



Verlagen van de risico's voor het optreden van bacteriële ziekten in teelten onder glas

Marta A. Streminska, Gerdit Greve, Huei Ming Huisman, Anna Huisman, Arca Kromwijk, Khanh Pham, Ineke Stijger

Rapport WPR-1310



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

TOPSECTOR
TUINBOUW & UITGANGSMATERIALEN

Stichting
Kennis in je Kas



Stimufiori

**Glastuinbouw
Nederland**
morgen groeit vandaag

Referaat

Bacteriële ziekten zorgen voor problemen in verschillende teelten onder glas. In dit project is onderzoek gedaan naar mogelijke alternatieve strategieën ter voorkoming van bacteriële ziekten in Pelargonium, Phalaenopsis en tomaat. Het onderzoek richtte zich op het voorkomen van de ontwikkeling van bacteriële ziekten in het gewas door aanpassing in bemestingsstrategie, het gebruik van enzymen tegen biofilm van plantpathogene bacteriën op het plantoppervlak, verstoring van communicatie tussen plantpathogene bacteriën, inzet van antagonistische micro-organismen en parasitaire bacteriën uit groep *Bdellovibrio* and the like organisms (zogenaamd BALO's) om plant pathogene bacteriën selectief af te doden.

Abstract

Bacterial diseases remain problematic in various greenhouse crops. In this project, research was conducted into possible alternative strategies to prevent and control bacterial diseases in Pelargonium, Phalaenopsis and tomato. The research focused on various alternative strategies such as adjustment of fertilization strategy, using enzymes to selectively prevent the development of biofilm of plant pathogenic bacteria on plant surface (root or leaf), disrupting quorum sensing of plant pathogenic bacteria, use of antagonistic microorganisms and the possibility of using the parasitic bacteria from the group *Bdellovibrio* and the like organisms (BALOs) to selectively kill plant pathogenic bacteria.

Rapportgegevens

Rapport WPR-1310

Projectnummer: 3742275400

BO-nummer: BO-56-001-010

DOI: <https://doi.org/10.18174/651023>

Dit project / onderzoek is mede tot stand gekomen door de bijdrage van Topsector Tuinbouw & Uitgangsmateriaal, Stichting Kennis in je Kas, Stichting Stimuflori, ICL Growing Solutions BV, Gennovation BV en ChiralVision BV, en is uitgevoerd in samenwerking met Glastuinbouw Nederland en gewascoöperaties.

TOPSECTOR
TUINBOUW & UITGANGSMATERIALEN



GenNovation



Disclaimer

© 2024 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw, Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104

BTW nr.: NL 8113.83.696.B07

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

Stichting Wageningen Research 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

glastuinbouw@wur.nl

wur.nl/glastuinbouw

Inhoud

Samenvatting	5
1 Inleiding	7
2 Materiaal & methoden	11
2.1 Isolatie van micro-organismen uit rhizosfeer en fylosfeer	11
2.2 Antagonisme assay	11
2.3 Screening van bacteriële isolaten op aanwezigheid van <i>aiiA</i> lactonase genen	12
2.4 Afbraak van signaalstoffen (AHL's)	12
2.5 <i>In vitro</i> toets: voorkomen van biofilmvorming door plantpathogene bacteriën	12
2.6 Vaststellen van de aanwezigheid en isolatie van <i>Bdellovibrio</i> and the like organisms (BALO's)	13
2.7 Kasexperimenten	14
2.7.1 Kasproeven met biologische bestrijding van <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i> in <i>Phalaenopsis</i>	14
2.7.2 Kasproeven met biologische bestrijding van <i>Xanthomonas hortorum</i> pv. <i>pelargonii</i> in Pelargonium	17
2.7.3 Kasproeven met verschillende behandelingen tegen ontwikkeling van overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten (opkweek)	22
2.7.4 Analyse van bacteriële microbiom in rhizosfeer, steenwol en fylosfeer	23
3 Resultaten	25
3.1 Isolatie van de micro-organismen uit rhizosfeer en fylosfeer en PCR check op <i>aiiA</i> lactonase gen	25
3.2 Antagonisme assays	26
3.3 <i>In vitro</i> assays voorkomen van biofilmvorming	27
3.4 Afbraak van AHL's	30
3.5 Aanwezigheid van BALO's in teeltsystemen onder glas	30
3.6 Kasexperimenten	32
3.6.1 <i>Phalaenopsis</i>	32
3.6.2 Pelargonium	41
3.6.3 Tomaat	52
4 Discussie en conclusie	56
4.1 Voorkomen van biofilmvorming door plantpathogene bacteriën (<i>in vitro</i> toets)	56
4.2 Biologische controle van bacteriële ziekten in tomaat, Pelargonium en <i>Phalaenopsis</i>	56
4.3 <i>Bdellovibrio</i> and like organisms (BALO's) als biologische controle van bacteriële plantenziekten	57
4.4 Invloed van de meststoffen op de ontwikkeling van bacteriële plantenziektes tijdens de teelt	58
4.5 Conclusies	59
Literatuur	60
Bijlage 1 Kasproef <i>Phalaenopsis</i> 2020	65
Bijlage 2 Kasproef <i>Phalaenopsis</i> 2021	66
Bijlage 3 Kasproef Pelargonium 2020	67
Bijlage 4 Kasproef Pelargonium 2021	69

Samenvatting

In de sier- en groenteteelt is behoefte aan milieuvriendelijke en duurzame manieren om gewassen minder vatbaar te maken voor bacterieziekten.

In dit project is onderzoek gedaan naar mogelijke alternatieve strategieën ter voorkoming en beheersing van bacteriële ziekten in sier- en groenteteelt onder glas. Drie gewassen met bijbehorende bacteriële ziekten zijn gebruikt in dit onderzoek: 1) Pelargonium en *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*, 2) *Phalaenopsis* en *Acidovorax cattleyae* en 3) tomaat en *Agrobacterium rhizogenes* (overmatige wortelgroei).

Het onderzoek richtte zich op verschillende alternatieve strategieën om ontwikkeling van bacteriële ziekte in het gewas te voorkomen:

- a. gebruik van enzymen en nuttige micro-organismen om de ontwikkeling van biofilm van plantpathogene bacteriën op het plantoppervlak (wortel of blad) selectief te voorkomen;
- b. verstoring van communicatie tussen plantpathogene bacteriën en daardoor (gedeeltelijk) voorkomen van infectie;
- c. inzet van antagonistische micro-organismen om de ontwikkeling van plantpathogene bacteriën te voorkomen of te vertragen en
- d. mogelijkheid om de parasitaire bacteriën uit de groep *Bdellovibrio* and the like organisms (zogenaamd BALO's) in te zetten om plantpathogene bacteriën selectief af te doden.

Bovengenoemde maatregelen zijn toegepast in de teelt in combinatie met verschillende fertigatie strategieën (standaard minerale meststof of gecontroleerd vrijkomende meststoffen in de pot).

Uit de onderzoeksresultaten blijkt dat protease enzymen, zoals savinase, de ontwikkeling van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* biofilm *in vitro* kunnen voorkomen. Infectie van Pelargonium met *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* was aanzienlijk vertraagd wanneer de bespuiting van dit enzym tijdens teelt werd uitgevoerd in combinatie met gecontroleerd vrijkomende meststoffen.

De micro-organismen, die enzymen produceren voor de afbraak van signaalstoffen van gramnegatieve bacteriën (acyl homoserine lactones, AHL's), zoals enzym aiiA lactonase, bleken effectief in het voorkomen van bacteriële plantziekten. Bijvoorbeeld, *Bacillus thuringensis* ST1 was in staat om de infectie van tomaat door *Agrobacterium rhizogenes* (veroorzaker van overmatige wortelgroei symptomen) effectief te voorkomen. *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 was effectief tegen *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* in Pelargonium. Het mechanisme waarmee *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 de infectie van Pelargonium voorkomt is niet volledig bekend. *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* produceert geen AHL's, maar gebruikt in plaats daarvan andere signaalstoffen, zogenaamd DSF (eng. diffusible signal factor). Het is mogelijk dat *Bacillus amyloliquefaciens* IT45, naast AHL's afbrekende lactonase, andere enzymen produceert die DSF signaalstoffen kunnen afbreken.

Bacteriële isolaten, zoals *Bacillus velezensis* FZB42 en isolaten verkregen uit de fylosfeer van Pelargonium (e.g. *Pseudomonas* isolaat G31), die direct antagonistisch zijn tegen plantpathogene bacteriën, kunnen de bacteriële ziekte incidentie in tomaat en Pelargonium significant verlagen.

Parasitaire bacteriën uit de groep *Bdellovibrio* and the like organisms (zogenaamd BALO's) bleken van nature aanwezig te zijn in de rhizosfeer van tomaat en het groeimedium (steenwol). Deze bacteriële groep is interessant omdat BALO's mogelijk de plantpathogene bacteriën op een selectieve manier zouden kunnen afdoden in teeltsystemen, zoals aangetoond *in vitro* met *Agrobacterium rhizogenes* binnen dit project. Dankzij deze eigenschap verschillen BALO's van bijvoorbeeld standaard gebruikte ontsmettingsmiddelen, die niet selectief zijn voor plantpathogenen en alle bacteriën, ook nuttige, kunnen afdoden.

Het gebruik van gecontroleerd vrijkomende meststoffen tijdens de teelt van Pelargonium en *Phalaenopsis*, vergeleken met een standaard minerale voeding regime, heeft een positieve invloed op de effectiviteit van nuttige bacteriële isolaten tegen infecties van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* en *Acidovorax cattleyae*.

1 Inleiding

In de sier- en groenteteelt is er behoefte aan milieuvriendelijke en duurzame manieren om gewassen minder vatbaar te maken voor bacterieziekten. In vergelijking met fungiciden zijn er bijvoorbeeld relatief weinig chemicaliën op de markt die specifiek gericht zijn op bacteriële plantenziekten. Het volgen van strenge hygiëneprotocolen is op dit moment de belangrijkste maatregel om bacteriële ziekten te voorkomen in het gewas. Alleen met hygiënemaatregelen is helaas een uitbraak van bacteriële infectie in planten niet altijd te voorkomen. Veel producten die gebruikt worden tijdens het ontsmetten en schoonmaken na de teelt zijn niet selectief en doden ook de nuttige micro-organismen die een plant nodig heeft voor de groei. Deze nuttige micro-organismen zouden ook een belangrijke rol kunnen spelen in het beschermen van de planten tegen bacteriële pathogenen.

In dit project is onderzoek gedaan naar mogelijke alternatieve strategieën ter voorkoming en beheersing van bacteriële ziekten in sier- en groenteteelt onder glas. Drie gewassen met bijbehorende bacteriële ziekten zijn gebruikt in dit onderzoek:

1. Pelargonium en *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*,
2. *Phalaenopsis* en *Acidovorax cattlayae*
3. Tomaat en *Agrobacterium rhizogenes* (overmatige wortelgroei)

Het onderzoek richtte zich op verschillende alternatieve strategieën om de ontwikkeling van bacteriële ziekte in het gewas te voorkomen:

- a. het gebruik van enzymen en nuttige micro-organismen om de ontwikkeling van biofilm van plantpathogene bacteriën op het plantoppervlak (wortel of blad) selectief te voorkomen;
- b. verstoring van communicatie tussen plantpathogene bacteriën en daardoor (gedeeltelijk) voorkomen van een infectie;
- c. inzet van antagonistische micro-organismen om de ontwikkeling van plantpathogene bacteriën te voorkomen of te vertragen;
- d. mogelijkheid om de parasitaire bacteriën uit groep *Bdellovibrio* and the like organisms (zogenaamd BALO's) in te zetten om plantpathogene bacteriën selectief af te doden;
- e. inzetten van bovengenoemde maatregelen tijdens teelt in de kas in combinatie met fertigatie: met standaard minerale voeding of met gecontroleerd vrijkomende meststoffen (eng. Controlled release fertilizers-CRF).

A) Voorkomen van biofilmvorming door plantpathogene bacteriën op het plantoppervlak

Microbiële biofilms, die op het plantoppervlak ontstaan, zijn gemeenschappen van verschillende micro-organismen die zijn ingekapseld in een extracellulaire polymere matrix. Biofilms op plantoppervlak kunnen bestaan uit zowel nuttige als plantpathogene micro-organismen. Plantpathogene bacteriën hebben vaak de biofilm op plantoppervlak nodig om zo de plant te infecteren. Nuttige bacteriën en schimmels uit de biofilm hebben een plant nodig om goed te blijven functioneren. Daarom is het belangrijk dat deze micro-organismen zich goed blijven hechten aan het plantoppervlak. Selectief beïnvloeden van het vermogen van plantpathogene bacteriën om zich te vestigen in de biofilms zou daarom een interessante oplossing kunnen zijn.

Er zijn verschillende mogelijkheden om de ontwikkeling van biofilm door plantpathogene bacteriën tegen te gaan. Binnen dit project ligt de focus op twee mogelijke opties: 1) afbraak van polymeren die biofilm matrix vormen en 2) voorkomen dat plantpathogene bacteriën met elkaar communiceren er daardoor van levensstijl veranderen (van vrijlevend, planktonisch in vloeistof naar niet bewegend in biofilm). De polymere verbindingen, die de basis van de biofilm matrix vormen, zoals eiwitten, vetten, DNA en suikers, kunnen afgebroken worden door extracellulaire microbiële enzymen (e.g. proteases, cellulases etc.). Deze enzymen zouden in situ kunnen worden gemaakt door nuttige micro-organismen of worden toegevoegd als product aan voedingswater of spuitvloeistof. Extracellulaire enzymen worden steeds vaker toegepast om microbiële biofilm tegen te gaan tijdens o.a. voedselproductie en in productie van detergentia (Nahar et al., 2018). Er zijn op dit moment verschillende producten op basis van enzymen beschikbaar die effectief zouden kunnen zijn in het afbreken van polymere matrix van biofilm. Voorbeelden daarvan zijn verschillende proteases, enzymen die eiwitten afbreken, zoals savinase. Savinase is een protease enzym die ook bij lagere temperaturen effectief eiwitten kan afbreken (Smith et al., 2003).

Voordat bacteriën een biofilm kunnen vormen moeten zij met elkaar gaan communiceren, omdat biofilm maken veel energie kost en dat kan een afzonderlijke bacteriële cel niet aan. Daarom produceren de bacteriën signaalstoffen die de andere cellen van hetzelfde soort kunnen waarnemen en processen starten waarvoor de hogere bacteriële dichtheden nodig zijn (quorum sensing, meer uitleg op pagina 2). Veel bacteriën functioneren als vrijlevende cellen in het laagje vloeistof op plantoppervlak, maar op het moment dat zij een signaalstof gaan waarnemen, kunnen zij beginnen met aanmaken van een biofilm. Als er geen signaalstof aanwezig is in de omgeving van deze bacteriën dan gaan zij niet beginnen met maken van de biofilm.

B) Verstoren van communicatie tussen plantpathogene bacteriën om infectie tegen te gaan

Bacteriën kunnen de dichtheid van hun populatie detecteren via een cel-cel communicatie systeem, zogenaamd 'quorum sensing' (QS). Dit systeem regelt genexpressie in reactie op celdichtheid door de constante productie en detectie van signaalmoleculen (Rutherford et al., 2012). Deze moleculen fungeren vaak als auto-inducers voor regulatie van synthese van eiwitten (o.a. enzymen) door individuele bacteriële cellen. Veel pathogene bacteriën, waaronder plantpathogene, gebruiken dit communicatiesysteem om het infectieproces te coördineren (bijvoorbeeld aanschakelen van virulentie genen pas bij bepaalde concentratie van signaalstoffen in de omgeving). Dit geldt voor plantpathogene bacteriën die behoren tot de groep van de gramnegatieve bacteriën (zoals *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Dickeya*, *Pectobacterium*, etc.). De meest bestudeerde signaalmoleculen van gramnegatieve bacteriën zijn de AHL's (acyl homoserine lactones). AHL's variëren met betrekking tot: (i) de lengte van de N-acylketens (4-12 koolstofatomen); (ii) de hydroxy- of oxogroep aan het derde koolstofatoom van de acylketen; en (iii) de verzadigde of onverzadigde koolstofketen (Churchill en Chen, 2011).

Quorum sensing versturende mechanismen (quorum quenching; QQ) zijn aanwezig in veel prokaryotische en eukaryotische organismen en bieden mogelijk een nieuwe, veelbelovende methode voor bacteriële ziekte-beheersing/bestrijding (Grandclement et al., 2016). Gedurende het laatste decennium zijn verschillende benaderingen voorgesteld om QS-routes van plantpathogenen te verstoren en daardoor hun virulentie te verminderen. Eén daarvan is afbraak van signaalstoffen (AHL's) door andere micro-organismen die in de omgeving aanwezig zijn. Het wordt nu algemeen aanvaard dat bacteriën QQ-enzymen gebruiken die de QS-routes van hun "buren" kunnen remmen (Fetzner, 2015). Er zijn verschillende enzymen bekend die AHL's kunnen afbreken (bijvoorbeeld lactonases, acylases en oxidoreductases) en ze worden geproduceerd door diverse bacteriën (onder andere *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Ochrobactrum*, etc.). Deze enzymen worden niet noodzakelijkerwijs geproduceerd alleen om de QS-routes van naburige bacteriën te remmen, maar kunnen ook dienen om de QS-signaalmoleculen te degraderen om ze als beschikbare voedsel- en energiebronnen te gebruiken (Leadbetter en Greenberg, 2000).

Molina et al. (2003) waren de eersten die melding maakten van het gebruik van bacteriën (*Bacillus* sp.) die exo AHL-afbrekende enzymen produceren voor de biologische bestrijding van bacteriële ziekte (*Pectobacterium carotovorum*- natrot in aardappel). *Bacillus* sp. A24 verminderde ook aanzienlijk de hoeveelheid en het gewicht van tumoren die waren ontstaan als gevolg van infectie door *Agrobacterium tumefaciens* (Molina et al., 2003). Sindsdien zijn veel aanvullende studies gepubliceerd waarin het biologische bestrijdingspotentieel van AHL-afbrekende enzymen tegen de ontwikkeling van symptomen van bacteriële infecties in planten op labschaal is aangetoond (Cirou et al., 2007; Jafra et al., 2004). AHL afbrekende bacteriën werden gevonden in verschillende milieus: water, afvalwater zuivering, bodem (Jafra et al., 2004) en zelfs in tuinbouw groeisubstraten (zoals steenwol) (Streminska en Stijger, 2016). De inheemse bacteriële isolaten zouden een voordeel kunnen hebben, ten opzichte van het toevoegen van andere isolaten, omdat die in staat zijn in het specifieke milieu te overleven (water, substraat of grond). Er zijn ook studies uitgevoerd naar stimulatie van de inheemse AHL afbrekende bacteriën. Cirou et al. (2007) hebben aangetoond, dat toevoeging van caprolactone, AHL afbrekende *Rhodococcus*-stammen stimuleerde. De brede verspreiding en diversiteit van AHL-afbrekende bacteriën biedt mogelijkheden voor hun gebruik als effectieve biologische bestrijdingsmiddelen tegen AHL-gebruikende plantpathogene bacteriën. De biocontrole-efficiëntie van dergelijke isolaten is echter nog niet in semipraktijk/praktijk omstandigheden aangetoond en daarom zullen verdere experimenten moeten worden uitgevoerd om de potentiële toepasbaarheid in de teelten onder glas en het succes van een dergelijke methode volledig in te kunnen schatten.

C) Inzet van antagonistische micro-organismen om infectie door plantpathogene bacteriën te voorkomen

Antagonistische micro-organismen kunnen de dichtheden van bacteriële plantpathogeen drastisch verlagen waardoor er geen of vertraagde infectie plaatsvindt (Arwiyanto, 2011). Antagonistische micro-organismen kunnen verschillende mechanismen gebruiken om plantpathogene bacteriën af te doden, o.a. productie van secundaire metabolieten, vluchtige stoffen etc. (Collindge et al., 2022). Er zijn bijvoorbeeld verschillende micro-organismen die plantpathogene *Xanthomonas* tegen kunnen houden, o.a. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus* (Marin et al., 2019). Daranas et al. (2018) hebben verschillende *Lactobacillus* stammen met succes getest tegen *Xanthomonas* infecties in aardbei en pruim. Infectie door rhizogene bacteriën kan tegengehouden worden door o.a. *Bacillus* (Streminska en Stijger, 2016) of *Paenibacillus* stammen (Bosmans et al., 2017).

D) *Bdellovibrio* and like organisms (BALO's)- parasitaire bacteriën

Bdellovibrio and like Organisms (BALO's) zijn kleine, gramnegatieve deltaproteobacteriën. Ze worden vaak gevonden in bodems en zeewater (Davidov et al., 2006). Dankzij gebruik van nieuwe moleculaire technieken is de aanwezigheid van deze groep bacteriën in verschillende bodems bevestigd (Fulthorpe et al., 2006). BALO's zijn ook gevonden in steenwolmatten uit een komkommerteelt met behulp van Next Generation Sequencing (onderzoek Wageningen UR Glastuinbouw, ongepubliceerd).

BALO's zijn intracellulaire parasieten van andere gramnegatieve bacteriën. Cellen van gramnegatieve bacteriën gaan lyseren na infectie met BALO's. Wat betreft hun levenscyclus zijn BALO's dus vergelijkbaar met de bacteriofagen. BALO verschillen echter met bacteriofagen ten opzichte van gastheerspecificiteit (Olanya and Lakshman, 2015). Terwijl bacteriofagen heel specifiek zijn wat betreft hun prooi, kunnen BALO's verschillende gramnegatieve bacteriën parasiteren (Jurkevitch et al., 2000). Deze unieke eigenschap en het feit dat deze groep bacteriën aanwezig is in verschillende groeisubstraten en rhizosfeer van planten, biedt kansen voor mogelijke praktische toepassing als biocontrole agents tijdens de teelt (Olanya & Lakshman, 2015). Er zijn nieuwe methoden ontwikkeld om deze bacteriën uit complexe matrices te isoleren (ook zogenaamd host-independent stammen) (Ferguson et al., 2008). Host-independent stammen zouden makkelijker kweekbaar kunnen zijn en daardoor ook inzetbaar als biocontrole organismen.

BALO's en andere parasitaire bacteriën zijn niet-pathogeen voor mensen en dieren (Dwidar et al., 2012). Jurkevitch et al. (2000) isoleerden verschillende stammen van *Bdellovibrio* uit de rhizosfeer en de bodem en hebben vervolgens hun predatie op plantenpathogenen en humaan pathogene bacteriën in vitro onderzocht. Predatie van *Bdellovibrio* resulteerde in lysis van cellen van o.a. *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas corrugata*, *P. syringae* en *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *E. coli*, *Serratia marcescens* en *Vibrio fluvialis*.

Onderzoeksresultaten van Saxon et al. (2014), toonden aan dat *B. bacteriovorus* HD100 effectief was in de onderdrukking van *Pseudomonas tolaasii* in *in vitro* experimenten. Ook in *in planta* onderzoek resulteerde de behandeling met *B. bacteriovorus* HD100 in vermindering van bacteriële infectie in paddenstoelen. Het is ook aangetoond dat BALO's werken tegen pathogenen en ook biofilms kunnen aantasten (Kadouri en O'Toole, 2005; Monnappa et al., 2014).

E) Verhoging van weerbaarheid van het teeltsysteem tegen bacteriële ziekten door micro-organismen en aangepaste bemesting

De glastuinbouwsector is op zoek naar een nieuw gewasbeschermingsparadigma waarin chemische gewasbescherming verschuift naar milieuvriendelijke en duurzame oplossingen. Ziektewerend substraat en weerbaar plantmateriaal zijn al een aantal jaren onderzocht, maar er is op dit moment nog weinig bekend over weerbaarheid in de context van bacteriële plantenziekten. Uit enkele onderzoeken, op voornamelijk *Arabidopsis* en tomaat, blijkt dat weerbaarheid tegen bacteriële ziekte is te manipuleren, bijvoorbeeld door gebruik van specifieke stoffen of micro-organismen die geïnduceerde systemische resistentie (ISR) van planten kunnen aanschakelen (Hahm et al., 2012; Huang et al., 2012; Park et al., 2013; Imada et al., 2015).

Meststoffen met gecontroleerde afgifte (eng. Controlled release fertilisers- CRF) zijn gekorrelde meststoffen die geleidelijk voedingsstoffen afgeven in de bodem/groeiemedium. De omhulde korrels kunnen een onoplosbaar of een semipermeabele omhulling hebben die oplossing verhindert terwijl voedingsstoffen naar buiten kunnen stromen. CRF wordt doorgemengd in de potgrond voor het planten of zaaien of als een topdressing.

CRF werden speciaal ontworpen om de door de gecontroleerde afgifte van voedingselementen gedurende de teelt een stabiele voedingsbasis te vormen voor de planten. Daardoor kan er met een lager meststoffen verbruik een hogere opbrengst worden gerealiseerd. De specifieke afgifte maakt ook dat er minder risico is op zoutschade/stress. Er zijn aanwijzingen dat het gebruik van CRF bij de teelt van kweekkasplanten de incidentie en ernst van ziekten zou kunnen verminderen. Het mechanisme is niet ontrafeld, maar een van de meest veelbelovende hypothesen ligt in het feit dat continue beschikbaarheid van lagere meststof- en zoutconcentraties in de groeimedia, ten opzichte van periodieke overschotten van nutriënten tijdens standaard fertigatie, een grotere microbiële diversiteit in de bodem of groeimedium mogelijk maken en ook positief effect hebben op plantgroei. Een andere mogelijkheid is dat de polymeren en additieven die worden gebruikt om CRF te produceren, effect hebben tegen pathogene micro-organismen (Servin A, et al. 2015). Hoe dan ook, CRF is een potentieel krachtig hulpmiddel tegen bacteriële ziekten.

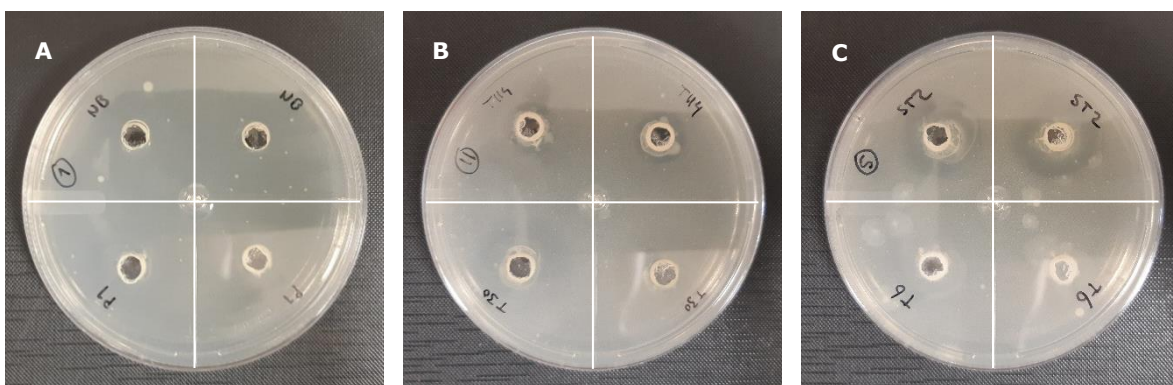
2 Materiaal & methoden

2.1 Isolatie van micro-organismen uit rhizosfeer en fylosfeer

Binnen dit project zijn verschillende bacteriën geïsoleerd uit tomaat rhizosfeer (worteloppervlak), *Pelargonium* fylosfeer (bladoppervlak) en *Phalaenopsis* fylosfeer. Voor de isolatie van bacteriën zijn de wortels/bladeren geplaatst in een steriel 50 mL buisje en ondergedompeld in steriele zoutoplossing (0.95% NaCl). Vervolgens zijn de buizen geplaatst op de schudder (30 minuten, 120-130 rpm). Suspensie met bacteriën is vervolgens uitgeplaat in verdunningen op nutriënt agar met antibiotica tegen schimmels (natamycine). Na 5-7 dagen zijn de afzonderlijke bacteriële kolonies overgezet naar nieuw agar medium om ze rein te kweken. Verschillende bacteriële isolaten zijn gegroepeerd op basis van hun morfologie. Een deel van de isolaten is vervolgens geïdentificeerd op basis van sequentie van 16S rDNA gen (aanwezig in alle bacteriën).

2.2 Antagonisme assay

In labexperimenten is onderzocht of de geïsoleerde bacteriën mogelijk antagonistisch werken tegen de drie plantpathogene bacteriën *A. avenae* subsp. *cattleyae*, *R. rhizogenes* en *X. hortorum* pv *pelargonii*. Voor het uitvoeren van dit experiment is eerst een selectie gemaakt van mogelijk interessante isolaten. Deze selectie is gemaakt op basis van o.a. het bezitten van het *aiiA*-gen, of de bacterie op basis van morfologie mogelijk een Bacillus-achtige is en op basis van verschillende andere morfologieën uit de isolaten collectie. De drie pathogenen en een selectie van de isolaten zijn op Nutrient Broth (NB), een vloeibaar groeimedium, overnacht gekweekt. De volgende dag is de pathogene bacterie uitgegoten door 100 µl van de overnachtcultuur van deze pathogeen te mengen met 5 mL top agar (NB met 0,8% agar) en dit uit te gieten op Nutrient Agar (NA), een vaste voedingsbodem in een petrischaal. Na het stollen van de top agar zijn in de voedingsbodems ponsjes met een diameter van ongeveer 0,5 cm gemaakt en is hierin 40 µl kweek van te testen isolaat gepipetteerd. Alle isolaten en pathogenen zijn vooraf verdund tot deze een optische dichtheid (OD) van 0.1-0.2 hadden bij 590 nm. In de dagen erna is regelmatig gecontroleerd of er zogenaamde halo's zijn ontstaan. Door groei van het pathogeen in de top agar, wordt deze na verloop van tijd troebel. Wanneer er rondom de plekken waar de isolaten zijn gepipetteerd een heldere zone te zien is, betekent dit dat de pathogeen hier niet is gaan groeien.



Figuur 2.1 Vorming van halo's door antagonistische bacteriën (A = bovenste twee kwadranten zijn de negatieve controle, B = bovenste twee kwadranten is isolaat T114 met een halo van $<0,5$ cm, C = bovenste twee kwadranten is isolaat ST2 met een halo van $\geq 0,5$ cm).

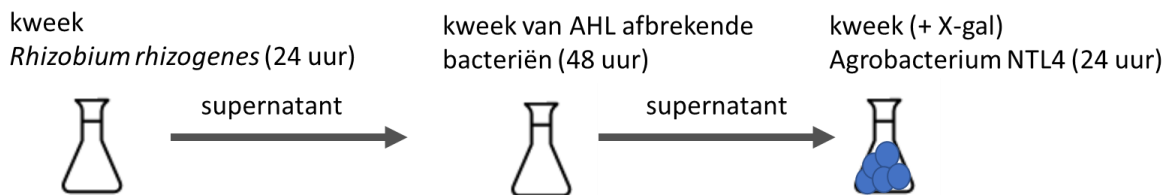
De aanwezigheid van het isolaat remt de groei van de bacteriële pathogeen en laat daarmee zien dat deze een antagonistische werking heeft. Bij het bekijken van de halo's is beoordeeld of deze een afwezige, een kleine ($<0,5$ cm) of een grote halo ($\geq 0,5$ cm) hadden (Figuur 2.1).

2.3 Screening van bacteriële isolaten op aanwezigheid van *aiiA* lactonase genen

Verschillende isolaten uit rhizosfeer van tomaat en fylosfeer van *Pelargonium* en *Phalaenopsis* zijn gecheckt op aanwezigheid van genen van lactonase *aiiA*. Isolaten waren gekozen op basis van morfologische kenmerken en sequentie van 16S rDNA. Alleen isolaten die leken op *Bacillus* en verwante soorten zijn gecheckt op de aanwezigheid van *aiiA* lactonase. Deze lactonase wordt alleen geproduceerd door bacteriën die bij de klasse *Bacilli* horen. Primer set (*aiiA1* en *aiiA2*) is gebruikt voor PCR amplificatie van *aiiA* lactonase gen (Yin et al., 2010).

2.4 Afbraak van signaalstoffen (AHL's)

De indicator stam van *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) werd gebruikt in de assay voor AHL's afbraak door verschillende bacteriële isolaten uit rhizosfeer en fylosfeer. Plantpathogene bacteriën *Agrobacterium rhizogenes* en *Acidovorax cattleyae*, die AHL's produceren, zijn opgekweekt in Nutrient Broth. Na 24 uur kweek zijn bacteriële kweken gecentrifugeerd (5000 rpm voor 10 minuten) en gefiltreerd (door 0.22 µm filter). Op de supernatanten van deze kweken zijn vervolgens verschillende bacteriële isolaten opgekweekt. Na 48 uur zijn de bacteriën alweer verwijderd uit de kweken en is *A. tumefaciens* NTL4 geïnoculeerd op supernatant+ X-gal. Ontwikkeling van de blauwe kleur betekent dat er geen afbraak van AHL signaalstoffen plaats heeft gevonden. Ontwikkeling van blauw verkleuring werd gedurende 24-48 uur kweek gemonitord (Figuur 2.2).



Figuur 2.2 Schema van de assay voor wel/geen afbraak van acyl homoserine lactones (AHL's) door bacteriën; in de aanwezigheid van externe AHL's wordt X-gal door *A. tumefaciens* NTL4 omgezet naar blauwe kleurstof (indole).

2.5 *In vitro* toets: voorkomen van biofilmvorming door plantpathogene bacteriën

In vitro biofilm toets is uitgevoerd volgens aangepast protocol van Vandecandelaere et al. (2016). In dit protocol werd de kleuring met crystal violet gebruikt om gevormde bacteriële biofilm zichtbaar te maken. Bacteriën (*Agrobacterium rhizogenes*, *Acidovorax cattleyae* of *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*) zijn gekweekt in 24 well platen in verdunde nutrient broth in aanwezigheid van verschillende enzymen of supernatanten van de kweken van nuttige micro-organismen. Na 24 of 48 uur kweek van plantpathogene bacteriën werd het supernatant verwijderd en biofilm werd gefixeerd in de plaat. Vervolgens werd de kleuring met crystal violet uitgevoerd. Er zijn in totaal 12 verschillende enzymen (of combinaties daarvan) beoordeeld in *in vitro* biofilm toets (zie Tabel 1). Verschillende verdunningen van de enzymen in nutrient medium zijn getoetst (1:100; 1:500; 1:750; 1:1000).

Naast enzymen zijn er supernatanten van reinkweken van verschillende nuttige micro-organismen gebruikt als mogelijke inhibitoren van biofilmopbouw door plantpathogene bacteriën. Supernatant is een vloeibare deel van kweekmedium die overblijft na de bacteriële kweek. Supernatanten voor de biofilm assays waren steriel gemaakt (geen bacteriële cellen erin; filtratie door 0.22 µm filter). De supernatanten kunnen wel secundaire metabolieten van bacteriën bevatten, zoals antibiotica en andere stoffen, die groei en biofilmopbouw door plantpathogene bacteriën kunnen beïnvloeden.

Biofilm *in vitro* assays zijn uitgevoerd met verschillende plantpathogene en nuttige micro-organismen. Lijst van micro-organismen is weergegeven in Tabel 2. Biofilm assays voor elke combinatie enzym/supernatant van nuttige en plantpathogene bacteriën zijn 3x herhaald.

Tabel 1 Enzymen gebruikt in *in vitro* biofilm assays.

Nr.	Naam	Beschrijving/afkomstig van
A	Amylase	
B	Lipase	
C	P6	Protease from <i>B. licheniformis</i>
D	P30	Protease from <i>B. subtilis</i>
E	P89	Protease from <i>B. subtilis</i>
F	P7	Protease from <i>B. amyloliquefaciens</i>
G	P14	Thermolysin from <i>Geobacillus sp.</i>
H	P15	Protease from <i>Trichoderma reesei</i>
I	Savinase	Protease uit <i>Bacillus sp.</i>
J	Pectinase	
K	Combi I	Amylase+ P89+ Savinase+ Phytase
L	Combi II	Amylase+P6

Tabel 2 Lijst van micro-organismen die zijn gebruikt in biofilm assays.

Nr.	Naam micro-organisme	Gebruikt in assay	
		bacterie (biofilmopbouw)	supernatant (inhibitor biofilm van plantpathogene bacteriën)
1	<i>Xanthomonas hortorum pv. pelargonii</i>	+	
2	<i>Acidovorax cattleyae</i>	+	
3	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	+	
4	<i>Pseudomonas simiae WCS417</i>	+	+
5	<i>Bacillus subtilis QST713</i>	+	+
6	<i>Bacillus amyloliquefaciens, FZB42</i>	+	+

2.6 Vaststellen van de aanwezigheid en isolatie van *Bdellovibrio* and the like organisms (BALO's)

Bdellovibrio and the like organisms (BALO's) zijn zeer kleine bacteriën die grotere cellen van gramnegatieve bacteriën kunnen parasiteren. BALO's vermenigvuldigen zich in de cel van gramnegatieve bacterie. De nakomelingen verlaten de cel van prooibacterie (en maken prooicel kapot) en gaan op zoek naar nieuwe prooi. Wat BALO's interessant maakt is het feit dat verschillende BALO isolaten heel specifiek bepaalde soorten bacteriën als prooi kunnen gebruiken. Dat zou betekenen dat bepaalde bacteriële pathogenen op semi-selectieve manier afgedood kunnen worden, zonder grote gevolgen voor de andere, in het bepaald milieu, aanwezige bacteriële soorten die nuttig zijn voor de plant. Binnen dit project hebben wij gezocht naar drie groepen van BALO's, namelijk: *Bdellovibrionaceae*, *Bacteriovoracaceae* en *Peredibacteraceae*, in de rhizosfeer van tomaat en fylosfeer van Pelargonium en Phalaenopsis.

Een eerste screening is uitgevoerd op basis van aanwezigheid van DNA van bovengenoemde drie groepen in DNA extracten uit rhizosfeer en fylosfeer. Specifieke primer sets zijn gebruikt in PCR om de aanwezigheid van deze drie groepen vast te stellen (Davidov et al., 2006).

Om BALO's te isoleren uit rhizosfeer/fylosfeer extracten is een double layer agar methode gebruikt. Extracten uit fylosfeer/rhizosfeer zijn eerst gefiltreerd door 0.22mm filter, om de grotere bacteriën eruit te halen. Vervolgens is het extract (met mogelijke BALO's erin) gemengd met een prooi kweek in verdunde nutrient agar (1,3 g/L NB + 6 g/L agar) en over gestolde bodem agar (nutrient broth 1,3 g/L + 15 g/L agar) plaat gegoten. Na incubatie van 7-10 dagen zijn de agarplaten beoordeeld op de ontwikkeling van de halo's (plekken op agarplaat zonder groei van plantpathogene bacterie).

2.7 Kasexperimenten

2.7.1 Kasproeven met biologische bestrijding van *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* in *Phalaenopsis*

2.7.1.1 Kasproef 2020 met biologische bestrijding van *A. cattleyae* in *Phalaenopsis*

Plantsoort:	<i>Phalaenopsis</i> ; planten in de pot ø 12cm
Pathogeen:	<i>Acidovorax cattleyae</i>
Kas:	144m ² ; 14 tafels; pottenproef
Kasverdeling:	8 blokken (4 met standaard voeding, 4 met controlled release fertilizer CRF); per blok is 1 herhaling van de behandeling geplaatst (met 10 planten per blok; totaal 80 planten per behandeling: 40 planten met standaard voeding+ 40 planten met CRF)
Uitvoering:	juni 2020- heden; de eerste behandelingen met micro-organismen en chitosan hydrochloride zijn preventief uitgevoerd (voor de infectie); eerste behandeling met zilverperoxide is uitgevoerd meteen na de inoculatie met <i>Acidovorax</i> . De behandelingen waren wekelijks herhaald. Eindconcentratie van micro-organismen in spuitvloeistof was 5x10 ⁶ kve/mL.
Start kasproef:	15 juni 2020
Inoculatie <i>Acidovorax</i> :	15 juli 2020 (T4) en 5 augustus 2020 (T7); via bespuiten met vloeistof met 10 ⁷ kve <i>Acidovorax cattleyae</i> /mL; in tweede deel van de proef is <i>Acidovorax</i> eenmalig geïnoculeerd op 17 september 2020. Negatieve controle is geïnoculeerd met demiwater.

Details van de kasproef zijn te vinden in Bijlage 1.

Behandelingen:

In de proef zijn in totaal 20 behandelingen uitgevoerd, inclusief negatieve en positieve controle (zie Tabel 3).

Beoordeling symptomen:

Voor de beoordeling van de planten wordt een index gebruikt van 0 (gezond), 1 (enkele stippen), 2 (ongeveer 50% bladeren met symptomen) tot 3 (alle bladeren met duidelijke symptomen). Voorbeeld van een aantasting met *Acidovorax* is te zien in Figuur 2.3.



Figuur 2.3 Voorbeelden van aantasting met *Acidovorax* (score 1).

Statistische analyse:

Resultaten van de proef zijn geanalyseerd met two-way ANOVA (2 factoren: bemesting en behandeling; voor significantie $p \leq 0.05$).

Tabel 3 Behandelingen in de *Phalaenopsis* proef (2020).

Nr.	Behandeling	Voeding	<i>Acidovorax</i>
1	Onbehandeld zonder <i>Acidovorax</i>	Standaard	-
2	Onbehandeld met <i>Acidovorax</i>	Standaard	+
3	<i>Bacillus thuringensis</i> ST1 (isolaat uit tomaat)	Standaard	+
4	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	Standaard	+
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45	Standaard	+
6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713	Standaard	+
7	<i>Bacillus toyonensis</i> P169 (isolaat uit <i>Phalaenopsis</i>)	Standaard	+
8	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> P207 (isolaat uit <i>Phalaenopsis</i>)	Standaard	+
9	chitosan hydrochloride (0.75%)	Standaard	+
10	zilverperoxide (concentratie 20 ppm H ₂ O ₂)	Standaard	+
11	Onbehandeld zonder <i>Acidovorax</i>	Standaard	+
12	Onbehandeld met <i>Acidovorax</i>	CRF	-
13	<i>Bacillus thuringensis</i> ST1 (isolaat uit tomaat)	CRF	+
14	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42 (Rhizovital 42)	CRF	+
15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45 (Rise-P)	CRF	+
16	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713 (Serenade)	CRF	+
17	<i>Bacillus toyonensis</i> P169 (isolaat uit <i>Phalaenopsis</i>)	CRF	+
18	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> P207 (isolaat uit <i>Phalaenopsis</i>)	CRF	+
19	chitosan hydrochloride (0.75%)	CRF	+
20	zilverperoxide (concentratie 20 ppm H ₂ O ₂)	CRF	+

ST- standaardvoeding schema; CRF- (gecontroleerd vrijkomende meststoffen, eng. controlled release fertilisers).

2.7.1.2 Kasproef 2021 met biologische bestrijding van *A. cattleyae* in *Phalaenopsis*

Plantsoort: *Phalaenopsis*; planten in de pot ø 12cm

Pathogeen: *Acidovorax cattleyae*

Kas: 144 m²; 14 tafels; pottenproef

Kasverdeling: 8 blokken (4 met standaard voeding, 4 met gecontroleerd vrijkomende meststoffen (emg. controlled release fertiliser- CRF); per blok is 1 herhaling van de behandeling geplaatst (met 10 planten per blok; totaal 80 planten per behandeling: 40 planten met standaard voeding+ 40 planten met CRF). Behandelingen met micro-organismen of enzymen zijn preventief toegepast (voor infectie) en vervolgens doorgezet na de infectie (elke twee weken). Eindconcentratie van micro-organismen in spuitvloeistof was 5x10⁶ kve/mL.

Inoculatie *Acidovorax*: vier weken na het planten; "natuurlijke" infectie route nabootsen met verspreiding van ziekte vanuit geïnfecteerde planten die tussen gezonde planten (proefplanten) zijn gezet. Na uitblijven symptomen in de proefplanten zijn planten nog 2 keer geïnoculeerd met *Acidovorax* (op 20 oktober 2021 en 10 november 2021; in november na licht schuren van 1 blad per plant).

Details van de kasproef zijn te vinden in Bijlage 2.

Behandelingen:

In de proef zijn er in totaal 28 behandelingen uitgevoerd, inclusief controles (zie Tabel 4).

Tabel 4 Behandelingen in de *Phalaenopsis* proef (2021).

Nr.	Behandeling	Voeding	<i>Acidovorax</i>
1	Onbehandeld zonder <i>Acidovorax</i>	ST	-
2	Onbehandeld met <i>Acidovorax</i>	ST	+
3	<i>Bacillus thuringensis</i> ST1 (isolaat uit tomaat)	ST	+
4	<i>Alcaligenes</i> ST2 (uit tomaat, antagonistisch tegen <i>Acidovorax</i>)	ST	+
5	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	ST	+
6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45	ST	+
7	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713	ST	+
8	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> P207 (isolaat uit <i>Phalaenopsis</i>)	ST	+
9	<i>Bacillus</i> P209 (isolaat uit <i>Phalaenopsis</i>)	ST	+
10	Zeewierextract (<i>Ascophyllum nodosum</i>)	ST	+
11	Savinase	ST	+
12	Protex 6L	ST	+
13	waterstofperoxide (20 ppm H ₂ O ₂)	ST	+
14	zilverperoxide (20 ppm H ₂ O ₂)	ST	+
15	Onbehandeld zonder <i>Acidovorax</i>	CRF	-
16	Onbehandeld met <i>Acidovorax</i>	CRF	+
17	<i>Bacillus thuringensis</i> ST1 (isolaat uit tomaat)	CRF	+
18	<i>Alcaligenes</i> ST2 (uit tomaat, antagonistisch tegen <i>Acidovorax</i>)	CRF	+
19	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	CRF	+
20	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45	CRF	+
21	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713	CRF	+
22	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> P207 (isolaat uit <i>Phalaenopsis</i>)	CRF	+
23	<i>Bacillus</i> P209 (isolaat uit <i>Phalaenopsis</i>)	CRF	+
24	Zeewierextract (<i>Ascophyllum nodosum</i>)	CRF	+
25	Savinase	CRF	+
26	Protex 6L	CRF	+
27	waterstofperoxide (20 ppm H ₂ O ₂)	CRF	+
28	zilverperoxide (20 ppm H ₂ O ₂)	CRF	+

ST- standaardvoeding schema; CRF- (gecontroleerd vrijkomende meststof, eng. controlled release fertilisers).

Statistische analyse:

Resultaten van de proef zijn geanalyseerd met two-way ANOVA (2 factoren: bemesting en behandeling; $p \leq 0.05$).

2.7.2 Kasproeven met biologische bestrijding van *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* in Pelargonium

2.7.2.1 Voorproef 1: infectie van Pelargonium met *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*

Twee isolaten van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* (DSM 50858 en DSM 50859) zijn gebruikt in de infectieproef. Deze isolaten zijn afzonderlijk van elkaar geïnjecteerd of gespoten over blad van Pelargonium planten (cv Senna)(Fig.2.4). Op basis van de resultaten van de voorproef is de keuze gemaakt voor de isolaat van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* die in de kasproeven is gebruikt.

injectie



bespuiting



Figuur 2.4 Infectie van Pelargonium met *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*.

2.7.2.2 Voorproef 2: nabootsen van natuurlijke infectie van Pelargonium met *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* via eerder geïnfecteerde planten

Deze voorproef is uitgevoerd om te beoordelen of het mogelijk is om de natuurlijke verspreidingsroute van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* (verspreiding *Xanthomonas* via spatwater of via eb en vloed van besmette planten naar de gezonde planten) in de kasproef na te bootsen. Gezonde pelargonium planten (cv Senna) zijn geplaatst op twee tafels in de kas. Planten op tafel 1 kregen water via eb en vloed, terwijl de planten op tafel 2 water van bovenaf kregen (via broezen). Tussen de gezonde planten (met witte steekhoutje) zijn een aantal met *Xanthomonas* geïnfecteerde, asymptomatische planten geplaatst (met rode steekhoutje). Ontwikkeling van de symptomen in de proefplanten is beoordeeld na zes en acht weken van de Pelargonium teelt.

2.7.2.3 Kasproef 2020 met biologische bestrijding van *Xanthomonas* in *Pelargonium*

Een kasproef is gestart in de week 45 van 2020 in kas 9.03 (14 tafels, 144 m²) bij Wageningen University & Research (WUR) Business unit Glastuinbouw en Bloembollen in Bleiswijk. Met een looptijd van 11 weken is de kasproef in week 3 van 2021 beëindigd.

Plantsoort: *Pelargonium zonale*; cultivar Senna
Pathogeen: *Xanthomonas hortorum pv pelargonii* (DSM 50859)
Kas: 144 m²; 14 tafels; pottenproef
Watergift: druppelaars; bij standaard minerale voeding met voedingstoffen, bij CRF met alleen water

De kas is verdeeld in 8 blokken, 4 met standaard voeding en 4 met langzaam vrijkomende meststoffen (CRF). 11 verschillende behandelingen (inclusief controles) zijn getest in combinatie met standaard voeding en CRF (Tabel 5). Behandelingen met micro-organismen of enzymen zijn preventief toegepast (voor infectie) en vervolgens doorgezet na de infectie (wekelijks, met uitzondering van enzymen). Eindconcentratie van micro-organismen in spuitvloeistof was 5*10⁶ kve/mL.

Per blok is 1 herhaling van elke behandeling geplaatst met 10 planten per plot. Per behandeling zijn dit 10 planten × 8 blokken = 80 planten per behandeling (40 planten met standaard voeding + 40 planten met CRF). De verschillende plotten zijn verdeeld over 12 van de 14 tafels in de kas.

Inoculatie *Xanthomonas* (DSM 50859): 4 weken na planten (3 december 2020), via bespuiting van de planten met *Xanthomonas* (10⁷ kve/vloeistof).

Details van de kasproef zijn te vinden in Bijlage 3.

Tabel 5 Behandelingen in *Pelargonium* kasproef 2020.

Nr.	Behandeling	Voeding	<i>Xanthomonas</i>
1	Negatieve controle	ST	-
2	Positieve controle	ST	+
3	Bacillus thuringensis/cereus ST2 (isolaat uit tomaat)	ST	+
4	Bacillus velezensis FZB42	ST	+
5	Bacillus amyloliquefaciens IT45	ST	+
6	Bacillus amyloliquefaciens QST713	ST	+
7	Isolaat G31 (isolaat uit <i>Pelargonium</i>)	ST	+
8	Savinase	ST	+
9	Chitosan hydrochloride 0,75%	ST	+
10	Zilverperoxide conc. 20 ppm H ₂ O ₂	ST	+
11	Protex 6L	ST	+
12	Negatieve controle	CRF	-
13	Positieve controle	CRF	+
14	Bacillus thuringensis/cereus ST2 (isolaat uit tomaat)	CRF	+
15	Bacillus velezensis FZB42	CRF	+
16	Bacillus amyloliquefaciens IT45	CRF	+
17	Bacillus amyloliquefaciens QST713	CRF	+
18	Isolaat G31 (isolaat uit <i>Pelargonium</i>)	CRF	+
19	Savinase	CRF	+
20	Chitosan hydrochloride, conc. 0,75%	CRF	+
21	Zilverperoxide, conc. 20 ppm H ₂ O ₂	CRF	+
22	Protex 6L	CRF	+

ST- standaardvoeding schema; CRF- (gecontroleerd vrijkomende meststof, eng. controlled release fertilisers).

Stekken (cultivars Senna en Mylena, afkomstig van P. v.d. Haak Handelskwekerij) van ongeveer 3 weken oud zijn geleverd op 2 november. Op 3 november (T=0) zijn de stekken opgepot in 12 cm potten (635-640 mL inhoud) met twee verschillende soorten potgrond (gevuld door Van der Knaap). De helft van de planten is opgepot in veen potgrond en heeft gedurende de proef standaardbemesting gekregen. De andere helft van de planten is opgepot in potgrond met minder PG-mix en met Osmocote van ICL, een gecontroleerd vrijkomende meststof (CRF), doorgemengd door de potgrond. Deze planten hebben op de momenten van watergift gewoon water gekregen. Informatie over de samenstelling van de verschillende substraten is te zien in Bijlage 3. Ter bevordering van het microklimaat zijn bevoeiingsmatten op de tafels geplaatst en zijn er randplanten (cultivar: Mylena) rondom de proefplanten (cultivar: Senna) gezet. Plantenvoeding is gegeven via een druppelsysteem. Omdat planten met verschillende behandelingen elkaar niet mogen contamineren via drainwater, zijn de potten op omgekeerde schotels gezet. Vanaf 5 november 2020 (T=0) zijn de middelen wekelijks toegepast door bespuiten tot 'run-off'. Informatie over de toepassing van deze middelen staat weergegeven in Tabel 6.

Tabel 6 Toepassing middelen kasproef 2020 met *Xanthomonas* in *Pelargonium*.

Nr.	Behandeling	Concentratie in spuitvloeistof	Frequentie
1 en 12	Negatieve controle	N.v.t.	N.v.t.
2 en 13	Positieve controle	N.v.t.	N.v.t.
3 en 14	ST2	5×10 ⁶ kve/ml	Wekelijks
4 en 15	Bacillus FZB42	5×10 ⁶ kve/ml	Wekelijks
5 en 16	Bacillus IT45	5×10 ⁶ kve/ml	Wekelijks
6 en 17	Bacillus QST713	5×10 ⁶ kve/ml	Wekelijks
7 en 18	G31	5×10 ⁶ kve/ml	Wekelijks
8 en 19	Savinase	1:500 verdunning	Eenmalig, dag na infectie
9 en 20	Chitosan hydrochloride	0,75%	Wekelijks
10 en 21	Zilverperoxide	20 ppm waterstofperoxide	Wekelijks
11 en 22	Protex 6L	1:500 verdunning	Eenmalig, dag na infectie

Savinase en Protex 6L zijn niet wekelijks, maar eenmalig op de dag na inoculatie van *Xanthomonas* toegepast. Op 3 december (T=4) zijn de planten geïnoculeerd met *Xanthomonas* door bespuiten tot 'run-off' met 10⁷ kve *Xanthomonas*/ml spuitvloeistof. De eigen geïsoleerde bacteriën (ST2 en G31) en *Xanthomonas* zijn steeds de dag voor gebruik overnacht opgekweekt in het vloeibare medium NB. De concentraties van de overnachtsculturen zijn bepaald door het meten van de OD bij 590 nm. Vervolgens zijn de bacteriën steeds verdund tot de gewenste concentratie.

Na infectie met *Xanthomonas* zijn de planten wekelijks beoordeeld op de ontwikkeling van symptomen. Ziektesymptomen zijn beoordeeld door een score van 0 (gezond) t/m 5 (volledige aantasting) te geven aan de mate van aantasting van de bladeren (Figuur 2.5). Daarnaast is een score van 0 (gezond) of 1 (slap hangen van bladeren) gegeven voor het beoordelen van de planten verwelking.



Figuur 2.5 Voorbeelden van aantasting met *Xanthomonas hortorum pv pelargonii*.

Statistische analyse:

Resultaten van de proef zijn geanalyseerd met two-way ANOVA (2 factoren: bemesting en behandeling; voor significantie $p \leq 0.05$).

2.7.2.4 Kasproef 2021 met biologische bestrijding van *Xanthomonas* in Pelargonium

In de week 49 van 2021 is opnieuw een kasproef met *Xanthomonas* in Pelargonium gestart. Deze kasproef vond plaats in kas 9.08 (14 tafels, 144 m²) bij Wageningen University & Research (WUR) Business unit Glastuinbouw en Bloembollen in Bleiswijk. 12 weken later, in week 9 van 2022 is de kasproef beëindigd.

Plantsoort: *Pelargonium zonale*; cultivar Mylena
 Pathogeen: *Xanthomonas hortorum pv pelargonii* (DSM 50859)
 Kas: 144 m²; 14 tafels; pottenproef
 Watergift: bovenleiding; bij standaard minerale voeding met voedingsstoffen, bij CRF met water

Net als de proef in 2020 is de kas verdeeld in 8 blokken, 4 met standaard voeding en 4 met CRF. In de proef zijn 12 verschillende behandelingen (inclusief controles) getest in combinatie met standaard voeding en met CRF (Tabel 7). Behandelingen met micro-organismen of enzymen zijn preventief toegepast (voor infectie) en vervolgens doorgezet na de infectie (tweewekelijks; en één keer per vier weken aangieten in groeimedium). Eindconcentratie van micro-organismen in spuitvloeistof was $5 \cdot 10^6$ kve/mL.

Per blok is 1 herhaling van elke behandeling geplaatst met 10 planten per plot. Per behandeling zijn dit 10 planten \times 8 blokken = 80 planten per behandeling (40 planten met standaard voeding + 40 planten met CRF).

Inoculatie *Xanthomonas* (DSM 50859): 4 weken na planten (3 december 2020), via herbesmetting vanuit de geïnfecteerde planten.

De verschillende plotten zijn verdeeld over 12 van de 14 tafels in de kas. Details van de kasproef zijn te vinden in Bijlage 4.

Tabel 7 Behandelingen kasproef 2021 met *Xanthomonas* in pelargonium.

Nr.	Behandeling	Voeding	<i>Xanthomonas</i>
1	Negatieve controle	Standaard	-
2	Positieve controle	Standaard	+
3	Bacillus velezensis FZB42	Standaard	+
4	Bacillus amyloliquefaciens IT45	Standaard	+
5	Bacillus amyloliquefaciens QST713	Standaard	+
6	Bacillus ST1	Standaard	+
7	Isolaat G31 (isolaat uit Pelargonium)	Standaard	+
8	Alcaligenes ST2 (isolaat uit tomaat)	Standaard	+
9	Savinase	Standaard	+
10	Protex 6L	Standaard	+
11	Zilverperoxide, conc. 20 ppm H ₂ O ₂	Standaard	+
12	Waterstofperoxide, conc. 20 ppm H ₂ O ₂	Standaard	+
13	Negatieve controle	Standaard	-
14	Positieve controle	Standaard	+
15	Bacillus velezensis FZB42	Standaard	+
16	Bacillus amyloliquefaciens IT45	Standaard	+
17	Bacillus amyloliquefaciens QST713	Standaard	+
18	Bacillus ST1	Standaard	+
19	Isolaat G31 (isolaat uit Pelargonium)	Standaard	+
20	Alcaligenes ST2 (isolaat uit tomaat)	Standaard	+
21	Savinase	Standaard	+
22	Protex 6L	Standaard	+
23	Zilverperoxide, conc. 20 ppm H ₂ O ₂	Standaard	+
24	Waterstofperoxide, conc. 20 ppm H ₂ O ₂	Standaard	+

ST- standaardvoeding schema; CRF- (gecontroleerd vrijkomende meststof, eng. controlled release fertilisers).

Op 1 december 2021 zijn de stekken (cultivars Mylena en Ronja, afkomstig van P. v.d. Haak Handelskwekerij) geleverd. Een week later op 6 december (T=0), zijn de stekken opgepot in 13 cm potten (800 mL inhoud) met twee verschillende soorten potgrond (gevuld door Van der Knaap). De helft van de planten is opgepot in standaard substraat en heeft gedurende de proef standaardbemesting gekregen. De andere helft van de planten is opgepot in hetzelfde substraat, maar met minder PG-mix en is Osmocote van ICL Growing Solutions BV, een gecontroleerd vrijkomende meststof (CRF), doorgemengd. Deze planten hebben op de momenten van watergift gewoon water gekregen.

Ter bevordering van het microklimaat zijn bevoeiingsmatten op de tafels geplaatst en zijn rondom de proefplanten (cultivar: Mylena) randplanten (cultivar: Ronja) gezet. Plantenvoeding is gegeven door beregenen. Omdat planten met verschillende behandelingen elkaar niet mogen contamineren via drainwater, zijn de potten op schotels gezet.

Vanaf 10 december 2021 (T=0) zijn de middelen tweewekelijks toegepast door bespuiten tot 'run off'. Daarnaast zijn de behandelingen vierwekelijks toegepast in het substraat door aangieten. De behandelingen met zilverperoxide en waterstofperoxide zijn niet aan het substraat toegepast. Informatie over alle gebruikte middelen staat weergegeven in Tabel 8.

Tabel 8 Toepassing middelen kasproef 2020 met *Xanthomonas* in *Pelargonium*.

Nr.	Behandeling	Concentratie in spuitvloeistof	Frequentie bespuiten	Frequentie aangieten substraat
1	en 13 Negatieve controle	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
2	en 14 Positieve controle	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
3	en 15 Bacillus FZB42	5×10 ⁶ kve/ml	Tweewekelijks	Vierwekelijks
4	en 16 Bacillus IT45	5×10 ⁶ kve/ml	Tweewekelijks	Vierwekelijks
5	en 17 Bacillus QST713	5×10 ⁶ kve/ml	Tweewekelijks	Vierwekelijks
6	en 18 Bacillus ST1	5×10 ⁶ kve/ml	Tweewekelijks	Vierwekelijks
7	en 19 G31	5×10 ⁶ kve/ml	Tweewekelijks	Vierwekelijks
8	en 20 ST2	5×10 ⁶ kve/ml	Tweewekelijks	Vierwekelijks
9	en 21 Savinase	1:500 verdunning	Tweewekelijks	Vierwekelijks
10	en 22 Protex 6L	1:500 verdunning	Tweewekelijks	Vierwekelijks
11	en 23 Zilverperoxide	20 ppm waterstofperoxide	Tweewekelijks	N.v.t.
12	en 24 Waterstofperoxide	20 ppm waterstofperoxide	Tweewekelijks	N.v.t.

Op 4 januari 2022 (T=4) is een deel van de planten geïnoculeerd met *Xanthomonas* door te bespuiten tot 'run-off' met een 10x verdunde overnachtcultuur van *Xanthomonas* (ongeveer 10⁸ kve *Xanthomonas*/ml spuitvloeistof). Door WUR geïsoleerde bacteriën (ST1, G31 en ST2) en *Xanthomonas* zijn steeds de dag voor het gebruik overnacht opgekweekt in het vloeibare medium NB. De concentraties van de overnachtculturen van de eigen geïsoleerde bacteriën zijn bepaald door het meten van de optische dichtheid (OD) bij 590 nm. Vervolgens zijn de bacteriën steeds verdund tot de gewenste einddichtheid.

Een aantal dagen na het infecteren met *Xanthomonas*, op 7 januari 2022 (T=4), zijn er per plot drie 'infectieplanten' (2x cultivar Mylena en 1x cultivar Ronja) tussen de niet geïnoculeerde proefplanten gezet. De proefplanten zouden door spatwater en direct contact op natuurlijke wijze geïnfecteerd kunnen worden door de infectieplanten.

Na de infectie met *Xanthomonas* zijn de planten wekelijks beoordeeld op de ontwikkeling van de symptomen. Ziektesymptomen zijn beoordeeld door een score van 0 (gezond) t/m 5 (volledige aantasting) te geven aan de mate van aantasting van de bladeren (Figuur symptomen). Daarnaast is een score van 0 (gezond) of 1 (slap hangen van bladeren) gegeven voor het beoordelen van de planten verwelking.

Statistische analyse:

Resultaten van de proef zijn geanalyseerd met two-way ANOVA (2 factoren: bemesting en behandeling; $p \leq 0.05$).

2.7.3 Kasproeven met verschillende behandelingen tegen ontwikkeling van overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten (opkweek)

2.7.3.1 Kasproef 2019 met biologische bestrijding van *Agrobacterium rhizogenes* in tomaat

De proef is uitgevoerd met jonge tomaten planten (cv Maxifort) gedurende 8 weken na het zaaien (in steenwolblokken). In deze proef zijn 7 verschillende behandelingen getest (Tabel 9). Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd (tot eindconcentratie in steenwolblok: 10⁷ kve/mL). In geval van de behandelingen via voedingswater zijn de behandelingen aan het water toegevoegd en bij elke watergift toegepast.

Aantal planten per behandeling: 24 planten

Inoculatie rhizogene *Agrobacterium rhizogenes*: in week 2, na verspenen (10⁸ kve/plant)

Uitvoering: oktober- november 2019

Tabel 9 Behandelingen kasproef 2019 met *Agrobacterium rhizogenes* in tomaat.

Nr.	Behandeling	Voeding	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
1	Negatieve controle	Standaard	-
2	Positieve controle	Standaard	+
3	chitosan hydrochloride (10 mg/L)	Standaard	+
4	chitosan hydrochloride (20 mg/L)	Standaard	+
5	chitosan hydrochloride (50 mg/L)	Standaard	+
6	chitosan hydrochloride (100 mg/L)	Standaard	+
7	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	Standaard	+
8	<i>Lactobacillus</i> mix	Standaard	+
9	<i>Alcaligenes</i> ST2 (isolaat uit tomaat)	Standaard	+

Statistische analyse:

Resultaten van de proef zijn geanalyseerd met one-way ANOVA (2 factor: behandeling; voor significantie $p \leq 0.05$).

2.7.3.2 Kasproef 2021 met *Agrobacterium rhizogenes* in tomaat

Deze proef is uitgevoerd om te beoordelen of biologische behandelingen effect kunnen hebben op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in jonge tomaten planten (cv Maxifort) gedurende 8 weken na zaaien (in steenwolblokken). In deze proef zijn toevoeging van verschillende micro-organismen en zilverperoxide getest. Geteste behandelingen zijn weergegeven in Tabel 10.

Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd (dosering 10^7 cellen/mL groeimedium). Zilverperoxide was toegevoegd aan voedingswater bij elke gietbeurt (tot eindconcentratie 50 ppm H_2O_2). Aantal planten per behandeling: 28 planten; Inoculatie rhizogene *Agrobacterium rhizogenes*: in week 2, na verspenen (10^8 kve/plant);
Uitvoering: april- mei 2021

Tabel 10 Behandelingen kasproef 2021 met *Agrobacterium rhizogenes* in tomaat.

Nr.	Behandeling	Voeding	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
1	Negatieve controle	Standaard	-
2	Positieve controle	Standaard	+
3	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	Standaard	+
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45	Standaard	+
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713	Standaard	+
6	<i>Bacillus thuringensis</i> isolaat ST1	Standaard	+
7	<i>Alcaligenes</i> isolaat ST2	Standaard	+
8	<i>Pseudomonas</i> isolaat T114	Standaard	+
9	<i>Pseudomonas</i> isolaat G31	Standaard	+
10	Zilverperoxide (50 ppm H_2O_2)	Standaard	+
11	BALO's mix	Standaard	+

2.7.4 Analyse van bacteriële microbiom in rhizosfeer, steenwol en fylosfeer

Tijdens de kasproeven met tomaat in 2019 en 2021 zijn monsters van tomaat rhizosfeer (worteloppervlak) en steenwol genomen voor de analyse van het bacteriële microbiom. Extractie van DNA uit rhizosfeer was uitgevoerd volgens protocol van Simmons et al. (2018). DNA is vervolgens geëxtraheerd met PowerSoil kit (Qiagen) volgens de aanwijzingen van de producent.

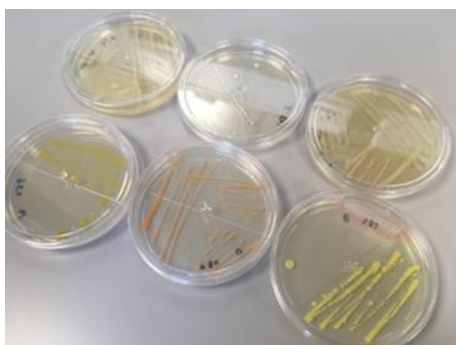
Tijdens de kasproef met *Pelargonium* in 2021 zijn er monsters genomen van de bladeren voor de isolatie van DNA uit fylosfeer (bladoppervlak). Bladeren zijn in een Bioreba zakje met steriele fosfaatbuffer gedaan. Na zacht schrapen van het blad is supernatant gebruikt voor extractie van DNA en eventuele isolatie van bacteriën op agarplaten. Extractie van DNA is uitgevoerd met PowerSoil kit (Qiagen) volgens de aanwijzingen van de producent.

Sequencing van bacteriële 16S rDNA en bioinformatica voor metabarcoding analyse is uitgevoerd door Eurofins Genomics (Illumina MiSeq). Variabele fragment van 16S rDNA gen (V3/V4 regio) van 16S rDNA is gebruikt voor metabarcoding analyse (Turner et al., 1999; Kisand et al., 2002).

3 Resultaten

3.1 Isolatie van de micro-organismen uit rhizosfeer en fylosfeer en PCR check op *aiiA* lactonase gen

Er zijn meerdere reine bacteriële isolaten verkregen uit de tomaten rhizosfeer, en *Pelargonium* en *Phalaenopsis* fylosfeer. In totaal zijn er 120 bacteriële isolaten verkregen uit de rhizosfeer van tomaat, 209 bacteriële isolaten uit de fylosfeer van *Phalaenopsis* en 122 bacteriële isolaten uit de fylosfeer van *Pelargonium*. Deze isolaten zijn vervolgens gegroepeerd op basis van morfologie (o.a. kleur en vorm van de kolonies op agar) (voorbeeld in Figuur 3.1).



Figuur 3.1 Voorbeelden van verschillende morfologieën van bacteriële isolaten uit de tomaten rhizosfeer.

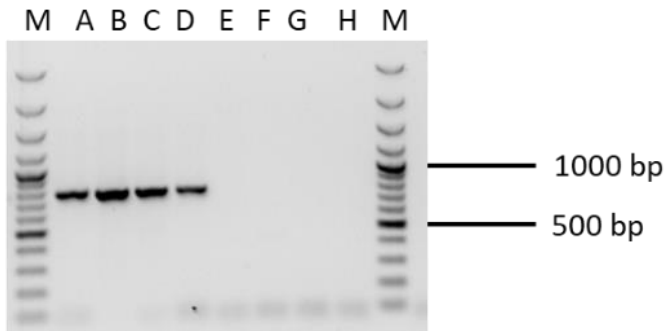
Deel van de bacteriële isolaten is vervolgens geïdentificeerd op basis van de volledige sequentie van 16S rDNA gen. Dit gen is aanwezig in DNA van alle bacteriën, maar de sequentie daarvan kan variëren tussen de verschillende soorten bacteriën. Bacteriële isolaten, die op basis van sequentie van 16S rDNA geïdentificeerd zijn als klasse *Bacilli*, zijn ook onderzocht op de aanwezigheid van *aiiA* lactonase gen in hun DNA. Lactonase *aiiA* is een enzym die nuttige bacteriën nodig hebben om signaalstoffen (acyl homoserine lactones, AHL's) van gramnegatieve (plantpathogene) bacteriën af te breken.

Alleen vier bacteriële isolaten uit de tomaten rhizosfeer behoren tot klasse *Bacilli* en alle blijken ook in bezit te zijn van *aiiA* lactonase gen (via PCR test en sequenzen van PCR product). Alle vier isolaten zijn geïdentificeerd als *Bacillus thuringensis*.

Meer dan de helft van de kweekbare bacteriële isolaten uit *Phalaenopsis* fylosfeer en rhizosfeer bleken te behoren tot klasse *Bacilli*. Groot aantal van deze isolaten is ook positief getest op de aanwezigheid van *aiiA* lactonase (72 bacteriële isolaten uit *Phalaenopsis* fylosfeer en 4 uit *Phalaenopsis* rhizosfeer). In tegenstelling tot *Phalaenopsis*, waren er maar 6 *Bacilli* geïsoleerd uit de fylosfeer van *Pelargonium* en geen daarvan is positief getest op de aanwezigheid van *aiiA* lactonase.

In de proeven zijn ook bacteriële isolaten (ST1- *Bacillus thuringensis*, ST2- *Alcaligenes* sp.) gebruikt, die in voorgaand project geïsoleerd waren uit steenwol tijdens de tomatenteelt in kas bij Wageningen UR Glastuinbouw en Bloembollen in Bleiswijk.

Bacteriële *Bacillus* isolaten uit commerciële microbiële producten (*Bacillus amyloliquefaciens* QST713, *Bacillus velezensis* FZB42 en *Bacillus amyloliquefaciens* IT45) zijn ook getest op de aanwezigheid van gen voor *aiiA* lactonase. Deze test is uitgevoerd op basis van PCR reactie met primers die specifiek zijn voor *aiiA* lactonase gen (*aiiA* gen PCR product lengte rond 150 bp). Alleen het DNA van *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 bevat gen voor *aiiA* lactonase (Figuur 3.2).



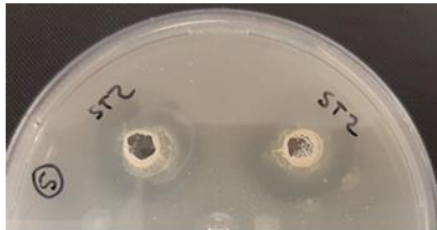
Figuur 3.2 Gelelektroforese van *aiiA* gen PCR producten uit verschillende bacteriële isolaten: A,B- *Bacillus thuringiensis* ST1; C,D- *Bacillus amyloliquefaciens* IT45; E,F- *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 en G,H- *Bacillus velezensis* FZB42. Verwachte grootte van de PCR product is rond 800 bp.

3.2 Antagonisme assays

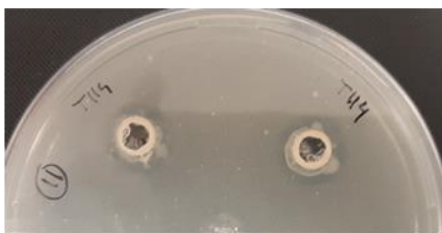
Bacteriële isolaten die verkregen zijn uit de tomaten rhizosfeer, Pelargonium fylosfeer en fylosfeer en rhizosfeer van Phalaenopsis zijn *in vitro* getest (dual layer agar) op antagonisme tegen drie bacteriële pathogenen: *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, *Agrobacterium rhizogenes* en *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*.

Uit een antagonisme assay blijkt dat er een aantal bacteriële isolaten *in vitro* de groei van alle drie de plantpathogene bacteriën kunnen remmen. Onderstaande isolaten waren antagonistisch voor alle drie de geteste plantpathogene bacteriën: isolaat T11 (uit tomaat), isolaat *Pseudomonas* T114 (uit tomaat), *Alcaligenes* ST2 (uit tomaat). Voorbeelden van antagonisme (zichtbaar als doorzichtige stukken in agar, geen groei van plantpathogene bacteriën) zijn te zien in Figuur 3.3.

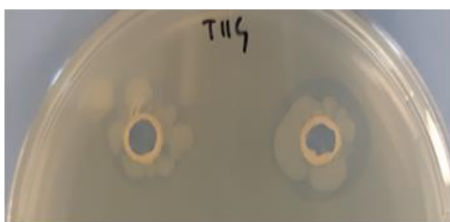
Antagonisme isolaat *Alcaligenes* ST2- *Rhizobium*



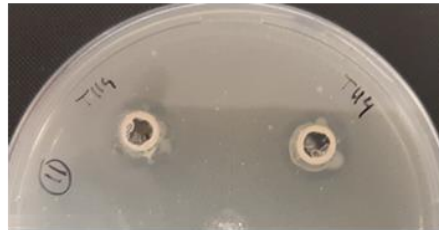
Antagonisme isolaat T114- *Acidovorax*



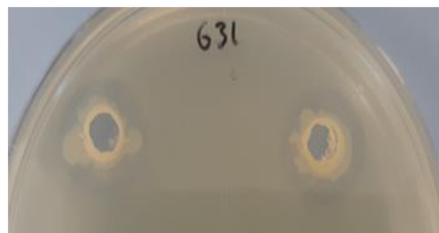
Antagonisme isolaat T114- *Xanthomonas*



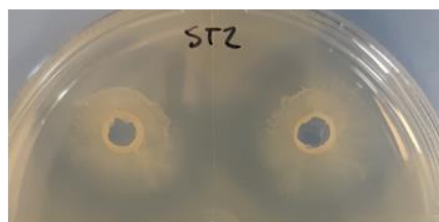
Antagonisme isolaat *Pseudomonas* T114- *Rhizobium*



Antagonisme isolaat G31- *Xanthomonas*



Antagonisme isolaat *Alcaligenes* ST2- *Xanthomonas*



Figuur 3.3 Antagonistisch effect van verschillende bacteriële isolaten op groei van bacteriële plantpathogenen.

Overzicht van antagonisme van verschillende isolaten tegen *Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae*, *Agrobacterium rhizogenes* en *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* is weergegeven in Tabel 11.

Tabel 11 Antagonisme *in vitro* van bacteriële isolaten tegen *Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae*, *Agrobacterium rhizogenes* en *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*.

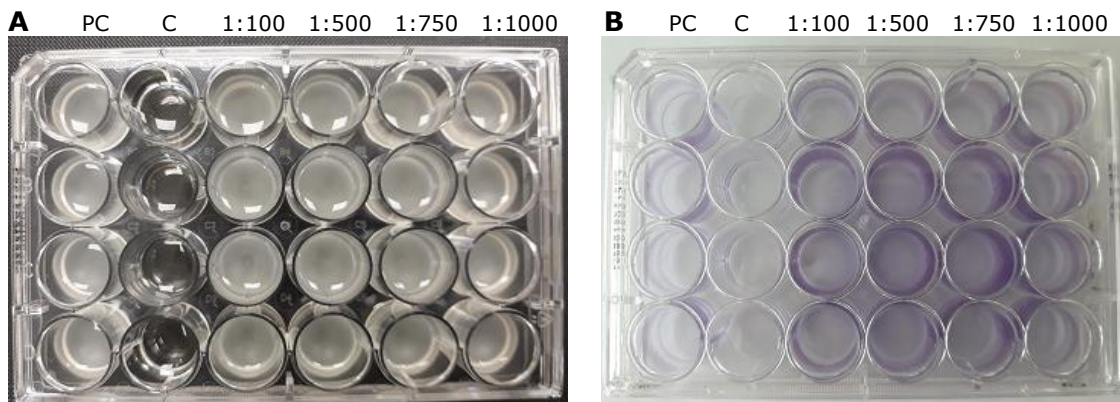
Bacteriële isolaten die antagonistisch zijn voor:		
<i>Acidovorax</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Xanthomonas</i>
T11	T11	G31
ST2	ST1	ST1
T114	ST2	ST2
P207	T114	T11
P209		T114

Sommige isolaten genoemd in Tabel 11 zijn getest in de kasproeven met *Pelargonium* en *Phalaenopsis*.

3.3 *In vitro* assays voorkomen van biofilmvorming

Er zijn diverse experimenten uitgevoerd om de effecten van enzymen en secundaire metabolieten van nuttige bacteriën op het voorkomen van biofilmvorming door plantpathogene bacteriën te kunnen beoordelen.

Als eerste was de groei van bacteriën in de assay beoordeeld (troebelheid van groeimedium; meting van OD 590nm). Daarna is de ontwikkeling van de biofilm beoordeeld (na kleuring met crystal violet). Voorbeelden van het resultaat van biofilm assay zijn weergegeven in Figuur 3.4.



Figuur 3.4 Groei van bacteriën in de biofilm assay (na 48 uur) (A) en resultaat van de biofilm kleuring met crystal violet (B). PC- positieve controle (groei bacteriën, kweek van bacterie zonder toevoeging van enzymen in kweekmedium); C- negatieve controle (voeding zonder bacteriën); Concentraties van enzymen: 1:100; 1:500; 1:750; 1:1000 (verdunningen in voeding).

Uit de uitgevoerde assays blijkt dat de geteste enzymen, behalve P14, geen inhiberende effect hebben op *in vitro* ontwikkeling van in de biofilm van *Agrobacterium rhizogenes* en *Acidovorax cattleyae* (Tabel 12). Enzym P14 heeft echter ook significant inhiberend *in vitro* effect op biofilm van nuttige bacteriën *B. amyloliquefaciens* QST713 en *B. velezensis* FZB42. Biofilm van nuttige bacteriën op het plantoppervlak is juist nodig om de planten te beschermen tegen verschillende pathogenen.

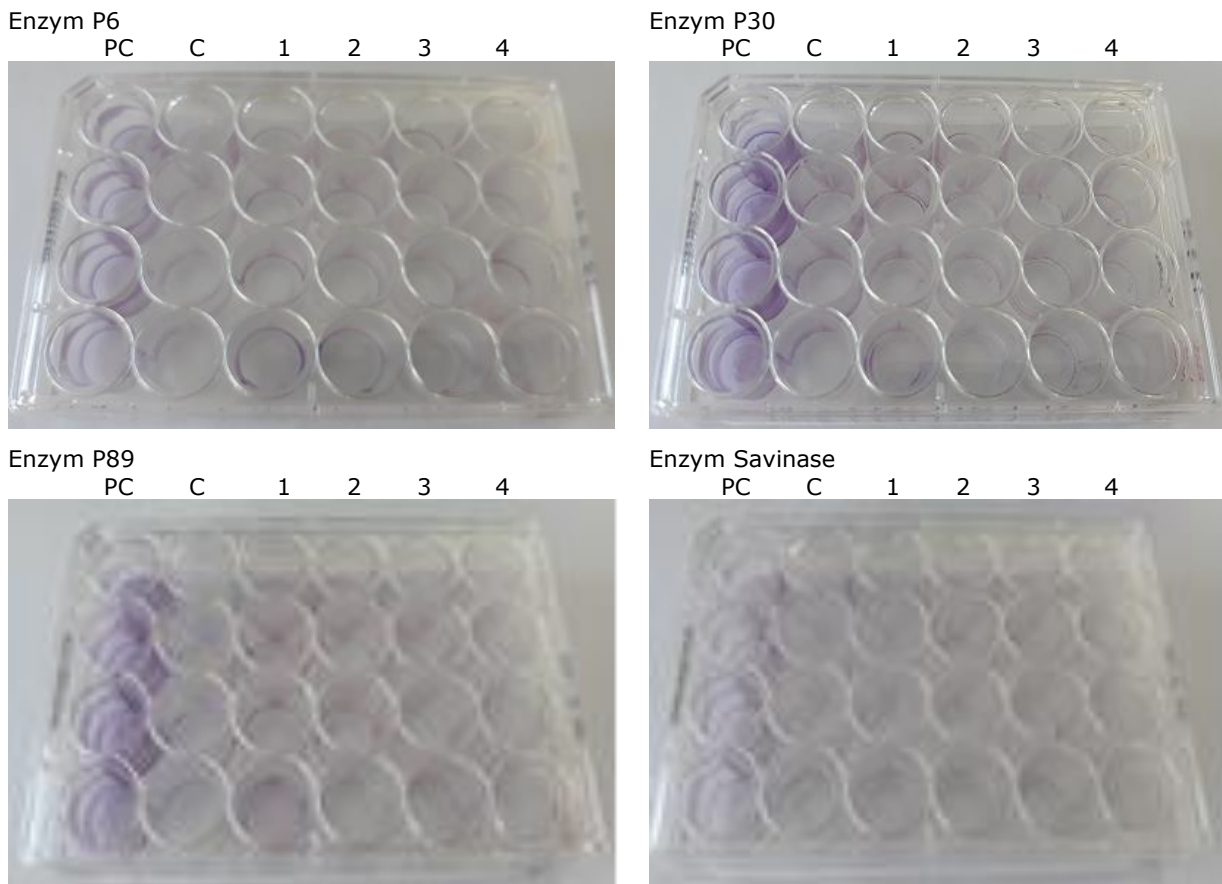
Tabel 12 Overzicht van resultaten van de experimenten met biofilmopbouw in diverse enzym-bacterie combinaties.

Enzym	<i>Xanthomonas</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Pseudomonas simiae</i>	<i>B. amyloliquefaciens QST713</i>	<i>B. velezensis FZB42</i>
Amylase	-	-	+/-	-	-	-
Lipase	-	-	-	-	X	X
P6	+	-	-	-	-	-
P30	+	-	-	-	-	-
P89	+	-	-	-	-	-
P7	X	-	-	X	-	-
P14	+	+	+	-	+	+
Savinase	+	-	-	-	-	-
Pectinase	X	-	-	-	-	X
Laccase	X	-	-	-	-	-
Combi I	+/-	-	-	-	-	+/-
Combi II	+	X	-	X	-	-

(+): inhibitie van de biofilmopbouw; (-): geen effect op de biofilmopbouw of betere biofilm vorming; (x): niet getest; voor beschrijving van Combi I en Combi II zie Tabel 1.

Voorbeelden van resultaten van in vitro bioassay van de biofilmopbouw

Vier van de geteste enzymen (P6, P30, P89, Savinase) hadden *in vitro* inhiberend effect op biofilm van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* en geen negatief effect op biofilm van nuttige bacteriën. Effect van toepassing van deze enzymen op biofilmopbouw door *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* is te zien in Figuur 3.5.



Figuur 3.5 Effect op de biofilmvorming door *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*.

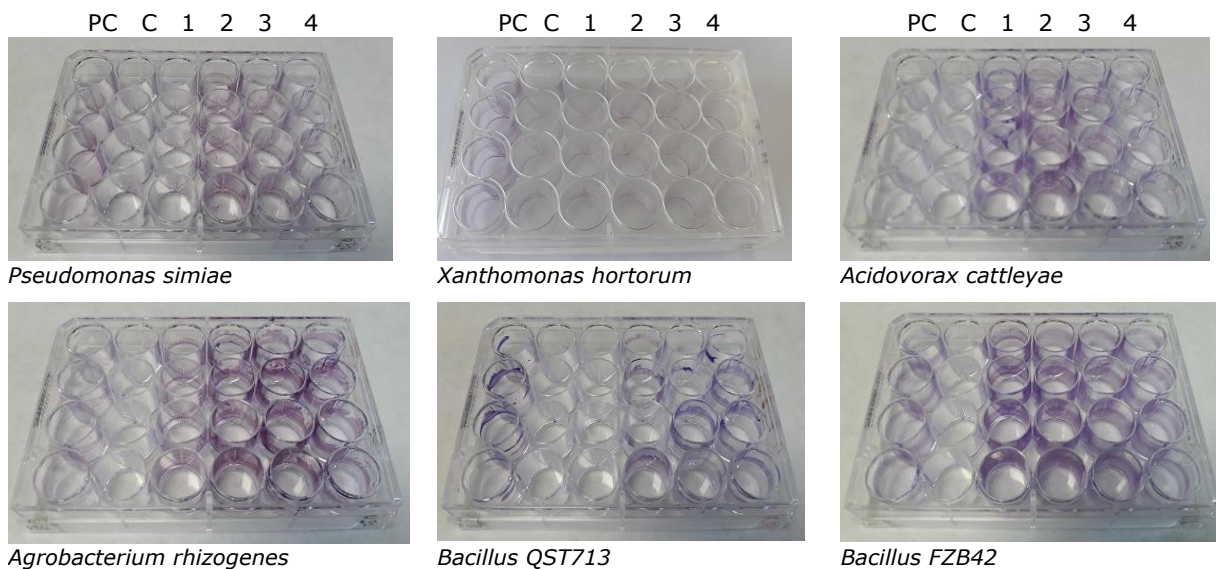
PC- positieve controle (biofilm na bacteriële kweek zonder toevoeging van enzymen); C- negatieve controle (voeding zonder *Xanthomonas* bacteriën); Er zijn verschillende verdunningen van enzymen gebruikt: 1- verdunning 1:100; 2- verdunning 1:500; 3- verdunning 1:750; 4- verdunning 1:1000. 3. Effect van toevoeging van het enzym Savinase op de biofilmopbouw door verschillende bacteriën.

Metingen van de OD590nm na 48 uur kweek van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* bevestigen dat het enzym savinase (verdunning 1:100 en 1:500) ook significant effect heeft op de groei van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* (Tabel 13).

Tabel 13 Metingen van optische dichtheid (OD590 nm) van *in vitro* kweken van verschillende bacteriën na 48 uur kweek in aanwezigheid van verschillende concentraties van savinase in groeimedium.

Enzym Savinase	<i>Pseudomonas</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Agrobacterium</i>
	OD590 nm na 48 uur kweek			
Pos C (geen enzym)	1,186	0,708	0,886	1,659
verdunning 1/100	0,131	0,029	1,749	1,618
verdunning 1/500	1,949	0,297	2,317	1,418
verdunning 1/750	2,012	0,888	2,040	1,659
verdunning 1/1000	1,841	1,238	1,677	1,567

Groei van *Pseudomonas simiae* WCS417, *Acidovorax cattlayae*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 en *Bacillus velezensis* FZB42 lijkt juist bevorderd te worden door toevoeging van enzym savinase (proteolytische activiteit) (Tabel 13). Alleen verdunning 1:100 van savinase inhibeerde de groei van *Pseudomonas simiae* WCS417. Savinase lijkt ook de biofilmvorming *in vitro* te bevorderen in *Pseudomonas simiae* WCS417, *Acidovorax cattlayae*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 en *Bacillus velezensis* FZB42 (Figuur 3.6).



Figuur 3.6 Effect van savinase enzym toevoeging op de *in vitro* biofilmvorming door verschillende bacteriën.

PC- positieve controle (biofilm na bacteriële kweek zonder toevoeging van enzym); C- negatieve controle (voeding zonder bacteriën); Er zijn verschillende verdunningen van enzymen gebruikt: 1- verdunning 1:100; 2- verdunning 1:500; 3- verdunning 1:750; 4- verdunning 1:1000.

3.4 Afbraak van AHL's

Voor de bepaling van de aanwezigheid/afbraak van de acyl homoserine lactones (AHL's), signaalstoffen van gramnegatieve bacteriën zoals *Agrobacterium rhizogens* en *Acidovorax cattleyae*, is een indirecte methode gebruikt met de AHL indicator stam *Agrobacterium tumefaciens NTL4*. Deze bacterie is genetisch gemodificeerd om zelf geen AHL's te kunnen aanmaken. Wel kan die reageren op de aanwezigheid van externe AHL's en een kleurreactie geven, via afbraak van X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) tot blauwe indol.

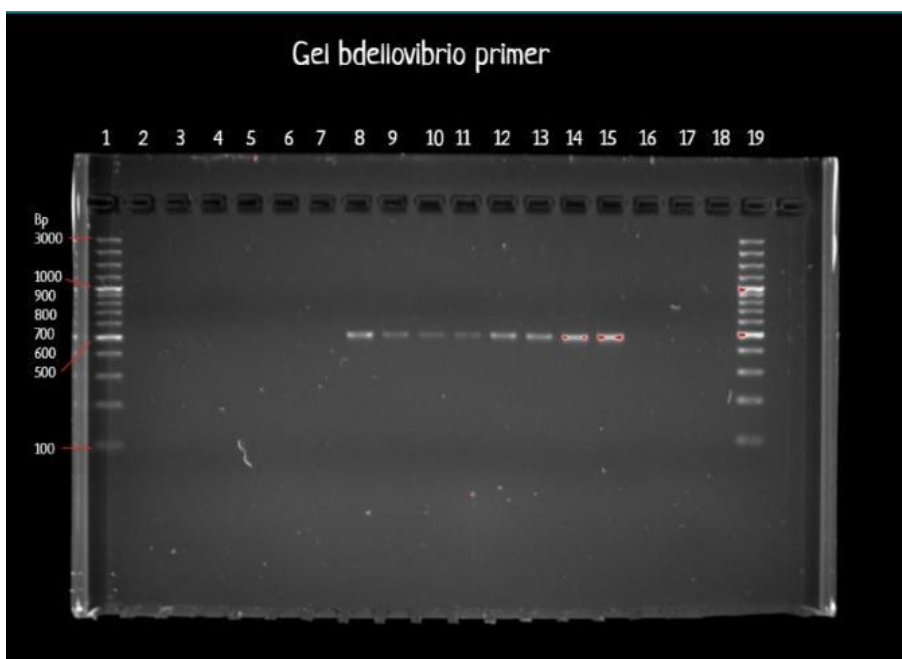
De reine kweek van *Agrobacterium tumefaciens NTL4* zou op agar zonder AHL's wit moeten uitgroeien. Ondanks meerdere pogingen (en het inkopen van nieuwe verse *Agrobacterium tumefaciens NTL4*) bleef deze blauw kleuren tijdens de kweek op agar zonder AHL's, wat het onmogelijk maakte om de indirecte test voor afbraak van AHL's uit te voeren.

De keuze van bacteriële isolaten, die gebruikt zijn in de kasproeven, is daarom gebaseerd op informatie over mogelijke antagonisme tegen plantpathogene bacteriën en op informatie over de aanwezigheid van genen voor enzym aiiA lactonase, die verschillende AHL's kan afbreken, in het genoom van verschillende bacteriële isolaten.

3.5 Aanwezigheid van BALO's in teeltsystemen onder glas

Parasitaire bacteriën uit de groep *Bdellovibrio* and the like organisms (BALO's) zijn zeer moeilijk kweekbaar op agar groeimedia die standaard wordt gebruikt in een microbiologisch laboratorium. Om vast te kunnen stellen of deze bacteriën van nature aanwezig zijn in de verschillende teeltsystemen onder glas is het nodig om gebruik te maken van PCR technieken. DNA is geïsoleerd uit *Phalaenopsis* fylosfeer, tomaat rhizosfeer en *Pelargonium* fylosfeer. Er zijn PCR reacties uitgevoerd om de aanwezigheid van drie families van parasitaire bacteriën vast te stellen: *Bdellovibrionaceae*; *Bacteriovoracaceae* en *Peredibacteraceae*.

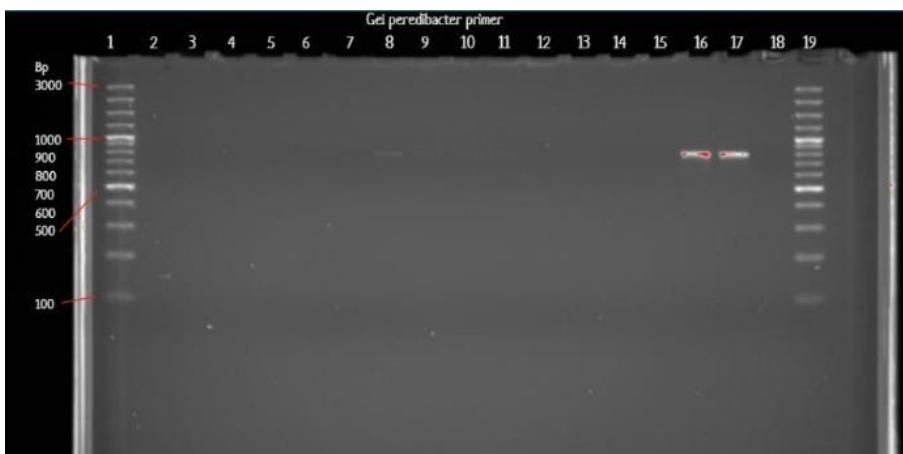
PCR producten van de juiste lengte zijn verkregen, met primers voor *Bdellovibrionaceae* en *Bacteriovoracaceae*, uit tomaat rhizosfeer (Figuur 3.7 en Figuur 3.8). Er zijn geen PCR producten gevormd met primers specifiek voor *Peredibacteraceae* (Figuur 3.9). Ook geen PCR producten voor BALO's gevormd met DNA uit fylosfeer van *Phalaenopsis* en *Pelargonium*.



Figuur 3.7 Gelelektroforese (op 1.5% agarose gel) van PCR producten met primers voor *Bdellovibrionaceae*; 1 en 19 marker; 2 t/m 7 DNA monsters uit *Phalaenopsis* fylosfeer; 8 t/m 13 monsters uit tomaat rhizosfeer; 14 en 15 positieve controle met DNA van *Bdellovibrio bacteriovorus* (lengte PCR product 481 bp).



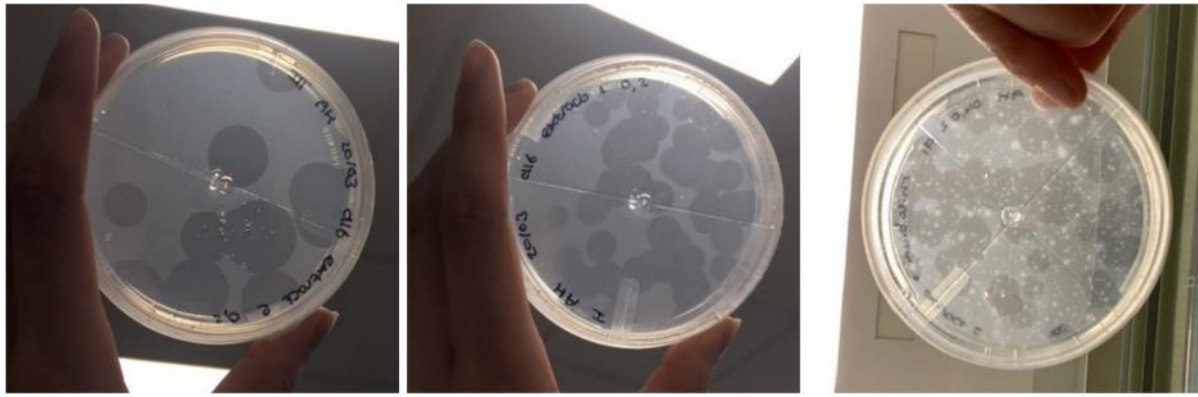
Figuur 3.8 Gelelektroforese (op 1.5% agarose gel) van PCR producten met primers voor *Bacteriovoracaceae*; 1 en 19 marker; 2 t/m 7 DNA monsters uit *Phalaenopsis* fylosfeer; 8 t/m 13 monsters uit tomaat rhizosfeer; 14 t/m 18 monsters uit *Pelargonium* fylosfeer (lengte PCR product 769 bp).



Figuur 3.9 Gelelektroforese (op 1.5% agarose gel) van PCR producten met primers voor *Peredibacteraceae*; 1 en 19 marker; 2 t/m 7 DNA monsters uit *Phalaenopsis* fylosfeer; 8 t/m 13 monsters uit tomaat rhizosfeer; 14 en 15 positieve controle *Bdellovibrio*, 16 en 17 positieve controle met DNA van *Peridibacter starrii* (lengte PCR product 767 bp).

Er zijn extracten van tomaat rhizosfeer gemaakt (in fosfaat buffer, PBS) voor de isolatie van *Bdellovibrionaceae* en *Bacteriovoracaceae*. Deze extracten zijn gefiltreerd door 0.22 μm filter. *Bdellovibrionaceae* en *Bacteriovoracaceae* zijn zeer kleine bacteriën die door deze filter niet worden tegen gehouden, in tegenstelling tot andere bacteriële cellen die groter zijn en door de filter worden tegen gehouden.

Vervolgens zijn de rhizosfeer extracten gebruikt om BALO's te kweken op prooi bacterie *Agrobacterium rhizogenes* in dual layer agarplaten. *Agrobacterium* groeide in de bovenste laag van de agar. Na 9 dagen kweek zijn de eerste halo's waargenomen (Figuur 3.10). Halo's ontstaan op plekken waar de *Agrobacterium* cellen kapot gaan door infectie met *Bdellovibrio* of *Bacteriovorax* bacteriën. PCR reactie, met primers specifiek voor *Bdellovibrionaceae* en *Bacteriovoracaceae*, met DNA geïsoleerd uit plekken met halo's, bevestigde dat BALO's aanwezig waren in agar op plekken waar halo's zichtbaar waren. *Bacteriovorax* was aanwezig in de agar op plekken met halo's.



Figuur 3.10 Ontwikkeling van doorzichtige halo's in *Agrobacterium rhizogenes* kweek na infectie met parasitaire BALO's bacteriën uit tomaat rhizosfeer (beoordeling na 9 dagen kweek).

Producten van de PCR reactie zijn opgeschoond met PCR clean up kit (Qiagen) en opgestuurd voor sequencing met *Bacteriovorax* primers (BaseClear BV). Sequencing van de PCR product heeft bevestigd dat *Bacteriovorax* bacteriën geïsoleerd waren uit tomaat rhizosfeer op double layer agar met *Agrobacterium* prooi.

Extracten uit de tomaat rhizosfeer zijn ook gebruikt om parasitaire bacteriën te isoleren die *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* of *Acidovorax cattleyae* als prooi kunnen gebruiken. Helaas is dit niet gelukt.

Rhizosfeer extracten, met BALO's, zijn vervolgens opgeslagen als glycerol stocks in -80°C voor later gebruik.

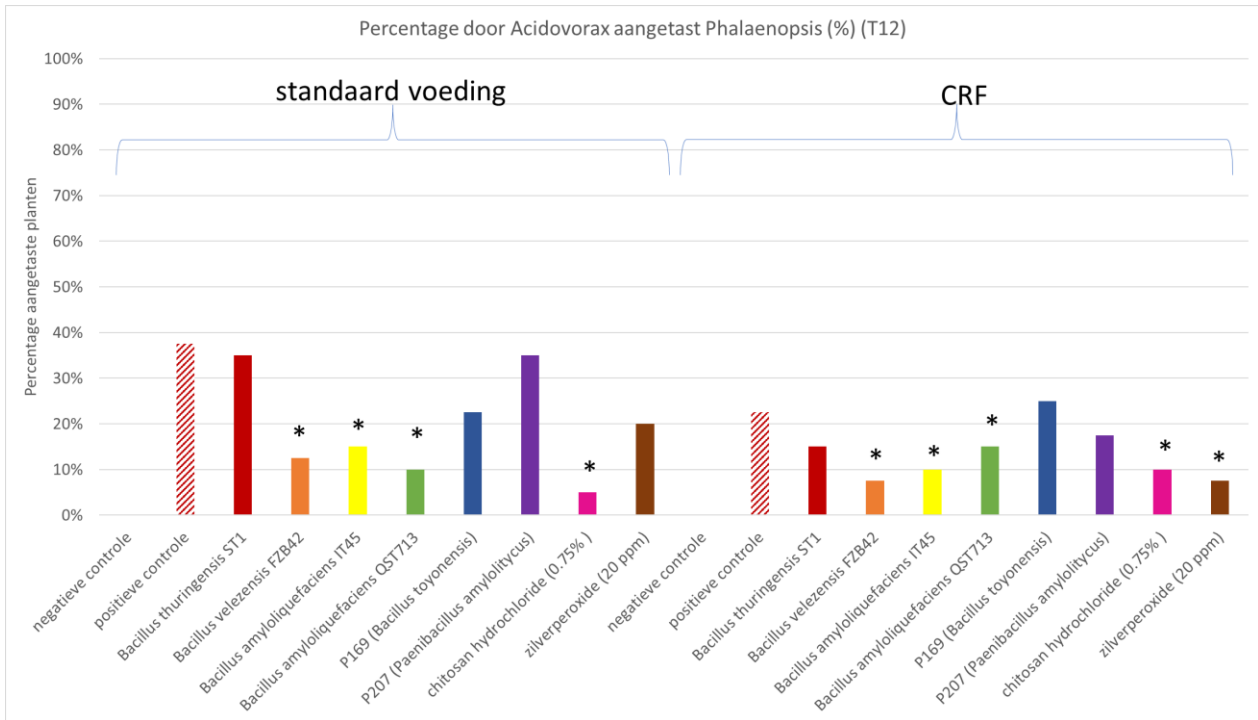
3.6 Kasexperimenten

3.6.1 Phalaenopsis

3.6.1.1 Kasproef 2020 met biologische bestrijding van *A. cattleyae* in *Phalaenopsis*

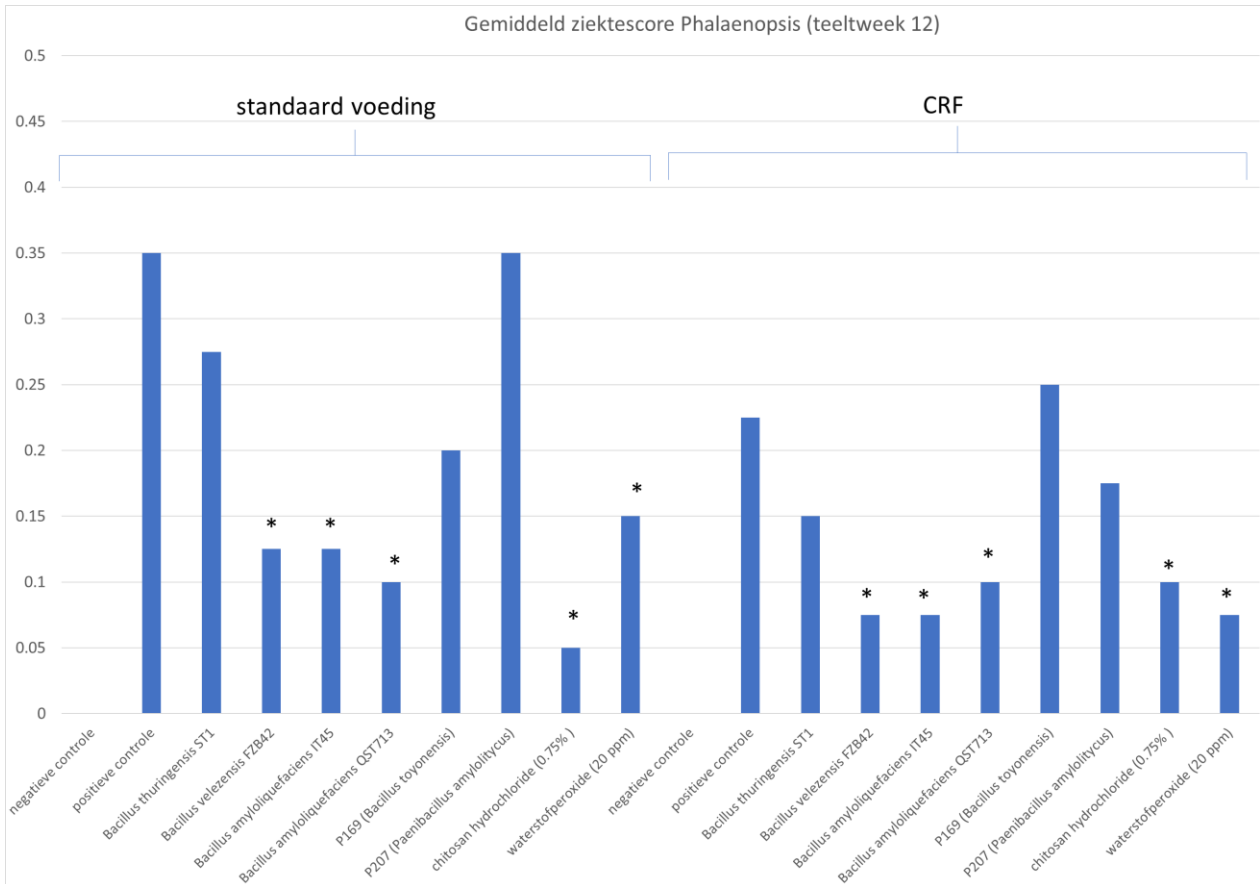
De infectie door *Acidovorax* verliep langzaam, met 38% en 23% planten met symptomen van een infectie acht weken na de inoculatie met plantpathogeen (teeltweek 12), in positieve controle behandeling, geteeld met standaard minerale voeding en gecontroleerd vrijkomende meststoffen respectievelijk (Figuur 3.11).

Veel planten met symptomen hadden een ziekte index 1 (enkele stippen op blad). Ook de gemiddelde ziekte index blijft laag onder 0.5 (Figuur 3.12). De in het eerste deel van de proef gebruikte bemestingsstrategie had geen significant effect op het percentage van geïnfecteerde planten ($p=0.095$), terwijl gemiddelde ziekte score was significant lager in planten geteeld met gecontroleerd vrijkomende meststoffen dan in controle planten (standaard voeding) ($p=0.045$). Behandeling met bacteriële isolaten had een significant effect op zowel percentage zieke planten als gemiddelde ziekte score ($p\leq 0.001$).



Figuur 3.11 Percentage aantasting met *Acidovorax* in *Phalaenopsis* (T12, 8 weken na 1^{ste} inoculatie met pathogeen); CRF- gecontroleerd vrijkomende meststoffen; behandelingen die significant verschillend zijn van positieve controle zijn aangeduid met * symbool.

Behandelingen met *Bacillus velezensis* FZB42, *Bacillus amyloliquefaciens* IT45, *Bacillus amyloliquefaciens* QST713, zilverperoxide en chitosan hydrochloride hebben een significant effect gehad op het percentage van *Phalaenopsis* planten die geïnfecteerd raakten met *Acidovorax* (Figuur 3.11). Toepassing van chitosan hydrochloride had een ongewenst neveneffect op het uiterlijk van *Phalaenopsis* bladeren (zie Figuur 3.13).



Figuur 3.12 Percentage aantasting met *Acidovorax* in *Phalaenopsis* (T12, 8 weken na 1^{ste} inoculatie met pathogeen); CRF- gecontroleerd vrijkomende meststoffen; behandelingen die significant verschillend zijn van positieve controle zijn aangeduid met * symbool.



Figuur 3.13 Voorbeeld van ongewenst neveneffect van chitosan behandeling op *Phalaenopsis* planten.

Tijdens de proef was er een aantasting door *Fusarium solani* waargenomen in de planten (voorbeelden in Figuur 3.14). Percentage van de aangetaste planten uit de verschillende behandelingen is weergegeven in Tabel 14. In sommige behandelingen zijn bij meer dan de helft van de planten de eerste symptomen van *Fusarium* aantasting waargenomen.



Figuur 3.14 Voorbeelden van aantasting *Phalaenopsis* door *Fusarium solani* in de kasproef.

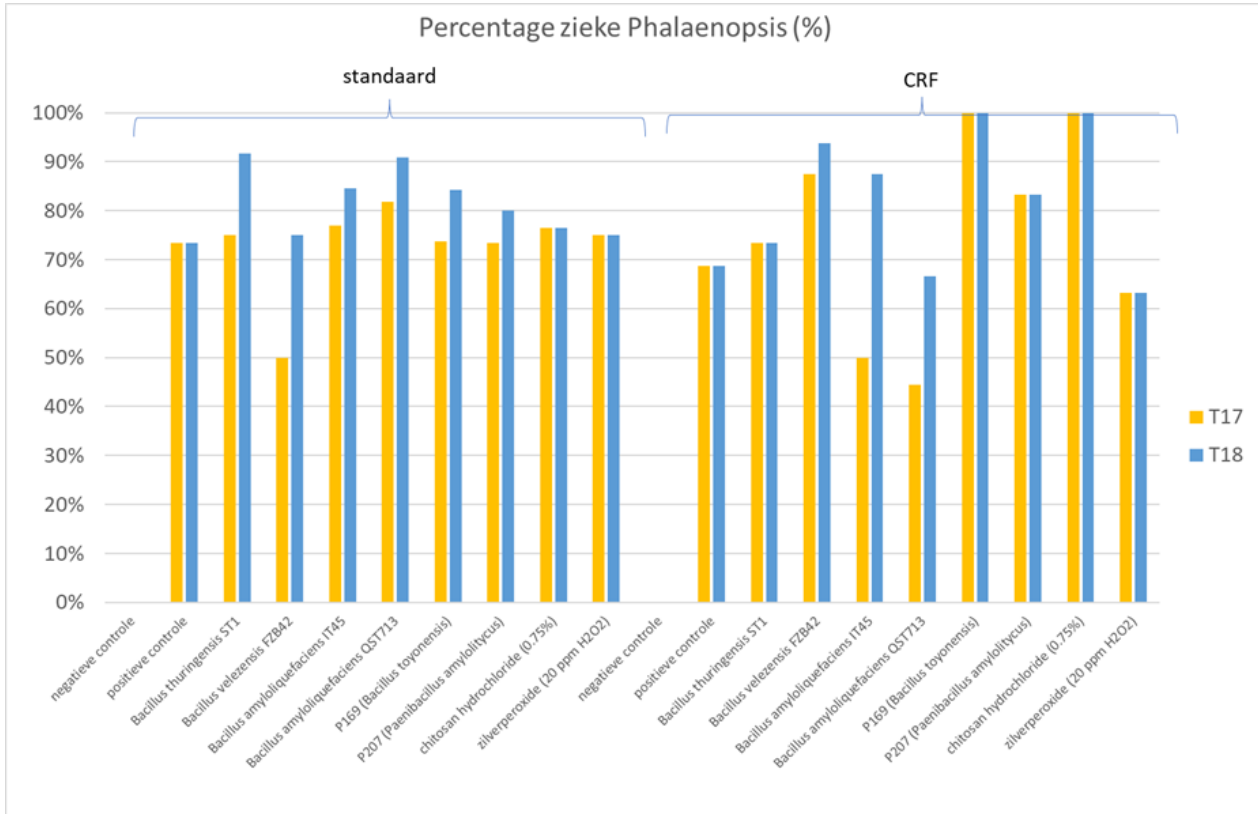
Tabel 14 Aantasting met *Fusarium* in *Phalaenopsis* in de proef 2020.

No.	Behandeling	voeding	Percentage met <i>Fusarium</i> aangetaste planten (% T11)
1	negatieve controle	Standaard	28%
2	positieve controle	Standaard	35%
3	<i>Bacillus thuringensis</i> ST1	Standaard	38%
4	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	Standaard	55%
5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45	Standaard	40%
6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713	Standaard	53%
7	P169 (<i>Bacillus toyonensis</i>)	Standaard	38%
8	P207 (<i>Paenibacillus amylolitycus</i>)	Standaard	58%
9	chitosan hydrochloride (0.75%)	Standaard	40%
10	zilverperoxide (20 ppm H ₂ O ₂)	Standaard	25%
11	negatieve controle	CRF	30%
12	positieve controle	CRF	58%
13	<i>Bacillus thuringensis</i> ST1	CRF	55%
14	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	CRF	43%
15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IT45	CRF	58%
16	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713	CRF	35%
17	P169 (<i>Bacillus toyonensis</i>)	CRF	55%
18	P207 (<i>Paenibacillus amylolitycus</i>)	CRF	38%
19	chitosan hydrochloride (0.75%)	CRF	60%
20	zilverperoxide (20 ppm H ₂ O ₂)	CRF	50%

ST- standaardvoeding schema; CRF- (gecontroleerd vrijkomende meststof, eng. controlled release fertilisers).

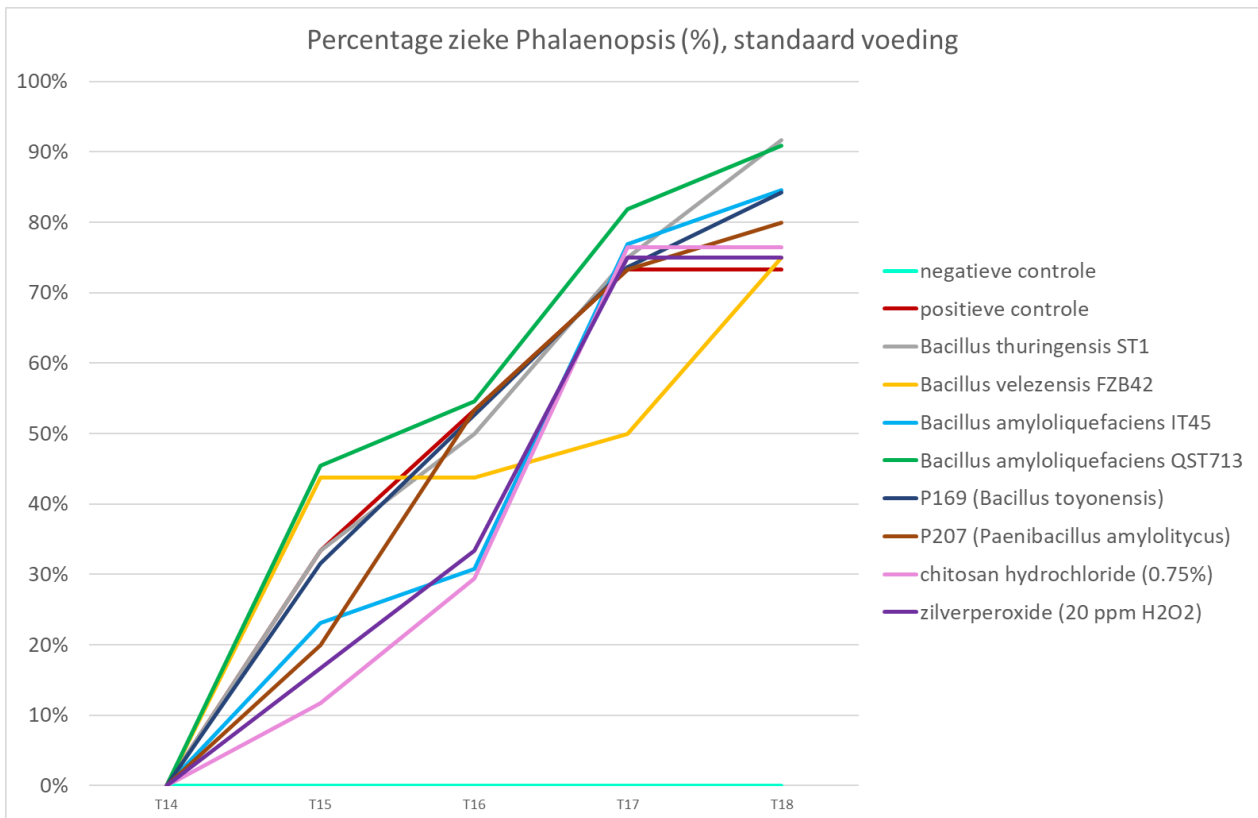
Omdat er een *Fusarium* aantasting was geconstateerd, heeft de projectgroep besloten om bij het deel van de planten (zonder zichtbaar *Fusarium* en *Acidovorax* infectie) de behandelingen voort te zetten en ze nogmaals te infecteren met hoge dichtheid van *Acidovorax* bacterie (in teeltweek 14; op 17 september 2020). Klimaatinstellingen in de kas zijn ook aangepast zodat de infectie beter zou kunnen aanslaan (verhoging van RV tot 90%).

In het tweede deel van de proef is de infectie met *Acidovorax* snel aangeslagen, met meer dan 70% besmette planten in de onbehandelde controle behandelingen, drie weken na de tweede inoculatie van *Acidovorax* (Figuur 3.15). In de teelt week 18 van de proef was de ziekteontwikkeling in de positieve controle niet verschillend in de behandeling met de standaard voeding ten opzichte van de behandeling met gecontroleerd vrijkomende meststoffen (CRF). Tot en met teeltweek 17 ontwikkelde de ziekte zich wel langzamer in de planten die geteeld waren met CRF voeding (Figuur 3.16). Ziekte druk bleek hoog en veel planten zijn al snel besmet geraakt.

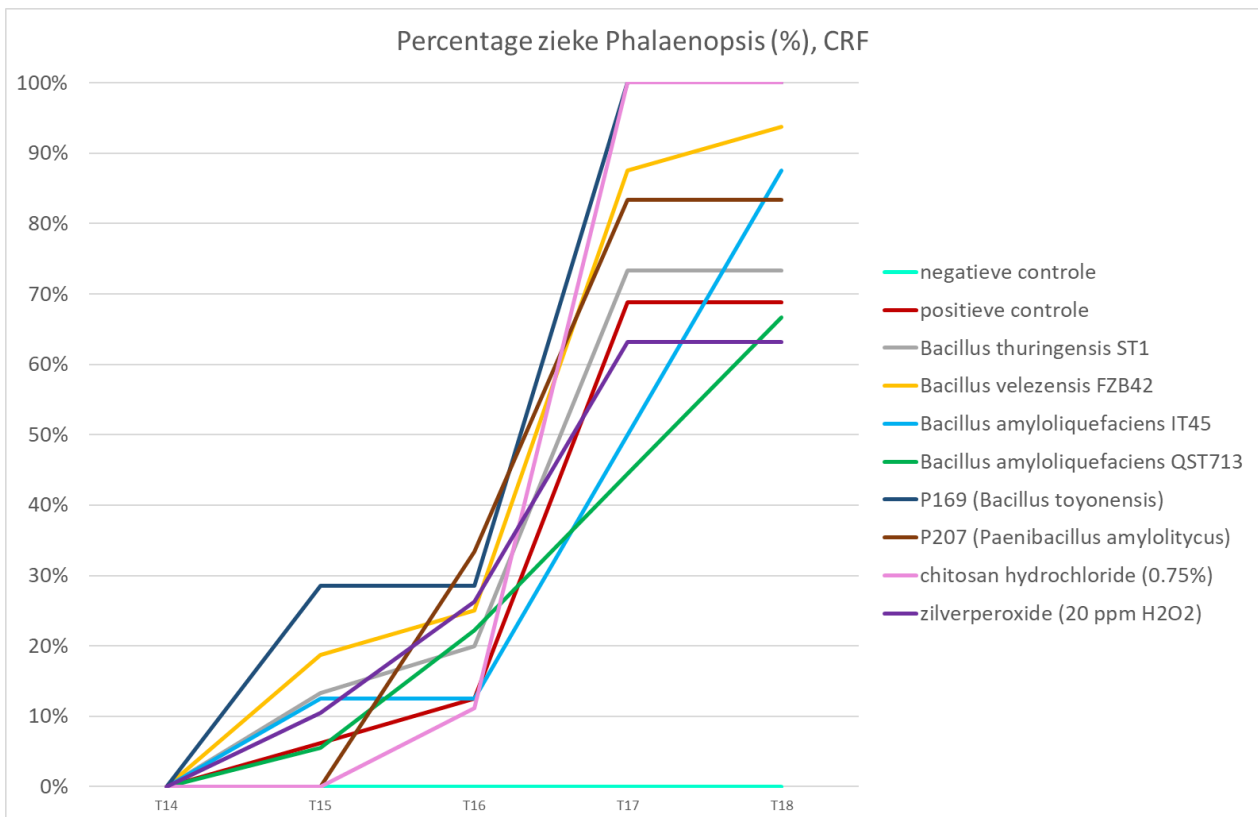


Figuur 3.15 Percentage aantasting met *Acidovorax* in *Phalaenopsis* (T17 en T18, respectievelijk drie en vier weken na herhaalde inoculatie met *Acidovorax*).

A Standaard voeding



B Langzaam vrijkomende meststoffen (CRF)



Figuur 3.16 Verloop van de aantasting met *Acidovorax* in *Phalaenopsis* in de tijd (na de tweede inoculatie met pathogeen in week 14) Percentage aantasting met *Acidovorax* in *Phalaenopsis* (T17 en T18, respectievelijk drie en vier weken na de tweede inoculatie van *Acidovorax*).

Symptomen van de infectie bleven ook heel erg gelokaliseerd op de geïnfecteerde bladeren. Er vond weinig herbesmetting plaats (van geïnfecteerde naar niet geïnfecteerde bladeren). Voorbeelden van ziektesymptomen zijn weergegeven in Figuur 3.17.



Figuur 3.17 Voorbeelden van *Acidovorax* infectie in *Phalaenopsis*.

3.6.1.2 Kasproef 2021 met biologische bestrijding van *A. cattleyae* in *Phalaenopsis*

In de proef met biologische bestrijding van *Acidovorax* in *Phalaenopsis*, uitgevoerd in 2021, is de *Acidovorax* besmetting in eerste instantie op een andere manier uitgevoerd dan in de proef in 2020. Zichtbaar zieke planten zijn tussen de proefplanten geplaatst als bron van infectieus inoculum. De infectie verliep echter niet goed en in overleg met het projectteam is de infectie met *Acidovorax* nogmaals uitgevoerd door 1 beschadigd blad per plant te infecteren (in teeltweek 8).

De infectie met *Acidovorax* op beschadigde *Phalaenopsis* bladeren ontwikkelde zich goed. In de negatieve controle behandeling (beschadigd blad, geen *Acidovorax* inoculatie) was geen infectie van *Acidovorax* zichtbaar, wel zijn verwondingen op het blad goed zichtbaar geweest (Figuur 3.18). Het is ook duidelijk dat de beschadigde bladeren van planten, die CRF voeding kregen tijdens teelt, minder symptomen hadden en waren minder vergeeld (Figuur 3.18).

Negatieve controle (standaard voeding)



Positieve controle (standaard voeding)



Positieve controle (standaard voeding)

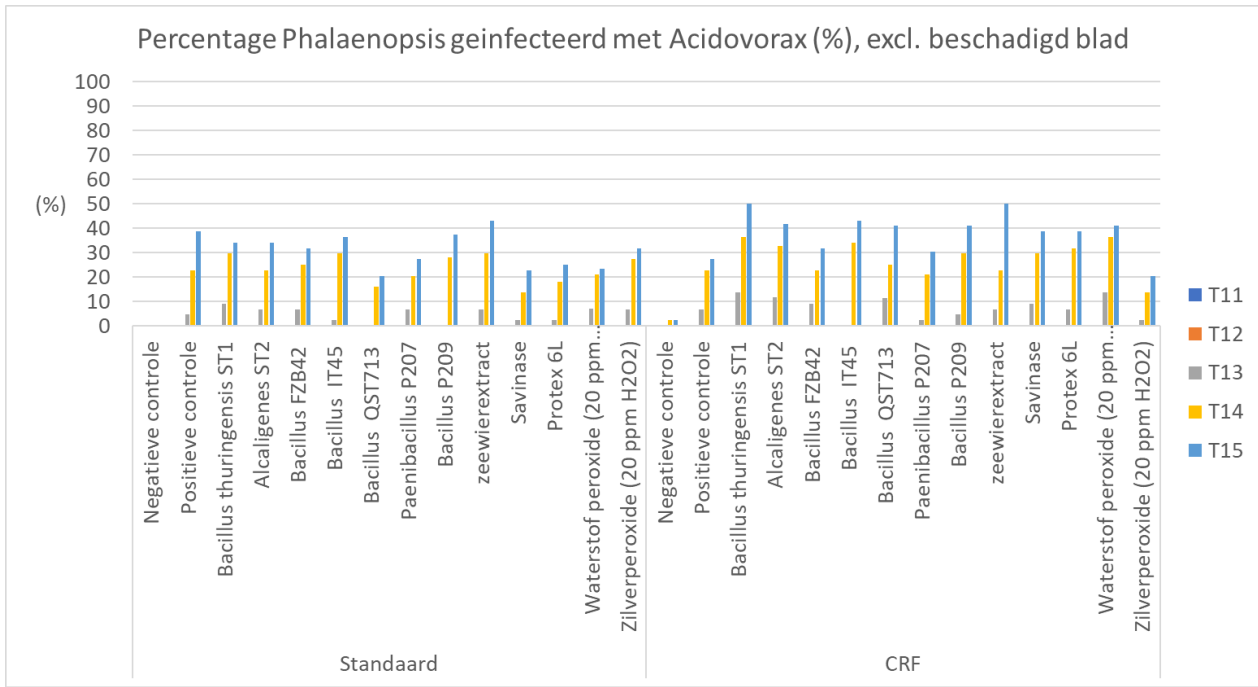


Positieve controle (CRF)

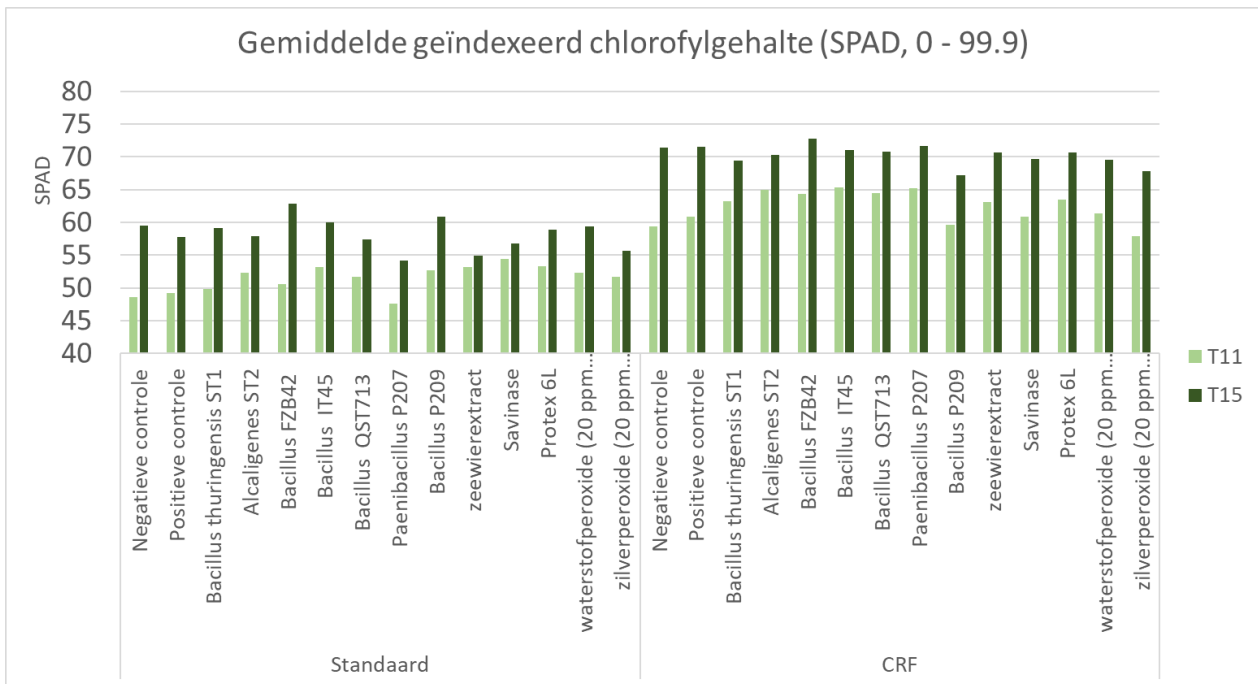


Figuur 3.18 Ontwikkeling van *Acidovorax* infectie in beschadigd *Phalaenopsis* blad bij planten die geteeld zijn met standaard minerale voeding of CRF.

Bovengenoemde verschil tussen plantreactie op de infectie met *Acidovorax* was helaas niet duidelijk zichtbaar in onbeschadigde bladeren, waarschijnlijk omdat de infectie in onbeschadigd blad was niet goed ontwikkeld (Figuur 3.19).

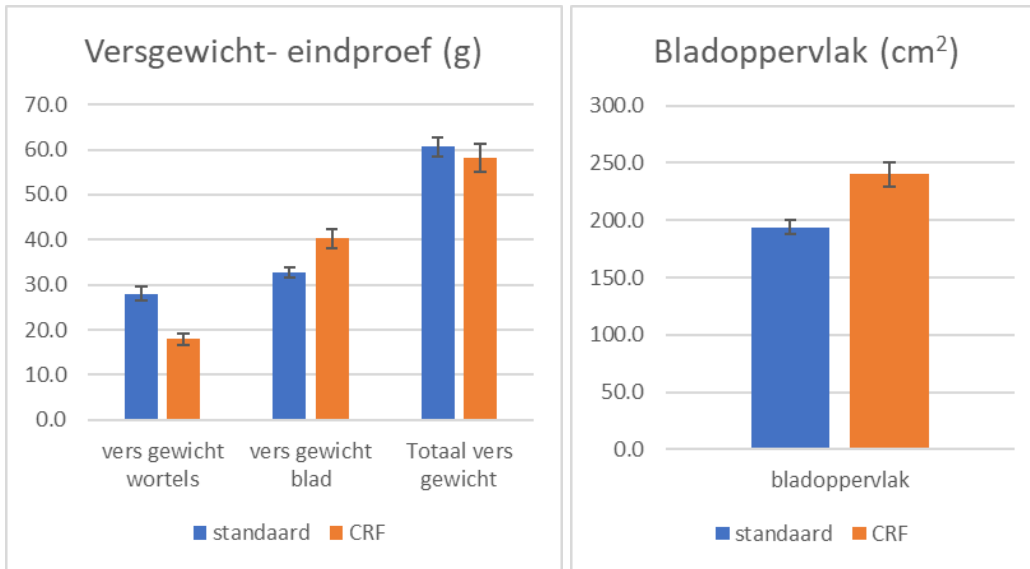


Figuur 3.19 Ontwikkeling van Acidovorax infectie in niet beschadigde Phalaenopsis bladeren gedurende de kasproef. T11 (teeltweek 11) t/m T15 (teeltweek 15).



Figuur 3.20 Gemiddelde chlorofylgehalte (SPAD meting; n=3) in onbeschadigd blad van Phalaenopsis tijdens de teelt met standaard of CRF voeding. T11= teeltweek 11; T15= teeltweek 15.

Het verschil in plantontwikkeling tussen standaard voeding en langzaam vrijkomende meststof (CRF) was ook duidelijk zichtbaar in de resultaten van andere metingen aan de planten. Bijvoorbeeld, de chlorofylmeting (SPAD) was consistent hoger in planten met CRF in vergelijking met standaard voeding (Figuur 3.20; $p < 0.001$). Gebruik van CRF resulteerde in groter bladoppervlak en hoger versgewicht van blad, terwijl het versgewicht van de wortels juist hoger was in planten geteeld met standaard voeding (Figuur 3.21).

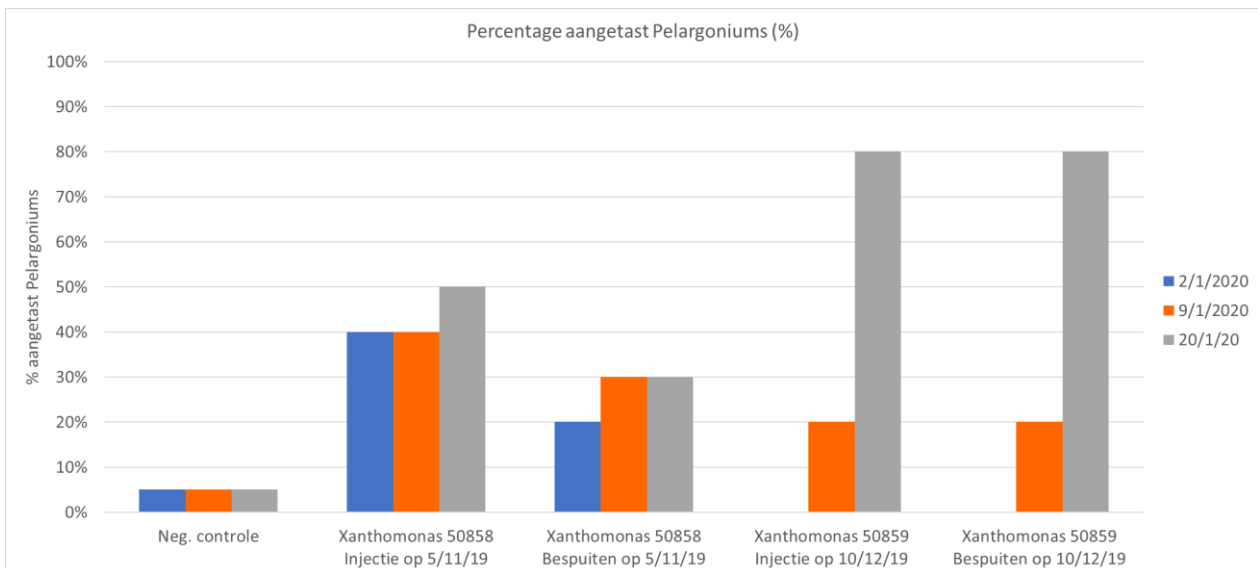


Figuur 3.21 Versgewicht en bladoppervlak van *Phalaenopsis* geteeld met standaard voeding of langzaam vrijkomende meststoffen (CRF). Tijdstip beoordeling: einde van de kasproef (in negatieve controle behandelingen).

3.6.2 Pelargonium

3.6.2.1 Voorproef 1: infectie van *Pelargonium* met *Xanthomonas hortorum pv pelargonii*

In de infectie proef met *Pelargonium* zijn twee isolaten van plantpathogene *Xanthomonas hortorum pv pelargonii* gebruikt. Beide isolaten van *Xanthomonas hortorum pv pelargonii* (DSM 50858 en DSM 50859), die zijn gebruikt in de infectie proef kunnen de *Pelargonium* planten infecteren. De isolaten zijn ook infectieus genoeg om de planten via de bespuiting (zonder verwonding) te infecteren (Figuur 3.22). Isolaat DSM 50859 is gekozen om gebruikt te worden in de kasproeven. De bespuiting is gekozen als infectie methode in de eerste kasproef met biologische bestrijding van *Xanthomonas* infectie in *Pelargonium*.

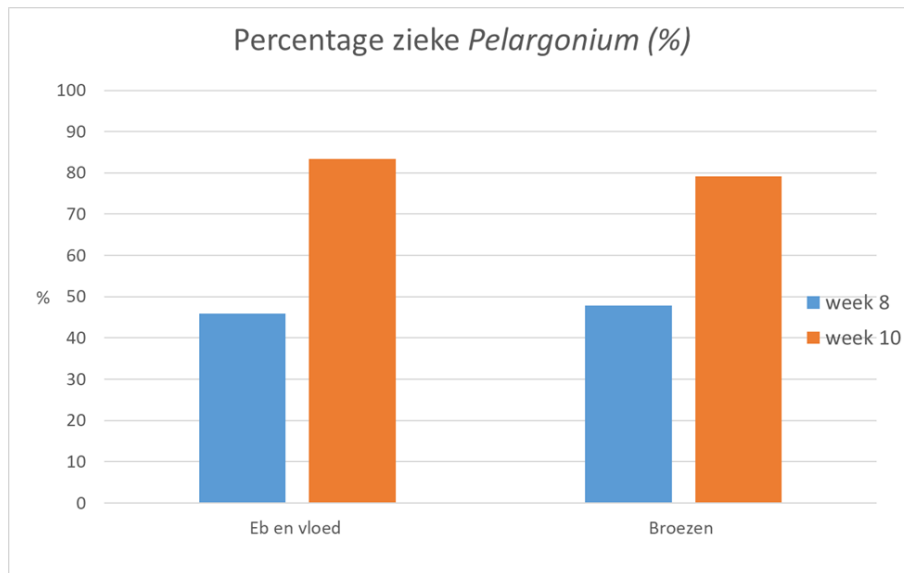


Figuur 3.22 Ontwikkeling van de ziektesymptomen in *Pelargonium* (cv *Senna*) na infectie (via bespuiting of injectie) met *Xanthomonas hortorum pv pelargonii* (isolaat DSM 50858 of DSM 50859).

3.6.2.2 Voorproef 2: nabootsen van natuurlijke infectie van *Pelargonium* met *Xanthomonas hortorum pv pelargonii* via eerder geïnfecteerde planten

Een additionele infectieproef is uitgevoerd in 2021 om uit te zoeken of het mogelijk is om de natuurlijke manier van de verspreiding van een *Xanthomonas hortorum* infectie in de kas beter na te bootsen. Geïnfecteerde, op dat moment nog symptoomloze, planten zijn meestal de primaire bron van besmetting in de kas.

In deze proef kregen de planten water via eb en vloed systeem of via broezen. Manier van watergeven bleek geen significant effect te hebben op het percentage *Pelargonium* planten met symptomen van *Xanthomonas* besmetting (8 en 10 weken na besmetting)(Figuur 3.23).



Figuur 3.23 Ontwikkeling van de ziektesymptomen in *Pelargonium* (cv Senna) na infectie (via symptoomloze, met *Xanthomonas hortorum pv pelargonii* besmette planten) na 8 of 10 weken teelt met eb en vloed systeem of broezen.

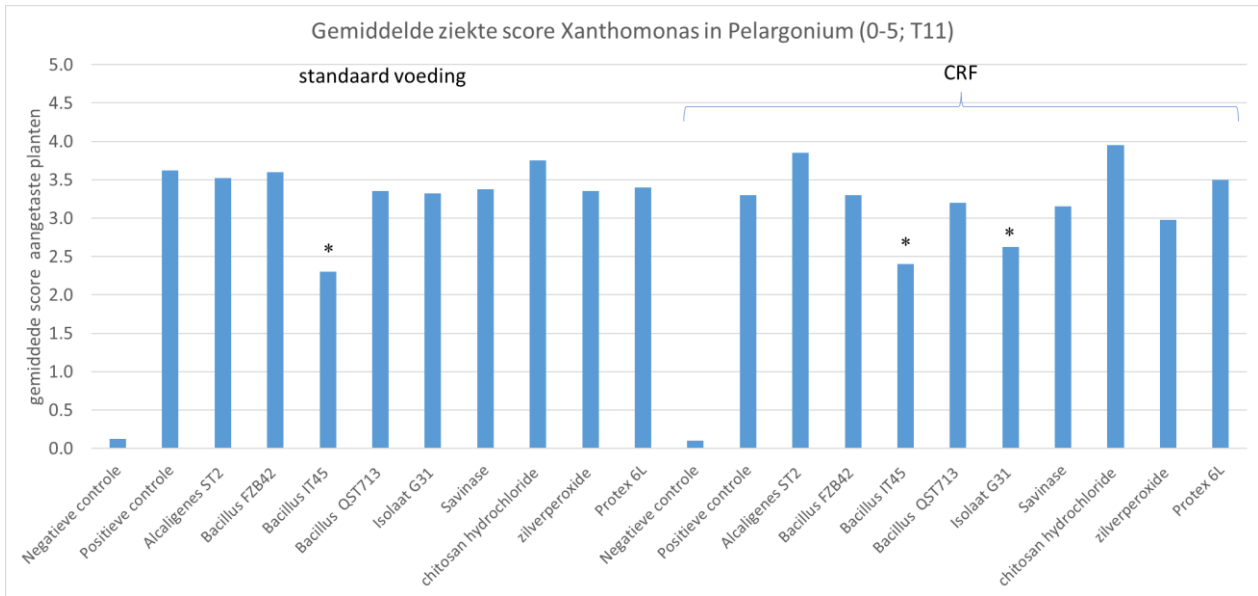
Voorbeelden van de ziektesymptomen in *Pelargonium* planten zijn te zien in Figuur 3.24.



Figuur 3.24 Symptomen van de besmetting met *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* in *Pelargonium* (cv *Senna*) tien weken na de het plaatsen van geïnfecteerde planten tussen gezonde planten.

3.6.2.3 Kasproef 2020 met biologische bestrijding van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* in *Pelargonium*

Preventieve inoculatie van *Pelargonium* met *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 resulteerde in lagere gemiddelde ziekte score, zowel in behandeling met standaard voeding als in behandeling met CRF voeding (Figuur 3.25). Ook de combinatie van *Pseudomonas* G31 (Isolaat G31) met CRF voeding resulteerde in een significant lagere gemiddelde ziekte score (Figuur 3.25). Voeding alleen had geen significant effect op gemiddelde ziekte score.



Figuur 3.25 Gemiddelde ziektescore *Pelargonium* planten (teeltweek 11, zeven weken na besmetting met *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*); CRF- gecontroleerd vrijkomende meststoffen; behandelingen die significant verschillend zijn van positieve controle zijn aangeduid met * symbool.

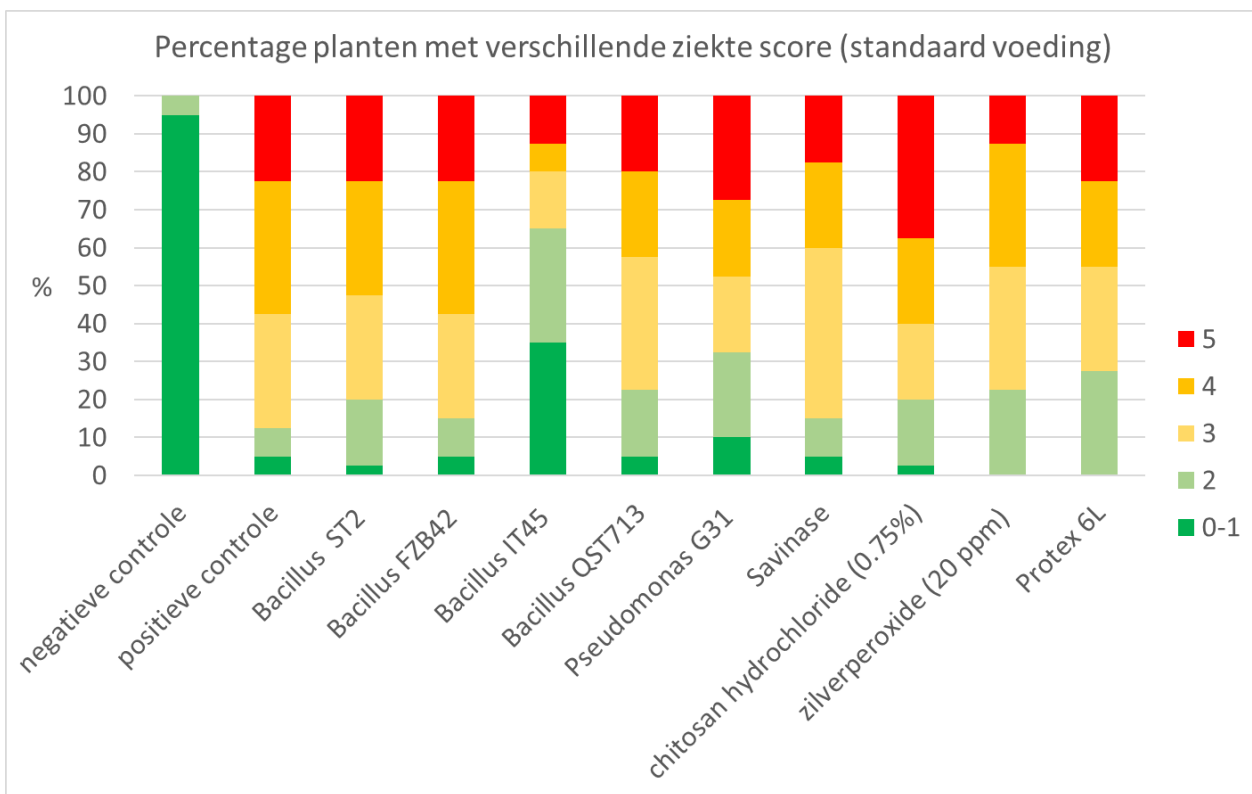
Behandeling met *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 resulteerde in de hoogste percentage van gezonde planten (score 0-1), met 35% en 37,5% gezonde planten, respectievelijk met standaard en CRF voeding (Figuur 3.26).

De behandeling met *Pseudomonas* G31 (geïsoleerd uit *Pelargonium* fylosfeer) resulteerde in significant meer gezonde planten dan in de onbehandelde positieve controle (zonder behandeling met infectie van *Xanthomonas*), zowel met standaard voeding als met CRF (Figuur 3.26). CRF voeding lijkt de effectiviteit van *Pseudomonas* G31 tegen *Xanthomonas hortorum* pc *pelargonii* te verhogen (Figuur 3.26) ten opzichte van de standaard voeding.

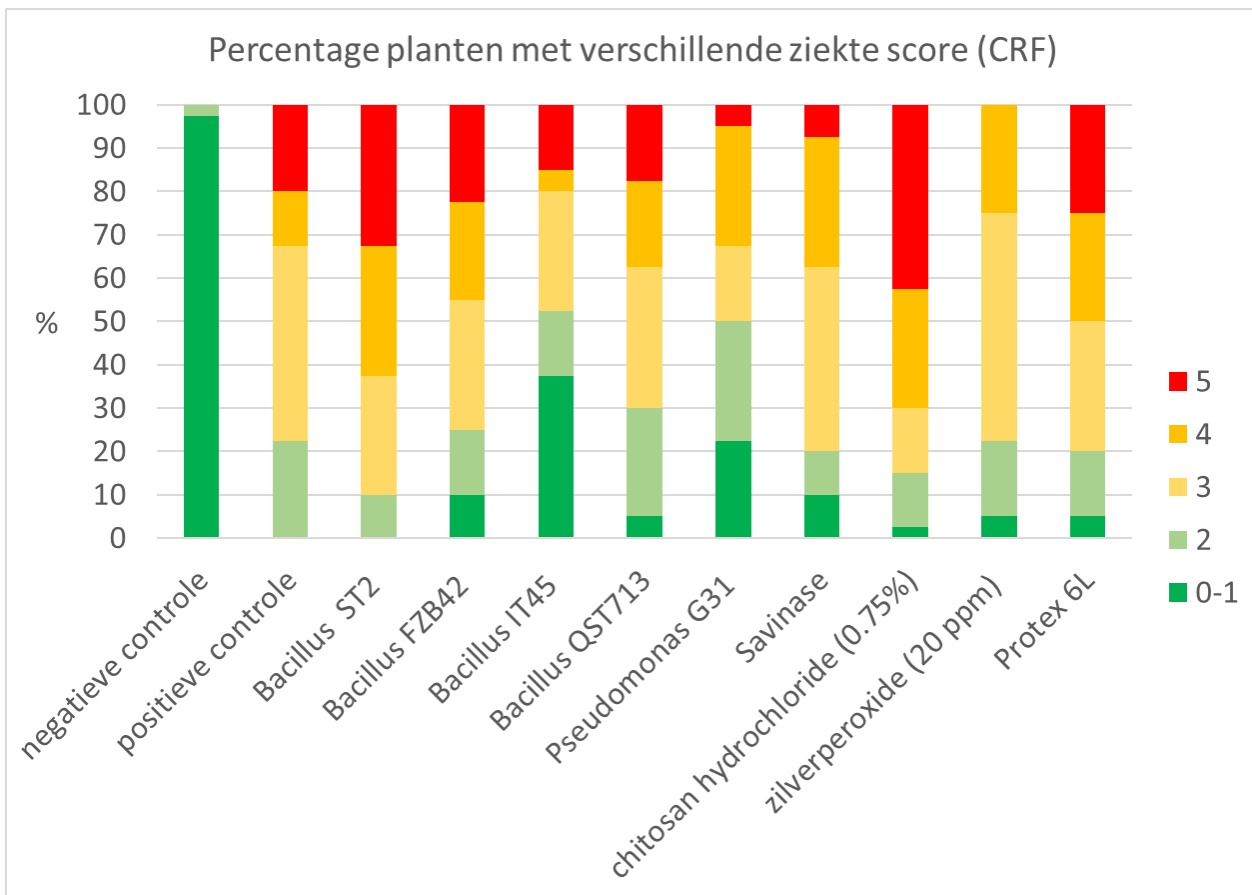
Ziekte symptomen van de *Xanthomonas* besmetting in *Pelargonium* planten uit verschillende behandelingen zijn weergegeven in Figuur 3.27.

In de kasproef was er duidelijk verschil te zien in de groei tussen de planten die standaard voeding kregen en de planten die voeding kregen met langzaam vrijkomende meststoffen (CRF). Planten met CRF voeding waren compacter en kleiner dan op standaard manier gevoede planten (Figuur 3.28).

A



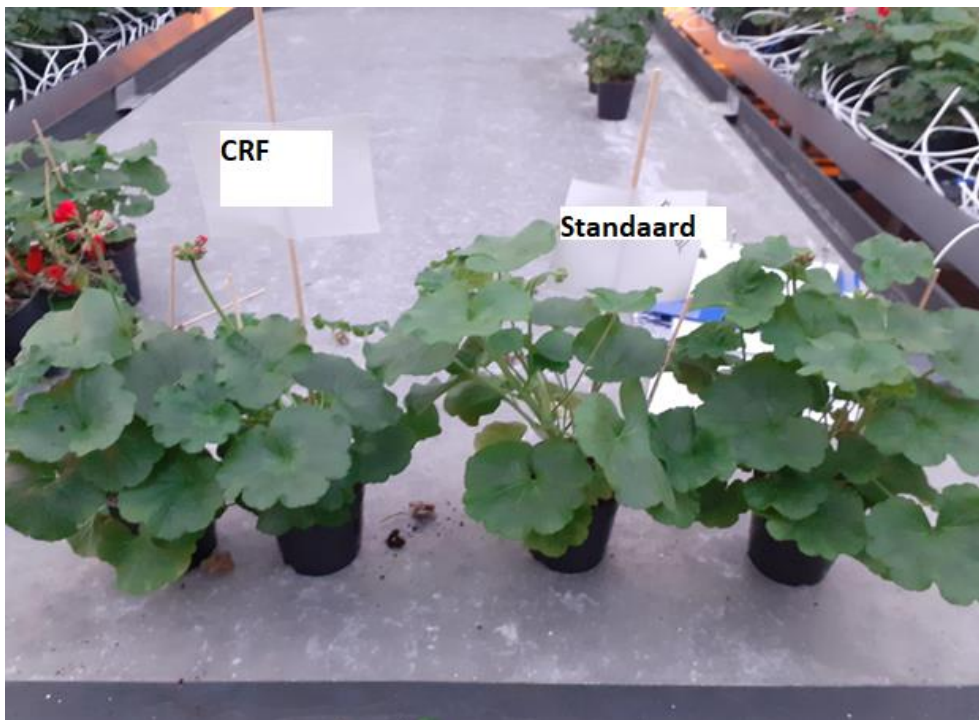
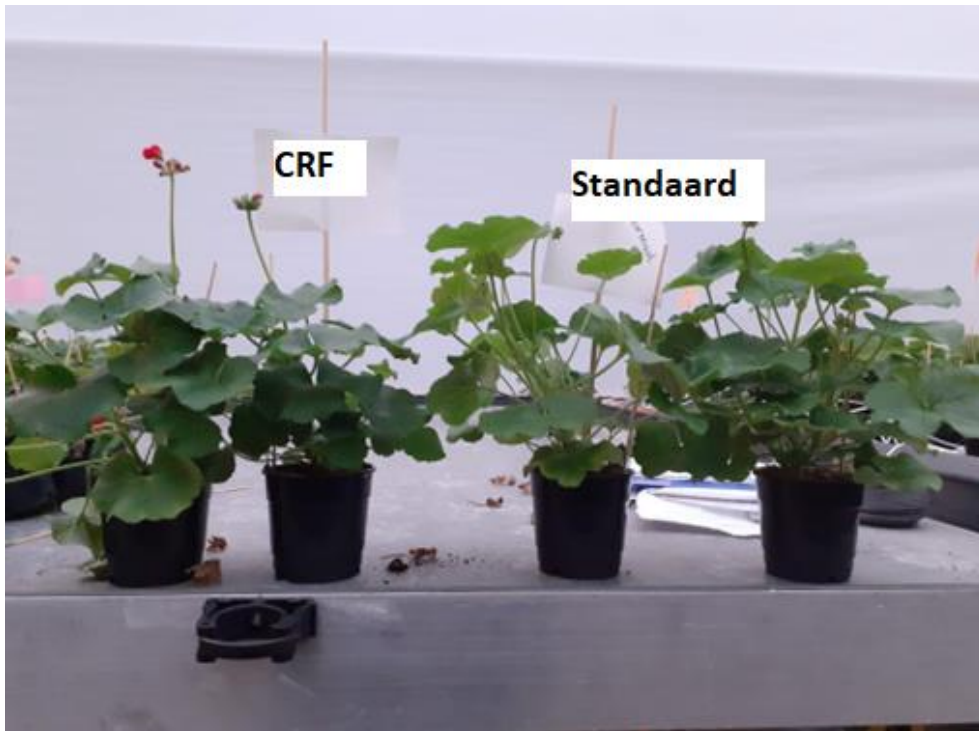
B



Figuur 3.26 Percentage *Pelargonium* planten met verschillende ziekte score in kasproef 2020 (teeltweek 11, zeven weken na besmetting met *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*).

	Standaardvoeding	CRF
Positieve controle		
<i>Bacillus</i> IT45		
<i>Pseudomonas</i> G31 (uit <i>Pelargonium</i>)		

Figuur 3.27 Voorbeelden van ziektesymptomen in *Pelargonium* in verschillende behandelingen tijdens de kasproef.

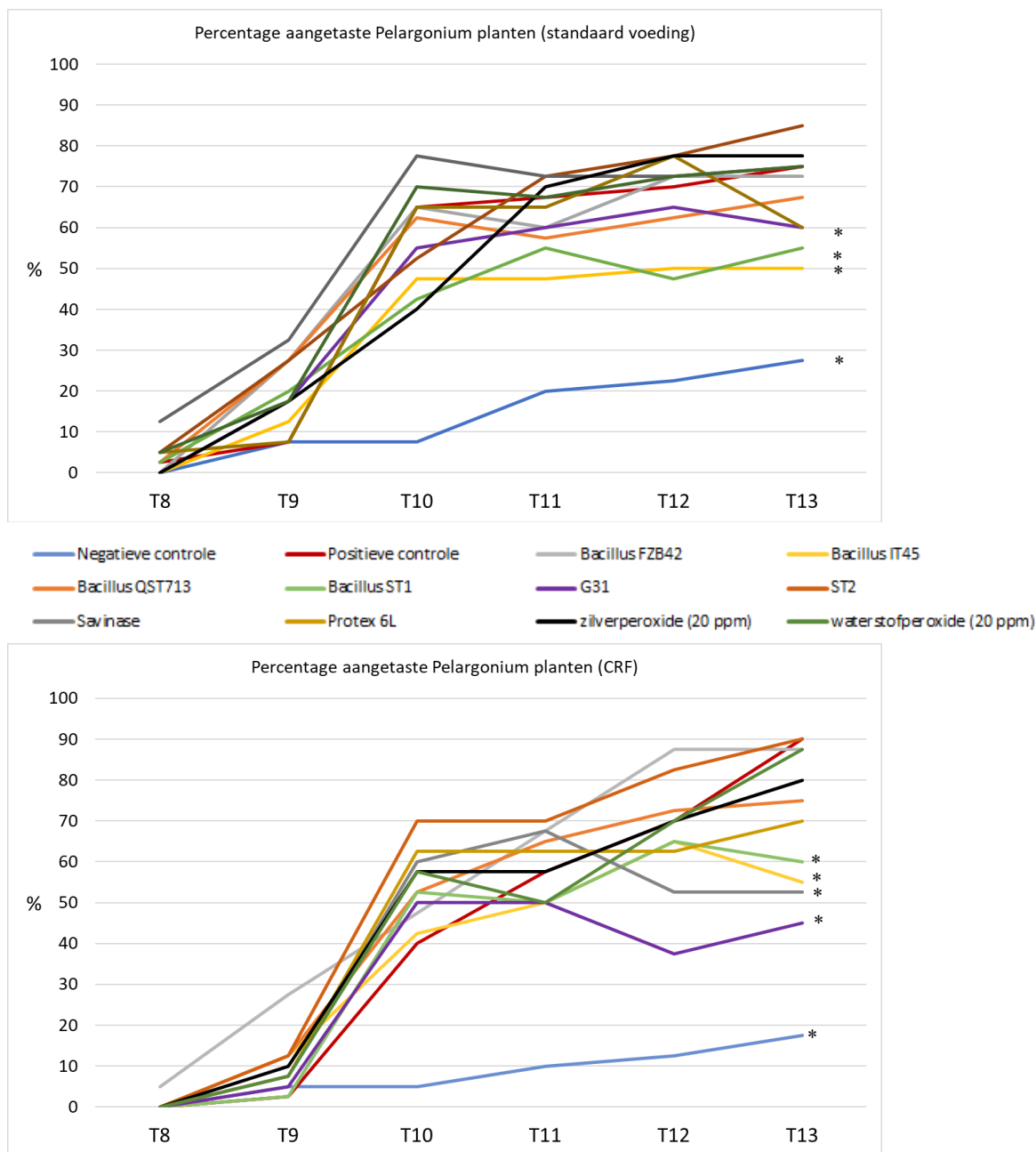


Figuur 3.28 Vergelijking groei van *Pelargonium* met: standaard voeding en gecontroleerd vrijkomende meststoffen (CRF).

3.6.2.4 Kasproef 2021 met biologische bestrijding van *Xanthomonas hortorum pv pelargonii* in *Pelargonium*

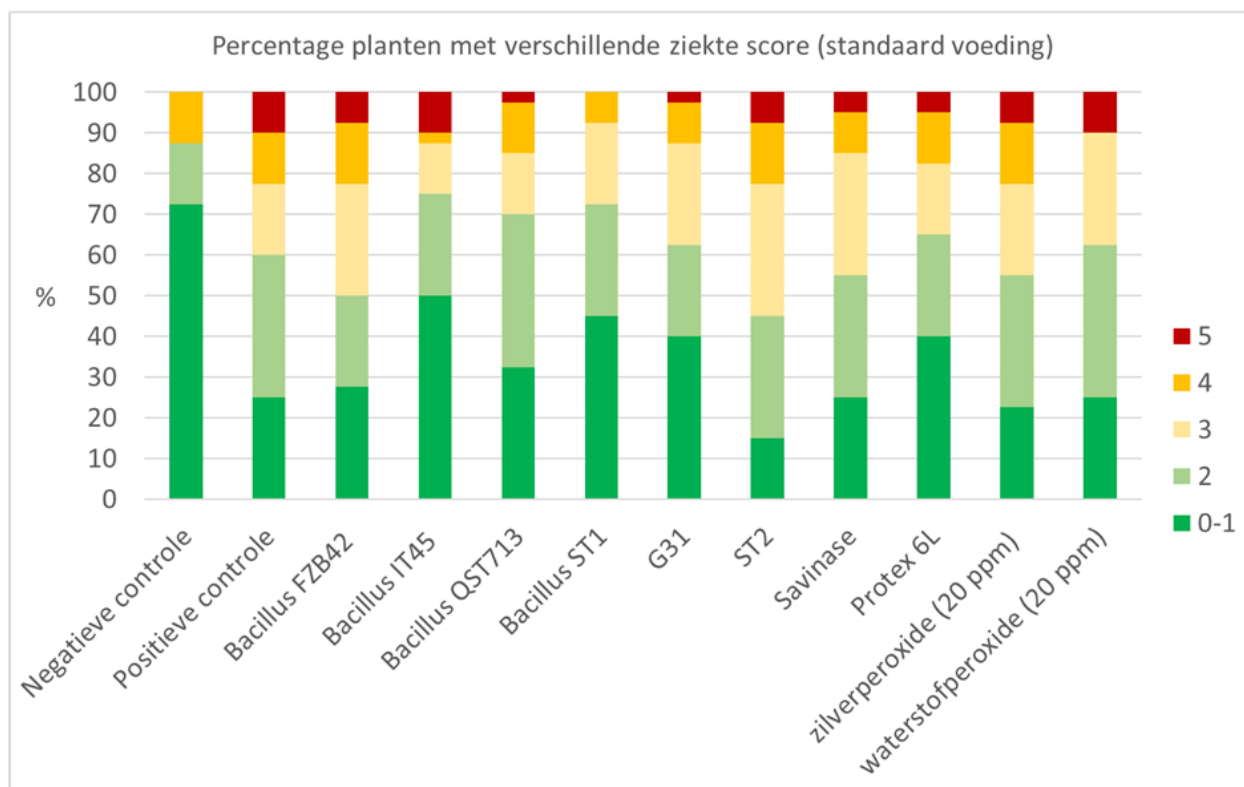
Zes weken na de introductie van geïnfecteerde planten, waren ongeveer 65% proefplanten aangetast in de positieve controle behandeling met standaard minerale voeding, terwijl in de positieve controle met CRF maar 40% van de planten (eerste) symptomen lieten zien (Figuur 3.29). Daarna ontwikkelde de ziekte zich snel, ook in behandelingen met CRF voeding. *Xanthomonas* heeft zich verspreid ook in de negatieve controle behandelingen (waarschijnlijk via spatwater). Na 13 weken teelt (negen weken na plaatsing van zieke inoculum planten) was 28% van de proefplanten aangetast in de negatieve controle behandeling met standaard minerale voeding, terwijl in de negatieve controle met CRF maar 18% van de planten (eerste) symptomen van *Xanthomonas* infectie lieten zien.

Behandelingen met *Bacillus amyloliquefaciens* IT45, *Bacillus thuringiensis* ST1 (uit tomaat) waren effectief tegen *Xanthomonas* in Pelargonium met standaard voeding en met CRF voeding (Figuur 3.29; Figuur 3.30). Behandelingen met het isolaat G31 (uit Pelargonium) en savinase in combinatie met CRF hadden ook een significant effect op de ontwikkeling van *Xanthomonas* aantasting in Pelargonium (Figuur 3.29; Figuur 3.30). Voorbeelden van ziektesymptomen in de kasproef zijn weergegeven in Figuur 3.31.

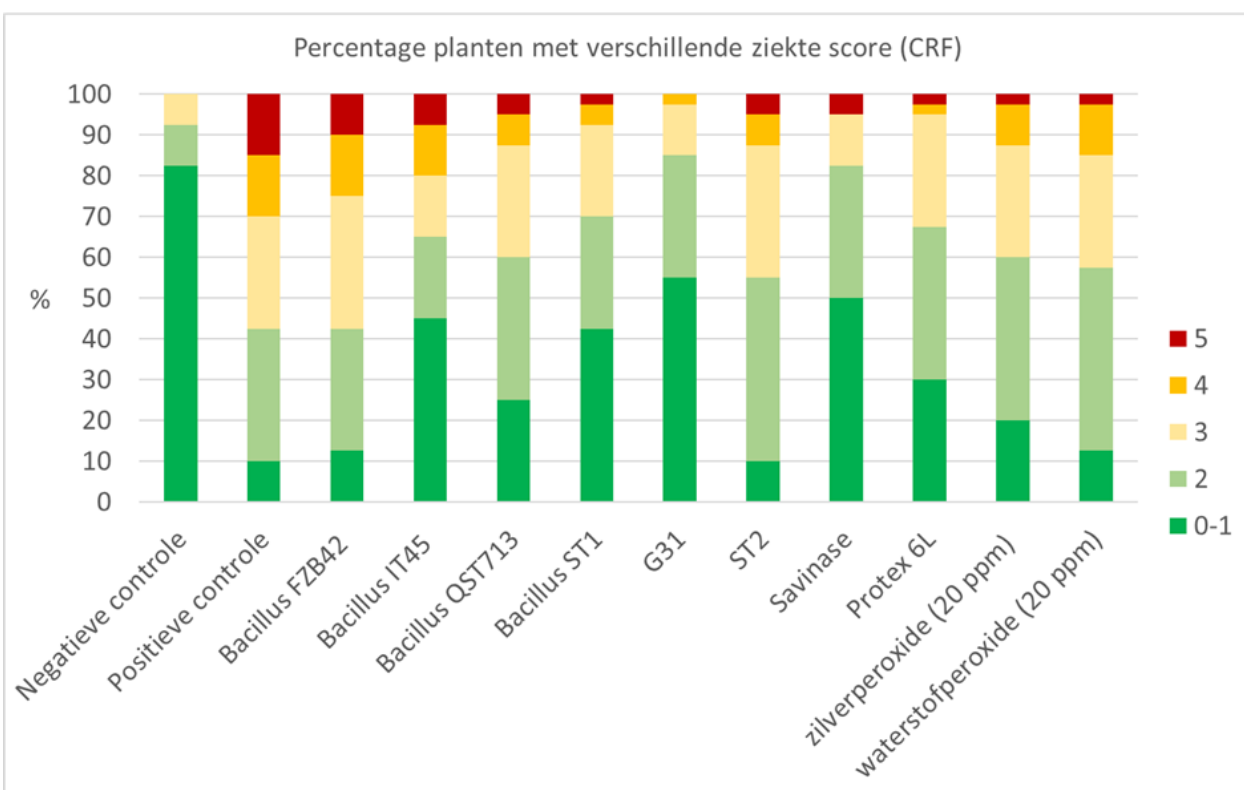


Figuur 3.29 Percentage van de geïnfecteerde Pelargonium planten tijdens de kasproef tussen T8 (teeltweek 8) en T13 (teeltweek 13). Geïnfecteerde planten zijn in teeltweek 4 tussen de proefplanten geplaatst. Behandelingen die significant verschillend zijn van positieve controle zijn aangeduid met * symbol.

A



B

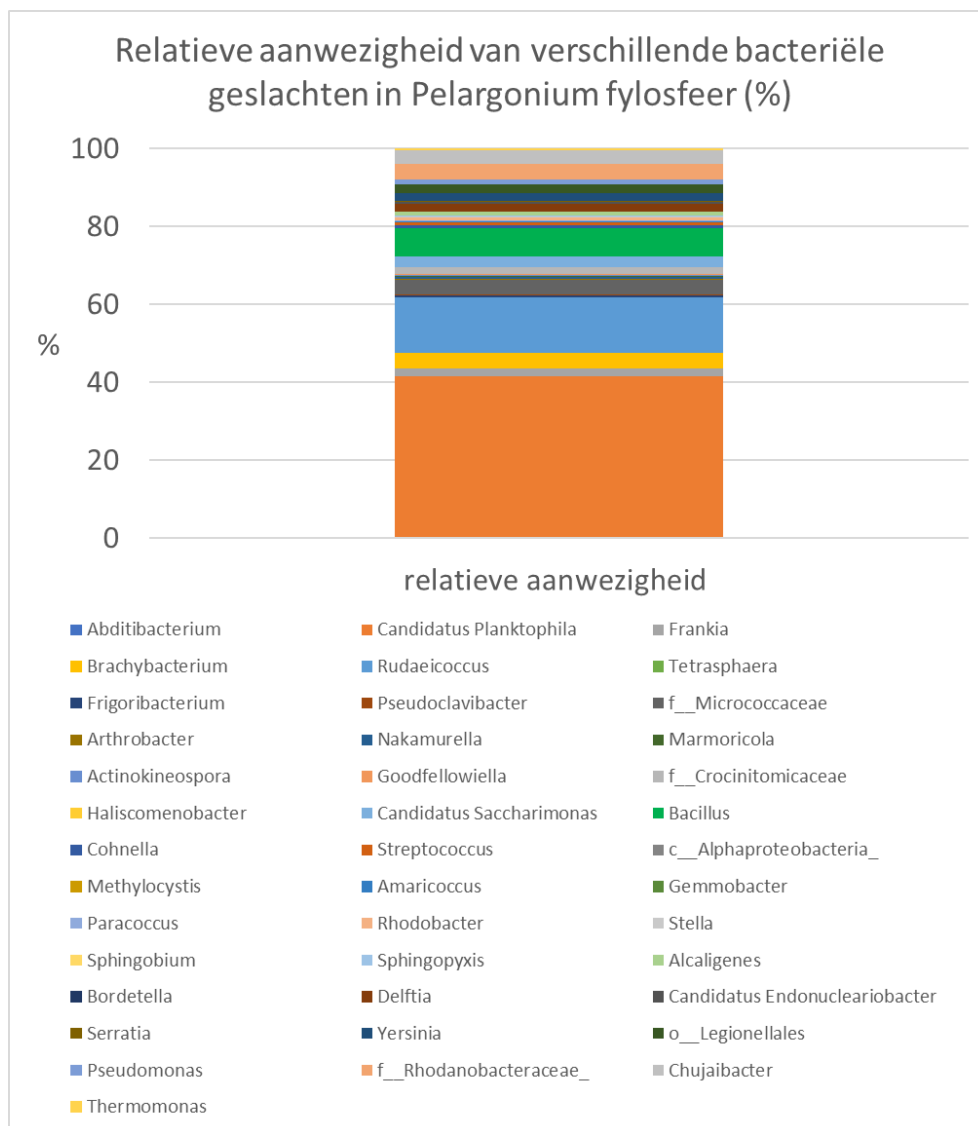


Figuur 3.30 Percentage *Pelargonium* planten met verschillende ziekte score in kasproef 2021 (teeltweek 13, negen weken na besmetting met *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*).

	Standaardvoeding	CRF
Positieve controle		
<i>Bacillus</i> IT45		
<i>Bacillus</i> ST1		
<i>Pseudomonas</i> G31 uit <i>Pelargonium</i>		
Savinase		

Figuur 3.31 Voorbeelden van ziektesymptomen in *Pelargonium* in verschillende behandelingen tijdens de kasproef 2021.

Ondanks succesvolle isolatie van DNA uit de fylosfeer van Pelargonium (uit monsters genomen tijdens proef in 2021) is de metabarcoding analyse niet volledig gelukt. Sequencing en analyse is gelukt voor Pelargonium fylosfeer monsters uit de behandeling met *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 (met CRF voeding). Daarom zijn deze resultaten alleen een indicatie, maar geven wel informatie over bacteriële geslachten die waarschijnlijk dominant zijn in de Pelargonium fylosfeer (Figuur 3.32). Meer dan 40% van alle gevonden sequenties behoren tot geslacht *Candidatus Planktophilia*, die vaak geïsoleerd wordt uit zoetwater. Pelargonium planten kregen water via bovenleiding. Het is daarom niet onwaarschijnlijk dat deze groep bacteriën afkomstig is uit het voedingswater. Relatieve aanwezigheid van *Pseudomonas* in onderzochte monsters was 1.2%. *Bacillus* duidelijk aanwezig in fylosfeer microbioom (met 7.3% relatieve aanwezigheid). In verband met mislukte sequencing van fylosfeer van controle planten (zonder behandeling met *Bacillus amyloliquefaciens* IT45) is het onmogelijk om te concluderen dat hoge relatieve aanwezigheid van *Bacillus* het resultaat is van de behandeling met *Bacillus amyloliquefaciens* IT45. Meer dan 67% van alle sequenties behoren tot fyllum *Actinobacteria*, wat een aanwijzing is dat fylosfeer wordt gekoloniseerd door bacteriën die overlevingsstructuren kunnen maken, die ze beschermen tegen UV straling en mogelijke uitdroging.

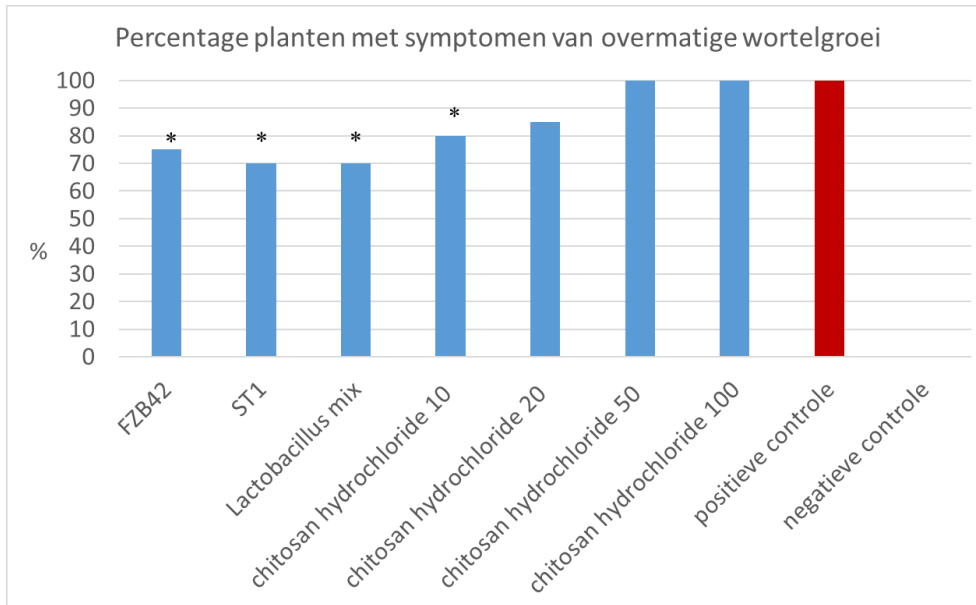


Figuur 3.32 Relatieve aanwezigheid van verschillende bacteriële geslachten in fylosfeer van Pelargonium die behandeld is met *Bacillus amyloliquefaciens* IT45.

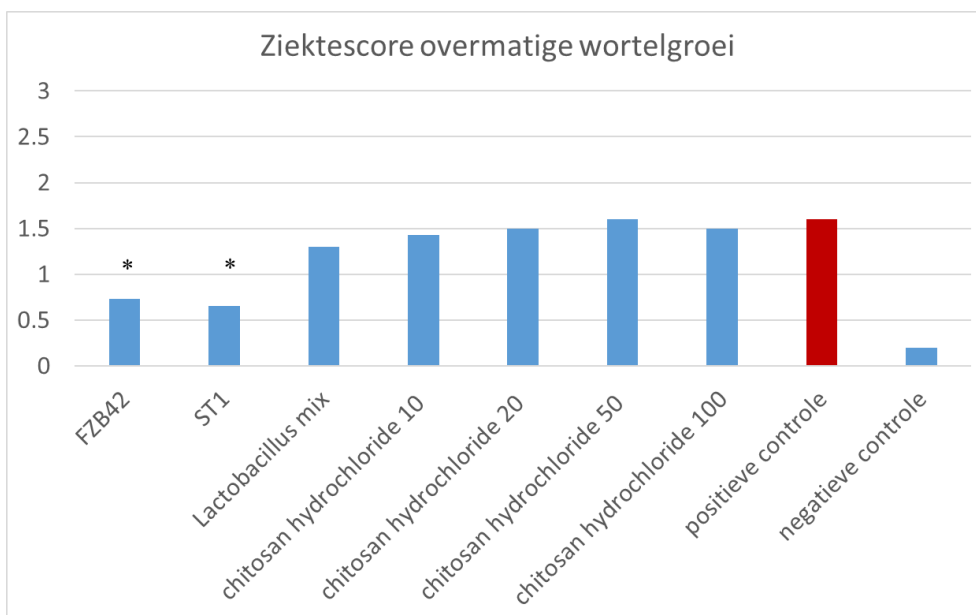
3.6.3 Tomaat

3.6.3.1 Kasproef met preventieve behandelingen tegen overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten-2019

Preventieve behandelingen met *Bacillus velezensis* FZB42, *Bacillus thuringensis* ST1, *Lactobacillus* mix en chitosan hydrochloride (10 mg/L) resulteerden in lagere incidentie van overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten (6 weken na infectie met *Agrobacterium rhizogenes*) (Figuur 3.33). Echter, alleen de behandelingen met *Bacillus velezensis* FZB42 en *Bacillus thuringensis* ST1 hadden een significant effect op de gemiddelde ziekte score van overmatige wortelgroei (ziekte score: 0- geen wortels bovenkant steenwolblok; 3- bovenkant steenwolblok volledig bedekt met wortels) (Figuur 3.34).



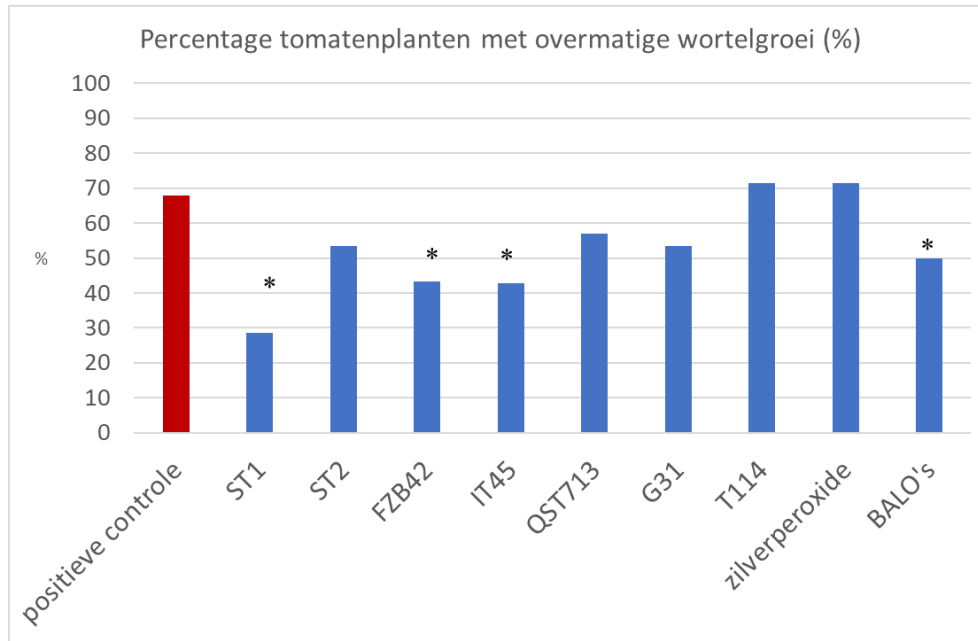
Figuur 3.33 Percentage van jonge tomatenplanten met symptomen van overmatige wortelgroei (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Agrobacterium rhizogenes*) in verschillende behandelingen in de kasproef. Behandelingen die significant verschillend zijn van positieve controle zijn aangeduid met * symbol.



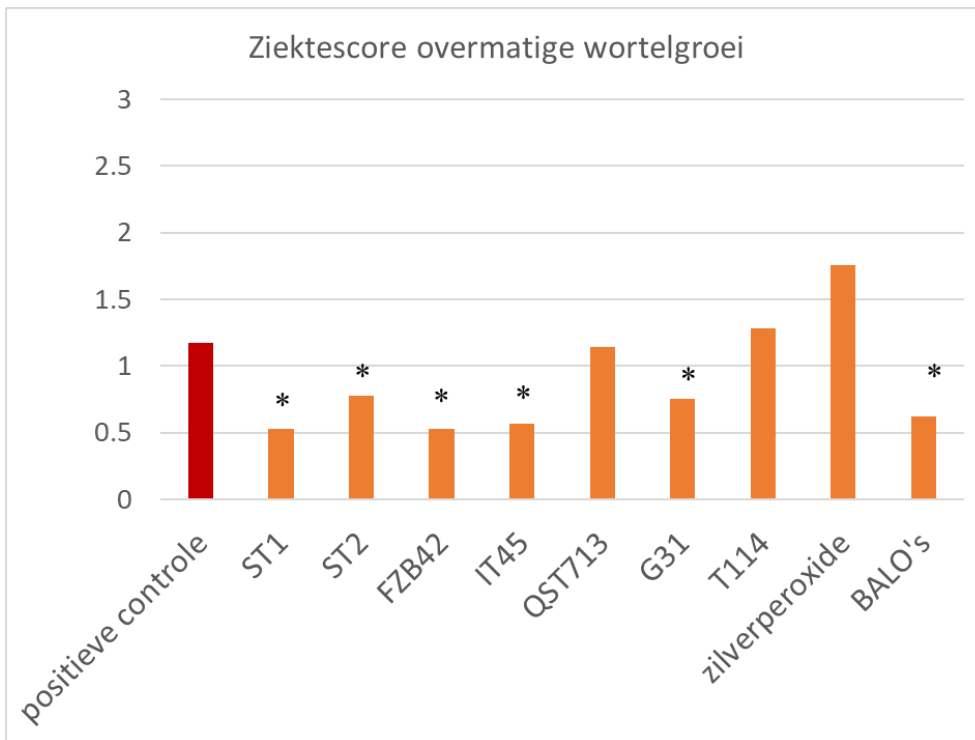
Figuur 3.34 Gemiddelde ziekte score van overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Agrobacterium rhizogenes*) in verschillende behandelingen in de kasproef (0- geen symptomen van overmatige wortelgroei; 3- bovenkant van steenwolblok volledig bedekt met wortels). Behandelingen die significant verschillend zijn van positieve controle zijn aangeduid met * symbol.

3.6.3.2 Kasproef (2021) met preventieve behandelingen tegen overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten

Preventieve behandelingen met *Bacillus velezensis* FZB42, *Bacillus thuringiensis* ST1, *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 en BALO's resulteerden in significant lagere incidentie van overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten (6 weken na infectie met *Agrobacterium rhizogenes*) (Figuur 3.35). Behandelingen met *Bacillus velezensis* FZB42, *Bacillus thuringiensis* ST1, *Alcaligenes* ST2, *Bacillus amyloliquefaciens* IT45, *Pseudomonas* G31 (isolaat uit *Pelargonium*) hadden een significant effect op de gemiddelde ziekte score van overmatige wortelgroei (ziekte score: 0- geen wortels bovenkant steenwolblok; 3- bovenkant steenwolblok volledig bedekt met wortels)(Figuur 3.36). Voorbeelden van symptomen zijn weergegeven in Figuur 3.37.



Figuur 3.35 Percentage van jonge tomatenplanten met symptomen van overmatige wortelgroei (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Agrobacterium rhizogenes*) in verschillende behandelingen in de kasproef. Behandelingen die significant verschillend zijn van positieve controle zijn aangeduid met * symbool.

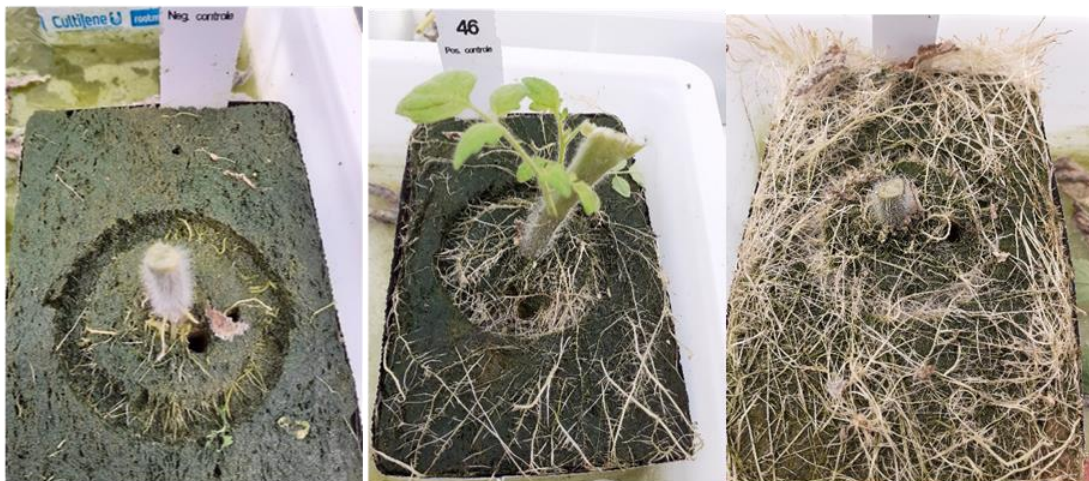


Figuur 3.36 Gemiddelde ziekte score van overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Agrobacterium rhizogenes*) in verschillende behandelingen in de kasproef (0- geen symptomen van overmatige wortelgroei; 3- bovenkant van steenwolblok volledig bedekt met wortels). Behandelingen die significant verschillend zijn van positieve controle zijn aangeduid met * symbool.

Negatieve controle

Positieve controle

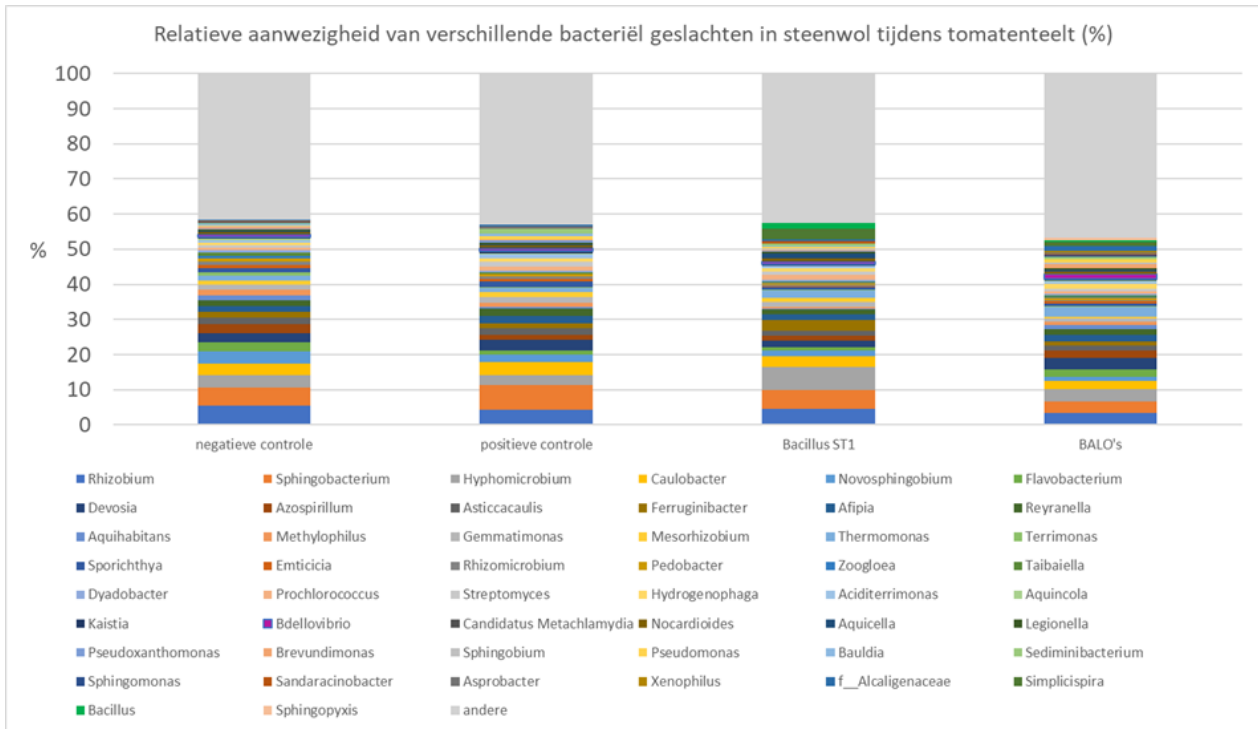
Zilver peroxide (50 ppm H₂O₂)



Figuur 3.37 Voorbeelden van overmatige wortelgroei symptomen in jonge tomatenplanten na 8 weken teelt (6 weken na inoculatie met *Agrobacterium rhizogenes*).

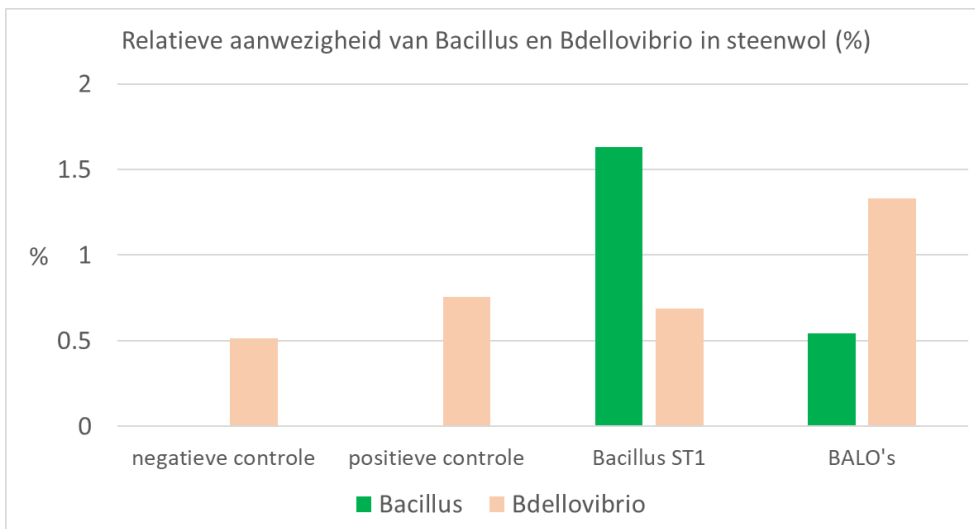
Samenstelling van het bacteriële microbiom in steenwol groeimedium was, na acht weken teelt, onderzocht in de monsters van de negatieve controle, de positieve controle (onbehandeld, geïnfecteerd met *Agrobacterium rhizogenes*), de behandeling met *Bacillus thuringiensis* ST1 (behandeld met *Bacillus thuringiensis* ST1, geïnfecteerd met *Agrobacterium rhizogenes*) en de behandeling met BALO's (behandeld met BALO's, geïnfecteerd met *Agrobacterium rhizogenes*) (Figuur 3.38).

Het bacteriële microbiom in de monsters van onbehandeld steenwol was significant anders dan in steenwol met een behandeling van *Bacillus thuringiensis* of BALO's (Figuur 3.38).



Figuur 3.38 Relatieve aanwezigheid van verschillende bacteriële geslachten in steenwol groeimedium (na 8 weken teelt) in de negatieve controle, de positieve controle (infectie, onbehandeld, geïnfecteerd met *Agrobacterium rhizogenes*), de behandeling met *Bacillus thuringensis* ST1 (behandeld met *Bacillus thuringensis* ST1, geïnfecteerd met *Agrobacterium rhizogenes*) en de behandeling met *Bdellovibrio* and like organisms BALO's (behandeld met BALO's, geïnfecteerd met *Agrobacterium rhizogenes*). Alleen geslachten/families met meer dan 0.5% relatieve aanwezigheid zijn weergegeven in dit figuur.

Uit metabarcoding analyse blijkt dat *Bacillus* aanwezig was in steenwol met behandeling met *Bacillus thuringensis* ST1 en behandeling met BALO's, maar niet aanwezig in de controle behandeling (Figuur 3.41). *Bdellovibrio* was aanwezig in alle steenwol monsters, maar in de behandeling met BALO's was de relatieve aanwezigheid van *Bdellovibrio* bijna drie keer zo hoog als in onbehandelde en niet geïnfecteerde steenwolmatten (1.3% ten opzichte van 0.51%) (Figuur 3.39).



Figuur 3.39 Relatieve aanwezigheid van bacteriële geslachten *Bacillus* en *Bdellovibrio* in steenwol groeimedium (na 8 weken teelt) in de negatieve controle, de positieve controle (infectie, onbehandeld, geïnfecteerd met *Agrobacterium rhizogenes*), de behandeling met *Bacillus thuringensis* ST1 (behandeld met *Bacillus thuringensis* ST1, geïnfecteerd met *Agrobacterium rhizogenes*) en de behandeling met *Bdellovibrio* and like organisms BALO's (behandeld met BALO's, geïnfecteerd met *Agrobacterium rhizogenes*).

4 Discussie en conclusie

4.1 Voorkomen van biofilmvorming door plantpathogene bacteriën (*in vitro* toets)

Het vormen van een biofilm, op het plantoppervlak of in de vaatbundels van de plant, is voor de meeste bacteriële plantpathogenen noodzakelijk voor het initiëren van de infectie (Mina et al., 2019). Bijvoorbeeld *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* infecteert de plant via natuurlijke openingen in het blad, zoals waterporiën (hydatoden) om vervolgens een biofilm te vormen in de vaatbundels (Barel et al., 2015). Ook rhizogene bacteriën, zoals *Agrobacterium rhizogenes* kunnen snel een biofilm vormen, zowel op het worteloppervlak als in de leidingen (Bosmans et al., 2016; Bourigault et al., 2021).

Biofilm is vooral belangrijk in het eerste stadia van het infectieproces, omdat veel virulentiefactoren in bacteriële plantpathogenen, zoals productie van enzymen die plantcelwanden kunnen afbreken, gestuurd worden via quorum sensing, die sterker is in biofilm waarin bacteriën dicht bij elkaar zitten (Barel et al., 2015).

Biofilmvorming kan voorkomen worden door het verstoren van de communicatie tussen plantpathogene bacteriën (quorum quenching via afbraak van signaalstoffen als AHL's en DSF) of door afbraak van de biofilm matrix (bestaand uit polymere, organische verbindingen) (Nahar et al., 2018).

Bourigault et al. (2019) hebben aangetoond dat biofilmvorming door *Agrobacterium rhizogenes* was geremd *in vitro* door het *qsda* lactonase enzym van *Rhodococcus erythropolis*. Lactonase enzym breekt de signaalstoffen (AHL's) van plantpathogene bacterie af.

Extracellulaire enzymen, zoals proteases, die geproduceerd worden door verschillende micro-organismen, spelen een belangrijke rol in de afbraak van de biofilm matrix (Jha et al., 2023). Savinase enzym wordt bijvoorbeeld al gebruikt in een aantal industriële toepassingen tegen biofilm (o.a. in detergentia).

Uit resultaten van dit project blijkt dat een aantal proteases (P6, P30, P89 en savinase) biofilmvorming door *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* effectief remmen in *in vitro* experimenten. Tegelijkertijd is er geen negatief effect van savinase en Protex 6L, na gewasbespuiting of aangieten in de pot, op Pelargonium en Phalaenopsis in de kasproeven waargenomen. Savinase bespuiting in combinatie met gecontroleerd vrijkomende meststoffen was effectief in het remmen van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* infectie in Pelargonium.

Helaas waren de geteste enzymen niet effectief tegen de biofilm van *Agrobacterium rhizogenes* en *Acidovorax cattleyae* *in vitro* biotoets. Ook is er geen effect op infectie van *Acidovorax cattleyae* in Phalaenopsis waargenomen tijdens de kasproef.

4.2 Biologische controle van bacteriële ziekten in tomaat, Pelargonium en Phalaenopsis

Binnen dit project zijn meerdere bacteriën geïsoleerd uit plantmateriaal van tomaat, Phalaenopsis en Pelargonium die de groei van plantpathogene bacteriën *in vitro* effectief remden, bijvoorbeeld *Alcaligenes* ST2 *Pseudomonas* T114 (uit tomaat), *Pseudomonas* G31 (uit Pelargonium) en *Paenibacillus* P207 en *Bacillus* P209 (uit Phalaenopsis).

De effectiviteit van een deel van deze isolaten tegen bacteriële ziekten is getest in kasproeven. Naast bovengenoemde bacteriële isolaten zijn ook de bacteriën uit commerciële producten getest, zoals *Bacillus amyloliquefaciens* QST713, *Bacillus velezensis* FZB42 en *Bacillus amyloliquefaciens* IT45.

Nuttige bacteriën, zoals *Bacillus thuringiensis* ST1, *Alcaligenes* ST2 en *Bacillus velezensis* FZB42 kunnen ontwikkeling van overmatige wortelgroei effectief voorkomen in jonge tomatenplanten. Effectiviteit van biologische controle van overmatige wortelgroei is al eerder aangetoond in oudere tomatenplanten (Bosmans et al., 2017; Streminska et al., 2022).

In *Pelargonium* waren *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 en *Pseudomonas* G31 het meest effectief tegen een infectie van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*. De effectiviteit van commercieel beschikbaar *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 en *Bacillus velezensis* FZB42 was niet voldoende om infectie van *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* te remmen in de uitgevoerde kasproeven. Dat ondanks het feit dat voor beide isolaten bekend is dat ze effectief kunnen zijn tegen andere plantpathogene *Xanthomonas* soorten. *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 is bijvoorbeeld toegelaten in Nederland als gewasbeschermingsmiddel tegen *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (*Xcc*) in bloemkoolachtige en sluitkool. *Bacillus velezensis* FZB42 is ook effectief gebleken tegen o.a. *Xanthomonas campestris* pv *campestris* in kool (Macha et al., 2021) en *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (*Xoo*) in rijst (Wu et al., 2015).

Verwachte mechanismen van onderdrukking van plantpathogene bacteriën door de nuttige bacteriën zijn o.a.: a) verstoren van de communicatie tussen plantpathogene bacteriën (voorbeeld *Bacillus* ST1 en *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 die *aiiA* lactonase kunnen produceren); b) actieve antagonisme die groei van plantpathogene bacterie remt (bijvoorbeeld *Pseudomonas* G31, die antagonistisch is tegen *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii*) en c) verhogen van geïnduceerde resistentie van de plant zelf, o.a. aangetoond voor *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 (Gattoni et al., 2023) en *Bacillus velezensis* FZB42 (Xie et al., 2018).

Biologische controle van bacteriële ziekten kan effectief zijn maar de effectiviteit is afhankelijk van de gebruikte stam van de biologische controle bacterie (eng. Biological controle agent-BCA), omstandigheden in de teelt en compatibiliteit met het gewas waarin de biologische controle wordt toegepast.

4.3 *Bdellovibrio* and like organisms (BALO's) als biologische controle van bacteriële plantenziekten

Bdellovibrio and the like organisms (BALO's) zijn obligaat parasitaire bacteriën die selectief cellen van gramnegatieve bacteriën gebruiken als prooi, onder andere veel plantpathogene bacteriën zoals *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pectobacterium* (Olanya en Lakshman, 2015; Bratanis et al., 2020, Youdkes et al., 2020). BALO's zijn aanwezig in veel natuurlijke milieus, maar zijn ook gevonden in bijvoorbeeld waterzuiveringsinstallaties en drinkwater systemen (Kandel et al., 2014; Williams en Chen, 2020), maar ook in bodem en rhizosfeer (Jurkevitch et al., 2020). Isolatie van deze bacteriën is bewerkelijk en pas toen de DNA technieken routinematig werden gebruikt is er meer informatie beschikbaar gekomen over verspreiding van deze bacteriën in verschillende milieus (Davidov et al., 2006; Rotem et al., 2014).

Onderzoek heeft aangetoond dat BALO's zeer selectief zijn wat betreft prooi-soort. Bijvoorbeeld *Bdellovibrio* isolaten, die *Rhizobium* en *Agrobacterium* cellen parasiteren, waren niet in staat om *Pseudomonas* cellen te liseren in *in vitro* experimenten (Jurkevitch et al., 2000). Selectieve parasitering is ook aangetoond in complexe bacteriële gemeenschappen van waterzuiveringsinstallaties (Cohen et al., 2021).

Bdellovibrio en *Bacteriovorax* waren aanwezig in tomaat rhizosfeer en in steenwol tijdens een kasteelt.

Bdellovibrio en *Bacteriovorax* parasitaire bacteriën, die cellen van *Rhizobium rhizogenes* parasiteren, zijn succesvol geïsoleerd binnen dit project. Na behandeling van de jonge tomaten zaailingen met *Bdellovibrio* mix was de ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen significant vertraagd.

Resultaten van deze eerste proef zijn veelbelovend, maar er zijn natuurlijk nog veel stappen nodig voordat BALO's in de teelt onder glas gebruikt zouden kunnen worden. Er is meer informatie nodig over de robuustheid van de resultaten, de mogelijkheden voor opkweek van BALO's voor grootschalige toepassing en over veiligheid van de BALO's voor mens, dier en het milieu.

Het is mogelijk dat BALO's ook aanwezig zijn in andere teeltsystemen onder glas welke last hebben van bacteriële ziekten. Ondanks het feit dat het niet gelukt is om ze te isoleren uit *Pelargonium* en *Phalaenopsis* binnen dit project. Naar verwachting zullen er ook BALO's bestaan die *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* en *Acidovorax cattleyae* kunnen parasiteren. Er zijn bijvoorbeeld BALO's geïsoleerd die *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* kunnen parasiteren, een belangrijke pathogeen van rijst (Uematsu, 1980).

4.4 Invloed van de meststoffen op de ontwikkeling van bacteriële plantenziektes tijdens de teelt

Dat meststoffen, en specifiek sommige macro- of micronutriënten, belangrijk zijn voor de groei en gezondheid van de plant is al langer bekend (Dordas, 2008, Tripathi et al., 2022).

Er zijn relatief veel publicaties beschikbaar over de invloed van organische meststoffen (zonder en in combinatie met bacteriële inoculanten) op de ontwikkeling van bacteriële ziekten in verschillende gewassen, zoals bijvoorbeeld *Ralstonia solanacearum* in tomaat (Liu et al., 2015; Deng et al., 2022).

Er is echter relatief minder informatie beschikbaar over hoe de vorm en dosering van minerale meststoffen de ontwikkeling van bacteriële ziekten beïnvloedt. Uit een aantal publicaties komt naar voren dat bemesting met overmatige dosering van minerale meststoffen, vooral stikstof, juist een negatief effect kan hebben op de plantgevoeligheid voor bacteriële ziekten, zoals bijvoorbeeld in het geval van *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* in rijst (Reddy et al., 1979). Ook de vorm van minerale stikstof, ammonium of nitraat, kan daarop een belangrijk effect hebben, zoals aangetoond in het geval van infecties van *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in tomaat (González-Hernández et al., 2013).

Twee van de drie door ons onderzochte bacteriële ziekteverwekkers, *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* en *Acidovorax cattleyae*, infecteren de planten via blad. Bladoppervlak is onderdeel van fylosfeer van de plant (Koskella, 2020; Sivakumar et al., 2020). Micro-organismen, die fylosfeer koloniseren, hebben verschillende functies, o.a. bescherming van de plant tegen pathogenen (Stone et al., 2018; Eshau-Taumaunu et al., 2022; Bhandari et al., 2023). Fylosfeer micro-organismen gebruiken verschillende mechanismen om plant te beschermen tegen pathogenen, zoals o.a. productie van sideroforen, die beschikbaarheid van ijzer voor de plantpathogenen beperken, antagonisme via productie van antimicrobiële stoffen, concurrentie om voedsel (Legein et al., 2020). Over het microbioom van de fylosfeer is relatief minder bekend dan over de rhizosfeer (wortel) microbioom. Het wordt wel steeds duidelijker dat samenstelling van fylosfeer microbioom afhankelijk is van o.a. de plantsoort en omstandigheden tijdens de teelt (Ortega et al., 2016). Er is relatief weinig onderzoek gedaan naar fylosfeer van sierteelt gewassen, maar de informatie uit onderzoek van o.a. Ortega et al. (2017) en da Silva et al. (2017) is duidelijk dat fylosfeer microbioom van sierteelt gewassen gedomineerd wordt door *Firmicutes* en *Actinobacteria*.

Er is steeds meer bewijs dat type en dosering van bemesting effect kan hebben op het microbioom van de fylosfeer, zoals aangetoond in spinazie en rucola, maar ook o.a. in tomaat, rijst en paprika (Darlison et al., 2019; Thapa et al., 2017; Bhandari et al., 2023). Berg en Koskella (2018) hebben aangetoond dat overbemesting de tomatenplanten gevoeliger kan maken voor *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. Effectiviteit van een bespuitingsbehandeling met antagonistische micro-organismen tegen *Pseudomonas syringae* pv *tomato* werd ook beïnvloedt door de bemesting (minder gevoeligheid voor de ziekte in planten die minder bemesting kregen).

Ook in de proeven, uitgevoerd binnen dit project, is het verschil duidelijk in plantontwikkeling tussen de planten (*Pelargonium* en *Phalaenopsis*) die standaard minerale bemesting (1 à 2 keer per week met hoge concentratie van voedingselementen) kregen en planten die bemest waren met gecontroleerd vrijkomende meststoffen, die continu lagere hoeveelheden van de nutriënten afgeven in de rhizosfeer. Toepassing van gecontroleerd vrijkomende meststoffen (CRF) resulteerde o.a. in compactere planten (bij *Pelargonium*) en meer chlorofylgehalte in blad (bij *Phalaenopsis*).

Toepassing van gecontroleerd vrijkomende meststoffen lijkt ook de effectiviteit van toegepaste microbiële producten, zoals *Bacillus amyloliquefaciens* IT45 in *Pelargonium*, te verhogen. Onderliggende mechanisme kon helaas niet helemaal ontrafeld worden omdat het niet gelukt is om het fylosfeer microbioom te analyseren. Verwachting is echter, dat er in de fylosfeer van *Pelargonium* en *Phalaenopsis*, die CRF voeding kregen in plaats van standaard fertigatie, een andere microbioom zich ontwikkelt dan in fylosfeer van de planten met standaard voeding, die vestiging van bacteriële antagonisten bevordert en de ontwikkeling van plantpathogeen waarschijnlijk beter kan onderdrukken, zoals eerder aangetoond door o.a. Berg en Koskella (2018). Koskella (2020) veronderstelt dat bij de lagere niveaus van voeding in fylosfeer, zoals het geval als planten bovenlangs alleen water krijgen, micro-organismen concurreren extra voor het voedsel en mineralen. Micro-organismen kunnen dan bijvoorbeeld antimicrobiële stoffen gaan produceren om de ontwikkeling van de andere micro-organismen in fylosfeer tegen te gaan. Uiteindelijk kan het dus resulteren in inhibitie van plantpathogenen.

Toepassen van bespuitingen met bacteriële isolaten, die afkomstig zijn uit fylosfeer van behandelde plant, kan effectief zijn tegen pathogeen over meerdere teeltrondes, zoals aangetoond in het geval van infectie van *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in tomaat (Ehau-Taumaunu et al., 2022). In dit project was deze strategie succesvol tegen *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* in Pelargonium. *Pseudomonas* isolaat G31, afkomstig uit fylosfeer van *Pelargonium*, kon de ontwikkeling van infectie door *Xanthomonas hortorum* pv *pelargonii* effectief vertragen.

4.5 Conclusies

Beheersing en bestrijding van bacteriële ziekten in glastuinbouw gewassen blijft een uitdaging omdat er bijna geen pesticiden, behalve een paar biopesticiden, toegelaten zijn in de teelt onder glas.

Uit dit onderzoek blijkt dat het mogelijk is om ontwikkeling van symptomen van bacteriële plantenziekten, zoals overmatige wortelgroei (gekke wortels) in tomaat of *Xanthomonas* verwelkingsziekte in Pelargonium (deels) te beheersen met toepassing van microbiële antagonisten, bacteriële isolaten die communicatie tussen plant pathogene bacteriën verstoren of dankzij inzet van parasitaire bacteriën die plantpathogene bacteriën selectief kunnen afdoden.

Gebruik van gecontroleerd vrijkomende meststoffen in potgrondmengsels lijkt ook de effectiviteit van biologische controle van bacteriële ziekten te beïnvloeden.

Literatuur

- Arwiyanto, T. 2011.
Biological Control of Plant Diseases Caused by Bacteria. Paper presented at the International Seminar and the 21st National Congress of the Indonesian Phytopathological Society. December 3rd–5th, 2011. Solo, Indonesia.
- Barel, V., Chalupowicz, L., Barash, I., Sharabani, G., Reuven, M., Dror, O., Burdman, S., Manulis-Sasson, S. 2015.
Virulence and in planta movement of *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* are affected by the diffusible signal factor (DSF)-dependent quorum sensing system. *Mol Plant Pathol*. 2015 Sep;16(7):710-23. doi: 10.1111/mpp.12230. Epub 2015 Jan 29. PMID: 25530086; PMCID: PMC6638389.
- Berg, M., Koskella, B. 2018.
Nutrient- and Dose-Dependent Microbiome-Mediated Protection against a Plant Pathogen. *Curr Biol*. 2018 Aug 6;28(15):2487-2492.e3. doi: 10.1016/j.cub.2018.05.085. Epub 2018 Jul 26. PMID: 30057302.
- Bhandari, R., Sanz-Saez, A., Leisner, C.P., Potnis, N. 2023.
Xanthomonas infection and ozone stress distinctly influence the microbial community structure and interactions in the pepper phyllosphere. *ISME Commun*. 2023 Mar 27;3(1):24. doi: 10.1038/s43705-023-00232-w. PMID: 36973329; PMCID: PMC10043289.
- Bosmans, L., Van Calenberge, B., Paeleman, A., Moerkens, R., Wittemans, L., Van Kerckhove, S., De Mot, R., Lievens, B., Rediers, H. 2016.
Efficacy of hydrogen peroxide treatment for control of hairy root disease caused by rhizogenic agrobacteria, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 121, Issue 2, 1 August 2016, Pages 519–527, <https://doi.org/10.1111/jam.13187>
- Bosmans, L., De Bruijn, I., Gerards, S., Moerkens, R., Van Looveren, L., Wittemans, L., Van Calenberge, B., Paeleman, A., Van Kerckhove, S., De Mot, R., Rozenski, J., Rediers, H., Raaijmakers, J.M., Lievens, B. 2017.
Potential for Biocontrol of Hairy Root Disease by a *Paenibacillus* Clade. *Front Microbiol*. 2017 Mar 22; 8:447. doi: 10.3389/fmicb.2017.00447. PMID: 28382027; PMCID: PMC5360736.
- Bourigault, Y., Rodrigues, S., Crépin, A., Chane, A., Taupin, L., Bouteiller, M., Dupont, C., Merieau, A., Konto-Ghiorghi, Y., Boukerb, A.M., Turner, M., Hamon, C., Dufour, A., Barbey, C., Latour, X. 2021.
Biocontrol of Biofilm Formation: Jamming of Sessile-Associated Rhizobial Communication by Rhodococcal Quorum-Quenching. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 31;22(15):8241. doi: 10.3390/ijms22158241. PMID: 34361010; PMCID: PMC8347015.
- Bratanis, E., Andersson, T., Lood, R., Bukowska-Faniband, E. 2020.
Biotechnological Potential of *Bdellovibrio* and Like Organisms and Their Secreted Enzymes. *Front Microbiol*. 2020 Apr 15;11:662. doi: 10.3389/fmicb.2020.00662. PMID: 32351487; PMCID: PMC7174725.
- Churchill, M.E.A., Chen, L., 2011.
Structural Basis of Acyl-homoserine Lactone-Dependent Signaling. *Chemical Reviews* 111: 68-85
- Cirou, A., Diallo, S., Kurt, C., Latour, X., Faure, D. 2007.
Growth promotion of quorum-quenching bacteria in the rhizosphere of *Solanum tuberosum*. *Environ Microbiol* 9.:1511–1522.
- Cohen, Y., Pasternak, Z., Müller, S. et al. 2021.
Community and single cell analyses reveal complex predatory interactions between bacteria in high diversity systems. *Nat Commun* 12, 5481 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25824-9>
- Daranas, N., Roselló, G., Cabrefigam J., Donati, I., Francés, J., Badosa, E., Spinelli, F., Montesinos, E., Bonaterra, A. 2019.
Biological control of bacterial plant diseases with *Lactobacillus plantarum* strains selected for their broad-spectrum activity. *Ann Appl Biol*. 2019 Jan;174(1):92-105. doi: 10.1111/aab.12476. Epub 2018 Nov 26. PMID: 30686827; PMCID: PMC6334523.

- Darlison, J., Mogren, L., Rosberg, A.K., Grudén, M., Minet, A., Liné, C., Mieli, M., Bengtsson, T., Håkansson, Å., Uhlig, E., Becher, P.G., Karlsson, M., Alsanius, B.W. 2019. Leaf mineral content govern microbial community structure in the phyllosphere of spinach (*Spinacia oleracea*) and rocket (*Diplotaxis tenuifolia*). *Sci Total Environ.* 2019 Jul 20;675:501-512. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.254. Epub 2019 Apr 17. PMID: 31030156.
- da Silva, T. F., Vollu, R. E., Marques, J. M., Salles, J. F., & Seldin, L. 2017. The bacterial community associated with rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*) leaves responds to anthracnose symptoms. *Plant and Soil*, 414(1-2), 69-79. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3102-z>
- Davidov, Y., Friedjung, A., and Jurkevitch, E. 2006. Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture-independent methods reveals a hitherto undetected diversity of Bdellovibrio-and-like organisms. *Environ Microbiol* 8: 1667–1673.
- Deng, X., Zhang, N., Li, Y., Zhu, C., Qu, B., Liu, H., Li, R., Bai, Y., Shen, Q., Falcao Salles, J. 2022. Bio-organic soil amendment promotes the suppression of *Ralstonia solanacearum* by inducing changes in the functionality and composition of rhizosphere bacterial communities. *New Phytol.* 2022 Aug;235(4):1558-1574. doi: 10.1111/nph.18221. Epub 2022 Jun 8. PMID: 35569105.
- Dordas, C. 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 28, 33–46 (2008). <https://doi.org/10.1051/agro:2007051>
- Dwidar, M., Monnappa, A.K., Mitchell, R.J. 2012. The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Reports* 45: 71-78.
- Ehau-Taumaunu, H., Hockett, K. 2022. Passaging phyllosphere microbial communities develop suppression towards bacterial speck disease in tomato. *Phytobiomes J.* 2022:PBIOMES-05.1-11.
- Ferguson, M.A., Schmitt, J.L., Sindhurakar, A.R., Volle, C.B., Nuñez, M.E., Spain, E.M. 2008. Rapid isolation of host-independent *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Microbiol Methods.* 73:279-81
- Fetzner, S. 2015. Quorum quenching enzymes. *J Biotechnol.* 10:2-14. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.001.
- Fulthorpe, R.R., Roesch, L.F., Riva, A., Triplett, E.W. 2008. Distantly sampled soils carry few species in common. *ISME J* 9: 901–910.
- Gattoni, K.M., Park, S.W., Lawrence, K.S. 2023. Evaluation of the mechanism of action of *Bacillus* spp. to manage *Meloidogyne incognita* with split root assay, RT-qPCR and qPCR. *Front Plant Sci.* 2023 Jan 20;13:1079109. doi: 10.3389/fpls.2022.1079109. PMID: 36743572; PMCID: PMC9895862.
- González-Hernández, A.I., Fernández-Crespo, E., Scalschi, L., Hajirezaei, M.-R., von Wirén, N., García-Agustín, P., Camañes, G. 2019. Ammonium mediated changes in carbon and nitrogen metabolisms induce resistance against *Pseudomonas syringae* in tomato plants. *J. Plant Physiol.* 2019;239:28–37. doi: 10.1016/j.jplph.2019.05.009.
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., Faure, D. 2016. Quorum quenching: role in nature and applied developments, *FEMS Microbiology Reviews* 40: 86–116
- Hahm, M.-S., Sumayo, M., Hwang, Y.-J., Jeon, S.-A., Park, S.-J., Lee, J.Y., Ahn, J.-H., Kim, B.-S., Ryu, C.-M., Ghim, S.-Y. 2012. Biological control and plant growth promoting capacity of rhizobacteria on pepper under greenhouse and field conditions. *The Journal of Microbiology* 50, 380–385.
- Huang, C.-H., Vallad, G.E., Zhang, S., Wen, A., Balogh, B., Figueiredo, J.F.L., Behlau, F., Jones, J.B., Momol, M.T., Olson, S.M. 2012. Effect of application frequency and reduced rates of acibenzolar-S-methyl on the field efficacy of induced resistance against bacterial spot on tomato. *Plant Disease* 96, 221–227
- Imada, K., Sakai, S., Kajihara, H., Tanaka, S., Ito, S. 2016. Magnesium oxide nanoparticles induce systemic resistance in tomato against bacterial wilt disease. *Plant Pathol* 65:551–560
- Jafra, S., van der Wolf, J.M. 2004. Fast screening method for detection of acyl-HSL degrading soil isolates. *J Microbiol Methods.* 57: 415-20

- Jha, S, Anand, S. 2023.
Development and Control of Biofilms: Novel Strategies Using Natural Antimicrobials. Membranes (Basel). 2023 Jun 2;13(6):579. doi: 10.3390/membranes13060579. PMID: 37367783; PMCID: PMC10302042
- Jurkevitch, E., Minz, D., Ramati, B., Barel, G. 2000.
Prey range and characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 66: 2365-2371.
- Kadouri, D., O'Toole, G.A., 2005.
Susceptibility of biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus* attack. Applied and Environmental Microbiology 71: 4044-4051
- Kandel, P.P., Pasternak, Z., van Rijn, J., Nahum, O., Jurkevitch, E. 2014.
Abundance, diversity and seasonal dynamics of predatory bacteria in aquaculture zero discharge systems. FEMS Microbiol Ecol. 2014 Jul;89(1):149-61. doi: 10.1111/1574-6941.12342. Epub 2014 May 12. PMID: 24749684.
- Kisand, V., Cuadros, R., Wikner, J. 2002.
Phylogeny of culturable estuarine bacteria catabolizing riverine organic matter in the northern Baltic Sea. Appl Environ Microbiol. 2002 Jan;68(1):379-88. doi: 10.1128/AEM.68.1.379-388.2002. PMID: 11772648; PMCID: PMC126561
- Koskella B. 2020.
The phyllosphere. Curr Biol. 2020 Oct 5;30(19):R1143-R1146. doi: 10.1016/j.cub.2020.07.037. PMID: 33022257.
- Leadbetter, J.R., Greenberg, E.P. 2000.
Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus*. J. Bacteriol. 182:m 6921-6926
- Legein, M., Smets, W., Vandenheuvel, D., Eilers, T., Muysshondt, B., Prinsen, E., Samson, R., Lebeer, S. 2020.
Modes of Action of Microbial Biocontrol in the Phyllosphere. Front Microbiol. 2020 Jul 14;11:1619. doi: 10.3389/fmicb.2020.01619. PMID: 32760378; PMCID: PMC7372246.
- Liu, L., Sun, C., Liu, S., Chai, R., Huang, W., Liu, X., et al. 2015.
Bioorganic Fertilizer Enhances Soil Suppressive Capacity against Bacterial Wilt of Tomato. PLoS ONE 10(4): e0121304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121304>
- Mácha, H., Marešová, H., Juříková, T., Švecová, M., Benada, O., Škríba, A., Baránek, M., Novotný, Č., Palyzová, A. 2021.
Killing Effect of *Bacillus Velezensis* FZB42 on a *Xanthomonas Campestris* pv. *Campestris* (Xcc) Strain Newly Isolated from Cabbage *Brassica Oleracea* Convar. *Capitata* (L.): A Metabolomic Study. Microorganisms. 2021 Jun 29;9(7):1410. doi: 10.3390/microorganisms9071410. PMID: 34210064; PMCID: PMC8303752.
- Marin VR, Ferrarezi JH, Vieira G, Sass DC. 2019.
Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. World J Microbiol Biotechnol. 2019 Apr 22;35(5):72. doi: 10.1007/s11274-019-2646-5. PMID: 31011844.
- Mina, I.R., Jara, N.P., Criollo, J.E. and Castillo, J.A. 2019.
The critical role of biofilms in bacterial vascular plant pathogenesis. Plant Pathol, 68: 1439-1447. <https://doi.org/10.1111/ppa.13073>
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L, Reimmann, C., Duffy, B., Défago, G. 2003.
Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. FEMS Microbiol Ecol. 45:71-81
- Monnappa, A.K., Dwidar, M., Seo, J.K., Hur, J.H., Mitchell, R.J. 2014.
Bdellovibrio bacteriovorus inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and invasion into human epithelial cells. Scientific Reports 4: 3811.
- Nahar, S., Mizan, M.F.R., Ham A.J., Ha, S.D. 2018.
Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2018 Nov;17(6):1484-1502. doi: 10.1111/1541-4337.12382. Epub 2018 Sep 4. PMID: 33350139.
- Olanya, O.M., Lakshman, D.K. 2015.
Potential of predatory bacteria as biocontrol agents for foodborne and plant pathogens. Journal of Plant Pathology. 97:405-417.

- Ortega, R.A., Mahnert, A., Berg, C., Müller, H., Berg G. 2016.
The plant is crucial: specific composition and function of the phyllosphere microbiome of indoor ornamentals. *FEMS Microbiol Ecol.* 2016 Dec;92(12):fiw173. doi: 10.1093/femsec/fiw173. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27624084.
- Park, H.B., Lee, B., Kloepper, J.W., Ryu, C-M. 2013.
One shot-two pathogens blocked: Exposure of Arabidopsis to hexadecane, a long chain volatile organic compound, confers induced resistance against both *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Signal Behav* 2013; 8:e24619;
- Reddy, A. P. K., Katyal, J. C., Rouse, D. I., MacKenzie, D. R. 1979.
Relationship between nitrogen fertilization, bacterial leaf blight severity, and yield of rice. *Phytopathology* 69: 970-973.
- Rotem, O., Pasternak, Z., Jurkevitch, E. 2014.
Bdellovibrio and Like Organisms. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9_379
- Rutherford, S.T., Bassler, B.L. (2012)
Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Nov; 2(11): a012427. doi: 10.1101/cshperspect.a012427
- Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., De La Torre-Roche, R., Hamdi, H., White, J.C., Bindraban, P.S., Dimkpa, C.O. 2015.
A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *J Nanopart Res* 17:92
- Simmons, T., Caddell, D.F., Deng, S., Coleman-Derr, D. 2018.
Exploring the Root Microbiome: Extracting Bacterial Community Data from the Soil, Rhizosphere, and Root Endosphere. *J Vis Exp.* 2018 May 2;(135):57561. doi: 10.3791/57561. PMID: 29782021; PMCID: PMC6101100.
- Sivakumar, N., Sathishkumar, R., Selvakumar, G., Shyamkumar, R., Arjunekumar, K. 2020.
Phyllospheric Microbiomes: Diversity, Ecological Significance, and Biotechnological Applications. In: Yadav, A., Singh, J., Rastegari, A., Yadav, N. (eds) *Plant Microbiomes for Sustainable Agriculture. Sustainable Development and Biodiversity*, vol 25. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38453-1_5
- Smith, E.M., Green, L.E., Mason, D. 2003.
Savinase is a bactericidal enzyme. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jan;69(1):719-20; 720-1. doi: 10.1128/AEM.69.1.719-721.2003. PMID: 12514070; PMCID: PMC152419.
- Stone, B.W.G., Weingarten, E.A. and Jackson, C.R. 2018.
The Role of the Phyllosphere Microbiome in Plant Health and Function. In *Annual Plant Reviews online*, J.A. Roberts (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0614>
- Streminska, M.A., Stijger, I. 2016.
Search for microorganisms which can disrupt communication between plant pathogenic bacteria causing hairy roots disease in greenhouse vegetables. *IOBC/WPRS Bulletin* 117: 276-280
- Streminska, M.A., Stijger, I. Greve, G., Ariyati Ayik. 2022.
Nieuwe aanpak voor bestrijden van bacteriële plantenziekten veroorzakers in diverse gewassen. Rapport WPR-1163 / Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw
- Thapa, S., Prasanna, R., Ranjan, K., Velmourougane, K., Ramakrishnan B. 2017.
Nutrients and host attributes modulate the abundance and functional traits of phyllosphere microbiome in rice. *Microbiol Res.* 2017 Nov;204:55-64. doi: 10.1016/j.micres.2017.07.007. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28870292.
- Tripathi, R., Tewari, R., Singh, K.P., Keswani, C., Minkina, T., Srivastava, A.K., De Corato, U., Sansinenea, E. 2022.
Plant mineral nutrition and disease resistance: A significant linkage for sustainable crop protection. *Front Plant Sci.* 2022 Oct 20;13:883970. doi: 10.3389/fpls.2022.883970. PMID: 36340341; PMCID: PMC9631425.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P., Palmer, J.D. 1999.
Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol.* 1999 Jul-Aug;46(4):327-38. doi: 10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x. PMID: 10461381.

Uematsu, T. 1980.

Ecology of *Bdellovibrio* parasitic to rice bacterial leaf blight pathogen, *Xanthomonas oryzae*. *Rev. Plant Prot. Res.* 13: 12-26.

Williams, H.N., Chen H. 2020.

Environmental Regulation of the Distribution and Ecology of *Bdellovibrio* and Like Organisms. *Front Microbiol.* 2020 Oct 29;11:545070. doi: 10.3389/fmicb.2020.545070. PMID: 33193128; PMCID: PMC7658600.

Wu, L., Wu, H., Chen, L. et al. 2015.

Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Sci Rep* 5, 12975 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep12975>

Xie, S., Jiang, H., Ding, T., Xu, Q., Chai, W., Cheng, B. 2018.

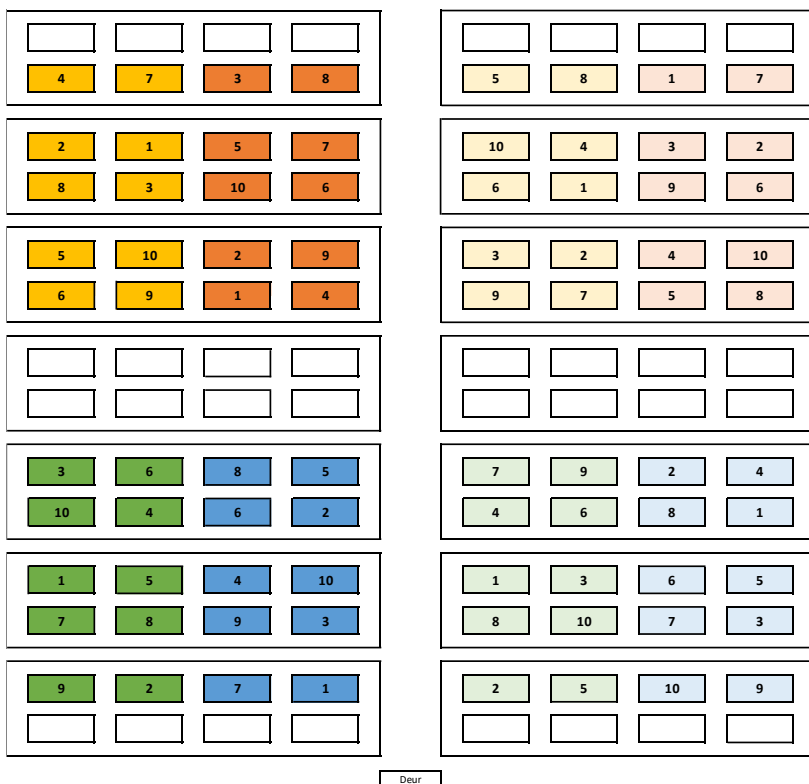
Bacillus amyloliquefaciens FZB42 represses plant miR846 to induce systemic resistance via a jasmonic acid-dependent signalling pathway. *Mol Plant Pathol.* 2018 Jul;19(7):1612-1623. doi: 10.1111/mpp.12634. Epub 2018 Feb 27. PMID: 29090851; PMCID: PMC6638179.

Youdkes, D., Helman, Y., Burdman, S., Matan, O., Jurkevitch, E. 2020.

Potential Control of Potato Soft Rot Disease by the Obligate Predators *Bdellovibrio* and Like Organisms. *Appl Environ Microbiol.* 2020 Mar 2;86(6):e02543-19. doi: 10.1128/AEM.02543-19. PMID: 31953332; PMCID: PMC7054095.

Bijlage 1 Kasproef Phalaenopsis 2020

Kasplattegrond



Blok	Voeding
Blok 1	Normaal
Blok 2	Normaal
Blok 3	Normaal
Blok 4	Normaal
Blok 5	CRF
Blok 6	CRF
Blok 7	CRF
Blok 8	CRF

In elk blok 1 herhaling van behandeling (10 potten per herhaling)

Behandeling nr.	Behandeling	Accovox
1	negatieve controle	-
2	positieve controle	+
3	Bacillus thuringiensis ST1	+
4	Bacillus velezensis F2B42	+
5	Bacillus amyloliquefaciens IT45	+
6	Bacillus amyloliquefaciens GST713	+
7	P169 (Bacillus toyonensis)	+
8	P207 (Pseudomonas amylofilicus)	+
9	chitosan hydrochloride (0.75% bespuiting)	+
10	waterstof peroxide (20 ppm)	+

Groeimedium: combinatie bark 2-bark 1 en een vochthoudende component als kokos of Hurlmoss 0.25 kg PG-mix per m³ substraat.

Bemesting:

- helft van planten: standaardbemesting met 1,0-1,1 EC in elke watering. Schema hieronder.

Tabel B1.1 Voedingsschema.

EC	Ureum*	NH ₄	K	Ca	Mg	NO ₃	H ₂ PO ₄	SO ₄	Fe	Mn	Zn	B	Cu	Mo	N-tot*
1.1	4.0	1.2	4.1	1.2	0.5	6.4	1.2	0.5	52	7.5	1.5	11.5	1.5	0.6	15.6

*4.0 mmol ureum = 8 mmol N uit Ureum.

- helft van planten: gecontroleerd vrijkomende meststoffen (CRF) in de pot doseren net na oppotten en tijdens teelt alleen schoon water zonder bemesting. Osmocote Season gericht op voedingsbehoefte van Phalaenopsis. Dosering ca. 11,5 kg/ m³/watermaat (11 gr/ltr substraat).

Bijlage 2 Kasproef Phalaenopsis 2021

Kasplattegrond



Groeimedium: combinatie bark 2-bark 1 en een vochthoudende component als kokos of Hurlmoss 0.25 kg PG-mix per m3 substraat.

Bemesting:

- helft van planten: standaardbemesting met 1,0-1,1 EC in elke watering. Schema hieronder.

Tabel B2.1 Voedingsschema.

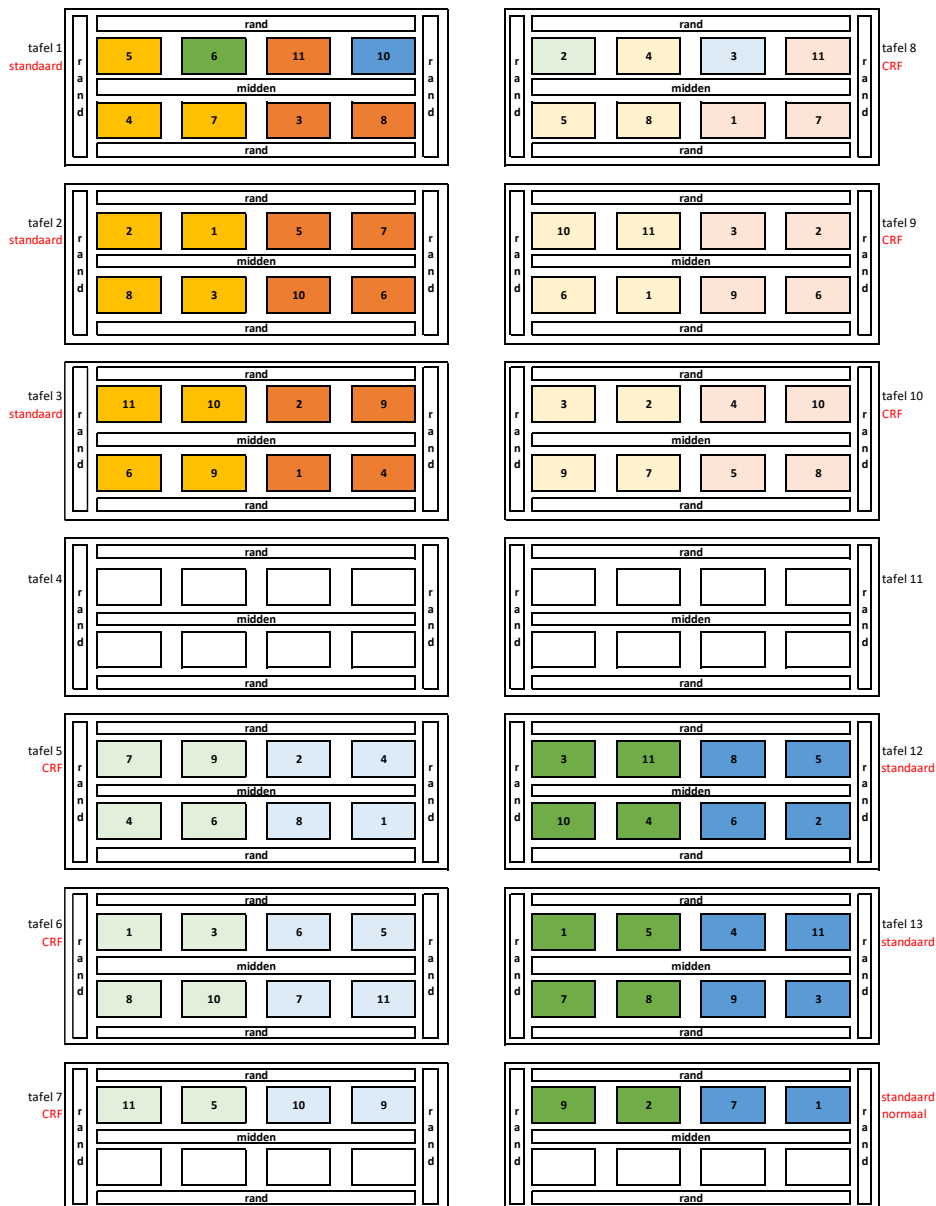
EC	Ureum*	NH ₄	K	Ca	Mg	NO ₃	H ₂ PO ₄	SO ₄	Fe	Mn	Zn	B	Cu	Mo	N-tot*
1.1	4.0	1.2	4.1	1.2	0.5	6.4	1.2	0.5	52	7.5	1.5	11.5	1.5	0.6	15.6

*4.0 mmol ureum = 8 mmol N uit Ureum.

- helft van planten: gecontroleerd vrijkomende meststoffen (CRF) in de pot doseren net na oppotten en tijdens teelt alleen schoon water zonder bemesting. Osmocote Season gericht op voedingsbehoefte van Phalaenopsis. Dosering ca. 11,5 kg/ m3/watermaat (11 gr/ltr substraat).

Bijlage 3 Kasproef Pelargonium 2020

Kasplattegrond



Deur

Behandeling nr.	Behandeling	Xanthomonas
1	Negatieve controle	-
2	Positieve controle	+
3	Alcaligenes ST2 (isolaat uit tomaat)	+
4	Bacillus velezensis FZB42	+
5	Bacillus amyloliquefaciens IT45	+
6	Bacillus amyloliquefaciens QST713	+
7	Isolaat G31 (isolaat uit Pelargonium)	+
8	Savinase	+
9	chitosan hydrochloride (0.75%)	+
10	zilverperoxide (20 ppm)	+
11	Protex 6L	+

- **Helft van planten normaal groeimedium met standaardbemesting:**

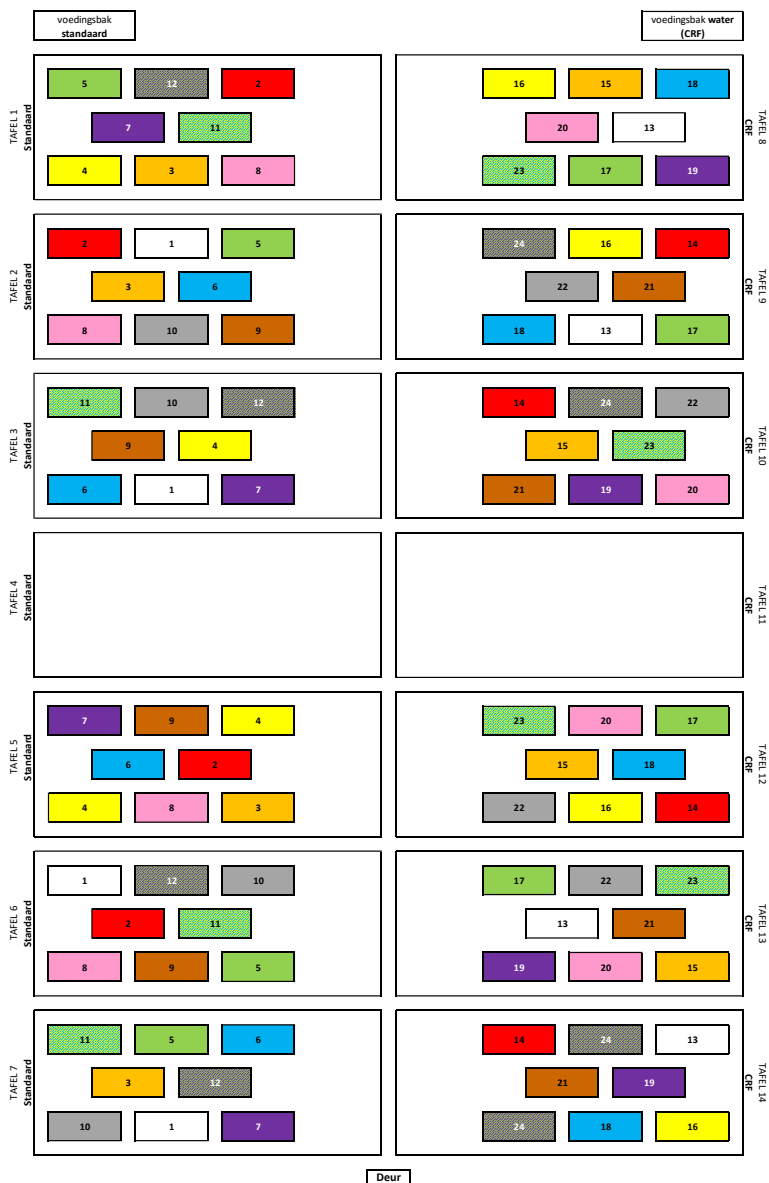
- Standaard substraatmengsel voor Pelargonium met standaard PG-mix met 15% grove perliet omdat nu de winter in gaat
- Bemesting met EC =2, pH = 5,5-6 en Pelargoniumschema uit bemestingsadviesbasis potplanten
- voor ca 900 potten 12 cm (635-640 ml inhoud)

- **Andere helft van planten zelfde groeimedium met minder PG-mix en CRF behandeling:**

- Zelfde standaard substraatmengsel voor Pelargonium met 15% grove perliet als hierboven, maar met minder PG mix: **max. 0,25 kg/m³ PG-mix en voor oppotten doormengen Osmocote mengsel** van (bij proefduur tot max. ca 12 weken):
 - 1 kg/m³ (watermaat) Osmocote CalMag 3-4maanden (1 gr/ltr potinhoud)
 - 3,5 kg/m³ (watermaat) Osmocote Exact 3-4maanden Hi K. (3,5 gr/ltr potinhoud)
 - beide zakken zijn al geleverd en liggen in Bleiswijk klaar in meststoffenhok (of bij deur naar de kas nog, Gerdit weet waar precies).
- watergeven met schoon water, zonder bemesting.

Bijlage 4 Kasproef Pelargonium 2021

Kasplattegrond



Nr.	Behandeling	Xanthomonas
1	Negatieve controle	-
2	Positieve controle	+
3	Bacillus FZB42	+
4	Bacillus IT45	+
5	Bacillus QST713	+
6	Bacillus ST1	+
7	G31	+
8	ST2	+
9	Savinase	+
10	Protex 6L	+
11	Zilverperoxide (20 ppm)	+
12	Waterstof peroxide (20 ppm)	+
13	Negatieve controle	-
14	Positieve controle	+
15	Bacillus FZB42	+
16	Bacillus IT45	+
17	Bacillus QST713	+
18	Bacillus ST1	+
19	G31	+
20	ST2	+
21	Savinase	+
22	Protex 6L	+
23	Zilverperoxide (20 ppm)	+
24	Waterstof peroxide (20 ppm)	+

- **Helpt van planten normaal groeimedium met standaardbemesting:**

- Standaard substraatmengsel voor Pelargonium met standaard PG-mix met 15% grove perliet omdat nu de winter in gaat
- Bemesting met EC =2, pH = 5,5-6 en Pelargoniumschema uit bemestingsadviesbasis potplanten
- voor ca 900 potten 12 cm (635-640 ml inhoud)

- **Andere helft van planten zelfde groeimedium met minder PG-mix en CRF behandeling:**

- Zelfde standaard substraatmengsel voor Pelargonium met 15% grove perliet als hierboven, maar met minder PG mix: **max. 0,25 kg/m³ PG-mix en voor oppotten doormengen Osmocote mengsel** van (bij proefduur tot max. ca 12 weken):
 - 1 kg/m³ (watermaat) Osmocote CalMag 3-4maanden (1 gr/ltr potinhoud)
 - 3,5 kg/m³ (watermaat) Osmocote Exact 3-4maanden Hi K. (3,5 gr/ltr potinhoud)
 - beide zakken zijn al geleverd en liggen in Bleiswijk klaar in meststoffenhok (of bij deur naar de kas nog, Gerdit weet waar precies).
- watergeven met schoon water, zonder bemesting.

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
www.wur.nl/glastuinbouw

Rapport WPR-1310

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 7.600 medewerkers (6.700 fte) en 13.100 studenten en ruim 150.000 Leven Lang Leren-deelnemers behoort Wageningen University & Research 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.