopsis differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:10732-
8. Shores M., Harman GE, Mastouri, F. Induced Systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents (2010) *Annu.Rev.Phytopathol.* 48:21.
9. Rausch T, Wachter A. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. (2005) *Trends Plant Sci* 10; 503
10. Pateraki I, Kanellis AK Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* subs. *creticus*. (2010) *Plant Cell Rep.* 29:629
11. Kunz BA, Cahill, DM, Mohr, PG, Osmond, MJ, Vonarx EJ. Plant responses to UV radiation and links to pathogen resistance. (2006) *Int. Rev. Cytol.* 255; 1
12. La Camera S, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz Y Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. (2004) *Immunol. Rev.* 198; 267
13. Shadle GL, Wesley SV, Korth KL, Chen F, Lamb C, Dixon RA. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 2003;64:153-161.
14. Corey D. Broeckling1, David V. Huhman1, Mohamed A. Farag1, Joel T. Smith2, Gregory D. May1,
15. Broeckling CD, Huhman DV, Farag MA, Smith JT, May GD, Mendes P., Dixon RA, Sumner LW Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. (2004) *J. Exp.Botany*, Vol. 56; 325
16. Schiavon M, Pizzeghello D, Muscolo A, Vaccaro S, Francioso O, Nardi S. High Molecular Size Humic Substances Enhance Phenylpropanoid Metabolism in Maize (*Zea mays* L.). (2010) *J Chem Ecol* 36:662.
17. Turner GW, Cuthbertson DJ, Voo S, Settles ML, Grimes, HD, Lange BM. Experimental sink removal induces stress responses, including shifts in amino acid and phenylpropanoid metabolism, in soybean leaves (2012). *Planta* 235:939
18. Ferri M., Righetti L, Tassoni A. Increasing sucrose concentrations promote phenylpropanoid biosynthesis in grapevine cell cultures (2011) *J. of Plant Physiology* 168: 189
19. Pontin MA, Piccoli PN, Francisco R, Bottini R, Martinez-Zapate JM, Lijavetzky D Transcriptome changes in grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaves induced by ultraviolet-B radiation (2010). *BMC Plant Biology* 10:224
20. Kandan A, Commare RR, Nandakumar R, Ramiah M, Raguchander T, Samiyappan R Induction of phenylpropanoid metabolism by *Pseudomonas fluorescens* against tomato spotted wilt virus in tomato (2002). *Folia Microbiol (Praha)*. 47(2):121

21. Graham TL, Graham MY Signaling in Soybean Phenylpropanoid Responses. (1996) *Plant Physiol.* 110: 1123
22. Steinbrenner J, Linden L. Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control (2003) *Plant Molecular Biology* 52: 343.
23. Avdiushko S, Croft KPC, Brown CC, Jackson M, Hamilton-Kemp TR, Hildebrand D. Effect of Volatile Methyl Jasmonate on the Oxylinin Pathway in Tobacco, Cucumber, and Arabidopsis (1995) *Plant Physiol.* 109: 1227.
24. Bleichert, S. Brodschelm W., Holder, S., Kammerer L., Kutchan, TMn Mueller MJ, Xia Z-Q, Zenk MH. The octadecanoic pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. (1995) *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 92:4099
25. Koch T, Krumm T, Jung V, Engelberth J Boland W Differential Induction of Plant Volatile Biosynthesis in the Lima Bean by Early and Late Intermediates of the Octadecanoid-Signaling Pathway (1999) *Plant Physiology*, 121: 153
26. Siqueira-Junior CL, Jardim BC, Urmenyi TP, Vicente ACP, Hansen E Otsuki K, da Cunha M Madureira HC de Carvalho DR, Jacinto T. Wound response in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) plants: gene characterization of a novel chloroplast-targeted allene oxide synthase up-regulated by mechanical injury and methyl jasmonate (2008) *Plant Cell Rep* 27:387
27. Cipollini D, Heil M. Costs and benefits of induced resistance to herbivores and pathogens in plants. (2010) *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 5: No 005.
28. Ramakrishna A, Ravishankar GA Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants (2011) *Plant Signaling & Behavior* 6: 1720
29. Vinocur B and Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations (2005) *Current Opinion in Biotechnology* 16:123
30. Loebenstein G Local lesions and induced resistance. (2009) *Advances in Virus Research*, 75:73
31. Walters D, Walsh D, Newton A, Lyon G. Induced Resistance for Plant Disease Control:Maximizing the Efficacy of Resistance Elicitors. (2005). *Phytopathology* 95:1368
32. Pertot I, Fiamingo F, Elad Y. Evaluation of disease control provided by the SAR inducer benzothiadiazole (BION) in strawberry. *ISHS Acta Horticulturae* 807: International Symposium on Strategies Towards Sustainability of Protected Cultivation in Mild Winter Climate.
33. Wurff A, Blok C, Janse J, Messelink G, Hofland-Zijlstra J, Driever S, Staaij M, Postma J, Wubben J, Bij de Vaate J, Holtman W Oppedijk B. Weerbaar Substraat Rapport GTB-1119 (2011) Wageningen UR / Productschap Tuinbouw.

