



# Plantversterking in Potplanten

Biostimulanten, middelen en plantreactie in Kalanchoe met Phytophthora, Begonia met Fusarium en Arabidopsis met Phytophthora en Botrytis

André van der Wurff<sup>1</sup>, Marta Streminska<sup>1</sup>, Marc van Slooten<sup>1</sup>, Filip van Noort<sup>1</sup>,  
Wessel Holtman<sup>2</sup> en Henrie Korthout<sup>2</sup>

Rapport GTB-1326

1 Wageningen UR Glastuinbouw, 2 Fytagoras BV



**WAGENINGEN UR**  
*For quality of life*

Productschap  Tuinbouw

## Referaat

Potplanten worden tijdens de teelt regelmatig blootgesteld aan stress factoren waarbij ze een verhoogd risico lopen op infecties door schimmels en bacteriën. In deze studie zijn plantversterkers onderzocht. Chitosan verhoogde de expressie van genen in de salicylzuur route in *Arabidopsis* en leidde tot een verminderde vatbaarheid voor *Phytophthora capsici*. Daarnaast bleek dat salicylzuur een effect had op de expressie van genen betrokken in de jasmonzuur route en de planten waren minder vatbaar voor *Botrytis cinerea*. Opvallend was dat Metalaxyl-M juist de expressie van de genen van zowel de salicylzuur-, als de jasmonzuurroute remt en de planten waren ook vatbaarder voor *P. capsici* en *B. cinerea*. Op praktijkniveau is gekeken naar het effect van zes plantversterkers in Kalanchoë met *P. nicotianae* en Begonia met *Fusarium foetens*. Tijdens het experiment werden twee stress factoren geïnduceerd, namelijk de overgang van korte-, naar lange dag en droogte stress. Silicium en salicylzuur gaven resp. 80% en 60% remming van de symptomen van *Phytophthora* in Kalanchoë. In Begonia gaf silicium juist een versnelling van uitval door *Fusarium*. Met NMR werd aangetoond dat, alleen in Kalanchoë, de plantinhoudstoffen sterk veranderde met chitosan en silicium. Analyse van een directe toxiciteit van plantversterkers op agarmedium liet een sterk effect zien van *Streptomyces* tegen *Phytophthora* en *Fusarium*, en salicylzuur tegen *Phytophthora*. Dit effect werd niet gevonden in de praktijktoets. Omdat silicium een sterk effect had op *Phytophthora* uitval in Kalanchoë en er een verandering zichtbaar werd in de plantinhoudstoffen, en silicium geen directe toxiciteit gaf, vind de werking dus waarschijnlijk plaats via de plant.

## Abstract

During the propagation and cultivation of pot plants, plant pathogenic bacteria and fungi can cause serious problems, including plant death. In this study, biostimulatory products were investigated. Influence of three biostimulants and the fungicide Metalaxyl-M on expression of twenty-four genes of *Arabidopsis thaliana* infected by *Botrytis cinerea* or *Phytophthora capsici* was analyzed. Addition of salicylic acid caused upregulation of genes important in jasmonic acid pathway, making the plant less susceptible to Botrytis infection. Chitosan upregulated an expression of genes that are involved in the salicylic acid route, making the plant less susceptible to Phytophthora infection. Interestingly, use of Metalaxyl-M resulted in a down regulation of plant defense genes. In addition, we tested the influence of six biostimulants on development of disease symptoms of *Fusarium foetens* in Begonia and *P. nicotianae* in Kalanchoe in greenhouse experiments. Significant suppression of *Phytophthora* symptoms in Kalanchoë was observed in salicylic acid and silicon treatments. Decrease in disease occurrence was 60% and 87% for salicylic acid and silicon treatments, respectively. In the Begonia trial, no suppression against *Fusarium foetens* was obtained with any of the biostimulants. NMR analyses of plant compounds showed that in Kalanchoe plant compounds differed when compared to the other treatments when treated with silicon or chitosan. A direct toxicity assay with aid of dual plate techniques showed an inhibition of *Phytophthora* as well as *Fusarium* with *Streptomyces*, while salicylic acid showed an inhibition of *Fusarium* only. Since silicon showed a clear effect on *Phytophthora* in Kalanchoe, an effect was visualized by NMR plant compound analyses and no direct toxicity towards the fungus was demonstrated, we may conclude that a plant response is the expected mode of action.

## Rapportgegevens

Rapport GTB-1326

Projectnummer: 3242165000

PT nummer: 14800

## Disclaimer

© 2014 Wageningen UR Glastuinbouw (instituut binnen de rechtspersoon Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek), Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk, Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk, T 0317 48 56 06, F 010 522 51 93, E glastuinbouw@wur.nl, www.wageningenUR.nl/glastuinbouw. Wageningen UR Glastuinbouw.

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

## Adresgegevens

### Wageningen UR Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 48 56 06

F +31 (0)10 522 51 93

# Inhoud

	<b>Samenvatting</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	<b>Problematiek en oplossingsrichtingen</b>	<b>7</b>
	1.1 Uitval door ziekten	7
	1.2 Stress bij veranderde omgeving	7
	1.3 Plantversterker als oplossing	7
	1.4 Weerbaar Telen	8
	1.5 Metingen aan plantversterking	8
	1.6 Keuze van substraat	9
	1.7 Definitie, doelstelling en afbakening	10
<b>2</b>	<b>Inleiding Plantversterking</b>	<b>13</b>
	2.1 Inleiding	13
	2.2 Biostimulanten bieden perspectief	13
	2.3 Wat zijn biostimulanten?	13
	2.4 Raamwerk	14
	2.5 NMR	14
	2.6 RNA merkers	15
	2.7 Duoplate techniek	15
<b>3</b>	<b>Genetica van plantversterking</b>	<b>17</b>
	3.1 Inleiding	17
	3.2 Materiaal en methode	17
	3.2.1 Planten	17
	3.2.2 Toediening van middelen	17
	3.2.3 Pathogeen inoculaties	17
	3.2.4 Gen expressie analyse	18
	3.3 Resultaten	18
	3.3.1 Visuele effecten op planten	18
	3.3.2 Effecten op de expressie van afweergenen	20
	3.3.3 Conclusie en discussie	22
<b>4</b>	<b>Kalanchoë</b>	<b>23</b>
	4.1 Materiaal en Methode	23
	4.2 Resultaten	23
	4.2.1 Plant parameters	23
	4.2.2 Effect op <i>Phytophthora</i>	24
	4.2.3 Effect op plant inhoud stoffen	25
	4.3 Conclusie en discussie	27
<b>5</b>	<b>Begonia</b>	<b>29</b>
	5.1 Materiaal en Methode	29
	5.2 Resultaten	30
	5.2.1 Plant parameters	30
	5.2.2 Effect op <i>Fusarium foetens</i>	31
	5.2.3 Effect op plant inhoud stoffen	31
	5.2.4 Conclusie en discussie	32

<b>6</b>	<b>Duoplate technieken en directe toxiciteit</b>	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>Conclusie en discussie</b>	<b>35</b>
	7.1 Acht plantversterkers	35
	7.2 Kasproefresultaten	35
	7.3 Model plant <i>Arabidopsis</i>	36
	7.4 Directe toxiciteit toets	36
	7.5 NMR	37
	7.6 Meer kennis nodig	37
	7.7 Samenvattend	37
<b>8</b>	<b>Dank</b>	<b>39</b>
<b>9</b>	<b>Referenties</b>	<b>41</b>
<b>10</b>	<b>Publicaties en presentaties</b>	<b>43</b>
<b>Bijlage 1</b>	<b>Overzicht van plant metingen aan Kalanchoe</b>	<b>45</b>
<b>Bijlage II</b>		<b>47</b>
<b>Bijlage III</b>	<b>Voedingsschema (vegetatief) Kalanchoe</b>	<b>49</b>
<b>Bijlage IV</b>	<b>Voedingsschema (generatief) Kalanchoe</b>	<b>51</b>
<b>Bijlage V</b>	<b>Voedingsschema Begonia</b>	<b>53</b>

# Samenvatting

Potplanten worden tijdens de teelt regelmatig blootgesteld aan stressfactoren waarbij ze een verhoogd risico lopen op infecties door schimmels en bacteriën. Om bacterie-, en schimmelinfecties te voorkomen wordt gebruik gemaakt van chemische gewasbeschermingsmiddelen. Echter, het beschikbaar middelenpakket zal in de komende jaren sterk worden gereduceerd waardoor naar alternatieve methodes gezocht moeten worden. Een van deze alternatieve methodes is het gebruik en inductie van het eigen afweersysteem van de plant. Er zijn de afgelopen jaren al tal van producten op de markt gekomen, zogenaamde plantversterkers of biostimulanten, die volgens dit mechanisme zouden moeten werken. Er is geen duidelijk bewijs geleverd in hoeverre deze biostimulanten werken en op welke wijze in de teelt van glastuinbouw gewassen.

In deze studie zijn een aantal plantversterkers onderzocht of en op welke manier ze de natuurlijke weerbaarheid van planten kunnen induceren. Hierbij is zowel gekeken naar het effect van de plantversterkers op moleculair (genetisch) niveau als op praktijk niveau.

## *Genetica van modelplant Arabidopsis (zandraket)*

Op moleculair niveau is gekeken in hoeverre plantversterkers genen in de plant aan kunnen schakelen die betrokken zijn bij de natuurlijke afweerreactie. Hierbij is gebruik gemaakt van de modelplant *Arabidopsis* (zandraket). Van deze plant is veel wetenschappelijk kennis beschikbaar over genen die betrokken zijn bij de afweerreactie. De invloed van plantversterkers op de expressie van deze genen (inductie of onderdrukking) is hierdoor relatief eenvoudig te onderzoeken. In de toegepaste proefopzet is de invloed van de plantversterkers getest op de expressie van genen die betrokken zijn bij het afweermechanisme via de Salicylzuur route (geïnduceerd bij pathogenen met een biotrofe levensstijl) en bij het afweermechanisme via de jasmonzuurroute (geïnduceerd bij pathogenen met een necrotrofe levensstijl). Van de geteste plantversterkers bleek alleen Chitosan een meetbaar effect te hebben op de inductie van de expressie van een aantal genen van de Salicylzuur route. De verhoogde expressie van deze genen leidde inderdaad tot een verminderde vatbaarheid van de *Arabidopsis* planten voor de biotrofe schimmel *Phytophthora capsici*. Daarnaast bleek dat een preparaat op basis van Salicylzuur een effect had op de inductie van genen betrokken bij de jasmonzuurroute. De *Arabidopsis* planten die behandeld waren met dit preparaat waren ook significant minder vatbaar voor de necrotrofe schimmel *Botrytis cinerea*. Opvallend was dat het chemische gewasbeschermingsmiddel Metalaxyl-M juist de expressie van de genen van de salicylzuurroute en jasmonzuurroute remt. De planten behandeld met Metalaxyl-M waren ook vatbaarder voor *Phytophthora capsici* en *Botrytis cinerea*. Metalaxyl-M doodt pathogenen maar tegelijkertijd verlaagt het de weerbaarheid van de plant.

## *Praktijk teelt proeven van Kalanchoë en Begonia*

Op praktijkniveau is gekeken naar het effect van plantversterkers tijdens de teelt van de potplanten Kalanchoë en Begonia. De praktijkproef met Kalanchoë betrof een proefopstelling van 144 m<sup>2</sup> waarin 24 tafels met ieder 74 potplanten stonden. Tijdens het experiment werden twee stress momenten geïnduceerd, namelijk overgang van korte naar lange dag en droogtestress. Er werden zes plantversterkers getoetst op werking tegen uitval van Kalanchoë door *Phytophthora nicotianae*, en Begonia door *Fusarium foetens*. De plantversterkers waren een Compost mengsel dat ook gebruikt werd op enkele praktijk bedrijven, Silicium, Chitosan, Kaliumfosfiet, *Streptomyces*, Salicylzuur en de chemische referentie Metalaxyl-M. Silicium en salicylzuur lieten een onderdrukking zien van *Phytophthora* uitval in de teelt, terwijl silicium in Begonia juist een versnelling liet zien van uitval door *Fusarium*. Van Kalifosfiet werd verwacht dat deze een duidelijk effect zou laten zien van het tegengaan van uitval door *Phytophthora*. Helaas is deze stof slechts eenmaal toegediend aan het begin van de teelt van Kalanchoë, en daarom is er waarschijnlijk geen effect waargenomen. In Begonia werden geen effecten gezien van onderdrukking van *Fusarium* door de plantversterkers. In Begonia werd Kalifosfiet wel wekelijks toegediend.

Met behulp van NMR techniek werd gekeken naar mogelijke effecten van plantversterkers op plantinhoudstoffen. Kernspinresonantie of NMR (Nuclear Magnetic Resonance) is een natuurkundig fenomeen dat onder andere toepassing vindt in de chemie en in de geneeskunde (zoals MRI-scanners). Met deze zeer geavanceerde methode bekijkt men de componenten op basis van hun chemische structuur. Zowel jonge als oude bladeren werden onderzocht. In alle analyses van zowel Begonia als Kalanchoë, in het begin of aan het einde van de teelt, werd er een duidelijk verschil gevonden in samenstelling qua plantinhoudstoffen tussen jonge en oude bladeren. Alleen bij toediening van Chitosan en Silicium werd een duidelijk effect gevonden in plantinhoudstoffen. Van beide werd verwacht dat ze een effect zouden laten zien op de jasmonzuur route.

In een directe toxiciteit toets op agarplaten, waarop zowel de plant pathogene schimmel als de plantversterker met elkaar in contact werd gebracht, liet alleen *Streptomyces* een directe werking zien tegen zowel *Phytophthora* als *Fusarium*. Salicylzuur liet alleen een directe werking zien tegen *Phytophthora*. Dit effect werd echter niet gevonden in de praktijktoets. Waarom *Streptomyces* geen effect liet zien in de teelt proeven is onbekend. Mogelijk is de pot niet een optimale omgeving voor vestiging en werking van *Streptomyces*.

Omdat silicium een sterk effect had op *Phytophthora* uitval in Kalanchoë en dit zichtbaar werd in de plantinhoudstoffen, en silicium geen directe toxiciteit gaf, kan geconcludeerd worden dat de werking via de plant plaats vond. Chitosan gaf ook een vergelijkbaar effect op plantinhoudstoffen in Kalanchoë, zoals gedetecteerd met NMR, en Chitosan gaf geen duidelijke onderdrukking van *Phytophthora* in de teelt, dus er zijn ook andere factoren. Mogelijk vind er een extra plant reactie plaats bij het gebruik van Silicium, zoals het versterken van celwanden, dat een verschil kan maken. Ook kan Silicium een effect hebben op het wortelmilieu, zoals een effect op de zuurgraad of microbiologie, waardoor *Phytophthora* al in een vroeg stadium is uitgeschakeld.

# 1 Problematiek en oplossingsrichtingen

## 1.1 Uitval door ziekten

In de teelt van potplanten kan uitval door schimmels en bacteriën in de stek fase en teelt een belangrijk probleem zijn. Bekende voorbeelden zijn *Phytophthora* in Kalanchoë tijdens o.a. bloemvorming, *Fusarium* in Begonia, stekuitval in Saintpaulia en Poinsettia en *Pseudomonas* in Phalaenopsis bij de watergift. Kenmerkend voor deze ziekten is dat ze voor schade zorgen als planten verminderd weerbaar zijn. Een versterking van deze planten is dus gewenst om deze problemen het hoofd te kunnen bieden.

## 1.2 Stress bij veranderde omgeving

Deze problematiek door ziekten wordt in de hand gewerkt door stress van omgevingsfactoren waarbij planten blootgesteld worden aan een veranderende omgeving, zoals door watergift (ook bovenlangs zoals bij Phalaenopsis) en waterhuishouding, verplaatsen van gewassen van buiten naar binnen, verplaatsing naar koelcel (bewaarfase), in bloei trekken en af-kweek of bij het sturen van vegetatief naar generatief of bij watergift waarbij potten teveel uitdrogen en vervolgens te nat worden gemaakt.

De oplossing voor de problematiek ligt dan ook in een systeemaanpak waarbij de gevoeligheid van substraat en plant voor een ziekte en de stress wordt verminderd.

Deels is de problematiek van ziekten op te lossen door de keuze van minder gevoelige cultivars, zoals weerbaarheid tegen *Phytophthora* in Kalanchoë en *Fusarium* in Begonia. Maar de vraag vanuit de markt is veelal bepalend voor de keuze van de cultivar.

## 1.3 Plantversterker als oplossing

Door bovengenoemde problematiek van ziekten en stress, een verkleining van het pakket van chemisch gewas beschermingsmiddelen, een toenemende vraag naar "groene" producten door de consument en succes verhalen door telers is er interesse vanuit de sector in plantversterkers.

Dat plantversterkers en weerbaar telen perspectief biedt blijkt uit zowel de feiten kennis in de wetenschappelijke literatuur over de middelen die nu gebruikt worden en de praktijkervaringen van telers.

Plantversterkers zijn middelen van natuurlijke oorsprong. Een introductie hiervan wordt gegeven in het PT rapport Weerbaar telen (Van der Wurff *et al.* 2011). Dit rapport vormt een raamwerk waarbinnen oplossingsrichtingen voor specifieke ziekten en plagen, en plantversterking met betrekking tot specifieke ziekten of plagen worden genoemd. Het rapport vormt daarom een belangrijk uitgangspunt.

Plantversterkers vormen een belangrijk onderdeel van weerbaar telen maar hoeven niet per se een weerbaarheid tegen ziekten en plagen te initiëren. Zo kunnen bacteriën of schimmels of stoffen gebruikt worden voor de versterking van de plant tegen omgevingsfactoren zoals plotselinge droogte of verhoogde instraling zonder dat er een weerbaarheid tegen ziekten en plagen optreedt. Belangrijke bevindingen van het rapport en vervolproject met gerbera in 2012 (Van der Wurff *et al.* 2013) met betrekking tot plantversterkers is dat het gehele systeem belangrijk is (de teelt) w.o. klimaat (instraling), watergift, voeding, en het type substraat. Plantversterkers of biostimulatoren zijn stoffen en micro-organismen die de planten, zaden of groeisubstraten, een verhoogde groei, ontwikkeling of stressweerbaarheid geven.

Bekende voorbeelden zijn (pseudo)hormonen in zeewierextracten voor een verhoogde opname van voeding en gebruik van gibberellines voor verlengde houdbaarheid, maar ook de schimmel *Trichoderma* spp. voor een verhoogd taggewicht zoals bij chrysa als er sprake is van stress. Plantversterkers veroorzaken een cascade aan reacties binnen de cel die met elkaar in verbinding staan. Hierdoor kan de werking de ene keer wel een versterking van de plant zichtbaar maken en de andere keer niet afhankelijk van de reacties die tegelijkertijd binnen de cel worden aangeschakeld (crosstalk). Hierdoor is het belangrijk om ook werkingsmechanismen van ziekteweerbaarheid, stress en productie te meten bij onderzoek naar effectiviteit om niet te hoeven vervallen in trial & error.

Maar ook humuszuren, complexe organische bestanddelen, chemische stoffen, anorganische zouten zoals fosfietverbindingen, zeewierextracten, chitine en chitosan, (metabole) antitranspiranten (ABA, kaolien, polyacrylamide, silicaten), aminozuren en N-verbindingen (DuJardin 2012), Trichoderma soorten, mycorrhiza, Azospirillum en Pseudomonas soorten. Ondanks de talrijke voorbeelden van natuurlijke plantversterkers en de talrijke producten die in de markt geïntroduceerd zijn om de natuurlijke weerstand (Induced Systemic Resistance (ISR), System Acquired Resistance (SAR)) te induceren is het nooit tot een onderzoek gekomen over het werkingsmechanisme van deze stoffen en hun effectiviteit.

Vooraf bij gebruik van micro-organismen wordt in een vroeg stadium begonnen bij de vermeerderaar of zelfs bij uitgangsmateriaal. In het PT rapport Plantstoffen en Plantweerbaarheid (Korthout 2012) is beschreven hoe deze plantenversterkers het natuurlijke afweermecanisme (ISR en SAR) van planten kunnen induceren.

## 1.4 Weerbaar Telen

In de natuur is meestal een stapeling van mechanismen verantwoordelijk voor een drastische afname van de schade aan de plant dat veroorzaakt wordt door diverse ziekten en plagen. Ook met het oog op het vergroten van de kans dat een behandeling succesvol is tegen een breed arsenaal aan vijanden zowel onder-, als bovengronds, is het aan te raden om gebruik te maken van een stapeling van mechanismen. Met andere woorden, er is een voorkeur voor een zogenaamde "concept aanpak", dus een aanpak waarbij een aantal mechanismen (middelen) worden gestapeld, zoals het gebruik van wettelijk toegelaten antagonistische (o.a. *Gliocladium* spp.) tegen substraat gebonden ziekten samen met organische meststoffen (compostthee, zeewier of algen) en stoffen die de plantopname verbeteren (fulvine-, en huminezuren) en de plant versterken (o.a. silicium, calcium) tegen bovengrondse ziekten en plagen zoals *Botrytis* of witte vlieg of spint en die het natuurlijke afweermecanisme van de plant induceren (bijv. Salicylzuur).



**Figuur 1** Kas 10 serie te Bleiswijk met 24 eb/vloed tafels met elk een onafhankelijk watergeefstelsel voor potplanten. In deze foto werden proeven gedaan voor weerbaar telen, plantversterking met *Kalanchoe* (cv. *Leonardo*) en *Phytophthora*.

## 1.5 Metingen aan plantversterking

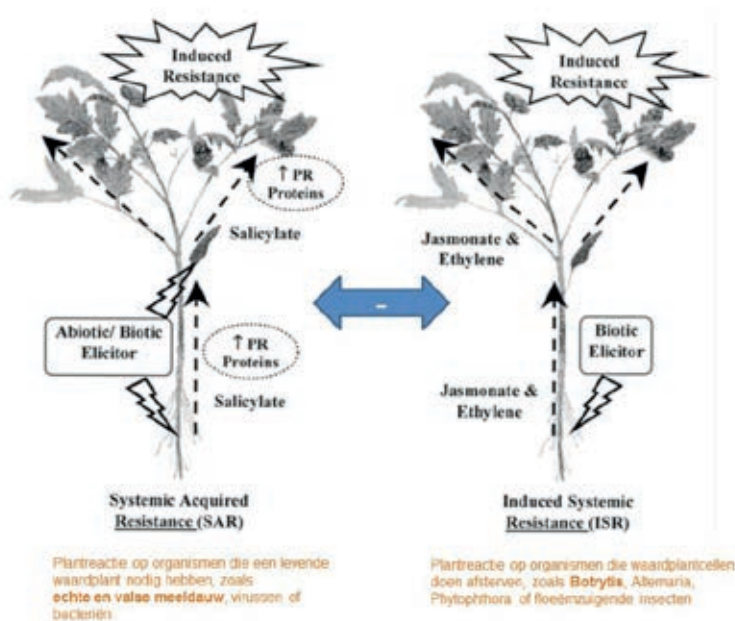
Planthormonen vormen een belangrijk signaalstof binnen de plant. Deze hormonen vormen een balans waarbij door verstoring hun concentratie toeneemt, afhankelijk van het type stress of type ziekte verwekker. Deze balans is het resultaat van alle signalen van buitenaf die de cel opvangt zoals droogte, ziekteverwekkers en instraling. Dit systeem bepaalt uiteindelijk hoe de plant reageert op stress of op een aanval van een ziekteverwekker.



Soms wordt ook een duidelijk negatief neveneffect gezien van biostimulatoren zoals bij toediening van Salicylzuur bij snijbloemen in de vaas waardoor de weerbaarheid tegen ziekten wordt verhoogd maar de houdbaarheid wordt verkort. Hierdoor is het belangrijk om het (beoogd) werkingsmechanisme van een plantversterker in kaart te brengen en deze te meten.

Voorbeelden van metingen aan planten die gebruikt kunnen worden als maat voor "sterkte" na confrontatie met een "stress" zijn de traditionele metingen zoals vers- en drooggewicht van stengels, bladeren en bloemen, totaal bladoppervlakte, wortelanalyses, spad analyse, metingen aan activiteit huidmondjes en aan calcium in de cel, en indirect door radiospectrometrische analyse van fotosystemen en zgn. quenchers ("uitdovers" van instraling) of radiospectrometrische analyse van de plant. Maar ook microbiologische activiteit in het substraat door koolstofdioxide evolutie (zuurstofverbruik in het substraat), DNA markers of enzymactiviteit, metaboliet profielen en de microbiologie in het wortelmilieu.

Afhankelijk van het type ziekte of plaag kan de plant "sterk" reageren (zie figuur 2), dus moet de keuze van bepalingen aan plantversterking afhangen van het type ziekte of plaag.



**Figuur 2** Overzicht van de samenhang van enkele plantreacties naar aanleiding van biologische (ziekteverwekkers of plagen) en niet-biologische (koud, droogte e.d.) stressfactoren.

## 1.6 Keuze van substraat

De activiteit van schimmels of bacteriën is sterk gerelateerd aan het type substraat (zie Van der Wurff *et al.* 2014). Zo kent kokos een schimmel dominantie, en steenwol een bacteriële dominantie. Daarnaast is het drainerend vermogen substraat type afhankelijk. Uitval door ziekten zoals Pythium en *Phytophthora* hangen hiermee nauw samen.

De keuze van het substraat is dus belangrijk bij het inzetten van plantversterkers of concepten binnen het weerbaar telen. Op dit moment lopen er, bijvoorbeeld, bij diverse potplanten praktijkproeven met composten waarbij enorme groeiverschillen worden gezien. De weerbaarheid hiervan tegen ziekten en plagen en andere vormen van stress is echter nog niet duidelijk aangetoond. Wel worden er duidelijke verbeteringen in groei geconstateerd.

## 1.7 Definitie, doelstelling en afbakening

Oplossen van de problematiek van ziekten en stress door gebruik van plantversterkers in de teelt van potplanten. Als modellen voor twee verschillende types ziekteverwekkers worden gebruikt i.o.m. de BCO bijvoorbeeld *Phytophthora* (Oomyceta) en *Fusarium* (Mycota). Hiervoor wordt (zie ook tabel 1):

- Een raamwerk van werkingsmechanismen van biostimulatoren en biofertilizers in potplanten in samenhang met stress en substraattypen worden in kaart gebracht.
- Kennis gegenereerd t.a.v. het werkingsmechanisme van geïnduceerde weerbaarheid, en hoe dit kan worden gebruikt om gericht geschikte plantversterkers te selecteren en te toetsen.
- Een selectie gemaakt van metingen aan werkingsmechanismen.
- Een selectie gemaakt van (beschikbare) veelbelovende plantversterkers.
- Vervolgens getoetst in een aantal modelgewassen te Bleiswijk met behulp van middelen die bij voorkeur al verkrijgbaar zijn en die geen wettelijke toelating nodig hebben waarbij gekeken wordt naar:
  - het werkingsmechanisme
  - weerbaarheid tegen ziekten en stress en
  - effect op productie.
- Effect van compost in lopende proeven op potplantbedrijven op plantversterking en weerbaarheid tegen ziekten.

Aan het einde van het project moeten resultaten vertaald kunnen worden naar andere potplanten en sectoren.

Tabel 1

Overzicht van activiteiten binnen het project en de deliverables.

Activiteit	deliverables
Raamwerk van mechanismen t.a.v. plantversterking tegen stress waaronder ziekten en plagen. Metingen/ indicatoren waarmee effect van middelen op mechanismen van plantversterking in kaart worden gebracht. Middelen die de genoemde mechanismen aan kunnen schakelen waardoor een plant sterker wordt. Voorkeur voor commercieel al verkrijgbare middelen (al of niet voor dat doel verkocht).	<ul style="list-style-type: none"> <li>- flyer raamwerk mechanismen plantversterking en weerbaarheid tegen twee ziektes met -bijbehorende metingen en</li> <li>- lijst mogelijke middelen. Bijvoorbeeld gebruik fosfiet voor aanschakelen Salicylzuur (SA) (aanvullend aan rapport Korthout 2012).</li> <li>- lijst indicatoren plantsterkte voor de teelt.</li> </ul>
4 SAR/ISR inductie <i>Arabidopsis</i> en aansluiten Modelgewas I	- model welke genen/eiwitten en metabolieten betrokken zijn bij inductie ISR/SAR
Optimaliseren metingen aan gekozen modelpotplanten	- praktijk-klaar meetmethoden/ indicatoren voor modelpotplanten voor bepalen weerbaarheid substraat en plantsterkte op basis van raamwerk. Hiervoor worden bestaande metingen gevalideerd voor gekozen modelpotplanten.
Model I Begonia: Tijdens vermeerdering en teelt te Bleiswijk met 7 behandelingen. In teelt te Bleiswijk met <i>Fusarium</i> . Kas 10.01 met stress en in kas 10.02 met stress factor en <i>Fusarium foetens</i> .	- effectiviteit van 7 behandelingen op substraatweerbaarheid en plantsterkte tegen een ziekte met- en zonder extra stressfactoren zoals verminderde instraling en transplantatie.
Model II Kalanchoë: Tijdens vermeerdering en teelt te Bleiswijk met 24 behandelingen. In teelt te Bleiswijk met <i>Phytophthora</i> . Kas 10.01 met stress factor en in kas 10.02 met stress factor en <i>Phytophthora nicotianae</i> .	- effectiviteit van 7 behandelingen op substraatweerbaarheid en plantsterkte tegen een ziekte met- en zonder extra stressfactoren zoals verminderde instraling en droogte.
Aansluiten Modelgewas II	Effectiviteit ISR/SAR induceert op weerbaarheid
Analyses en rapportage	- Analyse en bundeling resultaten met toegankelijke samenvatting voor sector.
Brede vertaalslag en creatieve demonstratie aan potplantsector i.o.m. BCO, PT en LTO.	Op een creatieve nieuwe manier zal door Fytagoras, UU en WUR i.s.m. PT, LTO de resultaten, en de vertaalslag naar andere potplanten, de zin en onzin van plantversterkers worden gedemonstreerd aan de potplantsector.



## 2 Inleiding Plantversterking

### 2.1 Inleiding

In de teelt van potplanten kan uitval door schimmels en bacteriën in de stek fase en teelt een belangrijk probleem zijn. Bekende voorbeelden zijn *Phytophthora* in Kalanchoë tijdens o.a. bloemvorming, *Fusarium* in Begonia, stekuitval in Saintpaulia en Poinsettia en *Pseudomonas* in Phalaenopsis. Kenmerkend voor deze ziekten is dat ze voor schade zorgen als planten verminderd weerbaar zijn. Een versterking van deze planten is dus gewenst om deze problemen het hoofd te kunnen bieden.

Deze problematiek door ziekten wordt in de hand gewerkt door stress van omgevingsfactoren waarbij planten blootgesteld worden aan een veranderende omgeving, zoals door watergift (ook bovenlangs zoals bij Phalaenopsis) en waterhuishouding, verplaatsen van gewassen van buiten naar binnen, verplaatsing naar koelcel (bewaarfase), in bloei trekken en afkweek of bij het sturen van vegetatief naar generatief of bij watergift waarbij potten teveel uitdrogen en vervolgens te nat worden gemaakt.

### 2.2 Biostimulanten bieden perspectief

Dat plantversterkers en weerbaar telen perspectief biedt blijkt uit zowel de feiten kennis in de wetenschappelijke literatuur over de middelen die nu gebruikt worden en de praktijkervaringen van telers. Plantversterkers vormen een belangrijk onderdeel van weerbaar telen maar hoeven niet per se een weerbaarheid tegen ziekten en plagen te initiëren. Zo kunnen bacteriën of schimmels of stoffen gebruikt worden voor de versterking van de plant tegen omgevingsfactoren zoals plotselinge droogte of verhoogde instraling zonder dat er een weerbaarheid tegen ziekten en plagen optreedt. Belangrijke bevindingen met gerbera zijn, bij het gebruik van plantversterkers of bouwstenen in het weerbaar telen, dat het gehele systeem belangrijk is (de teelt) waar onder klimaat (instraling), watergift, voeding, en het type substraat.

### 2.3 Wat zijn biostimulanten?

In het algemeen wordt er bij plantversterkers gesproken over zgn. biostimulatoren. Onder biostimulatoren vallen humuszuren, complexe organische bestanddelen, chemische stoffen, anorganische zouten zoals fosfietverbindingen, zeewierextracten, chitine en chitosan, (metabole) antitranspiranten (ABA uitschrijven, kaolien, polyacrylamide, silicaten), aminozuren en N-verbindingen. Bekende voorbeelden zijn (pseudo)hormonen in zeewierextracten voor een verhoogde opname van voeding en gebruik van gibberellines voor verlengde houdbaarheid. Een onderdeel vormen ook de levende micro-organismen zoals bacteriën en schimmels. Vooral bij gebruik van micro-organismen wordt in een vroeg stadium begonnen bij de vermeerderaar of zelfs bij uitgangsmateriaal. Voorbeelden van biofertilizers zijn o.a. *Trichoderma* soorten, mycorrhiza, *Azospirillum* en *Pseudomonas* soorten. De schimmel *Trichoderma* spp. zorgt bijvoorbeeld voor een verhoogd takgewicht bij chrysant als er sprake is van stress.

Ondanks de talrijke voorbeelden van natuurlijke plantversterkers en de talrijke producten die in de markt geïntroduceerd zijn om de natuurlijke weerstand van de plant aan te schakelen is het nog niet tot onderzoek gekomen over de effectiviteit en de randvoorwaarden voor werkzaamheid. Dat is belangrijk omdat het gebruik van plantversterkers nu alleen afhangt van een idee dat het werkt, of gewerkt heeft, maar dat we het niet zeker weten.

## 2.4 Raamwerk

Binnen het PT project Plantversterking in Potplanten wordt dit onderzocht door Wageningen UR Glastuinbouw en Fyttagoras BV. Als antwoord op het zgn. "trial-and-error" type onderzoek, kiezen we hier voor een aanpak waarin we ook kijken of de plant reageert en op welke wijze. Bij plantversterkers verwacht je effecten op groei en op het inwendige afweersysteem van de plant. Daar wordt in dit onderzoek naar gekeken. Indien we bijvoorbeeld geen effecten op ziekteonderdrukking vinden maar wel signalen in de plant dat een afweersysteem wordt aangezet, dan zijn we een stap verder en weten we dat er weliswaar iets gebeurd in de plant, maar dat het niet afdoende is. Er worden twee wegen gevolgd: 1. Kasproeven met zeven plantversterkers in Kalanchoë tegen *Phytophthora*, en Begonia tegen *Fusarium*. Hierin zoeken we naar een bewijs van werking van plantversterkers op plantstoffen niveau (WUR Glastuinbouw). 2. fundamenteel onderzoek naar bewijs van werking op DNA/gen niveau (Fyttagoras) aan de hand van de modelplant Zandraket (*Arabidopsis*) tegen *Phytophthora*, *Botrytis* en *Fusarium*. In tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de plantversterkers die ingezet worden in het onderzoek en de veronderstelde werking via jasmonzuur-, of salicylzuur route.

Tabel 2

Overzicht van biostimulanten en middelen gebruikt in dit onderzoek bij *Arabidopsis*, *Begonia* en *Kalanchoë* met de verwachte werking en toediening.

behandeling	werking	afweer systeem	toediening
1 Compost	?	?	eenmalig
2 Silicium	kalimetasilicaat direct toxiciteit	JA	wekelijks
3 Chitosan	directe toxiciteit	JA	eenmalig
4 Kaliumfosfiet	direct toxiciteit	SA	Eenmalig in Kalanchoë / wekelijks in Begonia
5 Streptomyces	direct toxiciteit	SA	opkweek
6 Salicylzuur	direct toxiciteit; synthetisch SA	SA	wekelijks
7 Metalaxyl-M (Ridomil Gold)	systemisch ; metalaxyl-M	geen	eenmalig
8 neg. controle	-		
pos contr	-		

## 2.5 NMR

Kernspinresonantie of NMR (Nuclear Magnetic Resonance) is een natuurkundig fenomeen dat onder andere toepassing vindt in de chemie en in de geneeskunde (zoals MRI-scanners). Met deze zeer geavanceerde methode bekijkt men de componenten op basis van hun chemische structuur. NMR is uiterst reproduceerbaar maar is niet zo gevoelig zoals een chromatografische methode (GC of LC). Hierbij gaat het om de quantum mechanische magnetische eigenschappen van atomen in een sterk magnetisch veld. Voor elk metabooliet geeft dit een specifiek patroon op basis waarvan de metaboolieten te identificeren zijn. In het algemeen kunnen er 20 – 50 moleculen op naam gebracht per analyse.

## 2.6 RNA merkers

Planten hebben een eigen afweermecanisme ontwikkeld om zich te beschermen tegen pathogenen. Dit aanschakelen kan geïnduceerd worden door schadelijke pathogenen of on niet schadelijke factoren. In het eerste geval spreken we van Acquired Resistance, in het tweede geval van Induced Resistance. In beide gevallen zijn er hormonen betrokken (JA, SA, ethyleen) die ervoor zorgen dat de juiste genen worden aangeschakeld die een belangrijke functie vervullen bij het opbouwen van het afweermecanisme. *Arabidopsis* (zandraket) is een van de eerste organismen waarbij het genoom in kaart is gebracht. Daardoor is *Arabidopsis* voor de wetenschap altijd een interessant modelorganisme geweest om studies op gen/DNA niveau te doen. De inschakeling van elk willekeurig gen is in *Arabidopsis* goed en relatief simpel te volgen. Binnen dit project is gekeken naar het gedrag van genen die betrokken zijn bij de inductie van het afweermecanisme. Hierbij is een selectie gemaakt van 24 genen waarvan wetenschappelijk is aangetoond dat ze een rol spelen bij het afweermecanisme. Hierdoor is het mogelijk om op basis van het gedrag van deze genen te onderzoeken of een middel invloed heeft op het afweermecanisme van een plant. Daarnaast kunnen de genen die duidelijk beïnvloed worden tijdens het induceren van het afweermecanisme gebruikt worden als merker om in praktijksituaties de mate van inschakeling van het afweermecanisme te kunnen monitoren.

## 2.7 Duoplate techniek

Bij een Duoplate techniek worden er meerdere bacteriën of schimmels op eenzelfde groeimedium geplaatst. Indien er minder groei plaats vindt ten opzichte van een controle dan vind er remming plaats. Ook kan er een contact inhibitie zone (halo) ontstaan op de plaat. Dit laat zien dat er remming optreedt van de groei van de schimmel of bacterie door een andere schimmel of bacterie. Deze techniek geeft algemeen inzicht in de potentie van een bacterie of schimmel om een andere bacterie of schimmel te remmen in de groei. Soms laat een organisme een remming zien van een plant pathogeen op groeimedium, maar in de praktijk blijkt hiervan geen sprake. In een dergelijke situatie kan onderzocht worden waarom het niet werkt in de praktijk en hoe dat verbeterd kan worden (door bijv. aanbrenge van drager materiaal).





# 3 Genetica van plantversterking

## 3.1 Inleiding

Het effect van vier "plantenversterkers" is getest bij modelplant *Arabidopsis*. Getest zijn Ridomil, FertigroSil, Chitosan en Salicylzuur (ten opzichte van de controle). Planten zijn gedurende de opgroefase (5 weken) wekelijks behandeld met bovengenoemde plantversterkers en het effect is getest op zowel het percentage zieke planten als op gen niveau na infectie van de planten met *Phytophthora capsici* (biotroof/necrotroof) en *Botrytis cinerea* (necrotroof).

## 3.2 Materiaal en methode

### 3.2.1 Planten

Zaden van *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0 zijn op zand gezaaid om vervolgens twee dagen bij 4°C opgeslagen te worden. Na deze twee dagen zijn de zaden verplaatst naar de groeikamers (21°C, 100% luchtvochtigheid, 10 uur licht per dag, 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Na 10 dagen zijn de zaailingen overgezet van zand naar een mix van potgrond en zand (verhouding 12:5) en bij 70% luchtvochtigheid gezet. Vervolgens kregen de planten regelmatig water en een maal per week werd ½ sterke hoagland oplossing toegevoegd.

### 3.2.2 Toediening van middelen

Ctrl: De controle behandeling kregen geen andere behandeling dan beschreven onder het kopje planten.

Metalaxyl-M: Aan de wortels van twee weken oude planten werd 5 mL Metalaxyl-M oplossing (75 $\mu\text{L}$  Metalaxyl-M per Liter water) toegevoegd. Dit werd wekelijks herhaald.

FertigroSil: Aan de wortels van twee weken oude planten werd 10 mL FertigroSil oplossing (144 $\mu\text{L}$  FertigroSil per Liter water) toegevoegd. Dit werd wekelijks herhaald.

Chitosan: Chitosan (practical grade) werd in 0.25 M HCl (pH 5.8 with NaOH) opgelost en 10 maal verdund met water tot een eindconcentratie van 1 mg chitosan per mL. Per plant werd eenmalig 10 mL chitosan oplossing aan de wortels toegevoegd.

Salicylzuur: Twee weken oude planten werden bespoten met Salicylzuur (25 mg Salicylzuur per liter water). Dit werd wekelijks herhaald.

### 3.2.3 Pathogeen inoculaties

*Phytophthora capsici*: *Phytophthora capsici* LT3112 werd een week op V8 agar platen gegroeid. Om zoösporen te oogsten werd de agar (met *P. capsici*) in stukken gesneden en werd 10 mL gedemineraliseerd water toegevoegd. Een uur later werd het water vervangen door opnieuw 10 mL gedemineraliseerd water en werd het geheel 3 dagen bij 20°C geïncubeerd. Vervolgens werden de agar stukjes in het water een uur bij 4°C geplaatst. Bij deze laatste stap kwamen de zoösporen vrij in het water en konden vervolgens verzameld worden. De planten (5 weken oud) werden daarna bespoten met een sporensuspensie van 50 sporen per  $\mu\text{L}$  (in water). Na de inoculatie werden de planten bij 100% luchtvochtigheid en tot de volgende morgen in het donker gezet. Na 6 dagen bij 100% luchtvochtigheid en verder standaard groeiomstandigheden werd de ziekte gescoord door voor ieder blad de aanwezigheid van symptomen te beoordelen (aanwezig=1, afwezig=0).

*Botrytis cinerea*: *Botrytis cinerea* werd 2 weken op ½ PDA platen gegroeid en vervolgens werden de sporen geoogst door 10 mL ½ PDB toe te voegen en de sporen in deze oplossing met een spatel los te wrijven. Vijf weken oude planten werden vervolgens geïnoculeerd met *B. cinerea* door druppels van 5  $\mu\text{L}$  ½ PDB met 105 sporen per mL op vijf bladen van iedere plant te druppelen. Na 4 dagen werd de ziekte gescoord door ieder geïnoculeerd blad in een categorie in te delen op basis van de intensiteit van de symptomen.

### 3.2.4 Gen expressie analyse

De invloed van plantversterkers en infectie op de genexpressie wordt gemeten op 24 geselecteerde genen die betrokken zijn bij de inductie van de plantweerbaarheid via de salicylzuur-, jasmonzuur of ethyleen route. De selectie is gemaakt op basis van relevante wetenschappelijke informatie. De geselecteerde genen staan in kolom 3 van tabel 1-3 weergegeven

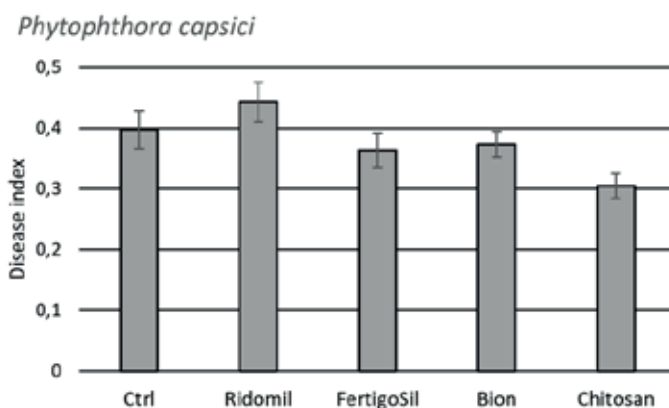
Bladeren van de geïnoculeerde planten werden direct na inoculatie (t=0), 24 uur na inoculatie (t=24) en 48 uur na inoculatie (t=48) geoogst en met behulp van vloeibaar stikstof ingevroren. De bladeren van de controle planten werden op dezelfde momenten geoogst. De planten waar wekelijks een chemische behandeling werd toegevoegd (Ridomil, FertigoSil, en Salicylzuur) zijn voor het laatst behandeld 24 uur voor t=0. Per plant werden drie bladeren geoogst en twee planten werden samengevoegd voor een monster (in totaal dus 6 bladeren per monster). Het RNA werd geïsoleerd, gecontroleerd op de aanwezigheid van en indien nodig werd een extra DNase behandeling uitgevoerd. Vervolgens werd cDNA gesynthetiseerd en werden er qPCRs uitgevoerd.

## 3.3 Resultaten

### 3.3.1 Visuele effecten op planten

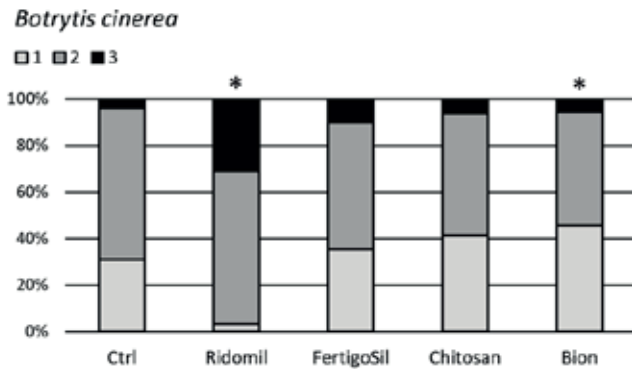
Om de effectiviteit van de verschillende middelen tegen pathogenen te testen zijn behandelde en onbehandelde planten geïnoculeerd met *P. capsici* of *B. cinerea*. *P. capsici* is een oomyceet die een groot aantal gewassen, zoals komkommer, tomaat en peper, maar ook de modelplant *A. thaliana* kan infecteren. *B. cinerea* is een pathogene schimmel die ook veel verschillende planten, waaronder *A. thaliana*, kan aantasten. Na infectie door een van deze twee pathogenen is de mate van infectie voor iedere plant bepaald.

In figuur 3 is de ziekte index van planten geïnfecteerd met *Phytophthora* uitgezet per behandeling. Een hogere ziekte index betekent meer symptomen per plant. In dit figuur is te zien dat vooral behandeling van de planten met chitosan een afname in symptomen vergeleken met de controle behandeling veroorzaakt. Uit een statistische analyse (ANOVA) blijkt echter dat er geen statistisch significant verschil waarneembaar is tussen de controle behandeling en de chitosan behandeling. Geen van de andere behandelingen lijkt een effect te hebben op de *P. capsici* infectie.



**Figuur 3.** Ziekte index van *Arabidopsis* planten behandeld met drie plantversterkers, Metalaxyl-M en een controle na infectie met *Phytophthora*.

In figuur 4 zijn de resultaten van de *B. cinerea* infectie weergegeven. Om de ziekte te scoren werd ieder geïnfecteerd blad in een ziekte categorie geplaatst waarbij de bladeren in categorie 1 de minste symptomen hebben en de bladeren in categorie 3 de zwaarste symptomen laten zien. FertigoSil en Chitosan lijken geen effect te hebben op de *B. cinerea* infectie. Metalaxyl-M zorgt voor significant ernstigere symptomen op het blad (Chi-square'  $p < 0.05$ ).



**Figuur 4.** Score ziektebeeld van *Arabidopsis* planten behandeld met drie plantversterkers, Metalaxyl-M (Ridomil) en een controle na infectie met *Botrytis*. 1: geen symptomen; 2: vergeling en laesies van minder dan de helft van het blad; 3: vergeling en laesies groter dan de helft van het blad; \* significante verschillen (Chi-square  $p < 0.05$ )

Wat verder opviel aan de Metalaxyl-M behandelde planten was dat de niet met *B. cinerea* geïnfecteerde planten ook vergeling en necrotische plekken lieten zien (figuur 5). Het is hierdoor niet duidelijk welke symptomen het gevolg zijn van *B. cinerea*. Behandeling met Salicylzuur laat een lichte maar significante vermindering van symptomen zien. Echter, in het proefexperiment werd het tegenovergestelde waargenomen. Dit kan mogelijk verklaard worden doordat het proefexperiment is uitgevoerd met een klein aantal planten waardoor het niet betrouwbaar is.



**Figuur 5** *Arabidopsis* planten behandeld met plantversterkers na infectie met *Botrytis*. V.l.n.r.: rij 1: controle (geen *Botrytis* infectie); rij 2: Salicylzuur 3; Metalaxyl-M; rij 4: FertigoSil; rij 5: Chitosan; rij 6: controle (met *Botrytis* infectie)

### 3.3.2 Effecten op de expressie van afweergenen

*P. capsici* heeft een hemibiotrofe levensstijl wat betekent dat het eerst een biotrofe levensfase heeft waarin *P. capsici* zich voedt op levende gastheer cellen. Deze fase wordt gevolgd door een necrotrofe fase waarin *P. capsici* zich voedt met dood weefsel en er dus sterke symptomen op de geïnfecteerde plant ontstaan. *B. cinerea* is een schimmel die de cellen in de plant direct dood tijdens de infectie. *B. cinerea* is daarom een necrotroof pathogeen. Over het algemeen is in planten de SA afweerroute belangrijk tegen (hemi)biotrofe pathogenen en is de JA route betrokken bij afweer tegen necrotrofe pathogenen. Verder hebben de genen uit de ET route een zeer diverse rol in de afweerreactie van planten.

Om een beeld te krijgen hoe de verschillende middelen deze twee afweerroutes beïnvloeden en of dit de verschillen in resistentie kan verklaren hebben we de expressie van verschillende genen uit beide afweerroutes na behandeling met de middelen bekeken. Daarnaast hebben we ook bekeken hoe de expressie van deze genen verloopt na infectie met *P. capsici* of *B. cinerea*. Verder hebben we de expressie patronen van een aantal die niet binnen de SA, JA en ET route vallen bekeken (PAMP).

In tabel 1-3 is de genexpressie van de 24 geselecteerde genen weergegeven. De genen zijn geselecteerd op basis van hun rol in de afweer van planten. We hebben geprobeerd om genen te selecteren uit alle bekende belangrijke signaleringsroutes betrokken bij de afweerreacties van planten. Alle expressiewaarden zijn relatief aan de controle behandeling (geen pathogeen en geen middel) op t=0. Als de relatieve expressie dicht bij 1 ligt en is er nauwelijks verandering is t.o.v. de controle behandeling. Waarden boven de 1 betekent een verhoogde expressie waarden onder de 1 een gereduceerde expressie t.o.v. de controle. De genen zijn geclusterd op de afweerroute waarbij ze betrokken zijn. Hoe hoger of lager de afwijking t.o.v. 1 hoe hoger of lager de expressie van het gen.

In tabel 3 is de genexpressie in de tijd weergegeven van de planten die niet zijn geïnfecteerd met een pathogeen. Het enige dat hier opvalt, is dat de Ridomil behandelde planten een gereduceerde afweergenenexpressie laten zien in zowel de SA als de JA route. Dit kan verklaren waarom deze planten ziek worden zonder dat er een pathogeen op is aangebracht. Alle andere middelen laten geen directe sterke effecten zien op de expressie van de onderzochte genen.

Tabel 3

Expressie waarden van de verschillende genen na behandeling van de plantversterkers op planten die niet zijn geïnfecteerd.

Gene	0h					24h					48h					
	Ctrl	Ridomil	FertigoSil	Chitosan	Bion	Ctrl	Ridomil	FertigoSil	Chitosan	Bion	Ctrl	Ridomil	FertigoSil	Chitosan	Bion	
SA	2 PR1	1	0.66	1.57	0.93	1.05	1.50	0.71	1.32	1.18	1.15	1.40	0.40	1.76	1.36	1.17
	3 PR5	1	0.52	0.78	0.89	1.17	0.56	0.63	0.90	0.62	0.63	0.47	0.29	0.45	0.81	0.80
	4 GST1	1	1.28	1.48	0.96	1.07	1.67	1.13	1.41	1.26	1.06	1.24	1.11	1.69	1.12	1.01
	5 PAD4	1	0.83	1.26	1.18	1.01	1.57	1.34	1.80	2.06	1.87	1.42	1.10	1.35	1.18	0.71
	6 ICS1	1	1.11	1.34	0.95	1.13	1.71	1.11	1.67	1.78	1.47	1.37	1.13	1.59	1.35	0.97
	7 EDS5	1	0.86	1.37	0.99	1.05	0.94	0.68	0.79	0.79	0.82	1.00	0.75	0.99	0.90	0.75
	8 WRKY54	1	0.54	1.74	0.83	0.56	2.47	0.42	1.47	2.14	2.21	0.89	0.17	0.74	0.63	0.41
	9 WRKY70	1	0.59	1.60	1.25	0.65	2.61	0.57	1.31	1.18	0.62	0.89	0.20	0.42	0.35	0.30
	10 PDF1.2	1	0.95	1.83	1.12	1.14	1.74	1.47	1.79	1.42	1.33	1.63	0.89	2.20	1.26	1.54
JA	11 ERF1	1	1.16	1.46	0.80	0.96	1.16	0.99	1.07	0.99	0.95	1.22	1.05	1.62	0.99	0.96
	12 VSP2	1	1.75	1.74	1.34	1.75	2.87	3.70	2.95	2.31	2.88	2.29	1.39	1.02	1.71	1.81
	13 MYC2	1	1.20	1.43	1.06	1.30	0.49	0.52	0.53	0.49	0.57	0.51	0.47	0.48	0.49	0.56
	14 LOX2	1	0.85	1.16	1.10	1.26	1.33	1.23	1.47	1.26	1.41	1.40	0.88	1.00	1.17	1.18
	15 AOS	1	1.08	1.14	1.16	1.41	1.06	1.21	1.19	0.97	1.10	0.88	0.99	0.69	0.79	1.02
	16 MYB34	1	1.35	1.12	0.90	1.05	0.39	0.41	0.53	0.57	0.75	0.55	0.71	0.74	0.94	0.95
	17 MYB28	1	1.09	1.23	0.98	1.14	0.46	0.59	0.54	0.54	0.69	0.56	0.73	0.65	0.71	0.71
	18 JAZ1	1	1.01	1.94	1.39	1.08	4.02	3.12	3.38	2.92	1.73	2.74	1.17	1.52	1.11	0.91
ET	19 PR3	1	1.21	1.55	0.87	1.08	1.57	1.17	1.39	1.16	1.26	1.27	1.34	1.10	1.28	1.01
	20 PR4	1	1.02	1.40	1.07	1.27	1.38	1.25	1.70	1.55	1.42	1.01	0.70	1.16	1.20	1.43
	21 EIN3	1	1.12	0.93	0.86	0.95	1.47	1.15	1.26	1.24	1.29	1.23	1.23	1.32	1.46	1.47
	22 EIL1	1	1.03	0.71	0.82	1.00	1.31	1.17	1.26	1.08	1.21	1.13	1.26	1.02	1.30	1.07
PAMP	23 FRK1	1	1.02	1.54	1.02	0.95	1.97	1.24	1.62	1.70	1.31	1.41	1.10	1.57	1.27	0.92
	24 WRKY33	1	1.09	1.38	0.92	0.91	1.98	1.34	1.67	1.67	1.62	1.38	1.46	1.63	1.23	1.08
	25 MPK3	1	1.05	1.31	1.23	1.13	1.30	1.58	2.04	1.94	1.65	1.66	1.29	1.40	1.44	1.01

In tabel 4 is de genexpressie in de tijd weergegeven van de planten die zijn geïnfecteerd met *P. capsici*. 24 uur na infectie is te zien dat zowel de genen uit de SA groep als de genen uit de ET groep geïnduceerd worden. Een aantal genen in het JA cluster laten juist een repressie zien na 24 uur. Na 48 uur is er een tegenovergesteld expressiepatroon waarneembaar. De SA en ET genen vertonen geen verhoogde expressie meer of komen zelfs lager tot expressie terwijl de JA genen een lichte inductie laten zien. Dit expressie patroon is waarschijnlijk het gevolg van de interactie tussen *P. capsici* en de plant. *P. capsici* wordt in eerste instantie herkend door de plant en de SA en ET routes worden geactiveerd (t=24). Door de activatie van de SA route wordt de JA route geremd, dit is een normaal proces. Later in de infectie (t=48) is *P. capsici* in staat om met speciale eiwitten de afweer te onderdrukken waardoor de genen in de SA en ET groep weer minder tot expressie komen. Wat het meest opvalt, is dat in de chitosan behandelde planten de inductie van de SA en ET genen maar ook van de andere afweer genen (PAMP) het sterkst is. Dit kan het verschil in ziekte dat is gevonden in zowel het proefexperiment als in het definitieve experiment verklaren.

Tabel 4

Expressie waarden van de verschillende genen na behandeling van de plantversterkers op planten geïnfecteerd met *Phytophthora*.

Gene	0h					24h					48h				
	Ctrl	Ridomil	FertigoSil	Chitosan	Bion	Ctrl	Ridomil	FertigoSil	Chitosan	Bion	Ctrl	Ridomil	FertigoSil	Chitosan	Bion
2 PR1	1.046965	0.35	0.48	0.66	0.72	0.86	0.91	1.09	1.34	0.81	0.21	0.36	0.22	0.29	0.18
3 PR5	0.805024	0.18	0.33	0.53	0.76	3.15	4.30	3.50	5.88	1.87	1.01	1.24	0.95	1.11	1.15
4 GST1	0.991799	1.03	0.90	0.97	1.11	1.05	1.09	1.29	1.62	1.00	1.06	0.99	1.16	0.90	0.94
5 PAD4	0.870608	1.34	0.88	0.67	1.12	1.15	1.07	1.57	1.12	1.43	0.98	0.84	0.73	0.52	0.63
6 ICS1	0.922562	1.26	0.99	0.88	1.04	1.09	1.21	1.41	1.57	1.17	1.35	1.07	1.14	0.90	0.94
7 EDS5	1.157061	0.85	1.09	0.95	0.91	1.15	1.05	1.09	1.08	0.98	1.14	0.94	1.02	0.96	1.22
8 WRKY54	0.440689	0.21	0.32	0.50	0.64	1.45	2.48	2.01	2.87	0.27	0.23	0.38	0.20	0.31	0.27
9 WRKY70	0.333289	0.13	0.25	0.28	0.25	2.83	4.38	3.13	4.30	0.42	0.30	0.56	0.27	0.45	0.34
10 PDF1.2	1.392837	1.07	1.24	1.22	1.21	1.47	1.63	1.85	1.85	1.43	0.03	0.79	0.09	0.02	0.08
11 ERF1	0.890311	0.93	0.86	0.96	0.81	0.94	1.04	1.10	1.09	0.89	0.92	1.05	1.00	0.84	0.82
12 VSP2	1.480948	3.09	2.33	2.00	2.10	4.36	2.35	3.22	3.32	3.63	3.54	4.05	4.32	2.65	4.69
13 MYC2	1.074628	1.02	0.99	0.98	0.98	0.48	0.48	0.50	0.41	0.43	0.75	0.86	0.74	0.63	0.63
14 LOX2	1.254166	1.61	1.14	1.19	2.40	4.22	2.58	3.30	2.93	2.55	1.23	2.28	1.42	1.31	1.85
15 AOS	1.125821	1.54	1.70	1.20	1.30	1.17	1.02	1.00	1.00	0.93	1.31	1.49	1.08	1.21	1.59
16 MYB34	1.226651	1.42	1.23	1.31	1.18	0.74	0.76	0.71	0.80	0.76	1.72	1.56	1.59	1.22	1.30
17 MYB28	1.008198	1.35	1.27	1.16	1.14	0.60	0.61	0.57	0.63	0.57	1.35	1.38	1.46	1.28	1.47
18 JAZ1	0.988574	0.56	0.57	0.47	0.31	3.34	2.69	2.74	1.84	1.32	0.56	0.55	0.43	0.37	0.30
19 PR3	0.956599	1.02	1.09	1.01	0.91	1.12	1.05	1.40	1.45	1.04	1.12	1.03	0.80	0.70	0.82
20 PR4	1.192288	0.77	1.15	1.06	1.39	1.76	2.01	2.14	3.33	1.57	0.16	0.33	0.13	0.11	0.16
21 EIN3	1.228008	1.17	1.34	1.00	1.41	1.05	1.19	1.29	1.84	0.94	1.25	0.93	0.90	1.06	1.02
22 EIL1	1.269008	1.25	1.30	1.10	1.25	1.89	1.73	1.72	2.69	1.44	1.07	0.94	1.12	1.20	1.07
23 FRK1	0.882446	1.10	1.15	0.95	0.92	1.06	1.12	1.44	1.64	1.09	1.38	1.01	1.09	0.74	1.00
24 WRKY33	0.95288	1.21	1.39	0.82	0.83	1.15	1.33	1.87	2.54	0.91	0.85	0.81	0.89	0.67	0.49
25 MPK3	0.976794	0.98	0.91	0.77	0.81	1.40	1.70	1.86	1.81	1.35	0.78	0.84	0.76	0.57	0.58

In tabel 5 is de genexpressie in de tijd weergegeven van de planten die zijn geïnfecteerd met *B. cinerea*. Na *B. cinerea* infectie is er een duidelijke inductie van de JA en ET genen te zien terwijl de SA genen een reductie laten zien. Dit geldt voor zowel 24 uur als 48 uur na infectie en is een normale reactie van *Arabidopsis* op *B. cinerea*. Wat hier opvalt, is dat na 24 uur de inductie van de genen in de JA en ET groep in de Salicylzuur behandelde planten een stuk sterker is dan in de overige planten. Dit kan de vermindering in symptomen na *B. cinerea* infectie verklaren. Dat Salicylzuur bescherming biedt tegen *B. cinerea* is dus onverwacht. Opvallend is dat Ridomil vooral na infectie met Botrytis de genexpressie van een aantal genen doet afnemen wat overeenkomt met de verhoogde ziekteverschijnselen.

Tabel 5

Expressie waarden van de verschillende genen na behandeling van de plantversterkers op planten geïnfecteerd met *Botrytis*: Groene markering: opvallend lage expressie bij behandeling met Metalaxyl-M (Ridomil); gele markering opvallend hoge expressie bij behandeling met SA (Salicylzuur)

Gene	Ctrl	0h					24h					48h				
		Ridomil	FertigoSil	Chitosan	Bion	Ctrl	Ridomil	FertigoSil	Chitosan	Bion	Ctrl	Ridomil	FertigoSil	Chitosan	Bion	
SA	2 PR1	0,442687	0,00	0,61	0,55	0,04	0,77	0,13	0,84	0,89	2,79	0,59	0,21	0,93	0,96	0,80
	3 PR5	0,535258	0,02	0,53	0,58	0,21	14,42	0,84	6,30	10,46	13,94	5,19	4,92	7,47	6,71	15,06
	4 GST1	0,982845	0,93	0,81	0,76	0,85	0,58	0,67	0,68	0,65	0,57	0,68	0,78	0,88	0,85	0,69
	5 PAD4	1,352262	0,86	1,28	1,20	0,75	0,36	0,43	0,32	0,31	0,39	0,49	0,33	0,37	0,35	0,41
	6 ICS1	1,306595	1,18	1,01	1,12	0,95	0,83	0,89	0,85	0,77	0,78	0,90	0,90	1,03	1,03	1,05
	7 EDS5	0,72422	0,23	0,80	0,73	0,62	1,00	1,23	2,25	0,86	1,21	1,94	1,30	1,33	1,21	2,73
	8 WRKY54	0,175783	0,06	0,24	0,36	0,08	1,38	0,51	2,01	1,45	2,66	1,33	0,67	2,58	1,36	1,40
	9 WRKY70	0,23301	0,05	0,26	0,32	0,12	82,85	2,73	60,17	35,15	102,24	75,40	17,90	68,83	47,48	139,89
	10 PDG1.2	1,398852	1,49	0,94	0,86	1,23	0,35	0,55	0,25	0,24	1,42	0,04	0,15	0,08	0,02	0,04
JA	11 ERF1	0,907411	0,95	0,71	0,75	0,84	0,94	0,87	0,97	0,92	1,01	0,94	1,20	1,21	0,96	1,03
	12 VSP2	3,052096	4,74	2,09	1,50	3,00	4,08	4,82	4,41	4,23	4,04	4,67	5,58	5,66	4,98	4,89
	13 MYC2	0,534208	0,45	0,44	0,35	0,50	2,80	1,34	2,82	2,09	4,56	2,69	2,47	3,19	2,02	2,62
	14 LOX2	1,242998	0,57	1,06	0,63	1,14	32,13	3,73	14,02	9,49	71,98	16,63	6,78	11,29	8,12	28,86
	15 AOS	1,162935	1,89	1,03	0,80	1,05	117,25	11,73	34,07	13,63	342,51	61,63	28,05	39,60	24,69	139,51
	16 MYB34	0,746041	1,46	0,66	0,72	0,90	2,93	2,69	2,62	2,61	4,20	3,44	3,99	4,30	3,66	3,61
	17 MYB28	0,664859	1,29	0,55	0,61	0,69	1,01	1,10	0,97	0,97	1,19	1,11	1,17	1,24	1,08	1,11
	18 JAZ1	1,207406	0,17	1,02	0,45	0,71	2,11	0,43	2,17	1,12	2,86	0,60	0,59	0,81	0,57	0,57
	ET	19 PR3	0,940153	0,34	0,93	0,79	0,92	2,36	1,51	2,12	2,14	2,55	2,09	1,32	1,91	1,57
20 PR4		1,237262	0,14	0,99	0,81	0,84	2,61	0,97	3,51	1,94	5,19	1,10	0,71	1,05	0,57	1,90
21 EIN3		1,065464	0,88	1,02	0,98	1,10	2,86	2,33	4,95	3,00	4,18	2,66	5,41	6,94	5,83	3,58
22 EIL1		1,335534	2,10	1,02	1015,00	1,46	4,53	4,32	4,96	4,36	3,92	5,05	6,00	7,57	7,09	5,18
PAMP	23 FRK1	1,612849	0,44	1,01	0,98	0,86	0,68	0,78	0,67	0,72	0,66	0,77	0,60	0,67	1,07	0,90
	24 WRKY33	1,19876	0,96	1,09	0,94	1,00	3,17	2,17	4,95	2,40	5,54	2,74	3,56	4,54	2,98	2,79
	25 MPK3	1,422109	0,91	1,35	1,19	0,83	1,90	1,45	1,78	1,60	2,15	1,83	1,79	1,97	1,90	1,81

*Arabidopsis* planten behandeld met Chitosan vertonen een lichte daling in ziekteverschijnselen na infectie met *Phytophthora* t.o.v. de controleplanten terwijl *Arabidopsis* planten behandeld met Salicylzuur iets minder ziekteverschijnselen vertonen na infectie met *Botrytis* t.o.v. de controleplanten

Voor het meten van het effect van de plantversterkers op gen niveau is een selectie gemaakt van de 24 meest interessante genen op basis van hun rol in de afweerreactie. Hierbij is onderscheid gemaakt tussen genen die een belangrijke rol spelen in de SA afweerroute (biotrofe pathogenen), JA route (necrotrofe pathogenen) en Ethyleen route (diverse afweermechanismen).

### 3.3.3 Conclusie en discussie

Uit de experimenten met het modelgewas *Arabidopsis* kan geconcludeerd worden dat de plantversterker Chitosan de expressie van afweergenen betrokken bij de SA route verhoogt en daarmee ook planten minder vatbaar maakt voor infectie van biotrofe pathogenen. Daarnaast verhoogt de plantversterker Salicylzuur de expressie van de afweergenen die betrokken zijn bij de JA route en maakt daardoor planten minder gevoelig voor necrotrofe pathogenen. Opvallend is dat de behandeling van planten met Metalaxyl-M (Ridomil Gold) de expressie van afweergenen juist verlaagd. Planten behandeld met Metalaxyl-M zijn dus verhoogd vatbaar voor zowel een infectie met biotrofe-, en necrotrofe pathogenen. Behandeling van de planten met de plantversterker silicium (FertigoSil) leverde geen significante effecten op.

# 4 Kalanchoë

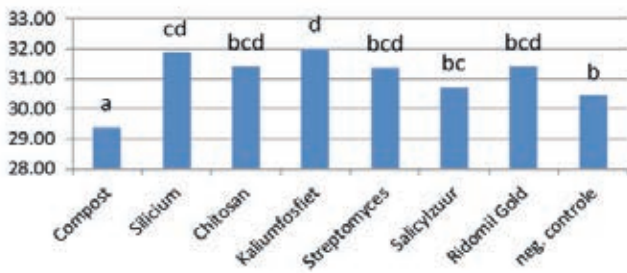
## 4.1 Materiaal en Methode

De cultivar "Leonardo" werd voor de proef gebruikt. Er zijn twee kassen met een oppervlakte van 144 m<sup>2</sup> gebruikt. In elke kas stonden 24 eb-vloed tafels met elk een afzonderlijk eb-vloed systeem met een voedingsbak onder de tafel. De temperatuur werd ingesteld op 20 OC en de RV op 70%. Er werden acht behandelingen ingezet met elke behandeling in drie herhalingen. Op elke tafel stonden 72 planten. Per vier weken werden de voedingsbakken geleegd en opnieuw gevuld met voedingsoplossing. De eerste twaalf dagen na oppotten werd er lange dag gegeven. Dit betekent dat er 18 uur per etmaal werd belicht. Na deze 12 dagen werd er tot het einde van de teelt een korte dag periode aangehouden. In dit stadium van de teelt werd 14 uur licht gegeven en een donkerperiode van 10 uur. Afhankelijk van het teeltstadium en de hoeveelheid instraling in de kas werd er wekelijks 2-3 keer een eb/vloed beurt van 10 minuten gegeven. Tijdens de vegetatieve fase werd een ander voedingsschema aangehouden dan tijdens de generatieve fase (zie bijlage III en IV). Op 4 juli 2013 werden de onbewortelde stekken, afkomstig van Fides, geplant en direct na planten werd de behandeling met *Streptomyces* uitgevoerd. Voor het stekken werden alle potten eerst gebroesd. Drie tafels werden volgezet met potten met een compostmengsel. De compost is afkomstig van Jiffy. Op 15 juli werden er in 1 kas monsters verzameld voor NMR bepaling. Het betrof hier 1 hele plant per tafel. Op 16 juli vond er een natuurlijk stressmoment plaats doordat de planten van korte dag naar lange dag gingen. Op 16 juli zijn ook alle overige behandelingen voor het eerst uitgevoerd. De behandelingen met silicium en Salicylzuur werden wekelijks uitgevoerd. De behandeling met kaliumfosfaat en Ridomil Gold werd alleen nog herhaald toen de eerste symptomen van *Phytophthora* werden gevonden. Op 19 juli werd *Phytophthora* geïnoculeerd in een kas via de onderbakken. Van 19 juli t/m 24 juli werden de planten gestrest door geen water meer te geven. Op het moment dat de planten slap gingen werd een eb/vloed beurt van 15 minuten gegeven. In beide kassen werden op 24 juli monsters verzameld voor NMR analyse. Het betrof hier per tafel 1 jong blad en 1 oud blad. De eerste symptomen van *Phytophthora* werden waargenomen op 6 augustus. Tot 17 september is er wekelijks gescoord op *Phytophthora*. Hierbij werd onderscheid gemaakt tussen het aantal zieke planten en het aantal dode planten. De eindbeoordeling vond plaats op 30 september. Hier werden acht metingen verricht aan tien planten per tafel afkomstig uit de kas waar niet was geïnoculeerd.

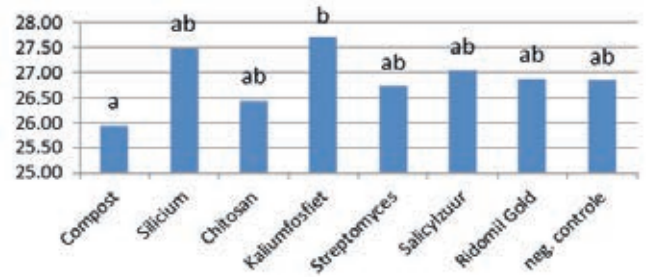
## 4.2 Resultaten

### 4.2.1 Plant parameters

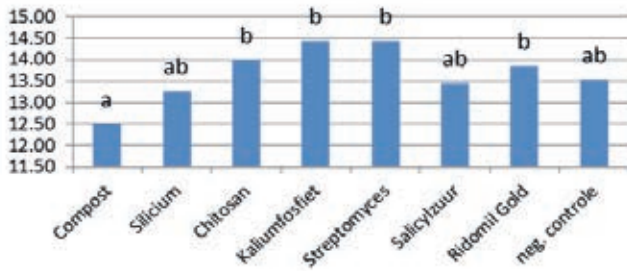
Aan het einde van de proef werden acht metingen verricht aan de planten om een effect van deze middelen te bepalen. Hiervoor werden tien planten per tafel gebruikt. De volgende metingen werden verricht: lengte van de plant, breedte, aantal bloemtakken, vers gewicht van de groene delen, vers gewicht van de bloemen, het bladoppervlak, droog gewicht van de groene delen en het drooggewicht van de bloemen.



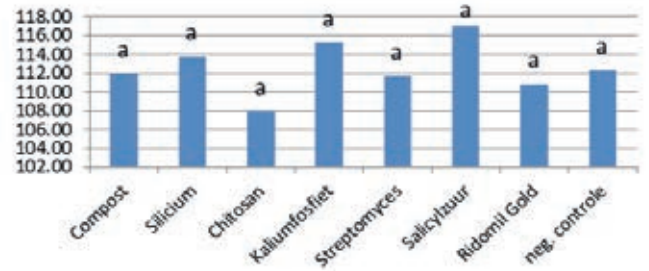
lengte (cm)



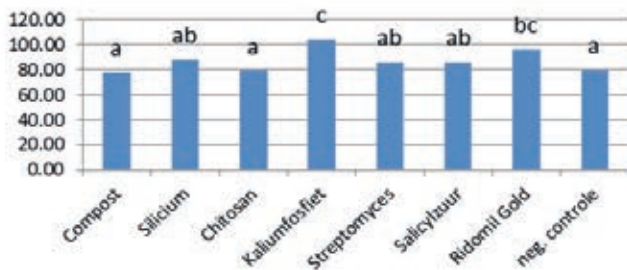
breedte (cm)



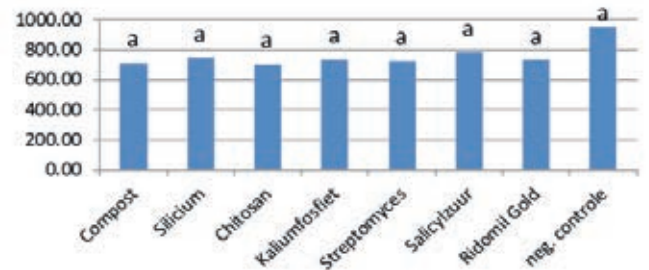
aantal bloemtakken



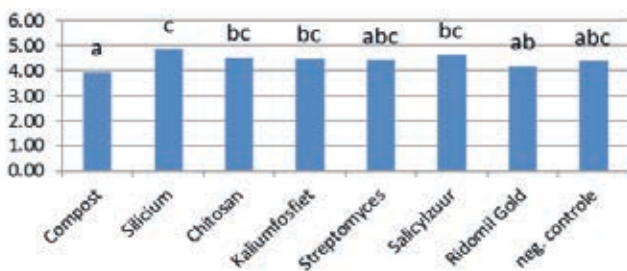
vers gewicht groene delen (gr)



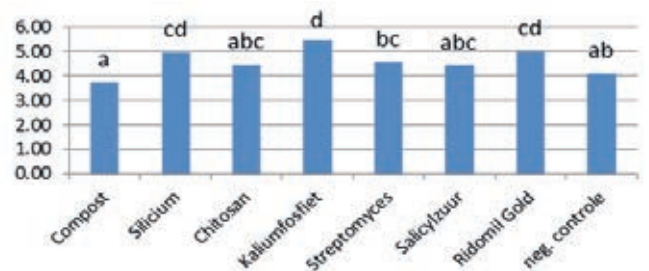
vers gewicht bloem (gr)



bladoppervlakte (cm<sup>2</sup>)



droog gewicht groene delen (gr)



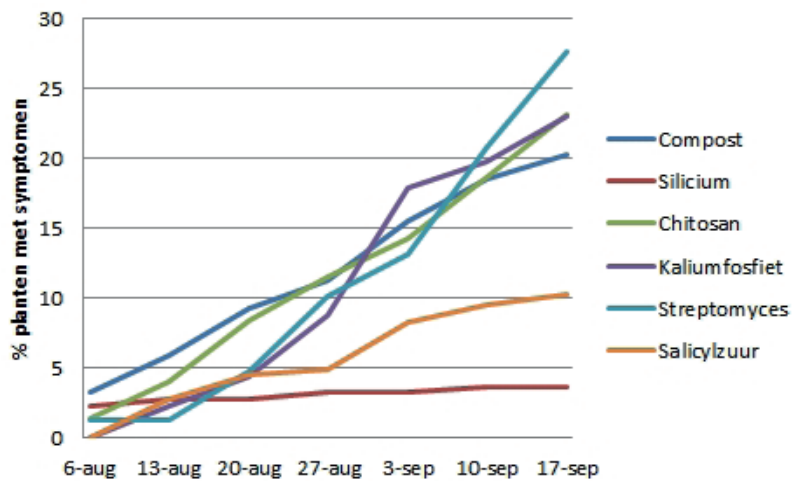
drooggewicht van de bloemen (gr)

**Figuur 6** Overzicht van effecten van de behandelingen op plant parameters van *Kalanchoë* a. lengte, b. breedte, c. aantal bloemtakken, d. vers gewicht groene delen, e. vers gewicht bloem, f. totale bladoppervlak, g. droog gewicht van groene delen en h. droog gewicht van de bloemen. Significant homogene groepen werden bepaald aan de hand van Tukey's b -test.

#### 4.2.2 Effect op *Phytophthora*

De behandelingen met silicium en salicylzuur lieten een vertraging zien in de zichtbare symptomen van *Phytophthora* aan de planten (figuur 7).

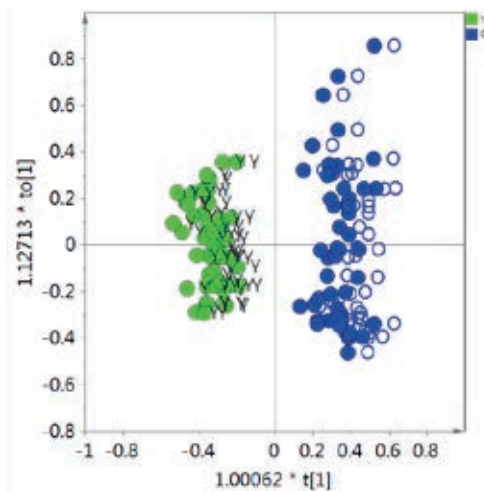




**Figuur 7** Verloop van symptoom ontwikkeling van *Phytophthora* in *Kalanchoë* met zes behandelingen. De onbehandelde controle en Metalaxyl-M (Ridomil Gold) lieten geen symptomen van aantasting met *Phytophthora* zien en zijn niet weergegeven in de grafiek.

#### 4.2.3 Effect op plant inhoud stoffen

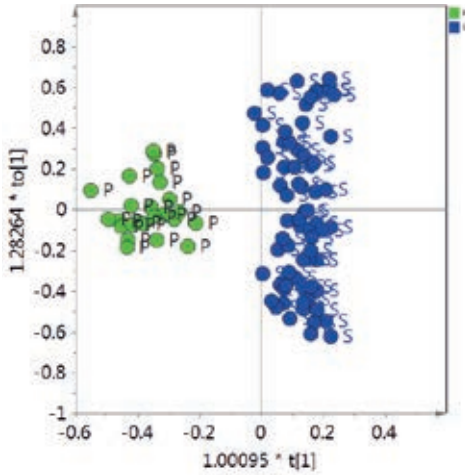
In de proef zijn telkens jonge bladeren bovenin de plant en oudere bladeren onderaan de plant verzameld. Er was een duidelijk effect van leeftijd van het plantweefsel op de samenstelling van de plant inhoud stoffen. Dit betekent dat oudere-, en jongere bladeren en de jonge aanplant erg verschillen qua samenstelling van plantstoffen (Figuur 8). De oudere bladeren bevatte, volgens de NMR analyse, meer appelzuur, citroenzuur, en iso-citroenzuur terwijl de jonge bladeren bovenin de plant meer suikers bevatte.



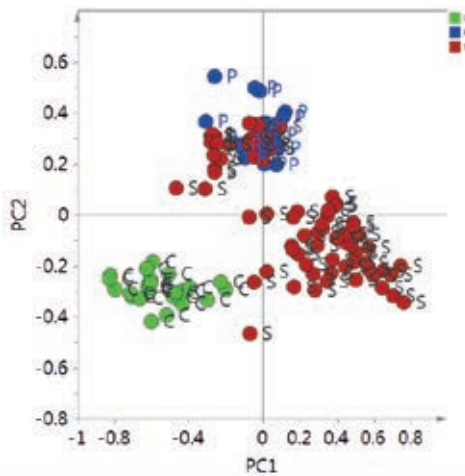
**Figuur 8** OPLS-DA score plot van *Kalanchoë* monsters met oudere bladeren (O; onderaan plant) en jongere bladeren (Y; bovenaan de plant).

Als er rekening gehouden wordt met de verschillende die veroorzaakt worden door de leeftijd van de bladeren (jong vs. oud), dan is er een duidelijk verschil in bladsamenstelling tussen de planten met *Phytophthora* en stress behandeld en de planten die alleen met stress behandeld werden (Figuur 9). Vooral de plant inhoud stoffen glucose-6-fosfaat, Inositol-fosfaat, fructose, threonine, melkzuur, valine, en wat terpenoide verbindingen bevinden zich in de planten die besmet zijn met *Phytophthora*.

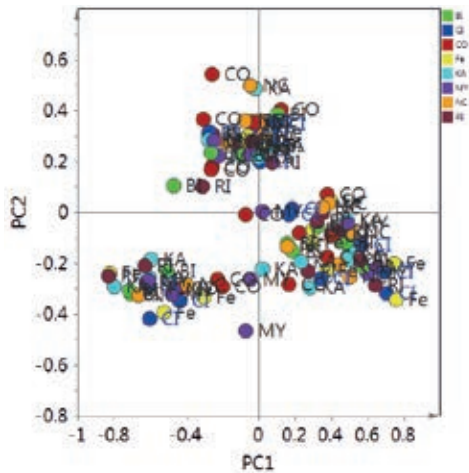
In de stress-behandelde planten, bevinden zich meer citroenzuurcyclus gerelateerde plant inhoud stoffen zoals appelzuur, citroenzuur, isocitroenzuur, asparaginezuur en fructose-6-fosfaat. De citroenzuurcyclus (krebscyclus) is een serie van chemische reacties waarbij energie (ATP, NADH en FAD) wordt vrijgemaakt op basis van de dissimilatie van eiwitten, vetten en suikers tot kooldioxide en water. De citroenzuurcyclus is nauw verbonden met de ABA pathway en dit is in overeenkomst met de verwachting.



**Figuur 9** PCA biplot van Kalanchoë monsters met bladeren van planten die behandeld zijn met *Phytophthora* en omgevingsstress (P) en met omgevingsstress zonder *Phytophthora* (S).



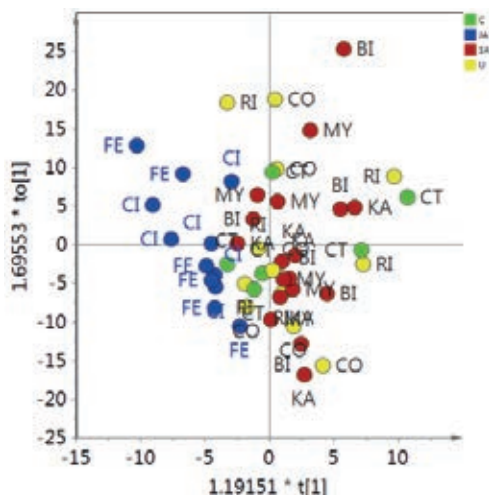
**Figuur 10** PCA biplot van Kalanchoë monsters. C: Controle (analyse o.b.v. jonge aanplant in geheel), en P: *Phytophthora*-behandelde planten en S: Stress-behandelde planten met zowel oude-, als jonge bladeren.



**Figuur 11** PCA biplot van *Kalanchoë monsters*. CO: Compost, FE: Silicium (FertigroSil), CI: Chitosan, KA: Kalifosfiet, MY: *Streptomyces* (Mycostop), BI: Salicylzuur, RI: *Metalaxyl-M* (Ridomil Gold), NC: Negatieve Control

Er is ook een effect te zien op plant inhoud stoffen van omgevings-stress en *Phytophthora* (figuur 9). Maar er is geen duidelijk verschil als er wordt gekeken naar de invloed van de behandelingen op de plant inhoud stoffen (figuur 11: CO: Compost, FE: FertigroSil, CI: Chitosan, KA: Kaliumfosfiet, MY: *Streptomyces* (Mycostop), BI: Salicylzuur, RI: *Metalaxyl-M* (Ridomil Gold), NC: Negatieve Controle).

Na afloop van de proef werden de planten opnieuw onderzocht met behulp van NMR op verschillen in inhoud stoffen in de verschillende behandelingen. Alleen de planten in de kasruimte met de stress werden hiervoor gebruikt. De planten in de kas met de ziekte waren teveel aangetast en konden niet gebruikt worden voor een tweede NMR analyse. Voor deze studie werden de monsters ingedeeld naar de te verwachte werking (zie tabel 2), namelijk de salicylzuur route of de jasmonzuur route. Opvallend is dat chitine en de silicium behandeling een effect laten zien. van beide wordt verwacht dat ze een effect hebben op de salicylzuur route. De monsters wijken vooral af door een initiële toename van sucrose, n-acetylaspartaat, threonine en lactaat, en vervolgens naar het einde van de teelt, curcibitacine, malaat en lipiden. Er is een groot verschil tussen jonge en oude bladeren.



**Figuur 11** OPLS-DA score analyse van *Kalanchoë monsters* aan het einde van de teelt. CO: Compost, FE: Silicium (FertigroSil), CI: Chitosan, KA: Kalifosfiet, MY: *Streptomyces* (Mycostop), BI: Salicylzuur, RI: *Metalaxyl-M* (Ridomil Gold), NC: Negatieve Control. De kleuren geven aan. De kleuren geven de te verwachte werking aan, namelijk C=controle, JA=jasmonzuur route, SA=salicylzuur route, U=onbekend.

## 4.3 Conclusie en discussie

Er is een duidelijk effect zichtbaar op plant inhoud stoffen door *Phytophthora*. Pas aan het einde van de proef wordt een effect gezien op plantinhoudstoffen bij *Kalanchoë* bij de behandelingen met chitine en silicium. Alleen silicium laat een duidelijke onderdrukking zien van de symptomen van *Phytophthora*.

Vooral de plant inhoud stoffen Glucose-6-fosfaat, Inositol-fosfaat, fructose, threonine, melkzuur, valine, en wat terpenoide verbindingen bevinden zich in de planten die besmet zijn met *Phytophthora*. In de stress-behandelde planten, bevinden zich meer citroenzuurcyclus gerelateerde plant inhoud stoffen zoals appelzuur, citroenzuur, isocitroenzuur, asparaginezuur en fructose-6-fosfaat. De citroenzuurcyclus (krebscyclus) is een serie van chemische reacties waarbij energie (ATP, NADH en FAD) wordt vrijgemaakt op basis van de dissimilatie van eiwitten, vetten en suikers tot kooldioxide en water. De citroenzuurcyclus is nauw verbonden met de ABA pathway.

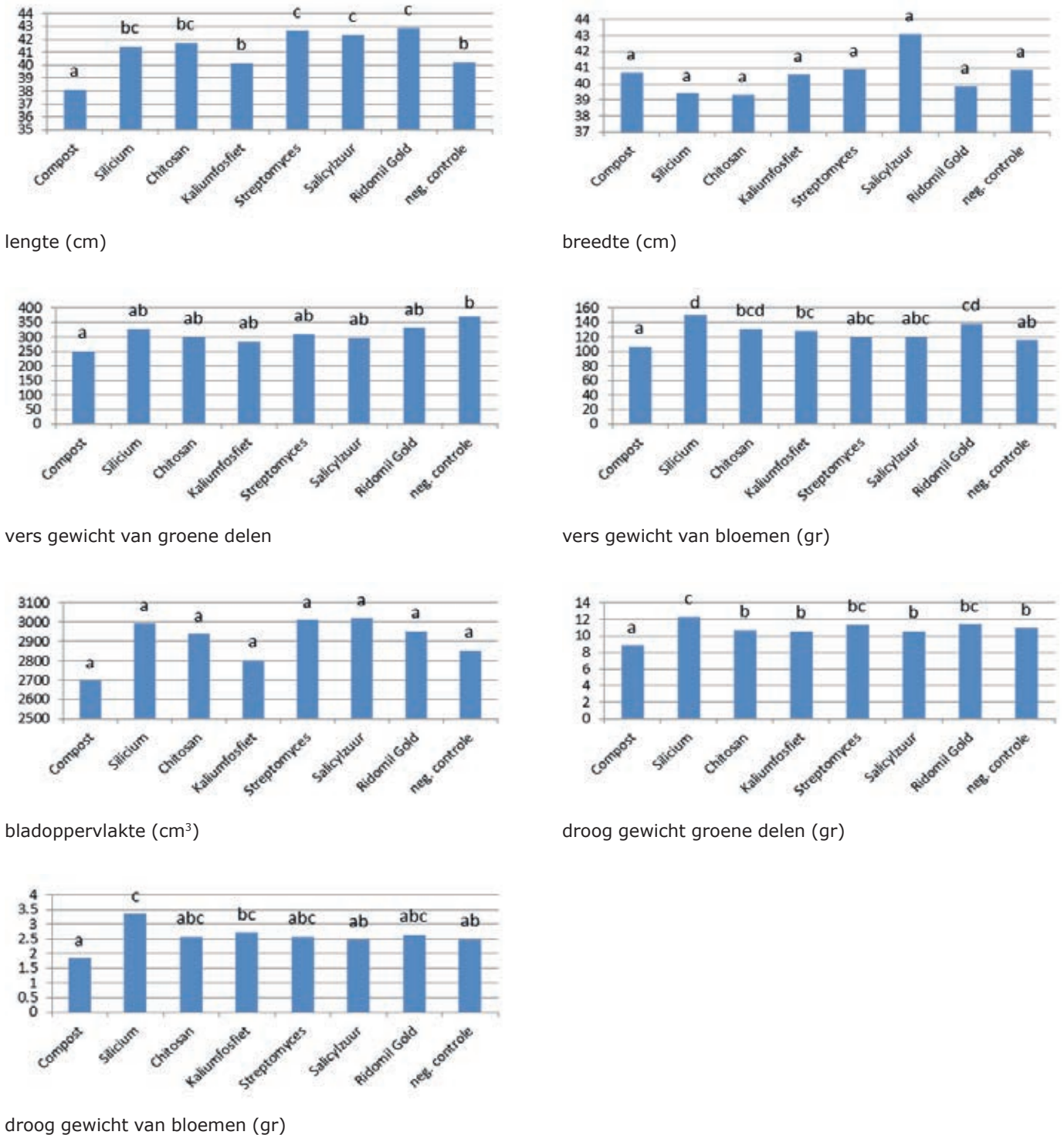
# 5 Begonia

## 5.1 Materiaal en Methode

De cultivar "White Netja" werd voor de proef gebruikt. Er zijn twee kassen met een oppervlakte van 144 m<sup>2</sup> gebruikt. In elke kas stonden 24 eb-vloed tafels met elk een afzonderlijk eb-vloed systeem met een voedingsbak onder de tafel. Er werden acht behandelingen ingezet met elke behandeling in drie herhalingen. Op elke tafel stonden 40 planten. Per vier weken werden de voedingsbakken geleegd en opnieuw gevuld met voedingsoplossing. Gedurende de hele teelt werd 16 uur licht gegeven. Afhankelijk van het teeltstadium en de hoeveelheid instraling in de kas werd er wekelijks 2-3 keer een eb/vloed beurt van 10 minuten gegeven. Tijdens de vegetatieve fase werd een ander voedingsschema aangehouden dan tijdens de generatieve fase (zie bijlage V). Op 1 oktober 2013 werden de onbewortelde stekken, afkomstig van Koppe, beworteld onder plastic folie. De behandeling met *Streptomyces* werd in de stek tray uitgevoerd. Drie weken later (21 oktober 2013) was de stek beworteld en werden ze opgepot. Drie tafels werden volgezet met potten met een compostmengsel. De compost is afkomstig van Jiffy. Op dezelfde dag zijn ook alle overige behandelingen voor het eerst uitgevoerd. De behandelingen met silicium, kaliumfosfaat en Salicylzuur werden wekelijks uitgevoerd. De behandeling met Metalaxyl-M (Ridomil Gold) werd alleen nog herhaald toen de eerste symptomen van *Phytophthora* werden gevonden. Op 12 december 2013 werden er in 1 kas monsters verzameld voor NMR bepaling. Het betrof hier een oud en een jong blad van een plant per tafel. Op 13 december werd *Fusarium* geïnoculeerd in 1 kas via de onderbakken. Van 3 januari t/m 8 januari werden de planten gestrest door geen water meer te geven. Op het moment dat de planten slap gingen werd een eb/vloed beurt van 15 minuten gegeven. In beide kassen werden op 8 januari monsters verzameld voor NMR analyse. Het betrof hier per tafel 1 jong blad en 1 oud blad. De eerste symptomen van *Fusarium* werden waargenomen op 9 januari 2014. Tot 6 februari is er wekelijks gescoord op *Fusarium*. Hierbij werd onderscheid gemaakt tussen het aantal planten met verkleurde bladeren, het aantal planten met voetrot en het aantal dode planten. De eindbeoordeling vond plaats op 3 februari 2014. Hier werden acht metingen verricht aan tien planten per tafel afkomstig uit de kas waar niet is geïnoculeerd.

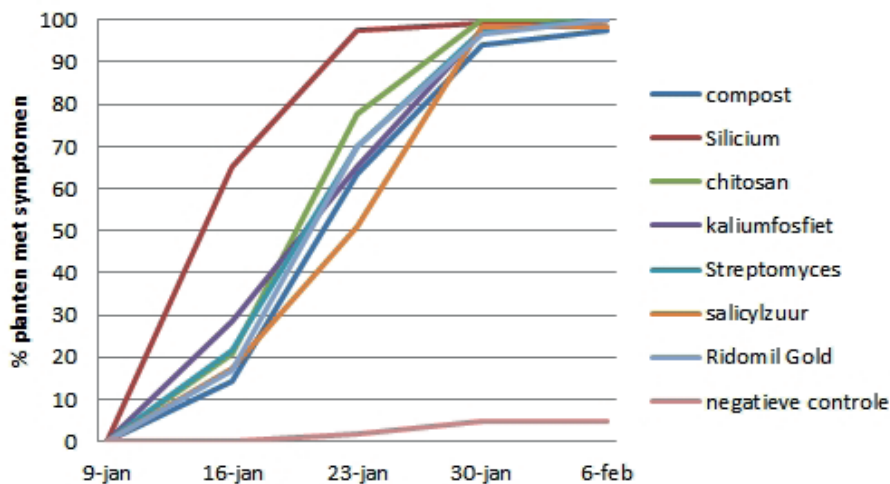
## 5.2 Resultaten

### 5.2.1 Plant parameters



**Figuur 12** Overzicht van effecten van de behandelingen op plant parameters van *Begonia*. a. lengte, b. breedte, c. aantal bloemtakken, d. vers gewicht groene delen, e. vers gewicht bloem, f. totale bladoppervlakte, g. droog gewicht van groene delen en h. droog gewicht van de bloemen. Significant homogene groepen werden bepaald aan de hand van Tukey's b -test.

### 5.2.2 Effect op *Fusarium foetens*

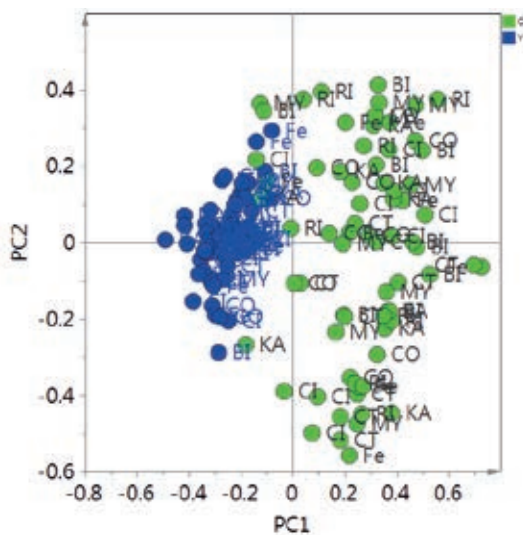


**Figuur 13** Verloop van symptoom ontwikkeling van *Fusarium* in *Begonia* met zes biostimulanten, Ridomil Gold en een negatieve controle.

### 5.2.3 Effect op plant inhoud stoffen

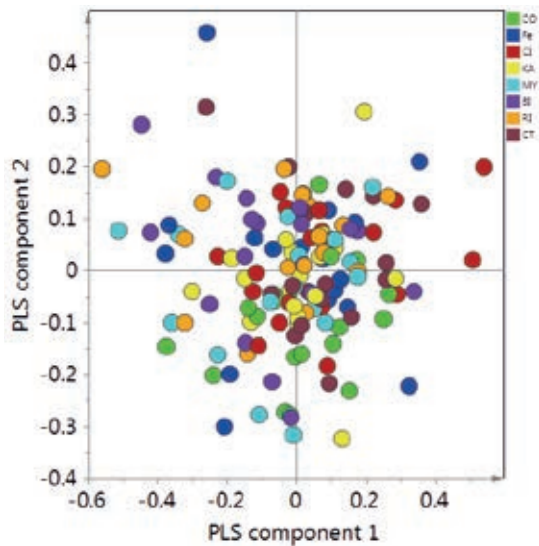
Bladeren vande de Begoniaplanten behandeld met de verschillende plantenversterkers zijn geanalyseerd via NMR.

In de jonge bladeren wordt meer glucose, appelzuur-achtige structuren en fenolen zoals procyanidine, tenatine, -linoleen -achtige vetzuren, en cyanidine -achtige structuren aangetroffen. In de oude bladeren wordt meer curcubitacine en fructose en GTP aangetroffen (Figuur).

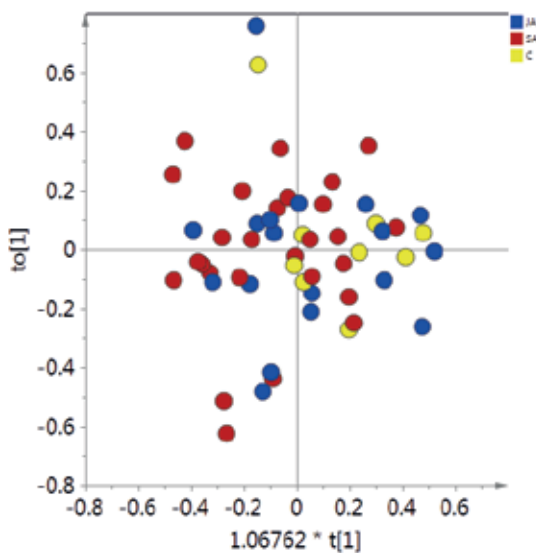


**Figuur 14** PCA biplot van *Begonia* monsters met oudere bladeren (O; onderaan plant) en jongere bladeren (Y; bovenaan de plant).

Er is geen effect te zien op plant inhoud stoffen van omgevings-stress en *Phytophthora*, alleen een verschil tussen jonge en oude bladeren (figuur 14). Er is ook geen duidelijk verschil als er wordt gekeken naar de invloed van de behandelingen op de plant inhoud stoffen (figuur 15: CO: Compost, FE: FertigroSil, CI: Chitosan, KA: Kaliumfosfiet, MY: *Streptomyces* (Mycostop), BI: Salicylzuur, RI: Metalaxyl-M (Ridomil Gold), NC: Negatieve Controle).



**Figuur 15** PLS-DA score plot van *Kalanchoë monsters*. CO: Compost, FE: *Silicium* (FertigroSil), CI: Chitosan, KA: Kalifosfiet, MY: *Streptomyces* (Mycostop), BI: Salicylzuur, RI: Metalaxyl-M (Ridomil Gold), NC: Negatieve Control



**Figuur 16** OPLS-DA score analyse van *Begonia monsters* na het toedienen van stress en *Fusarium*. De kleuren geven de te verwachte werking aan, namelijk C=controle, JA=jasmonzuur route, SA=salicylzuur route.

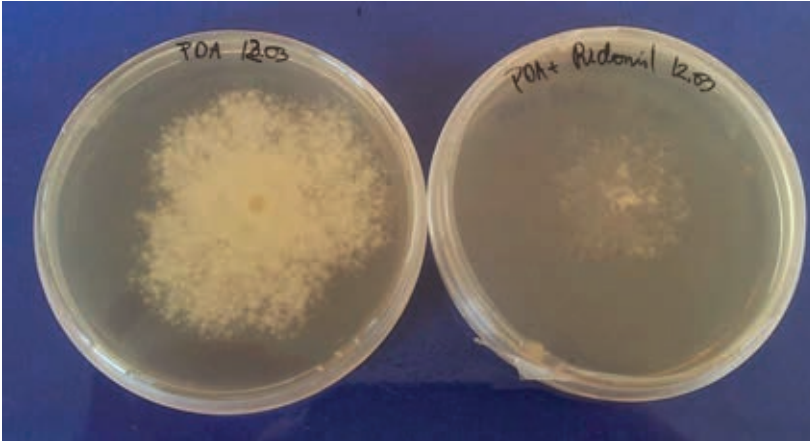
#### 5.2.4 Conclusie en discussie

In tegenstelling tot de praktijkproef *Kalanchoë* met *Phytophthora* is er bij *Begonia* geen enkele plantversterker in staat om de ziekteverschijnselen na infectie met *Fusarium foetens* significant te onderdrukken. De symptomen in planten ontwikkelt zich plots en zeer snel. Dit wordt ook in de praktijk gezien. Op het moment dat *Fusarium* gaat sporuleren in de plant wordt de besmetting en daarna de symptoom ontwikkeling nog eens versneld. Hierdoor werden zelfs de planten op andere tafels van de onbesmette (negatieve) controle besmet (figuur 13).



## 6 Duoplate technieken en directe toxiciteit

Om een indruk te krijgen of er sprake is van een directe werking van biostimulanten zijn er ook Duoplate technieken uitgevoerd. Hierbij wordt de plant pathogene schimmel *Phytophthora* of *Fusarium* op een agarplaat geplaatst. De biostimulant wordt door de agar gemengd. Bij een organisme, zoals *Streptomyces*, wordt het organisme samen met de plant pathogene schimmel op de agar geplaatst. Als er sprake is van een verminderde groei van de plant pathogene schimmel ten opzichte van de controle, dan wordt dat veroorzaakt door de biostimulant.



**Figuur 17** Twee PDA agar petrischalen met daarop links *Phytophthora* en rechts *Phytophthora* met Ridomil Gold.

Er zijn een aantal manieren waarmee een biostimulant een directe werking (niet via de plant) kan hebben op de plant pathogene schimmel: 1. Door een voor de plant pathogene schimmel toxische stof (dit diffundeert door de agar). 2. Door competitie voor nutriënten in de agar. Dit manifesteert zich door een groeiremming in de zone waar de biostimulant en de plant pathogene schimmel elkaar treffen.

Bij *Phytophthora* was er een duidelijke groei remming zichtbaar door *Streptomyces* en Ridomil (tabel 6). In mindere mate was er een effect te zien van salicylzuur.

Tabel 6

Overzicht van de resultaten Duoplate *Phytophthora capsici*.

Behandeling	Vershil in groei ten opzichte van onbehandelde controle (controle=100%)
<i>Phytophthora nicotianae</i>	
silicium	105.44
chitosan	90.09
kaliumfosfiet	99.01
Streptomyces	40.09
Salicylzuur*	82.17
Ridomil Gold*	53.46

\*Bij salicylzuur en Ridomil Gold groeit *Phytophthora* verder maar vormt heel dun mycelium

Bij *Fusarium* was er met de Duoplate techniek een duidelijke remming te zien van de groei door toedoen van de biostimulant *Streptomyces* (tabel 7).

Tabel 7

Overzicht van de resultaten Duoplate *Fusarium foetens* soorten (694 en 754) met percentage groei ten opzichte van de controle (100%)

Behandeling	Verschil in groei ten opzichte van onbehandelde controle (controle=100%)	
	<i>Fusarium foetens</i> 694	<i>Fusarium foetens</i> 754
silicium	104.78	107.40
chitosan	91.86	122.22
kaliumfosfiet	103.82	102.46
Streptomyces	40.19	33.95
Salicylzuur	97.61	126.54
Ridomil Gold	109.09	108.64

In de teeltproeven lieten alleen de salicylzuur en silicium een effect zien op *Phytophthora* in Kalanchoë. Aangezien er geen direct effect werd gezien op de petrischaal is een indirect effect via plantversterking waarschijnlijk.

## 7 Conclusie en discussie

Dat planten ziek kunnen worden door stress is bekend. Bij een verminderde weerbaarheid, zoals in de stek fase, de overgang van vegetatief naar generatief of gewoon door de klimaatomstandigheden, krijgen schimmels en bacteriën eerder de kans met uitval of beschadiging als gevolg. Door 'plantversterkers' toe te voegen, kunnen planten zich beter weren tegen aanvallen van buitenaf. Maar welke middelen werken nu echt en hoe?

Het idee achter plantversterkers is dat ze de plant triggeren aanzetten tot de aanmaak van bepaalde stoffen. Ze zouden kunnen dit doen door genen te activeren die verantwoordelijk zijn voor het aanschakelen van het plantafweersysteem. In theorie zijn daarvoor drie klassieke routes bekend: de jasmonzuurroute, de salicylzuurroute of een combinatie van deze twee. In dat geval is de plant hemi-autotroof.

Als een ziekteverwekker van dood materiaal leeft (necrotroof), zoals *Fusarium foetens*, en *Botrytis*, verdedigt de plant zich met de jasmonzuurroute. Leeft de ziekteverwekker van levende cellen, zoals valse- of echte meeldauw, bacteriën en virussen, dan schakelt de plant de salicylzuurroute aan om zich te verdedigen.

Ziekteverwekkers kunnen ook beginnen als biotroof en na een korte periode van bijvoorbeeld een dag overschakelen naar necrotroof. Een voorbeeld daarvan is *Phytophthora capsici* in *Arabidopsis*. Of datzelfde geldt voor *Phytophthora nicotianae* in *Kalanchoë* is onduidelijk. Daarnaast kan een stof als silicium ook zelf nog een effect hebben door een 'schild' op in de bladeren te vormen. Dat betekent wel dat het continue nodig blijft om deze stof toe te dienen omdat eenmaal opgenomen in het bladweefsel, het silicium niet meer verplaatst kan worden en dus steeds meer van deze stof nodig is bij de groei van de plant.

### 7.1 Acht plantversterkers

In het onderzoek 'Plantversterking van Potplanten' zijn er twee gewassen in een kasproef bekeken: Begonia White Netja en Kalanchoë Leonardo. Bij Kalanchoë testten ze de weerbaarheid tegen *Phytophthora nicotianae* en bij Begonia tegen *Fusarium foetens*. Beide ziekten komen regelmatig voor in de praktijk en zijn lastig chemisch te bestrijden. Vooral tegen *Fusarium* zijn geen middelen toegelaten. Er zijn acht plantversterkers geselecteerd, waarvan een aantal de salicylzuur-, of jasmonzuurroute aanschakelt of op andere wijze versterkend werken: Compost die ook gebruikt werd op diverse praktijk bedrijven, Silicium, Chitosan, Kaliumfosfiet, *Streptomyces*, Salicylzuur, Metalaxyl-M (Ridomil Gold) en positieve en negatieve controle. In de kasproef hebben ze uitwendig beoordeeld wat het effect is van deze middelen op de planten. Parallel daaraan is gekeken naar het effect van de middelen op de ziekteverwekkers door ze direct toe te dienen aan de ziekteverwekkers op een petrischaal.

### 7.2 Kasproefresultaten

Er zijn twee kassen met ieder 24 onafhankelijke eb-vloedtafels gebruikt. De planten krijgen stress toegediend in de vorm van droogte: vijf dagen geen water. Daarnaast krijgen ze stress door het in bloei trekken. In de ene kas krijgen de planten alleen stress, in de andere krijgen ze ook nog een ziekteverwekker toegediend.

De proef leverde direct informatie op over de werkzaamheid van de plantversterkers. Silicium gaf onverwacht een goed onderdrukking van *Phytophthora* in Kalanchoë, maar maakte Begonia juist vatbaar voor *Fusarium*. Kalifosfaat werkt in de praktijk goed tegen *Phytophthora*, maar werkt hier minder goed omdat het alleen bij aanvang is toegepast. Tegen *Fusarium* in Begonia werkt het niet. Daar werd Kalifosfiet wel wekelijks toegediend. Bij Kalanchoë werd een effect gezien op lengte door Silicium en Kalifosfiet, op vers gewicht en droog gewicht van de bloem door Kalifosfiet en droog gewicht door Silicium, kaliumfosfiet en Metalaxyl-M. Bij Begonia werd een effect gezien op lengte door Compost, *Streptomyces* en Salicylzuur, en door Compost op vers gewicht van de plant, op vers gewicht van de bloemen door Silicium en Metalaxyl-M en van Silicium en Compost op drooggewicht van de plant en droog gewicht van de bloemen (tabel 8.).

Tabel 8

**Overzicht van effecten van plantversterkers op de fysiologie van de plant.**

<b>Kalanchoe</b>	compost	silicium	chitosan	kaliumfos.	Strept.	salyc.	Ridomil	controle
Lengte	-	+		+				
breedte								
# bloemtakken								
versgew.								
versgew. bloem				+				
bladopp.								
drooggew.								
drooggew. Bloem		+		+			+	
<b>Begonia</b>								
	compost	silicium	chitosan	kaliumfos.	Strept.	salyc.	Ridomil	controle
Lengte	-				+	+	+	
breedte								
# bloemtakken								
versgew.	-							
versgew. bloem		+					+	
bladopp.								
drooggew.	-	+						
drooggew. bloem		+						
*tov de controle onder stress								

### 7.3 Model plant *Arabidopsis*

De onderzoekers willen ook het mechanisme zien van de plantreactie en een meetmethode ontwikkelen om te kunnen toetsen of de plant door de behandeling inderdaad weerbaarder wordt. Door plantversterkers toe te dienen aan planten, ontwikkelen ze weerstand tegen bepaalde ziekteverwekkers. Als er een ziekte voorbij komt, staan ze op stand-by. Stap een is bekijken welke genen erbij betrokken zijn en hoe snel. Naar verwachting is dit binnen 24 uur vertaald op gen niveau. Om op gen niveau te kijken, werd het modelgewas *Arabidopsis* (zandraket). Gebruikt. Van deze modelplant zijn alle genen bekend. Er werd bestudeerd welke genen door stress en plantversterkers werden aangeschakeld. In de proef zijn de plantjes eerst behandeld met plantversterker en vervolgens blootgesteld aan een ziekteverwekker. Uit de proef blijkt dat chitosan de genexpressie van de salicylzuurroute verhoogt in zandraket en dit werkt tegen *Phytophthora*. Salicylzuur verhoogt de genexpressie van de genen die bij de jasmonzuurroute zijn betrokken en dit werkt tegen Botrytis. Dit klopt met de resultaten van de potplantenproef. De planten die behandeld zijn met Salicylzuur en Chitosan zijn minder vatbaar.

### 7.4 Directe toxiciteit toets

In een directe toxiciteit toets op agarplaten, waarop zowel de plant pathogene schimmel als de plantversterker met elkaar in contact werd gebracht, liet alleen *Streptomyces* een directe werking zien tegen zowel *Phytophthora* als *Fusarium*. Salicylzuur liet alleen een directe werking zien tegen *Phytophthora*. Dit effect werd echter niet gevonden in de praktijktoets. Waarom *Streptomyces* geen effect liet zien in de teelt proeven is onbekend. Mogelijk is de pot niet een optimale omgeving voor vestiging en werking van *Streptomyces*. Het chemische middel Metalaxyl-M heeft een direct effect tegen *Phytophthora*, maar niet tegen *Fusarium foetens* zoals verwacht. Opvallend is dat dit middel de uitgroei van *Phytophthora* niet geheel tegen gaat, maar dat de mycelium draden erg dun worden.

## 7.5 NMR

Met de NMR-techniek werd gekeken naar de vorming van inhoudsstoffen in oude en jonge bladeren uit de kasproef met begonia en Kalanchoë als gevolg van toegediende plantversterkers. De bladeren uit de kasproef zijn gelijk bevroren in vloeibaar stikstof en geanalyseerd met behulp van de NMR-technologie om te zien of er metaboliëten in zitten. In de resultaten lijkt het erop dat de plantversterkers die gericht zijn op het aanschakelen van de salicylzuurroute verdediging route, de hoeveelheid flavonoïden in het blad worden verhoogd, terwijl bij de jasmonzuur route, een andere groep, de steroïden, verhoogt wordt. Maar de verschillen zijn erg klein. Omdat silicium een sterk effect had op *Phytophthora* uitval in Kalanchoë en dit zichtbaar werd in de plantinhoudstoffen, en silicium geen directe toxiciteit gaf, kan voorzichtig geconcludeerd worden dat de werking via de plant plaats vond. Chitosan gaf ook een vergelijkbaar effect op plantinhoudstoffen in Kalanchoë, zoals gedetecteerd met NMR, en Chitosan gaf geen duidelijke onderdrukking van *Phytophthora* in de teelt, dus er zijn ook andere factoren. Mogelijk vind er een extra plant reactie plaats bij het gebruik van Silicium, zoals het versterken van celwanden, dat een verschil kan maken. Ook kan Silicium een effect hebben op het wortelmilieu, zoals een effect op de zuurgraad of microbiologie, waardoor *Phytophthora* al in een vroeg stadium is uitgeschakeld.

## 7.6 Meer kennis nodig

In ieder geval hebben Silicium, Chitosan en Salicylzuur een plantversterkend effect. Maar het inzetten van plantversterkers vraagt veel meer kennis van de telers dan de 'gemakkelijke' oplossing van de chemie. De werking van een plantversterker hangt af van factoren als het substraat, de cultivar en het ziektebeeld. Daar tegenover staat dat chemische middelen de plant kunnen verzwakken. Uit metingen op gen niveau van *Arabidopsis* blijkt bijvoorbeeld dat de 'stressgenen' van de plant aangaan en de verdediging genen worden platgelegd als het middel Metalaxyl-M wordt gebruikt. Daarmee werkt het dit middel dus juist plant verzwakkend. Het is onbekend in hoeverre dit met chemische middelen het geval is en of dat ook zo is in de teelt met tuinbouw gewassen.

## 7.7 Samenvattend

Bij een verminderde weerstand kunnen planten ziek worden. Er werden zes plantversterkers onderzocht óf ze werken in de gewassen begonia en Kalanchoë. Daarnaast bekeken ze aan het model gewas zandraket of plantversterkers ervoor zorgen dat er genen worden aangeschakeld die afweerstoffen vormen tegen indringers. Salicylzuur en Chitosan blijken dit inderdaad te doen in de zandraketen dit past in het verhaal van de kasproeven met begonia en Kalanchoë. In de teeltproeven lieten alleen de Salicylzuur en Silicium een effect zien op *Phytophthora* in Kalanchoë. Aangezien er geen direct effect werd gezien op de petrischaal is een indirect effect via plantversterking waarschijnlijk. Dit wordt ondersteund door de plantinhoudstoffen analyses met behulp van de NMR techniek: bij toediening van Silicium en Chitosan in Kalanchoë worden inderdaad effecten op plantinhoudstoffen samenstelling gezien.

Om te testen of plant versterkers inderdaad de plantweerbaarheid verhogen zijn verschillende zijn verschillende methodes beschikbaar die op verschillende niveaus werken. Met de modelplant *Arabidopsis* kan het effect al op het aller vroegste stadium van de inductie van plantweerbaarheid worden bestudeerd. De genen die betrokken zijn bij de verschillende routes die leiden tot plantweerbaarheid zijn in kaart gebracht waardoor het effect van plantversterkers op de expressie van deze genen kan worden gemeten. Indien op individueel gen niveau wordt beoordeeld lijken Salicylzuur, Silicium en Chitosan inderdaad een verhoogde expressie van een aantal van de geselecteerde genen te induceren wat duidt op een geïnduceerd afweermecanisme. Echter door de gekozen experimentele opzet kan dit onvoldoende statistisch worden onderbouwd. Daarom is gekozen om het effect op de totale set genen betrokken bij ofwel de SA route, ofwel de JA route ofwel de Ethyleenroute te meten. Hierbij blijkt dat Chitosan na infectie met *Phytophthora* een verhoogde expressie t.o.v. de controle laat zien van genen betrokken bij de SA route (in eerste instantie) en later ook bij de JA route. Dit komt omdat *Phytophthora capsici* een hemibiotrofe levensstijl heeft waarbij een biotrofe levensfase (SA route) gevolgd wordt door een necrotrofe fase (JA route). Dit komt overeen met de verminderde ziekteverschijnselen die bij Chitosan behandelde planten werd waargenomen na *Phytophthora* infectie. *Fusarium* is een schimmel met een uitgesproken biotrofe levensstijl.

Behandeling van de planten met Salicylzuur had juist effect op de genen betrokken bij de JA en Ethyleen route. Dit was onverwacht omdat met Salicylzuur juist een effect zou verwachten op de expressie van genen uit de SA route. Er was een duidelijke verhoging van de expressie LOX2 en AOS genen. Deze genen zijn betrokken bij de octadecanoid biosynthese waar JA een rol in speelt. Het feit dat Salicylzuur juist de expressie van genen uit de JA route wordt verhoogd is in overeenstemming met de waarneming dat planten behandeld met Salicylzuur minder gevoelig zijn voor infectie met necrotrofe schimmel *Botrytis cinerea*. Ook in de praktijkproef waarbij Kalanchoë planten zijn behandeld met Salicylzuur zien we minder uitval na blootstelling van de planten aan *Phytophthora* in vergelijking met andere getoetste plantversterkers. Alleen Silicium scoorde in de praktijkproef met Kalanchoë-planten nog beter, maar Silicium had geen meetbaar effect op expressie niveau van de onderzochte genen in *Arabidopsis*. Op basis van de gemeten plantparameters waren er na behandeling met Salicylzuur geen significante afwijkingen ten opzicht van de controle planten.

Metalaxyl-M is als chemische referentie meegenomen. Van dit middel is het bekend dat het direct en systemisch pathogenen doodt. Uit de experimenten met *Arabidopsis* waarin naar het effect op genexpressie werd gekeken nog wel een opvallende conclusie worden getrokken. Behandeling van de planten met Metalaxyl-M onderdrukt juist de expressie van genen betrokken van de verschillende afweerroutes. Dit kwam ook tot uiting in de verhoogde vatbaarheid van de planten voor *Botrytis* en *Phytophthora*. Hoewel Metalaxyl-M een pathogeen dodend effect heeft lijkt het er op dat het ook een ongewenst bijeffect heeft waarbij het de natuurlijke plantweerbaarheid van de planten juist verzwakt.

## 8 Dank

Dit rapport is tot stand gekomen dankzij een groot aantal collega's binnen Wageningen UR, en Fytagoras B.V. Daarnaast bedanken wij Gerard van den Broek, Arthur van den Berg (LTO) en de BCO voor de teelt begeleiding en Marcel Lieferink voor compost behandelingen. De NMR analyse werd gerealiseerd dankzij dr. Young Hae Choi, Natural Products Laboratory, Institute of Biology, Leiden University, Leiden.





## 9 Referenties

Korthout 2012

PT rapport "Plantenstoffen en Plantweerbaarheid" rapportnummer: 14761.01.

Matthes MC1, Bruce TJ, Ton J, Verrier PJ, Pickett JA, Napier JA (2010)

The transcriptome of cis-jasmone-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence. *Planta* 232(5):1163-80.

Wurff, A.W.G. van der, Chris Blok, Jan Janse, Gerben Messelink, Jantineke Hofland-Zijlstra, Steven Driever, Marieke van der Staaij, Joeke Postma, Jos Wubben, Jaap Bij de Vaate, Wessel Holtman, Berry Oppedijk (2011)

Weerbaar substraat: Opstellen matrix – bouwstenen voor weerbaar telen. Rapport GTB-1119.

Wurff, A.W.G. van der, Chris Blok, Jan Janse, Gerben Messelink, Jantineke Hofland-Zijlstra, Steven Driever, Marieke van der Staaij, Joeke Postma, Jos Wubben, Jaap Bij de Vaate, Wessel Holtman, Berry Oppedijk (2014)

Weerbaar Substraat: Praktijkproeven Ontwikkeling toets methodiek en eerste toetsing op gewasschade van tien concepten bij tomaat, komkommer en gerbera. Praktijkproeven. Rapport GTB-1285.



# 10 Publicaties en presentaties

Arkesteijn, M. (2014)

Inzetten van Plantversterkers vraagt om meer kennis. *Onder glas*, 5, pagina 66-67.

Staij, M. van der; Streminska, M.A. ; Noort, F.R. van; Wurff, A.W.G. van der (2013 )

Plantversterking Potplanten (PPP) Fundamenten voor bepalen effectiviteit plantversterkers.

Roelofarendsveen : presentatie bij LTO Groeiservice Plantgezondheidsdag, 2013-12-04.

Streminska, M.A., F. van Noort, M.A. van Slooten, H. Korthout, W. Holtman, A.W.G. van der Wurff (2014)

Decreasing pot plants susceptibility to disease by application of biostimulants. Abstract voor conferentie van European Foundation for Plant Pathology, Krakau Polen.

Streminska, M.A., A.W.G. van der Wurff (2014)

Inzet van biostimulanten binnen de context van optimale bodem- en substraatweerbaarheid. Arenasessie: Weerbaar Telen, GreenQ, 2 Oktober, Bleiswijk.

Wurff, A.W.G. van der; Noort, F.R. van; Slooten, M.A. van; Streminska, M.A. (2013)

Plantversterking Potplanten. Bleiswijk : Informatiebijeenkomst Bromelia (georg. door Wageningen UR Glastuinbouw i.s.m. Flora Holland en LTO Groeiservice), 2013-11-14



## Bijlage 1. Overzicht van plant metingen aan Kalanchoe

		behandeling	n	Gem.	Std. dev.
lengte (cm)	1	Compost	30	29.38	1.31
	2	Silicium	30	31.88	1.81
	3	Chitosan	30	31.40	1.48
	4	Kaliumfosfiet	30	32.00	1.95
	5	Streptomyces	30	31.37	1.67
	6	Salicylzuur	30	30.73	1.35
	7	Ridomil Gold	30	31.42	1.27
	8	neg. controle	30	30.43	1.31
breedte (cm)	1	Compost	30	25.95	1.84
	2	Silicium	30	27.50	2.24
	3	Chitosan	30	26.45	1.81
	4	Kaliumfosfiet	30	27.72	2.06
	5	Streptomyces	30	26.73	2.25
	6	Salicylzuur	30	27.05	1.67
	7	Ridomil Gold	30	26.88	2.26
	8	neg. controle	30	26.85	2.37
nr_bloemtakken	1	Compost	30	12.50	1.85
	2	Silicium	30	13.27	1.34
	3	Chitosan	30	14.00	1.31
	4	Kaliumfosfiet	30	14.43	1.50
	5	Streptomyces	30	14.43	1.19
	6	Salicylzuur	30	13.47	2.08
	7	Ridomil Gold	30	13.87	1.31
	8	neg. controle	30	13.53	1.33
versgewichtgroen (gr)	1	Compost	30	111.90	8.95
	2	Silicium	30	113.78	8.50
	3	Chitosan	30	107.98	10.95
	4	Kaliumfosfiet	30	115.27	17.41
	5	Streptomyces	30	111.66	9.75
	6	Salicylzuur	30	117.07	13.83
	7	Ridomil Gold	30	110.82	11.99
	8	neg. controle	30	112.28	9.46
versgewichtbloem (gr)	1	Compost	30	78.34	20.90
	2	Silicium	30	87.91	19.63
	3	Chitosan	30	79.49	15.97
	4	Kaliumfosfiet	30	104.83	19.09

		behandeling	n	Gem.	Std. dev.
	5	Streptomyces	30	86.31	11.09
	6	Salicylzuur	30	86.33	19.59
	7	Ridomil Gold	30	96.28	16.12
	8	neg. controle	30	79.63	9.02
bladopp (cm <sup>3</sup> )	1	Compost	30	713.57	63.48
	2	Silicium	30	745.27	57.43
	3	Chitosan	30	704.44	71.45
	4	Kaliumfosfiet	30	732.67	94.72
	5	Streptomyces	30	723.65	62.25
	6	Salicylzuur	30	783.77	102.26
	7	Ridomil Gold	30	730.50	80.36
	8	neg. controle	30	951.07	1168.81
drooggewichtgroen (gr)	1	Compost	30	3.93	0.63
	2	Silicium	30	4.85	1.02
	3	Chitosan	30	4.54	0.66
	4	Kaliumfosfiet	30	4.49	0.84
	5	Streptomyces	30	4.43	0.56
	6	Salicylzuur	30	4.64	0.73
	7	Ridomil Gold	30	4.19	0.65
	8	neg. controle	30	4.38	0.60
drooggewichtbloem (gr)	1	Compost	30	3.74	0.98
	2	Silicium	30	4.94	1.61
	3	Chitosan	30	4.43	1.25
	4	Kaliumfosfiet	30	5.52	0.95
	5	Streptomyces	30	4.56	0.65
	6	Salicylzuur	30	4.43	1.08
	7	Ridomil Gold	30	4.99	1.11
	8	neg. controle	30	4.08	0.50

## Bijlage II

		behandelingen	n	Gem.	Std. Dev.
lengte	1	Compost	30	38.1	2.99828
	2	Silicium	30	41.4667	3.47139
	3	Chitosan	30	41.7333	3.16155
	4	Kaliumfosfiet	30	40.1667	2.30567
	5	Streptomyces	30	42.7	3.33374
	6	Salicylzuur	30	42.3667	2.67148
	7	Ridomil Gold	30	42.9	2.18695
	8	neg. controle	30	40.2333	2.9906
breedte	1	Compost	30	40.7	4.72083
	2	Silicium	30	39.4	6.57372
	3	Chitosan	30	39.3333	4.67077
	4	Kaliumfosfiet	30	40.6	3.46012
	5	Streptomyces	30	40.9333	7.70997
	6	Salicylzuur	30	43.1	5.22164
	7	Ridomil Gold	30	39.8333	4.44959
	8	neg. controle	30	40.8667	5.38025
versgewgroen	1	Compost	30	251.205	32.35795
	2	Silicium	30	328.1933	44.01934
	3	Chitosan	30	300.4647	39.16119
	4	Kaliumfosfiet	30	285.204	27.49552
	5	Streptomyces	30	309.1643	28.04705
	6	Salicylzuur	30	297.2917	38.84294
	7	Ridomil Gold	30	331.9887	63.1108
	8	neg. controle	30	368.4743	358.2859
versgewichtbloem	1	Compost	30	106.871	28.26281
	2	Silicium	30	150.2563	28.0058
	3	Chitosan	30	131.021	28.2993
	4	Kaliumfosfiet	30	128.4587	28.17007
	5	Streptomyces	30	119.878	27.83912
	6	Salicylzuur	30	119.7887	23.11379
	7	Ridomil Gold	30	138.0197	31.11558
	8	neg. controle	30	115.6423	31.65325
bladopp	1	Compost	30	2696.833	348.6962
	2	Silicium	30	2993.367	598.5754
	3	Chitosan	30	2937.967	322.0082
	4	Kaliumfosfiet	30	2803.467	192.1299
	5	Streptomyces	30	3010.733	276.6626
	6	Salicylzuur	30	3020.5	413.5992

		behandelingen	n	Gem.	Std. Dev.
	7	Ridomil Gold	30	2953.367	649.2329
	8	neg. controle	30	2853.633	370.9823
drooggewichtgroen	1	Compost	30	8.8413	1.53643
	2	Silicium	30	12.2963	2.04147
	3	Chitosan	30	10.705	1.75649
	4	Kaliumfosfiet	30	10.6303	1.0302
	5	Streptomyces	30	11.3077	1.18822
	6	Salicylzuur	30	10.5797	1.93191
	7	Ridomil Gold	30	11.385	1.74887
	8	neg. controle	30	10.9647	1.89629
drooggewichtbloemw	1	Compost	30	1.8273	1.08937
	2	Silicium	30	3.344	1.07654
	3	Chitosan	30	2.566	0.96235
	4	Kaliumfosfiet	30	2.7067	1.02817
	5	Streptomyces	30	2.572	1.02519
	6	Salicylzuur	30	2.465	0.98272
	7	Ridomil Gold	30	2.621	1.06255
	8	neg. controle	30	2.471	1.1336



# Bijlage III Voedingsschema (vegetatief) Kalanchoe

POTPLANTEN-RECEPTEN				INJECTIE-UNIT PBG AALSMEER		KLASSE 3.X.X. VEGETATIEF		
	STANDAARD VOEDINGSOPLOSSING			STREEFWAARDEN VOEDINGSOPLOSSING		STREEFWAARDEN 1:1.5 EXTRACT		
	voeding standaard	voeding variabel	EC variabel	EC (v)*		EC (v)*	streefcijfer	grenzen
EC	1,7	1,7	1,8	EC (v)*	1.7	EC (v)*	0,7	0.5 - 0.9
pH	(**)	(**)	(**)	pH	(**)	pH	(***)	
NO3 -	11,50	11,50	12,18	NO3 -	7.4 - 13.8	NO3 -	4,0	3.2 - 4.8
SO4 --	1,10	1,10	1,16	SO4 --	0.7 - 1.3	SO4 --	0,8	0.5 - 1.1
P -	1,60	1,60	1,69	P -	0.9 - 1.8	P -	0,5	0.4 - 0.6
NH4 +	1,20	1,20	1,27	NH4 +	< 0.5	NH4 +	<0.1	
K +	6,00	6,00	6,35	K +	3.9 - 7.2	K +	1,6	1.3 - 1.9
Ca ++	3,25	3,25	3,44	Ca ++	2.1 - 3.9	Ca ++	1,2	0.8 - 1.6
Mg ++	0,80	0,80	0,85	Mg ++	0.5 - 1.0	Mg ++	0,5	0.3 - 0.7
Ionen -	15,30	15,30	16,20					
Ionen +	15,30	15,30	16,20					
Ber. EC	1,70	1,70	1,80					
Fe	20	20		Fe	15 - 25	Fe	8	5.0 - 10
B	10	10		B	8.0 - 12	B	15	10 - 25
Mn	5	5		Mn	4.0 - 6.0	Mn	2	1.0 - 3.0
Zn	3,0	3,0		Zn	2.0 - 5.0	Zn	2	1.5 - 2.5
Cu	0,8	0,8		Cu	0.6 - 0.8	Cu	-	<1
Mo	0,5	0,5		Mo	0.3 - 0.8	Mo	-	-

Recept instelling      Recept instelling EC (v) is EC na aftrek Na bijdrage (=Na cijfer \* 0.12)

NITRAK	0,333	0,333	0,353	(** pH	instelling unit:	(*** pH streefwaarden in 1:1.5 ext.	
ZWAKAL	0,278	0,278	0,294	pH klasse	x.x.1      pH 4.7	pH klasse	x.x.1      <4.6
AMNITR	0,151	0,151	0,159	pH klasse	x.x.2      pH 5.0	pH klasse	x.x.2      4.6 - 5.4
CALSAL	0,694	0,694	0,735	pH klasse	x.x.3      pH 5.3	pH klasse	x.x.3      4.9 - 5.7
MAGNIT	0,107	0,107	0,113	pH klasse	x.x.4      pH 5.6	pH klasse	x.x.4      5.2 - 6.0
BFK	0,471	0,471	0,499	pH klasse	x.x.5      pH 5.9	pH klasse	x.x.5      5.5 - 6.3
BASKAL	0,164	0,164	0,173				
zuurbalans	-0,001	-0,001	-0,001				
FeDTPA	0,500	0,500					
BORIUM	0,400	0,400					
MANGAAN	0,500	0,500					
ZINK	0,600	0,600					
KOPER	0,500	0,500					
MOLYB	0,500	0,500					

Dick van den Berg  
10-01-04

Basigegevens uit: "Bemestingsadviesbasis glastuinbouw" (IKC)

doc: KL-3XXV.xls



# Bijlage IV Voedingsschema (generatief) Kalanchoe

POTPLANTEN-RECEPTEN				INJECTIE-UNIT PBG AALSMEER				KLASSE 3.X.X. VEGETATIEF		
EC	STANDAARD VOEDINGSOPLOSSING			STREEFWAARDEN VOEDINGSOPLOSSING			STREEFWAARDEN 1:1.5 EXTRACT			
	voeding standaard 1,7	voeding variabel 1,7	EC variabel 1,8	EC (v)*			EC (v)*	streefcijfer	grenzen	
pH	(**)	(**)	(**)	pH	(**)		pH	(***)		
NO3 -	11,50	11,50	12,18	NO3 -	7,4 - 13,8		NO3 -	4,0	3,2 - 4,8	
SO4 --	1,10	1,10	1,16	SO4 --	0,7 - 1,3		SO4 --	0,8	0,5 - 1,1	
P -	1,60	1,60	1,69	P -	0,9 - 1,8		P -	0,5	0,4 - 0,6	
NH4 +	1,20	1,20	1,27	NH4 +	< 0,5		NH4 +	<0,1		
K +	6,00	6,00	6,35	K +	3,9 - 7,2		K +	1,6	1,3 - 1,9	
Ca ++	3,25	3,25	3,44	Ca ++	2,1 - 3,9		Ca ++	1,2	0,8 - 1,6	
Mg ++	0,80	0,80	0,85	Mg ++	0,5 - 1,0		Mg ++	0,5	0,3 - 0,7	
ionen -	15,30	15,30	16,20							
ionen +	15,30	15,30	16,20							
Ben. EC	1,70	1,70	1,80							
Fe	20	20		Fe	15 - 25		Fe	8	5,0 - 10	
B	10	10		B	8,0 - 12		B	15	10 - 25	
Mn	5	5		Mn	4,0 - 6,0		Mn	2	1,0 - 3,0	
Zn	3,0	3,0		Zn	2,0 - 5,0		Zn	2	1,5 - 2,5	
Cu	0,8	0,8		Cu	0,6 - 0,8		Cu	-	<1	
Mo	0,5	0,5		Mo	0,3 - 0,8		Mo	-	-	

Recept instelling      Recept instelling EC (v) is EC na aftrek Na bijdrage (=Na cijfer \* 0,12)

NITRAK	0,333	0,333	0,353
ZWAKAL	0,278	0,278	0,294
AMNITR	0,151	0,151	0,159
CALSAL	0,694	0,694	0,735
MAGNIT	0,107	0,107	0,113
BFK	0,471	0,471	0,499
BASKAL	0,164	0,164	0,173
zuurbalans	-0,001	-0,001	-0,001
FeDTPA	0,500	0,500	
BORIUM	0,400	0,400	
MANGAAN	0,500	0,500	
ZINK	0,600	0,600	
KOPER			
MOLYB	0,500	0,500	

(** pH	instelling unit:	(** pH streefwaarden in 1:1.5 ext.
pH klasse x.x.1	pH 4.7	pH klasse x.x.1 <4.6
pH klasse x.x.2	pH 5.0	pH klasse x.x.2 4.6 - 5.4
pH klasse x.x.3	pH 5.3	pH klasse x.x.3 4.9 - 5.7
pH klasse x.x.4	pH 5.6	pH klasse x.x.4 5.2 - 6.0
pH klasse x.x.5	pH 5.9	pH klasse x.x.5 5.5 - 6.3

Dick van den Berg  
10-01-04

Basisegegevens uit: "Bemestingsadviesbasis glastuinbouw" (IKC)

doc: KL-3XXV.xls



# Bijlage V Voedingsschema Begonia

Bemesting 7.2.5.

Streefcijfers bij ec 0.67

Vegetatief	generatief
Nh4 <0.1	<0.1
K 1.6	2
Ca 1.2	1
Mg 0.7	0.7
No3 4.0	4
So4 0.6	0.6
P 0.5	0.5





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



Wageningen UR Glastuinbouw  
Postbus 20  
2665 ZG Bleiswijk  
Violierenweg 1  
2665 MV Bleiswijk  
T +31 (0)317 48 56 06  
F +31 (0) 10 522 51 93  
[www.wageningenUR.nl/glastuinbouw](http://www.wageningenUR.nl/glastuinbouw)

Glastuinbouw Rapport GTB-1326

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

De missie van Wageningen UR (University & Research centre) is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen UR bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van stichting DLO en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.000 medewerkers en 9.000 studenten behoort Wageningen UR 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.