



Nieuwe aanpak voor bestrijden van bacteriële plantenziekten veroorzakers in diverse gewassen

Marta Streminska, Ineke Stijger, Gerdit Greve en Ariyati Ayik

Rapport WPR-1163

Referaat

Overmatige wortelgroei in groentegewassen, veroorzaakt door rhizogene bacterie *Rhizobium rhizogenes*, vormt een uitdaging voor de teelt. Er zijn op dit moment weinig mogelijkheden om deze ziekte te bestrijden behalve uitgebreide hygiëne maatregelen. Aanvullende maatregelen zijn nodig om er voor te zorgen dat de ziekte zich niet kan ontwikkelen. Eén daarvan is het verstoren van de communicatie tussen afzonderlijke bacteriële cellen (quorum sensing), zodat die de plant niet kunnen infecteren. Dit is bijvoorbeeld mogelijk door gebruik te maken van andere micro-organismen die signaalstoffen, acyl homoserine lactones (AHL's), van pathogene bacteriën afbreken. In dit project zijn AHL afbrekende micro-organismen geïsoleerd uit de endosfeer en rhizosfeer van tomaat. Uit kasexperimenten blijkt dat deze micro-organismen in staat zijn tomaat te beschermen tegen de ontwikkeling van overmatige wortelgroei gedurende de teelt in de kas.

Abstract

Development of hairy roots symptoms in greenhouse vegetable crops, caused by the rhizogenic bacterium *Rhizobium rhizogenes*, poses a challenge during cultivation. There are currently few options to combat this disease except for extensive hygiene measures. Additional measures are needed to ensure that the disease does not develop in the crop. One of these measures might be disrupting communication between individual bacterial cells (quorum sensing) so that the plant does not get infected. This is possible, for example, by using other micro-organisms that breakdown signal molecules, acyl homoserine lactones (AHLs), of pathogenic bacteria. In this project, AHL-degrading microorganisms were isolated from the tomato endosphere and rhizosphere. Greenhouse experiments show that these micro-organisms are able to protect tomatoes against the development of hairy roots symptoms during cultivation in the greenhouse.

Rapportgegevens

Rapport WPR-1163

Projectnummer: 3742201800

DOI: <https://doi.org/10.18174/574598>

Thema: Gewasbescherming

Dit project is mede tot stand gekomen door de bijdrage van Topsectoren T&U, Stichting Programmafonds Glastuinbouw, Rijk Zwaan BV en Koppert BV met coördinatie van Glastuinbouw Nederland (bij aanvang project LTO Glaskracht Nederland)

Disclaimer

© 2022 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw, Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104

BTW nr.: NL 8113.83.696.B07

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

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

Adresgegevens

Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 48 56 06

Inhoud

	Samenvatting	5
1	Inleiding	7
1.1	Doelstelling	7
1.2	Rhizogene bacteriën als plantpathogenen	7
1.3	Quorum sensing (QS) en Quorum quenching (QQ) in bacteriën	9
2	Materialen en Methoden	11
2.1	Isolatie van plantpathogene <i>Rhizobium rhizogenes</i>	11
2.2	Productie van signaalstoffen (AHL's) door plantpathogene isolaten van rhizogene bacteriën	11
2.3	Pathogeniciteitstoets van <i>Rhizobium rhizogenes</i> op tomaat	11
2.4	Isolatie en identificatie van endofytische bacteriën uit tomaat en bacteriën uit steenwol	12
2.5	PCR screening van bacteriële isolaten op aanwezigheid van genen van lactonases <i>aiiA</i> en <i>qsda</i>	12
2.6	Assay voor afbraak van signaalstoffen (AHL's) door endofytische bacteriën uit tomaat en isolaten uit steenwol	12
2.7	Effect van verschillende behandelingen op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten (opkweek)	13
2.7.1	Proef 1	13
2.7.2	Proef 2	13
2.7.3	Proef 3	14
2.7.4	Proef 4	14
2.7.5	Proef 5	14
2.7.6	Proef 6	14
2.7.7	Proef 7	15
2.7.8	Proef 8	15
2.7.9	Proef 9	15
2.7.10	Proef 10	15
2.7.11	Proef 11	16
2.8	Effect van AHL afbrekende bacteriën en andere micro-organismen op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei tijdens de teelt van tomaat	17
2.9	Expressie van virulentie genen in <i>in vitro</i> kweken van <i>Rhizobium rhizogenes</i>	18

3	Resultaten	19
3.1	Isolatie en identificatie van rhizogene <i>Rhizobium</i>	19
3.2	Isolatie en karakterisatie van endofyten uit tomaat en isolaten uit steenwol	20
3.3	Afbraak van signaalstoffen (AHL's) door endofyten en isolaten uit steenwol	22
3.4	Effecten van micro-organismen en verschillende andere behandelingen op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten	25
3.4.1	Proef 1	25
3.4.2	Proef 2	27
3.4.3	Proef 3	28
3.4.4	Proef 4	29
3.4.5	Proef 5	30
3.4.6	Proef 6	31
3.4.7	Proef 7	32
3.4.8	Proef 8	33
3.4.9	Proef 9	34
3.4.10	Proef 10	35
3.4.11	Proef 11	37
3.5	Effecten van inoculatie met micro-organismen op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei in tomatenplanten gedurende een teelt van vier maanden	38
3.6	Expressie van virulentie genen in rhizogene <i>Rhizobium rhizogenes</i>	41
4	Discussie en conclusie	43
	Literatuur	45

Samenvatting

Bacteriën vormen een steeds belangrijker wordend probleem in de glastuinbouw. Een voorbeeld daarvan is overmatige wortelgroei in tomaat en aubergine. Dit wordt veroorzaakt door virulente stammen van *Rhizobium rhizogenes*. Bij plantenziekten die veroorzaakt worden door bacteriën is het niet mogelijk om curatief een chemische bestrijding toe te passen. Op dit moment is de belangrijkste manier van omgaan met bacteriële ziekten het voorkomen van de ziekten door het nemen van uitgebreide hygiënemaatregelen. De ontsmettingsmethoden resulteren vaak in onvoldoende remming van de ontwikkeling van overmatige wortelgroei en andere ziekten die veroorzaakt worden door bacteriën. Daarom is het noodzakelijk om te komen tot een nieuwe aanpak in de bestrijding van plantenziekten die worden veroorzaakt door bacteriën.

Ter bestrijding van overmatige wortelgroei in verschillende teelten onder glas richten we ons in dit project op twee mogelijke strategieën namelijk: verstoren van communicatie (quorum quenching) in *Rhizobium rhizogenes* en/of inhibitie van virulentie factoren. Deze strategieën zouden moeten leiden tot inhibitie of verlaging van virulentie van *Rhizobium rhizogenes*. Deze bacterie, als die avirulent is, kan in de rhizosfeer onafhankelijk van de plant functioneren.

Binnen het project zijn strategieën ontwikkeld die zorgen voor onderdrukking van groei/virulentie factoren van de plantpathogene bacterie *Rhizobium rhizogenes*. Voor het ontwikkelen van de optimale strategie voor ziektebestrijding is meer kennis nodig over de mechanismen van infectie en factoren die de infectie kunnen verstoren. Dankzij dit project is meer inzicht verkregen over de veranderingen in virulentie van *Rhizobium rhizogenes* in de omgeving waar quorum sensing/virulentie versturende stoffen of micro-organismen aanwezig zijn.

Resultaten van dit project laten zien dat het mogelijk is om micro-organismen, die quorum sensing van plantpathogene bacteriën kunnen verstoren, te isoleren uit tomaatweefsel en groeimedium tijdens de teelt van tomaten (steenwol). Deze micro-organismen zijn vervolgens getest *in planta* op effectiviteit tegen overmatige wortelgroei. Het bleek dat niet in elke kasproef met jonge tomaten positieve effect van behandeling zichtbaar was, zowel in het geval van commerciële producten als met de nieuwe isolaten verkregen binnen dit onderzoek. Optimalisatie van de toedieningsmethode is daarom nodig. Het is mogelijk, dat na toedienen van verse bacteriële kweken, veel van de bacteriën snel dood gaan in de nieuwe omgeving (steenwolmat). Mogelijk kan een zaadbehandeling, bijvoorbeeld coating met endosporen van *Bacillus*, een beter en robuuster effect hebben.

Interessant is, dat bij de behandeling van oudere tomatenplanten, een duidelijk en significant effect op de ontwikkeling van de overmatige wortelgroei is aangetoond. Dit zou kunnen betekenen dat gebruikte micro-organismen waarschijnlijk beter de wortelzone van oudere tomaten kunnen koloniseren, omdat er meer voeding in de vorm van wortellexudaten aanwezig is.

Informatie en resultaten uit het onderzoek dienen als basis voor verdere studies naar de ontwikkeling van strategieën om andere bacteriële ziekten in diverse teelten onder glas tegen te gaan.

1 Inleiding

1.1 Doelstelling

Plantenziekten veroorzaakt door bacteriën vormen een steeds belangrijker wordend probleem in de glastuinbouw. Chemische en curatieve bestrijding is vaak onmogelijk. Op dit moment is de belangrijkste manier van omgaan met bacteriële ziekten het voorkomen van de ziekten door het nemen van uitgebreide hygiënemaatregelen.

De ontsmettingsmethoden resulteren vaak in onvoldoende remming van de ontwikkeling van bacteriële ziekten. Daarom is het noodzakelijk om te komen tot een nieuwe aanpak in de bestrijding van plantenziekten die worden veroorzaakt door bacteriën.

Een van belangrijkste bacteriële ziektes in de glastuinbouw in de afgelopen jaren is overmatige wortelgroei, veroorzaakt door verschillende isolaten van gramnegatieve rhizogene bacteriën (met Ri plasmide, Ri= eng. root inducing). Deze bacteriën kunnen meer dan 450 verschillende plantensoorten infecteren. In de teelt onder glas in Nederland veroorzaakt overmatige wortelgroei grote problemen in de teelt van groentegewassen zoals tomaat, aubergine en komkommer. Daarom is deze bacteriële ziekte gekozen als een case study voor onderzoek naar de mogelijkheden voor de biologische bestrijding van bacteriële plantenziekten.

Dit project richt zich op de verkenning van mogelijkheden van inzet van twee strategieën, namelijk: 1) verstoring van bacteriële communicatie (quorum quenching) in rhizogene bacteriën en/of 2) inhibitie van virulentie factoren. Deze strategieën moeten leiden tot inhibitie of verlaging van virulentie van rhizogene bacteriën. Deze micro-organismen, als die niet virulent zijn, kunnen in de rhizosfeer van de plant functioneren zonder nadelige gevolgen voor de plantgezondheid.

Informatie en resultaten uit het onderzoek dienen als basis voor verdere studies naar de ontwikkeling van strategieën om deze en andere bacteriële ziekten bij diverse teelten tegen te gaan.

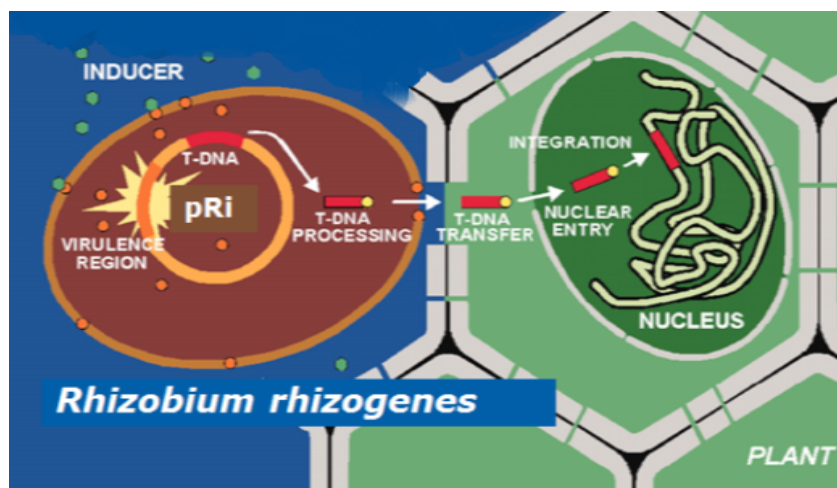
1.2 Rhizogene bacteriën als plantpathogenen

Overmatige wortelgroei, door de telers vaak "crazy roots" genoemd, is een symptoom van een bacteriële infectie door rhizogene bacteriën in dicotyle planten. Deze bacteriën hebben een brede waardplantenreeks, met meer dan 450 plantensoorten die gevoelig zijn voor de infectie, o.a. komkommer, tomaat, meloen, appelboom (De Cleene *et al.* 1987; Veena and Taylor, 2007). In de afgelopen jaren hebben steeds meer tomaten-, aubergine- en komkommertelers in Nederland problemen gehad, in de teelt op substraat, door ongewenste wortelgroei in de steenwolmat. Dit resulteerde in een verstoorde groei van de bovengrondse delen van de planten.

De infectie wordt veroorzaakt door virulente stammen van rhizogene bacteriën o.a. *Rhizobium rhizogenes* (*Agrobacterium rhizogenes*). Overmatige wortelgroei symptomen waren in het verleden geassocieerd met plantpathogene *Rhizobium rhizogenes* biovar 2 van *Agrobacterium/Rhizobium* groep. De biovar-classificatie is gebaseerd op fysiologische en biochemische eigenschappen, zonder rekening te houden met het ziektefenotype. Echter, in de afgelopen jaren, was de conclusie dat het pathogeen die de meeste gevallen van overmatige wortelgroei veroorzaakt de virulente *Agrobacterium* biovar 1 (McPherson, 2009, Weller *et al.* 2004; Bosmans *et al.* 2015) is. Ongeacht de biovar-classificatie is er een gemeenschappelijke noemer voor virulente rhizogene bacteriën in het bezit van Ri-plasmide (White *et al.* 1985).

Ri plasmiden zijn circulaire DNA-moleculen die geen deel uitmaken van de chromosomale DNA van de bacteriën. Op Ri-plasmiden staan specifieke virulentiekarakteristieken van rhizogene bacteriën gecodeerd (zogenaamd vir genen). Bovendien bevatten plasmiden een zogenaamd T-DNA-fragment, die tijdens het infectieproces wordt overgebracht naar het chromosoom van de plantencel. De expressie van de genen die gecodeerd staan op T-DNA bevordert de ontwikkeling en groei van de wortels op de plaats van de infectie. Bovendien bevat T-DNA ook de genensequenties voor de productie van opines. Opines zijn verbindingen met een laag moleculair gewicht, die vrijwel uitsluitend door rhizogene plantpathogene bacteriën worden gebruikt als een bron van stikstof en energie. Virulente stammen worden ingedeeld in subgroepen op basis van het type opines die zij gebruiken: 1) agropine-type; 2) mannopine-type; 3) cucumopine-type en 4) mikimopine-type (Filetici *et al.* 1987).

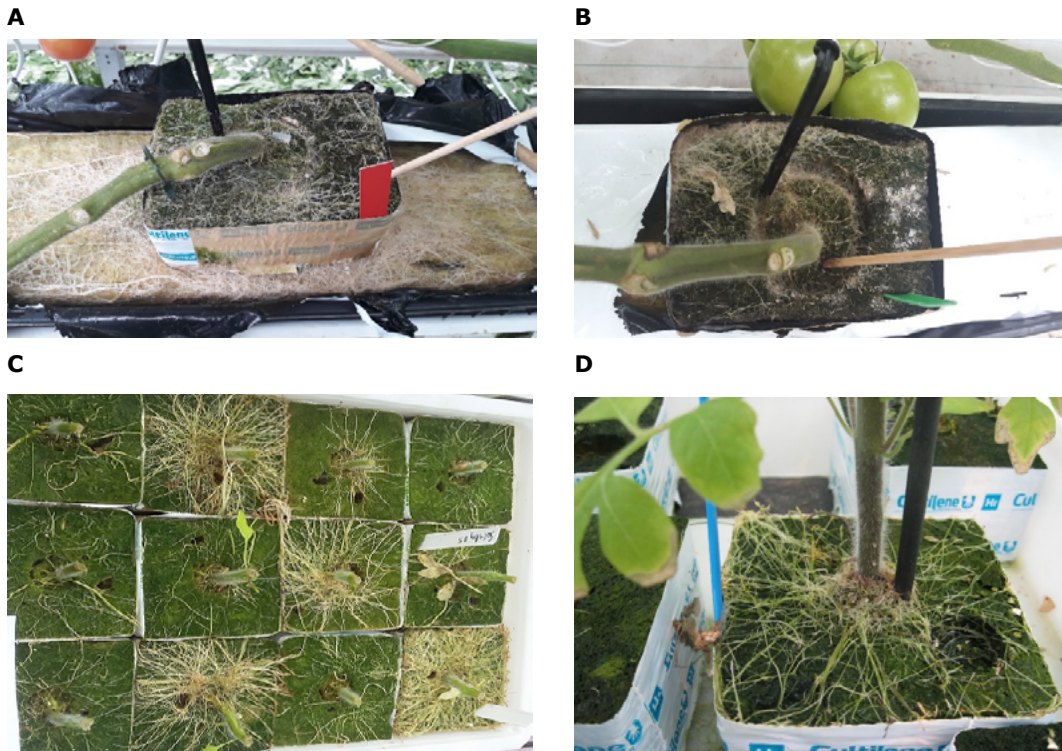
Er is weinig informatie beschikbaar over het precieze verloop van het infectieproces door rhizogene bacteriën. Echter, rhizogene bacteriën zijn nauw verwant aan andere, de vaak bestudeerde plant pathogene *Agrobacterium tumefaciens*, veroorzaker van kroongalziekte, in welke virulentie ook via plasmide wordt bepaald (Ti plasmid; tumor inducing plasmid) (Veena and Taylor, 2007). De verwachting is dat het infectie proces op grote lijnen hetzelfde is in beide pathogenen. Nadat de wortel beschadigd raakt worden er fenolen uitgescheiden in de rhizosfeer. Bacteriën reageren op deze fenolen en zwemmen in de richting van de wond. De pH rond de wond is tussen pH 5.5-5.8 (Yuan *et al.* 2007). In een lage pH worden de virulentie genen van Ri plasmide geïnduceerd en bacteriën worden dan virulent. Bovendien speelt de communicatie tussen afzonderlijke cellen van plantpathogene bacteriën, zogenaamd quorum sensing, een belangrijke rol in het infectieproces (Lang and Faure, 2014). De aantallen van bacteriële cellen rond de wond moeten boven een bepaalde drempelwaarde zitten voordat het infectieproces geïnitieerd wordt. Het verloop van het infectieproces is schematisch weergegeven in Figuur 1.1.



Figuur 1.1 Infectieproces van rhizogene bacteriën (gemodificeerd Valentine, 2003).

Infectie door rhizogene bacteriën verloopt anders dan in het geval van veel andere bacteriële pathogenen, zoals *Pectobacterium* of *Acidovorax*. Veel plantpathogene bacteriën veroorzaken rot van plantmateriaal, omdat zij veel extracellulaire enzymen produceren die celwanden van de plantencellen afbreken. *Rhizobium/Agrobacterium* manipuleren als het ware het DNA van de plant zelf, zodat de plant stoffen gaat produceren die nodig zijn voor de overleving van deze bacteriën (zoals opines, bron van stikstof voor rhizogene bacteriën). Geïnfecteerde planten kunnen niet meer genezen.

Voorbeelden van symptomen van een infectie met rhizogene bacteriën (overmatige wortelgroei) in tomaat zijn weergegeven in Figuur 1.2.



Figuur 1.2 Voorbeelden van symptomen van overmatige wortelgroei in tomaat: A en B symptomen in oudere planten, 3 maanden naar inoculatie met rhizogene bacteriën; C en D symptomen in jonge planten, 6 weken naar inoculatie met rhizogene bacteriën.

1.3 Quorum sensing (QS) en Quorum quenching (QQ) in bacteriën

Quorum sensing (QS) is een communicatieproces tussen afzonderlijke bacteriële cellen dat de productie, detectie en respons op extracellulaire signaalmoleculen, autoinducers (AI's), omvat. Deze autoinducers hopen zich op in de omgeving naarmate de bacteriële dichtheid toeneemt. Veranderingen in concentratie van signaalstoffen geven bacteriën informatie over hun celantallen in de specifieke omgeving. Vaak regelt QS expressie van genen die activiteiten aansturen waarvoor belangrijk is dat ze worden uitgevoerd door groepen bacteriën die synchroon werken. Voorbeelden van processen gecontroleerd door QS zijn: bioluminescentie, sporulatie, antibioticaproductie, biofilmvorming en vaak productie van virulentiefactoren (Rutherford *et al.* 2012). Er is geen één algemeen quorum sensing systeem die werkt in alle bacteriën. Alle quorum-detectiesystemen maken wel gebruik van autoinducers (LaSarre, 2013). Rhizogene bacteriën maken gebruik van quorum sensing gebaseerd op acyl homoserine lactonen (AHL) als autoinducers.

Quorum sensing speelt een belangrijke rol in de regulatie van virulentie van rhizogene bacteriën o.a. expressie van virulentie genen en transfer van T-DNA naar de plantencel.

Quorum quenching (QQ) is de algemene term voor alle processen die een rol spelen in de verstoring van communicatie tussen afzonderlijke bacteriële cellen. QQ kan invloed hebben op de verschillende aspecten van quorum sensing, van de productie van signaalstoffen tot perceptie van deze signaalstoffen door bacteriële cellen. Er zijn daarom verschillende mogelijkheden voor quorum quenching. Quorum-sensing inhibitors (QSI) zijn verschillende chemicaliën die invloed hebben op de productie en/of perceptie van signaalstoffen door bacteriën. Voorbeelden van quorum sensing inhibitors zijn: gamma aminobutyric acid (GABA, curcumin, flavonoles, salicylzuur en furanonen).

Veel micro-organismen, zoals o.a. *Bacillus* stammen, zijn in staat om signaalstoffen (AHL's) van andere bacteriën af te breken met behulp van specifieke enzymen die AHL hydroliseren (Dong *et al.* 2000). Er bestaan verschillende groepen van AHL hydrolyserende enzymen: 1) lactonasen, die homoserine lactone ring openbreken; 2) amidasen, die AHL's splitsen bij de amide binding waarbij vetzuur en homoserine lactone vrijkomen; 3) reductases die 3-oxo-AHL kunnen converteren tot 3-hydroxyl-AHL en 4) cytochrome oxidases die oxidatie van acylketting van de AHL's katalyseren (Fetzner, 2015). Binnen dit project ligt de focus op lactonases die geproduceerd worden door o.a. *Bacillus* omdat *Bacillus* soorten relatief makkelijk zijn om te formuleren in producten en die langdurig goed blijven in bewaring dankzij de productie van endosporen (=overlevingsstructuren).

2 Materialen en Methoden

2.1 Isolatie van plantpathogene *Rhizobium rhizogenes*

Plantpathogene *Rhizobium rhizogenes* is geïsoleerd uit wortels van tomatenplanten die symptomen van overmatige wortelgroei vertoonden. Voor de eerste stap van de isolatie is 0.5g wortels gemalen en vervolgens opgelost in 5mL steriele fysiologisch zout oplossing (0.95% NaCl). 100mL van deze oplossing is vervolgens uitgeplaat op petrischalen met specifieke medium (MG-Te medium, met mannitol en kalium tellurite- K_2TeO_3) (Shams *et al.* 2012). Na een aantal dagen zijn de kolonies met specifieke morfologie en zwarte kleur (reductie van tellurite) overgezet naar MG medium (zonder tellurite). De verkregen reine isolaten zijn vervolgens opgeslagen als glycerol stocks in $-80^{\circ}C$.

Uit de verkregen reine kolonies is DNA geïsoleerd en zijn de isolaten geïdentificeerd op basis van hun 16S rDNA sequentie (primers 27F/1492R; Lane, 1985).

Aanwezigheid van Ri plasmide in cellen van isolaten van *Rhizobium rhizogenes* uit tomaat is bevestigd met PCR techniek (primers VCF3/VCR3; Suzuki *et al.* 2004). Als positieve controle is het isolaat van *Rhizobium radiobacter* nummer NCPPB 4043 gebruikt.

2.2 Productie van signaalstoffen (AHL's) door plantpathogene isolaten van rhizogene bacteriën

De indicator stam van *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) is gebruikt om signaalstoffen (AHL's) met lange acylketens van plantpathogene isolaten indirect te detecteren. Deze stam is zelf niet in staat om AHL's te produceren. Deze stam draagt het plasmide pZLR4, dat een $traG :: lacZ$ -fusie en $traR$ bevat. In de aanwezigheid van exogene AHL's wordt β -galactosidase activiteit ingeschakeld. Gemeten β -galactosidase activiteit is een indicatie voor de aanwezigheid van AHL's. Als substraat voor β -galactosidase wordt chromogene substraat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) gebruikt.

A. tumefaciens NTL4 is opgekweekt in een vloeibare AB medium (glucose als koolstofbron) met antibiotica gentamicine.

Rhizogene isolaten zijn opgekweekt in Nutrient Broth (NB). Na 48 uur zijn de kweken van rhizogene isolaten gecentrifugeerd (5000 rpm gedurende 10 minuten) en gefiltreerd (door 0.22 μm filter). Het supernatant van de kweken (zonder bacteriële cellen) + X-Gal is vervolgens gebruikt als groeimeedium voor *A. tumefaciens* NTL4.

2.3 Pathogeniciteitstoets van *Rhizobium rhizogenes* op tomaat

Pathogeniciteit van *Rhizobium rhizogenes* WUR1 en *Rhizobium radiobacter* NCPPB 4043 in tomaat is vastgesteld in een biotoets met jonge tomatenplanten van drie verschillende onderstam cultivars (Maxifort, Emperador en Shield). Twee weken oude zaailingen (in steenwolblokken) zijn geïnoculeerd met 10^8 cellen van *Rhizobium rhizogenes*/*Rhizobium radiobacter* per plant. De ontwikkeling van de symptomen van overmatige wortelgroei is gedurende zes weken gevolgd.

2.4 Isolatie en identificatie van endofytische bacteriën uit tomaat en bacteriën uit steenwol

Endofytische bacteriën zijn geïsoleerd vanuit tomatenplanten afkomstig uit een kas bij WUR Glastuinbouw en Bloembollen in Bleiswijk. Stengels van 8 weken oude planten zijn in stukken geknipt (lengte ≈ 5cm). Vervolgens is het stengeloppervlak gesteriliseerd met een natrium hypochloriet oplossing (1%; gedurende 10 min) en drie keer gespoeld met steriel demiwater. Vervolgens zijn, onder steriele omstandigheden, monsters genomen van de binnenkant van de stengels. Ongeveer 250mg van het weefselmonster is gesuspenderd in 1.5mL steriele oplossing van fysiologisch zout (0.95% NaCl). Na homogenisatie van het monster is 100ml van de oplossing uitgeplaat op nutrient agar (NA) platen. Na 72-96 uur incubatie zijn de gegroeide kolonies overgezet op nieuwe nutrient agar platen voor het verkrijgen van reinisolaten.

Steenwolmonsters zijn genomen tijdens een tomatenteelt in de kas bij WUR Glastuinbouw en Bloembollen in Bleiswijk. Voor isolatie van de bacteriën zijn steenwol monsters (2g) gesuspenderd in 1.5mL steriele oplossing van fysiologisch zout (0.95% NaCl). Na homogenisatie van de monsters is 100ml van de oplossing uitgeplaat op nutrient agar (NA) platen. Na 72uur incubatie zijn de gegroeide kolonies overgezet op nieuwe nutrient agar platen voor het verkrijgen van reinisolaten.

Endofyten uit tomaat en isolaten uit steenwol zijn vervolgens geïdentificeerd op basis van de 16S rDNA gen sequentie van (primer set 27F-1492R; Wilson, *et al.* 1990).

2.5 PCR screening van bacteriële isolaten op aanwezigheid van genen van lactonases *aiiA* en *qsdA*

Endofytische isolaten en isolaten uit steenwol zijn gecheckt op de aanwezigheid van genen van lactonase *aiiA* en acylase *qsdA*. Primer set (*aiiA*1 en *aiiA*2) is gebruikt voor PCR amplificatie van *aiiA* lactonase gen (Yin *et al.* 2010). Primer set (*qsdA*F en *qsdA*R) is gebruikt voor PCR amplificatie van *qsdA* lactonase gen (Tannieres *et al.* 2013).

2.6 Assay voor afbraak van signaalstoffen (AHL's) door endofytische bacteriën uit tomaat en isolaten uit steenwol

De indicator stam van *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) is gebruikt in de assay voor AHL's afbraak door endofyten en isolaten uit steenwol. Rhizogene bacteriën zijn opgekweekt in Nutrient Broth. Na 48uur kweek zijn de rhizogene bacteriën gecentrifugeerd (5000 rpm voor 10 minuten) en gefiltreerd (door 0.22 mm filter). Op het resulterende supernatant zijn vervolgens verschillende endofyten of steenwol isolaten opgekweekt. Na 24 uur zijn de bacteriën verwijderd uit de kweek en is er *A. tumefaciens* NTL4 geïnoculeerd op het supernatant+ X-gal. De ontwikkeling van blauw verkleuring werd na 24 en 48 uur kweek gemonitord en de blauwe kleur betekende dat er geen afbraak van AHL signaalstoffen plaats heeft gevonden.



Figuur 2.1 Schema van de assay voor afbraak van acyl homoserine lactones (AHL's) door bacteriën.

2.7 Effect van verschillende behandelingen op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten (opkweek)

Isolaten van AHL afbrekende bacteriën zijn in verschillende proeven getoetst als behandeling tegen de ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomatenplanten (in de eerste 8 weken na het zaaien). De toepassing van AHL afbrekende bacteriën was altijd preventief (voor de inoculatie met plantpathogene rhizogene bacteriën). Inoculatie met rhizogene bacteriën vond plaats 10 dagen na het zaaien.

Ook zijn er effecten van verschillende behandelingen, zoals oxiderende stoffen, salicylzuur, huminezuren etc., getest op effectiviteit tegen overmatige wortelgroeisymptomen in tomatenplanten (eerste 8 weken na het zaaien) in verschillende *in vivo* biotoetsen (zie hieronder).

2.7.1 Proef 1

Proefduur: 8 weken vanaf zaaien.

Cultivars: Maxifort, Emperador en Shield.

Behandelingen: bacteriële isolaten KV462, KV807, KV864, KV1021 (Koppert BV; 10^6 kve/cm³ steenwol); endofyten uit tomaat (EndoT5, EndoT12, EndoT24, EndoT26, EndoT33; EndoT65 en EndoT69; WUR; 10^6 kve/cm³ steenwol); isolaten uit steenwol (ST1, ST2 en ST12; WUR; 10^6 kve/cm³ steenwol) en *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 (10^6 kve/cm³ steenwol), *Bacillus velezensis* FZB42 (10^6 kve/cm³ steenwol); mix *Bacillus* en *Streptomyces* (10^6 kve/cm³ steenwol). Daarnaast is er behandeling met caprolactone (5 mM, via voedingswater) toegepast. Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd. In geval van de behandelingen via voedingswater zijn de behandelingen aan het water toegevoegd en bij elk watergift toegepast.

Aantal planten per behandeling: 6 planten.

Inoculatie rhizogene *Rhizobium rhizogenes*: in week 2, na verspenen (10^8 kve/plant).

Uitvoering: november- december 2016.

2.7.2 Proef 2

Proefduur: 8 weken vanaf zaaien.

Cultivars: Maxifort.

Behandelingen: bacteriële isolaten KV462, KV807, (Koppert BV; 10^6 kve/cm³ steenwolisolaten uit steenwol (ST1, ST2; WUR; 10^6 kve/cm³ steenwol); *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 (10^6 kve/cm³ steenwol), *Bacillus velezensis* FZB42 (10^6 kve/cm³ steenwol); mix *Bacillus* en *Streptomyces* (10^6 kve/cm³ steenwol) en caprolactone (5 mM, via voedingswater). Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd. In geval van de behandelingen via voedingswater zijn de behandelingen aan het water toegevoegd en bij elk watergift toegepast.

Aantal planten per behandeling: 20 planten.

Inoculatie rhizogene *Rhizobium rhizogenes*: in week 2, na verspenen (10^8 kve/plant).

Uitvoering: januari- februari 2017.

2.7.3 Proef 3

Proefduur: 8 weken vanaf zaaien.

Cultivars: Maxifort.

Behandelingen: bacteriële isolaten KV462, KV807, (Koppert BV; 10^6 kve/cm³ steenwolisolaten uit steenwol (ST1, ST2; WUR; 10^6 kve/cm³ steenwol); *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 (10^6 kve/cm³ steenwol), *Bacillus velezensis* FZB42 (10^6 kve/cm³ steenwol); mix *Bacillus* en *Streptomyces* (10^6 kve/cm³ steenwol), *Streptomyces* k61 (10^6 kve/cm³ steenwol) en caprolactone (5 mM, via voedingswater). Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd. In geval van de behandelingen via voedingswater zijn de behandelingen aan het water toegevoegd en bij elk watergift toegepast.

Aantal planten per behandeling: 20 planten.

Inoculatie rhizogene *Rhizobium rhizogenes*: in week 2, na verspenen (10^8 kve/plant).

Uitvoering: februari- maart 2017.

2.7.4 Proef 4

Proefduur: 8 weken vanaf zaaien.

Cultivars: Maxifort.

Behandelingen: caprolactone (5 mM, via voedingswater), caprolactone (5 mM, via voedingswater) in combinatie met isolaten uit steenwol ST1, ST2 (WUR) of *B. amyloliquefaciens* QST713. Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd. In geval van de behandelingen via voedingswater zijn de behandelingen aan het water toegevoegd en bij elk watergift toegepast.

Aantal planten per behandeling: 30 planten.

Inoculatie rhizogene *Rhizobium rhizogenes*: in week 2, na verspenen (10^8 kve/plant).

Uitvoering: april-mei 2017.

2.7.5 Proef 5

Proefduur: 8 weken vanaf zaaien.

Cultivars: Maxifort.

Behandelingen: wilgenbastextract (1:100, via voedingswater), colloïdaal zilver (2 ppm; via voedingswater), wilgenbastextract (1:100, via voedingswater)+ colloïdaal zilver, caprolactone (5 mM, via voedingswater), caprolactone (5 mM, via voedingswater) in combinatie met isolaten ST1 of ST2 (WUR; 10^6 kve/cm³ steenwol). Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd. In geval van de behandelingen via voedingswater zijn de behandelingen aan het water toegevoegd en bij elk watergift toegepast.

Aantal planten per behandeling: 20 planten.

Inoculatie rhizogene *Rhizobium rhizogenes*: in week 2, na verspenen (10^8 kve/plant).

Uitvoering: augustus- september 2017.

2.7.6 Proef 6

Proefduur: 8 weken vanaf zaaien.

Cultivars: Maxifort.

Behandelingen: verschillende inoculum concentraties (10^3 , 10^4 en 10^6 kve *Rhizobium rhizogenes*/cm³ steenwolblok of via geïnfecteerde plant) met en zonder behandeling met wilgenbastextract (1:100) of caprolactone (5 mM, via voedingswater). Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd. In geval van de behandelingen via voedingswater zijn de behandelingen aan het water toegevoegd en bij elk watergift toegepast.

Aantal planten per behandeling: 20 planten.

Inoculatie rhizogene *Rhizobium rhizogenes*: in week 2, na verspenen (10^8 kve/plant).

Uitvoering: oktober- november 2017.

2.7.7 Proef 7

Proefduur: 8 weken vanaf zaaien.

Cultivars: Maxifort.

Behandelingen: caprolactone (10 mM, via voedingswater), wilgenbastextract (1:100 of 1:10 of onverdund, via voedingswater), salicylzuur (10 mM, via voedingswater), waterstofperoxide (50 ppm H₂O₂, via voedingswater), zilverperoxide (op basis van 50 ppm H₂O₂, via voedingswater), Linafer-P (Koppert BV) en COS-OGA (bespuiting 3x volgens etiket). Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd. In geval van de behandelingen via voedingswater zijn de behandelingen aan het water toegevoegd en bij elk watergift toegepast. Aantal planten per behandeling: 30 planten.

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

Uitvoering: december 2017- januari 2018.

2.7.8 Proef 8

Proefduur: 8 weken vanaf zaaien.

Cultivars: Maxifort.

Behandelingen: caprolactone (10 mM, via voedingswater), wilgenbastextract (1:100 of 1:10, via voedingswater), waterstofperoxide (50 ppm H₂O₂, via voedingswater), zilverperoxide (op basis van 50 ppm H₂O₂, via voedingswater), Linafer-P (Koppert BV), *Bacillus subtilis* uit Linafer-P (10⁶ kve/cm³ steenwol), isolaten uit steenwol: ST1 en ST2 (10⁶ kve/cm³ steenwol), PowHumus (80mg/plant). Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd. In geval van de behandelingen via voedingswater zijn de behandelingen aan het water toegevoegd en bij elk watergift toegepast. Aantal planten per behandeling: 25 planten.

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

Uitvoering: februari 2018- maart 2018.

2.7.9 Proef 9

Proefduur: 8 weken vanaf zaaien.

Cultivars: Maxifort.

Behandelingen: caprolactone (20 mM, via voedingswater), waterstofperoxide (50 ppm H₂O₂, via voedingswater), zilverperoxide (op basis van 50 ppm H₂O₂, via voedingswater), *Bacillus subtilis* uit Linafer-P (10⁶ kve/cm³ steenwol), PowHumus (400mg/plant). Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd. In geval van de behandelingen via voedingswater zijn de behandelingen aan het water toegevoegd en bij elk watergift toegepast. Aantal planten per behandeling: 25 planten.

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

Uitvoering: april 2018- mei 2018.

2.7.10 Proef 10

Proefduur: 8 weken vanaf zaaien.

Cultivars: Maxifort.

Behandelingen: endofyten uit tomaat EndoT53, EndoT55, EndoT64, EndoT71, EndoT79, EndoT91 (10⁶ kve/cm³ steenwol), Linafer-P (10⁶ kve/cm³ steenwol), *Bacillus velezensis* FZB42 (10⁶ kve/cm³ steenwol). Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd. Aantal planten per behandeling: 20 planten.

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

Uitvoering: juli 2018- augustus 2018.

2.7.11 Proef 11

Proefduur: 8 weken vanaf zaaien.

Cultivars: Maxifort.

Behandelingen: endofyten uit tomaat EndoT11, EndoT26, EndoT53, EndoT55, EndoT64, (10^7 kve/cm³ steenwol), isolaat uit steenwol ST1 (10^7 kve/cm³ steenwol), Linafer-P (10^7 kve/cm³ steenwol), *Bacillus velezensis* FZB42 (10^7 kve/cm³ steenwol). Behandelingen met micro-organismen zijn wekelijks uitgevoerd.

Aantal planten per behandeling: 20 planten.

Inoculatie rhizogene *Rhizobium rhizogenes*: in week 2, na verspenen (10^8 kve/plant).

Uitvoering: oktober 2018- november 2018.

In elke proef is de ontwikkeling van overmatige wortelgroei wekelijks beoordeeld volgens de ziekte score index van 0 (gezond, geen symptomen) t/m 3 (veel overmatige wortelgroei symptomen) (Figuur 2.2).

Voor de proeven 1 t/m 8 zijn de kasopstellingen gebruikt die weergegeven zijn in Figuur 2.3.



Figuur 2.2 Ziektescore overmatige wortelgroei: A) index 0 (geen symptomen van overmatige wortelgroei), B) index 1 (enkele atypische wortels), C) index 2 (meerdere atypische wortels) en D) score 3 (volledige oppervlak van steenwolblok bedekt met atypische wortels)

Met inoculatie via bekende hoeveelheid
cellen van *Rhizobium rhizogenes*



Met inoculatie via geïnfecteerde planten



Figuur 2.3 Kasopstelling gebruikt voor het toetsen van effect van verschillende behandelingen op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen gedurende de eerste 8 weken van een tomatenteelt.

2.8 Effect van AHL afbrekende bacteriën en andere micro-organismen op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei tijdens de teelt van tomaat

Isolaten van AHL afbrekende bacteriën en biostimulanten zijn ook getoetst als behandelingen tegen de ontwikkeling van overmatige wortelgroeisymptomen in oudere tomatenplanten (tijdens teelt op steenwolmatten).

De kasproef is uitgevoerd in een hoge-draad kascompartiment met niet recirculerend druppelsysteem met standaard tomatenvoeding en met standaard klimaatinstellingen voor de tomatenteelt (temp. 22°C; licht/donker: 16 uur licht/8 uur). Voor de teelt zijn steenwolmatten als groeimedium gebruikt. In de kas zijn 12 goten aanwezig. De 10 binnenste goten zijn gebruikt in de proef. Per rij zijn 8 librabakken met daarin één steenwolmat geplaatst. Per mat zijn 2 steenwolblokken met een tomaatplant geplaatst. Librabakken zijn gebruikt om de contaminatie tussen de behandelingen te voorkomen. Per behandeling zijn er 10 librabakken geplaatst in de kas. Tomatenplanten (cv Merlice geënt op cv Maxifort) zijn gebruikt in de teelt.

In deze proef zijn zes verschillende behandelingen met nuttige micro-organismen preventief ingezet tegen infectie van rhizogene bacterie *Rhizobium rhizogenes*. Tomatenplanten zijn vanaf het moment van zaaien behandeld met verschillende nuttige micro-organismen (wekelijks met 10^7 kve nuttige bacteriën/cm³ steenwol). Behandelingen zijn doorgezet ook tijdens de teelt in de kas (tweewekelijks). Daarnaast zijn er planten in de kas gezet voor de positieve (met inoculatie van pathogeen) en negatieve controle. Bij de start van de proef waren de tomatenplanten vier weken oud. Zes weken oude tomatenplanten, twee weken na het planten op steenwolmat, zijn geïnoculeerd met 10^8 kve van *Rhizobium rhizogenes* per plant. Effecten van de verschillende behandelingen op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen zijn gedurende vier maanden tomatenteelt gemonitord.

In mei 2019 zijn er monsters genomen van tomatenwortels en steenwolmatten, uit verschillende behandelingen, om vast te stellen of rhizogene bacteriën nog steeds aanwezig waren in het teeltsysteem en of er micro-organismen te vinden waren die *aiiA* lactonase bevatten. Daarvoor is DNA geïsoleerd uit monsters met behulp van PowerSoil DNA extractie kit (Qiagen BV) volgens de aanwijzingen van de producent.

PCR reacties zijn uitgevoerd met twee sets van primers: 1) VCF3/VCR3 (voor aanwezigheid van rhizogene plasmide) en 2) aiiAF en aiiAR (voor aanwezigheid van aiiA lactonase).

2.9 Expressie van virulentie genen in *in vitro* kweken van *Rhizobium rhizogenes*

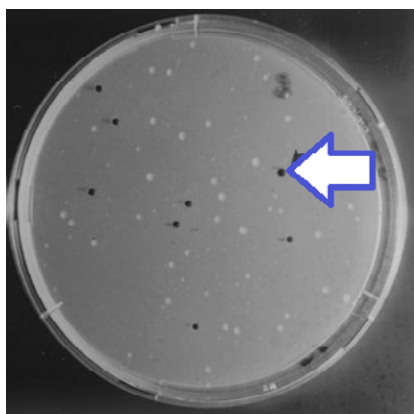
Om het effect van verschillende behandelingen op expressie van virulentie genen door *Rhizobium rhizogenes* te bestuderen is er een protocol nodig voor RT-qPCR (reverse transcriptase qPCR). In deze PCR reactie wordt eerst RNA, die aanwezig is in de monster, terug omgezet naar cDNA. Deze cDNA wordt vervolgens gebruikt voor PCR reactie om de virulentie genen die tot expressie worden gebracht in kaart te brengen.

RNA van *Rhizobium rhizogenes* is geïsoleerd uit reine kweken op AB glucose minimale minerale medium voor inductie van virulentie genen (Wang *et al.* 2015) met behulp van RNeasy Protect Bacteria reagent en RNeasy kit (Qiagen BV). Tweestaps RT-qPCR is uitgevoerd met GoTaq 2-step RT-qPCR protocol van Promega BV. In deze qPCR is er gekeken naar expressie van virulentie genen: virA, virB, virF en virG en housekeeping gen ATU_0972 (Rana *et al.* 2016).

3 Resultaten

3.1 Isolatie en identificatie van rhizogene *Rhizobium*

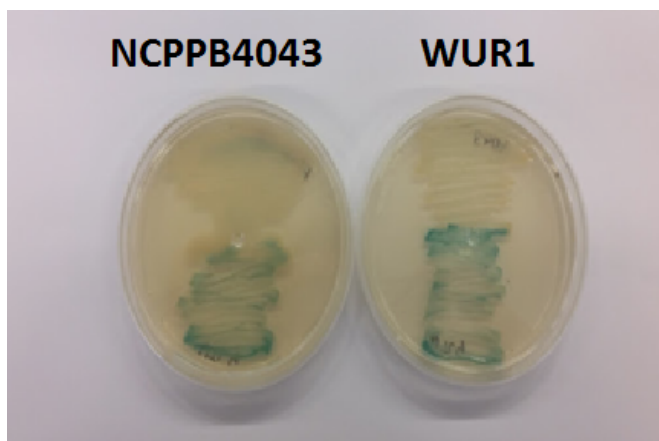
Er zijn verschillende isolaten van rhizogene bacteriën verkregen na isolatie uit tomatenwortels (Figuur 3.1). Deze isolaten zijn rein opgekweekt. De PCR check op virulentie genen van rhizogene bacteriën was positief. Vervolgens zijn deze isolaten geïdentificeerd op basis van sequentie van 16S rDNA gen als *Rhizobium rhizogenes*. Zes verschillende isolaten zijn getest op hun pathogeniciteit op tomaat met als controle een inoculatie met *Rhizobium radiobacter* NCPPB 4043. Alle isolaten bleken tomatenplanten te kunnen infecteren maar bij inoculatie met isolaat WUR1 ontwikkelde de planten de ergste symptomen (vaak ziektescore 3) daarom is dit isolaat gekozen om toe te passen in de proeven in de kas.



Figuur 3.1 Isolatie van rhizogene *Rhizobium* isolaten op MG medium met tellurite.

Rhizobium radiobacter NCPPB 4043 en *Rhizobium rhizogenes* WUR1 zijn ook getest op productie van acyl homoserine lactones (AHL's; signaalstoffen). Omdat directe meting van AHL moeilijk is, is er gebruik gemaakt van een indirecte methode met de indicator stam *Agrobacterium tumefaciens* NTL4. Aanwezigheid van geproduceerde signaalstoffen worden op indirecte manier zichtbaar gemaakt door *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 te kweken in dezelfde agarplaat. *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 produceert zelf geen AHL's maar reageert op de exogene AHL's die aanwezig zijn in het medium. In aanwezigheid van AHL's kan dan *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 X-gal in het medium omzetten naar blauwe kleurstof (indole).

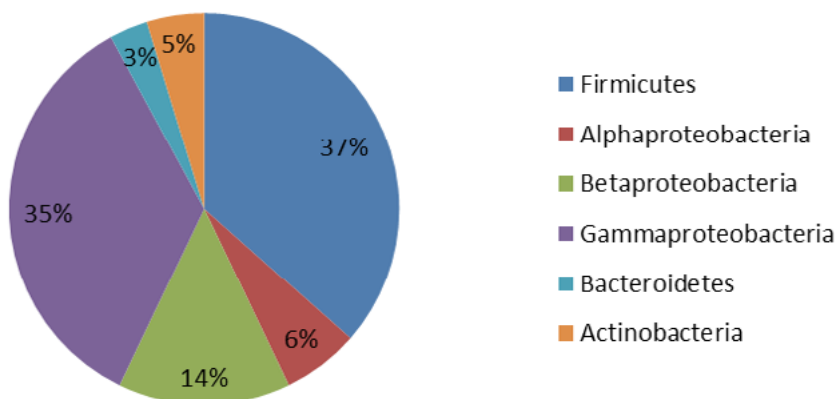
Uit deze check blijkt dat beide, *Rhizobium radiobacter* NCPPB 4043 en *Rhizobium rhizogenes* WUR1, acyl homoserine lactones (AHL's) produceren (Figuur 3.2).



Figuur 3.2 Productie van blauwe kleurstof (indole) door *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 in aanwezigheid van de signaalstoffen (AHL's) geproduceerd door *Agrobacterium radiobacter* NCPPB4043 en *Rhizobium rhizogenes* isolaat WUR1.

3.2 Isolatie en karakterisatie van endofyten uit tomaat en isolaten uit steenwol

Er zijn 63 bacteriële endofyten geïsoleerd uit tomaatweefsel. Deze isolaten zijn geïdentificeerd op basis van sequentie van 16S rDNA gen. Uit analyse blijkt dat ongeveer 1/3 van de kweekbare endofyten hoort bij fyllum *Firmicutes*. Rond 55% van endofyten waren *Proteobacteria* (fyllum), met duidelijke dominantie van gammaproteobacteria (35% van alle endofyten) (Figuur 3.3).



Figuur 3.3 Taxonomische verdeling van endofytische bacteriële isolaten verkregen uit tomaat.

Taxonomische identiteit van alle endofyten is weergegeven in Tabel 3.1.

Alle endofyten die bij *Firmicutes* horen zijn vervolgens gecheckt met PCR op aanwezigheid van lactonase *aiiA* genen in hun DNA. Deze lactonase wordt specifiek geproduceerd door de bacteriën van het *Bacillus* geslacht en verwanten daarvan. PCR producten zijn vervolgens met gel elektroforese gecheckt of ze van de juiste lengte zijn die correspondeert met het *aiiA* lactonase gen (rond 753 bp). PCR producten zijn ter controle gestuurd voor sequencing om te checken of PCR product echt een *aiiA* lactonase gen is.

Uit analyse in gel elektroforese blijkt dat niet alle endofyten, die als *Bacillus* geïdentificeerd zijn, *aiiA* lactonase (Figuur 3.4) bevatten. In totaal zijn er 10 endofyten met *aiiA* lactonase geïdentificeerd (EndoT1, Endo3, EndoT5, EndoT12, EndoT33, EndoT35, EndoT46, EndoT53, EndoT66, EndoT91).



Figuur 3.4 Voorbeeld van gel elektroforese van PCR producten uit reactie met primers sets voor lactonase *aiiA* met DNA van endofyten uit tomaat. M-DNA marker, cijfers geven de nummer van endofyt aan.

Sommige endofyten bevatten sequenties die identiek zijn aan een ander enzym, acyl-homoserine lactone acylase (*qsdA* gen). In totaal zijn *qsdA* genen gevonden in 9 endofyten (EndoT10, EndoT11, EndoT24, EndoT26, EndoT31, EndoT64, EndoT65, EndoT67, EndoT69). Ook micro-organismen uit commerciële producten bevatten *qsdA* gen (*Bacillus amyloliquefaciens* QST713 en *Bacillus velezensis* FZB42).

Er zijn 15 *Bacillus* isolaten verkregen uit gebruikte steenwolmatten. Zes van deze isolaten hebben ook *aiiA* lactonase genen. Omdat 4 uit 6 isolaten (ST12, ST14, ST15, ST16) geïdentificeerd zijn als *Bacillus cereus*, mogelijk humane pathogeen, zijn alleen isolaten ST1 en ST2 gebruikt in verdere onderzoek. ST1 en ST2 zijn geïndiceerd als *Bacillus thuringensis*.

Isolaten KV462, KV807, KV864, KV1021 (Koppert BV) hebben geen *aiiA* lactonase genen.

Tabel 3.1

Identificatie van bacteriële endofyten uit tomaat.

	Organisme die endofyt meest op lijkt	Fylum/klasse
EndoT1	Bacillus sp. PVS08	Firmicutes
EndoT3	Bacillus sp. L4	Firmicutes
EndoT4	Agrobacterium sp. A2-S6	Proteobacteria; Alphaproteobacteria
EndoT5	Bacillus thuringiensis strain Ph_26B1	Firmicutes
EndoT6	Stenotrophomonas sp. NCCP-572	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT9	Bacillus subtilis	Firmicutes
EndoT10	Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum	Firmicutes
EndoT11	Bacillus subtilis strain GPA1	Firmicutes
EndoT12	Bacillus amyloliquefaciens strain H49	Firmicutes
EndoT13	Pseudomonas sp. LJ20	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT14	Proteus vulgaris strain LTY1	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT16	Achromobacter denitrificans	Proteobacteria; Betaproteobacteria
EndoT17	Proteus vulgaris strain JXYFP1	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT18	Proteus mirabilis HI4320	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT19	Pseudomonas sp.	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT20	Pseudomonas aeruginosa strain CNU082141	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT23	Alcaligenes faecalis	Proteobacteria; Betaproteobacteria
EndoT24	Bacillus amyloliquefaciens strain H49	Firmicutes
EndoT26	Bacillus subtilis strain VITVP4	Firmicutes
EndoT27	Bacillus sp. B-20	Firmicutes
EndoT28	Paenibacillus illinoisensis strain F24	Firmicutes
EndoT31	Bacillus sp. AR491	Firmicutes
EndoT33	Bacillus cereus strain SWFU02	Firmicutes
EndoT34	Alcaligenes sp. strain sz8	Proteobacteria; Betaproteobacteria
EndoT35	Bacillus sp. ZK14	Firmicutes
EndoT36	Uncultured Stenotrophomonas sp. clone 129	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT37	Citrobacter freundii	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT38	Aureimonas sp. S-NaCl-8	Proteobacteria; Alphaproteobacteria
EndoT41	Stenotrophomonas sp. A18(2008)	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT43	Alcaligenes faecalis	Proteobacteria; Betaproteobacteria
EndoT44	Arthrobacter sp. enrichment culture clone TVH.003.O3.1	Actinobacteria
EndoT46	Bacillus sp 210	Firmicutes
EndoT52	Arthrobacter arilaitensis RE117	Actinobacteria
EndoT53	Bacillus sp. L-11	Firmicutes
EndoT54	Uncultured Ochrobactrum sp. clone MFC63B02	Proteobacteria; Alphaproteobacteria
EndoT55	Uncultured Ochrobactrum sp. clone Acro242	Proteobacteria; Alphaproteobacteria
EndoT64	Bacillus amyloliquefaciens strain H49	Firmicutes

	Organisme die endofyt meest op lijkt	Fylum/klasse
EndoT65	Bacillus sp. AR491	Firmicutes
EndoT66	Bacillus sp. L-4	Firmicutes
EndoT67	Bacillus sp. CCF7	Firmicutes
EndoT69	Bacillus vallismortis strain ST47	Firmicutes
EndoT70	Arthrobacter arilaitensis Re117	Actinobacteria
EndoT71	Chryseobacterium sp. ANSL	Bacteroidetes
EndoT73	Paenibacillus illinoisensis strain F24	Firmicutes
EndoT74	Stenotrophomonas sp. NCCP-572	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT75	Uncultured Stenotrophomonas sp. clone F5oct.3	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT76	Alcaligenes sp. strain sz8	Proteobacteria; Betaproteobacteria
EndoT77	Pseudomonas geniculata strain XJUH3	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT78	Stenotrophomonas maltophilia strain SZH14	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT79	Pseudomonas sp. M78	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT80	Chryseobacterium sp. ANSL	Bacteroidetes
EndoT81	Proteus vulgaris strain LTY1	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT82	Uncultured Stenotrophomonas sp. clone F5oct.3	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT84	Stenotrophomonas sp. JA139	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT85	Uncultured Stenotrophomonas sp. clone F5oct.3	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT87	Uncultured Stenotrophomonas sp. clone F5oct.3	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT88	Uncultured bacterium clone 3-42028	Proteobacteria; Betaproteobacteria
EndoT90	Uncultured bacterium clone 3-42028	Proteobacteria; Betaproteobacteria
EndoT91	Bacillus sp. PSM 6	Firmicutes
EndoT92	Pseudomonas sp. M78	Proteobacteria; Gammaproteobacteria
EndoT93	Alcaligenes sp. enrichment culture clone CCNWSP30	Proteobacteria; Betaproteobacteria
EndoT94	Alcaligenes sp. DYJL52	Proteobacteria; Betaproteobacteria
EndoT95	Uncultured Stenotrophomonas sp. clone F5oct.3	Proteobacteria; Gammaproteobacteria

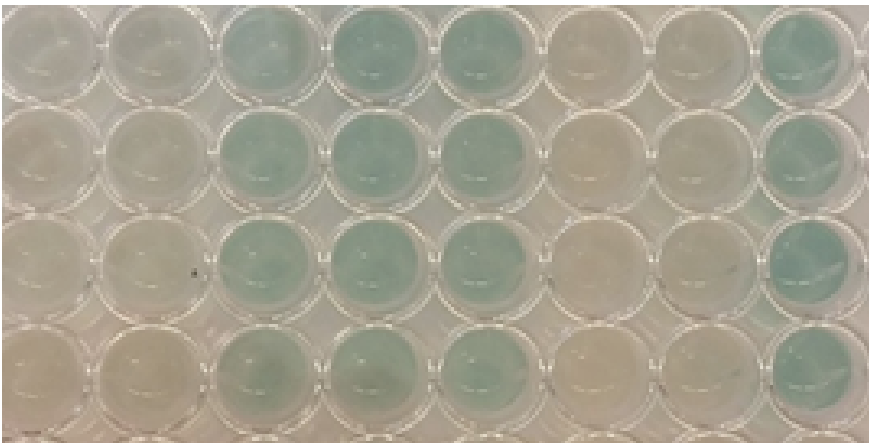
3.3 Afbraak van signaalstoffen (AHL's) door endofyten en isolaten uit steenwol

Een aantal van de endofyten, isolaten uit steenwol en micro-organismen uit commerciële producten zijn getest in vitro op afbraak van acyl-homoserine lactones van *Rhizobium rhizogenes* gebruik makend van indirecte test met *Agrobacterium tumefaciens* NTL4.

Voorbeelden van resultaten van deze test zijn te zien in Fig.3.5.

In de controle behandeling ontwikkeld zich een blauwe/groene verkleuring in de tijd. Dit is het resultaat van indole productie door *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 in aanwezigheid van signaalstoffen (AHL's) van *Rhizobium rhizogenes*. Als er kleurontwikkeling plaatsvindt in behandeling met endofyt/isolaat uit steenwol/micro-organisme uit commercieel product dan betekent dit dat er geen afbraak van *Rhizobium* signaalstoffen heeft plaatsgevonden in die behandeling. Lichtere kleur/wit verkleuring wijst op afbraak van *Rhizobium* signaalstoffen door bepaalde bacterie.

B+S 807 462 864 1021 QST713 FZB42 C



Figuur 3.5 Acyl-homoserine lactone (AHL's) afbraak door verschillende micro-organismen. Blauw kleur- geen afbraak; wit- afbraak van AHL's; C-controle, B+S-Bacillus en Streptomyces mix; 462, 807, 864, 1021- isolaten van Koppert BV, QST713- *Bacillus amyloliquefaciens* QST713, FZB42- *Bacillus velezensis* FZB42.

Verskillende endofyten (EndoT1, Endo3, EndoT5, EndoT11, EndoT12, EndoT26, EndoT33, EndoT35, EndoT46, EndoT53, EndoT64, EndoT65, EndoT66, EndoT67, EndoT69, EndoT91) en isolaten uit steenwol (ST1, ST2, ST12, ST14, ST15, ST16) zijn in staat om *in vitro* AHL's af te breken (Tabel 3.2).

Ook isolaten KV807, *Bacillus amyloliquefaciens* QST713, *Bacillus velezensis* FZB42 kunnen de AHL's *in vitro* afbreken (Fig. 3.5).

Tabel 3.2

In vitro afbraak van acyl-homoserine lactones (AHL's) van *Rhizobium rhizogenes* door verschillende bacteriële isolaten.

Bacteriële isolaat	aanwezigheid aiiA gen	aanwezigheid van qsdA gen	<i>in vitro</i> AHL's afbraak
EndoT1	+	-	+
Endo3	+	-	+
EndoT5	+	-	+
EndoT11	-	+	+
EndoT12	+	-	++
EndoT26	-	+	++
EndoT33	+	-	+
EndoT35	+	-	+
EndoT46	+	-	++
EndoT53	+	-	++
EndoT64	-	+	+
EndoT65	-	+	+
EndoT66	-	-	+
EndoT67	-	+	+
EndoT69	-	+	+
EndoT91	+	-	+
ST1	+	-	++
ST2	+	-	++
ST12	+	-	++
ST14	+	-	++
ST15	+	-	++
ST16	+	-	++
Bacillus FZB42	-	+	++
Bacillus QST713	-	+	++
KV462	-	-	-
KV807	-	-	++
KV864	-	-	-
KV1021	-	-	-

+ - gedeeltelijke afbraak AHL's

++ - volledige afbraak AHL's

3.4 Effecten van micro-organismen en verschillende andere behandelingen op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei in jonge tomatenplanten

3.4.1 Proef 1

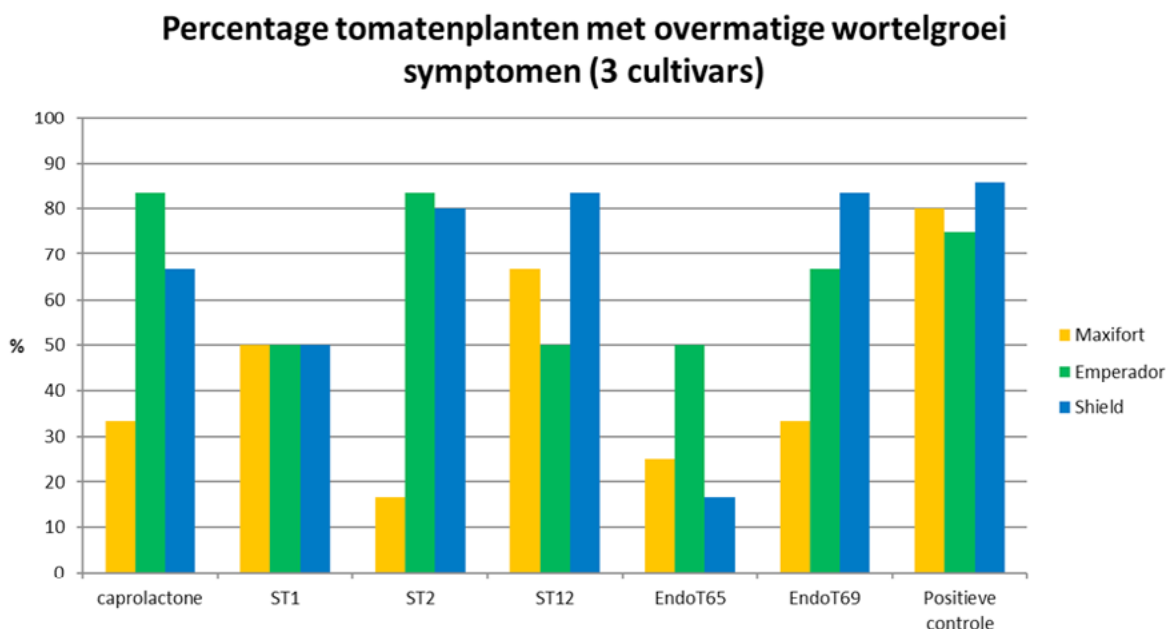
In de eerste proef zijn de effecten van inoculatie met verschillende micro-organismen op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in drie tomaatonderstam cultivars (Maxifort, Emperador en Shield) nagegaan.

In het eerste deel van het experiment hadden de isolaten ST1 en EndoT65 het meest significante effect op het percentage tomatenplanten met overmatige wortelgroei symptomen (Figuur 3.6). Diverse cultivars reageerden verschillend op de inoculatie met micro-organismen, bijvoorbeeld isolaat ST2 had een heel goed effect op OWG in cultivar Maxifort, maar geen effect in Emperador of Shield. Hetzelfde geldt voor caprolactone, die toegevoegd is om AHL afbrekende micro-organismen te stimuleren die van nature aanwezig zijn rond de wortels. Caprolactone had effect in cv Maxifort maar niet in cv Emperador.

Ook in het tweede deel van het experiment ontwikkelde overmatige wortelgroei zich goed. In alle drie de onderstammen was het percentage van zieke planten in de onbehandelde (geïnoculeerde controle) echter verschillend, tussen 30% (cv Shield) en 100% (cv Emperador). In dit experiment leek onderstam cv Emperador het meest gevoelig (Tabel 3.7). Behandelingen met *Bacillus* FZB42, *Bacillus* QST713, KV462, KV807, KV1021, EndoT5, EndoT12, EndoT26 resulteerde in lagere percentages van besmette planten in tenminste 2 van de 3 onderstammen (Figuur 3.7).

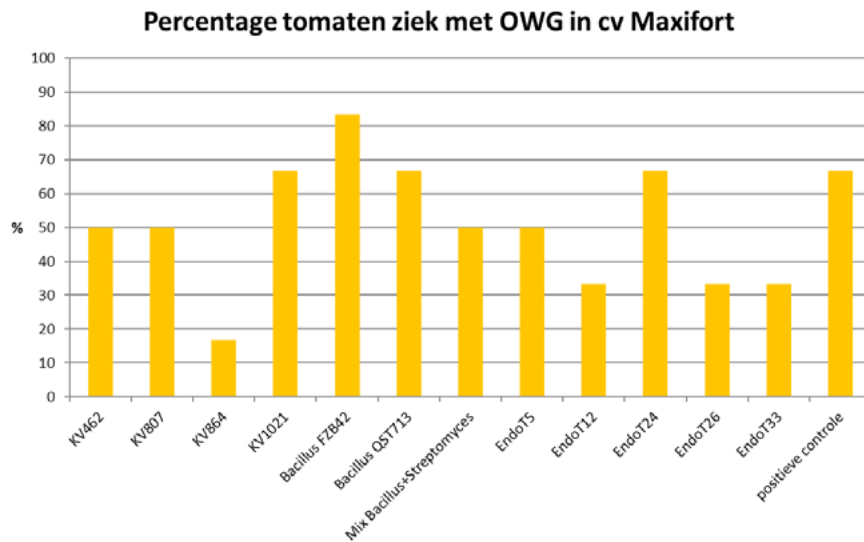
In verband met het lage aantal planten per behandeling (6) zijn er geen, duidelijke, statistisch significante verschillen gevonden tussen de behandelingen in de cultivars Emperador en Shield.

Daarom is er een keuze gemaakt voor cv Maxifort als onderstam voor de volgende proeven waarbij met een groter aantal planten per behandeling is gewerkt.

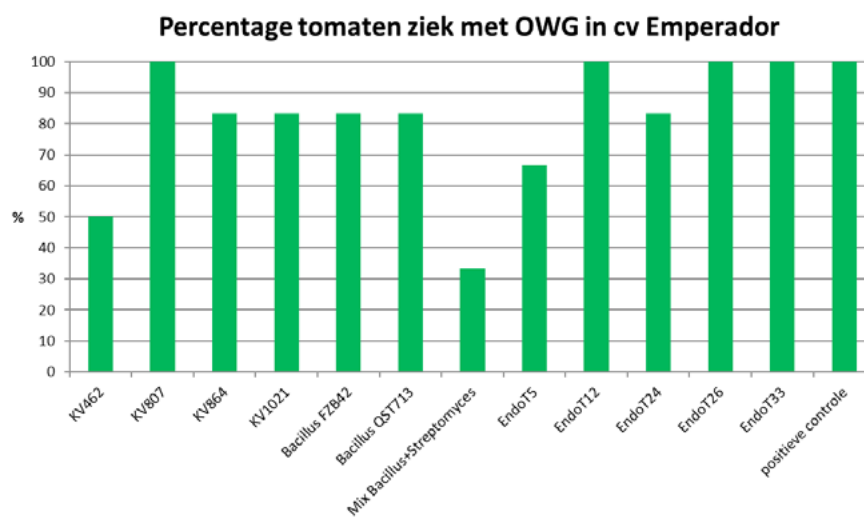


Figuur 3.6 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in drie tomaatonderstammen in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen

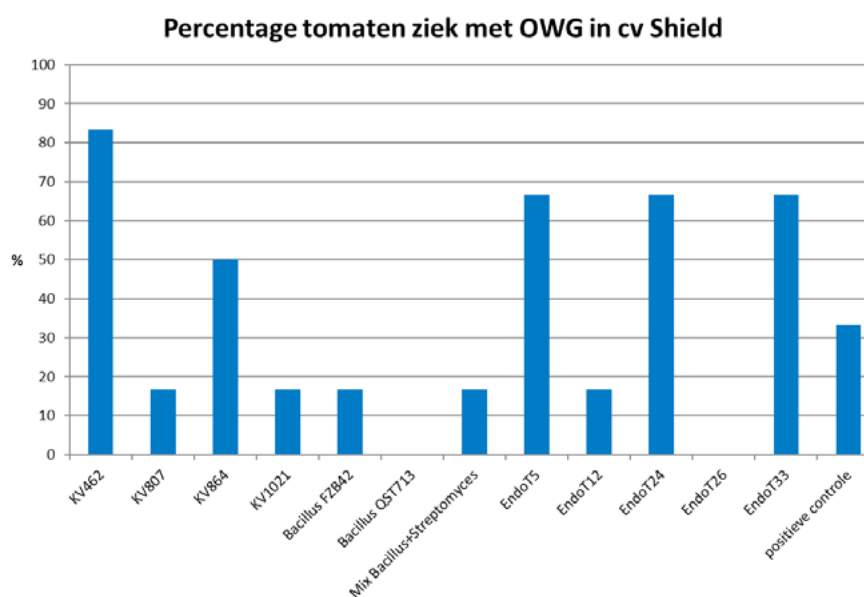
A



B



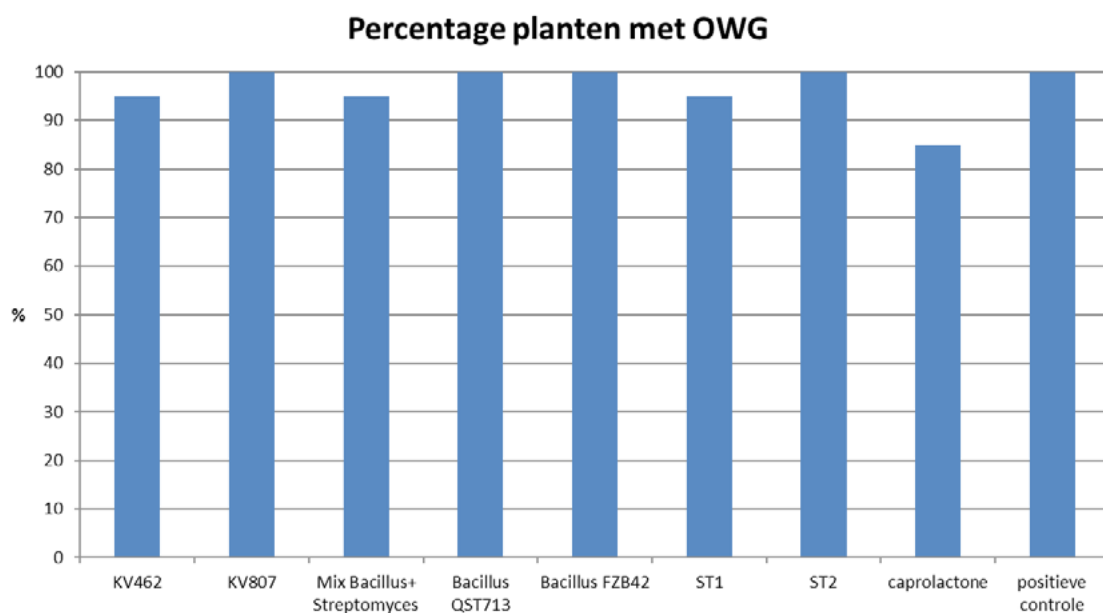
C



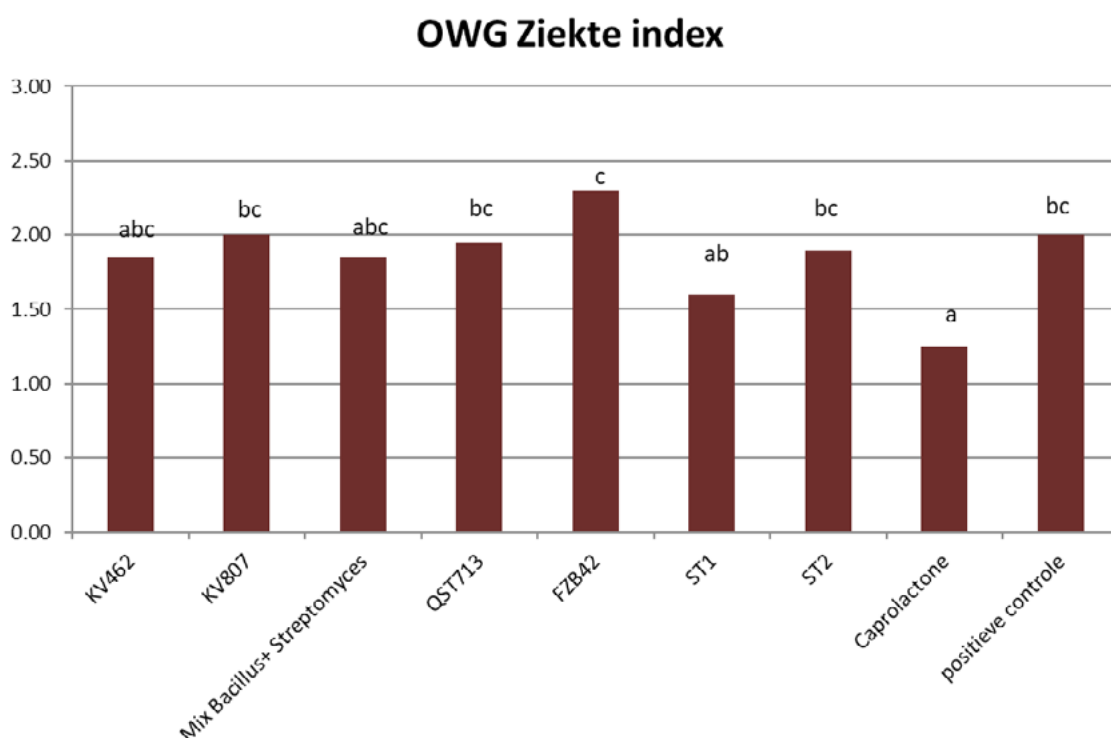
Figuur 3.7 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in drie tomaatonderstammen in combinatie met een behandeling met verschillende micro-organismen; OWG- overmatige wortelgroei.

3.4.2 Proef 2

In deze proef is het effect van de verschillende behandelingen met micro-organismen beoordeeld op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomatenplanten cv Maxifort. Alleen de behandeling met caprolactone had een effect op het percentage van geïnfecteerde planten (85% ten opzichte van 100% in positieve controle) (Figuur 3.8). Toevoegen van caprolactone heeft als doel de micro-organismen, die acyl homoserine lactones (AHL's) afbreken en van nature aanwezig zijn rondom de wortels van tomaat, te stimuleren. Toevoeging van caprolactone heeft een significant effect gehad op de gemiddelde ziekte score (1,25 op 3,0, in plaats van 2,0 in onbehandelde, geïnfecteerde controle) (Figuur 3.9).



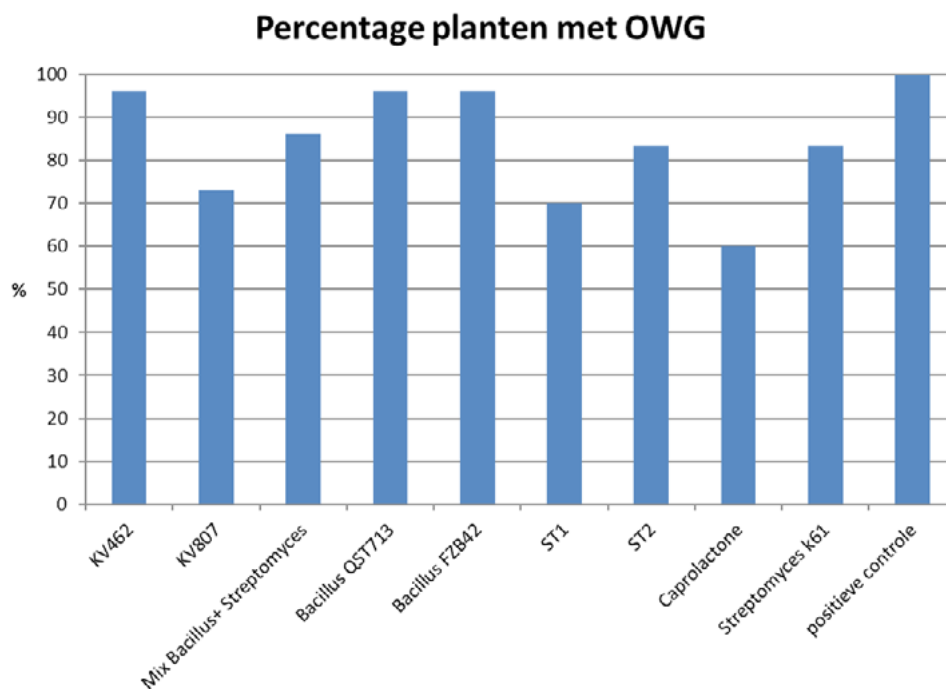
Figuur 3.8 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen of caprolactone.



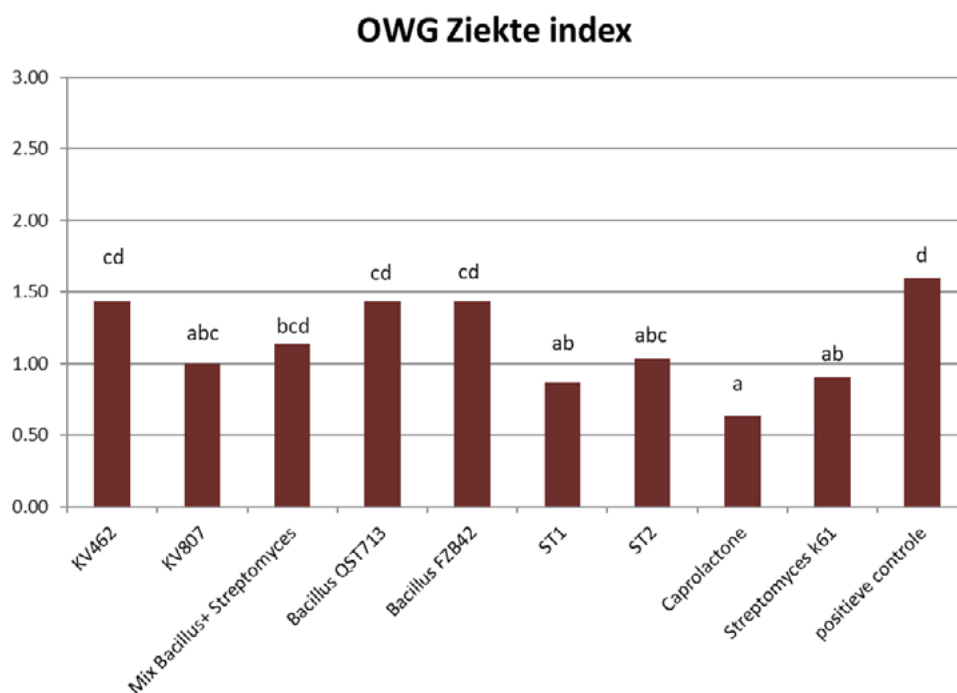
Figuur 3.9 Gemiddelde ziekte score van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen of caprolactone (n=20).

3.4.3 Proef 3

In deze proef is nogmaals het effect van verschillende behandelingen met micro-organismen beoordeeld op ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomatenplanten cv Maxifort. In deze proef hadden behandelingen met caprolactone, KV807, ST1, ST2 en Streptomyces k61 een significant effect op het percentage van geïnfecteerde planten (tussen 60% en 83% ten opzichte van 100% in positieve controle) (Figuur 3.10). Deze behandelingen hadden ook een significant effect op de gemiddelde ziekte score (Figuur 3.11).



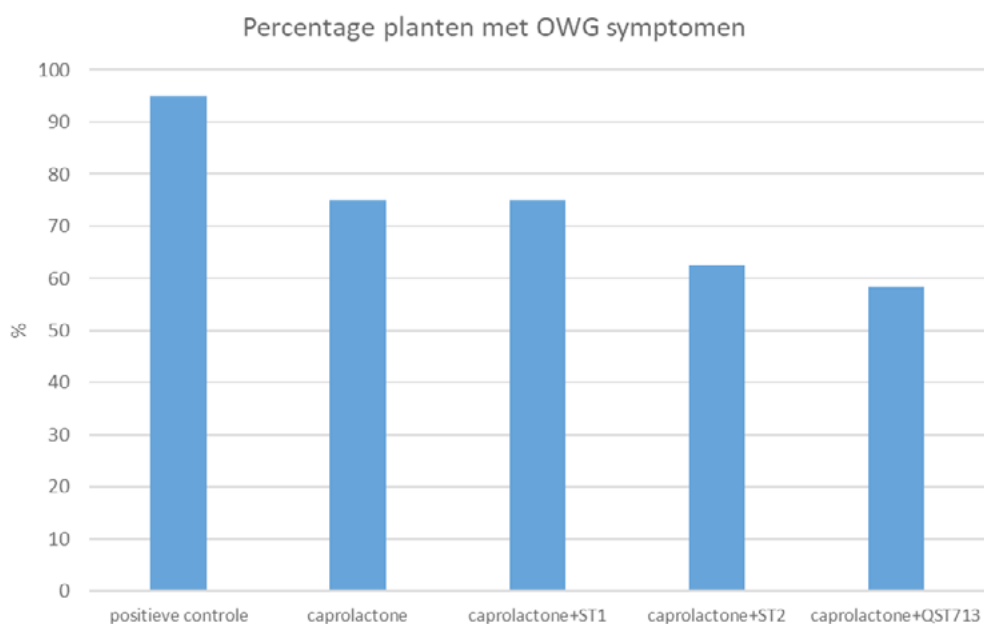
Figuur 3.10 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen of caprolactone.



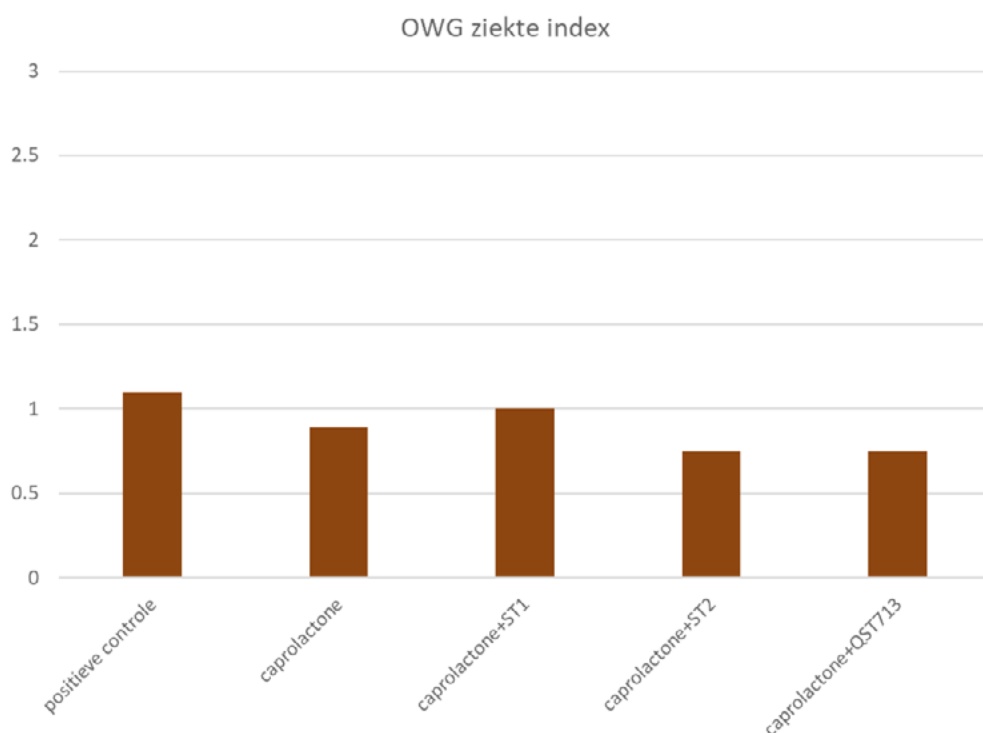
Figuur 3.11 Gemiddelde ziekte score van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen of caprolactone (n=30)

3.4.4 Proef 4

In deze proef is een combinatie van caprolactone en AHL afbrekende isolaten (ST1 en ST2) of *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 getest op effectiviteit tegen de ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomatenplanten cv Maxifort. Zowel de behandelingen met caprolactone als de combinatie behandelingen hadden een significant effect op de ziekteontwikkeling. Behandeling met caprolactone en *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 bleek het meest effectief (net onder 60% geïnfecteerde planten ten opzichte van 95% in positieve controle) (Figuur 3.12). Alleen behandelingen met caprolactone met ST2 of *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 hebben een significant effect gehad op de gemiddelde ziekte score (Figuur 3.13).



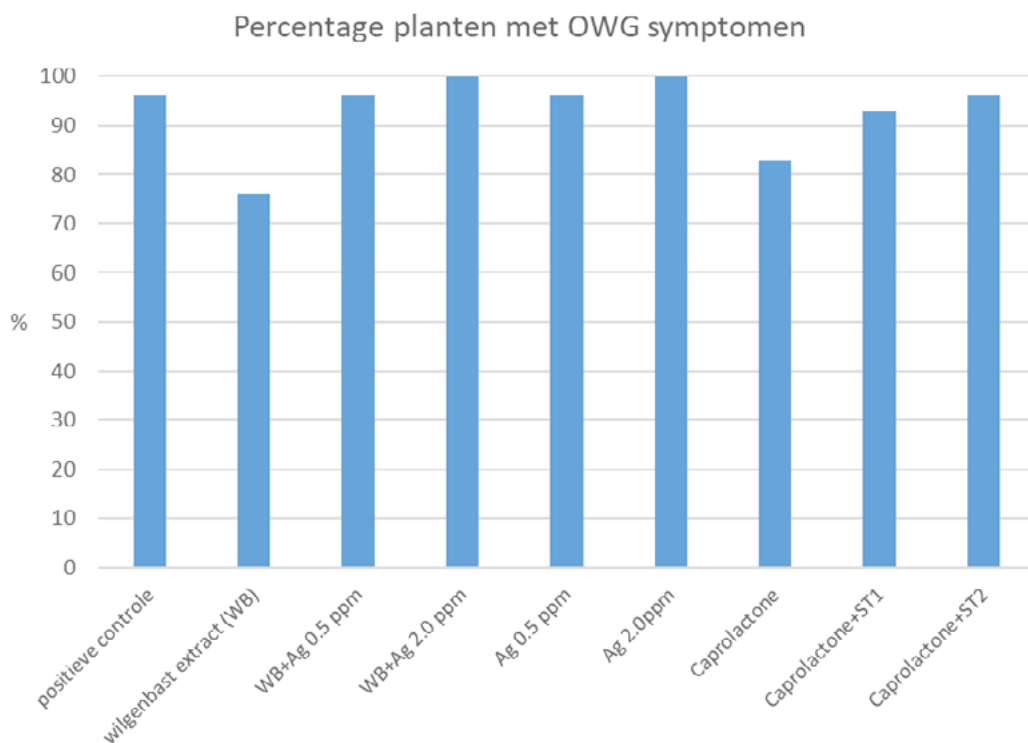
Figuur 3.12 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen of caprolactone.



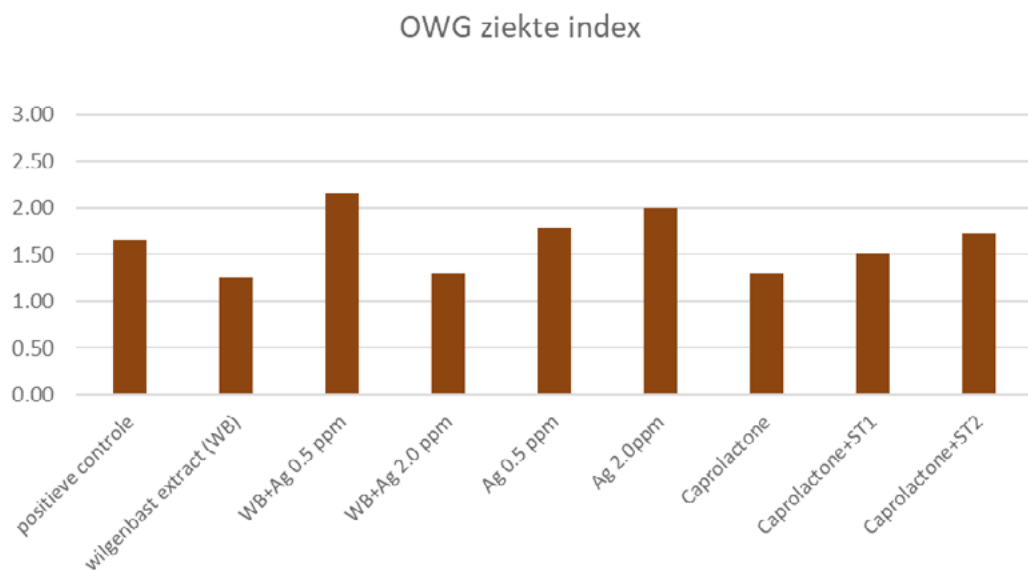
Figuur 3.13 Gemiddelde ziekte score van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen of caprolactone (n=30).

3.4.5 Proef 5

Proef 5 had als doel de beoordeling van de effecten van chemische toevoegingen, zoals wilgenbast extract en zilver op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei in tomatenplanten. Wilgenbast extract bevat grote hoeveelheden van salicilin. Salicilin is een precursor van salicylzuur. Salicylzuur is bekend als een van de chemische verbindingen die de communicatie tussen rhizogene bacterien (quorum sensing) kan verstoren *in vitro* (op labschaal). In deze proef hadden alleen wilgenbast extract en alleen caprolactone een licht effect op ziekteontwikkeling (Figuur 3.14 en Figuur 3.15).



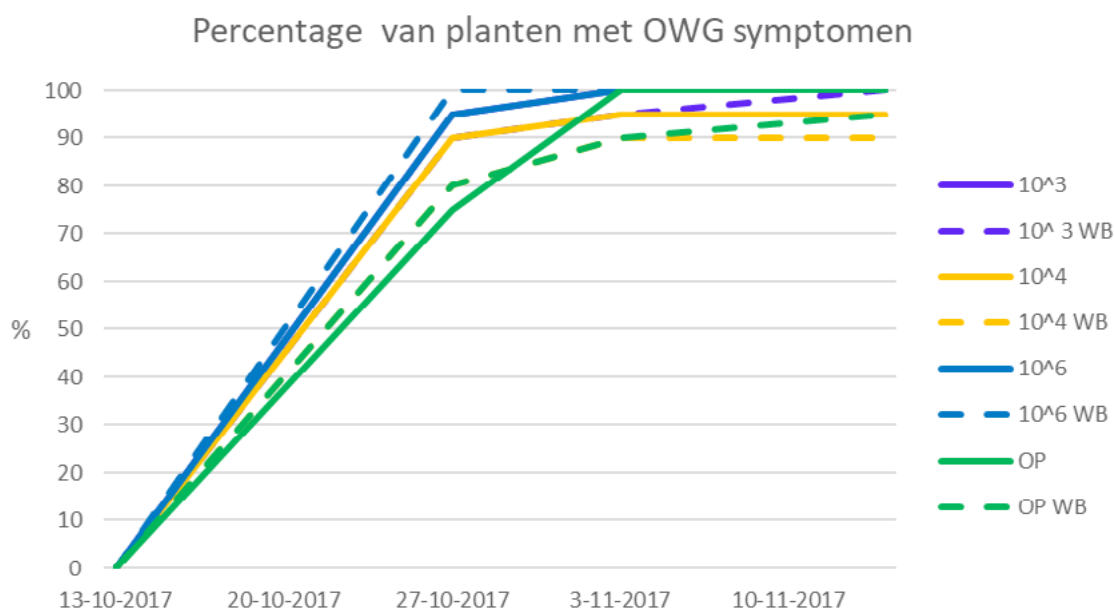
Figuur 3.14 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen of caprolactone of WB- wilgenbast extract, Ag-zilver.



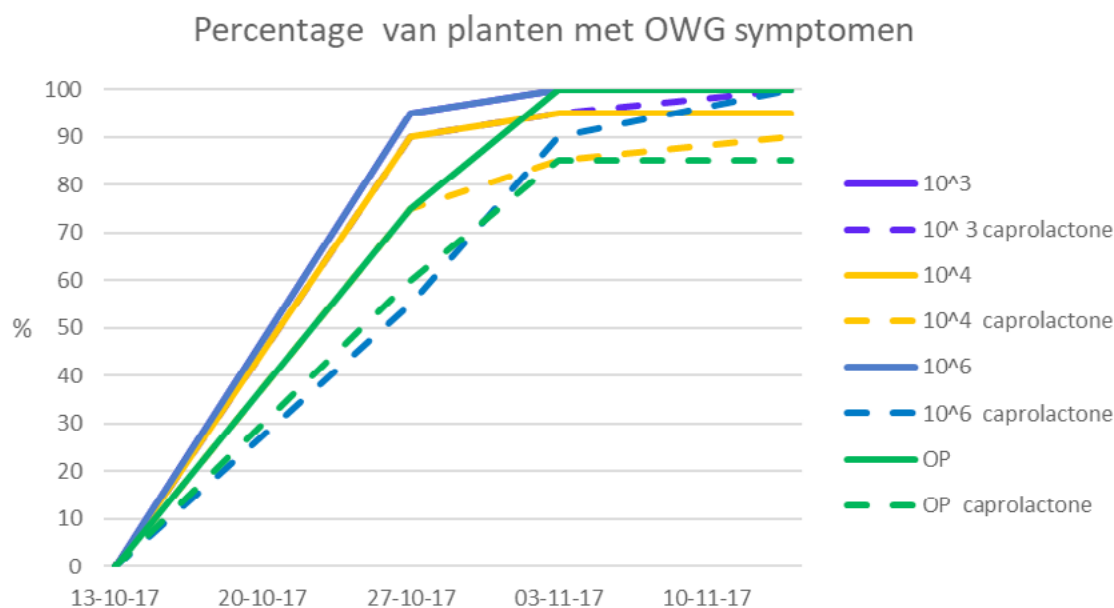
Figuur 3.15 Gemiddelde ziekte index van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen of caprolactone of WB- wilgenbast extract, Ag-zilver (n=20).

3.4.6 Proef 6

Verschillende inoculum dichtheden zijn getest op de snelheid van symptomatisch infectie in jonge tomatenplanten. Uit de proef blijkt dat na twee weken tijd meer dan 90% van de tomatenplanten symptomatisch was in behandelingen met een start inoculum van 10^3 , 10^4 of 10^6 *Rhizobium rhizogenes* cellen per cm^3 steenwol (Figuur 3.16 en Figuur 3.17). Alleen bij de infectie methode via oudere, symptomatische planten was de percentage symptomatische planten lager, maar nog steeds hoog (bijna 80%). Caprolactone had een significant, vertragend effect op de ontwikkeling van symptomen. Dit effect was na drie weken helaas niet meer zichtbaar (Figuur 3.17).



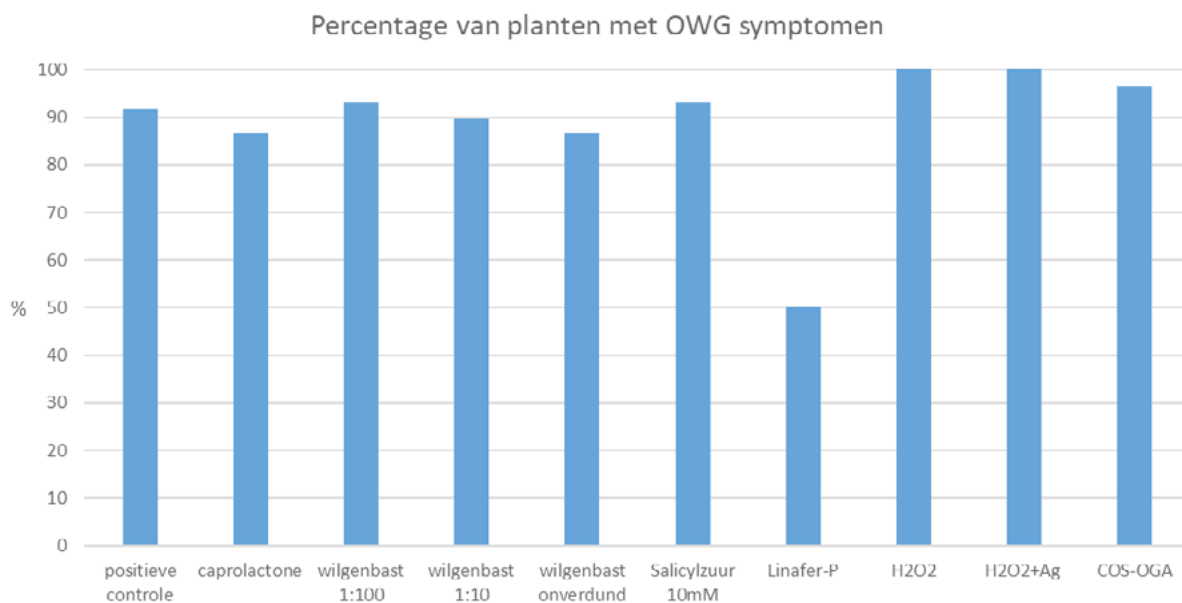
Figuur 3.16 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort behandelingen met verschillende start inoculum dichtheden (10^3 , 10^4 en 10^6 kve/ cm^3 of via oudere geïnfecteerde planten-OP) en behandeling met wilgenbast extract (WB)



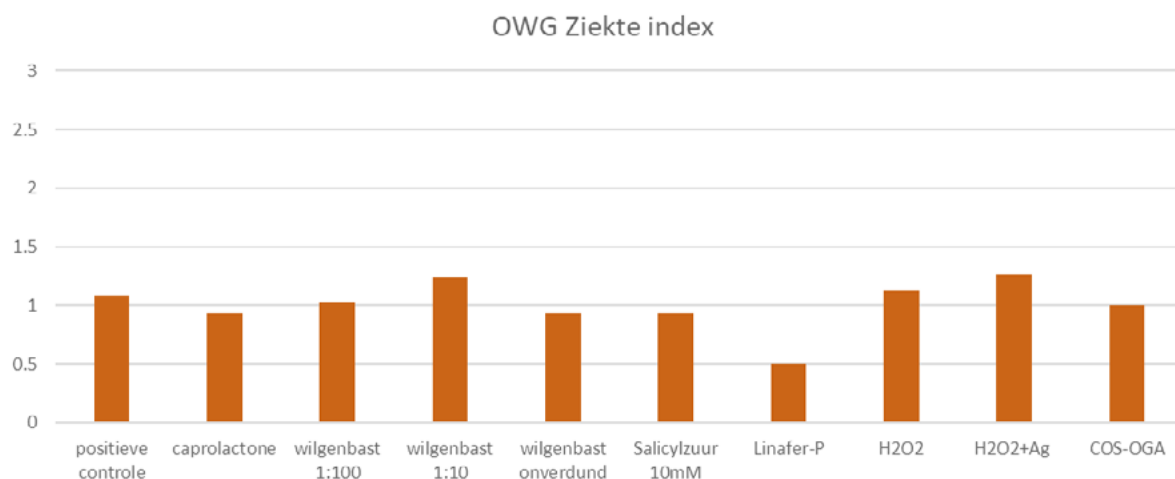
Figuur 3.17 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort behandelingen met verschillende start inoculum dichtheden (10^3 , 10^4 en 10^6 kve/ cm^3 of via oudere geïnfecteerde planten-OP) en behandeling met wilgenbast extract (WB)

3.4.7 Proef 7

In deze proef zijn verschillende behandelingen getest met salicylzuur of precursoren daarvan (salicilin in wilgenbast extract). Bovendien is ook waterstofperoxide met/zonder zilver toegepast om de rhizogene bacteriën af te doden. COS-OGA is toegepast als elicitor van systemisch verworven resistentie (eng. SAR- systemic acquired resistance). Alleen een behandeling met Linafer-P (*Bacillus subtilis*+ humine/fulvinezuren) was effectief tegen de ontwikkeling van overmatige wortelgroei (Figuur 3.18 en Figuur 3.19)



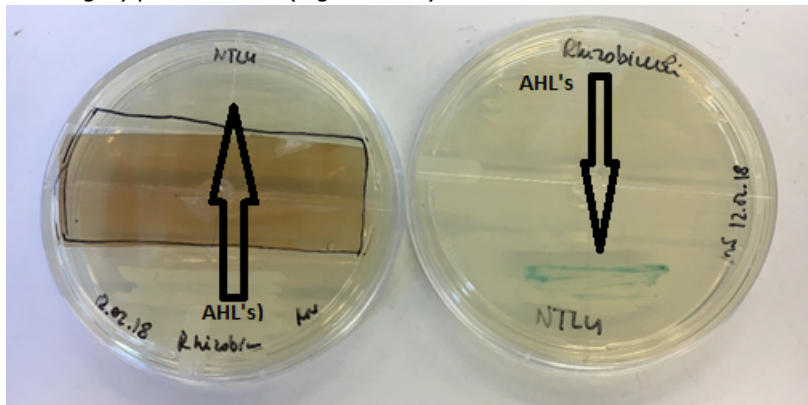
Figuur 3.18 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met of WB- wilgenbast extract, Ag-zilver en waterstof peroxide.



Figuur 3.19 Gemiddelde ziekte index van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met of WB- wilgenbast extract, Ag-zilver en waterstof peroxide (n=30).

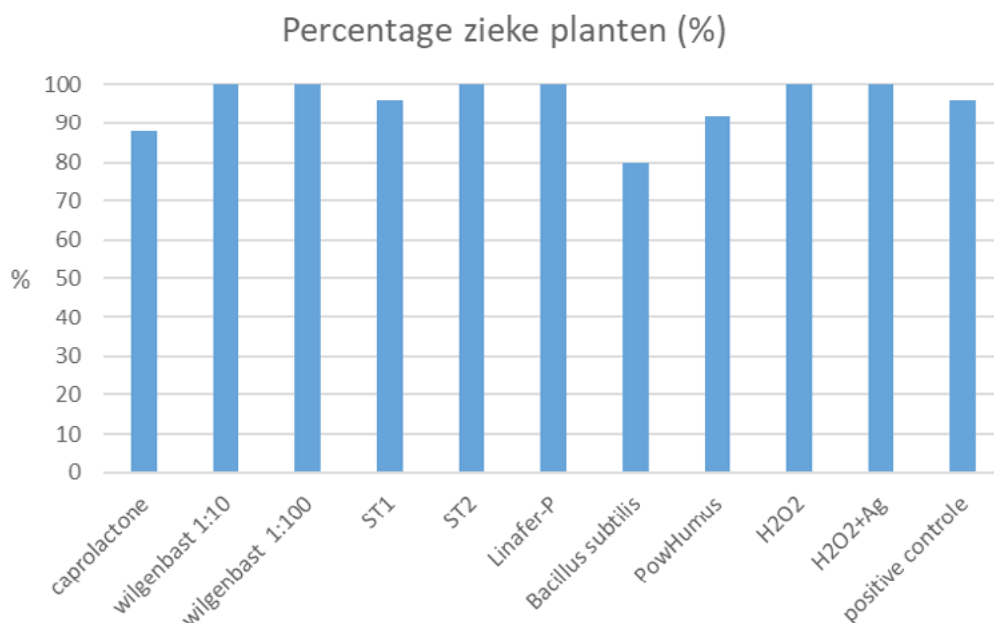
3.4.8 Proef 8

In deze proef zijn o.a. behandelingen met humine/fulvinezuren getest. Uit een labschaal experiment blijkt dat het oplossen van humine/fulvinezuren in het agar medium een effect heeft op diffusie van acyl homoserine lactones (AHL's) van *Rhizobium rhizogenes* in agar medium. Een laagje medium met humine/fulvinezuren absorbeerde de AHL's. Als resultaat dat de indicator stam *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 geen indole (uit X-gal in de agar) produceerde (Figuur 3.20).

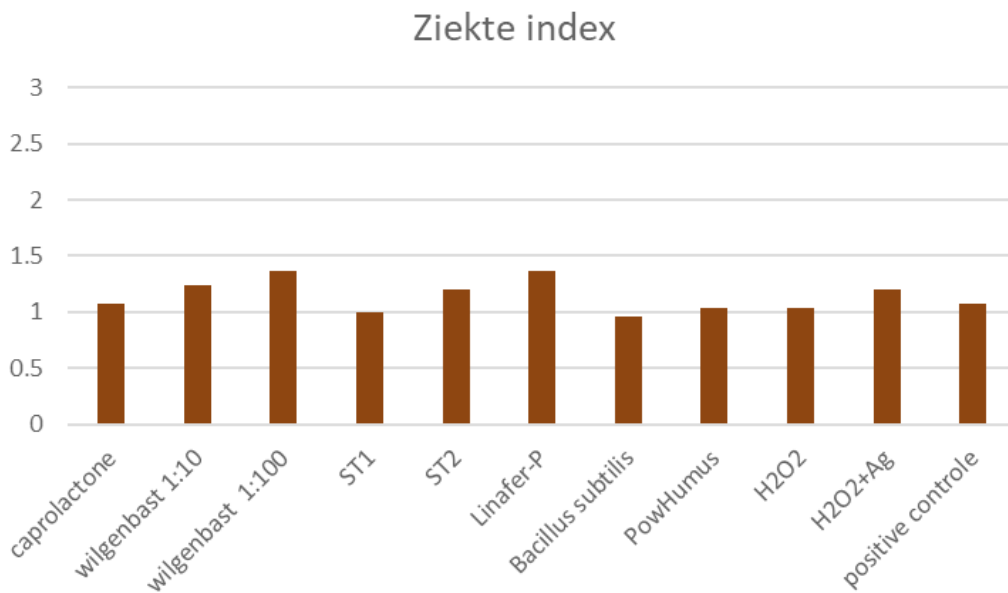


Figuur 3.20 Verspreiding van acyl-homoserine lactones geproduceerd door *Rhizobium rhizogenes* in het agarmedium en invloed van huminezuren daarop.

Helaas bleek de behandeling met humine/fulvinezuren niet effectief tegen de ontwikkeling van overmatige wortelgroei in planta (Figuur 3.21 en Figuur 3.22).



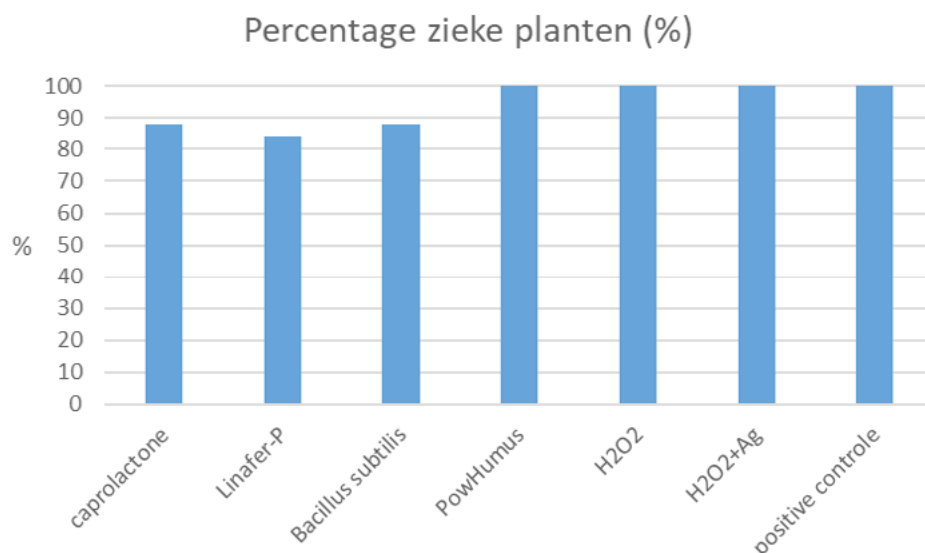
Figuur 3.21 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen of wilgenbast extract, caprolactone, Ag-zilver en waterstof peroxide.



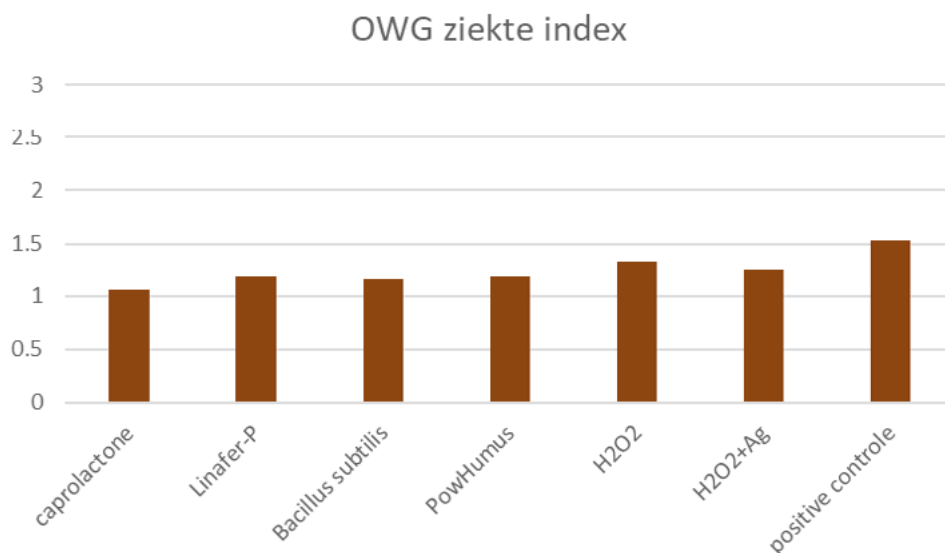
Figuur 3.22 Gemiddelde ziekte index van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen of wilgenbast extract, caprolactone, Ag-zilver en waterstof peroxide (n=25).

3.4.9 Proef 9

In deze proef hadden caprolactone, Linafer-P en Bacillus subtilis (uit Linafer-P) een licht effect, maarniet significant, op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei in tomaten (Figuur 3.23). Ook een hogere dosis van humine/fulvinezuren, hoger dan in proef 8, had geen effect op overmatige wortelgroei. Er was geen significant effect op de gemiddelde ziekte score (Figuur 3.24)



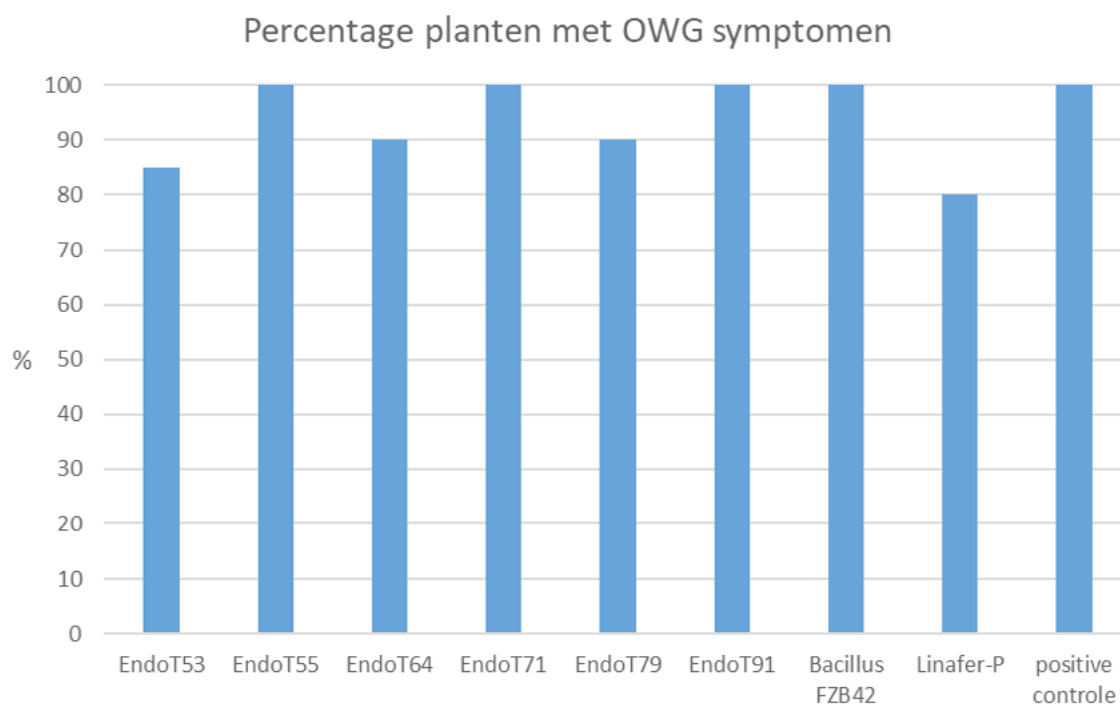
Figuur 3.23 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met een behandeling met verschillende micro-organismen of caprolactone, Ag-zilver en waterstofperoxide of fulvine/huminezuren (PowHumus).



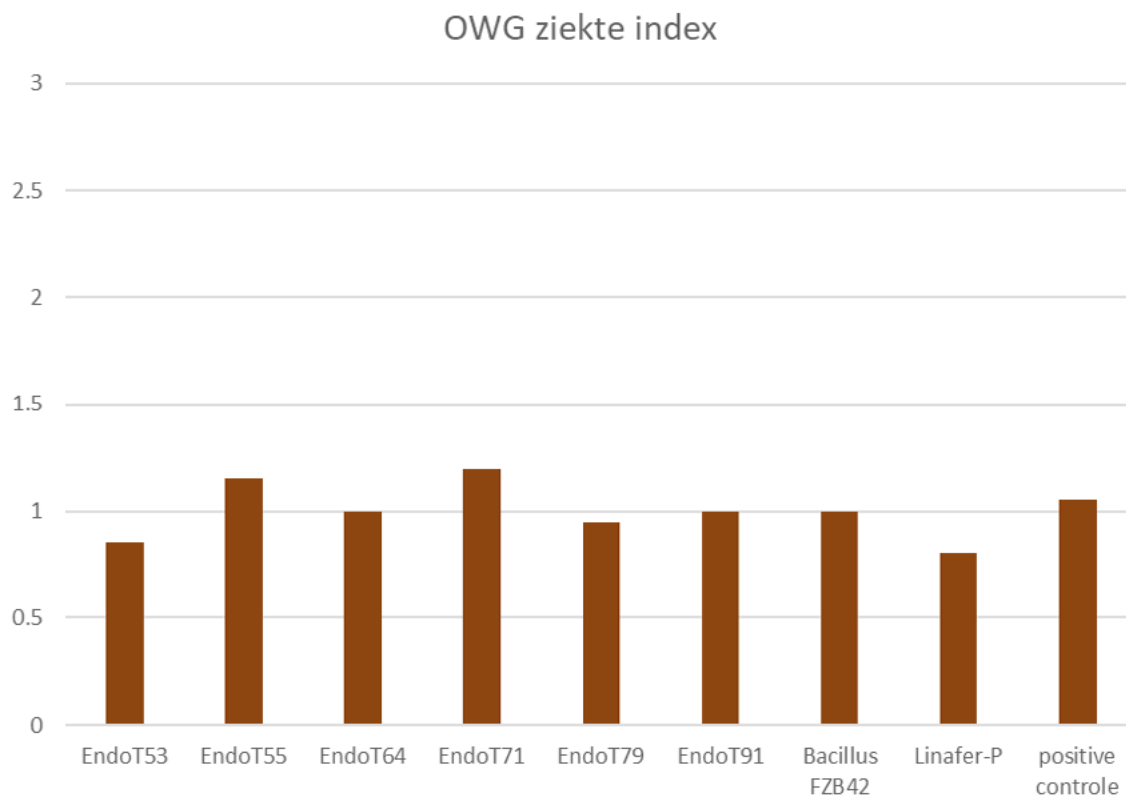
Figuur 3.24 Gemiddelde ziekte index van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met een behandeling met verschillende micro-organismen of caprolactone, Ag-zilver en waterstofperoxide of fulvine/huminezuren (PowHumus)(n=25).

3.4.10 Proef 10

In deze proef zijn verschillende endofytische micro-organismen getest en ook *Bacillus velezensis* FZB42 en Linafer-P product. Alleen EndoT53 en Linafer-P behandeling resulteerden in significant minder symptomatische planten (80-85% tov 100% in geïnfecteerde controle) (Figuur 3.25). Deze behandelingen hadden ook een licht effect op de gemiddelde ziekte score (Figuur 3.26).



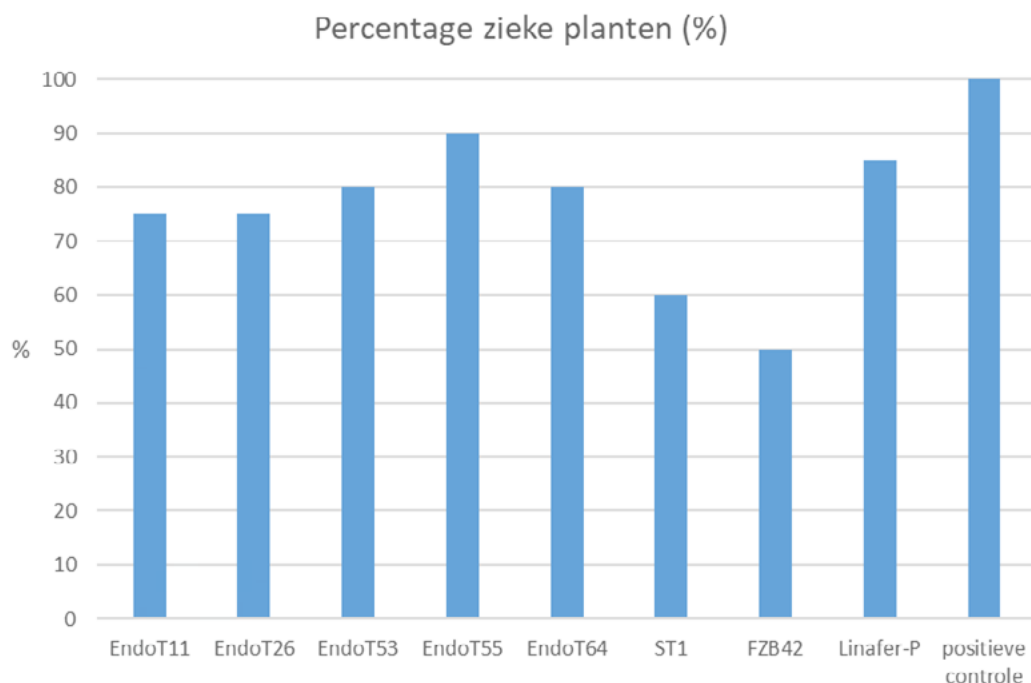
Figuur 3.25 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met een behandeling met verschillende micro-organismen.



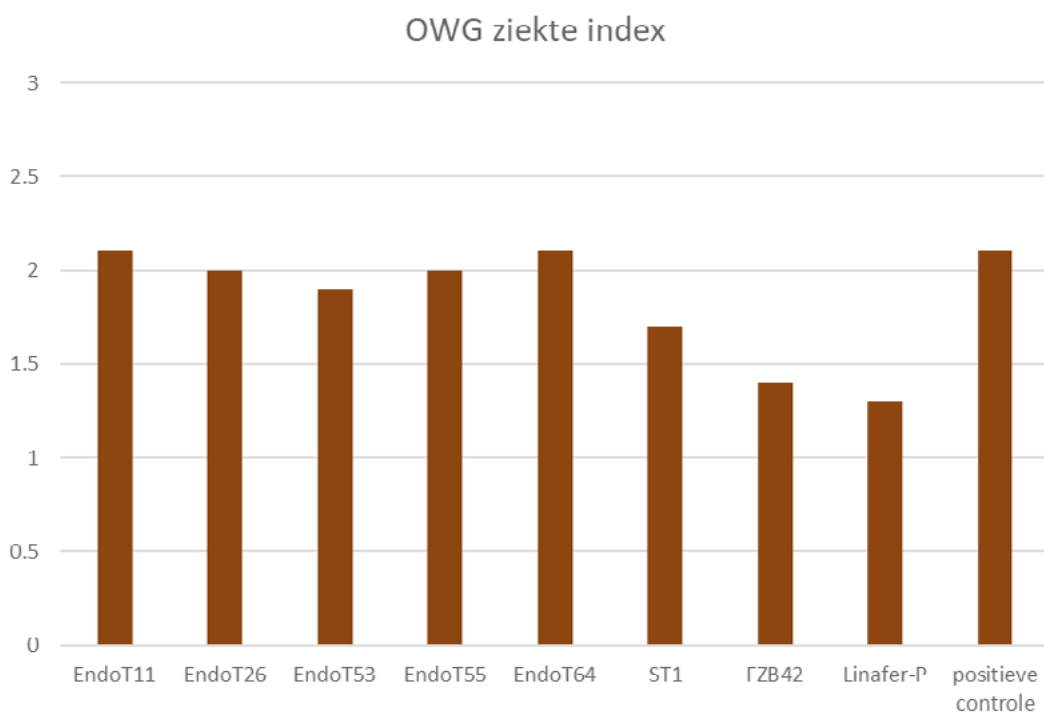
Figuur 3.26 Gemiddelde ziekte index van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met een behandeling met verschillende micro-organismen (n=20).

3.4.11 Proef 11

In deze proef zijn nogmaals verschillende endofytische micro-organismen getest, isolaat uit steenwol ST1 en ook *Bacillus velezensis* FZB42 en Linafer-P product. Micro-organismen zijn toegepast in een hogere dosis dan in Proef 10. Isolaat ST1 en *Bacillus velezensis* FZB42 behandeling resulteerden in significant minder symptomatische planten, respectievelijk 60% en 50%, tov 100% in geïnfecteerde controle. (Figuur 3.27). Deze behandelingen hadden ook een duidelijk effect op de gemiddelde ziekte score (Figuur 3.28).



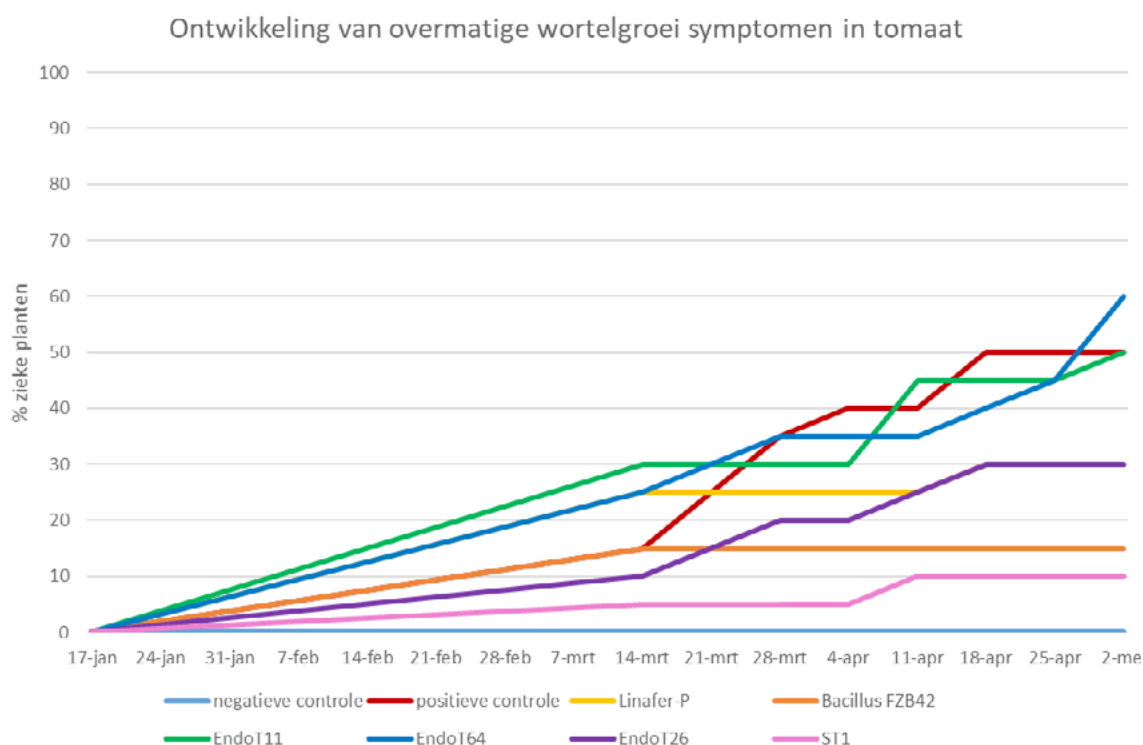
Figuur 3.27 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met een behandeling met verschillende micro-organismen.



Figuur 3.28 Gemiddelde ziekte index van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met een behandeling met verschillende micro-organismen (n=20).

3.5 Effecten van inoculatie met micro-organismen op de ontwikkeling van overmatige wortelgroei in tomatenplanten gedurende een teelt van vier maanden

In de kasproef met oudere planten zijn verschillende behandelingen met micro-organismen getest. Isolaat ST1 (*Bacillus thuringiensis*) en *Bacillus velezensis* FZB42 remden de ontwikkeling van overmatige wortelgroei in tomaat het meest, met respectievelijk 10% en 15% van de symptomatische planten in deze behandelingen ten opzichte van 50% symptomatische planten in de onbehandelde, geïnoculeerde controle (Figuur 3.29). Ook product Linafer-P en isolaat EndoT26 hadden een significant effect op overmatige wortelgroei, met 30% van de symptomatische planten ten opzichte van 50% zieke planten in positieve controle behandeling.



Figuur 3.29 Ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in tomaatonderstam Maxifort in combinatie met behandeling met verschillende micro-organismen.

Voorbeelden van overmatige wortelgroei symptomen zijn weergegeven in Figuur 3.30.

Uit PCR check, op basis van aanwezigheid van virulentie genen, blijkt dat rhizogene bacteriën aanwezig waren in de steenwolmatten en wortels van tomaten in mei 2019 in alle behandeling behalve negatieve controle zonder inoculatie van rhizogene *Rhizobium rhizogenes* (Figuur 3.31A). Dat betekent dat ondanks aanwezigheid in het systeem was *Rhizobium rhizogenes* minder in staat om tomatenplanten te infecteren na behandeling met verschillende isolaten, die uit labproeven in staat bleken te zijn om signaalstoffen van *Rhizobium rhizogenes* af te breken.

Uit PCR check op *aiiA* lactonase blijkt dat die te vinden was in behandeling met isolaat ST1 zowel in wortels als in steenwol tijdens tomatenteelt (Figuur 3.31B). In de DNA monsters uit andere behandelingen is er geen *aiiA* lactonase gen gevonden. Isolaat ST1 kan dus goed rhizosfeer van tomaat en steenwol koloniseren tijdens tomatenteelt in de kas.

Waarschijnlijk speelt dus quorum quenching, verstoring van communicatie tussen afzonderlijke bacteriële cellen wel een tegelijk rol in afremmen van infectie met *Rhizobium rhizogenes*. Nogmaals doel van quorum quenching is niet de bacterie volledig af te doden maar quorum sensing activeren zodat afzonderlijke cellen niet met elkaar kunnen communiceren.

A geïnoculeerde controle



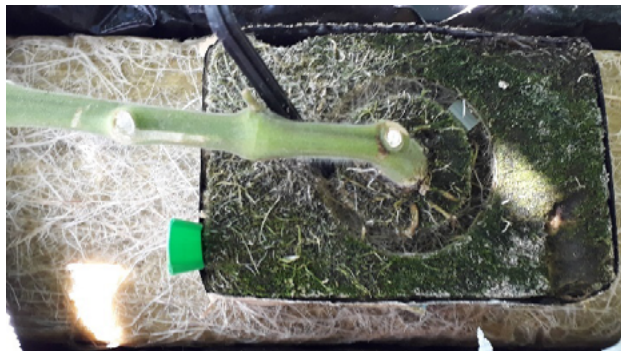
B behandeling met isolaat ST1



C behandeling met isolaat EndoT64



D behandeling met isolaat EndoT11



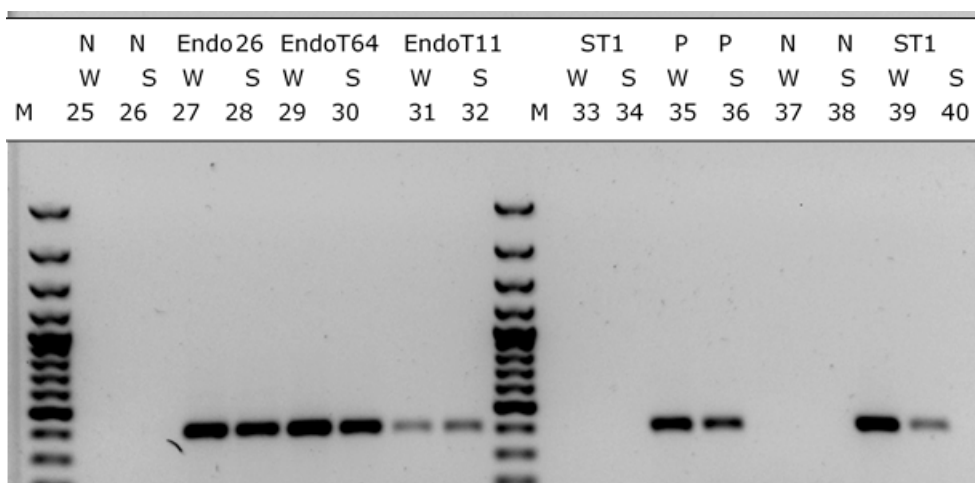
E behandeling met FZB42



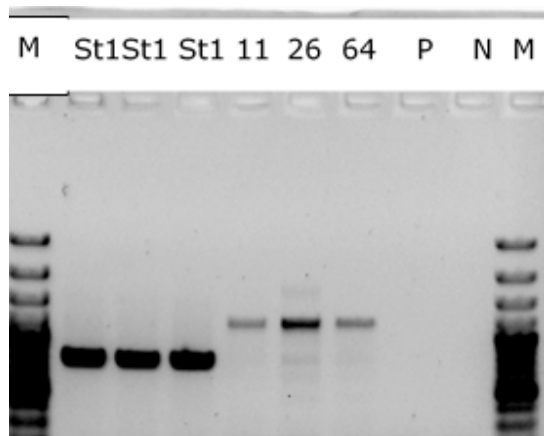
F behandeling met EndoT26



Figuur 3.30 Voorbeelden van overmatige wortelgroei symptomen in oudere tomatenplanten in de kas; A- geïnoculeerde, onbehandelde controle; B- behandeling met isolaat uit steenwol ST1, C- isolaat EndoT64; D- isolaat EndoT11; E- *Bacillus* FZB42; F- isolaat EndoT26.



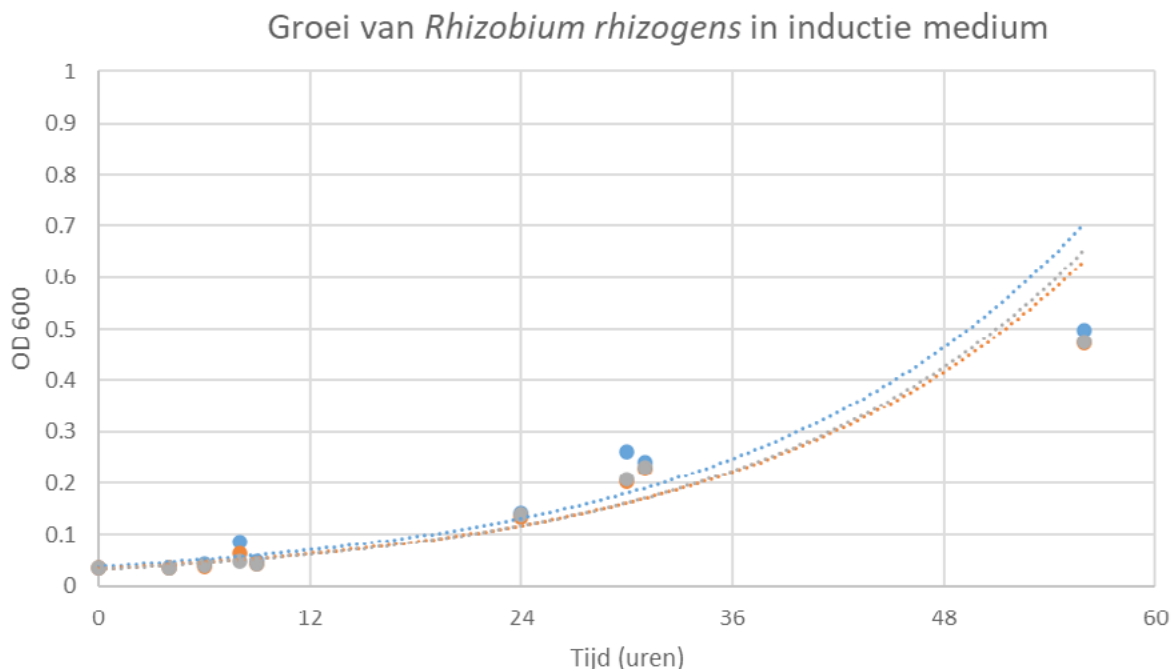
B



Figuur 3.31 Gel elektroforese van PCR producten van PCR reacties voor het vaststellen van de aanwezigheid van: a) rhizogene plasmide en b) *aiiA* lactonase in steenwol (S) en tomatenrhizosfeer (W), N- negatieve controle zonder inoculatie rhizogene bacterien, P- positieve controle met inoculatie van rhizogene bacterien. EndoT26, EndoT11, EndoT64 en ST1- behandelingen met nuttige micro-organismen

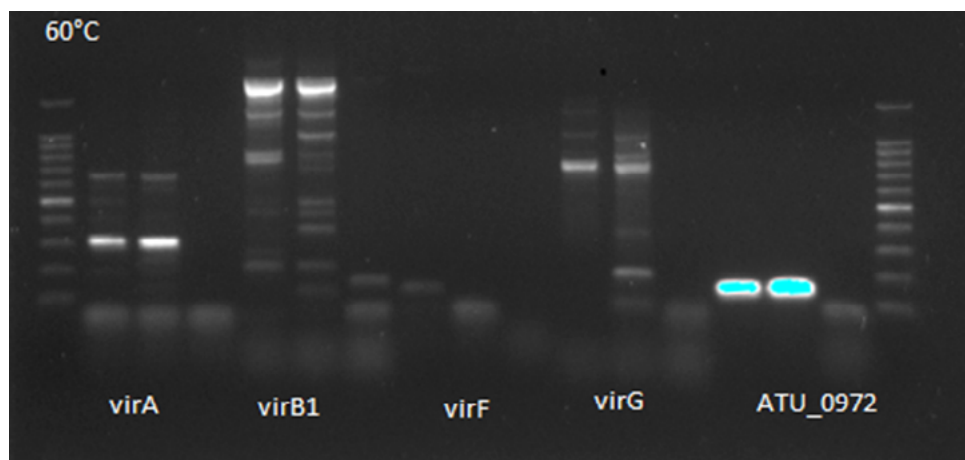
3.6 Expressie van virulentie genen in rhizogene *Rhizobium rhizogenes*

Rhizobium rhizogenes groeide goed in minimale minerale inductie medium (Figuur 3.32). Na 56 uur groei was de optische dichtheid (OD) bij 600 nm rond 0.5 wat betekend dat er ongeveer 10^8 bacteriële cellen/mL medium aanwezig waren. Kweken zijn in triplo uitgevoerd.



Figuur 3.32 Groei van rhizogene *Rhizobium rhizogenes* in inductie medium (minimale minerale medium).

Na isolatie van RNA uit de kweek (na 56 uur kweek) bleek dat er ongeveer 12.5 ng RNA/ml is geïsoleerd uit de kweken. Uit RT qPCR analyse bleek dat het niet mogelijk was om de helemaal zuivere producten van virulentie genen (virA, virB, virF en virG) van qPCR te verkrijgen ondanks het uitproberen van verschillende modificaties van qPCR procedure o.a. amplificatie en annealing temperaturen. Product van huishoud gen ATU-0972 was wel helemaal zuiver. Het beste voor annealing bleek een temperatuur van 60°C (Figuur 3.33) maar ook dan bleken de PCR producten niet zuiver te zijn. Daarom is verder onderzoek naar de expressie van virulentie genen in *Rhizobium rhizogenes* niet uitgevoerd binnen dit project.



Figuur 3.33 Voorbeelden van overmatige wortelgroei symptomen in oude tomatenplanten in de kas; A- geïnoculeerde, onbehandelde controle; B- behandeling met isolaat uit steenwol ST1.

4 Discussie en conclusie

Rhizogene bacteriën, die symptomen van overmatige wortelgroei veroorzaken in verschillende groentegewassen onder glas, vormen een grote uitdaging voor de telers. Verschillende hygiëne maatregelen zijn belangrijk in het voorkomen van deze ziekten. Echter niet al deze maatregelen zijn makkelijk te combineren met een weerbaar teeltconcept, omdat deze maatregelen, bijvoorbeeld gebruik van oxiderende stoffen, ook negatieve effect hebben op de overleving van nuttige micro-organismen in het systeem.

Nieuwe oplossingen, zoals de inzet van nuttige micro-organismen, die communicatie tussen plantpathogene bacteriën verstoren (quorum quenching) zouden een belangrijke aanvulling kunnen zijn op de huidige maatregelen tegen de ontwikkeling van overmatige wortelgroei in groentegewassen. Effectiviteit van quorum quenching (verstoring van communicatie) tegen de ontwikkeling van bacteriële ziekten in gewassen is al eerder aangetoond bijvoorbeeld in aardappel (tegen *Pectobacterium*) (Cirou *et al.* 2011; Garge en Nerurkar, 2017). Er zijn ook pogingen geweest om in het teeltsysteem micro-organismen te stimuleren, die van nature daarin aanwezig zijn, om signaalstoffen van plantpathogene bacteriën af te breken. Daarvoor wordt vaak caprolactone gebruikt (o.a. Cirou *et al.* 2011). Helaas gaf de toepassing van caprolactone matige resultaten wat betreft het voorkomen van de ontwikkeling van overmatige wortelgroei symptomen in jonge tomatenplanten.

Resultaten van dit project laten zien dat het mogelijk is om micro-organismen, die quorum sensing van plantpathogene bacteriën kunnen verstoren, te isoleren uit tomaatweefsel en groeimedium tijdens de teelt van tomaten (steenwol). Bij isolaties lag de focus op *Bacillus* soorten, omdat die aiiA lactonase kunnen bevatten (Dong *et al.* 2000). Wat *Bacillus* ook zo potentieerlijk maakt is het feit dat deze soorten overlevingsstructuren (endosporen) kunnen produceren en daarom makkelijk te formuleren zijn tot commerciële producten met langdurige houdbaarheid. Het blijkt ook dat een aantal van de commercieel beschikbare producenten op basis van *Bacillus* isolaten, zoals bijvoorbeeld *Bacillus velezensis* FZB42, ook effectief kunnen zijn tegen overmatige wortelgroei.

Het bleek echter dat niet in elke kasproef met jonge tomaten dit positieve effect zichtbaar was, zowel in het geval van commerciële producten als met de nieuwe isolaten verkregen binnen dit onderzoek. Optimalisatie van de toedieningsmethode is daarom nodig. Het is mogelijk, dat na toedienen van verse bacteriële kweken, veel van de bacteriën snel dood gaan in de nieuwe omgeving (steenwolmat). Mogelijk kan een zaadbehandeling, bijvoorbeeld coating met endosporen van *Bacillus*, een beter en robuuster effect hebben (Rocha *et al.* 2019).

Interessant is, dat bij de behandeling van oudere tomatenplanten, een duidelijk en significant effect op de ontwikkeling van de overmatige wortelgroei is aangetoond. Dit zou kunnen betekenen dat gebruikte micro-organismen waarschijnlijk beter de wortelzone van oudere tomaten kunnen koloniseren, omdat er meer voeding in de vorm van wortellexudaten aanwezig is (de Weert en Bloomberg, 2007). Onderzoek in België, naar biologische controle van overmatige wortelgroei tijdens een tomatenteelt, heeft aangetoond dat *Paenibacillus* soorten, die tot hetzelfde klasse behoren als *Bacillus*, effectief kunnen zijn in de biologische controle van overmatige wortelgroei (Bosman *et al.* 2017).

Uit onderzoek blijkt ook dat sommige oxiderende en antibacteriële stoffen, zoals waterstofperoxide en zilver een beperkt effect hebben op de remming van een *Rhizobium rhizogenes* infectie in jonge tomaten planten ondanks een relatief hoge dosering van deze stoffen gedurende de kasproeven. Effectiviteit van deze stoffen tegen bacteriën is in verschillende eerdere onderzoeken al aangetoond (Mendoza de Gyves *et al.* 2010; Bosmans *et al.* 2016). Er zijn echter aanwijzingen dat sommige rhizogene bacteriën steeds resistenter worden tegen oxiderende middelen zoals waterstofperoxide en steeds hogere concentraties, zelfs rond 600 ppm H₂O₂/L water, kunnen doorstaan (Bosmans *et al.* 2016).

Literatuur

- Bosmans, L., Álvarez-Pérez, S., Moerkens, R., Wittemans, L., Van Calenberge, B., Kerckhove, S.V., Paeleman, A., De Mot, R., Rediers, H., Lievens, B. 2015.
Assessment of the genetic and phenotypic diversity among rhizogenic *Agrobacterium* biovar 1 strains infecting solanaceous and cucurbit crops. *FEMS Microbiol Ecol.* 2015 Aug;91(8):fiv081. doi: 10.1093/femsec/fiv081. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26187479.
- Bosmans, L., Van Calenberge, B., Paeleman, A., Moerkens, R., Wittemans, L., Van Kerckhove, S., De Mot, R., Lievens, B., Rediers, H. 2016.
Efficacy of hydrogen peroxide treatment for control of hairy root disease caused by rhizogenic *agrobacteria*. *J Appl Microbiol.* 2016 Aug;121(2):519-27. doi: 10.1111/jam.13187. PMID: 27214259.
- Bosmans, L., De Bruijn, I., Gerards, S., Moerkens, R., Van Looveren, L., Wittemans, L., Van Calenberge, B., Paeleman, A., Van Kerckhove, S., De Mot, R., Rozenski, J., Rediers, H., Raaijmakers, J.M., Lievens, B. 2017.
Potential for Biocontrol of Hairy Root Disease by a *Paenibacillus* Clade. *Front Microbiol.* 2017 Mar 22;8:447. doi: 10.3389/fmicb.2017.00447. PMID: 28382027; PMCID: PMC5360736.
- Cirou, A., Raffoux, A., Diallo, S., Latour, X., Dessaux, Y., Faure, D. 2011.
Gamma-caprolactone stimulates growth of quorum-quenching *Rhodococcus* populations in a large-scale hydroponic system for culturing *Solanum tuberosum*. *Res Microbiol.* 2011 Nov;162(9):945-50. doi: 10.1016/j.resmic.2011.01.010. Epub 2011 Feb 1. PMID: 21288487.
- De Cleene, M. 1987.
The susceptibility of monocotyledons to *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Phytopathol.*, 113 (1985), pp. 81-89, 10.1111/j.1439-0434.1985.tb00829.x
- de Weert, S., Bloemberg, G.V. 2007.
Rhizosphere competence and the role of root colonization in biocontrol. In: Gnanamanickam, S.S. (eds) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_9
- Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., Zhang, L.H. 2000.
AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3526-31. doi: 10.1073/pnas.97.7.3526. PMID: 10716724; PMCID: PMC16273
- Fetzner S. 2015.
Quorum quenching enzymes. *J Biotechnol.* 2015 May 10;201:2-14. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.09.001. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25220028.
- Filetici, P., Spanò, L., Costantinom P. 1987.
Conserved regions in the T-DNA of different *Agrobacterium rhizogenes* root-inducing plasmids. *Plant Mol Biol.* 1987 Jan;9(1):19-26. doi: 10.1007/BF00017983. PMID: 24276794.
- Garge S. S., Nerurkar A. S. 2017.
Evaluation of quorum quenching *Bacillus* spp. for their biocontrol traits against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot. *Biocatal. Agri. Biotechnol.* 9 48–57.
- Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace. 1985.
Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:6955-6959.
- Lang, J., Faure, D. 2014.
Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front Plant Sci.* 2014 Jan 31;5:14. doi: 10.3389/fpls.2014.00014. PMID: 24550924; PMCID: PMC3907764.
- LaSarre, B., Federle, M.J. 2013.
Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013 Mar;77(1):73-111. doi: 10.1128/MMBR.00046-12. PMID: 23471618; PMCID: PMC3591984.
- McPherson, G.M. 2009.
Protected hydroponic tomato: investigating the potential for various novel non-chemical techniques for the suppression or control of root-mat disease. AHDB Horticulture Project PC 241 Final Report
- Mendoza-De Gyves E, Picarella ME, Ruiu F, Teixeira Da Silva JA, Rouphael Y, Muleo R, Rugini E. 2010.
Inhibition of *Agrobacterium tumefaciens* growth by silver nitrate. *Int J Plant Dev Biol.* 2010;**4**(1):64–67.

- Rana, M.M.; Han, Z.-X.; Song, D.-P.; Liu, G.-F.; Li, D.-X.; Wan, X.-C.; Karthikeyan, A.; Wei, S. 2016. Effect of Medium Supplements on *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Hairy Root Induction from the Callus Tissues of *Camellia sinensis* var. *sinensis*. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1132. <https://doi.org/10.3390/ijms17071132>
- Rocha I, Ma Y, Souza-Alonso P, Vosátka M, Freitas H, Oliveira RS. Seed Coating: A Tool for Delivering Beneficial Microbes to Agricultural Crops. 2019. *Front Plant Sci.* 2019. Nov 6;10:1357. doi: 10.3389/fpls.2019.01357. PMID: 31781135; PMCID: PMC6852281.
- Rutherford, S.T., Bassler, B.L. 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Nov 1;2(11):a012427. doi: 10.1101/cshperspect.a012427. PMID: 23125205; PMCID: PMC3543102.
- Shams, M., Campillo, T., Lavire, C., Muller, D., Nesme, X., & Vial, L. 201). Rapid and Efficient Methods to Isolate, Type Strains and Determine Species of *Agrobacterium* spp. in Pure Culture and Complex Environments. In (Ed.), *Biochemical Testing*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/36068>
- Suzaki, K., Yoshida, K., Sawada, H. 2004. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *J Gen Plant Pathol* **70**, 342–347 (2004). <https://doi-org.ezproxy.library.wur.nl/10.1007/s10327-004-0133-8>
- Tannieres, M., Beury-Cirou, A., Vigouroux, A., Mondy, S., Pellissier, F. 2013. A metagenomic study highlights phylogenetic proximity of Quorum-Quenching and Xenobiotic-Degrading Amidases of the AS-Family. *PLoS ONE* 8(6): e65473
- Valentine, L. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* and the plant: the David and Goliath of modern genetics. *Plant Physiol.* 2003 Nov;133(3):948-55. doi: 10.1104/pp.103.032243. PMID: 14612581; PMCID: PMC1540339.
- Wang K., editor, 2015. *Agrobacterium* protocols. *Methods Mol. Biol.* 1224 vii–viii. 10.1007/978-1-4939-1658-0_26
- Weller, S.A., Stead, D.E., Young, J.P. 2004. Acquisition of an *Agrobacterium* Ri plasmid and pathogenicity by other alpha-Proteobacteria in cucumber and tomato crops affected by root mat. *Appl Environ Microbiol.* 2004 May;70(5):2779-85. doi: 10.1128/AEM.70.5.2779-2785.2004. PMID: 15128532; PMCID: PMC404455.
- White *et al.* 1985. Wilson, K. H., Blichington R. B., Greene R. C. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28:1942-1946.
- Veena, V., Taylor, C.G. 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* **43**, 383–403 <https://doi-org.ezproxy.library.wur.nl/10.1007/s11627-007-9096-8>
- Yin, X-T, Xu, L, Fan, S-S, Xu, L-N, Li, D-C, Liu, Z-Y. 2010. Isolation and characterization of an AHL lactonase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1361–1367
- Yuan, Z.C., Edlind, M.P., Liu, P., Saenkham, P., Banta, L.M., Wise, A.A., Ronzone, E., Binns, A.N., Kerr, K., Nester, E.W. 2007. The plant signal salicylic acid shuts down expression of the vir regulon and activates quorum-quenching genes in *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jul 10;104(28):11790-5. doi: 10.1073/pnas.0704866104. Epub 2007 Jul 2. PMID: 17606909; PMCID: PMC1905925.

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



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

Rapport WPR-1163

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.