



Nieuwe methoden in Plantversterking tegen Ondergrondse Ziekten en Plagen

Gebruik van lokaal aanwezige antagonisten uit groeisubstraat en plant

A.W.G. van der Wurff, M.A. Streminska, F.A. de Boer, E. Bruyant en Y. Cuesta Arenas

Rapport GTB-1427

Referaat

Binnen dit project worden twee nieuwe methoden van plantversterking tegen ziekten en plagen onderzocht: a. het gebruik van bacteriën die al op het bedrijf aanwezig zijn; en b. bacteriën die in de plant aanwezig zijn.

Door het gebruik van bacteriën uit de plant of teelt substraat is de kans groter dat antagonisten succesvol ingezet kunnen worden. Bacteriën werden *in vitro* getoetst tegen *Pythium ultimum* uit chrysant, tegen het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita* en tegen de schadelijke bacterie *Rhizobium rhizogenes* uit tomaat en tegen *Fusarium solani* en *F. oxysporum* uit Amaryllis. Vervolgens werden antagonisten van *Pythium* en *Meloidogyne* getoetst in potproeven met grond afkomstig van de glastuinbouw bedrijven. Alle isolaten verminderde de bruin-verkleuring symptomen van *Pythium* in de stengel van chrysant. *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp. en twee niet-geïdentificeerde soorten gaven een onderdrukking van de wortelschade van *Meloidogyne* spp. terwijl *Alcaligenes* sp. en *Bacillus* sp. ook een vermindering gaf van het aantal nakomelingen. De inzet van lokaal micro-leven tegen ziekten en plagen biedt een duurzame-, en nieuwe oplossing voor de verkleining van het beschikbare middelenpakket. Uit de studie blijkt dat Proteïnase remmer 2 (PINII), Glucanase (LeGluB) en Chitinase (LeChi3) gebruikt kunnen worden als merkers in tomaat voor onderzoek naar het effect van antagonisten en endofieten op de plantafweer.

Abstract

Within this project, two new methods of the control of pathogens were investigated. New methods are: a. use of local bacteria that are isolated from soils or growing substrates; and b. bacteria that are present within the plant. By using local antagonists, already present in growing substrates or within plants in the greenhouse, the chance is higher that antagonist can be successfully used against local pathogens. Bacteria that were isolated from soil of growers were assessed on their antagonistic potential in lab trials against *Pythium ultimum*, *Meloidogyne* spp. and *Rhizobium rhizogenes* and *Fusarium solani* and *F. oxysporum*. Finally, the effect of antagonists against *Pythium* and *Meloidogyne* was evaluated in pot trials in the greenhouse. All antagonists diminished brown colourization symptoms in stems caused by *Pythium*. *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp. en two unidentified species diminished root damage and *Alcaligenes* sp. as well as *Bacillus* also reduced also the number of offspring of *Meloidogyne* spp. within the roots. The use of local microorganisms offers a sustainable-, new solution to control pathogens. In this study, it was shown that Proteinase inhibitor 2 (PINII), Glucanase (LeGluB) and Chitinase (LeChi3) can be used in tomato to investigate the influence of antagonists or endophytes on the plant defence.

Rapportgegevens

Rapport GTB-1427

Projectnummer: 3242183300

PT nummer: 14980

DOI nummer: 10.18174/405709

Disclaimer

© 2016 Wageningen Plant Research (instituut binnen de rechtspersoon Stichting Wageningen Research), Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk, Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk, T 0317 48 56 06, F 010 522 51 93, E glastuinbouw@wur.nl, www.wur.nl/plant-research. Wageningen Plant Research.

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

Adresgegevens

Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 48 56 06

F +31 (0)10 522 51 93

Inhoud

	Samenvatting	5
1	Inleiding	7
1.1	Ziekten en plagen: nieuwe teeltsystemen blijven gevoelig	7
1.2	Weerbaar Telen	7
1.3	Raamwerk Plantversterkers maakt strategische aanpak mogelijk	7
1.4	Onderliggend Raamwerk Plantversterkers: drie pijlers van plantafweer	8
1.5	Nieuwe methoden voor plantversterking	9
1.6	Onderzoek naar werking en gereedschap voor teelt	9
1.7	Doelstelling(en) en afbakening	9
2	Raamwerk en merkers	11
2.1	Vruchtgroenten: tomaat	11
2.2	Validatie van RNA merkers voor tomaat	12
2.2.1	Wortels Komeett	13
2.2.2	Jonge bladeren Komeett	13
2.2.3	Oude bladeren Komeett	14
2.2.4	Wortels Sassari	14
2.2.5	Jonge bladeren Sassari	15
2.2.6	Oude bladeren Sassari	15
2.2.7	Conclusie en discussie	16
2.3	Sierteelt	16
3	Endofytische micro-organismen in verschillende plantensoorten	17
3.1	Wat zijn endofieten?	17
3.1.1	Endofieten uit tomaat	17
3.1.1.1	Isolatie van endofieten	17
3.1.1.2	Identificatie van endofieten	17
3.1.1.3	Antagonisme potentieel van endofieten uit tomaat tegen <i>Rhizobium rhizogenes</i>	20
3.1.2	Endofieten uit lisianthus	20
3.1.2.1	Endofieten isolatie procedure	20
3.1.2.2	Antagonisme potentieel van endofieten uit Lisianthus tegen plant pathogene <i>Fusarium</i>	21
3.1.3	Endofieten uit chrysant	21
3.1.3.1	Isolatie van endofieten	21

4	Antagonisten in groeisubstraten	23
4.1	Antagonisten tegen juveniele (J2) <i>Meloidogyne</i> uit grond van de biologische teelt van tomaat	23
4.1.1	Isolatie van antagonisten	23
4.1.2	Identificatie van antagonisten	23
4.1.3	Toets <i>in vitro</i> van antagonistisch effect van bacteriële metabolieten op juveniele <i>Meloidogyne incognita</i> (J2 stadium)	24
4.2	Antagonisten tegen <i>Fusarium solani</i> en <i>Fusarium oxysporum</i> in Amaryllis	25
4.2.1	Isolatie procedure	25
4.2.2	Identificatie van bacteriële isolaten uit groeisubstraten van amaryllis	25
4.2.3	<i>In vitro</i> antagonisme van bacteriële isolaten tegen <i>F. oxysporum</i> en <i>F. solani</i>	26
4.3	Antagonisten tegen <i>Pythium ultimum</i> in chrysant	27
4.3.1	Isolatie procedure	27
4.3.2	<i>In vitro</i> antagonisme van bacteriële isolaten tegen <i>Pythium ultimum</i>	27
5	Antagonisten in biotoetsen	29
5.1	Biotoets met bacteriële isolaten op ontwikkeling van <i>Pythium</i> wortelrot in chrysant	29
5.2	Biotoets met bacteriële isolaten op ontwikkeling van wortelknobbelaaltjes in biologische tomaat	30
5.3	Conclusie en discussie	31
5.3.1	<i>Pythium</i> in chrysant	31
5.3.2	Wortelknobbelaaltje in tomaat	32
6	Conclusie en discussie	33
6.1	Antagonisten <i>in vitro</i> toets	33
6.1.1	<i>Meloidogyne</i>	33
6.1.2	<i>Fusarium</i>	33
6.1.3	Endofieten uit de plant	33
6.2	Antagonisten in pottenproef	33
6.3	Relatie met raamwerk	34
6.4	Algemene conclusie en discussie	34
	Dankwoord	35
7	Literatuur	37
	Bijlage 1 Plattegrond biotoets <i>Pythium</i>	39
	Bijlage 2 Plattegrond biotoets <i>Meloidogyne</i>	41

Samenvatting

Nieuwe methoden

Binnen het project wordt gekeken naar nieuwe methoden voor het gebruik van plantversterkers. Deze nieuwe methoden zijn: a. het gebruik van bacteriën en schimmels die in het groeisubstraat op het bedrijf aanwezig zijn; en b. bacteriën die in de plant aanwezig zijn (zgn. endofieten).

Sierteelt en tomaat als Model

Als model werd gekozen voor sierteelt gewassen chrysanthe, lisianthus en amaryllis. Voor de sierteelt is een inventarisatie gemaakt van potentiële RNA merkers. Daarnaast is er gekozen voor tomaat omdat er enkele RNA merkers beschikbaar zijn voor de verschillende plantafweer routes: De grote pijlers van het afweersysteem van de plant zijn de Geïnduceerde Systemische Resistentie (ISR) met een centrale rol voor de hormonen Jasmonzuur (JA) en Ethyleen (Et) en systemisch verworven resistentie (SAR) met het hormoon Salicylzuur (SA). Deze plantverdediging routes vormen de basis van het raamwerk plantweerbaarheid zoals ontwikkeld binnen het PT project Potplanten. De plant maakt "een keuze" voor één van deze afweersystemen, afhankelijk van het type ziekte of plaag: Een soort dat zich voedt met levende cellen zoals meeldauw (een zgn. biotroof) of het wortelknobbelaaltje, wordt geweerd door het SA systeem, terwijl een soort dat de plant doodt, zoals *Botrytis* (een zgn. necrotroof), gestopt wordt door het JA systeem. Beide afweersysteem routes werken elkaar tegen: Een SA reactie gaat vaak ten koste van een JA reactie.

Met een set van expressie (RNA) merkers voor de JA en de SA route in tomaat is een validatie experiment uitgevoerd. Hieruit blijkt dat Proteïnase remmer 2 (PINII), Glucanase (LeGluB) en Chitinase (LeChi3) gebruikt kunnen worden als merkers voor onderzoek naar het effect van antagonisten en endofieten op de plantafweer.

Antagonisten vangen

Er werd gekeken naar het gebruik van bacteriën die ziekten kunnen onderdrukken en die al in de teelt aanwezig zijn. Er is gekeken naar grondmonsters uit de teelt van chrysanthe en biologische tomaat, en monsters van perliet en kleikorrels uit de teelt van amaryllis. Er werden bacteriën geïsoleerd en in proeven werd de effectiviteit van deze bacteriën getoetst. Bacteriën uit de teelt van chrysanthe werden getoetst tegen *Pythium ultimum*, in tomaat tegen het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita* en in amaryllis tegen *Fusarium solani*. In substraat uit de teelt van amaryllis werden zes bacteriën gevonden in perliet met meer dan 50% remming van *F. oxysporum* (2 uit perliet, 4 uit klei) en zes antagonisten gaven meer dan 50% remming van *F. solani* (4 perliet, 2 klei). In potproeven met tomaat gaven drie van de zes bacteriën een vermindering van de wortelknobbelschade (wortelknobbels) met een vermindering van 50% van de wortelschade. Het effect op het aantal nakomelingen (J2) in de wortelknobbels was een vermindering van de schade met 33%. Er wordt bediscussieerd dat eerdere proeven met dezelfde antagonist in tomaat geen onderdrukking van schade gaven omdat het isolaat pas werd toegediend na de opkweek fase.

Endofieten: bacteriën uit de plant

Als laatste werd er gekeken naar nieuwe methoden voor het gebruik van bacteriën die in de plant zelf aanwezig zijn. Bij tomaat werd er een zeer grote diversiteit aan (in het laboratorium kweekbare) bacteriën aangetroffen. Bij lisianthus en chrysanthe was deze diversiteit minder groot. De diverse bacteriën werden met DNA technieken op naam gebracht en bieden mogelijk een nieuwe duurzame oplossing tegen ziekten en plagen.

1 Inleiding

1.1 Ziekten en plagen: nieuwe teeltsystemen blijven gevoelig

De historie leert dat ziekten en plagen altijd wel een probleem voor de teelt zullen vormen, onafhankelijk van de ontwikkeling van nieuwe teeltsystemen in-, of uit de grond. De identiteit van deze soorten is wel sterk afhankelijk van het teeltsysteem, zo zien we in de teelt van tomaat los van de ondergrond geen problemen meer met o.a. aaltjes en kurkwortel, maar wel met *Pythium* spp., *Phytophthora* spp. en relatief nieuwe ziekten zoals *Rhizobium rhizogenes*, d.i. de veroorzaker van overmatige wortelgroei. Bij de grondteelten in de sierteelt is er op dit moment veel aandacht voor *Fusarium*, aaltjes (wortelknobbelaaltjes, wortellesie aaltjes) en *Verticillium*. *Pythium* wordt op dit moment onderdrukt door Aaterra en in de toekomst door Ridomil en diverse alternatieve middelen zoals onderzocht in het PT project Alternatieven voor Aaterra. Bij lisianthus wordt er nog steeds vier of vijf maal gestoomd per jaar en vormen schimmels zoals *Myrothecium* en *Fusarium* een bedreiging voor de teelt. Voor *Verticillium* in de diverse teelt zoals in trekheesters, is er op dit moment geen oplossing. Het is belangrijk om een generieke (breed inzetbare) oplossing te zoeken voor de schade dat veroorzaakt wordt door ziekten en plagen. En dus niet een oplossing dat alleen werkt voor een specifiek substraat of kasomgeving.

1.2 Weerbaar Telen

Binnen het weerbaar telen wordt voorkomen dat ziekten en plagen uitval veroorzaken. Er wordt gebruik gemaakt van bouwstenen binnen een systeem aanpak om de teelt een weerbaarder substraat te geven en een sterke plant binnen de randvoorwaarden van een optimaal klimaat. Onderzoek laat zien dat er een interactie is tussen plantversterker, cultivar, kasomgeving, groeisubstraat en (het type) pathogeen. Hierdoor is de efficiëntie van dit soort middelen vaak niet duidelijk en (nog) onvoorspelbaar. Meer inzicht in deze interacties is dus nodig. Het is belangrijk om teeltzekerheid te bieden aan telers om het weerbaar telen te presenteren als een duurzame oplossing voor de problematiek van ziekten en plagen.

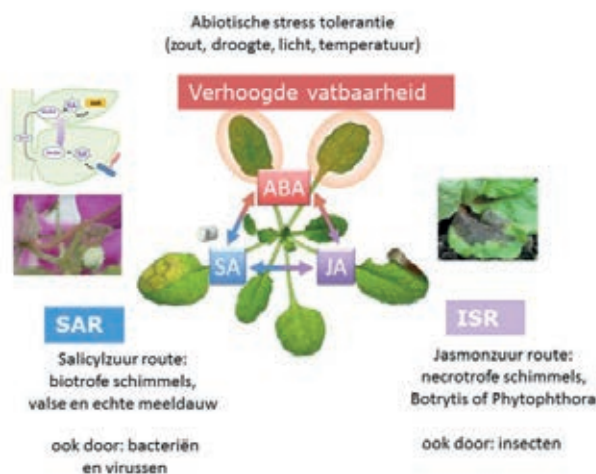
1.3 Raamwerk Plantversterkers maakt strategische aanpak mogelijk

Het is duidelijk dat het gebruik van dit soort middelen veel meer kennis vraagt van teler, onderzoek en toeleverancier. Voor onderzoek naar plantversterkers is daarom een raamwerk belangrijk. Het raamwerk maakt een integratie mogelijk van kennis over teeltomstandigheden, kennis van ziekten en plagen en de plantsoorten om te komen tot een systeem aanpak, namelijk "het nieuwe doen in telen". Binnen dit raamwerk worden ziekten en plagen, plantafweerreacties en teeltomstandigheden ingedeeld in groepen. De meerwaarde is dat er geen sprake meer is van *trial-and-error* en dat een succes van een middel vertaald kan worden naar een hele groep van middelen: een succesvolle toepassing van een plantenversterker kan dan leiden tot het identificeren van een groep van middelen die werkzaam zijn binnen een groep van planten binnen een groep teeltsystemen. Het raamwerk is nog niet af en het is daarom noodzakelijk dat het ingevuld wordt met kennis van diverse interacties tussen pathogeen, plantversterker, plant, substraat en omgeving. Ook is er dringend behoefte aan gereedschap om de plantreactie op dit soort middelen te kunnen meten en in kaart te brengen.

1.4 Onderliggend Raamwerk Plantversterkers: drie pijlers van plantafweer

Plantversterkers beschermen de plant door a. fysieke bescherming (o.a. silicium, calcium, bedekken van plantoppervlak), b. toxiciteit (o.a. extracten en antistoffen van organismen) en c. aanschakelen van de plantafweer. De grote pijlers van het afweersysteem van de plant zijn de Geïnduceerde Systemische Resistentie (ISR) met een centrale rol voor de hormonen Jasmonzuur (JA) en Ethyleen (Et) en het Systemisch Verkregen Resistentie (SAR) met Salicylzuur (SA). De plant maakt "een keuze" voor een van deze afweersystemen afhankelijk van het type ziekte of plaag: Een soort dat zich voedt met levende cellen zoals *Phytophthora* (waarvan een aantal een zgn. biotroof) wordt geweerd door SAR, terwijl een soort dat dode cellen nodig heeft (een zgn. necrotroof) gestopt wordt door het ISR. Beide afweersysteem routes werken elkaar tegen: Een SAR reactie gaat ten koste van een ISR reactie. Ook omgevingsfactoren zoals uitplanten, verplaatsing naar andere kas, -of van binnen naar buiten de kas en overgang naar een andere belichting hebben invloed. Een planthormoon dat hierin een belangrijke rol speelt is ABA. Deze route wordt ook als een belangrijke pijler gezien voor het plantafweer systeem. ABA werkt de andere routes (JA en SA/Et) tegen. Hierdoor wordt de plant gevoelig voor ziekten en plagen.

Plantparasieten "misleiden" dit afweersysteem om de plant binnen te komen. Een bekend voorbeeld hiervan is de schimmel *Botrytis*. Deze wordt in principe afgeweerd door het ISR, maar produceert een stof die het SAR aanschakelt. Hierdoor verzwakt *Botrytis* de plant. Ook plant parasitaire aaltjes misleiden het afweersysteem van de plant: Wortelknobbelaaltjes kunnen het systeem van de plant manipuleren zodat ze de cellen kunnen gebruiken als voeding cel. Dit voorbeeld laat goed zien dat telers de mogelijkheid hebben om de ziekten en plagen op hun beurt te doorzien en de misleiding te stoppen door te sturen op het juiste plantafweersysteem. Met plantversterkers hebben telers de mogelijkheid om ziekten en plagen te doorzien en de misleiding te stoppen door te sturen op het juiste plantafweersysteem.



Figuur 2.1 Overzicht van de interacties tussen de klassieke pijlers van plantafweer gerelateerd aan het type stressor, namelijk necro- (Lecourieux-Ouaked et al., 2000), en biotrofe schimmel pathogenen (Thomma et al., 2001), insecten, bacteriën, virussen en abiotische (omgeving) stress. Systemisch Verkregen Resistentie (SAR) betreft een bovengrondse reactie zoals een zgn. Hyper Gevoeligheid Reactie (HSR). Dit resulteert in lokaal doodgaan van cellen en lokale activiteit van genen, zoals chitinase en glucanase. Geïnduceerde Systemische Reactie (ISR) betreft de reactie van de plant na aanleiding van een ondergrondse aanval.

1.5 Nieuwe methoden voor plantversterking

Binnen dit onderzoek wordt onderzocht of er gebruik gemaakt kan worden van lokaal aanwezig antagonisten en endofieten in de plant. Het voordeel van het gebruik van lokaal aanwezige bacteriën is dat deze soorten al gewend zijn aan de lokale omstandigheden van de teelt van gewassen onder glas, zoals aan bemestings-, en watergeef regime en het type substraat zoals bodem, perliet of kleikorrels. Hetzelfde geldt voor soorten die in de plant leven (endofieten). Deze insteek vormt de basis van dit rapport: "Nieuwe Methoden voor Plantversterking".

1.6 Onderzoek naar werking en gereedschap voor teelt

Op dit moment worden plantversterkers ingezet (zowel in onderzoek als praktijk) zonder duidelijk bewijs van de werkzaamheid. Pas na uitval kan (soms) worden vastgesteld of een plantversterker wel of niet gewerkt heeft. Deze indruk is dan vaak plaats en tijd afhankelijk, dat wil zeggen binnen het ene bedrijf lijkt het wel te werken en binnen het andere niet. Er is dus een sterke behoefte bij telers om al in een vroeg stadium te kunnen meten of een middel een (preventieve) werking heeft. Dit type gereedschap wordt binnen het onderzoek van Wageningen UR Glastuinbouw ontwikkeld aan de hand van planthormonen, -inhaltsstoffen en het RNA (DNA expressie). Bij divers lopend onderzoek worden dit gemeten om a. het raamwerk te kunnen maken en op termijn b. daarnaast een set van merkers te kunnen afleveren waarbij de praktijk al in een vroeg stadium de mate van omgevingsstress en de werking van plantversterkers (en andere middelen) kan bepalen. In dit rapport worden potentiële merkers in vruchtgroenten (tomaat) en diverse sierteelt gewassen genoemd. Maar het onderzoek is nog niet zo ver dat ze ook al ingezet kunnen worden. Vervolg onderzoek is daarom nodig om dit in kaart te kunnen brengen.

1.7 Doelstelling(en) en afbakening

Er wordt gekeken naar nieuwe methoden, d.i. het gebruik van lokaal aanwezige antagonisten in het groeisubstraat en endofieten in de plant. Het project bevat dus toetsen voor effectiviteit, en het zoeken naar een verklaring van werking. Het raamwerk van het plantafweersysteem wordt gebuikt om de resultaten te onderbouwen.

2 Raamwerk en merkers

Een raamwerk van het plantafweersysteem wordt gebruikt om de werking van nieuwe methoden binnen plantgezondheid (weerbaar telen) te onderzoeken. Dit raamwerk is gebaseerd op de klassieke pijlers van de plantafweer, namelijk de Jasmonzuur (JA) en Ethyleen (Et) route, Salicylzuur (SA) route en Abscisinezuur (ABA) route. Om de betrokkenheid van deze routes te kunnen onderzoeken e/o te valideren, is er gereedschap nodig.

Hiervoor wordt er in dit onderzoek gekeken naar het Ribonucleïnezuur (RNA). RNA is een van drie macromoleculen (met DNA en eiwitten) die essentieel zijn voor alle bekende levensvormen. RNA lijkt qua chemische structuur sterk op DNA, en net als DNA is RNA opgebouwd uit een lange keten van nucleotiden. RNA hoort net zoals DNA tot de nucleïnezuren. Het wordt in organismen gemaakt in een proces dat transcriptie heet: het proces waarbij DNA wordt omgezet naar RNA. De volgorde van de nucleotiden bepaalt de genetische informatie waarvoor het RNA codeert. Alle cellulaire organismen gebruiken boodschapper RNA, afgekort als mRNA, voor het overbrengen van de genetische informatie die de eiwitsynthese regelt (uit: Wikipedia.nl).

In een literatuur studie is gezocht naar de beschikbaarheid van potentiële merkers voor het meten van plant weerbaarheid tegen ziekten en plagen. Voor (vrucht-) groenten gewassen is er zeer veel kennis beschikbaar van het genoom, functionele genen en afweer reacties van de plant tegen ziekten en plagen. Maar voor de sier teelt is er relatief weinig informatie beschikbaar.

2.1 Vruchtgroenten: tomaat

In de literatuur is veel informatie te vinden over de genetische machinerie van tomaat. Ook over de plant afweer routes is al veel in kaart gebracht. In onderstaande tabel zijn een aantal voorbeelden opgenomen ter illustratie. Een volledig overzicht van alle genen wordt gegeven in o.a. Van der Wurff *et al.*, (2015). Omdat er veel potentiële merkers voorhanden zijn is er voor gekozen om in dit onderzoek tomaat mee te nemen als modelgewas.

Tabel 2.1

Overzicht van genen die gebruikt kunnen worden in tomaat voor de bepaling van activiteit van het plant afweer systeem binnen het raamwerk. SA=salicylzuur route; JA=jasmonzuur route; ABA= abscisinezuur route; Et= ethyleen route. Uit: Van der Wurff et al., (2015).

Route	Functie	Genen	
SA	biosynthese	calcium bindend eiwit	
		Plant afweer	Diverse pathogenese eiwitten
		chitinase	
		glucanase	
		beta endo-glucosidase	
JA	biosynthese	lypoxigenase	
			fenyl alanine-lyase
	Plant afweer	peroxidase	
			protease remmer II
ABA	biosynthese	phytoene synthase (carotenoide biosint.)	
			lycopeen synthase (carotenoide biosint.)
			zeaxanthine epoxidase
			violaxanthine de-epoxidase
			neoxanthine synthase
		9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	
	Plant afweer	MAPK	
		catalase	
		tomaat stress gerelateerd	
Et	Plantafweer	hypothetisch proline-rijk eiwit	
			cel expansie/krimping

2.2 Validatie van RNA merkers voor tomaat

Er is een grote hoeveelheid potentiële merkers beschikbaar voor tomaat. Maar deze merkers zijn nog niet gevalideerd. Er is daarom een studie uitgevoerd naar de betrouwbaarheid van een set van merkers voor de JA en de SA route in tomaat. Er werd gekeken naar het de activiteit van deze genen in de wortels, jonge- en oude bladeren.

Twee cultivars werden gebruikt voor het valideren van een set van RNA merkers, namelijk *Lycopersicum esculentum* cv Komeett (DRS) en *Lycopersicum esculentum* cv Sassari (RZ). Na 10 dagen opkweek werden de planten op steenwol geplaatst in potten en 3 weken geïncubeerd voordat er met de behandelingen begonnen werd.

Na vijf weken na zaaien werden de planten behandeld met een "aanschakelaar" (elicitor) van SA route, namelijk 2,6-Dichloroisonicotinic acid (INA), of met JA. Na 0 uur (controle), 6, 24 en na 1 week na het uitvoeren van de behandelingen, werden de bladeren meteen ingevroren in vloeibare stikstof en opgeslagen voor verdere analyse. Per behandeling werd er steeds 3 keer bemonsterd. De RNA extractie werd uitgevoerd volgens de handleiding van QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit. De RNA concentratie en kwaliteit werd bepaald volgens de instructies van Experion™ Automated Electrophoresis System (Bio-Rad).

cDNA synthese werd uitgevoerd volgens het GoTaq 2-Step RT-qPCR System protocol (Promega).

qPCR analyse werd uitgevoerd met het CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System van Bio-Rad. Relatieve cDNA concentratie en statistische analyse (ANOVA) werd uitgevoerd met qBase+ software van Biogazelle met 5 potentiële referentie genen voor de normalisatie van de data.

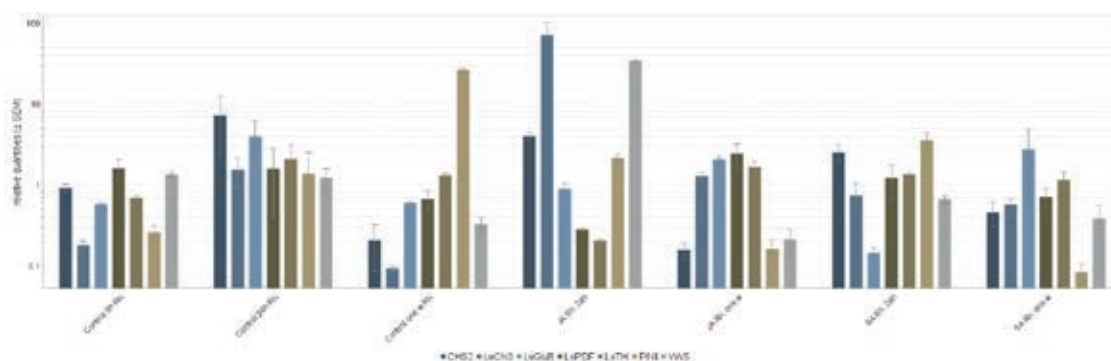
Tabel 2.2

Overzicht van de twaalf genen die gebruikt werden in het validatie experiment w.o. vijf huishoud genen die gebruikt werden als referentie en zeven genen die actief kunnen worden in hetzij de SA of de JA route.

Gen	Gen beschrijving	Forward primer	Reverse primer
Actin	Actine	CACCACTGCTGAACGGGAA	GGAGCTGCTCCTGGCAGTTT
LeChi3	Klasse III chitinase	GCGTTGTGGTTCTGGATGACA	CAGCGGCAGAATCAGCAACA
LeCHS2	Chalcone synthase 2	GGCCGGCGATTCTAGATCA	TTTCGGGCTTTAGGCTCAGTT
LeEF1	Elongatie factor alpha	GGAACCTGAGAAGGAGCCTAAG	CAACACCAACAGCAACAGTCT
LeGAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CTGCTCTCTCAGTAGCCAACAC	CTTCTCCAATAGCAGAGGTTT
LeGluB	β -1,3-glucanase	TTTCGATGCCCTTGTGGATTC	GGCCAACCACTTTCCGATAC
LePDF	Plant defensine	ACTGTGCTTGAAGAAGAGATTGTG	GGCTACTAAAGCCCAATAACACG
LeThi	Thionine	TGTAAGTTGGGCTGTGCCTT	TGGTGCAGTTCTTTGAGCAAG
LeVWS	Vegetatieve wand opslag	TACGGGTGGCATTCCCTTTC	CATTTGAGTGGCACACCAGC
PGK	Fosfoglycerate Kinase	CTTCTCCTTAAAACCTCTCTCC	CTAAGGTCTCCAACGCTCTTCT
PINII	Proteïne Remmer II	GGCCAAATGCTTGACACCTTT	CGTGGTACATCCGGTGGGATA
Tip41	TIP41-achtig Proteïne	ATGGAGTTTTTGAGTCTTCTGC	GCTGCGTTTCTGGCTTAGG

2.2.1 Wortels Komeett

Na 24 uur na de behandeling met INA (SA elicitor), lieten twee genen, LeChi3 en LeVWS, een verhoging van hun activiteit zien in de wortels van Komeett (Figuur 2.1). LeChi3 en VWS vertoonde resp. 46 en 28 keer meer activiteit dan de controle. De 3 andere genen, LeGluB, LePDF en LeThi, vertoonde resp. 4, 6 en 10 keer minder activiteit dan de controle. Een week na de JA behandeling vertoonde LeChi3, LeGluB en LePDF de meeste activiteit, namelijk resp. een factor van 14, 3 en 4. Alleen PINII vertoonde een lagere activiteit, namelijk 154 keer minder dan de controle. Na 24 uur na de SA behandeling, vertoonde alleen PINII een hogere activiteit, namelijk 2.5 keer hoger. LeGluB en VWS vertoonde minder activiteit, resp. 28 en 2 keer minder. Een week na de SA behandeling vertoonde LeChi3 en LeGluB resp. 6 en 4.6 keer meer activiteit. PINII vertoonde zelfs 321 keer minder activiteit.



Figuur 2.1 Relatieve expressie van 7 genen in de wortels van cv. Komeett (RK), 24 uur of een week na de behandeling met elicitors JA of SA.

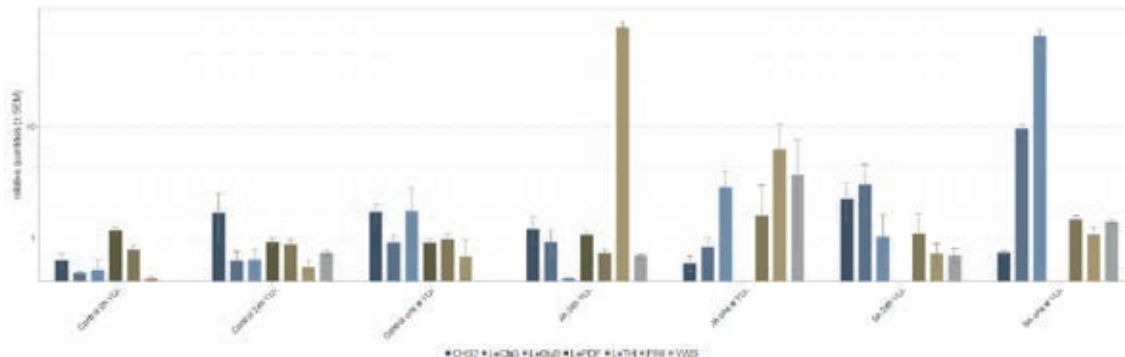
2.2.2 Jonge bladeren Komeett

In Figuur 2.2. staat een overzicht van activiteit van de zeven genen, in jonge bladeren van cv. Komeett. 24 uur na de JA behandeling vertonen LeChi3 en PINII een lagere activiteit resp. een factor 2.3 en 169 ten opzichte van de controle. LeGluB, LeThi en VWS hadden een hogere activiteit van resp. 9, 1.4, en 1.2 keer meer dan de controle.

Een week na de JA behandeling laten PINII en VWS een hogere activiteit zien van resp. 13.8 en 4.2. CHS2 laat een 6 keer lagere activiteit zien.

24 uur na de SA behandeling laat LeChi3 een 9 keer hogere activiteit zien.

Een week na de SA behandeling vertonen LeChi3, LeGluB en LeThi een hogere activiteit (resp. 11.3, 18.7, 1.7 keer). CHS2 laat een verminderde activiteit zien (3.4 keer minder).

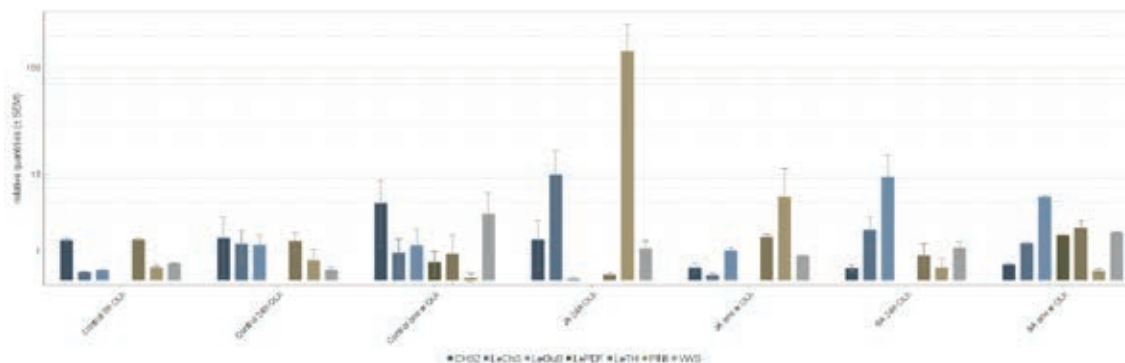


Figuur 2.2 Relatieve expressie van 7 genen in jonge bladeren van cv. Komeett (YLK), 24 uur of een week na de behandeling met elicitors JA of SA.

2.2.3 Oude bladeren Komeett

Figuur 2.3 laat de activiteit zien van zeven genen in oude bladeren van Komeett. 24 uur na de behandeling met JA vertonen LeChi3, PINII en VWS een hogere activiteit, resp. 7.4, 237 en 3.8 keer meer dan de controle. LeGluB en LeThi lieten een lagere activiteit zien (resp. 30.6 en 3 keer minder).

Een week na de behandeling met JA vertonen CHS2 en VWS minder activiteit dan de controle, resp. 14 en 4.6 keer minder. 24 uur na de behandeling met SA laten alleen LeGluB en VWS een hogere activiteit zien, namelijk 7.3 en 4 keer meer. Een week na de behandeling met SA waren LeGluB en LePDF actief resp. met een factor 4.5 en 3.4. Alleen CHS2 laat een hogere waarde zien van 10.5 keer meer dan de controle.



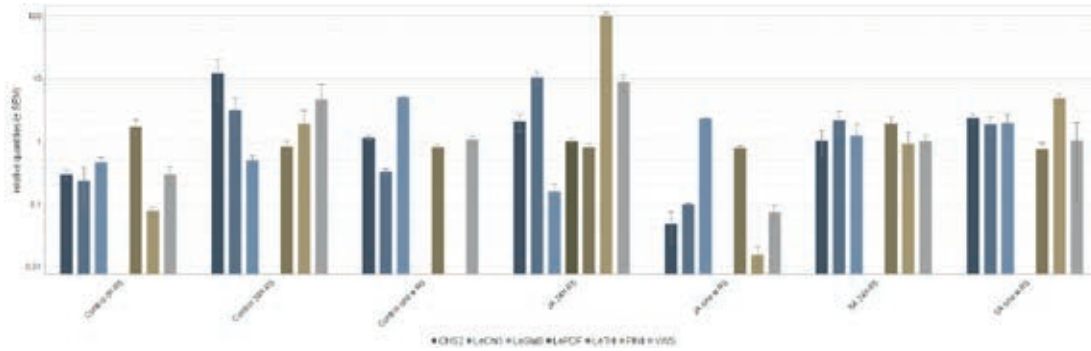
Figuur 2.3 Relatieve expressie van 7 genen in oude bladeren van cv. Komeett (OLK), 24 uur of een week na de behandeling met elicitors JA of SA.

2.2.4 Wortels Sassari

Figuur 2.4 laat de activiteit zien van de zeven genen in de wortels van cv. Sassari.

24 uur na de JA behandeling, LeChi3 en PINII vertonen een hogere activiteit van resp. 3.3 en 52.7 keer meer. LePDF gaat van 0 in de controle naar 1 in de behandelde planten. CHS2 en LeGluB laten een resp. verhoging zien van 5.9 en 3 keer. Een week na de JA behandeling, PINII gaat naar 0.015. CHS2, LeChi3, LeGluB en VWS zijn 23.8, 3.3, 2.4, en 14 keer verhoogd.

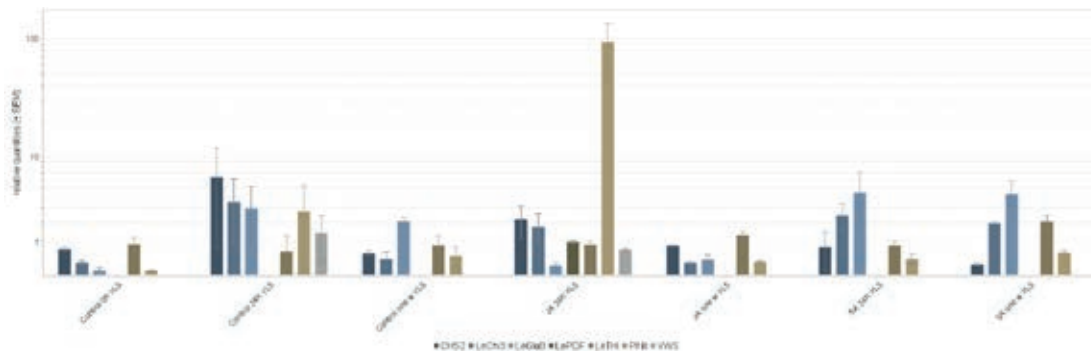
24 uur na SA behandeling, LeGluB en LeThi zijn meer actief met 2.5 en 2.3 verhoging van hun activiteit. CHS2 is 11.9 keer verhoogd. Een week na de SA behandeling, de activiteit van LeChi3 is 5.7 keer verhoogd. PINII gaat naar 4.8 en LeGluB naar 2.6.



Figuur 2.4 Relatieve expressie van 7 genen in de wortels van cv. Sassari (RS), 24 uur of een week na de behandeling met de elicitors van JA of SA.

2.2.5 Jonge bladeren Sassari

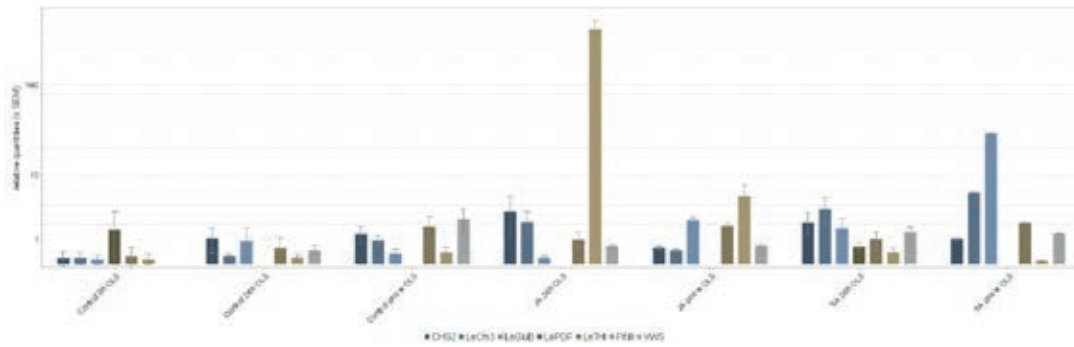
In Figuur 2.5 is afgebeeld de relatieve activiteit van de 7 genen gemeten in jonge bladeren van cv. Sassari. 24 uur na het aanschakelen van de JA route, laat PINII 34.4 keer meer activiteit zien dan de onbehandelde controle. De activiteit van het gen LePDF gaat juist iets omhoog. Het gen LeGluB vermindert de activiteit met een factor 13.6. Een week na het aanschakelen laat alleen gen CHS2 een activiteit zien dat 1.4 keer hoger is dan de onbehandelde controle. LeGluB is minder actief, namelijk 5.3 keer minder. Na 24 uur is alleen het gen VWS actief, namelijk 1.4 keer hoger dan de controle. Na een week is de activiteit van LeChi3, LeGluB en LeThi resp. 4.8, 2 en 2.4 keer hoger dan de controle. De activiteit van CHS2 is 2.4 hoger. De andere genen laten geen significant verschil zien met de onbehandelde controle.



Figuur 2.5 Relatieve expressie van 7 genen in jonge bladeren van Sassari (YLS), 24 uur en een week na toediening van JA of SA.

2.2.6 Oude bladeren Sassari

In Figuur 2.6 is afgebeeld de relatieve activiteit van 7 genen in oude bladeren van cv. Sassari. Na 24 uren nadat JA is toegediend, laten de genen LeChi3 en PINII een verhoogde activiteit zien met 8.3 en 2103 keer hoger dan de onbehandelde controle. Een week na het toedienen van JA, zijn de genen LeGluB en PINII 6.6. en 13.8 keer meer actief dan de controle. Maar CHS2, Lechi3 en VWS zijn minder actief, resp. 2.2, 2 en 3.6 minder actief. Na 24 uur zijn de genen LeChi3 en VWS resp. 13.2 en 2.9 keer meer actief. Gen LePDF neemt toe met een factor van 0.6. Na een week laten alleen Lechi3 en LeGluB een verhoogde activiteit zien van resp. 6.2 en 82 keer de controle.



Figuur 2.6 Relatieve expressie van 7 genen in oude bladeren van Sassari (OLS), 24 uur en een week na toediening van JA of SA.

2.2.7 Conclusie en discussie

Een paar genen laten potentie zien als het gaat om merkers voor de JA of de SA route.

Proteïnase remmer 2 (PINII) laat een betrouwbare response zien na behandeling met JA in deze validatie studie. In de literatuur wordt bevestigd dat dit gen een belangrijke rol speelt na de aanval van een plaag of mechanische schade. Het gen speelt een rol in het remmen van de enzymen van insecten (Sun *et al.*, 2011). Het gen wordt aangeschakeld zowel in wortels en bladeren en blijft zelfs na een week na de behandeling met JA nog actief. Een uitzondering hierin zijn de wortels van Komeett. In de wortels van Komeett blijven ze niet zo lang actief. De activiteit in zowel wortels als bladeren laat zien dat het om een systemisch effect gaat (door de hele plant zichtbaar). Dit wordt bevestigd door Farmer *et al.*, (1992).

Voor de SA route, zowel Glucanase (LeGluB) als Chitinase (LeChi3) kunnen gebruikt worden als merker. Ze laten namelijk een sterk effect zien in wortels, oude- en jonge bladeren en ze zijn nog steeds actief na een week. Chitinase en Glucanase behoren tot de familie van zgn. PR –eiwitten. Ze kunnen de celwand van schimmels afbreken. Vooral als beide actief zijn, kan het effect op de indringer behoorlijk sterk zijn (Wu & Bradford 2003). LeChi3 wordt ook actief na toediening van JA, maar alleen in het beginstadium (na 24 uur). Dit laat zien dat er een interactie is tussen beide routes. LeGluB is actief na SA maar wordt veel actief dan een controle na de JA behandeling. Dit laat mooi zien dat er een tegengestelde werking kan zijn van beide routes.

2.3 Sierteelt

Voor de sierteelt is er veel minder informatie te vinden. Voor *Kalanchoe blossfeldiana* zijn er genen beschreven die invloed hebben op groei (Topp *et al.*, 2009) en die dus ook gebruikt zouden kunnen worden om effecten van plantversterkers te onderzoeken die weliswaar niet gerelateerd zijn aan ziekten en plagen maar wel aan groei en ontwikkeling (RNA genen 13C, KbORF1).

In *Alstroemeria* is divers onderzoek uitgevoerd om te kijken naar genen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van bloemen en genen die betrokken zijn bij de "levensduur in de vaas" (post-harvest stress) onder invloed van droogte en kou. Voor een aantal zijn qPCR probes gemaakt en deze zouden gebruikt kunnen worden in onderzoek naar de invloed van stress op de plantafweer (Wagstaff *et al.*, 2010; Anoniem report 2001).

In *Chrysanthemum morifolium* is gekeken naar WRKY transcriptie factoren (Song *et al.*, 2014). Deze hebben een belangrijke functie in diverse processen in de plant. In het onderzoek is gekeken naar de betrokkenheid van deze factors in biotische en abiotische stress, o.a. zout stress, water, temperatuur, bladshade, *Alternaria*, *Puccinia*, de bladluis *Macrosiphoniella* en *Fusarium*. Voor een aantal WRKY factoren zijn qPCR probes ontwikkeld. Ook is er gekeken naar de genen die betrokken zijn bij droogte (Xu e.a 2013) en bij de afweer van de bladluis *Macrosiphoniella* (Xia *et al.*, 2014). In *Chrysanthemum nankingense* zijn transcriptie factoren onderzocht die betrokken zijn bij de Ethylene (Et) route en bij de reactie op droogte en die actief zijn na behandeling van JA, SA en ABA (Gao *et al.*, 2015).

In de literatuur worden vooral in chrysant diverse genen en (qPCR) probes genoemd die gebruikt kunnen worden bij onderzoek naar het raamwerk van plantversterkers.

3 Endofytische micro-organismen in verschillende plantensoorten

3.1 Wat zijn endofieten?

Endofieten zijn micro-organismen (bacteriën en schimmels) die leven binnen in planten. In het onderzoek gaat het om soorten die geen nadelig effect hebben op plantgroei en ontwikkeling. Vaak zijn het de micro-organismen die positief effect hebben op productie (opbrengst) door verbetering van nutriënten opname van de plant of productie van secundaire metabolieten (o.a. plant hormonen). Er zijn ook talrijke aanwijzingen dat endofieten een belangrijke rol spelen in het verdedigen van de plant tegen ziekten en plagen. Binnen dit project zijn er endofytische bacteriën geïsoleerd uit tomaat en endofytische bacteriën en schimmels uit chrysanthe en lisianthus.

3.1.1 Endofieten uit tomaat

Bacteriële endofieten zijn geïsoleerd uit stengels van tomaat (cultivar Komeett). Hiervoor is er een coupe uit de stengelbasis (net boven de wortel) gesneden van twee planten. Er zijn 95 bacteriële endofieten geïsoleerd. 71 daarvan zijn geïdentificeerd op basis van sequentie van hun 16S rDNA. Het gaat alleen over bacteriële endofieten die kweekbaar zijn op microbiologisch voedingsbodems (zoals nutriënten agar). Diversiteit van niet kweekbare endofieten is niet meegenomen in dit onderzoek.

3.1.1.1 Isolatie van endofieten

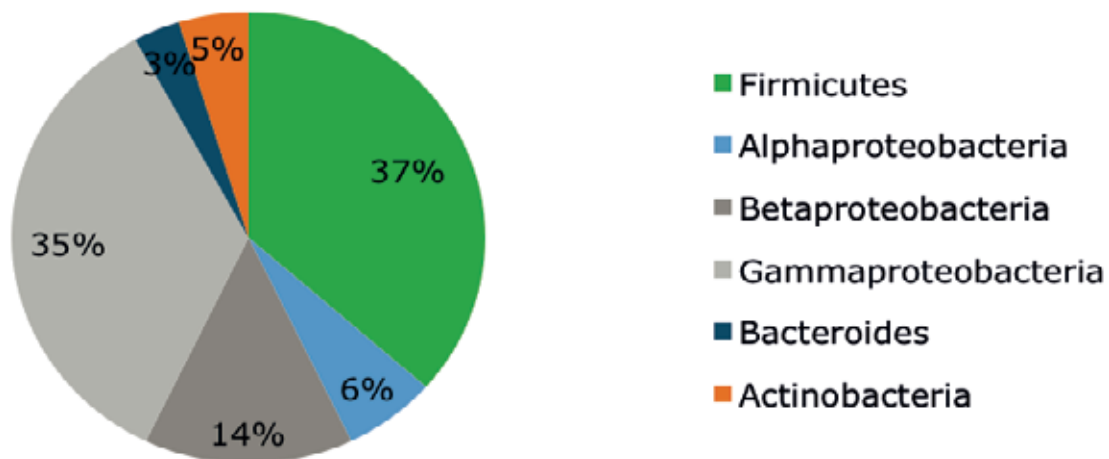
Oppervlak van fragmenten van stengels is gesteriliseerd met natrium hypochloriet (2%; 10minuten) en ethyl alcohol (70%; 10 minuten) en daarna 3 keer met steriel demiwater gespoeld. Monsters voor isolatie van bacteriën zijn genomen aan binnenkant van stengelweefsel.

Weefselmonsters van 1g vers gewicht zijn vervolgens opgelost in 10mL van steriele oplossing van fysiologisch zout (0.95% NaCl) en geschud voor 20 minuten (met 125 rotaties per minuut). Verdunningsreeks is gemaakt en uitgeplaat op standaard voedingsmedium (NA- nutriënten agar). Na 48-72 uur is de groei van bacteriën op platen gecheckt en kolonies met verschillende morfologie zijn gekozen om ze verder op te schonen tot rein culturen.

3.1.1.2 Identificatie van endofieten

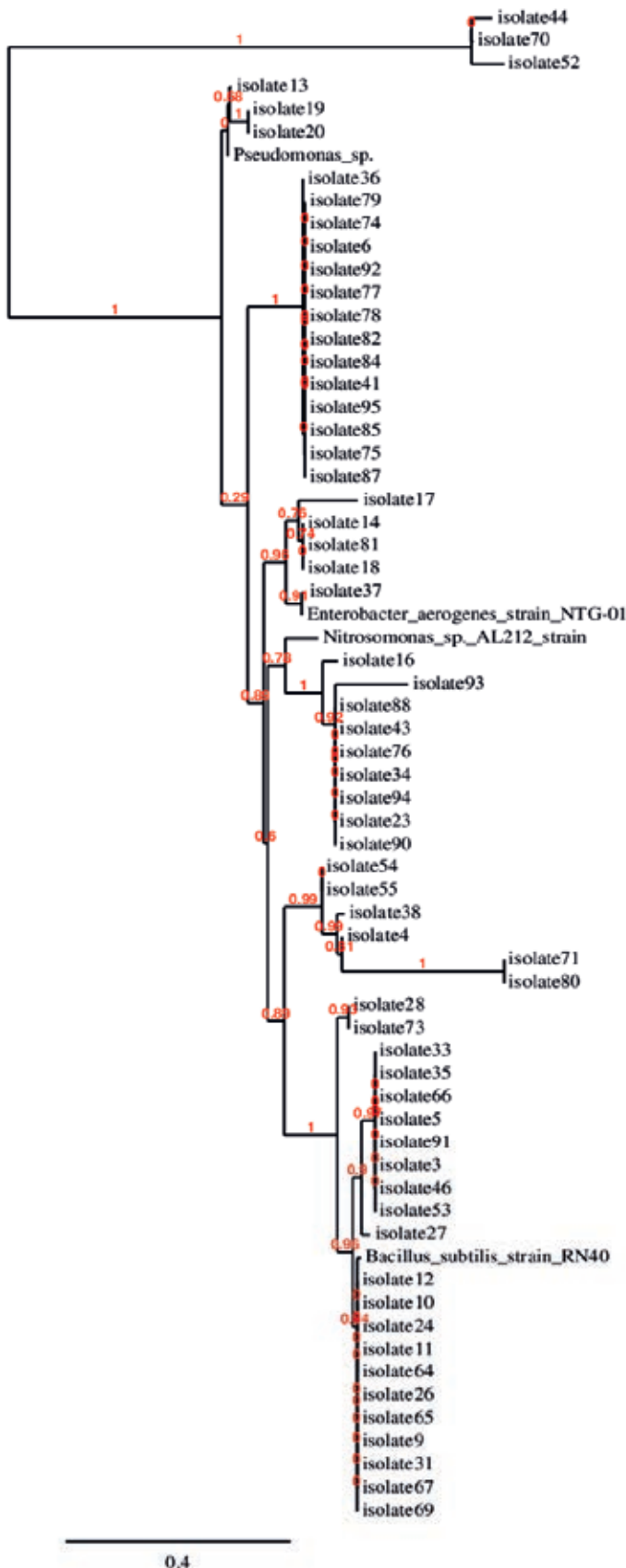
Voor identificatie van isolaten is gebruik gemaakt van moleculaire technieken. Identificatie van bacteriën is mogelijk op basis van 16S rDNA gen sequentie. Er zijn bacteriële kweken opgezet op vloeibare medium (*nutrient broth*). Uit 24uur kweek is DNA geïsoleerd met behulp van DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) volgens aanwijzingen van de producent. DNA van bacteriële isolaten is gebruikt in PCR reactie met primers voor 16S rDNA (primer set: 27F en 1492R). Producten van PCR reacties zijn verder opgeschoond met PCR clean-up kit (Qiagen) en opgestuurd voor de bepaling van de samenstelling van het DNA naar BaseClear BV (Leiden, Nederland).

Er zijn 71 endofieten geïdentificeerd op basis van sequentie van het 16S ribosomaal (r)DNA. Uit een analyse van de sequenties aan de hand van sequenties die gedeponeerd zijn in Genbank (www.genbank.com) blijkt dat meeste isolaten behoren tot de *Firmicutes* (37%; o.a. *Bacillus* soorten) en gamma Proteobacteria (35%; o.a. *Pseudomonas* soorten). Zie Figuur 3.1 voor een overzicht.



Figuur 3.1 Diversiteit van bacteriële endofieten uit tomaat. Deze fractie is kweekbaar op standaard microbiologische agar voedingsbodems.

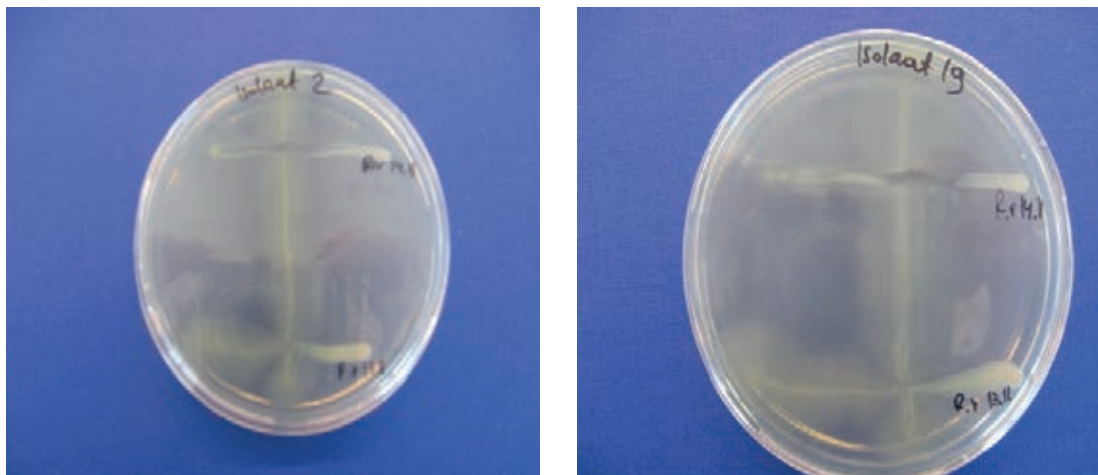
Fylogenetische relaties tussen geïsoleerde endofieten zijn ook onderzocht en weergegeven in fylogenetisch boom in Figuur 3.2.



Figuur 3.2 Fylogenetisch (verwantschap) boom van bacteriële endofieten uit tomaat cv. Komeett op basis van 16S rDNA sequentie. In de clusters zitten isolaten die aan elkaar nauw verwant zijn. Boven de lijnen staan rode cijfers (van 0 tot 1). Het cijfer geeft aan in welke mate isolaten van elkaar verschillen. Een laag cijfer (bijvoorbeeld een 0) betekent dat isolaten weinig van elkaar verschillen. Om de analyse te kunnen interpreteren zijn drie bekende soorten (referenties) meegenomen in de analyse: *Nitrosomonas* (AL212), *Bacillus subtilis* (RN40) en *Enterobacter aerogenes* (NTG01). Aan de rechter zijde staan de groepen aangegeven, d.i. Actinobacteria, Proteobacteria, Bacterioidetes en Firmicutes.

3.1.1.3 Antagonisme potentieel van endofieten uit tomaat tegen *Rhizobium rhizogenes*

Endofytische isolaten uit tomaat zijn getoetst *in vitro* op antagonisme tegen de bacterie *Rhizobium rhizogenes*. Deze bacterie veroorzaakt overmatige wortelgroei symptomen in tomaat, aubergine en komkommer. Gebruik makend van zgn. duoplate techniek zijn 6 isolaten geïdentificeerd die directe antagonisme tegen *Rhizobium rhizogenes* laten zien (isolaten 2, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 23). Een voorbeeld van deze duoplate techniek is hieronder weergegeven in Figuur 3.3.



Figuur 3.3 Directe antagonisme van bacteriële endofieten tegen *Rhizobium rhizogenes*, de veroorzaker van overmatige wortelgroei. De middelste streek wordt veroorzaakt door de bacterie *Rhizobium*. De bovenste en onderste strepen worden veroorzaakt door andere bacteriën (endofieten).

3.1.2 Endofieten uit lisianthus

Endofieten zijn geïsoleerd uit stengels van drie cultivars: Piccolo White, Rosita White en Arena Champagne. Er zijn bacteriële en schimmel endofieten geïsoleerd.

3.1.2.1 Endofieten isolatie procedure

Oppervlak van fragmenten van stengels is gesteriliseerd met natrium hypochloriet (2%; 10minuten) en ethyl alcohol (70%; 10 minuten) en daarna 3 keer met steriel demiwater gespoeld. Monsters voor isolatie van bacteriën zijn genomen aan binnenkant van stengelweefsel.

Weefselmonsters van 1g vers gewicht zijn vervolgens opgelost in 10mL van steriele oplossing van fysiologisch zout (0.95% NaCl) en geschud voor 20 minuten (met 125 rotaties per minuut). Verdunningsreeks is gemaakt en uitgeplaat op standaard voedingsmedium voor bacteriën (NA- nutriënt agar) en schimmels (PDA- Potato Dextrose Agar). Na 48-72 uur is de groei van bacteriën en schimmels op platen gecheckt en kolonies met verschillende morfologie zijn gekozen om ze verder op te schonen tot rein cultuur.

In Tabel 3.1 is een aantal van kweekbare endofieten uit verschillende lisianthus rassen weergegeven.

Tabel 3.1

Aantal endofieten in verschillende Lisianthus rassen.

Kweekbare fractie op standaard microbiologische agar voedingsbodems uit Arena, Piccolo en Rosita.

Lisianthus	Arena	Piccolo	Rosita
Schimmels	15	6	18
Bacteriën	21	13	25

3.1.2.2 Antagonisme potentieel van endofieten uit Lisianthus tegen plant pathogene *Fusarium*

Endofytische isolaten uit Lisianthus zijn getoetst *in vitro* op antagonisme tegen *Fusarium* (ziekteveroorzaker uit lisianthus). Deze schimmel veroorzaakt o.a. voetrot.

Gebruik makend van duoplate techniek zijn 4 bacteriële en 2 schimmel isolaten geïdentificeerd die directe antagonisme tegen *Fusarium* laten zien. Een voorbeeld van duoplate techniek is weergegeven in Figuur 3.4.



Figuur 3.4 Direct antagonisme van bacteriële en schimmel endofieten tegen een pathogene *Fusarium* sp. uit *Lisianthus*.

3.1.3 Endofieten uit chryasant

Endofieten zijn geïsoleerd uit stengels van cultivar Euro. Er zijn bacteriële-, en schimmel endofieten geïsoleerd volgens procedure beschreven hieronder.

3.1.3.1 Isolatie van endofieten

Oppervlak van fragmenten van stengels is gesteriliseerd met natrium hypochloriet (2%; 10minuten) en ethyl alcohol (70%; 10 minuten) en daarna 3 keer met steriel demiwater gespoeld. Monsters voor isolatie van bacteriën zijn genomen aan binnenkant van stengelweefsel.

Weefselmonsters van 1g vers gewicht zijn vervolgens opgelost in 10mL van steriele oplossing van fysiologisch zout (0.95% NaCl) en geschud voor 20 minuten (met 125 rotaties per minuut). Verdunningsreeks is gemaakt en uitgeplaat op standaard voedingsmedium voor bacteriën (NA- nutriënten agar) en schimmels (PDA- Potato Dextrose Agar). Na 48-72 uur is de groei van bacteriën en schimmels op platen gecheckt en kolonies met verschillende morfologie zijn gekozen om ze verder op te schonen tot rein culturen.

In Tabel 3.2 is een aantal van kweekbare endofieten uit chryasant (cv. Euro) weergegeven.

Tabel 3.2

Aantal endofyten in Chryasant cv euro.

Kweekbare fractie op standaard microbiologische agar voedingsbodems.

Chryasant	Euro
Schimmels	17
Bacteriën	26

4 Antagonisten in groeisubstraten

Antagonistische micro-organismen zijn bacteriën en schimmels die directe effect hebben op overleving of groei van plant pathogene ziekten en plagen. Antagonistische micro-organismen kunnen plant pathogenen doden door productie van antibiotica of andere secundaire metabolieten. Antagonisten kunnen ook werken door direct te parasiteren van organisme (bijvoorbeeld schimmels of aaltjes).

In dit project zijn er antagonistische bacteriën geïsoleerd tegen:

1. Wortelknobbelaaltje (*Meloidogyne incognita*) uit grond van biologische teelt van tomaat.
2. *Pythium ultimum* uit grond van chrysantenteelt.
3. *Fusarium solani* en *F. oxysporum* uit gebruikte groeisubstraten uit de teelt van amaryllis (groei substraten kleikorrels en perliet).

4.1 Antagonisten tegen juveniele (J2) *Meloidogyne* uit grond van de biologische teelt van tomaat

Mogelijke bacteriële antagonisten tegen aaltje *Meloidogyne* zijn geïsoleerd uit grond afkomstig uit biologische teelt van tomaat onder glas in Nederland (BioVerbeek BV). Er zijn >20 bacteriële isolaten met verschillende kolonie morfologie geïsoleerd. Vervolgens zijn er 10 isolaten gebruikt in *in vitro* toets op antagonisme tegen *Meloidogyne* juveniele (J2 stadium) en geïdentificeerd op basis van sequentie van hun 16S rDNA. Ook 4 isolaten uit collectie van het CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre zijn meegenomen in onderzoek naar antagonisme (*Bacillus firmus*, *B. thuringiensis*, *Pseudomonas* sp. 184 en *Pseudomonas* sp. 518)

4.1.1 Isolatie van antagonisten

Grondmonsters van 10g vers gewicht zijn opgelost in 90mL van steriele oplossing van PBS (Phosphate Buffered Saline) en geschud voor 20 minuten (met 125 rotaties per minuut). Verdunningsreeks is gemaakt en uitgeplaat op standaard voedingsmedium (NA- nutrient agar). Na 48-72 uur is de groei van bacteriën op platen gecheckt en kolonies met verschillende morfologie zijn gekozen om ze verder op te schonen tot rein culturen.

4.1.2 Identificatie van antagonisten

Voor identificatie van isolaten is gebruik gemaakt van moleculaire technieken. Identificatie van bacteriën is mogelijk op basis van 16S rDNA gen sequentie. Er zijn bacteriële kweken opgezet op vloeibare medium (nutrient broth). Uit 24uur kweek is DNA geïsoleerd met behulp van DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) volgens aanwijzingen van het producent. DNA van bacteriële isolaten is gebruikt in PCR reactie met primers voor 16S rDNA (primer set: 27F en 1492R). Producten van PCR reacties zijn verder opgeschoond met PCR clean-up kit (Qiagen) en opgestuurd voor DNA analyse naar BaseClear BV (Leiden, Nederland). De identiteit van de 10 isolaten uit de grond die werden gebruikt in de *in vitro* antagonisme toets tegen aaltjes is weergegeven in Tabel 4.1.

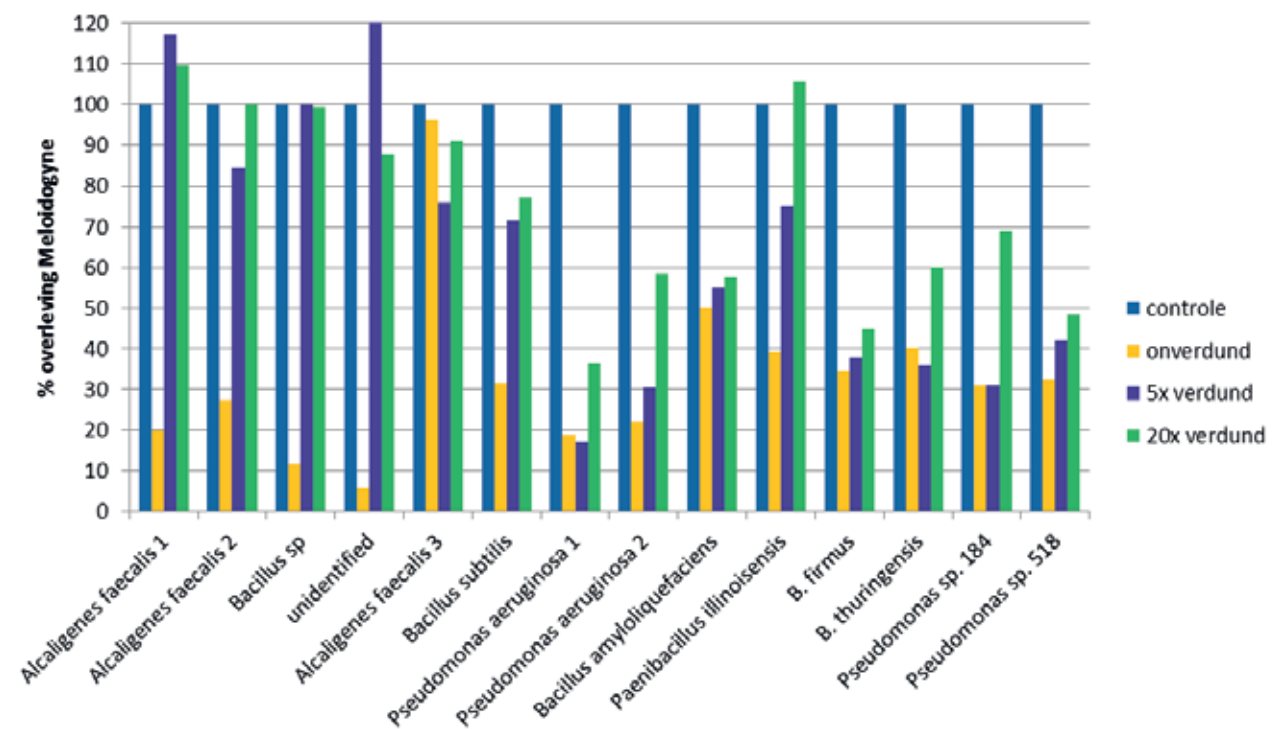
Tabel 4.1

Identificatie van bacteriële isolaten uit grond bioteelt tomaat.
Identiteit is bepaald aan de hand van het 16s rDNA gen.

Isolaat nr.	Naam
1	<i>Alcaligenes faecalis</i>
2	<i>Alcaligenes faecalis-1</i>
3	<i>Bacillus</i> sp
4	uncultured bacterium
5	<i>Alcaligenes faecalis</i>
6	<i>Bacillus subtilis</i>
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
10	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>

4.1.3 Toets *in vitro* van antagonistisch effect van bacteriële metabolieten op juveniele *Meloidogyne incognita* (J2 stadium)

Steriel supernatant (vloeibare fractie) van 24uur bacteriële kweken is gebruikt om antagonistische werking van bacteriële metabolieten tegen juveniele (J2) van *Meloidogyne incognita* te bepalen. Voor deze bepaling is aangepaste protocol gebruikt voor ecotoxicologisch onderzoek. Aantal overlevende juveniele *Meloidogyne* was bepaald 24 en 48 uur nadat J2's blootgesteld waren aan *supernatant* van de bacteriële kweken (in drie concentraties: onverdund, 5 keer en 20 keer verdund). Resultaten van deze *in vitro* toets zijn weergegeven in Figuur 4.1.



Figuur 4.1 Overleving van juveniel stadium (J2) van *Meloidogyne incognita* na blootstelling aan steriele oplossing (supernatant) van bacteriële kweek met bacteriële metabolieten (onverdund, 5x verdund en 20x verdund).

4.2 Antagonisten tegen *Fusarium solani* en *Fusarium oxysporum* in Amaryllis

De Amaryllis teelt heeft veel last van *Fusarium* spp. Aangetaste bollen zijn niet bruikbaar voor de teelt. Er zijn bacteriële antagonisten voor twee *Fusarium* soorten (*F. solani* en *F. oxysporum*) geïsoleerd uit gebruikte groeisubstraten afkomstig van praktijk bedrijven (kleikorrels en perliet).

4.2.1 Isolatie procedure

Groei-substraatmonsters van 10g vers gewicht zijn opgelost in 90mL van steriele oplossing van PBS (Phosphate Buffered Saline) en geschud voor 20 minuten (met 125 rotaties per minuut). Verdunningsreeks is gemaakt en uitgeplaat op standaard voedingsmedium (NA- nutriënt agar). Na 48-72 uur is de groei van bacteriën op platen gecheckt en kolonies met verschillende morfologie zijn gekozen om ze verder op te schonen tot rein culturen. Er zijn in totaal 40 verschillende soorten van bacteriën geïsoleerd uit beide substraten (20 isolaten uit perliet, 20 isolaten uit kleikorrels).

4.2.2 Identificatie van bacteriële isolaten uit groeisubstraten van amaryllis

Identificatie van bacteriële isolaten was gedaan zoals in punt 4.2.1 beschreven is. Negen isolaten die meer dan 50% groeiremming veroorzaakten van *F. solani* en *F. oxysporum* in een *in vitro* toets. Identificatie van bacteriële isolaten is samengevat in Tabel 4.2.

Tabel 4.2

Identificatie van bacteriële isolaten uit groeisubstraat van amaryllis (kk=kleikorrels en p=perliet).

Isolaat nr.	Naam
KK2	<i>Microbacterium sp.</i>
KK3	<i>Pseudomonas sp.</i>
KK4	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>
KK5	<i>Bacillus sp.</i>
KK9	<i>Pseudomonas sp.</i>
P1	<i>Serratia marcescens</i>
P8	<i>Serratia marcescens</i>
P17	<i>Bacillus pumilis</i>
P18	<i>Burkholderia sp.</i>

4.2.3 *In vitro* antagonisme van bacteriële isolaten tegen *F. oxysporum* en *F. solani*

Voor *in vitro* toetsen van antagonisme is duoplate techniek gebruikt om directe antagonistische werking van bacteriële isolaten op *F. solani* en *F. oxysporum* vast te stellen. In Figuur 4.2 zijn voorbeelden te zien van *in vitro* toets antagonisme.



Figuur 4.2 Directe antagonisme van bacteriële isolaten tegen *Fusarium* uit *Amaryllis*.

In Tabel 4.3 is het percentage van *Fusarium* groeiremming weergegeven in *in vitro* toets met verschillende bacteriële isolaten uit groeisubstraten.

Tabel 4.3

In vitro antagonistische werking van bacteriële isolaten uit klei en perliet substraat amaryllis tegen *F. oxysporum* en *F. solani*.

Isolaten*	remming van <i>F. oxysporum</i> groei (%)	remming van <i>F. solani</i> groei (%)
P1	52.17	14.6
P8	74.31	45
P17	64	87
P18	81	61
KK2	66.01	51
KK3	60.47	23
KK4	70.75	59
KK5	64.43	25
KK9	47.83	32

*P- isolatie uit perliet substraat; KK-isolatie uit kleikorrels

4.3 Antagonisten tegen *Pythium ultimum* in chryasant

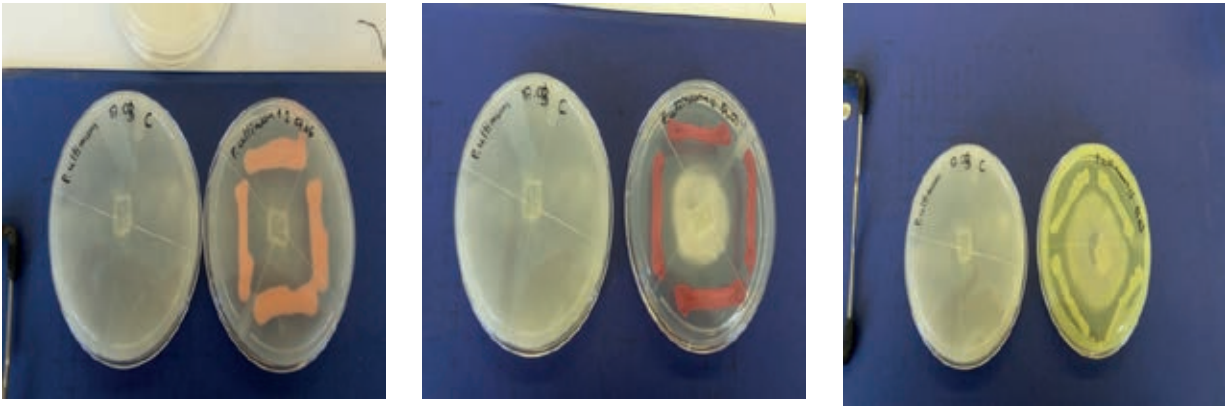
Teelt van chryasant heeft veel last van *Pythium* aantasting in eerdere stadia van de teelt. Binnen dit project zijn bacteriële antagonisten tegen *Pythium ultimum*, geïsoleerd uit grond chryasantenteelt.

4.3.1 Isolatie procedure

Grondmonsters van 10g vers gewicht werden opgelost in 90mL steriele oplossing van PBS (Phosphate Buffered Saline) en geschud voor 20 minuten (met 125 rotaties per minuut). Verdunningsreeks werd gemaakt en uitgeplaat op standaard voedingsmedium (NA- nutriënt agar). Na 48-72 uur werd de groei van bacteriën op platen gecheckt en kolonies met verschillende morfologie gekozen om ze verder op te schonen tot rein culture. Er werden in totaal 35 verschillende soorten van bacteriën geïsoleerd uit grond chryasantenteelt.

4.3.2 *In vitro* antagonisme van bacteriële isolaten tegen *Pythium ultimum*

Voor *in vitro* toetsen van antagonisme is een duoplate techniek gebruikt om de directe antagonistische werking van bacteriële isolaten tegen *Pythium ultimum* te onderzoeken. In Figuur 4.3 zijn voorbeelden weer gegeven van *in vitro* toets antagonisme. Er zijn 5 antagonisten uit de chrysangrond geïsoleerd met een hog percentage van groeiremming van *Pythium ultimum*. Resultaten van de *in vitro* toets zijn weergegeven in Tabel 4.4.



Figuur 4.3 Directe antagonisme van bacteriële isolaten tegen *Pythium ultimum* uit chrysant.

Tabel 4.4

Remming van *P. ultimum* groei (%).

Isolaten*	remming van <i>P. ultimum</i> groei (%)
Isolaat KR1	63
Isolaat KR11	78
isolaat KR13	54
isolaat KR14	52
isolaat KR15	41

5 Antagonisten in biotoetsen

5.1 Biotoets met bacteriële isolaten op ontwikkeling van *Pythium* wortelrot in chryasant

De grond in de biotoets is afkomstig van een praktijkbedrijf van een teler van chryasant. De grond werd gestoomd voordat het werd verzameld en vervoerd naar de kassen van Wageningen UR Glastuinbouw in Bleiswijk. Uit dezelfde grond werd eerder ook de antagonisten geïsoleerd. De grond werd besmet met *Pythium ultimum*, eerder geïsoleerd uit chryasant (Van der Wurff *et al.*, 2011). Voor de biotoets werden 800 mL potten gebruikt en chryasant cv. Grand Pink volgens Van der Wurff *et al.*, (2011). Twee weken na het steken van de onbewortelde ent in de pot werd begonnen met de eerste toediening van de antagonisten. Vervolgens werd tweewekelijks het isolaat toegediend. Zie Tabel 5.1 voor een overzicht van de bacteriële isolaten en de behandelingen in de biotoets.

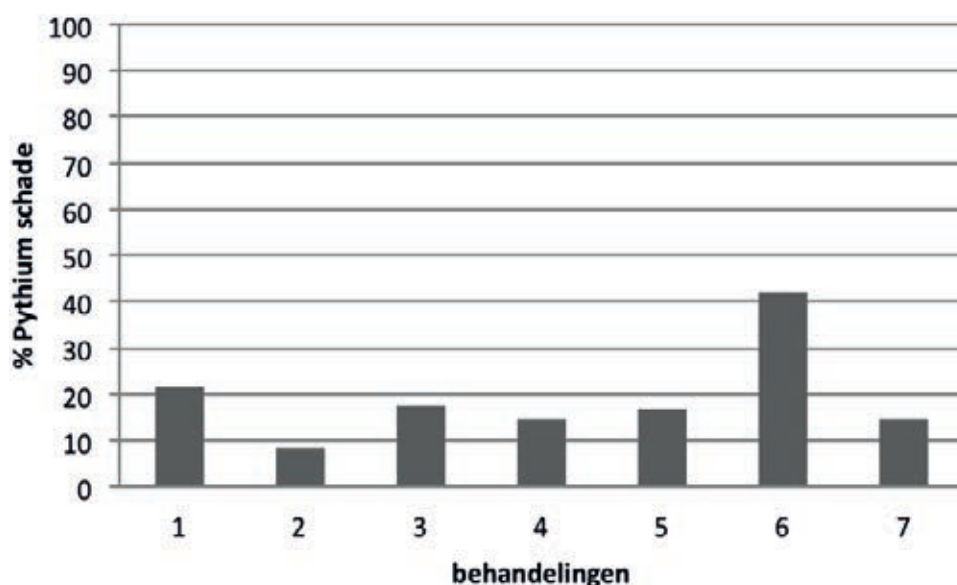
Tabel 5.1

Overzicht van de behandelingen in de biotoets chryasant.

Isolaten zijn geïsoleerd uit de bedrijfsgrond van een chrysantenteler in de Bommelerwaard.

behandeling	Isolaat
1	KR1
2	KR11
3	KR13
4	KR14
5	KR15
6	Positieve controle
7	Negatieve controle

Schade werd gescoord als bruinverkleuring binnen in de stengel basis. De bruinverkleuring werd gevalideerd als symptoom door bruin weefsel uit te platen op groeimedium en te controleren op *Pythium*. In de analyse werd gecorrigeerd met symptomen waarvan niet met zekerheid kon worden vastgesteld dat het veroorzaakt werd door *Pythium*. Deze werden meegenomen als co-variabele in een GLM procedure (SPSS). De positieve controle liet de meeste schade zien, zie Figuur 5.1. Alle isolaten verschilde significant in de mate van schade met de positieve controle. Bij een aantal planten werd een achtergrond besmetting van *Fusarium* aangetroffen. Deze schimmels is waarschijnlijk afkomstig uit de grond van het praktijkbedrijf.



Figuur 5.1 De mate van *Pythium* schade (% schade) bij chrysant cv. Grand Pink, per behandeling. De isolaten zijn eerder geïsoleerd uit de grond van het praktijkbedrijf dat ook gebruikt werd voor deze biotoets. De grond werd gestoomd en vervolgens verzameld. Alle isolaten (1-5) verschilde significant in de mate van schade met de positieve controle (6). Bij een aantal planten werd een achtergrond besmetting van *Fusarium* sp. aangetroffen.

5.2 Biotoets met bacteriële isolaten op ontwikkeling van wortelknobbelaaltjes in biologische tomaat

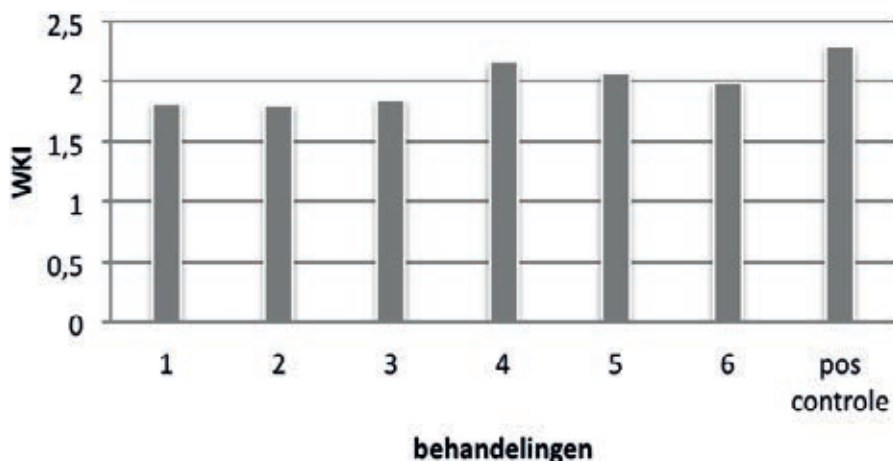
De grond in de biotoets was afkomstig van een praktijkbedrijf van een teler van biologische tomaat. Uit dezelfde grond werden eerder ook de antagonisten geïsoleerd. De grond was besmet met *Meloidogyne* spp. Voor de biotoets werden 800 mL potten gebruikt en tomaat cv. Komeett volgens Van der Wurff *et al.*, (2011). De opkweek van cv. Komeett werd uitgevoerd in Bleiswijk. Meteen na het zaaien werd begonnen met de eerste toediening van de antagonisten. Een tweede toediening meteen bij het planten in de potten en vervolgens tweewekelijks. Zie Tabel 5.2 voor een overzicht van de bacteriële isolaten en de behandelingen in de biotoets.

Tabel 5.2

Overzicht van de behandelingen in de biotoets tomaat.

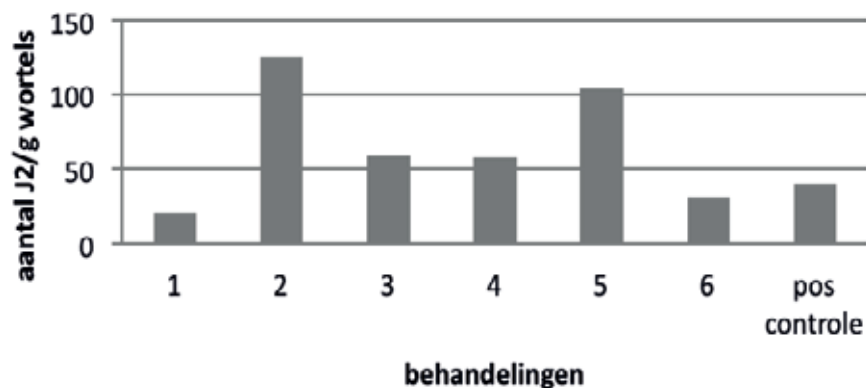
behandeling	Isolaat
1	isolaat 1A: <i>Alcaligenes</i>
2	isolaat 3A: <i>Bacillus</i>
3	isolaat 4A: -
4	isolaat 5A
5	isolaat 6A
6	isolaat 9
7	positieve controle

In de proef kwam de positieve controle duidelijk naar voren met de meeste wortelknobbel schade (WKI-waarde). Behandelingen 1 (isolaat 1A *Alcaligenes* sp.), 2 (isolaat 3A *Bacillus* sp.), 3 (isolaat 4A) en 6 (isolaat 9) verschilde significant van de positieve controle. Ze laten minder wortelknobbel schade zien (Figuur 5.2).



Figuur 5.2 De mate van wortelschade bij tomaat cv. Komeett, weergegeven als wortelknobbelindex WKI (0=geen schade, 10= erg veel schade) per isolaat. De positieve controle heeft significant de hoogste WKI-waarde en behandelingen 1 (isolaat 1A *Alcaligenues* sp.), 2 (isolaat 3A *Bacillus* sp.), 3 (isolaat 4A) en 6 (isolaat 9) verschillen significant van de positieve controle.

Als er vervolgens gekeken werd naar de hoeveelheid nakomelingen in de wortels (de hoeveelheid J2), dan verschilde behandeling 2 en behandelingen 1 (isolaat 1A *Alcaligenues*) significant van de positieve controle (Figuur 5.3). Deze behandelingen resulteerde in minder nakomelingen in de wortels. De hoeveelheid nakomelingen werd bepaald zoals beschreven in Van der Wurff *et al.*, (2011)



Figuur 5.3 De hoeveelheid aaltjes in de wortels van tomaat cv. Komeett, weergegeven als het aantal J2 per gram vers wortelgewicht per isolaat. Behandeling 2 (isolaat 3A *Bacillus* sp.) en behandelingen 1 (isolaat 1A *Alcaligenues*) verschillen significant van de positieve controle.

5.3 Conclusie en discussie

5.3.1 *Pythium* in chrysant

De isolaten bleken uitermate succesvol in het tegengaan van *Pythium ultimum* schade in chrysant. Alle isolaten die eerder uit niet-gestoomde grond werden geïsoleerd, lieten een onderdrukking zien van de *Pythium* schade. De grond die gebruikt werd in de biotoets werd gestoomd op het praktijkbedrijf, vervolgens verzameld en ingezet in de kasproef. Door het grondstomen werd de grond ontdaan van micro-leven. Daardoor was er waarschijnlijk minder competitie tussen *Pythium* en andere micro-leven. Dit resulteerde vervolgens in een snel toenemende schade. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor de effectiviteit van alle isolaten in deze toets. Eerder onderzoek liet namelijk zien dat algemene activiteit van het bodemleven verantwoordelijk kan zijn voor de onderdrukking van *Pythium* schade in chrysant (Van der Wurff *et al.*, 2014). Ook al werden de behandeling relatief laat gestart, de isolaten waren toch effectief, namelijk twee weken nadat stekken werden geplant in de potten.

5.3.2 Wortelknobbelaaltje in tomaat

In de proef met tomaat, laten isolaten *Bacillus* sp. en *Alcaligenes* sp. een vermindering zien van zowel wortelknobbelschade als de hoeveelheid nakomelingen in de wortels. Twee andere waren ook effectief tegen de wortelschade. De behandeling met de isolaten werd al gestart in de opkweek bij het zaaien. Het onderdrukkend effect kan verklaard worden door een antagonistische werking in de grond en/of door het aanschakelen van het plantafweer systeem. In tegen stelling tot de proef met *Pythium* in chrysant, was het pathogeen (de aaltjes) al aanwezig in de grond. Hierdoor lijkt het belangrijk om al vroeg (in de opkweek) met de behandelingen te starten.

6 Conclusie en discussie

6.1 Antagonisten *in vitro* toets

6.1.1 *Meloidogyne*

Er werden 20 soorten bacteriën geïsoleerd uit grond van een biologische teler van tomaat. Tien isolaten werden gebruikt in een *in vitro* (lab) toets. Hiervan lieten vier soorten een onderdrukking zien van het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne incognita*. Deze soorten behoorde tot de groep van *Bacillus* sp., *Alcaligenes* sp. en *Pseudomonas* sp.

6.1.2 *Fusarium*

Er werden tien soorten geïsoleerd uit perliet en tien soorten uit klei-korrels afkomstig van de teelt van Amaryllis. Hiervan gaven vijf isolaten een remming van meer dan vijftig procent op de groei van *F. solani* (vier uit perliet en eentje uit klei-korrels). Vijf isolaten gaven remming van *F. oxysporum* (eentje uit perliet en vier uit klei-korrels). Deze zijn op naam gebracht met behulp van DNA analyse.

6.1.3 Endofieten uit de plant

Endofieten zijn micro-organismen die voorkomen in de planten. Over hun rol is nog weinig bekend. In tomaat (cv. Komeett) is een grote hoeveelheid aan bacteriën aangetroffen. Deze zijn op naam gebracht met behulp van DNA analyse. Deze soorten behoren tot de Firmicutes (37%, o.a. *Bacillus* soorten), Gamma Proteobacteria (35%, o.a. *Pseudomonas* soorten) en Alpha Proteobacteria, Beta Proteobacteria, Bacteroides en Actinobacteria. Zes isolaten lieten *in vitro* (op agar medium) een onderdrukking zien van de pathogene bacterie *Rhizobium rhizogenis*. In Lisianthus en chrysanth werden minder soorten geïsoleerd: uit Lisianthus 15-18 schimmel soorten en 13-25 bacteriën en uit chrysanth 17 schimmels en 26 bacteriën.

6.2 Antagonisten in pottenproef

In de potproeven met tomaat en chrysanth lieten vier isolaten, w.o. *Bacillus* sp. en *Alcaligenes* sp. een remming zien van wortelschade veroorzaakt door het wortelknobbelaaltje *Meloidogyne* spp. Zowel *Bacillus* sp. als *Alcaligenes* sp. gaf ook een vermindering van het aantal nakomelingen in de wortels. Daarnaast lieten alle isolaten in chrysanth een remming zien van de schade veroorzaakt door *Pythium ultimum*. Er wordt bediscussieerd dat algemeen microbiologische activiteit belangrijk is voor de onderdrukking van schade door *Pythium*. De grond die gebruikt werd in deze proef was een dag voor het afhalen gestoomd. Daarom is waarschijnlijk iedere activiteit al effectief tegen deze ziekte verwekker. De antagonisten zijn dus in ieder geval algemeen antagonistisch-, maar niet per se specifiek antagonistisch werken tegen *Pythium ultimum*.

6.3 Relatie met raamwerk

De effectiviteit van de isolaten moet onderzocht worden op indirecte werking via de plant. Dit kan met specifieke RNA merkers. Voor vruchtgroenten zoals tomaat zijn er al veel merkers beschikbaar. Maar het ontbreekt aan een validatie van deze merkers. Voor de sierteelt zijn er veel minder potentiële merkers beschikbaar. In dit rapport is een overzicht gemaakt van de merkers die gebruikt zouden kunnen worden. Een vervolg stap is om het werkingsmechanisme van de antagonisten en endofieten te onderzoeken binnen het raamwerk van plantafweer, namelijk met gevalideerde RNA merkers die betrokken zijn in de plantafweer, namelijk in de Jasmonzuur- (JA), Ethyleen- (Et), Salicylzuur- (SA), en de Abscisinezuur (ABA) routes. Uit de validatie studie blijkt dat Proteïnase remmer 2 (PINII), Glucanase (LeGluB) en Chitinase (LeChi3) gebruikt kunnen worden als merkers voor onderzoek naar het effect van antagonisten en endofieten op de plantafweer.

6.4 Algemene conclusie en discussie

Bij aanvang van dit onderzoek was er weinig tot geen kennis over de aanwezigheid van antagonisten in de planten en in het substraat op praktijkbedrijven in de bedekte teelten. Het onderzoek naar endofieten (microleven in de plant) staat nog in de kinderschoenen en er is ook nog weinig kennis over de enorme diversiteit, hun dynamiek, functie en voor-, en nadelen voor groei en productie van het gewas.

Er wordt ervan uitgegaan dat er weinig antagonisten aanwezig is in de intensief gebruikte gronden in de kasteelt van Noordelijke Europa. De biologische teelt zou daarin een uitzondering kunnen zijn. Maar dit onderzoek maakt duidelijk dat er antagonisten geïsoleerd kunnen worden in zowel biologische-, als gangbare teelten. Zelfs in de intensief gangbare teelt van chrysant en in het kunstmatig substraat zoals perliet en kleikorrels in de teelt van amaryllis.

Dit onderzoek laat ook zien dat deze antagonisten met succes terug gezet kunnen worden in de kasgronden van herkomst. Er is wel een wettelijke toelating nodig voor de inzet van deze antagonisten als gewasbeschermingsmiddel. Met dit project is een nieuwe methode gerealiseerd. Het is mogelijk het begin van een duurzame, en nieuwe aanpak. Een antwoord op de problematiek van de verkleining van het beschikbare middelenpakket.

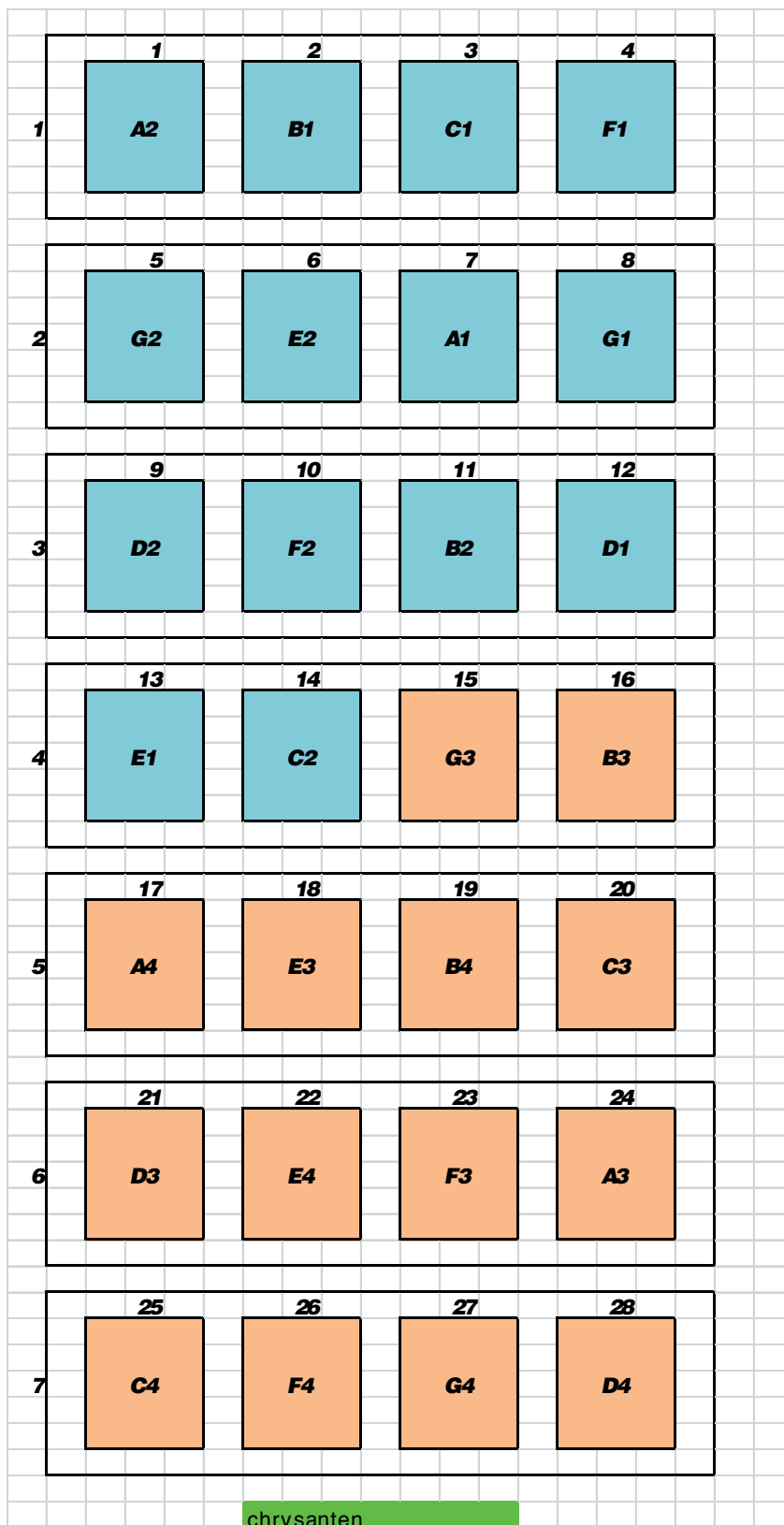
Dankwoord

Hierbij willen we onze collega's Kees Scheffers, Gerard van de Broek, Peter Grootsholten, Fred van Leeuwen bedanken die bijgedragen hebben aan het uitvoeren van de potproeven op locatie in Bleiswijk. Daarnaast willen we bedanken Manuela van Leeuwen (Dümmen Orange) voor het ter beschikking stellen van hun cv. Grand Pink, Jan Barendse (LTO Glaskracht), de BCO Amaryllis en Jan van Overkleef, glastuinbouw bedrijf BioVerbeek met Robert Berkelmans, en Rene Corsten (Delphy) en glastuinbouw bedrijf Kreling Chrysant B.V. Ook dank aan Ewen Bruyant voor zijn werk aan de validatie van de expressie merkers voor tomaat in H2.2 tijdens zijn stage. Het stage verslag is gepubliceerd als *Bruyant, E. (2015) Genes involved in the Jasmonic acid and the Salicylic acid defence pathways in tomato plants. Internship report Wageningen UR Greenhouse Horticulture / Université Angers (Fr.), pp 14.*

7 Literatuur

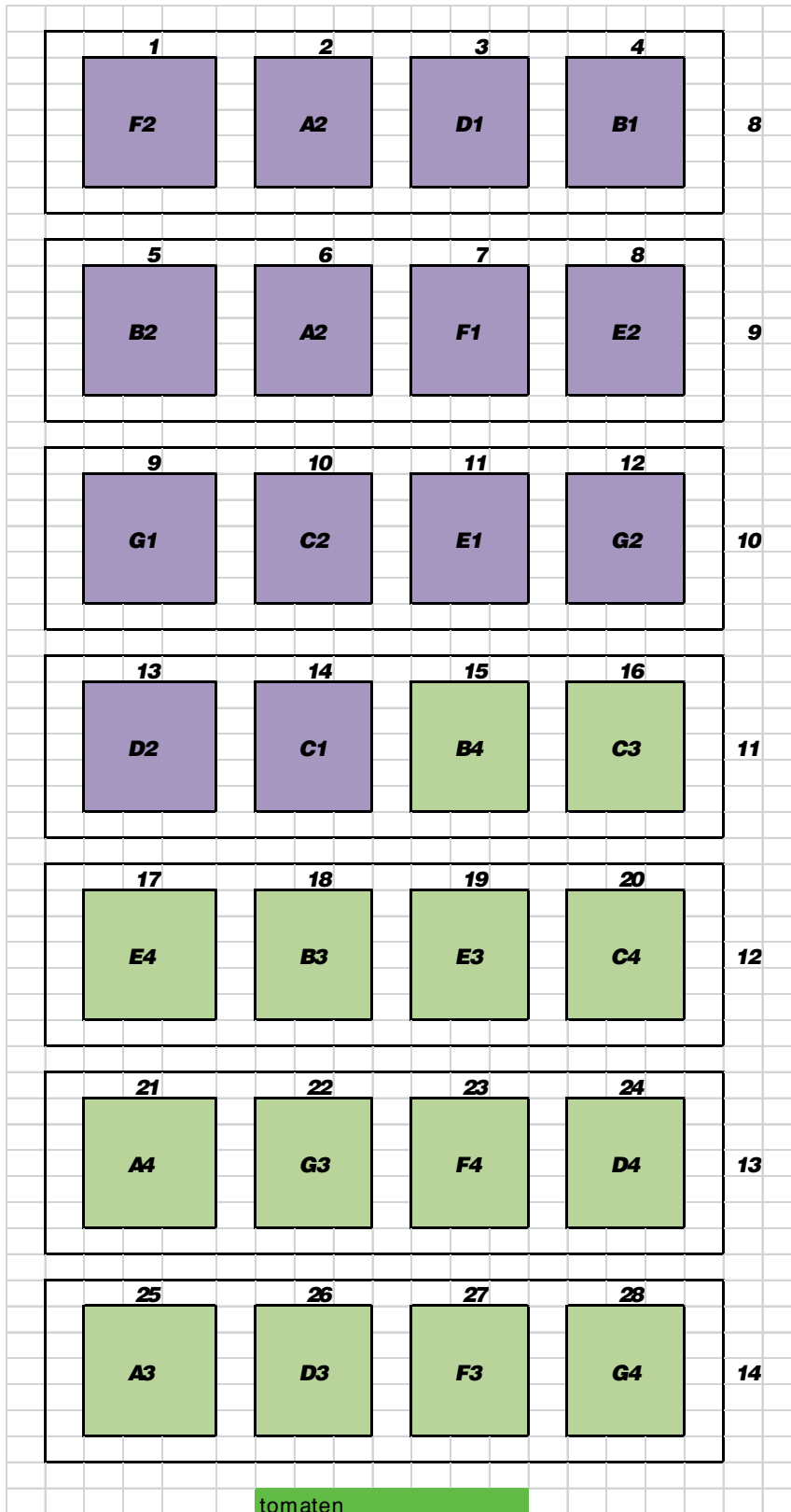
- Anoniem (2001).
The biochemical basis of post-harvest quality in cut flowers. Cardiff School of Biosciences, Cardiff University. MAFF HH2122TOF Project report Min. of Agriculture, Fisheries and Food.
- Farmer, E.E., R.R. Johnson & C.A. Ryan (1992)
Regulation of expression of proteinase-inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology* 98: 995-1002.
- Gao C, Li P, Song A, *et al.*
Isolation and Characterization of Six AP2/ERF Transcription Factor Genes in *Chrysanthemum nankingense*. Iriti M, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(1):2052-2065. doi:10.3390/ijms16012052.
- Lecourieux-Ouaked F, Pugin A, Lebrun-Garcia A.(2000).
Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defence reaction in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 821-829.
- Song A, Li P, Jiang J, *et al.*
Phylogenetic and Transcription Analysis of *Chrysanthemum* WRKY Transcription Factors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(8):14442-14455. doi:10.3390/ijms150814442.
- Sun J-Q, Jiang H-L en Li C-Y. 2011.
Systemin/Jasmonate-Mediated Systemic Defense Signaling in Tomato. *Molecular Plant* 4: 607-615
- Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP.(200)1.
The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Immunology* 13, 63-68.
- Topp S.H., Rasmussen S.K., Mibus H., Sander L. (2009)
A search for growth related genes in *Kalanchoë blossfeldiana*. *Plant Physiol Biochem*. 2009 Nov-Dec;47(11-12):1024-30. doi: 10.1016/j.plaphy.2009.09.006.
- Xia X, Shao Y, Jiang J, *et al.*
Gene expression profiles responses to aphid feeding in *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium*). *BMC Genomics*. 2014;15(1):1050. doi:10.1186/1471-2164-15-1050.
- Xu Y, Gao S, Yang Y, *et al.* (2013)
Transcriptome sequencing and whole genome expression profiling of *Chrysanthemum* under dehydration stress. *BMC Genomics*: 14:662. doi:10.1186/1471-2164-14-662.
- Wagstaff C, Bramke I, Breeze E, *et al.* (2016)
A specific group of genes respond to cold dehydration stress in cut *Alstroemeria* flowers whereas ambient dehydration stress accelerates developmental senescence expression patterns. *Journal of Experimental Botany*. 2010;61(11):2905-2921. doi:10.1093/jxb/erq113.
- Wurff, A.W.G. van der, Y. Cuesta Arenas, M.A. Streminska, J. Janse, M.A. van Slooten (2015)
First step to design a model system to screen biostimulants. Report Wageningen UR Greenhouse Horticulture pp. 47.
- Wurff, A.W.G. van der, M.A. Streminska, A.C. Corsten, M.A. van Slooten (2014)
Biostimulatoren, middelen en ziekteonderdrukking van *Pythium* in chrysant - Indicatoren voor ziekteonderdrukking in de bodem. PT rapport GTB-1314.
- Wurff, A.W.G. van der; Slooten, M.A. van; Hamelink, R. ; Bohne, S. ; Wensveen, W. van (2011)
Soil suppressiveness towards *Meloidogyne*, *Verticillium* or *Pythium* in greenhouse horticulture. In: 1 International Conference on Organic Greenhouse Horticulture. - ISHS, 1 International Conference on Organic Greenhouse Horticulture, Bleiswijk, Netherlands, 2010-10-11/2010-10-14 - p. 141 - 149.
- Wu C.T. & Bradford K.J. (2003)
Class I chitinase and beta-1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. *Plant Physiology* 133: 263-273.

Bijlage 1 Plattegrond biotoets *Pythium*



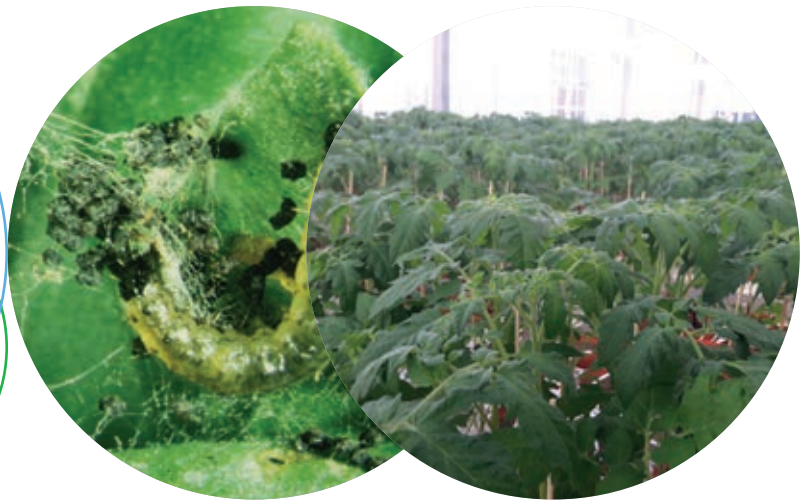
120 potten per tafel; 28 planten per herhaling; 7 behandelingen (inclusief negatieve controle) (A t/m G); 4 herhalingen (1 t/m 4); 2 blokken (objecten 1-14; 15-28).

Bijlage 2 Plattegrond biotoets *Meloidogyne*



120 potten per tafel; 30 planten per herhaling (tomaat); 7 behandelingen (inclusief negatieve controle) (A t/m G); 4 herhalingen (1 t/m 4); 2 blokken (objecten 1-14; 15-28).

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



Wageningen University & Research,
BU Glastuinbouw
Postbus 20
2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1
2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06
F +31 (0) 10 522 51 93
www.wageningenur.nl/glastuinbouw

Glastuinbouw Rapport GTB-1427

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

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen WUR bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van stichting DLO en WUR hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.000 medewerkers en 9.000 studenten behoort WUR wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.