

Oran 11119 JNN 2903

112 546

964

Landbouwuniversiteit

duurzame
resistentie tegen
pathogenen via
genetische
modificatie

door prof. dr. ir. P.J.G.M. de Wit

ORANJES

23 SEP 1991

CL. KANON

71250

DUURZAME RESISTENTIE TEGEN PATHOGENEN VIA GENETISCHE MODIFICATIE

door prof.dr.ir. P.J.G.M. de Wit



**Inaugurele rede uitgesproken op 17 oktober 1991
bij de aanvaarding van het ambt van Hoogleraar in de
Fytopathologie, in het bijzonder de fysiologische
aspecten, aan de Landbouwniversiteit Wageningen.**

DUURZAME RESISTENTIE TEGEN PATHOGENEN VIA GENETISCHE MODIFICATIE

utopie of werkelijkheid voor de gewasbescherming in
het jaar 2000?

Mijnheer de rector magnificus, dames en heren,

Inleiding

Het doet mij veel genoegen deze rede, ter gelegenheid van de aanvaarding van de leeropdracht "Fytopathologie in het bijzonder de fysiologische aspecten", uit te spreken in het jaar dat de "Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging", sinds april "Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging", 100 jaar bestaat.

Door de meeste fytopathologen in Nederland wordt professor Ritzema Bos gezien als de grondlegger van de planteziektenkunde, in het bijzonder de fytopathologie. Jan Ritzema Bos nam met Hugo de Vries in het jaar 1891 het initiatief tot de oprichting van de Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging, een van de oudste verenigingen op dit terrein. Het universitair onderwijs en onderzoek in de planteziektenkunde vangt aan in 1895, wanneer Ritzema Bos wordt benoemd tot directeur van de stichting Phytopathologisch Laboratorium, "Willie Commelin Scholten" en in datzelfde jaar het initiatief neemt tot het uitgeven van het "Tijdschrift over Planteziekten", het huidige "Netherlands Journal of Plant Pathology". In 1906 komt hij naar Wageningen en wordt hoofd van het "Instituut voor Phytopathologie" van de toenmalige Rijks Hogere Land- Tuinbouw- en Bosbouwschool. In Wageningen is de Ritzema Bos weg naar hem genoemd. Ik ga U vanmiddag geen historisch overzicht van de fytopathologie geven, dat hebben collegae voor mij gedaan (Dekker, 1974; Zadoks, 1991). Ik zal mij

beperken tot een kort overzicht en vervolgens enkele, naar mijn mening belangrijke, ontwikkelingen in de fysiologische en moleculaire fytopathologie belichten. Ik zal een brug proberen te slaan tussen fundamenteel fytopathologisch onderzoek en mogelijke toepassingen van dit onderzoek voor de gewasbescherming in de toekomst.

Fytopathologie

Fytopathologie is afgeleid van Griekse woorden *phuton*, *pathos* en *logos*, hetgeen direct vertaald betekent: "De leer over het lijden van de plant". In de praktijk komt dit er op neer dat de fytopathologie zich bezig houdt met de bestudering, bestrijding en preventie van planteziekten. Aanvankelijk werden alle veroorzakers van planteziekten tot het vakgebied van de fytopathologie gerekend. In de inaugurele rede van Ritzema Bos, bijna honderd jaar geleden, waren drie pagina's gewijd aan de omschrijving van het vakgebied van de "Phytopathologie". In zijn leeropdracht stonden alle veroorzakers van ziekten en plagen vermeld: virussen, bacteriën, schimmels, nematoden, insecten en abiotische factoren. Ziekten en plagen veroorzaken mondiaal oogstverliezen van 30 tot 40 procent, hetgeen het maatschappelijk belang van gewasbescherming meteen aangeeft. Voor het in stand houden en verbeteren van de wereldvoedselproductie is gewasbescherming essentieel. Momenteel houdt de vakgroep Fytopathologie zich voornamelijk bezig met planteziekten veroorzaakt door schimmels en bacteriën. Ziekten veroorzaakt door insecten, nematoden en virussen worden bij respectievelijk de vakgroepen Entomologie, Nematologie en Virologie bestudeerd.

De vakgroep Fytopathologie van de Landbouw- universiteit is de enige vakgroep in het Nederlandse universitaire bestel die zich uitsluitend met fytopathologisch onderzoek bezighoudt. Het is betreuenswaardig dat het eerder genoemde Phytopathologisch Laboratorium "Willie Commelin Scholten" te Baarn, juist dit jaar ophoudt te bestaan. Het fytopathologisch onderwijs en onderzoek wordt voortgezet in de vorm van zogenaamde "Project- groepen Fytopathologie" van respectievelijk de vakgroepen Moleculaire Celbiologie van de Universi- teit van Amsterdam, en Botanische Oecologie en Evolutiebiologie van de Rijksuniversiteit Utrecht.

In een eeuw tijd heeft de fytopathologie zowel in Nederland als mondiaal stormachtige ontwikkelingen doorgemaakt. Het tijdperk van Ritzema Bos is er één van beschrijving en indeling der ziekten en wordt sterk beheerst door de mycologie en bacteriologie. De klassieke fytopathologie heeft zijn bloeitijd achter de rug maar blijft belangrijk voor de hedendaagse fytopathologie, daar er door het toenemende inter- nationale verkeer en handel in land- en tuinbouw- produkten, siergewassen, zaaizaad en pootgoed, jaarlijks weer nieuwe ziekten de kop opsteken. In de zestiger jaren kwam de nadruk in het onderzoek en onderwijs meer en meer te liggen op de interactie en vooral de reactie van de waardplant op pathogenen, met als doel hieruit belangrijke aanwijzingen ter bestrijding van de ziekteverwekkers te verkrijgen. De bestudering van de interactie van het pathogeen met zijn waardplant is sterk discipline-gericht, doch het zal iedereen duidelijk zijn dat men bij preventie en bestrijding van planteziekten zal moeten samenwerken met alle gewasbeschermingsdisciplines inclusief de

entomologie, de nematologie en de virologie. In de praktijk wordt eenzelfde plant immers vaak aangetast door alle eerder genoemde pathogenen en plaagverwekkers.

Schimmel- en bacterieziekten

Voor degenen onder U, die niet of nauwelijks met fytopathologische problemen te maken hebben, zal ik enkele schimmel- en bacterieziekten de revue laten passeren. De wereldberuchte aardappelziekte en de iepeziekte worden veroorzaakt door schimmels.

De aardappelziekte wordt veroorzaakt door *Phytophthora infestans*, een pathogeen dat uit Centraal Amerika afkomstig is, doch in West-Europa pas enkele eeuwen na de introductie van de aardappel uit Zuid-Amerika de kop opstak. De schimmel veroorzaakte in 1845 in West-Europa een zodanig grote epidemie dat er op vele plaatsen hongersnood uitbrak. Vooral in Ierland was de aantasting dramatisch. Vele Ieren emigreerden in die tijd naar Noord-Amerika. Dat de ziekte veroorzaakt werd door de schimmel *Phytophthora infestans* werd pas in 1876 door de Duitse onderzoeker De Bary met zekerheid aangetoond. Sinds 1845 hebben we met deze ziekte leren leven. Zij vraagt nog steeds veel aandacht in de aardappelteelt (Ingram and Williams, 1991) en is op de vakgroep Fytopathologie ook onderwerp van studie.

De iepeziekte is een ander voorbeeld van een schimmelziekte. De ziekte heeft in het buitenland de naam "Dutch elm disease" gekregen, aangezien de symptomen van de ziekte in Nederland voor het eerst werden beschreven door de vrouwelijke fytopathologen Spierenburg en Schwarz, van wie de laatste in 1922

aantoonde dat *Graphium ulmi* de ziekteverwekker is. Nadien hebben nog 5 andere Nederlandse vrouwelijke fytopathologen waaronder professor Westerdijk en Kerling, aan dit pathogeen onderzoek verricht (Holmes en Heybroek, 1990). De schimmel heeft het iepbestand in Nederland zeer sterk gereduceerd en vormt tegenwoordig nog steeds een groot probleem.

Kroongal of de wortelknobbelziekte wordt veroorzaakt door de bacterie *Agrobacterium tumefaciens*. De ziekte is in Nederland van ondergeschikt belang in tegenstelling tot de zojuist genoemde schimmelziekten. De bacterie is echter in staat op zeer efficiënte wijze DNA over te brengen naar het genoom van vooral dicotyle planten. Diepgaand onderzoek aan deze bacterie (Nester en Gordon, 1991) heeft ertoe geleid dat deze ziekteverwekker inmiddels gemodificeerd kan worden tot een organisme dat van groot nut is bij het overbrengen van gewenste genen in het moderne gewasbeschermings- en (resistentie)veredelingsonderzoek.

Dit zijn slechts enkele voorbeelden. Er zijn in Nederland zeer veel schimmel- en bacterieziekten die problemen veroorzaken in de hedendaagse land- en tuinbouw en die onze aandacht vragen. Omdat ze enorme schade kunnen veroorzaken aan gewassen op het veld of na de oogst, is het voor de praktijk belangrijk te weten hoe ze bestreden kunnen worden. Het onderzoek levert daaraan een belangrijke bijdrage.

Cultuurmaatregelen

De ontwikkeling van effectieve maatregelen om planteziekten te bestrijden verliep aanvankelijk zeer

traag, hetgeen verband hield met de zeer beperkte kennis aangaande ziekteverwekkers. De bestrijding was beperkt tot sanitaire- en teeltmaatregelen, waarbij het toepassen van braaklegging, een ruime vruchtwisseling, het opruimen van aangetast plantmateriaal en het gebruiken van gezond zaaizaad en pootgoed genoemd moeten worden. Vele van deze maatregelen waren reeds in gebruik lang voordat men er zich van bewust was dat ziekten veroorzaakt werden door pathogenen. Literatuur over cultuurmaatregelen ter preventie van planteziekten is moeilijk toegankelijk. Dat cultuurmaatregelen belangrijk zijn is echter onomstotelijk vastgesteld. Vele cultuurvolkeren zoals bijvoorbeeld de Inca's hadden reeds wetten met betrekking tot braaklegging en vruchtwisseling om misoogsten van bepaalde gewassen zoals aardappel te voorkomen. De gebruiken werden van generatie op generatie doorgegeven. Cultuurmaatregelen zijn ingebed in de hedendaagse landbouwpraktijk en krijgen weer extra aandacht met de opkomst van de oecologische en biologisch-dynamische landbouwmethoden (Palti, 1981).

Chemische bestrijding

Het onderzoek naar chemische middelen ter preventie en bestrijding van pathogenen heeft een lange historie. Omdat insecten en andere dieren reeds lang als beschadigers van planten bekend waren, werd hiertegen al vroeg naar een effectieve wijze van bestrijding gezocht. Zo is het niet vreemd dat de eerste pesticiden insecticiden waren. In de Verenigde Staten wordt de Coloradokever al vanaf 1875 chemisch bestreden. Het duurde aanzienlijk langer voordat schimmels en bacteriën als ziekteverwekkers onderkend

werden, en er gericht gezocht kon worden naar fungiciden en bactericiden. Het eerste fungicide werd per toeval ontdekt door Millardet in Frankrijk. Hij wilde diefstal van druiven voorkomen door ze een onaantrekkelijke kleur te geven. Hiervoor besproeide hij de druiveranken met de beroemd geworden Bordeauxse pap, een mengsel van kopersulfaat en ongebluste kalk. Dat bleek niet alleen effectief te zijn tegen diefstal maar ook tegen aantasting door de valse meeldauw van de druif. Op plaatsen waar het middel aangebracht was, werden de druiven niet aangetast. In 1885 werd het middel reeds in de praktijk toegepast. Tot de dertiger jaren werden vooral contactfungiciden gebruikt met preventieve werking en een breed werkingsspectrum. Een expansie van het gebruik van fungiciden vond plaats na de tweede wereldoorlog. De laatste decennia zijn zeer veel specifieke systemische middelen op de markt gebracht die niet alleen preventief doch ook vaak curatief werken. Tot eind zestiger begin zeventiger jaren leek het er op dat resistentie tegen fungiciden minder snel optrad dan resistentie tegen insecticiden, maar sinds de introductie van specifiek werkende middelen, die meestal minder milieubelastend zijn, is ook resistentie tegen fungiciden snel opgetreden (Dekker, 1987). Toepassing van chemische bestrijdingsmiddelen op grote schaal en het toenemend publieke bewustzijn aangaande risico's voor de leefomgeving, stelden aanvankelijk vooral het gebruik van insecticiden in een kwaad daglicht. Later ondergingen zeer veel bestrijdingsmiddelen inclusief fungiciden, bactericiden en nematociden hetzelfde lot. Zelfs zeer eenvoudige verbindingen zoals derivaten van aminozuren en fosforigzuur, die de natuurlijke resistentie

van de plant verhogen, worden over één kam geschoren met persistente verbindingen, ook wanneer volkomen duidelijk is dat er geen schadelijke effecten zijn voor het milieu. In het meerjarenplan gewasbescherming wordt gestreefd naar een drastische reductie van het gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen. Er ligt hier duidelijk een probleem. Enerzijds wordt optimale produktie en hoge kwaliteit in de land- en tuinbouw nagestreefd om te kunnen concurreren met de ons omringende landen, anderzijds moet er een duidelijke grens gesteld worden aan de toenemende belasting van het milieu door bestrijdingsmiddelen nu en voor de verdere toekomst. De wetgeving omtrent het gebruik van bestrijdingsmiddelen en het verbod op vele van deze verbindingen hebben de laatste jaren het gericht zoeken naar nieuwe methoden van bestrijding gestimuleerd. Ik moet hierbij vooral biologische bestrijding en de moderne resistentieveredeling tegen pathogenen en plaagverwekkers middels genetisch modificatie noemen, waarvoor ik een grote toekomst weggelegd zie.

Resistentieveredeling

De resistentieveredeling is een zeer belangrijke zo niet de belangrijkste component bij de preventie en bestrijding van ziekten. Reeds 372 jaar voor Christus werd door Theophrastus beschreven dat planten van dezelfde soort een verschillende graad van aantasting te zien gaven voor een bepaalde "ziekte". Door de Engelsman Knight werd in 1795 waargenomen dat sommige tarwehybriden, die hij via kruising verkregen had, veel minder aantasting door "blight" (vermoedelijk *Puccinia striiformis*, de veroorzaker van gele roest) vertoonden dan een deel van het uitgangsmateriaal.

Darwin ontdekte in 1868 hetzelfde fenomeen bij uien die door de schimmel *Colletotrichum circinans* aangetast waren. De opmars van de resistentieveredeling ontstond pas toen algemeen onderkend werd dat planteziekten door schimmels, bacteriën en virussen veroorzaakt konden worden. Hoewel de wetten van Mendel reeds in 1866 gepubliceerd waren, duurde het nog tot 1905, door het baanbrekende werk van Biffen (Biffen, 1905), voordat het besef begon door te dringen dat resistentie door kruising overgebracht kon worden en dat de ingebrachte resistentiegenen gehoorzaamden aan de wetten van Mendel. De reden voor deze opmars is duidelijk: resistentie vererft eenvoudig en de introductie in planten is rechttoe rechtaan. De bescherming kon ingekruist worden en hoefde niet steeds opnieuw toegediend te worden zoals een bestrijdingsmiddel. Sinds het pionierswerk van Biffen zijn er duizenden publikaties verschenen over resistentie tegen ziekten in vrijwel elk economisch belangrijk gewas. Aanvankelijk dacht men dat elke ziekte op deze manier beteugeld zou kunnen worden. Zo was Biffen ervan overtuigd dat resistentie niet doorbroken zou kunnen worden omdat de schimmel te langzaam zou zijn om het werk van de resistentieveredelaars te niet te doen. Echter door het onderzoek van Stakman en medewerkers (Stakman et al., 1918) werd duidelijk dat resistentie doorbroken kon worden door varianten van de ziekteverwekker die later bekend werden als fysiologische rassen, kortweg fysio's genoemd. Sindsdien is er een wedloop ontstaan tussen cultuurplanten en hun pathogenen die ook wel bekend staat als de "boom and bust" cyclus. Hieruit krijgt U misschien de indruk dat resistentieveredeling geen oplossing biedt voor duurzame gewasbescherming, doch ik zal trachten U ervan te

overtuigen dat er grote mogelijkheden zijn weggelegd voor de resistentieveredeling in de toekomst.

De plantenveredeling heeft zich na de tweede wereldoorlog vooral toegelegd op produktieverhoging en kwaliteitsverbetering van gewassen en in veel mindere mate op resistentie tegen ziekten en plagen. Voor een deel is deze geringe aandacht wellicht te wijten aan de ontmoedigende "boom and bust" cyclus. Mijns inziens is er echter te weinig fundamenteel onderzoek gedaan aan resistentiemechanismen in planten tegen pathogenen, waarvan de resistentieveredeling juist gebruik had kunnen maken. Zo berust de resistentie in planten die geleid heeft tot de "boom and bust" cyclus vaak op overgevoelighedsresistentie. Uit mijn latere betoog zal duidelijk worden dat bestudering van afweermechanismen in planten tegen pathogenen, in het bijzonder de overgevoelighedsreactie, nieuwe mogelijkheden biedt voor de moderne gewasbescherming, en dit zal wellicht in de toekomst leiden tot een vorm van duurzame resistentie tegen pathogenen.

Gen-om-gen relatie

Het is duidelijk dat het gebruik van pesticiden en van resistente planten diepgaande consequenties gehad heeft en nog steeds heeft op de genetische constitutie van de pathogeenpopulatie. Ieder fytopatholoog en veredelaar weet dat de natuur op alles een antwoord heeft. Hier is de uitdrukking van toepassing: "Al is de fytopatholoog of de veredelaar nog zo snel het pathogeen achterhaalt haar/hem wel".

Dit was ongeveer de stand van zaken toen ik begin

zeventiger jaren kennis maakte met de fytopathologie en professor Dekker mij in 1974 in de gelegenheid stelde onderzoek te gaan doen naar de fysiologische en biochemische achtergrond van plantpathogeen-relaties, een zeer boeiend terrein van onderzoek in de fytopathologie.

Het was professor Oort die reeds tijdens de tweede wereldoorlog een publikatie deed verschijnen in het eerder genoemde Tijdschrift over Planteziekten, waarbij de co-evolutie tussen tarwe en de schimmel *Ustilago tritici* beschreven werd in termen van een gen-om-gen relatie (Oort, 1944). Oort heeft voor zijn baanbrekende werk nooit de internationale erkenning gekregen die hij verdiende. Een verklaring hiervoor is wellicht gelegen in het feit dat zijn vinding tijdens de tweede wereldoorlog in een Nederlandstalig tijdschrift werd gepubliceerd. Het zijn de genetische studies van Flor in 1942 en daaropvolgende jaren aan vlas en de vlasroestschimmel *Melampsora lini* waaruit de internationaal bekende gen-om-gen hypothese is voortgekomen (Flor, 1942). Het boek "Genetics of Host-Parasite Interactions" van Day (Day, 1974) heeft grote invloed gehad op mijn fytopathologisch denken in de zeventiger jaren. Het was voor mij verassend te vernemen - ik was toen al enige jaren met mijn promotieonderzoek aan *Cladosporium fulvum* bezig - dat de geneticus Day zijn promotieonderzoek eveneens had verricht aan de imperfecte schimmel *Cladosporium fulvum*. Hiermee heeft hij nooit de elegante genetische studies van Flor kunnen uitvoeren. Toen ik zijn publikaties las besepte ik pas terdege welke grote obstakels ik tijdens mijn promotieonderzoek nog tegen zou komen, maar ik was niet van plan mij van mijn stuk te laten brengen en vastbesloten met deze

schimmel door te gaan. Professor Dekker had mij in 1974 de vrijheid van onderwerpkeuze gegeven, maar dat legde tegelijkertijd een grote verantwoordelijkheid op mijn schouders, want een mislukking had ik aan mijzelf te wijten. Ik stelde mij als doel de fysiologisch-biochemische en moleculaire achtergrond van de gen-om-gen interactie te ontrafelen, met in het achterhoofd de wetenschap dat de ontrafeling van deze interactie wellicht nieuwe mogelijkheden zou bieden voor preventie en bestrijding van plantepathogene bacteriën en schimmels.

De moleculaire basis van gen-om-gen relaties

Vele onderzoekers, en ik was één van hen, dachten aanvankelijk dat het vrij eenvoudig zou zijn om de moleculaire basis van de gen-om-gen relatie te ontrafelen. Zij werden in hun onderzoek echter vaak beperkt door het gewas waaraan zij uit praktische overwegingen hun onderzoek richtten. Sommigen werkten met obligate parasieten, anderen met imperfecte schimmels of met schimmels waarvan nauwelijks iets over de genetische achtergrond bekend was. Ook de waardplant kon problemen geven zoals lange generatietijden of weinig gegevens over de genetische achtergrond.

De gen-om-gen relatie geeft de eenvoudigste verklaring voor de resultaten die werden verkregen uit kruisingsproeven met de vlasroestschimmel en cultivars van vlas met verschillende resistentiegenen voor vlasroest. Uit kruisingsproeven tussen fysio's met een verschillend avirulentiespectrum bleek dat een avirulent fysio aanleiding gaf tot een overgevoeligheidsreactie op vlascultivars met een bij-

passend of complementair resistentiegen. Voor elk resistentiegen in de waardplant heeft het pathogeen een complementair avirulentiegen dat na interactie met het resistentiegen aanleiding geeft tot een overgevoeligheidsreactie. De overgevoeligheidsreactie is een van de meest voorkomende afweersystemen die in planten werkzaam zijn tegen pathogenen zoals virussen, bacteriën, schimmels en nematoden. In tegenstelling tot circulerende antilichamen in vertebraten is actieve afweer in planten meestal gelokaliseerd, waarbij zeer snelle afsterving van waardplantcellen optreedt rond de penetratieplaats van het pathogeen. Deze dode cellen hoeven niet per se verantwoordelijk te zijn voor groeiremming van het pathogeen. Zij dienen vaak als een reservoir voor de ophoping van antibiotische stoffen, terwijl er in de levende cellen rondom de dode cellen vaak callosevorming, lignificatie en accumulatie van pathogenesegerelateerde eiwitten zoals chitinases en glucanases optreden (Joosten en de Wit, 1989; Scheel en Parker, 1990; Mansfield, 1986). De overgevoeligheidsreactie kan dus gezien worden als de eerste respons die gevolgd wordt door een cascade van andere afweerreacties. Avirulentiegenen van fysio's van bacteriën of schimmels coderen voor fysio-specifieke elicitors, die verantwoordelijk zijn voor de initiatie van de overgevoeligheidsreactie (Keen, 1990; Keen et al., 1991; Bent et al., 1991). Tegenover avirulentie staat virulentie die meestal recessief vererft. Om aan het surveillancesysteem van de plant te ontkomen moet het pathogeen avirulentiegenen verliezen of recessieve genen bezitten die coderen voor moleculen die voor het surveillancesysteem van de plant onherkenbaar zijn. In vertebraten-termen zou dit vertaald kunnen worden als het verlies van immunogene determinanten

bij het pathogeen waardoor het de waardplant onopgemerkt kan parasiteren (Pryor, 1987). Dit betekent echter niet dat de overgevoeligheidsreactie niet meer zou functioneren. Het is misleidend om over doorbreking van resistentie te spreken. Resistentie wordt niet doorbroken doch de overgevoeligheidsreactie wordt niet meer geïnduceerd. Een pathogeen kan zeer vele avirulentiegenen en bijgevolg -om in de terminologie van vertebraten te blijven- ook vele antigene determinanten bezitten die in de waardplant door evenzovele resistentiegenen herkend kunnen worden. In tegenstelling tot vertebraten met hun circulerende antilichamen bezit een plant waarschijnlijk immobiele receptoren die na herkenning van een pathogeen een lokale afweereactie oproepen. Over dit alles is nog weinig bekend, maar het lijkt erop dat resistentiegenen hierbij de belangrijkste rol vervullen en als "mastergenen" functioneren (Keen, 1990). Resistentiegenen komen vaak als clusters voor en soms is er sprake van functionele allelen op bepaalde loci. Wanneer men bedenkt dat door recombinaatie tussen zeer nauw gekoppelde genen nieuwe specificiteiten kunnen ontstaan dan lijkt dit zeer sterk op recombiniatiemechanismen van immunoglobuline genen bij vertebraten die op deze manier vele nieuwe specificiteiten kunnen genereren. Een ander kenmerk van resistentiegenen in planten, dat gelijkenis vertoont met receptoren bij vertebraten, is het feit dat ze coderen voor twee verschillende functies, namelijk: de herkenning van fysisio-specifieke elicitoren en het in gang zetten van een signaaltransductieketen die leidt tot de overgevoeligheidsreactie (Scheel en Parker, 1990).

Cladosporium fulvum--tomaat

Inmiddels zijn er van vele plantepathogene bacteriën en de schimmel *Cladosporium fulvum* avirulentiegenen geïsoleerd en gekloneerd, en in de meeste gevallen zijn hun produkten geanalyseerd (Keen en Staskawicz, 1988; Keen, 1990; De Wit et al., 1991). Omdat op de vakgroep Fytopathologie vooral onderzoek gedaan wordt aan plantepathogene schimmels zal ik vanmiddag een schimmelvoorbeeld verder uitwerken. Zo is er van de schimmel *Cladosporium fulvum*, de veroorzaker van de bladvlekkenziekte van tomaat, één avirulentiegen met zijn bijbehorend produkt volledig gekarakteriseerd (De Wit en Oliver, 1989; Van Kan et al., 1991). Het betreffende avirulentiegen is avr9 en het complementaire resistentiegen in tomaat is Cf9. Wanneer via transformatie het avirulentiegen overgebracht wordt naar een fyso dat voordien virulent was op een tomaat met resistentiegen Cf9, dan blijkt een dergelijk getransformeerd fyso zijn vermogen om deze plant aan te tasten verloren te hebben met alle gevolgen van dien (Van den Ackerveken et al., 1991 in voorbereiding). Kort samengevat heeft de fytopathologie sinds de postulaten van Koch in de vorige eeuw en sinds het baanbrekende genetische onderzoek van Oort en Flor belangrijke stappen voorwaarts gezet met betrekking tot de ontrafeling van de moleculaire achtergrond van de waardplant-pathogeen interactie namelijk:

(i) Koch toonde aan dat een pathogeen uit een zieke plant geïsoleerd kan worden en dat datzelfde pathogeen, eenmaal in reïncultuur gebracht, diezelfde plant weer ziek kan maken met uiteraard dezelfde symptomen,

(ii) Oort en Flor vonden experimentele steun voor de genetische basis van de plant-pathogeen interactie uitmondend in de eerder genoemde gen-om-gen relatie,

(iii) onderzoekers van de vakgroep Fytopathologie bevestigen op moleculair niveau de genetische basis van de gen-om-gen interactie voor de relatie *Cladosporium fulvum*-tomaat. Zij isoleren het produkt van één van de interacterende genen, namelijk de fysio-specifieke elicitor, die gecodeerd wordt door het avirulentiegen *avr9*. Dit avirulentiegen is inmiddels gekloneerd (van Kan et al., 1991; van den Ackerveken et al., in voorbereiding).

(iv) de overgevoelighedsreactie wordt door het produkt van het avirulentiegen *avr9* geïnduceerd en is volledig afhankelijk van de aanwezigheid van het corresponderende resistentiegen *Cf9*. Dit resistentiegen, de tweede component van het systeem, is nog niet geïsoleerd maar dit lijkt nog slechts een kwestie van tijd (Dickinson et al., 1991).

Nu zult U zich afvragen of dit onderzoek in de strategische planning van de vakgroep Fytopathologie en van de Landbouwuniversiteit past en of de Nederlandse landbouw, in het bijzonder de praktijk van de gewasbescherming, iets met de resultaten van dergelijk onderzoek kan doen? Mijn antwoord hierop is volmondig ja! Het moleculair-genetisch onderzoek aan waardplant-parasiet interacties is van grote betekenis voor de praktijk van de gewasbescherming, in het bijzonder ter voorkoming en bestrijding van bacterie- en schimmelziekten en wellicht ook van virusziekten en nematodenaantasting (De Wit 1990). De vakgroep zal de komende vijf tot tien jaar dit type

onderzoek binnen de sectie moleculaire fytopathologie tot speerpunt van haar onderzoeksbeleid maken. Niet alleen de interactie *Cladosporium fulvum*-tomaat maar ook de al eerder genoemde interactie *Phytophthora infestans*-tomaat en -aardappel zullen als model gebruikt worden om avirulentiegenen en corresponderende resistentiegenen op te sporen (Govers et al. niet gepubliceerde data). Avirulentiegenen zullen gebruikt gaan worden om planten met de corresponderende resistentiegenen te transformeren. De promoters die de expressie van de avirulentiegenen controleren, moeten aan bepaalde eisen voldoen. Dit zal duidelijk worden als ik U iets meer verteld heb over de inductie van afweerreacties.

Inductie van fytoalexinen en andere afweermechanismen

In dezelfde tijd als Oort en Flor hun hypothesen over gen-om-gen relaties publiceerden, waren het de Duitse fytopathologen Müller en Börger die de eerste resultaten over de inductie van afweerstoffen bij planten tegen schimmels publiceerden (Müller en Börger, 1940). Zij toonden aan dat wanneer een aardappel, met een bepaald resistentiegen tegen *Phytophthora infestans*, behandeld wordt met een avirulent fysio, diezelfde aardappel niet meer aangetast kon worden door een virulent fysio van de schimmel. Uit nader onderzoek bleek dat de aardappelschijf onder invloed van het avirulente fysio fungitoxische stoffen produceert die verantwoordelijk zijn voor het achterwege blijven van aantasting. De stoffen die accumuleerden werden fytoalexinen genoemd (afgeleid van de Griekse woorden *phuton* en *alexin*, die respectievelijk plant en afweren betekenen). Sinds 1940 zijn in zeer veel planten deze fyto-

alexinen aangetoond en de chemische structuur van deze verbindingen is in de meeste gevallen opgehelderd (Bailey en Mansfield, 1982). In de jaren zeventig en tachtig werd naarstig gezocht naar componenten van bacteriën en schimmels die de synthese van deze fytoalexinen konden induceren. Men vond zeer veel van dergelijke stoffen die kortheidshalve aspecifieke elicitors genoemd worden (Darvill en Albersheim, 1984). Het zijn vaak oplosbare componenten van de celwand van pathogenen. Deze stoffen moeten duidelijk onderscheiden worden van de eerder genoemde fyto-specifieke elicitors, zoals het produkt van het avirulentiegen *avr9* van *Cladosporium fulvum*.

Inmiddels is erg veel bekend geworden over de biochemie en moleculaire biologie van de inductie en accumulatie van fytoalexinen en andere belangrijke afweerreacties (Scheel en Parker, 1990; Dixon en Lamb, 1990). De belangrijke conclusies van dit onderzoek zijn dat de genen betrokken bij de synthese van de fytoalexinen vrijwel altijd geïnduceerd worden door eerder genoemde aspecifieke elicitors. Bovendien is bekend dat in intacte planten de expressie van genoemde genen zeer lokaal is. De genen betrokken bij de synthese van fytoalexinen worden dus zeer lokaal aangeschakeld en van de plant wordt dus niet meer energie gevraagd dan strikt noodzakelijk is. De promotors van deze genen reageren zeer lokaal op externe signalen zoals aspecifieke elicitors. Het zijn dit type pathoogeen-induceerbare promotors die we nodig hebben, wanneer we duurzame resistentie willen verkrijgen via genetische modificatie van planten met avirulentiegenen, die inzetbaar is tegen vele verschillende pathogenen, hetgeen uit het hierna volgende betoog zal blijken.

Duurzame resistentie tegen pathogenen via genetische modificatie

Met de huidige stand der wetenschap omtrent de gen-om-gen relatie is het mogelijk om cultivar-specifieke resistentie te modificeren tot duurzame niet-waardplant-specifieke resistentie. Hierbij zal gebruik gemaakt worden van avirulentiegenen van schimmels, die ingebouwd zullen worden in het genoom van de plant die bijpassende resistentiegenen bezitten (De Wit, 1990). Het avirulentiegen zal onder controle van een eerder genoemde pathogeen-induceerbare promoter gebracht worden opdat het avirulentiegenprodukt, de fysio-specifieke elicitor, alleen geproduceerd wordt wanneer een schimmel de desbetreffende plant probeert aan te tasten. Dat wil zeggen dat zodra het produkt van het avirulentiegen, de fysio-specifieke elicitor, geproduceerd wordt dit onmiddellijk tot een overgevoeligheidsreactie aanleiding zal geven, uitmondend in resistentie. De gebruikte promoter die het avirulentiegen moet besturen is hierbij cruciaal, want aan de promotor wordt als eis gesteld dat deze (i) zeer lokaal en nimmer systemisch geïnduceerd wordt en (ii) alleen door pathogenen of door pathogenen geproduceerde specifieke elicitors geïnduceerd wordt en niet of nauwelijks induceerbaar is door andere uitwendige prikkels. Promoters van plantegenen die betrokken zijn bij de eerder genoemde fytoalexinenproductie komen hiervoor in aanmerking, aangezien ze zeer lokaal opereren en gedurende de evolutie reeds bewezen hebben op signalen van vrijwel alle pathogenen te blijven reageren. In de toekomst kunnen wellicht ook andere promoters gevonden of

geconstrueerd worden die aan dezelfde stringente voorwaarden voldoen.

Wanneer het resistentiegen reeds aanwezig is in de plant die beschermd moet worden tegen pathogenen, is het slechts nodig om het bijbehorende avirulentiegen dat onder besturing staat van een eerder genoemde pathogeen-induceerbare promotor, in de plant te brengen. Wanneer het resistentiegen corresponderend met het avirulentiegen nog niet aanwezig is in de plant die men wil modificeren met het avirulentiegen, dan moet de desbetreffende plant gekruist worden met een plant die het gen wel heeft. Wanneer het resistentiegen eenmaal geïsoleerd is, kan het door middel van transformatie naar elke gewenste plant overgebracht worden. Tegen dit zogenaamde twee-componenten sensorsysteem dat enerzijds het resistentiegen en anderzijds het avirulentiegen omvat kan in de natuur niet snel resistentie optreden omdat het avirulentiegen onder controle staat van een door alle pathogenen induceerbare plantepromoter. De selectiedruk zal op de promotor zijn en niet op het produkt van het avirulentiegen, de fysiologisch-specifieke elicitor, die de voor de meeste schimmels fatale overgevoeligheidsreactie induceert. In principe kan het twee-componenten sensorsysteem met iedere avirulentiegen-resistentiegen combinatie in alle planten gebracht worden waarin produkten van resistentiegen en avirulentiegen werkzaam zijn. Dit betekent dat één bepaald twee-componenten sensorsysteem zeer breed inzetbaar is tegen vele pathogenen. Het is duidelijk dat via dit systeem de overgevoeligheidsresistentie, de meest efficiënte en absolute vorm van natuurlijke resistentie, ten volle benut kan worden. Modificatie van planten met behulp

van het twee-componenten sensorsysteem biedt een mogelijkheid bij uitstek om het gebruik van bestrijdingsmiddelen tegen pathogenen terug te dringen en zo het milieu voor een groot deel van deze middelen te ontlasten.

Onderzoek bij de vakgroep Fytopathologie

Uit pragmatische overwegingen heb ik slechts enkele belangrijke facetten van het biochemisch en moleculair fytopathologisch onderzoek belicht. Ik heb niet geprobeerd een volledige opsomming van het onderzoek van de vakgroep Fytopathologie te geven. Hiervoor kan ik verwijzen naar het "public relation" boekje dat de vakgroep vorig jaar heeft uitgegeven. Hierin staan alle onderwijselementen en onderzoekprojecten van de secties moleculaire en ecologische fytopathologie overzichtelijk vermeld. Het fytofarmaceutisch onderzoek van de Waard en het ecologisch fytopathologisch onderzoek dat geleid wordt door professor Zadoks en zijn medewerkers heb ik niet onder uw aandacht gebracht. Er zijn duidelijke dwarsverbanden tussen het moleculair en het ecologisch fytopathologisch onderzoek. Steeds meer technieken zullen uitgewisseld worden. Er wordt al gesproken van moleculaire ecologie. Ik kan hierbij het onderzoek aan detectie en evolutie van pathogenen met behulp van moleculair biologische technieken en methoden zoals RFLP's, RAPD's en genomische subtractie noemen (Leong en Holden, 1989, Dickinson et al., 1991). Diverse *Phytophthora* species worden in beide secties bestudeerd, waarbij genoemde technieken gebruikt worden. Onderzoek naar de ecologische functies van avirulentie- en resistentiegenen ligt ook voor de hand. Het is dan ook van het grootste

belang dat na het emeritaat van professor Zadoks bij de vakgroep het onderzoek in de ecologische fytopathologie aan pathogenen met een bodemgebonden levensfase wordt voortgezet en zelfs wordt versterkt.

Het verwerven van fondsen voor fytopathologisch onderzoek vraagt momenteel steeds meer inspanning daar de eerste geldstroomfinanciering steeds verder terugloopt. De laatste jaren is de vakgroep er echter zeer goed in geslaagd tweede en derde geldstroomprojecten aan te trekken. De vakgroep is erg blij met de financiële steun van NWO via haar stichtingen BION en STW. De samenwerking met DLO-instituten krijgt steeds meer gestalte in de vorm van DLO-AIO's. Ook de EO en het bedrijfsleven hebben ons de laatste jaren in ruime mate gesteund. We doen er alles aan om het in de vakgroep gestelde vertrouwen waar te blijven maken.

Onderzoekscholen

De samenwerking tussen de verschillende vakgroepen van de cluster gewasbescherming en daarbuiten krijgt de laatste jaren steeds meer gestalte en heeft reeds tot veel positieve resultaten geleid. Ik noem hier vooral de AIO-seminarcyclus die afgelopen september zijn tweede jaargang is ingegaan en waaraan meer dan 50 AIO's en OIO's deelnemen. De "Summerschool Crop Protection" genoot afgelopen maand veel belangstelling. Maar liefst 100 AIO's en OIO's waren in Wageningen bijeen om de nieuwste ontwikkelingen met betrekking tot fysiologische en moleculaire aspecten van afweerreacties in planten tegen virussen, bacteriën, schimmels, nematoden en insecten te bespreken. De cluster gewasbescherming is momenteel onderge-

bracht bij de onderzoekschool "Experimentele Planten-
wetenschappen", waarin ze zich volledig thuisvoelt
en naar mijn mening een onmisbare schakel vormt. Hier
vinden op de raakvlakken tussen verschillende
disciplines nieuwe baanbrekende ontwikkelingen
plaats. De cluster gewasbescherming ontwikkelt zich
steeds meer in de richting van een "Graduate School",
waarbij er een gezonde mengeling is van eerste fase
studenten, AIO's en OIO's uit de groene maar zeker
ook uit biologische en moleculair-biologische rich-
tingen. Ik beschouw het dan ook als een belangrijke
taak het eerste fase onderwijs en het AIO- en OIO-
onderwijs op een hoog niveau te houden.

*Geachte leden van het college van bestuur,
benoemingsadviescommissie en clusterbestuur
Gewasbescherming,*

Ik dank U allen voor de prettige wijze van overleg en
samenwerking in aanloop op mijn benoeming en ben U
zeer erkentelijk voor het in mij gestelde vertrouwen.
Hopelijk heb ik U vanmiddag van het belang van de
fytopathologie, in het bijzonder de moleculaire fyto-
pathologie, overtuigd. Het zal U duidelijk zijn dat
dit onderzoek niet goedkoop is en ruime materiële en
personele steun behoeft om in de toekomst op peil te
blijven. Ik hoop nog lang op vruchtbare en construc-
tieve wijze met U samen te werken.

Hooggeleerde professor Dekker, beste Johan,

Toen jij mij in 1974 vroeg om op de vakgroep
Fytopathologie te komen werken heb ik die kans met
beide handen aangegrepen. Zoals ik al memoreerde is
de weg niet altijd over rozen gegaan, maar dat is

inherent aan wetenschappelijk onderzoek. Ik denk dat de vrijheid die je mij in het wetenschappelijk onderzoek gegeven hebt een zeer gunstige uitwerking gehad heeft op mijn carrière. Ook voor je inspanningen om voor mij een verblijf van een jaar in de Verenigde Staten mogelijk te maken, ben ik je zeer dankbaar. Ik denk nog steeds met een beetje heimwee aan deze vruchtbare periode terug. Wellicht komt het in het Nederlandse universitaire bestel nog ooit zover dat een reguliere sabbatical periode ingevoerd wordt. Mijns inziens werkt dit zeer motiverend en innoverend.

Geachte oudcollega's van de vakgroep Fytopathologie,

Zonder iemand te kort willen doen, wil ik hier met name Adriaan Fuchs en Leen Davidse noemen. Jullie hebben beiden een grote invloed gehad op het verloop van mijn carrière. Ik wil jullie danken voor de vele vruchtbare wetenschappelijke discussies en de atmosfeer van kameraadschap en collegialiteit.

Geachte collega's van de vakgroep Fytopathologie,

Ik heb het zeer gewaardeerd dat jullie mijn voordracht vrijwel unaniem gesteund hebben. Ik hoop dat vertrouwen in de toekomst niet te beschamen. Ik ben ervan overtuigd dat we gezamenlijk de moeilijke jaren die de gewasbescherming boven het hoofd hangen aankunnen. Ik ben zeer ingenomen met de huidige prettige sfeer van collegialiteit die er heerst tussen de beide secties. Ik ben ervan overtuigd dat de gezamenlijke projecten in de toekomst de wetenschappelijke en collegiale band nog versterken. Ik spreek de hoop uit dat iedereen bij de vakgroep

hieraan zijn volle bijdrage zal leveren of U nu kasmedewerker, secretaresse, amanuensis, analist, AIO, OIO, UD, UHD of hoogleraar bent.

Geachte collega's van de cluster gewasbescherming en het sectorbureau,

Ik heb altijd getracht verder te kijken dan de vakgroep Fytopathologie. De laatste jaren ontstaan er vooral bij de fysiologisch en moleculair georiënteerde onderzoekers van de cluster steeds meer initiatieven voor samenwerking. Deze drang tot samenwerken was er reeds voordat de cluster gevormd werd, doch begint de laatste jaren steeds meer handen en voeten te krijgen. Ik hoop dat deze samenwerking zich zal uitbouwen in de richting van de ecologie. Hoe hechter we intern opereren hoe beter we door de buitenwacht gehoord worden.

Geachte leden van de vakgroep Plantenveredeling,

Met het samengaan van de studierichtingen plantenziektenkunde en plantenveredeling zal er in de toekomst niet alleen op het terrein van onderwijs maar ook op het terrein van onderzoek hechter samengewerkt gaan worden. Uit mijn voordracht is duidelijk geworden dat voor de plantenveredeling, in het bijzonder de veredeling op duurzame ziekteresistentie een grote toekomst ligt. Ik zie uit naar een vruchtbare samenwerking in de toekomst.

Geachte studenten,

De maatschappelijke betekenis van de gewasbescherming is groot en het is belangrijk dat verantwoorde oplossingen gevonden worden voor preventie en bestrijding van ziekten en plagen. De toekomst van de gewasbescherming ligt voor een groot deel in jullie handen. De studenten van vandaag zijn de onderzoekers, de gewasbeschermers en de beleidsmakers van morgen. In de toekomst kunnen wij niet aan de vraag naar moleculair en ecologisch opgeleide fytopathologen voldoen. Ik hoop U vanmiddag overtuigd te hebben van het feit hoe boeiend de fytopathologie is, en hoe zij zich via fundamenteel onderzoek inzet voor het duurzaam oplossen van gewasbeschermingsproblemen. Ik hoop van harte dat jullie je door de crisis waarin de gewasbescherming zich momenteel bevindt niet laten afschrikken, maar juist extra gemotiveerd aan de slag gaan.

Beste familieleden, kennissen en vrienden,

Ik hoop dat ik ook voor jullie iets duidelijk heb kunnen maken over wat fytopathologie is en waar ze zich mee bezighoudt.

Beste Els, Christiaan en Matthieu,

Ik ben jullie zeer dankbaar voor jullie steun, afleiding en vooral begrip, wanneer het werk weer eens meer tijd vroeg dan gepland.

Mijnheer de rector magnificus, dames en heren,

Ik dank U allen voor uw aanwezigheid en uw aandacht.

Referenties

- Bailey, J.A. en Mansfield, J.W., 1982. *Phytoalexins*. Blackie and Sons, London.
- Bent, A., Garland, F., Dahlbeck D., Innes, R., Kearney, B., Ronald, P., Roy, M., Salmeron J., Whalen, M. en Staskawicz, B., 1991. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, 1, 32-36. (H.Hennecke en D.P.S. Verma eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Biffen, R.H., 1905. Mendel's laws of inheritance and wheat breeding. *J. Agr. Sci.* 1: 4-48.
- Darvill, A.G. en Albersheim, P., 1984. *Phytoalexins and their elicitors- a defense against microbial infection in plants*. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 243-275.
- Day, P.R., 1974. *Genetics of Host-Parasite Interaction*. W.H. Freeman en Company, San Francisco.
- Dekker, J., 1974. De geschiedenis van gewasbescherming. In: "Maatschappelijke aspecten van de gewasbescherming", symposium ter gelegenheid van het 75-jarig bestaan van de Plantenziektenkundige Dienst, pag 9-22.
- Dekker, J., 1987. Development of resistance to modern fungicides and strategies for its avoidance. In: "Modern selective fungicides-properties, mechanism of action", pag. 39-52. (H. Lyr, ed.), Fischer Verlag, Jena.

- De Wit, P.J.G.M., 1990. Werkwijze voor het beschermen van planten tegen pathogenen. Oktrooiaanvraag 90.00773 Ned., 2 april 1990.
- De Wit, P.J.G.M. en Oliver R.P., 1989. The interaction between *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) and tomato: A model system in molecular plant pathology. Proceedings of the EMBO-Alko workshop on Molecular Biology of Filamentous Fungi (Nevalainen, H. en Penttilä eds.) Foundation of Biotechnical and Industrial Fermentation Research 6: 227-236.
- De Wit, P.J.G.M., Van Kan, J.A.L., Van den Ackerveken, A.F.J.M. en Joosten, M. H.A.J., (1991). In: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, 1: 233-241. (H.Hennecke en D.P.S. Verma eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Dickinson, M., Jones, D., Thomas, C., Harrison, K., English, J., Bishop, G., Scofield, S., Hammond-Kosack, K. en Jones J.D.G., 1991. Strategies for the cloning of genes in tomato for resistance to *Fulvia fulva*. Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, 1: 276-279. (H.Hennecke en D.P.S. Verma eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Dixon, R.A. en Lamb C.J., 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. 41: 339-367.

- Flor, H.H., 1942. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathol.* 32: 653-659.
- Holmes, F.W. en Heybroek, H.M., 1990. Dutch elm disease, the early papers: selected work of seven Dutch women phytopathologists. St. Paul: APS, 1990.
- Ingram, D.S. en Williams, P.H., 1991. *Phytophthora infestans*: the cause of late blight of potato. *Adv. Plant Pathol.* Academic Press, London.
- Joosten, M.H.A.J. en De Wit, P.J.G.M., 1989. The identification of several pathogenesis-related (PR) proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3- β -glucanases and chitinases. *Plant Physiol.* 89: 945-951.
- Keen, N.T. en Staskawicz, B.J., 1988. Host range determinants in plant pathogens and symbionts. *Annu. Rev. of Microbiol.* 42: 421-440.
- Keen, N.T., 1990. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.*, 24: 447-463.
- Keen, N., Kobayashi, D., Tamaki, S., Shen, H., Stayton, M., Lawrence, D., Sharma, A., Midland, S., Smith, M. en Sims, J., 1991. Avirulence gene *avrD* from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and its interaction with resistance gene *Rpg4* in soybean. *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, 1: 37-44. (H.Hennecke en D.P.S. Verma eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Leong, S.A. en Holden, D.W., 1989. Molecular genetic approaches to the study of fungal pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27: 463–481.
- Mansfield, J.W., 1986. Recognition, elicitors and the hypersensitive reaction. In: "Recognition in Microbe–Symbiotic and Pathogenic Interactions, pag 433–437. (B.J.J. Lugtenberg ed.) Springer Verlag, Berlijn.
- Müller, K.O., en Börger, H., 1940. Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora: Resistenz der Kartoffel. *Arb. biol. Abt. (Aust. Reichsanst.) (Berlin)* 23: 189–231.
- Nester, E.W. en Gordon, M.P., 1991. Molecular strategies in the interaction between *Agrobacterium* and its hosts. *Advances in Molecular Genetics of Plant–Microbe Interactions*, 1: 3–9. (H.Hennecke en D.P.S. Verma eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Oort, A.J.P., 1944. Onderzoekingen over stuifbrand. II. Overgevoeligheid van tarwe voor stuifbrand (*Ustilago tritici*). *Tijdschrift over Plantenziekten*, 50: 73–106.
- Palti, J., 1981. Cultural practices and infectious crop diseases. Springer–Verlag, Berlin.
- Pryor, T., 1987. The origin and structure of fungal disease resistance genes in plants. *Trends in Genetics* 3: 157–161.

- Scheel, D. en Parker, J.E., 1990. Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation. *Z. Naturforsch.* 45c: 569–575.
- Stakman, E.C., Parker J.J., en Piemeisel, F.J., 1918. Can biologic forms of stem rust on wheat change rapidly enough to interfere with breeding for rust resistance? *J. Agr. Res.* 14: 111–123.
- Van Kan, J.A.L., Van den Ackerveken, A.F.J.M. en De Wit, P.J.G.M., 1990. Cloning and characterization of the avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, the causal agent of tomato leaf mould. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 4: 52–59.
- Zadoks, J.C., 1991. A hundred and more years of plant protection in the Netherlands. *Neth. J. Plant Pathol.*, 97: 3–24.