

Biorationals binnen IPM tegen ondergrondse ziekten (*Fusarium* in komkommer en lisianthus)

Marta A. Streminska, Suzanne Breeuwsma, Gerdit Greve, Huei Ming Huisman, Khanh Pham, Ineke Stijger



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

Referaat

In dit project is kennis opgebouwd om de sier- en groenteteelt op een milieuvriendelijkere en duurzamere manier minder vatbaar te maken voor ondergrondse ziekten, met als model pathogeen *Fusarium*. Binnen dit project is de effectiviteit van biorationals producten en maatregelen ter verhoging van bodem/groeimedum weerbaarheid tegen *Fusarium* getest in grondteelt (lisianthus) en vruchtgroenteteelt in steenwol (komkommer). Met dit project is kennis ontwikkeld over de werkingsmechanismen en de effectiviteit van verschillende biorationals in teeltsystemen onder glas.

Abstract

This project has provided basic knowledge on how to make ornamental and vegetable cultivation less susceptible for soilborne diseases, as a model pathogen *Fusarium*, in an environmentally friendly and sustainable way. Within this project, the effectiveness of biorational products and measures to increase soil/growing medium suppression against *Fusarium* have been tested in soil-based cultivation (lisianthus) and vegetable cultivation in stonewool (cucumber). With this project, knowledge is developed on the mechanisms of action and the effectiveness of biorationals in cultivation systems in greenhouses.

Rapportgegevens

Rapport WPR-1410

Projectnummer: 3742287900

DOI: <https://doi.org/10.18174/689365>

Dit project / onderzoek is mede tot stand gekomen door de bijdrage van Topsector Tuinbouw en Uitgangsmaterialen en Club van 100 van Wageningen UR Glastuinbouw en Bloembollen.

TOPSECTOR
TUINBOUW & UITGANGSMATERIALEN



Disclaimer

© 2025 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Businessunit Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, 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 vervaelvoudigd, 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, Businessunit Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06
wur.nl/glastuinbouw

Postbus 644, 6700 AP Wageningen
Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen
T +31 (0)317 48 60 01
wur.nl/glastuinbouw

Inhoud

Samenvatting	5
1 Inleiding	7
2 Materiaal & methoden	10
2.1 Lisianthus proef 1 (juni-augustus 2020)	10
2.2 Lisianthus proef 2 (januari-maart 2021)	12
2.3 Lisianthus proef 3 (mei-juli 2022)	14
2.4 Komkommer proef 1 (november 2021-maart 2022)	16
2.4.1 Behandelingen komkommer proef 1	16
2.4.2 <i>Fusarium</i> pathogeen komkommer proef 1	17
2.5 Komkommer proef 2 (juni 2022-september 2022)	17
2.5.1 Behandelingen komkommer proef 2	17
2.5.2 <i>Fusarium</i> komkommer proef 2	18
2.6 Metingen komkommer proeven 1 en 2	18
2.6.1 Scoren ziektesymptomen	18
2.7 Bemonstering voor microbiologische analyses	18
2.7.1 Bemonstering in lisianthus proeven	18
2.7.2 Bemonstering in komkommerproeven	18
2.7.3 Chitinase activiteit in steenwolmatten	19
2.7.4 DNA-extracties	20
2.7.5 qPCR analyses	20
2.7.6 Analyse van het microbioom in de bodem/groeimedium en rhizosfeer	20
3 Resultaten	21
3.1 Lisianthus proef 1 (juni-augustus 2020)	21
3.1.1 Aanwezigheid <i>Fusarium</i> inoculum in de grond	21
3.1.2 Ziekteontwikkeling in lisianthus	21
3.2 Lisianthus proef 2 (januari-maart 2021)	27
3.2.1 Ziekteontwikkeling in lisianthus	27
3.2.2 Microbioom analyse	29
3.3 Lisianthus proef 3 (mei-juli 2022)	41
3.3.1 Ziekteontwikkeling	41
3.3.2 Microbioom analyse	47
3.4 Komkommer proef 1 (november 2021-maart 2022)	58
3.4.1 Metingen organische koolstof in voeding met/zonder champostthee	58
3.4.2 Ziekteontwikkeling in komkommer	58
3.4.3 Aanwezigheid micro-organismen in steenwol en rhizosfeer komkommer 2021	62
3.5 Komkommer proef 2 (juni 2022-september 2022)	68
3.5.1 Metingen organische koolstof in voeding met/zonder champostthee	68
3.5.2 Ziekteontwikkeling in komkommer	68
3.5.3 Aanwezigheid micro-organismen in steenwol en rhizosfeer komkommer 2022	70
4 Discussie en conclusie	76
Literatuur	79
Bijlage 1 Protocol beoordeling op aantasting door <i>F.oxysporum</i> in Lisianthus	83
Bijlage 2 Plattegrond proef lisianthus 2020	85
Bijlage 3 Resultaten grondvoorraad lisianthus proef 2020	86
Bijlage 4 Plattegrond lisianthus proef 2021	87

Bijlage 5	Resultaten grondvoorraad en uitgebreide grondanalyse lisianthus proef 2021	88
Bijlage 6	Plattegrond lisianthus proef 2022	90
Bijlage 7	Resultaten grondvoorraad en uitgebreide grondanalyse lisianthus proef 2022	91
Bijlage 8	Protocol beoordeling op aantasting door <i>F. oxysporum</i> in komkommer	92
Bijlage 9	Plattegrond komkommer proef 1	94
Bijlage 10	Samenstelling komkommervoeding	95
Bijlage 11	Plattegrond komkommer proef 2	96

Samenvatting

Het project heeft kennis opgeleverd over de onderliggende mechanismen voor onderdrukking van bodem/groeimedium gebonden schimmel plantpathogenen, met als model pathogeen *Fusarium*, met behulp van biorationals en maatregelen die weerbaarheid van de bodem/ groeimedium verhogen.

In het project zijn verschillende biorationale strategieën onderzocht om *Fusarium* infecties in uiteenlopende teeltsystemen te onderdrukken en beheersen. Er zijn succesvolle strategieën ontwikkeld om *Fusarium* (gedeeltelijk) te beheersen in de teelt van lisianthus (grondgebonden; korte teelt van 7-8 weken) en tijdens de vruchtgroente teelt in inerte groeimedium (komkommer op steenwol, teelt van 4 maanden; met/zonder recirculatie van voedingswater). Voorbeelden van succesvolle strategieën zijn: a) inzet van niet plant pathogene *Fusarium oxysporum* in een recirculerende komkommerteelt, die ontwikkeling van verwelking symptomen door plantpathogene *Fusarium* onderdrukte met behoud van komkommer productie of b) inzet van organische (rest)stromen om weerbaarheid tegen *Fusarium* te verhogen in de grond van lisianthus teelt. Deze kennis kan toegepast worden door de telers, opkweekbedrijven en adviseurs in glastuinbouw om *Fusarium* infecties in toom te houden.

Uit onderzoek naar *Fusarium* onderdrukking in lisianthus blijkt dat er grote verschillen zijn in gevoeligheid voor *Fusarium* infectie tussen de commerciële cultivars van lisianthus. Verder blijkt dat effectiviteit van biorationale producten op basis van specifieke schimmel of bacteriële stammen afhankelijk is van overleving van deze micro-organismen in de rhizosfeer van de planten. Toevoeging van deze producten heeft geen significant effect op het totale microbiom van de bodem of groeimedium. Wel kunnen deze producten effect hebben op rhizosfeer microbiom (dichtbij wortels), zoals in het geval van *B. velezensis* FZB42 en *B. amyloliquefaciens* QST713, ondanks het feit dat deze bacteriën in relatief lage aantallen gevonden werden rondom de wortels van lisianthus (10^4 kve ten opzichte van 10^{10} van cellen van alle bacteriën per 1g wortel). Uit resultaten blijkt ook dat het microbiom van de lisianthus rhizosfeer significant beïnvloedt wordt door het natuurlijke microbiom van de bodem waarin de planten groeien. Natuurlijk bodemmicrobiom kan op zijn beurt beïnvloedt worden door organische toevoegingen aan de bodem, bijvoorbeeld champost of biochar, waardoor uiteindelijk in de rhizosfeer een microbiom met een andere samenstelling kan ontstaan.

Dit project heeft ook veel kennis opgeleverd over mogelijkheden voor het sturen van microbiom van inerte groeimedia en de rhizosfeer van de planten die erin groeien (in dit geval komkommer). Uit analyses blijkt dat ook in steenwol, die als groeimedium met relatief laag microbiologisch activiteit wordt beschouwd, een divers bacterieel microbiom zich ontwikkelt, die te sturen is met o.a. organische toevoegingen zoals champostthee.

Gegenereerde kennis over onderliggende mechanismes kan bijdrage leveren aan het opstellen van strategieën voor onderdrukking en beheersing van *Fusarium*, en mogelijk andere schimmel plantpathogenen, in andere teeltsystemen.

1 Inleiding

Zowel grondgebonden als substraatteelten onder glas zijn gevoelig voor verschillende wortelziekten, zoals voet- en wortelrot of verwelking, die veroorzaakt worden door o.a. *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Pythium* en *Phytophthora*. Deze wortelziekten kunnen leiden tot grote uitval tijdens de teelt.

In de afgelopen jaren is de beschikbaarheid (en in sommige gevallen ook effectiviteit) van middelen voor chemische controle van wortelziekten sterk gedaald. Bovendien staat gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen onder druk in verband met een mogelijke risico's voor volksgezondheid en milieu. Daarom is de vraag naar biorationale oplossingen in de afgelopen jaren enorm toegenomen. Ondanks een substantiële groei in de markt van biorationals, is er nog steeds een gebrek aan openbaar beschikbare gegevens over effectiviteit van deze producten op (semi)praktijkschaal. Om die redenen blijven deze producten tot nu toe in de praktijk onderbenut. Om wortelziekten tegen te gaan in grondgebonden teelt onder glas wordt vaak grondontsmetting toegepast (zoals stomen). Grondontsmettingsmethoden hebben een hoog energieverbruik. Mogelijk kan door toepassing van biorationals de noodzaak van het ontsmetten van de grond worden verminderd. Veel plantenpathogenen, zoals *Pythium*, *Phytophthora* en *Fusarium* kunnen zich bovendien zeer goed aanpassen aan de teelten in groeimedia anders dan grond. Deze pathogenen produceren veel sporen, die via water verspreid kunnen worden.

Biorationals zijn gewasbeschermingsproducten (van natuurlijke oorsprong) die relatief weinig risico's hebben voor de volksgezondheid en het milieu. Deze producten kunnen verdeeld worden in verschillende groepen zoals biopesticiden (op basis van micro-organismen), biochemische pesticiden (op basis van metabolieten van micro-organismen), botanicals (op basis van planten en algenextracten), basisstoffen en elicitors. Biorationals zijn goed geschikt voor geïntegreerde aanpak van ziekten en plagen, in combinatie met verschillende teeltmaatregelen die verspreiding van deze wortelziekten vertragen. Biorationals kunnen ook worden gebruikt in rotatie met synthetische pesticiden om de kans op resistentie ontwikkeling in pathogenen te verkleinen, of in combinatie met synthetische pesticiden die additieve, zo niet synergetische effecten bieden (Xu *et al.*, 2011).

Het idee om plantenziekten tegen te gaan met inzet van nuttige micro-organismen, hun metabolieten of algen/planten extracten is natuurlijk niet nieuw (Van Lenteren *et al.*, 2018). Wetenschappelijk onderzoek heeft aangetoond dat gebruik van de juiste micro-organismen (biopesticide), andere biorationals of combinaties daarvan, wortelziekten op verschillende manieren kunnen onderdrukken via: a) direct antagonisme (o.a. productie van antibiotica en andere metabolieten); b) aanschakelen van geïnduceerde resistentie in planten (Bakker *et al.*, 2013) en c) indirect effect op pathogenen door veranderingen in (functionele) samenstelling van plant/bodem/substraat microbiom (Chowdhury *et al.*, 2013). Er zijn veel voorbeelden bekend van het succesvol gebruik van antagonistische bacteriën en schimmels (o.a. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Trichoderma*) tegen substraat- en grondgebonden plantpathogene oömyceten, schimmels en aaltjes in *in vitro* studies en kleine kasexperimenten (o.a.: Adam *et al.*, 2014; Bubici, 2018; Chowdhury *et al.*, 2013; Fira *et al.*, 2018; Postma *et al.*, 2019). Sommige van deze antagonistische micro-organismen zijn ook op dit moment commercieel beschikbaar in Nederland. De uitgebreide lijst van in Europa verkrijgbare gewasbeschermingsmiddelen op basis van micro-organismen is opgenomen in o.a. het review artikel (Van Lenteren *et al.*, 2018). Vaak hebben deze biopesticiden een brede werking tegen verschillende wortelpathogenen, bijvoorbeeld tegen verschillende schimmels, of tegen schimmels en wortelknobbelaaltjes (Adam *et al.*, 2014; Streminska *et al.*, 2019). Deze producten zijn voorbeelden van zogenaamd inundatief/inoculatief benadering in biologische bestrijding van grondgebonden plantpathogenen, die streeft naar populatieopbouw van antagonisten in substraat/bodem door inoculatie met grote aantallen van antagonistische micro-organismen (Mazzola en Freilich, 2017). Uit verschillende onderzoeken in open teelten blijkt dat dit soort producten niet altijd in staat zijn om bescherming tegen plantpathogenen te bieden gedurende de gehele teeltperiode (Mazzola en Freilich, 2017). Op dit moment is er echter weinig en fragmentarische informatie beschikbaar over hoe succesvol deze producten zijn in (semi)praktijk teelt onder glas.

Wat teelt onder glas duidelijk onderscheidt van open teelten is het feit dat er meer mogelijkheden bestaan voor bijsturing in het systeem onder glas dan in open teelt wat betreft klimaatomstandigheden, maar ook voor optimalisatie van biopesticide/biorationale toepassing zodat de effectiviteit van de producten gewaarborgd blijft.

“Traditionele” kennis en recente inzichten vormen een duidelijker beeld van het functioneren van de plant holobiont (Berg *et al.*, 2017). Alle micro-organismen, dus o.a. bacteriën, Archeae, schimmels en protisten, die in en op de plant leven, vormen samen met de plant een holobiont (Berg *et al.*, 2024). Er bestaan namelijk geen planten zonder micro-organismen. Microbiële diversiteit en balans is een sleutel voor gezonde planten (Yan *et al.*, 2017). Microbiële soorten kunnen op meerdere manieren bijdragen aan een gezond systeem, inclusief essentiële functies zoals a) zaadkieming en groeiondersteuning door het verstrekken van hormonen; b) verhogen van beschikbaarheid van voedingstoffen en c) verhogen van weerbaarheid tegen (a)biotische stress.

In de afgelopen jaren zijn er veel nieuwe wetenschappelijke inzichten gepubliceerd over mogelijkheden voor manipulatie van microbiom van plant/ teeltsysteem door a) beïnvloeden van micro-organismen die van nature aanwezig zijn in het teeltsysteem (bodem, substraat) en in plantmateriaal (o.a. Antoniou *et al.*, 2017), of b) gebruik makend van “synthetische” microbiomen om een gezond, weerbaar gewas te produceren (Mueller & Sachs, 2015; Hu *et al.*, 2016).

De benadering met synthetische gemeenschappen is gebaseerd op valide wetenschappelijke, ecologische principes. Echter, introductie van dit soort gemanipuleerde consortia tegen plantpathogenen in de praktijk zal niet altijd snel en makkelijk zijn, in verband bijvoorbeeld met productie en registratie kosten van microbiële consortia (Köhl *et al.*, 2019).

Recentelijk zijn ook wetenschappelijke studies verschenen die aantonen dat geoptimaliseerde toepassing van single species producten (met 1 specifieke microniele stam) de negatieve veranderingen in rhizosfeer microbiom van met *Rhizoctonia* geïnfecteerde slaplanten lijkt te compenseren (Erlacher *et al.*, 2014). Ook een *Trichoderma* inoculatie kan een significant effect hebben op rhizosfeer microbiom en uiteindelijk ook op plantkwaliteit (Fiorentino *et al.*, 2018).

Ondanks snelle ontwikkelingen in het veld van microbiom manipulatie voor plantgezondheid, in de nabije toekomst (horizon van ≥ 5 jaar) zijn de telers nog steeds aangewezen op het gebruik van biopesticiden van de “oude generatie” en andere biorationale en chemische producten die reeds commercieel beschikbaar zijn als gewasbeschermingsmiddelen.

Het is belangrijk dat een micro-organisme uit een biopesticide de rhizosfeer en plantenwortels goed en snel koloniseert (eng. rhizosphere competence) en in staat is zijn functie als gewasbeschermingsmiddel te vervullen o.a. productie van antischimmel metabolieten of inductie van natuurlijke resistentie van de plant (Induced Systemic Resistance- ISR) (Adesina *et al.*, 2014). Om ISR effectief op te wekken of voor effectieve antibiose zijn hoge populatiedichtheden van een specifieke biocontrole micro-organisme in de bodem/substraat of rhizosfeer nodig, meestal rond 10^5 - 10^7 kolonievormende eenheden (kve) per gram wortel (Raaijmakers en Weller, 1998; van Pelt *et al.*, 2008). Vaak blijkt toch dat biopesticiden onvoldoende effectief zijn op (semi)praktijkschaal (Mazzola en Freilich, 2016). Slechte kolonisatie van de rhizosfeer zou een van de redenen kunnen zijn voor ineffectiviteit van biopesticiden. Wel zijn maatregelen te bedenken, zeker in de high-tech glastuinbouw productieomgeving, die de kans van slagen van biopesticiden vergroten. Het is bijvoorbeeld mogelijk om op een gecontroleerde manier specifieke bodem/substraat “prebiotica” (voedsel voor specifieke groep van micro-organismen) en biopesticiden samen toe te passen in voedingswater/substraat (Adam *et al.*, 2016). Andere optie is aanpassing aan de microhabitat voor micro-organismen door toepassing van dragermaterialen (zoals biochar of compost) (Hale *et al.*, 2014).

Terwijl een significant aantal van wetenschappelijke en vakpers publicaties en ervaringen beschikbaar is over biopesticiden/biochemische pesticiden tegen ondergrondse ziekten, is er veel minder literatuur beschikbaar over gebruik van botanicals (planten extracten, algen extracten en etherische oliën) en elicitors tegen wortelpathogenen. In de meeste publicaties wordt alleen *in vitro* effectiviteit tegen bodempathogenen gerapporteerd en gegevens over de werkzaamheid in de bodem/substraat ontbreken vaak.

Bijvoorbeeld, Bowers en Locke (2000) hebben verschillende formuleringen van plantenextracten en essentiële oliën (o.a. neem olie, chili extract + mosterd olie, kruidnagel en cassia boom extract) geëvalueerd op hun effectiviteit in het verminderen van populaties van *F. oxysporum* in de bodem en vermindering van verwelkingsymptomen in meloen. Zeewierextracten, zoals die van *Ascophyllum nodosum* of *Laminaria digitata*, blijken effect te hebben op infecties door plantpathogenen. Op zeewier gebaseerde producten kunnen in de plant de afweerreacties tegen pathogenen induceren door te fungeren als priming- of elicitor-moleculen (Shukla *et al.*, 2019). Zeewier extracten kunnen ook invloed hebben op de door de plant geproduceerde wortellexudaten en de activiteit van micro-organismen in de rhizosfeer (Alam *et al.*, 2013).

Elicitors van geïnduceerde systemische resistentie zijn ook te vinden tussen oligosacchariden, zoals COS-OGA (chitooligosacchariden + oligogalacturoniden) (Van Aubel *et al.*, 2014). COS-OGA kan voor resistentie zorgen tegen o.a. meeldauw in komkommer (Van Aubel *et al.*, 2014), *Phytophthora infestans* in aardappelen (Clinckemaillie *et al.*, 2016) en wortelknobbelaaltje *Meloidogyne graminicola* in rijst (Singh *et al.*, 2019). Chitine is een elicitor van geïnduceerde resistentie, als gevolg van o.a. accumulatie van fytoalexines en/of lignificatie na behandeling, in o.a. aardappel (*Phytophthora infestans*), tomaat (*Fusarium oxysporum*) en komkommer (*Pythium aphanidermatum*) (Derkx *et al.*, 2012).

Chitosan, geproduceerd van chitine na behandeling met loog, is bekend van zijn antimicrobiële eigenschappen (Sahariah *et al.*, 2017) en als elicitor van geïnduceerde resistentie in planten (Ke *et al.*, 2017).

Verschillende biorationale oplossingen voor wortelziektes zijn beschikbaar voor de praktijk. Voor sommige toepassingen zijn echter optimalisaties/aanpassingen nodig om een optimale werking tegen bodempathogenen te waarborgen in de praktijk (teelt onder glas).

Het doel van dit project is kennis genereren om de sier- en groenteteelt op een milieuvriendelijkere en duurzamere manier minder vatbaar te maken voor ondergrondse ziekten. Binnen dit project worden er producten onderzocht en strategieën ontwikkeld die kunnen bijdragen aan het verminderen van de productieverliezen bij diverse gewassen. Kennis die opgebouwd is tijdens dit project kan bijdragen aan openbare informatie over werking en effectiviteit van verschillende biorationals in teeltsystemen onder glas. Als pilot gewassen zijn lisianthus (sierteelt, bodemgebonden) en komkommer (vruchtgroente, in inerte groeimedium) gebruikt.

2 Materiaal & methoden

2.1 Lisianthus proef 1 (juni-augustus 2020)

Deze kasproef vond plaats van juni t/m augustus 2020 in een kascompartiment van Wageningen University & Research Business Unit Glastuinbouw en Bloembollen (WUR) in Bleiswijk. De kas heeft een oppervlakte van 144 m² en bevat 2 keer 7 tafels. De kas is verdeeld in 4 blokken/herhalingen (Bijlage 2). In elk blok zijn 14 verschillende behandelingen geplaatst zodat elke behandelingen in 4 herhalingen is getoetst. Per herhaling zijn 30 planten ingezet zodat per behandeling in totaal 120 lisianthus planten gebruikt werden (leverbare stekjes, cultivar Rosita 3 Pure White).

De kas is ingesteld op een temperatuur van 23-24°C, 60% RV en een lichtsom van maximaal PAR 7.5. Via de regenleiding werd afhankelijk van de behoefte (maar meestal dagelijks en na 6 weken 2 maal per dag) een aantal minuten standaard Lisianthus voeding gegeven met start EC van 1.6.

Er zijn 14 verschillende behandelingen ingezet, inclusief een controle behandeling zonder plantpathogene *Fusarium* en een controle behandeling met plantpathogene *Fusarium* (positieve controle). In Tabel 2.1 staat per behandeling aangegeven hoe het product is toegepast en de frequentie. Afhankelijk van de behandeling zijn de producten toegepast als toevoeging aan de grond voor het planten, bespuiting of aangieten bij plug en/of na het planten.

Tabel 2.1 Behandelingen Lisianthus kasproef 2020.

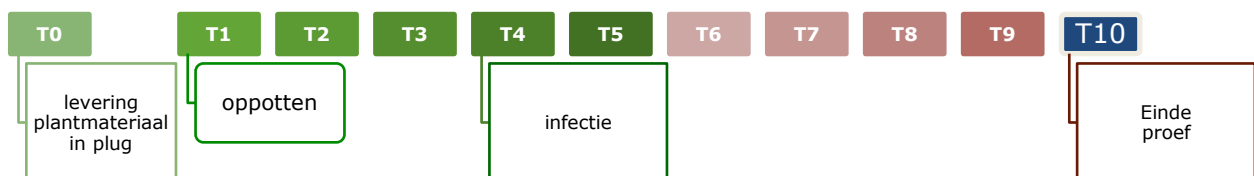
nr.	Behandeling	<i>Fusarium</i>	Toepassing	Frequentie
1	Negatieve controle	-	nvt	
2	Positieve controle	+	nvt	
3	0.1% chitine	+	Mengen door grond	eenmalig
4	5% Biochar	+	Mengen door grond	eenmalig
5	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22 granulaat	+	Mengen door grond	eenmalig
	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22 (water dispergeerbaar granulaat)		Pipetteren bij plant	Week 3,5 en 7
	Kruidenextract met tryptofaan		Bespuiting	Bij plug en week 1 en 3
6	<i>Trichoderma asperellum</i> T34	+	Pipetteren bij plant	Bij plug en week 1 en 4
7	CEU-10026-F-WG	+	Pipetteren bij plant	Bij plug en wekelijks vanaf week 2
8	wilgenbast extract	+	Bespuiting	Wekelijks vanaf start
9	CEU-40940-N-CS	+	Pipetteren bij plant	Wekelijks vanaf week 4
10	zeewierextract	+	Pipetteren bij plant	Week 1 en 4
11	chitosan hydrochloride	+	Pipetteren bij plant	Week 1,3 en 4
12	3% orthokieselzuur	+	Pipetteren bij plant	Wekelijks vanaf start
13	Cerevisane (gistextract)	+	Bespuiting	Week 1,3 en 4
14	wilgenbast extract	+	Bespuiting	Wekelijks vanaf start
	3% orthokieselzuur		Bespuiting	Wekelijks vanaf start
	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22 granulaat		Mengen door grond	eenmalig
	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22 T22 (water dispergeerbaar granulaat)		Pipetteren bij plant	Week 3,5 en 7
	Kruidenextract met tryptofaan		Bespuiting	Bij plug en week 1 en 3

De producten chitine (Sigma-Aldrich), biochar (Carbon Gold Enriched Blend) en *Trichoderma afroharzianum* T-22 (granulaat) zijn twee weken voor het planten van de lisianthus stekjes door de grond gemengd (praktijkgrond lisianthus, Bommelerwaard). In de tussentijd stonden de potjes in de verwarmde kas overdekt met plastic om uitdroging te voorkomen. Een uitgebreide grondanalyse is uitgevoerd na het mengen van de producten voor de behandelingen: controle zonder *Fusarium*, chitine en biochar (Bijlage 3).

Eén week voor het planten werden de planten in de pluggen, afhankelijk van de behandeling, voor het eerst behandeld met kruidenextract met tryptofaan, *Trichoderma asperellum* T34, CEU-10026-F-WG, wilgenbast extract en 3% orthokiezeldzuur (zie Tabel 2.2 voor de toegepaste concentratie per product). Er is 0.5 ml product bij het plugje gepipetteerd of er is bespoten tot aan afdruipe op het blad. Na een week werden de planten geplant in de grond. Zie Figuur 2.1 voor de tijdlijn van deze proef. Elk plantje werd individueel in een pot (Ø12cm) geplant. Gedurende de daarop volgende negen weken (t/m T= 10) zijn de producten volgens schema toegevoegd.

Tabel 2.2 Toepassing middelen kasproef 2020 met *F. oxysporum* in *Lisianthus*.

Nr.	Behandeling	Concentratie toepassing mengen door grond	Concentratie toepassing in plug	Concentratie toepassing potbehandeling
1	Negatieve controle	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
2	Positieve controle	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
3	0.1% chitine	0.6g/600 ml grond		
4	5% Biochar	30g/600 ml grond		
5	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22 granulaat	0.45g/600 ml grond		
	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22 (water dispergeerbaar granulaat)			30g/1000 planten
	Kruidenextract met tryptofaan		5 ml/m ²	5 ml/m ²
6	<i>Trichoderma asperellum</i> T34		1*10 ⁵ cfu/ml substraat	1*10 ⁵ cfu/ml substraat
7	CEU-10026-F-WG		1*10 ⁵ cfu/ml substraat	
8	wilgenbast extract		Dosering volgens producent	Dosering volgens producent
9	CEU-40940-N-CS			0.4% (v/v)
10	zeewierextract			3 ml/pot
11	chitosan hydrochloride			2 ml/potje
12	3% orthokiezeldzuur		Dosering volgens producent	Dosering volgens producent
13	Cerevisane (gistextract)			0.5 kg/ha
14	wilgenbast extract		Dosering volgens producent	Dosering volgens producent
	3% orthokiezeldzuur		Dosering volgens producent	Dosering volgens producent
	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22 granulaat	0.45g/600 ml grond		
	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22 (water dispergeerbaar granulaat)			30g/1000 planten
	Kruidenextract met tryptofaan		5 ml/m ²	5 ml/m ²



Figuur 2.1 Tijdlijn kasproef 2020 met *F. oxysporum* in *Lisianthus*.

Drie weken na het planten is de pathogene *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f.sp *eustomae*) in een concentratie van 5*10⁵ sp/ml grond toegevoegd. Vervolgens is wekelijks de ziekteontwikkeling gevolgd door te scoren op verwelking van de plant (index 0-5, waarbij 0 gezond is en 5 geheel verwelkte plant) en het aantal verwelkte planten is genoteerd (zie Bijlage 1 voor protocol ziekte-score).

Om te bepalen hoeveel *Fusarium* er in de grond aanwezig is, zijn er van negatieve en positieve controle behandelingen mengmonsters genomen (van vier planten per blok).

Zes weken na de inoculatie van de pathogene *Fusarium* (T=10) zijn de eindwaarnemingen van deze proef uitgevoerd. Aanwezigheid van *Fusarium* is in de wortels en stengels van de planten vastgesteld met uitplaat methode. Daarvoor zijn er 20 planten uit de negatieve en positieve controle behandelingen willekeurig geselecteerd. Per plant zijn 5 stukjes wortel, zonder grond eraan, direct op PDA platen gelegd. Het onderste deel van de stengel (ongeveer 1.5 cm lang) is afgeknipt. Dit deel werd geflambeerd in 96% alcohol. Vervolgens is de stengel door midden gesneden. Beide helften zijn met de binnenkant naar beneden op agar petrischaal gelegd (PDA + antibiotica tegen bacteriegroei). Na drie en na acht dagen zijn de petrischalen beoordeeld op *Fusarium* uitgroei.

Bij de eindbeoordeling is naast verwelking van de planten ook vergeling van de planten genoteerd (index 0-3, waarbij 0 gezond en 3 plant geheel vergeeld is). Zie Bijlage 1 voor protocol ziekte-score. Van elke individuele plant is de lengte gemeten en is het versgewicht bepaald.

2.2 Lisianthus proef 2 (januari-maart 2021)

Deze kasproef vond plaats van januari t/m maart 2021 in een kascompartiment van WUR in Bleiswijk. De kas heeft een oppervlakte van 144 m² en bevat 2 keer 7 tafels. De kas is verdeeld in 4 blokken/herhalingen (Bijlage 4). In elk blok zijn 14 verschillende behandelingen geplaatst zodat elke behandelingen in 4 herhalingen is getoetst in de kas (behandeling 1 t/m 14). Per herhaling zijn 30 planten ingezet zodat per behandeling in totaal 120 lisianthus planten gebruikt zijn. (leverbare stekjes, cultivar Arena 3 Champagne).

Een extra infectieproef is ingezet waarbij 2 verschillende cultivars met en zonder infectie van plantpathogene *Fusarium* zijn getoetst (cultivars Rosita 3 Pure White en Arena 3 White). Per behandeling zijn 3 herhalingen ingezet van ieder 8 planten (behandeling 15 t/m 18). De kas is ingesteld op een temperatuur van 23-24°C, 60% RV en een lichtsom van maximaal PAR 7.5. Via de regenleiding werd afhankelijk van de behoefte (maar meestal dagelijks en na 6 weken 2 maal per dag) een aantal minuten standaard Lisianthus voeding gegeven met start EC van 1.6.

Proef met de maatregelen ter beheersing van *Fusarium* is ingezet met de cultivar Arena 3 Champagne. Er zijn 14 verschillende behandelingen ingezet, inclusief een controle behandeling zonder plantpathogene *Fusarium* en een controle behandeling met plantpathogene *Fusarium*. Cultivars Rosita 3 White en Arena 3 White zijn alleen gebruikt om de gevoeligheid voor *Fusarium* van deze cultivars te bepalen. In Tabel 2.3. staat per behandeling weergegeven hoe het product is toegepast en de frequentie. Afhankelijk van de behandeling zijn de producten toegepast als toevoeging aan de grond voor het planten, bespuiting of aangieten bij plug en/of na het planten.

Tabel 2.3 Behandelingen Lisianthus kasproef 2021.

nr.	Behandeling	Fusarium	Toepassing	Frequentie
1	Negatieve controle Arena 3 Champagne	-	nvt	
2	Positieve controle Arena 3 Champagne	+	nvt	
3	0.1% chitine	+	Mengen door grond	eenmalig
4	1% biochar	+	Mengen door grond	eenmalig
5	1% champost	+	Mengen door grond	eenmalig
6	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22	+	Pipetteren bij plant	Week 0 en 4
7	<i>Trichoderma asperellum</i> T34		Pipetteren bij plant	Bij plug en week 1 en 4
8	CEU-20013-F-LC	+	Pipetteren bij plant	Bij plug en wekelijks vanaf week 1
9	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	+	Pipetteren bij plant	Bij plug en week 1,2 en 4
10	wilgenbast extract	+	Bespuiting	Wekelijks vanaf start
	3% orthokiezelszuur	+	Pipetteren bij plant	Wekelijks vanaf start
11	zeewierextract	+	Pipetteren bij plant	Week 1 en 2
12	chitosan hydrochloride	+	Pipetteren bij plant	Week 1,2 en 3
13	<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47	+	Pipetteren bij plant	Bij plug en week 1,2 en 4
14	Cerevisane (gist extract)	+	Bespuiting	Week 1 en 2
15	Negatieve controle Rosita 3 Pure White	-	nvt	nvt
16	Positieve controle Rosita 3 Pure White	+	nvt	nvt
17	Negatieve controle Arena 3 White	-	nvt	nvt
18	Positieve controle Arena 3 White	+	nvt	nvt

De producten chitine (Sigma-Aldrich), Biochar (Carbon Gold), champost (afkomstig van Kooter B.V., Hazerswoude) zijn één week voor het planten van de lisianthus stekjes door de grond gemengd (praktijkgrond lisianthus kas, Bommelerwaard). In de tussentijd stonden de potjes in de verwarmde kas overdekt met plastic om uitdroging te voorkomen. Een uitgebreide grondanalyse is na mengen van de producten uitgevoerd voor de behandelingen controle zonder *Fusarium*, chitine, biochar en champost (Bijlage 5).

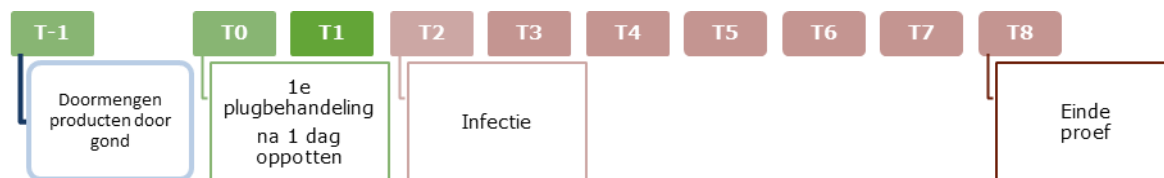
Een dag voor het planten van de plugjes in de grond werden ze behandeld, afhankelijk van de behandeling, met *Trichoderma asperellum* T34, CEU-20013-F-LC, *Bacillus velezensis* FZB42, wilgenbast extract, 3% orthokiezelszuur of niet pathogenen *Fusarium oxysporum* Fo47 (zie Tabel 2.4 voor de toegepaste concentratie per product). Er is 0.5 ml product bij het plugje gepipetteerd of er is bespoten tot aan afdruipe op het blad. Zie Figuur 2.2 voor de tijdlijn van deze proef. De volgende dag werd elk plantje individueel in een potje (Ø12cm) geplant. Vervolgens werden de potjes volgens het kasschema op de tafels geplaatst. Eén dag na oppotten zijn de planten in behandeling 6 behandeld met *Trichoderma afroharzianum* T-22 door het product bij de plant te pipeteren. Een week na oppotten werden de planten voor het eerst behandeld met zeewierextract, chitosan hydrochloride en Cerevisane.

Gedurende de daarop volgende acht weken (t/m T= 8) zijn de producten volgens schema toegevoegd. Er is per product steeds 10 ml per plantje toegevoegd aan de grond of er is een bespuiting uitgevoerd tot aan afdruipe van het blad. Middels een proefbespuiting met water werd per week bepaald hoeveel er bespoten moest worden. Ter bestrijding van de varenrouwmug is volgens voorschrift Entonem (Koppert) toegepast.

Tabel 2.4 Doseringen in plug en pot in *Lisianthus* kasproef 2021.

Nr.	Behandeling	Concentratie toepassing mengen door grond	Concentratie toepassing in plug	Concentratie toepassing potbehandeling
1	Negatieve controle Arena 3 Champagne	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
2	Positieve controle Arena 3 Champagne	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
3	0.1% chitine	0.6g/600 ml grond		
4	1% Biochar	6 g/600 ml grond		
5	1% champost	6 g/600 ml grond		
6	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22			30/1000 planten
7	<i>Trichoderma asperellum</i> T34		1*10 ⁵ kve/ml grond	1*10 ⁵ cfu/ml grond
8	CEU-20013-F-LC		0.006 ml product/pot	
9	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42		1*10 ⁵ kve/ml grond	1*10 ⁵ cfu/ml grond
10	wilgenbast extract		Dosering volgens producent	Dosering volgens producent
	3% orthokiezelszuur		Dosering volgens producent	Dosering volgens producent
11	zeewierextract			3 ml/pot
12	chitosan hydrochloride			0.06 ml/pot
13	<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47		1*10 ⁵ cfu/ml grond	1*10 ⁵ cfu/ml grond
14	Cerevisane (gist extract)			0.05 g/m ²
15	Negatieve controle Rosita 3 White	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
16	Positieve controle Rosita 3 White	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
17	Negatieve controle Arena 3 White	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
18	Positieve controle Arena 3 White	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.

Behandeling 1 t/m 14 zijn uitgevoerd met de cultivar Arena 3 Champagne.



Figuur 2.2 Tijdlijn kasproef 2021 met *Fusarium* infectie in *Lisianthus*.

2.3 Lisianthus proef 3 (mei-juli 2022)

Deze kasproef vond plaats van mei t/m juli 2022 in een kascompartiment van WUR in Bleiswijk. De kas heeft een oppervlakte van 144 m² en bevat 2 keer 7 tafels. De kas is verdeeld in 4 blokken/herhalingen (Bijlage 6). In elk blok zijn 14 verschillende behandelingen geplaatst zodat elke behandelingen in 4 herhalingen is getoetst (behandeling 1 t/m 14). Per herhaling zijn 30 planten ingezet zodat per behandeling in totaal 120 lisianthus planten gebruikt zijn (leverbare stekjes cultivar Arena 3 Champagne). De kas is ingesteld op een temperatuur van 23-24°C, 60% RV en een lichtsom van maximaal PAR 7.5. Via de regenleiding werd afhankelijk van de behoefte (maar meestal dagelijks en na 6 weken 2 maal per dag) een aantal minuten standaard Lisianthus voeding gegeven met start EC van 1.6.

Er zijn 14 verschillende behandelingen ingezet, inclusief een controle behandeling zonder plantpathogene *Fusarium* en een controle behandeling met plantpathogene *Fusarium*. In Tabel 2.5 staat per behandeling weergegeven hoe het product is toegepast en de frequentie. Afhankelijk van de behandeling zijn de producten toegepast als toevoeging aan de grond voor het planten of aangieten bij plug en/of na het planten.

Tabel 2.5 Behandelingen *Lisianthus* in kasproef 2022.

nr.	Behandeling	<i>Fusarium</i>	Toepassing	Frequentie
1	Negatieve controle Arena 3 Champagne	-	nvt	
2	Positieve controle Arena 3 Champagne	+	nvt	
3	1% champost	+	Mengen door grond	eenmalig
4	1% gesteriliseerd champost	+	Mengen door grond	eenmalig
5	1% (v/v) champostthee	+	Mengen door grond	Bij plug en week 0,2 en 4
6	1% biochar	+	Mengen door grond	eenmalig
7	1% wormhumus		Mengen door grond	eenmalig
8	1% biochar 1% wormhumus	+	Mengen door grond	eenmalig
9	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	+	Pipetteren bij plant	Bij plug en week 0,2 en 4
10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713	+	Pipetteren bij plant	Bij plug en week 0
11	product PB1921 product PB1922	+	Pipetteren bij plant	week 0 en 4 week 0,2,4 en 6
12	1% biochar <i>Bacillus velezensis</i> FZB42	+	Pipetteren bij plant	eenmalig Bij plug en week 0,2 en 4
13	1% biochar <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	+	Mengen door grond Pipetteren bij plant	eenmalig Bij plug en week 0
14	1% biochar 1% champost	+	Mengen door grond	eenmalig

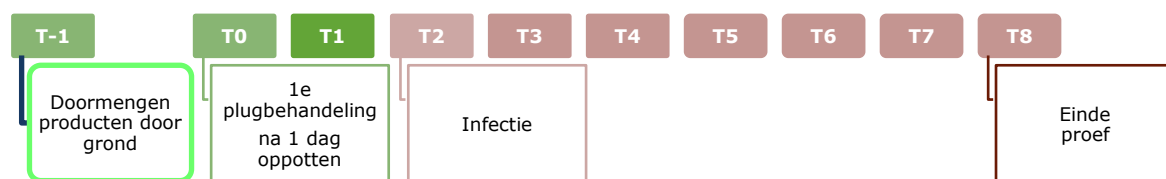
Een week voor planten zijn de producten champostthee, *Bacillus velezensis* FZB42, *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 gepipetteerd bij de plugjes. Champostthee is bereid door het 48 uur beluchten van 1 volume deel champost in 4 volume delen water waarna de vloeistof is afgefilterd. Er is 0.5 ml product bij het plugje gepipetteerd. (zie Tabel 2.6 voor de toepassing per product)

De producten champost (afkomstig van Kooter B.V., Hazerswoude), gesteriliseerde champost (twee keer 20 minuten geautoclaveerd met 1 dag rust), biochar (Carbon Gold) en vermicompost (Van Iersel) zijn twee dagen voor het planten van de lisianthus door de grond gemengd (praktijkgrond lisianthus, Tielerwaard). In de tussentijd stonden de potjes in de verwarmde kas.

Een uitgebreide grondanalyse is na het mengen van de producten uitgevoerd voor de behandelingen: controle zonder *Fusarium*, champost, steriele champost, champostthee, biochar, vermicompost en van een aantal combinaties van producten (Bijlage 7). Twee dagen na het vullen van de potten werd elk plantje individueel in een potje (Ø12cm) geplant. Vervolgens werden de potjes volgens het kasschema op de tafels geplaatst. De producten PB1912 en PPB1922 werden dezelfde dag voor het eerst toegepast. Gedurende de daarop volgende acht weken (t/m T= 8) zijn de producten volgens schema toegevoegd. Zie Figuur 2.3 voor de tijdlijn van deze proef. Ter bestrijding van de varenrouwmug is volgens voorschrift Entonem (Koppert BV) toegepast.

Tabel 2.6 Toepassing middelen kasproef *Lisianthus* 2022.

Nr.	Behandeling	Concentratie toepassing mengen door grond	Concentratie toepassing in plug	Concentratie toepassing potbehandeling
1	Negatieve controle	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
2	Positieve controle	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
3	1% champost	0.6 ml/600 ml grond		
4	1% gesteriliseerde champost	0.6 ml/600 ml grond		
5	1% (v/v) champostthee		0.5 ml per plug	6.0 ml per pot
6	1% biochar	0.6 ml/600 ml grond		
7	1% vermicompost	0.6 ml/600 ml grond		
8	1% biochar	0.6 ml/600 ml grond		
	1% vermicompost	0.6 ml/600 ml grond		
9	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42		1*10 ⁵ cfu/ml substraat	1*10 ⁵ cfu/ml substraat
10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713		3 mL per 150 L grond	3 mL per 150 L grond
11	product PB1921		Dosering volgens producent	Dosering volgens producent
	product PB1922		Dosering volgens producent	Dosering volgens producent
12	1% biochar	0.6 ml/600 ml grond		
	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42		1*10 ⁵ cfu/ml substraat	1*10 ⁵ cfu/ml substraat
13	1% biochar	0.6 ml/600 ml grond		
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713		3 mL per 150 L grond	3 mL per 150 L grond
14	1% biochar	0.6 ml/600 ml grond		
	1% champost	0.6 ml/600 ml grond		



Figuur 2.3 Tijdlijn van kasproef *lisianthus* in 2022 (in totaal 8 weken).

Twee weken na het planten is de plantpathogene *Fusarium oxysporum f.sp eustomae* in een concentratie van 5*10⁵ sporen/ml in de grond geïnoculeerd. Vervolgens is wekelijks de ziekteontwikkeling gevolgd door te scoren op verwelking van de plant (index 0-5, waarbij 0 gezond is en 5 geheel verwelkt plant), vergeling van de plant (index 0-3, waarbij 0 geen vergeling en 3 alle blaadjes vergeeld) en het aantal verwelkte planten is genoteerd (zie Bijlage 1 voor protocol ziekte-score). Om de twee weken (T=2, T=4 en T=6, T=8) is per behandeling de lengte van 12 planten per blok gemeten.

2.4 Komkommer proef 1 (november 2021-maart 2022)

Een kasproef met plantpathogene *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* in komkommer is in week 43 in 2021 ingezet bij WUR in Bleiswijk. De komkommerplanten (cultivar: Proloog) zijn gezaaid op 29 oktober (T=0) en opgekweekt in steenwolblokken (Cultilene) in kas 2.106 (3 tafels, 24 m²). Op 22 november (T=4) zijn de planten geplant op steenwolmatten (Grodan) in kas 6.01 (12 goten 144 m²) (Bijlage 8). Met een looptijd van 18 weken is de kasproef in week 9 van 2022 beëindigd. Een tijdlijn van de proef staat weergegeven in Figuur 2..



Figuur 2.4 Tijdlijn kasproef 2021 met plantpathogene *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* in komkommer.

De kas is verdeeld in 12 goten met 12 matten per goot en 2 planten per mat (= 24 planten per goot). De buitenste 2 goten hebben gediend als randrijen. Op de binnenste 10 goten zijn 10 verschillende behandelingen (inclusief controles) getest. De verschillende behandelingen zijn random in de kas geplaatst met steeds 2 planten met dezelfde behandeling per mat. De plattegrond van de kas staat weergegeven in Bijlage 8.

Gedurende de opkweek en de gehele teelt is minerale voeding gebruikt. Deze voeding is via de voedingsunit in Bleiswijk aangemaakt. De samenstelling van de voeding staat weergegeven in Bijlage 9. Tijdens de opkweek is een eb en vloed systeem gebruikt en op de matten druppelirrigatie. Het drainwater is in deze proef niet hergebruikt (geen recirculatie) ter voorkoming van overdracht van pathogeen en verschillende behandelingen tussen de planten in de kas.

2.4.1 Behandelingen komkommer proef 1

In Tabel 2 staat een overzicht weergegeven van de toegepaste behandelingen en manier van toepassen. De behandeling champostthee is wekelijks bereid door het 48 uur beluchten van 1 volume deel champost (afkomstig van Kooter B.V., Hazerswoude) in 4 volume delen water waarna de vloeistof is afgefilterd. De champostthee is continu met de voeding meegegeven via druppelirrigatie. Voor de opkweek is champost toegepast in het steenwolblok. Hierbij is elk blok in 3 gelijke stukken gesneden en is hier de champost tussen gedaan met gelijke verdeling. Bij het planten is champost tussen het blok en de mat toegepast. Micro-organismen uit verschillende producten zijn toegepast zoals aangegeven in Tabel 2.7.

Tabel 2.7 Toepassing middelen kasproef 2021 met *F. oxysporum* in komkommer.

Nr.	Behandeling	Concentratie toepassing in blok	Concentratie toepassing in mat	Frequentie
1	Negatieve controle	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
2	Positieve controle	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
3	Champostthee (2%)	2% v/v van voeding	2% v/v van voeding	Continu
4	Champostthee (2%) + champost	Gelijk aan behandeling 3 en 5	Gelijk aan behandeling 3 en 5	Gelijk aan behandeling 3 en 5
5	Champost	3 x 3,5 g tussen blok	7 g tussen blok en mat	Eenmalig in blok en eenmalig tussen blok en mat
6	<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47	10 ⁵ sp/ml substraat	10 ⁵ sp/ml substraat	Tweewekelijks
7	<i>B. velezensis</i> FZB42	10 ⁵ sp/ml substraat	10 ⁵ sp/ml substraat	Tweewekelijks
8	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22	0,5 kg/ha (3,3 x 10 ⁶ sp/plant)	0,5 kg/ha (3,3 x 10 ⁶ sp/plant)	Eenmalig bij opkweek en in week 8
	<i>Trichoderma afroharzianum</i> T22	N.v.t.	1 g tussen blok en mat	Eenmalig
	zeewierextract met betaïne	N.v.t.	5 L/ha (0,33 ml/plant)	In week 6 en 9
9	<i>Trichoderma asperellum</i> T34	0,5 g/m ² (3,3 x 10 ⁸ sp/plant)	500 g/ha (3,3 x 10 ⁷ sp/plant)	Tweewekelijks (3x vanaf start)
10	<i>Streptomyces</i> k61	10 ⁵ sp/ml substraat	10 ⁵ sp/ml substraat	Tweewekelijks

2.4.2 *Fusarium* pathogeen komkommer proef 1

Plantpathogene *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* is opgekweekt in steriel vloeibaar Czapek Dox medium. Planten zijn geïnfecteerd met *Fusarium* twee weken na het planten op de mat (week 6 van de proef). Bij elke plant, met uitzondering van de negatieve controle, is 60 ml *Fusarium* sporenoplossing (tot eindconcentratie 10^5 sporen/ml steenwol) aangegoten tussen het steenwolblok en de mat.

2.5 Komkommer proef 2 (juni 2022-september 2022)

In week 21 van 2022 is er een tweede kasproef ingezet met *Fusarium oxysporum* in komkommer. De komkommerplanten (cultivar: Proloog) zijn gezaaid op 31 mei (T=0) en opgekweekt in steenwolblokken (Grodan) in kas 2.106 (3 tafels, 24 m²). Op 22 juni (T=3) zijn de planten geplant op steenwolmatten (Grodan) in kas 6.02 (12 goten 144 m²). Met een looptijd van 17 weken is de kasproef in week 38 van 2022 beëindigd. Een tijdlijn van de proef staat weergegeven in Figuur 2..



Figuur 2.5 Tijdlijn kasproef 2022 met plantpathogene *Fusarium oxysporum* in komkommer.

De kas is verdeeld in 12 goten met 12 matten per goot en 2 planten per mat (= 24 planten per goot). De 2 buitenste 2 goten hebben gediend voor de negatieve controle (zonder *Fusarium*). Alle andere behandelingen en de positieve controle (met alleen *Fusarium*) zijn verdeeld over de rest van de kas met 2 goten per behandeling/controle. De plattegrond van de kas staat weergegeven in Bijlage 10.

Gedurende de opkweek en de gehele teelt is minerale voeding gebruikt. Deze voeding is via de voedingsunit in Bleiswijk aangemaakt. De samenstelling van de voeding staat weergegeven in Bijlage 9. Tijdens de opkweek is een eb en vloed systeem gebruikt en op de matten druppelirrigatie. Het drainwater is in tegenstelling tot de komkommerproef in 2021 wel hergebruikt (recirculatie). Voor elke behandeling (2 goten) is een aparte voedingsbak gebruikt ter voorkoming van overdracht van de ziekte en verschillende behandelingen.

2.5.1 Behandelingen komkommer proef 2

In Tabel 2 staat een overzicht van de behandelingen en manier van toepassen weergegeven. Champostthee is op dezelfde manier toegepast als in de komkommerproef in 2021. Champost (Kooter B.V.) en biochar (Carbon Gold) zijn vlak voor het zaaien (T=0) toegepast door mengen met vermiculiet en hiermee het plantgat in het steenwolblok te vullen (Figuur 2). Bij het planten (T=3) zijn champost en biochar tussen het blok en de mat toegepast. *Fusarium oxysporum* Fo47 en *Trichoderma asperellum* T34 zijn driemaal elke 2 weken toegepast vanaf de eerste week na het zaaien. *Fusarium oxysporum* Fo47 en *Trichoderma asperellum* T34 zijn aangegoten (20 ml per plant).

Tabel 2.8 Toepassing middelen kasproef 2022 met *Fusarium oxysporum* in komkommer.

Nr.	Behandeling	Concentratie toepassing in blok	Concentratie toepassing in mat	Frequentie
1	Negatieve controle	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
2	Positieve controle	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
3	Champostthee (2%) + champost	2% v/v van voeding 0,5 g in plantgat vermengd met vermiculiet	2% v/v van voeding 7 g tussen blok en mat	Continu Eenmalig in blok en eenmalig tussen blok en mat
4	Biochar	0,5 g in plantgat vermengd met vermiculiet	7 g tussen blok en mat	Eenmalig in blok en eenmalig tussen blok en mat
5	<i>Fusarium</i> Fo47	10^5 sp/ml substraat	10^5 sp/ml substraat	Tweewekelijks (3x vanaf start)
6	<i>Trichoderma asperellum</i> T34	0,5 g/m ² ($3,3 \times 10^8$ sp/plant)	500 g/ha ($3,3 \times 10^7$ sp/plant)	Tweewekelijks (3x vanaf start)



Figuur 2.6 Behandelingen gemengd met vermiculiet.

2.5.2 *Fusarium* komkommer proef 2

Plantpathogene *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* is opgekweekt in steriel vloeibaar Czapek Dox medium. *Fusarium* is geïnoculeerd bij de planten twee weken na het planten op de mat. Bij elke plant, met uitzondering van de negatieve controle, is 60 ml *Fusarium* sporenoplossing aangegoten tussen het steenwolblok en de mat (tot eindconcentratie 10^5 sporen/ml steenwol).

2.6 Metingen komkommer proeven 1 en 2

2.6.1 Scoren ziektesymptomen

Bij beide proeven zijn de planten na infectie met plantpathogene *Fusarium oxysporum* wekelijks beoordeeld op de ontwikkeling van symptomen. Om te bepalen in welke mate de planten zijn aangetast is de ziekte index bepaald, eng. Disease Severity Index (DSI). Dit is gedaan door een score van 0 (gezond) t/m 4 (volledige aantasting) te geven aan de mate van verwelking en vergeling van de bladeren (Fout! Verwijzingsbron niet gevonden. en aantasting van de stengelvoet en aan de buitenkant (Bijlage 8).

2.7 Bemonstering voor microbiologische analyses

2.7.1 Bemonstering in lisianthus proeven

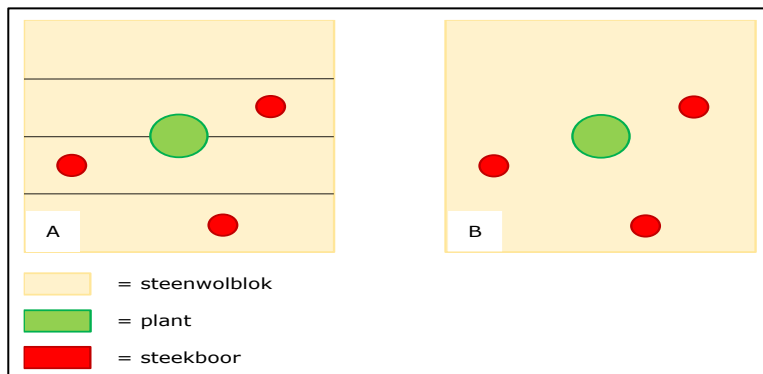
Tijdens de verschillende kasproeven met lisianthus zijn er grondmonsters genomen voor microbiologische analyses op verschillende tijdstippen in de teelt (week 2 en week 4 tenzij anders vermeld in de rapportage; voor en na het inoculeren met *Fusarium* pathogeen). Per behandeling zijn er altijd 4 aparte potten bemonsterd. Naast grondmonsters zijn er ook monsters van lisianthus rhizosfeer genomen (grond die vast zit aan de wortel; ≤ 2 mm van de wortel). Per plant is 1 gram wortel verzameld in een buis. Hier is 25 ml fosfaat gebufferde zoutoplossing (PBS) aan toegevoegd en gevortexed voor 1 minuut. Dit is vervolgens gefiltreerd door een 100 μ m filter. Het filtraat is daarna gecentrifugeerd voor 15 min bij 5000 rpm. Het verkregen pellet bevat micro-organismen die in plant rhizosfeer aanwezig waren.

2.7.2 Bemonstering in komkommerproeven

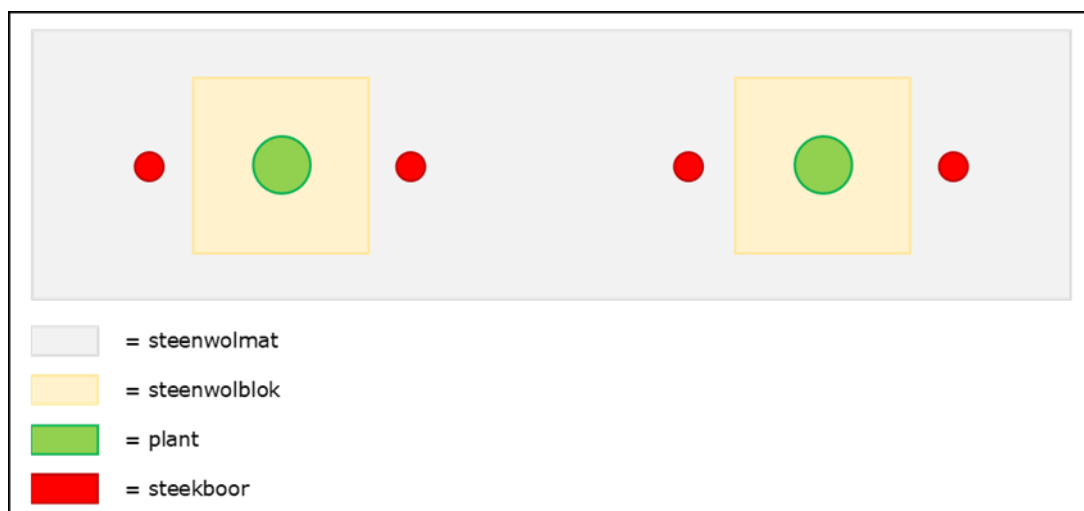
In de proeven met komkommers zijn ook monsters genomen voor analyse van micro-organismen in rhizosfeer van de planten en groeimedum (steenwol). Wortelmonsters zijn genomen door wortels van de steenwol te scheiden. Per plant is 1 gram wortel verzameld in een buis. Hier is 25 ml fosfaat gebufferde zoutoplossing (PBS) aan toegevoegd en gevortexed voor 1 minuut.

Dit is vervolgens gefiltreerd door een 100 µm filter. Het filtraat is daarna gecentrifugeerd voor 15 min bij 5000 rpm. Het verkregen pellet bevat micro-organismen die in plant rhizosfeer aanwezig waren. Het pellet is tot aan DNA-extractie bewaard in de -80°C vriezer. Substraatmonsters zijn op 3 plekken per steenwolkblok genomen met een boor (Ø 1 cm) (Figuur 2).

In de komkommerproef in 2021 zijn 2 dagen voor infectie en 3 weken na infectie (respectievelijk T=6 en T=9) groeimedum monsters genomen ten behoeve van microbiologische analyses. In de komkommerproef van 2022 zijn 4 dagen voor infectie en 4 weken na infectie (respectievelijk T=5 en T=9) groeimedum monsters genomen ten behoeve van microbiologische analyses. Per behandeling zijn 4 matten bemonsterd. Groeimedum monsters zijn op 4 plekken per mat genomen met een appelboor (Ø 1,9 cm) (Fout! V erwijzingsbron niet gevonden.).



Figuur 2.7 A = Monsternamen steenwolkblok, behandelingen met champost (gesneden blokken); B = Monsternamen steenwolkblok, alle behandelingen m.u.v. behandeling met champost (niet gesneden blokken).



Figuur 2.8 Monsternamen steenwolmatten, 4 steken per mat.

2.7.3 Chitinase activiteit in steenwolmatten

Na bemonstering is het substraat direct gebruikt voor het bepalen van de endo- en exochitinase activiteit. Per steenwolmonster is 0,5 gram afgewogen. Hier is 1 ml steriel demiwater aan toegevoegd en vervolgens voor 2 minuten op maximale snelheid geschud op een horizontale mixer. Het verkregen supernatant na centrifugeren is gebruikt voor het uitvoeren van het assay. Hiervoor is de chitinase assay kit van Sigma-Aldrich (CS1030) gebruikt en analyses zijn uitgevoerd volgens het protocol van de producent. De kit is gebaseerd op de enzymatische hydrolyse van chitine substraten.

Door de enzymatische hydrolyse komt 4-methylumbelliferone (4-MU) vrij en kan zo kolorimetrisch worden gemeten met een fluorescentiemeter met een excitatie golflengte van 360 nm en een emissie golflengte van 450 nm. De chitinase activiteit is berekend door gebruik van een ijklijn, een reeks met bekende concentraties 4-MU. Het uitgangsmateriaal is afkomstig van de substraatmonsters uit de komkommerproef van 2021 genomen op T=3, T=6 en T=9 en de komkommerproef van 2022 genomen op T=3, T=5 en T=9. Direct na monsternamen is de meting uitgevoerd. 1 unit (U) van chitinase activiteit maakt 1 µmol 4-MU/min vrij uit enzymsubstraat bij pH 5.0 bij 37°C.

2.7.4 DNA-extracties

Rhizosfeer- en groeimedium monsters zijn na monsternamen opgeslagen bij -80°C tot aan het moment van DNA-extractie. DNA-extracties zijn uitgevoerd met Qiagen DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen 12855) volgens het protocol van het producent met kleine aanpassingen. Met het verkregen DNA extract zijn de verdere DNA-analyses uitgevoerd.

2.7.5 qPCR analyses

Er zijn verschillende qPCR analyses uitgevoerd in de monsters van bodem/groeimedium en rhizosfeer van komkommers en lisianthus. Deze zijn opgesomd in Tabel 2.9.

Tabel 2.9 qPCR voor het bepalen van dichtheden van verschillende micro-organismen in bodem/groeimedium en rhizosfeer van komkommer of lisianthus.

qPCR	primers	Bron
Totale bacteriën (16S rRNA gen)	Eub338/ Eub518	Fierer <i>et al.</i> , 2005
Chitinase chiA	GA1F/GA1R	Williamson <i>et al.</i> , 2000
<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	FZB42-F/FZB42-R	Hafiz <i>et al.</i> , 2022
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> QST713	Serenade 1F- Serenade-1R	Mendis <i>et al.</i> , 2018
<i>Fusarium oxysporum</i> Fo47	P47C/P47D	Edel-Hermann <i>et al.</i> , 2011

2.7.6 Analyse van het microbioom in de bodem/groeimedium en rhizosfeer

Tijdens de kasexperimenten zijn bodem/groeimedium en rhizosfeer (bodem dichtbij plantenwortels; <2mm vanaf de wortels) monsters genomen om de diversiteit van het microbioom en eventuele veranderingen daarvan te bepalen.

Metabarcoding analyse is gebruikt om de diversiteit van bacteriële populaties (en voor de proef met lisianthus in 2021, ook schimmels) in de bodem, groeimedium en rhizosfeer in kaart te brengen.

Metabarcoding is uitgevoerd door Eurofins Genomics met Illumina MiSeq. Voor sequencing van het bacteriële microbioom is een variabel deel van 16S rRNA gen gebruikt (V3/V4 region). Gen 16S rRNA is aanwezig in alle bacteriën, maar afhankelijk van de soort is sequentie van dit gen verschillend. Voor sequencing van schimmels is fragment ITS gen gebruik (ITS2), die aanwezig is alle schimmel cellen.

3 Resultaten

3.1 Lisianthus proef 1 (juni-augustus 2020)

Symptomen van *Fusarium* infectie zijn niet goed ontwikkeld in cv Rosita 3 White tijdens de eerste proef met verschillende biorationale producten tegen ontwikkeling van *Fusarium*. Dit is waarschijnlijk veroorzaakt door de keuze van het cultivar. Uit resultaten van de tweede proef met lisianthus (in 2021) kwam naar voren dat cultivar Rosita 3 White veel toleranter is voor aanwezigheid van *Fusarium* in de grond dan andere cultivars, zoals Aren 2 Champagne. Rosita 3 White werd in eerste instantie gekozen omdat het één van de belangrijke cultivars is die in Nederlands kassen geteeld wordt.

3.1.1 Aanwezigheid *Fusarium* inoculum in de grond

Omdat de planten weinig symptomen van infectie met *Fusarium* lieten zien zijn er, vier weken na inoculatie met plantpathogenen *Fusarium oxysporum* f.sp. *eustomae* (op 27 juli 2020), grondmonsters genomen uit verschillende potten in de proef (negatieve en positieve controle behandeling) om te checken of *Fusarium* geïsoleerd kon worden uit de grond. Grondmonsters zijn vervolgens uitgeplaat op PDA medium (aardappel dextrose agar) voor schimmels en op *Fusarium* semi-selectief Komada medium.

Fusarium was aanwezig in de grond van de negatieve en positieve controle. In de grondmonsters van de positieve controle behandeling (onbehandeld, extra geïnoculeerd met plantpathogene *Fusarium*) was de *Fusarium* dichtheid (aantal kve/cm³ grond) significant hoger dan in de grond uit de negatieve controle behandeling (Tabel 1).

Tabel 3.1 *Fusarium* aanwezigheid in de grond (4 weken na inoculatie).

Behandeling	<i>Fusarium</i> dichtheid (kve/cm ³ grond)	
	PDA medium	Komada medium
Negatieve controle*	93	146
Positieve controle	65266	24666

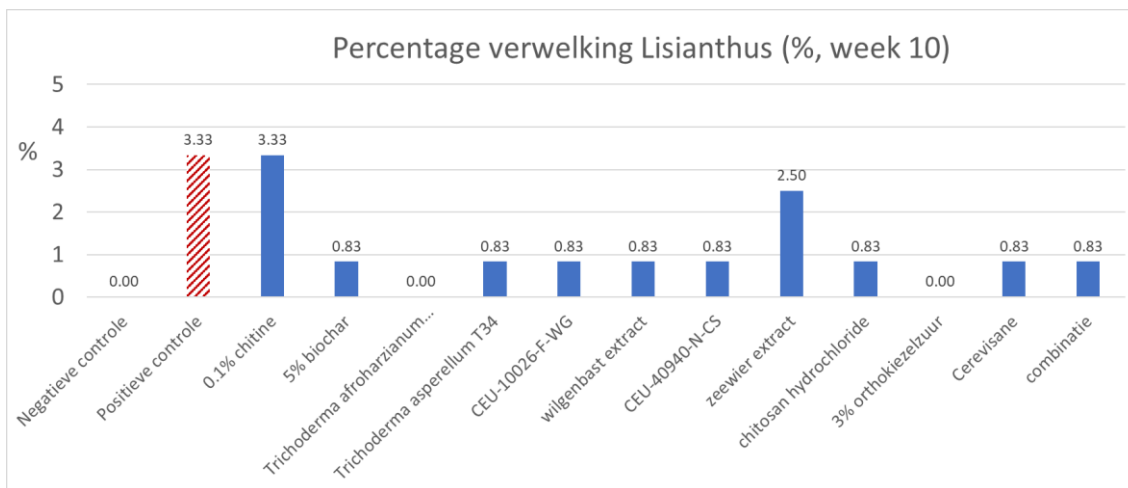
*Geen inoculatie met plant pathogene *Fusarium*.

3.1.2 Ziekteontwikkeling in lisianthus

Ondanks de hoge dichtheden van *Fusarium* inoculum in de grond, was de symptomenontwikkeling matig. Het is daarom moeilijk om te beoordelen of de behandelingen effect hebben gehad op de verwelkingsziekte van lisianthus veroorzaakt door *Fusarium oxysporum* f.sp. *eustomae* (Figuur 3.1).

Na afloop van de proef zijn monsters van wortels en stengels genomen van 20 verschillende planten in de negatieve en positieve controle (totaal 40 planten) om vast te stellen of *Fusarium* aanwezig was in het plantmateriaal.

Uit dit onderzoek bleek dat *Fusarium* in grote mate aanwezig was in de wortels van planten uit de positieve controle behandeling (geïnoculeerd met *Fusarium oxysporum* f.sp. *eustomae*) en ook relatief vaak gevonden is in de wortels van planten uit de negatieve controle behandeling (zonder inoculatie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *eustomae*) (Tabel 3. 2 en Figuur 3. 2).

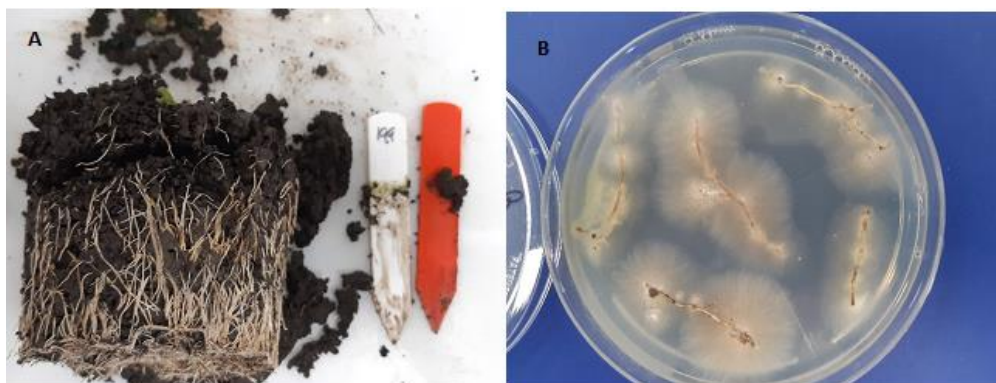


Figuur 3.1 Percentage van lisianthus planten met verwelkingsymptomen na 10 weken teelt (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum*). Behandeling combinatie: wilgenbast extract+ 3% orthokieselzuur + *Trichoderma afroharzianum* T22).

Tabel 3.2 *Fusarium* aanwezigheid in plantmateriaal (6 weken na inoculatie).

Behandeling	<i>Fusarium</i> aanwezigheid (in % onderzochte planten)	
	wortels	inwendig stengelbasis
Negatieve controle*	55	20
Positieve controle	100	55

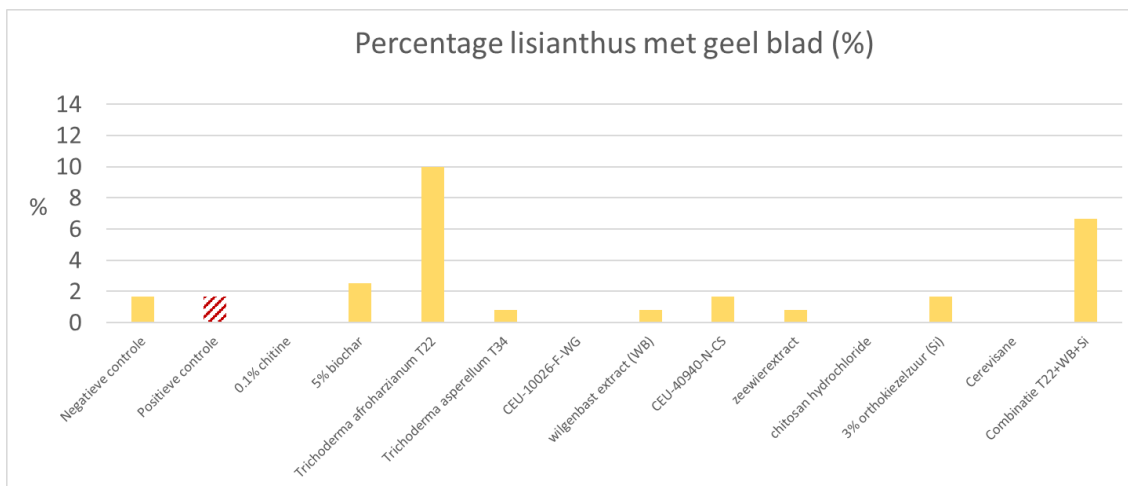
*Geen inoculatie met plant pathogene *Fusarium*.



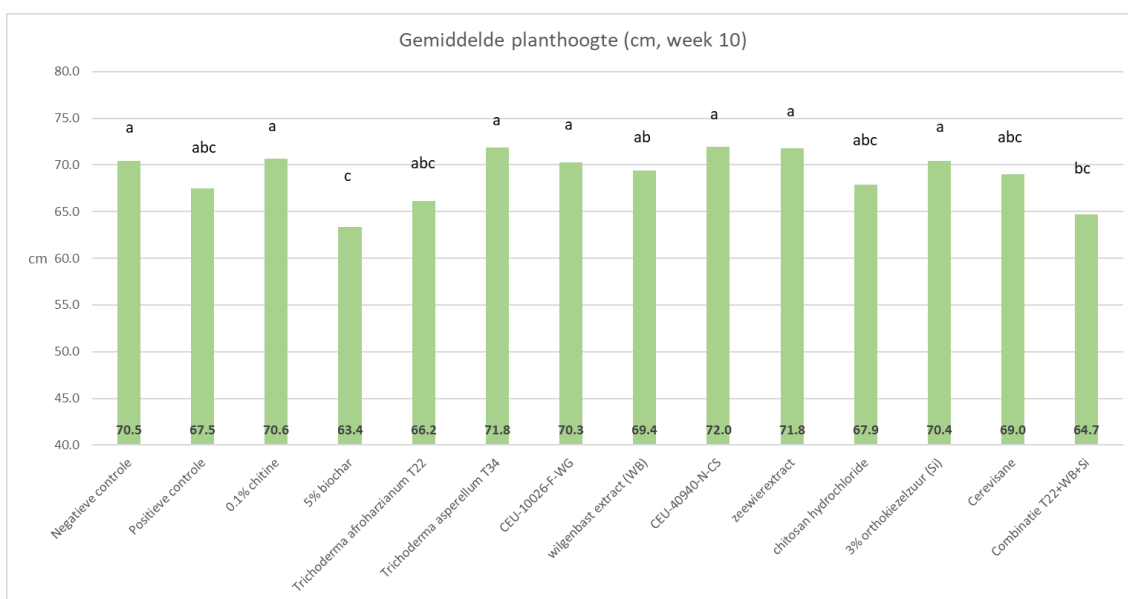
Figuur 3.2 Wortels van plant uit positieve controle behandeling: na verwijderen uit pot (a) en na uitplaten op *Fusarium* semiselectief medium (b).

Lisianthus planten ontwikkelden zich verschillend onder de invloed van de toegepaste behandelingen. Sommige behandelingen lijken een fytotoxisch effect op lisianthus planten te hebben, die zich uitte als vergeeld blad (Figuur 3.3), kleinere (in cm; Figuur 3.4) en lichtere planten (in gram, Figuur 3.5) en significant minder g gewicht/cm tak (Figuur 3.6).

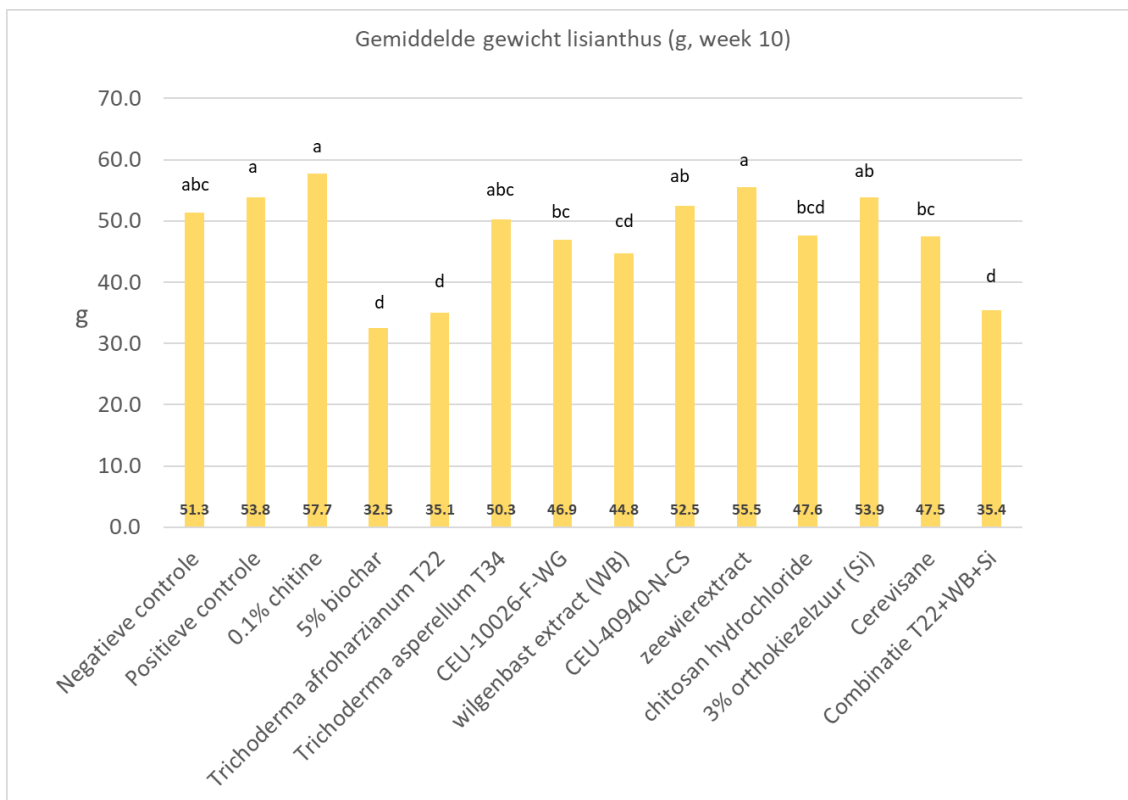
In Figuur 3.7, Figuur 3.8 en Figuur 3.9 zijn er voorbeelden weergegeven van gewasstand in verschillende behandelingen. In Figuur 3.10 zijn er voorbeelden weergegeven van vergelijk en verwelking symptomen in lisianthus.



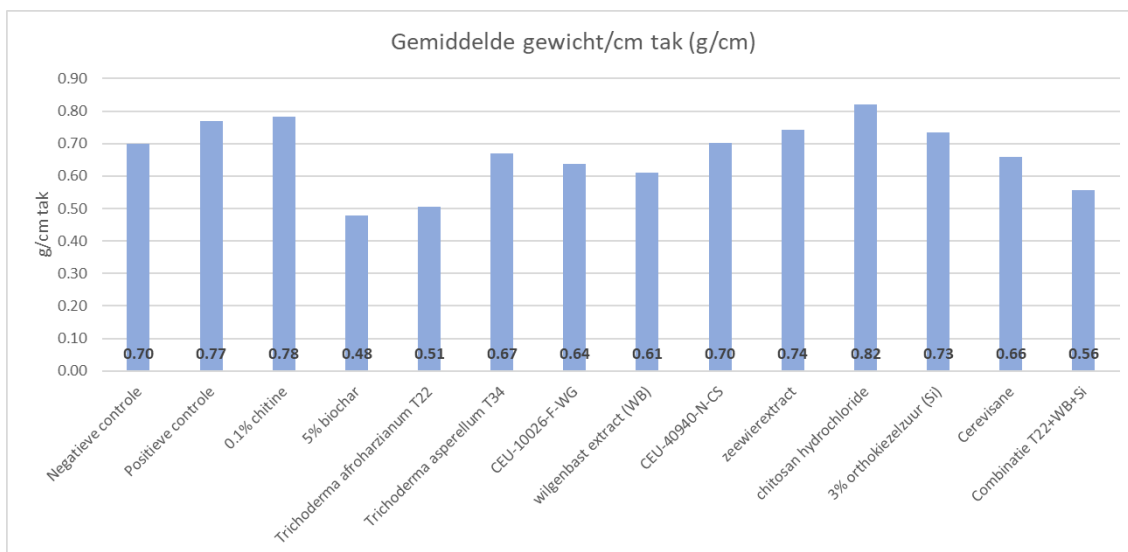
Figuur 3.3 Percentage van lisianthus planten met vergeeld blad na 10 weken teelt (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum*).



Figuur 3.4 Gemiddelde planthoogte lisianthus uit verschillende behandelingen na 10 weken teelt (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum*) (n=48).



Figuur 3.5 Gemiddelde versgewicht lisianthus uit verschillende behandelingen na 10 weken teelt (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum*) (n=48).



Figuur 3.6 Gemiddelde versgewicht (g) per cm tak in lisianthus uit verschillende behandelingen na 10 weken teelt (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum*) (n=48)



Figuur 3.7 Vergelijking gewasstand behandelingen 1 (negatieve controle, witte steekhout), 4 (biochar, gele steekhout), 5 (*Trichoderma afroharzianum* T22+kruidenextract; groen steekhout) en 6 (*Trichoderma asperellum* T34, blauw steekhout) op 13 juli 2020.



Figuur 3.8 Vergelijking gewasstand behandeling 2 (positieve controle, wit-rood steekhout) en 4 (biochar, 5% v/v gele steekhout) op 9 juli 2020.



Figuur 3.9 Vergelijking gewasstand behandelingen 2 (positieve controle, wit-rood steekhout) en 14 (combinatie, oranje-paars steekhout) op 9 juli 2020



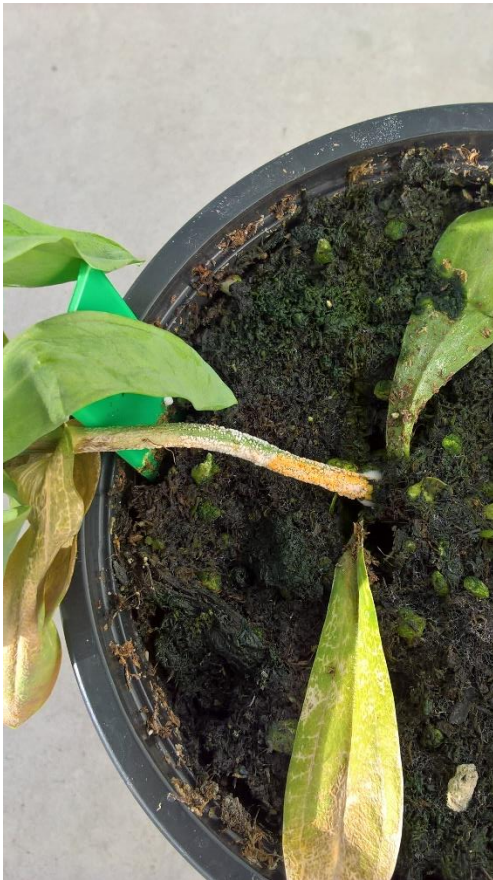
Figuur 3.10 Voorbeelden van verwelkingssymptomen op 23 juli 2020

3.2 Lisianthus proef 2 (januari-maart 2021)

3.2.1 Ziekteontwikkeling in lisianthus

Fusarium verwelking heeft zich snel ontwikkeld in de lisianthus planten, met de eerste symptomen die zichtbaar waren 5 weken na het planten, dat is drie weken na inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum*. Helaas bleek er ook andere plantpathogene *Fusarium* aanwezig te zijn in het systeem, namelijk *Fusarium solani* (Figuur 3.11), ondanks het feit dat met uitplaten van grondmonsters voor het begin van de proef geen *Fusarium* was gevonden in de grond. Omdat er een additioneel pathogeen aanwezig bleek te zijn, is er uiteindelijk ook in de negatieve controle behandeling (zonder toevoeging van plant pathogene *F. oxysporum*) veel uitval van de planten geconstateerd.

A *Fusarium oxysporum* f. sp. *eustomae*

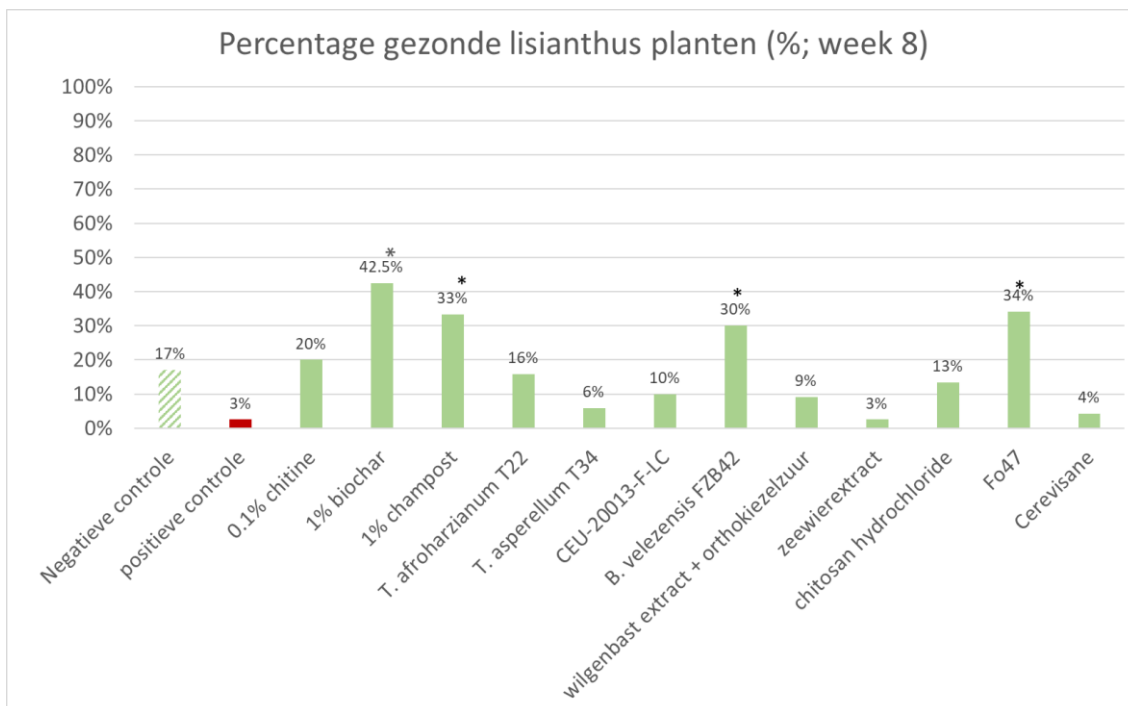


B *Fusarium solani*

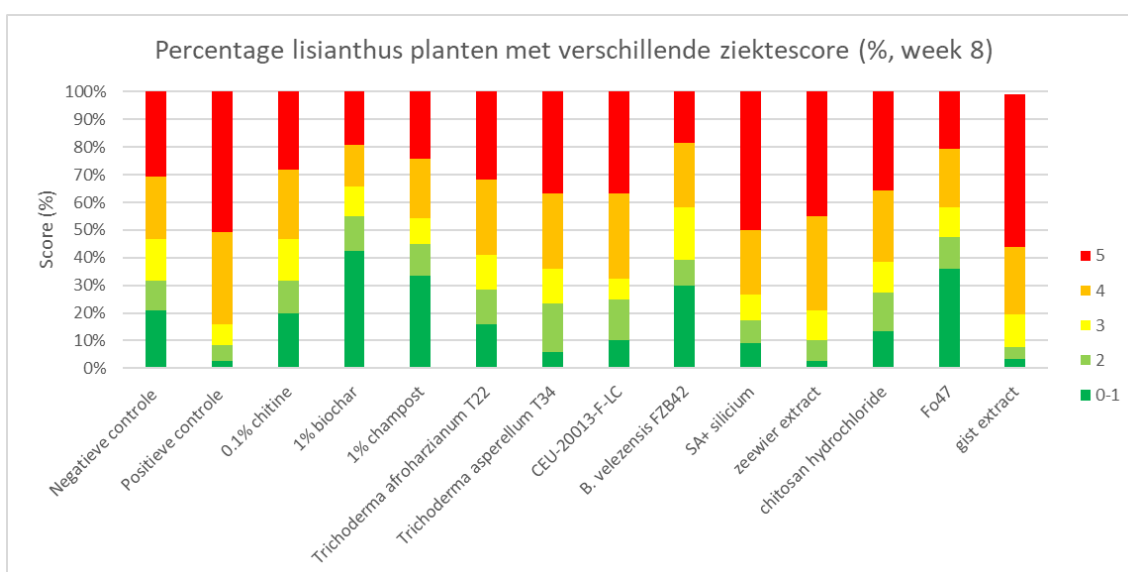


Figuur 3.11 Symptomen van *Fusarium* infectie in lisianthus planten: A) *Fusarium oxysporum* f.sp. *eustomae* en B) *Fusarium solani*.

Na acht weken teelt waren bijna alle planten van de positieve controle ziek (98%), terwijl in de negatieve controle ook veel planten ziek zijn geworden (83%) (Figuur 3.12). Twee behandelingen ter verhoging van bodemweerbaarheid tegen *Fusarium*: 1% biochar en 1% champost, met respectievelijk 58% en 67% uitval, hadden significant effect op de ontwikkeling van de ziektesymptomen (Figuur 3.12). Ook twee behandelingen met biofungiciden, *B. velezensis* FZB42 en *Fusarium oxysporum* Fo47, met respectievelijk 70% en 66% uitval, hadden significant effect op de ontwikkeling van de ziekte symptomen (Figuur 3.12). In bovengenoemde behandeling waren veel planten met een ziektescore 0 of 1 (ziekte score 0 t/m 5; 0- gezond plant, 5- dood plant) (Figuur 3.13).

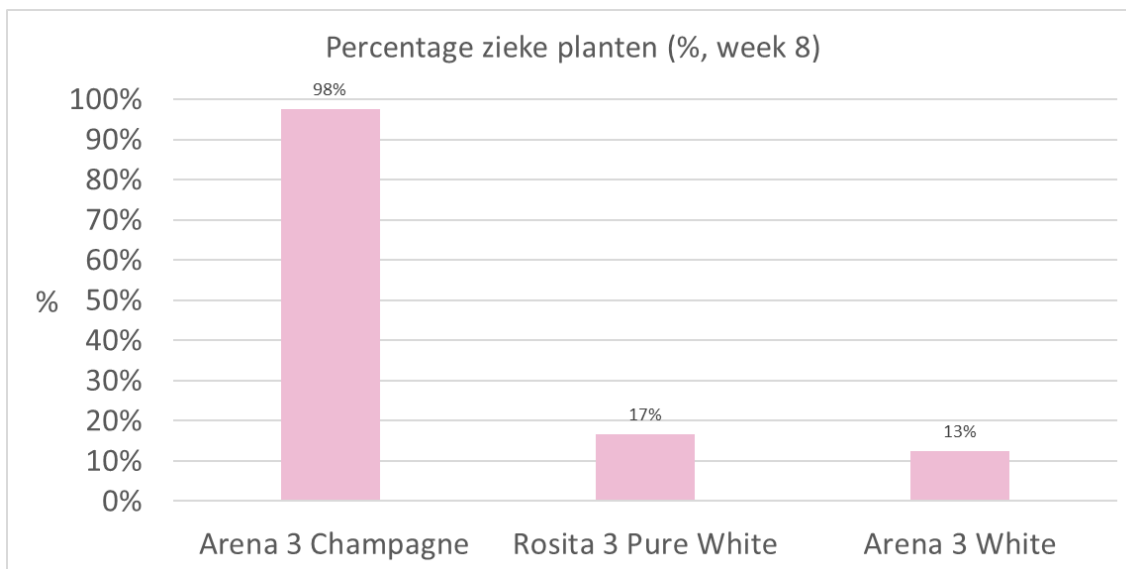


Figuur 3.12 Percentage van gezonde lisianthus planten na 8 weken teelt (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum*). Met een sterretje zijn behandelingen aangegeven die significant verschillend zijn van de controles.



Figuur 3.13 Percentage van lisianthus planten met verschillende ziekte scores (0 t/m 5; 0- gezond; 5-dood plant) na 8 weken teelt (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum*).

De ontwikkeling van de symptomen van *Fusarium* verwelking was veel minder zichtbaar in de andere twee cultivars (Rosita 3 White en Arena White), ondanks inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum* en aanwezigheid van *Fusarium solani*. Na 8 weken teelt waren 17% en 13% planten in de positieve controle behandeling ziek geworden, respectievelijk voor cultivar Rosita 3 Pure White en Arena 3 White (Figuur 3.14). Ondanks het feit dat planten visueel geen symptomen vertoonden werd er wel *Fusarium solani* en *Fusarium oxysporum* geïsoleerd uit de stengels (na het ontsmetten van de buitenkant van de stengel).



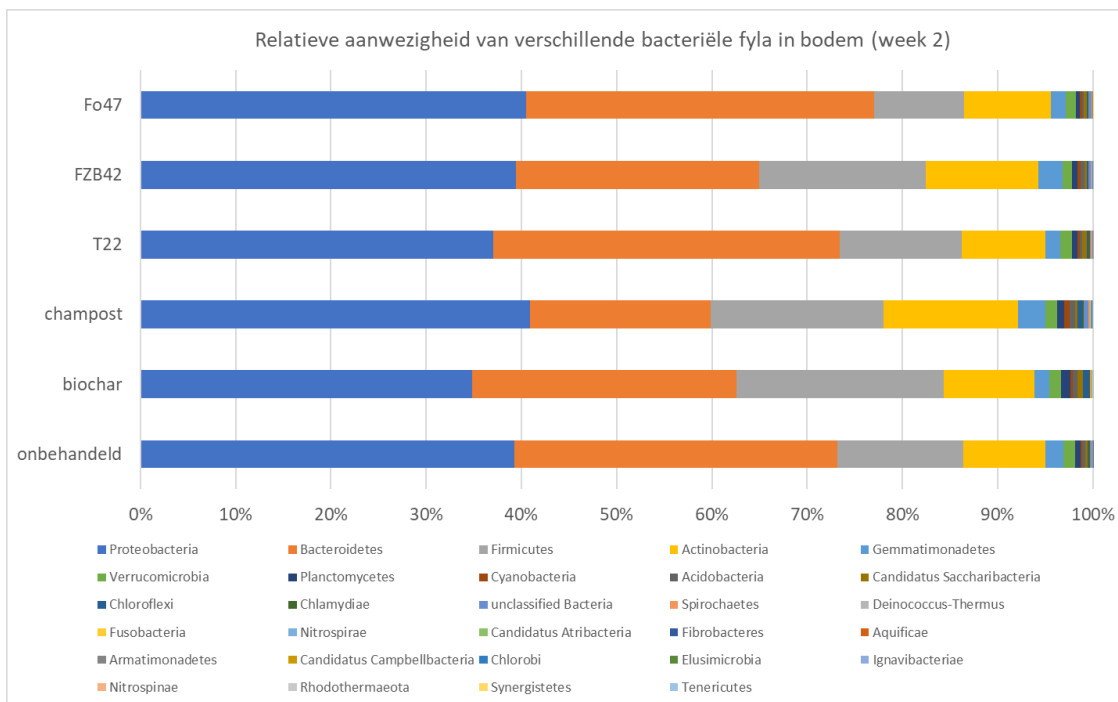
Figuur 3.14 Vergelijking van ontwikkeling van *Fusarium* verwelking in verschillende *lisianthus* cultivars (6 weken na inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum*).

3.2.2 Microbioom analyse

3.2.2.1 Bodemmicrobioom

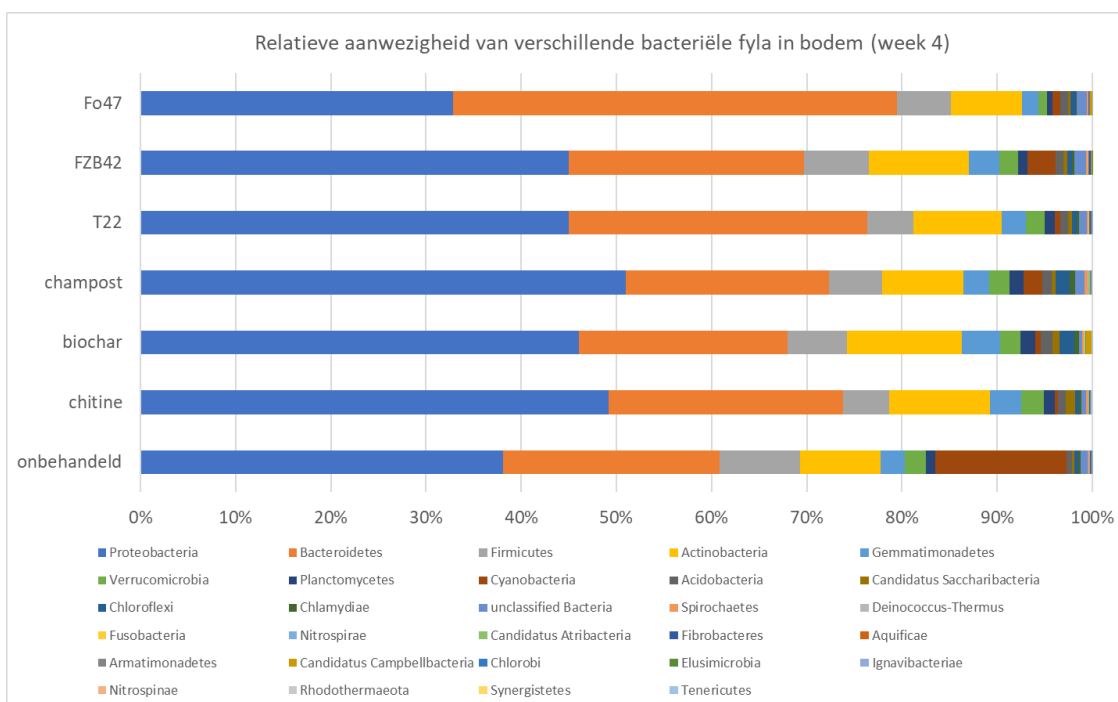
Grondmonsters zijn ook op twee verschillende momenten in de teelt genomen: 1) week 2, net voor inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum* en 2) week 4, twee weken na inoculatie van plantpathogene *Fusarium oxysporum*.

Uit de analyse van het bacteriële microbiom in de bodem blijkt dat *Proteobacteria* is een fyllum met het hoogste percentage van relatieve aanwezigheid in de bodemmonsters, zowel in de tweede (Figuur 3.15) als in de vierde week (Figuur 3.16) van het kasexperiment (met uitzondering van de behandeling met *F. oxysporum* Fo47). De behandeling met *F. oxysporum* Fo47 resulteerde in hoge relatieve aanwezigheid van fyllum *Bacteroidetes* in week 4- 46,7% (Figuur 3.16), meer dan 2x zo hoog als in onbehandelde grond. In onbehandelde grond was de relatieve aanwezigheid van *Bacteroidetes* onder 23%.



Figuur 3.15 Diversiteit van bacteriële microbiom op fyllum niveau in de bodem in de 2^{de} week van de teelt (voor inoculatie van plantpathogene *Fusarium oxysporum*).

onbehandeld- controle (geen behandeling, geen inoculatie plantpathogene *F. oxysporum*); chitine- behandeling 0.1% (v/v) chitine; biochar- behandeling 1% (v/v) biochar; champost- behandeling 1% (v/v) champost; T22- behandeling met *T. afroharzianum* T22; FZB42- *Bacillus velezensis* FZB42; Fo47- niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo47.



Figuur 3.16 Diversiteit van bacteriële microbiom op fyllum niveau in de bodem in de 4^{de} week van de teelt (2 weken na inoculatie van plantpathogene *Fusarium oxysporum*).

onbehandeld- controle (geen behandeling, geen inoculatie plantpathogene *F. oxysporum*); chitine- behandeling 0.1% (v/v) chitine; biochar- behandeling 1% (v/v) biochar; champost- behandeling 1% (v/v) champost; T22- behandeling met *T. afroharzianum* T22; FZB42- *Bacillus velezensis* FZB42; Fo47- niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo47.

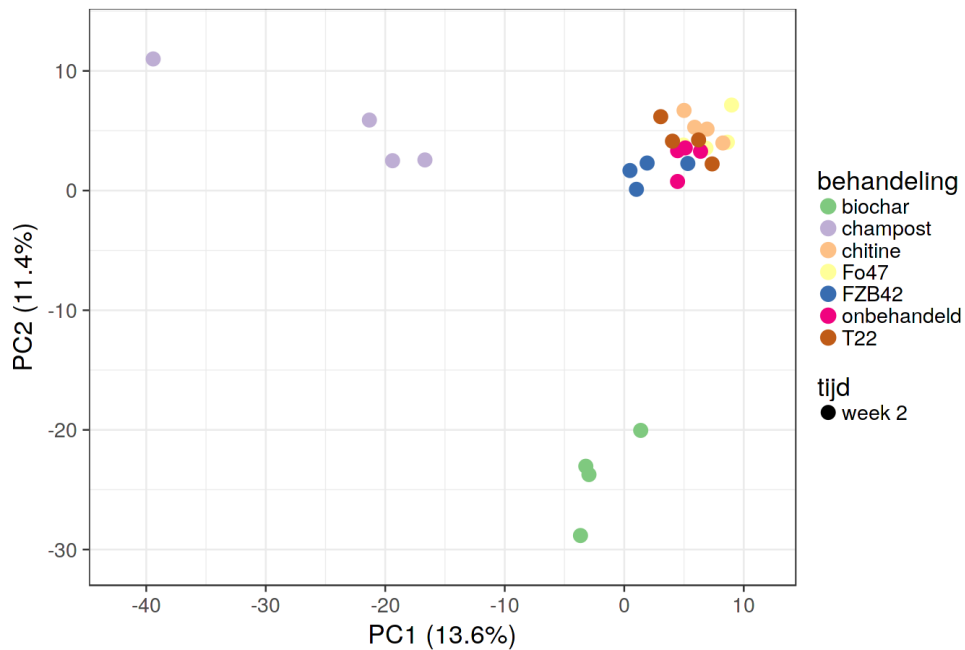
Er zijn meer dan 1000 bacteriële geslachten aanwezig in de onderzochte bodemmonsters. Het is echter opvallend dat maar een beperkt aantal daarvan de bacteriële gemeenschap in de grond lijkt te domineren. Dat zijn geslachten: 1) *Flavobacterium*, met gemiddeld relatieve aanwezigheid van 9.5% (onbehandelde controle) tot 41.5% (behandeling met *F. oxysporum* Fo47) van alle gevonden bacteriële sequenties, 2) *Pseudomonas* met 1% (onbehandelde controle) tot 14% relatieve aanwezigheid (behandelingen met biochar en champost) van alle gevonden bacteriële sequenties. Andere dominante geslachten zijn o.a. *Algoriphagus*, *Pseudosporangium*, *Paenibacillus*, *Lysobacter*, *Gemmatimonas*, *Acinetobacter*, *Hydrogenophaga*, *Cellvibrio* en *Bacillus*.

De PCA (Principal Component Analysis) laat zien dat het totale bacteriële microbiom (geslacht niveau, week 2 en 4 van de teelt) van de bodem significant is veranderd als gevolg van de behandelingen met champost en biochar (Figuur 3.17A). Meting in de week 4, twee weken na inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum*, laat zien dat de samenstelling van het bacteriële microbiom in deze behandelingen nog steeds blijft verschillen van de onbehandelde controle. In week 4 heeft ook de behandeling met Fo47 geresulteerd in significante verandering in de samenstelling van het bacteriële bodemmicrobiom (geslacht niveau) (Figuur 3.17B). Andere behandelingen hadden geen significant effect op de samenstelling van het bacteriële microbiom in de onderzochte bodemmonsters.

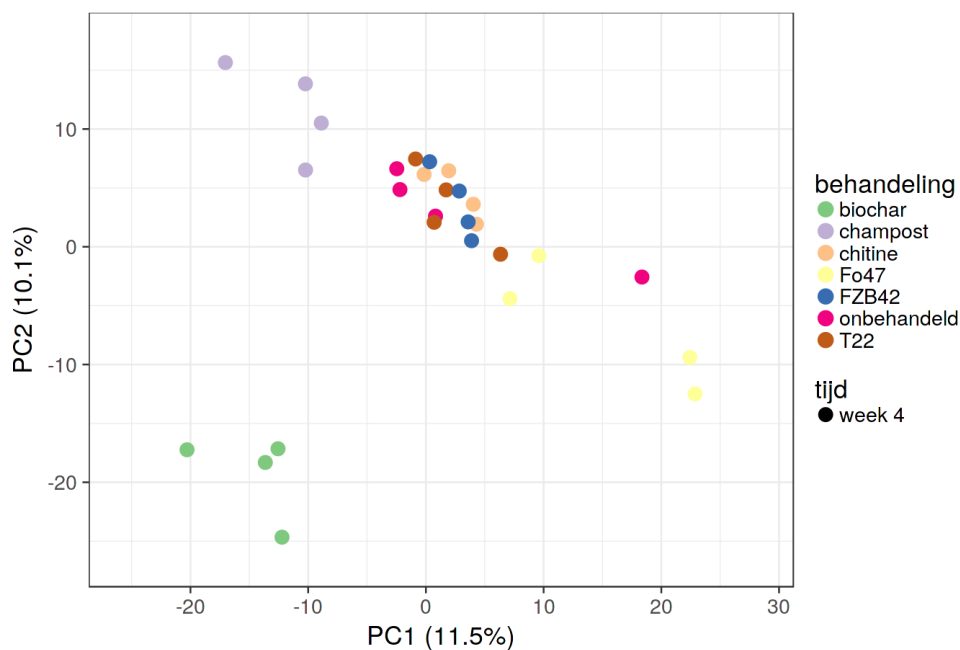
Relatieve aanwezigheid van sommige bacteriële geslachten, in week 4 van de teelt, laat een sterke negatieve correlatie zien met ontwikkeling van de *Fusarium* verwelking later in de teelt, o.a. *Pseudomonas* ($r=-0.48$; $p=0.01$), *Hyphomicrobium* ($r=-0.58$; $p=0.05$).

De samenstelling van het bacteriële bodemmicrobiom verandert in de tijd, ook in onbehandelde grond tijdens een relatief korte periode tussen week 2 en week 4 van de teelt, wat blijkt uit PCA analyse (Figuur 3.18). Samenstelling van het bacteriële microbiom, op geslacht niveau, in onbehandelde grond in de tweede week van de teelt is significant anders dan in week 4 van de teelt. Samenstelling van het bacteriële microbiom in de negatieve en positieve controle (respectievelijk, zonder en met inoculatie van plantpathogene *Fusarium oxysporum*) in de week 4 van de teelt is niet verschillend (Figuur 3.18).

A bacteriële microbiom in de bodem- week 2

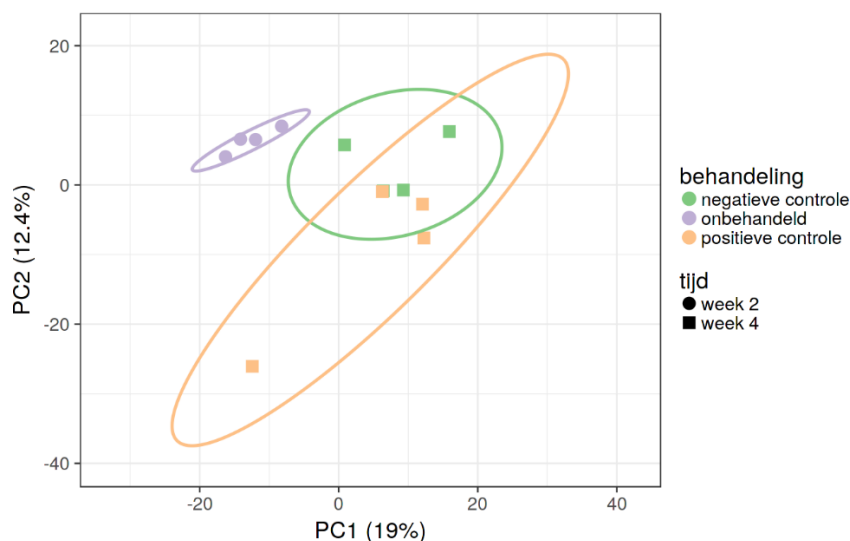


B bacteriële microbiom in de bodem- week 4



Figuur 3.17 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële diversiteit (geslacht niveau) in de bodem in de 2^{de} week (voor de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*) en 4^{de} week van teelt (na de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*). Er zijn 4 bodemmonsters geanalyseerd van elk behandeling.

onbehandeld- controle (geen behandeling); chitine- behandeling 0.1% (v/v) chitine; biochar- behandeling 1% (v/v) biochar; champost- behandeling 1% (v/v) champost; T22- behandeling met *T. afroharzianum* T22; FZB42- *Bacillus velezensis* FZB42; Fo47- niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo47.

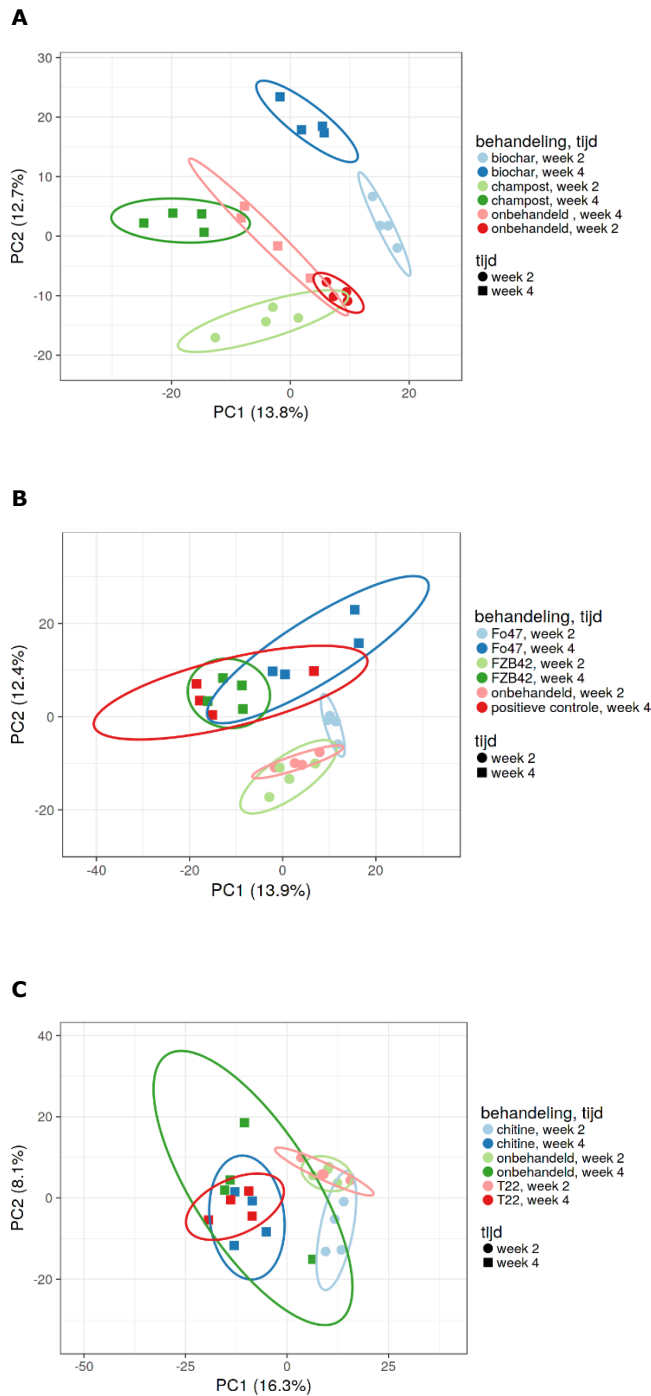


Figuur 3.18 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële diversiteit (geslacht niveau) in de onbehandelde bodem in de 2^{de} week (voor de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*) en 4^{de} week van teelt (na de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*). Er zijn 4 bodemonsters geanalyseerd van elk behandeling.

onbehandeld- controle (geen behandeling, voor inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum*); negatieve controle- onbehandeld zonder toevoeging van plant pathogene *Fusarium oxysporum*; positieve controle- onbehandeld met toevoeging van plant pathogene *Fusarium oxysporum*.

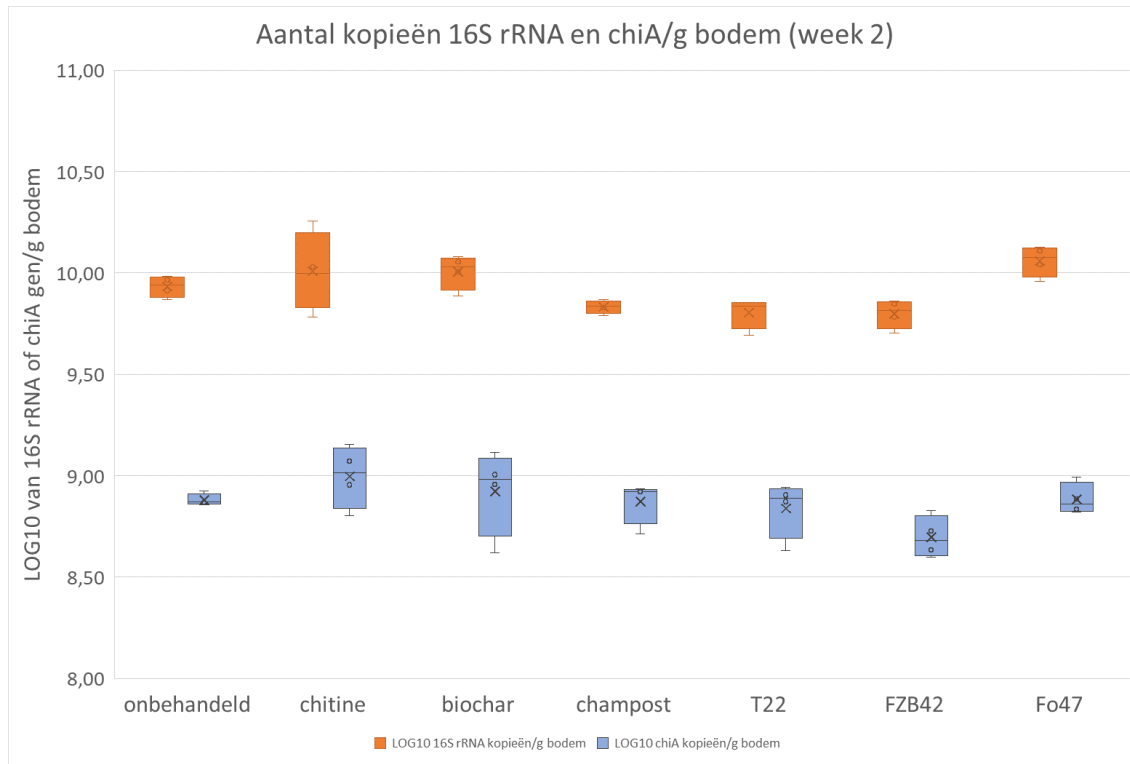
De samenstelling van het bacteriële bodemmicrobioom verandert ook in de tijd in andere behandelingen. In behandelingen met biochar of champost blijven samenstellingen van bacteriële microbiom significant verschillend, ook in de tijd, ten opzichte van onbehandelde controle (Figuur 3.19A). Het bacteriële microbiom in de grond van behandeling met *Fusarium oxysporum* Fo47 verschilt ook duidelijk van onbehandelde grond in week 2, maar na inoculatie van plantpathogene *Fusarium oxysporum* (bemonstering in week 4) is het bacteriële microbiom in deze behandeling niet verschillend van onbehandelde controle (Figuur 3.19B). Hetzelfde geldt voor behandeling met chitine (Figuur 3.19C). Het bacteriële microbiom in de bodem van behandelingen met *Bacillus velezensis* FZB42 en *Trichoderma afroharzianum* T22 verandert ook in de tijd, maar de resulterende samenstellingen zijn niet significant verschillend van de samenstelling van het bacteriële microbiom in de bodem van de onbehandelde controle.

Dichtheid van de populatie bacteriën in de bodem tijdens de proef is bepaald met qPCR (op 16S rRNA gen). Er zijn ongeveer 10^{10} (LOG10≈10) kopieën van 16S rRNA gen/1 gram grond gemeten in de bodem, ongeacht de behandeling (Figuur 3.20). Aantal kopieën van chitinase *chiA* gen/g grond was ook relatief hoog met 10^9 (LOG10=9) (Figuur 3.20). Ratio van aantal kopieën *chiA* vs aantal kopieën 16S rRNA (ratio *chia*:16S rRNA; %) wijst op het feit dat relatief veel bacteriën (tussen 6 en 12% van alle bacteriën), die aanwezig zijn in de grond, potentie hebben om chitine af te breken (Figuur 3.21).

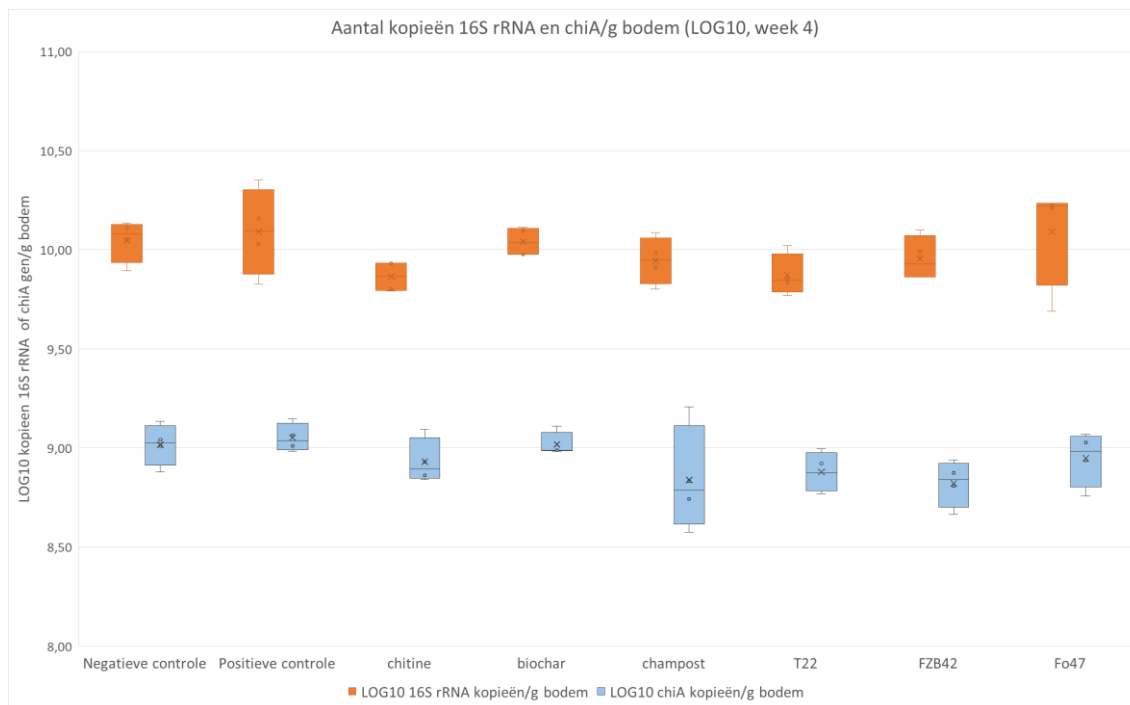


Figuur 3.19 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële diversiteit (geslacht niveau) in de onbehandelde en behandelde bodem in de 2^{de} week (voor de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*) en 4^{de} week van teelt (na de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*). Er zijn 4 bodemonsters geanalyseerd van elk behandeling. onbehandeld- controle (geen behandeling); chitine- behandeling 0.1% (v/v) chitine; biochar- behandeling 1% (v/v) biochar; champost- behandeling 1% (v/v) champost; T22- behandeling met *T. afroharzianum* T22; FZB42- *Bacillus velezensis* FZB42; Fo47- niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo47. Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terechtkomen van een bepaalde behandeling.

A totale aantallen bacteriën in de bodem (week 2)

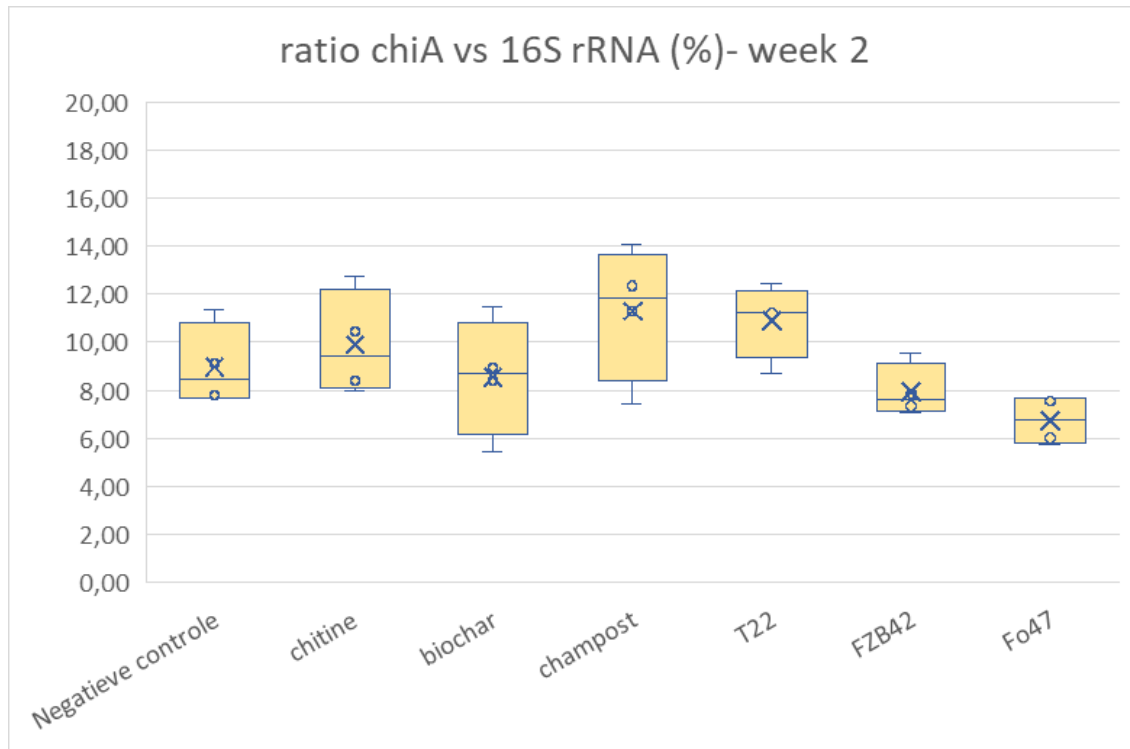


B totale aantallen bacteriën in de bodem (week 4)

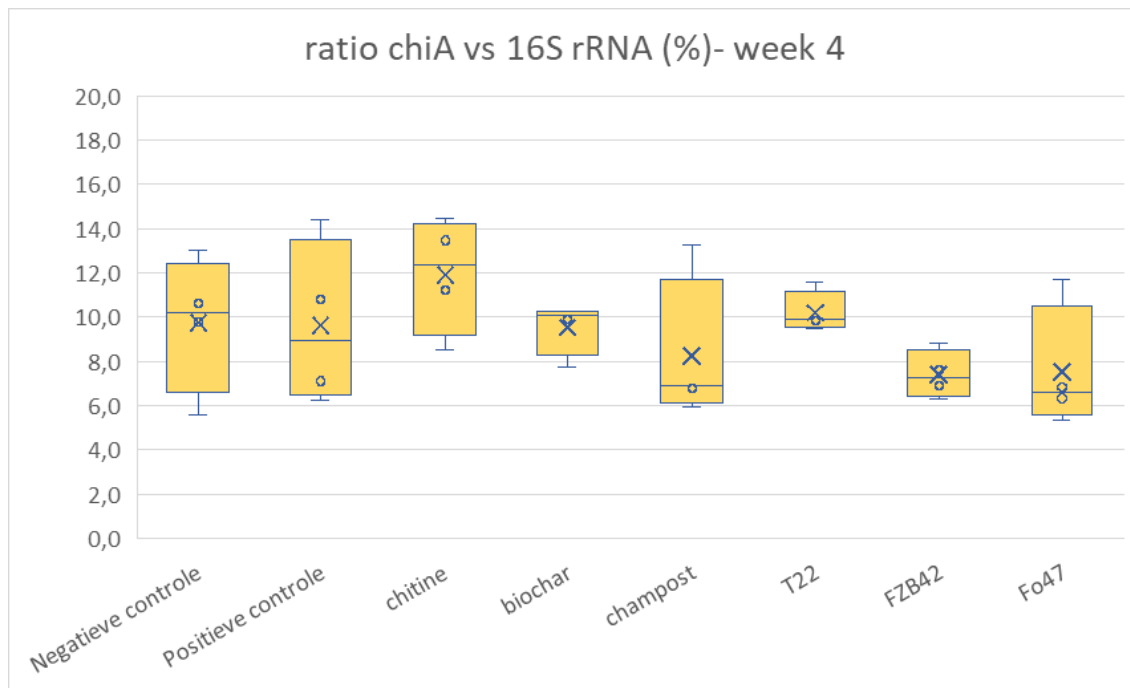


Figuur 3.20 Aantallen van totale bacteriën (op basis van qPCR 16S rRNA kopieën) en chitinase *chiA* producerende bacteriën (op basis van qPCR kopieën *chiA* gen) in de onbehandelde en behandelde bodem in de 2^{de} week (voor de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*) en 4^{de} week van teelt (na de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*). Er zijn 4 bodemmonsters geanalyseerd van elk behandeling. onbehandeld- controle (geen behandeling); negatieve controle (onbehandeld, zonder *Fusarium*), positieve controle (onbehandeld, met *Fusarium*) chitine- behandeling 0.1% (v/v) chitine; biochar- behandeling 1% (v/v) biochar; champost- behandeling 1% (v/v) champost; T22- behandeling met *T. afroharzianum* T22; FZB42- *Bacillus velezensis* FZB42; Fo47- niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo47.

A ratio chitinase vs totale bacteriën- ratio chiA:16S rRNA (week 2)



B ratio chitinase vs totale bacteriën- ratio chiA:16S rRNA (week 4)



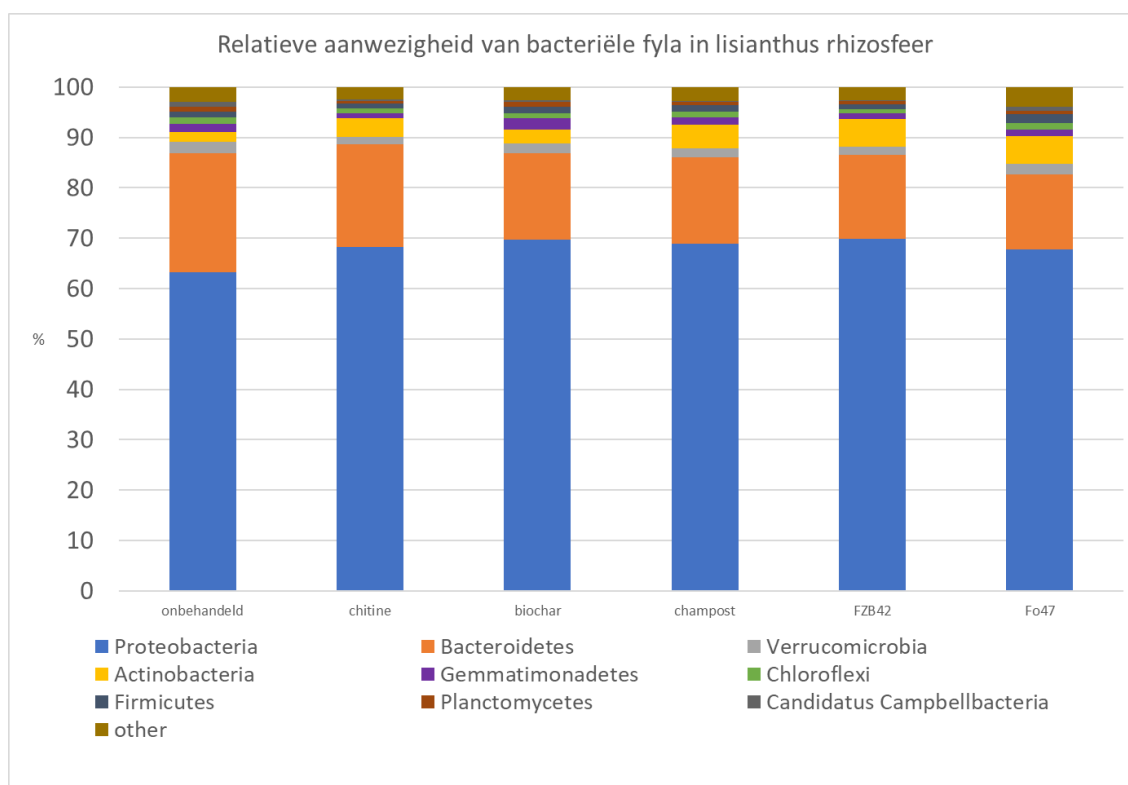
Figuur 3.21 Ratio van *chiA* ten opzichte van 16S rRNA (op basis van qPCR kopieën gen) in de onbehandelde en behandelde bodem in de 2^{de} week (voor de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*) en 4^{de} week van teelt (na de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*). Er zijn 4 bodemmonsters geanalyseerd van elk behandeling.

onbehandeld- controle (geen behandeling); negatieve controle (onbehandeld, zonder *Fusarium*), positieve controle (onbehandeld, met *Fusarium*) chitine- behandeling 0.1% (v/v) chitine; biochar- behandeling 1% (v/v) biochar; champost- behandeling 1% (v/v) champost; T22- behandeling met *T. afroharzianum* T22; FZB42- *Bacillus velezensis* FZB42; Fo47- niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo47.

3.2.2.2 Rhizosfeer microbiom

Microbiom analyse is alleen uitgevoerd in de rhizosfeer monsters uit de behandelingen die significant effect hebben gehad op de ontwikkeling van *Fusarium* verwelking in lisianthus (biochar, champost, *B. velezensis* FZB42, *F. oxysporum* Fo47), uit de positieve controle (geen behandeling; inoculatie van plantpathogene *F. oxysporum*) en uit behandeling met 0.1% (v/v) chitine. Per behandeling zijn er 4 planten bemonsterd voor de analyse van rhizosfeer microbiom.

Uit analyse van het bacteriële microbiom in de rhizosfeer van lisianthus blijkt, dat *Proteobacteria* de fyllum is met het hoogste percentage van relatieve aanwezigheid in de rhizosfeer van lisianthus, tussen 63.0% en 70% van alle bacteriële sequenties, op het eind van kasexperiment (Figuur 3.22). Ook fyllum *Bacteroidetes* is aanwezig in hoge percentages (tussen 14.8% en 23.7% van alle bacteriële sequenties). Andere bacteriële fylla die aanwezig zijn in relatief hoge percentages zijn o.a: *Verrucomicrobia* (1.4% tot 2.3% sequenties), *Actinobacteria* (1.8% tot 5.5% sequenties), *Firmicutes* (1% tot 1.6% sequenties), *Gemmatimonadetes* (0.9% tot 1.6% sequenties). Relatieve aanwezigheid van sommige bacteriële fylla in rhizosfeer laat een sterke negatieve correlatie zien met ontwikkeling van de *Fusarium* verwelking, o.a. *Actinobacteria* ($r=-0.43$; $p=0.05$), Candidatus *Saccharibacteria* ($r=-0.49$; $p=0.05$) en *Proteobacteria* ($r=-0.63$; $p=0.01$). Terwijl relatieve aanwezigheid van andere fylla in rhizosfeer juist positief is gecorreleerd met *Fusarium* verwelking o.a. *Bacteroidetes* ($r=0.74$; $p=0.01$), *Spirochaetes* ($r=0.47$; $p=0.05$), Candidatus *Campbellbacteria* ($r=0.46$; $p=0.05$) en *Fibrobacteres* ($r=0.43$; $p=0.05$).

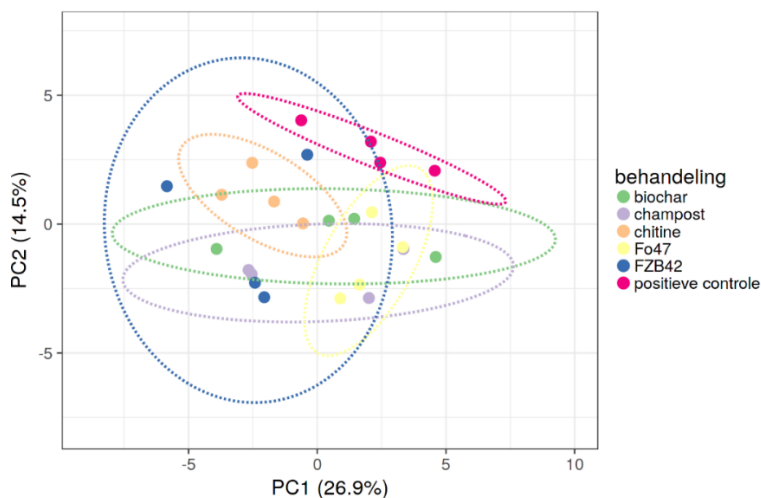


Figuur 3.22 Diversiteit van bacteriële microbiom op fyllum niveau in de rhizosfeer van lisianthus planten op het eind van kasexperiment. Onbehandeld- geen behandeling, inoculatie plantpathogene *F. oxysporum*; chitine- 0.1% chitine; biochar- 1% biochar; champost- 1% champost; FZB42- *Bacillus velezensis* FZB42; Fo47- niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo47.

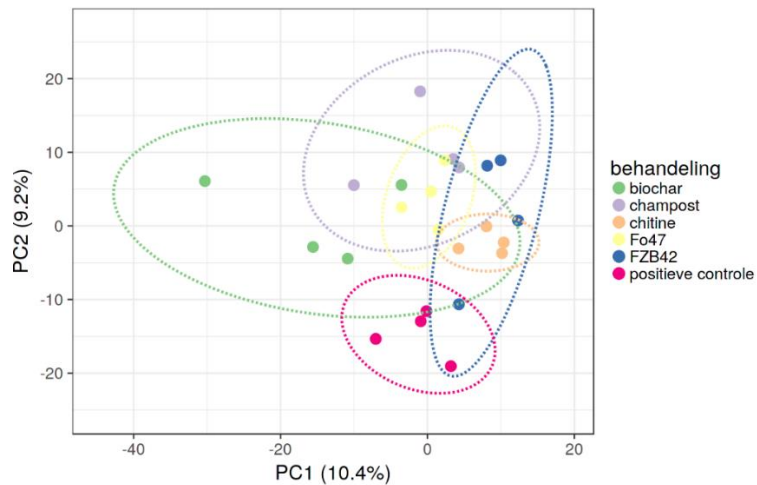
De PCA (Principal Component Analysis) laat zien dat het totale bacteriële microbiom (fyllum niveau) van de lisianthus rhizosfeer significant is veranderd als gevolg van de behandelingen (Figuur 3.23). Uit PCA analyse blijkt ook dat er significante verschillen zijn in rhizosfeer microbiom van lisianthus op geslacht niveau (Figuur 3.24). De geslachten met de hoogste percentages in relatieve aanwezigheid zijn *Pseudomonas* en *Flavobacterium*.

Relatieve aanwezigheid van sommige bacteriële geslachten in rhizosfeer aan het einde van teelt laat een sterke negatieve correlatie zien met ontwikkeling van de *Fusarium* verwelking, o.a. *Pseudomonas* ($r=-0.65$; $p=0.01$; $n=24$) en *Hydrogenophaga* ($r=-0.49$; $p=0.05$; $n=24$). Dat betekent dat hoe hoger relatieve percentage van deze bacteriële geslachten, hoe minder ziektesymptomen zijn waargenomen in lisianthus planten. Dat zou kunnen betekenen dat deze bacteriële geslachten zijn belangrijk in onderdrukking van *Fusarium* infectie.

Terwijl relatieve aanwezigheid van de andere bacteriële geslachten juist positieve correlatie met ziekteontwikkeling laat zien, zoals o.a. *Cellvibrio* ($r=0.82$; $p=0.01$; $n=24$), *Flavobacterium* ($r=0.64$; $p=0.01$; $n=24$). Dat betekent dat in de rhizosfeer van de planten die meer ziektesymptomen hebben ontwikkeld, zijn deze bacteriële geslachten in hogere relatieve aanwezigheid gevonden. Dat kan betekenen dat aanwezigheid van deze bacteriën de planten gevoeliger heeft gemaakt voor *Fusarium*, of dat deze bacteriën juist na de infectie zijn pas door de plant aangetrokken, via wortellexudaten, om de *Fusarium* te bestrijden (in het Engels: cry for help). De correlatie analyse verklaart helaas deze causaliteit niet.



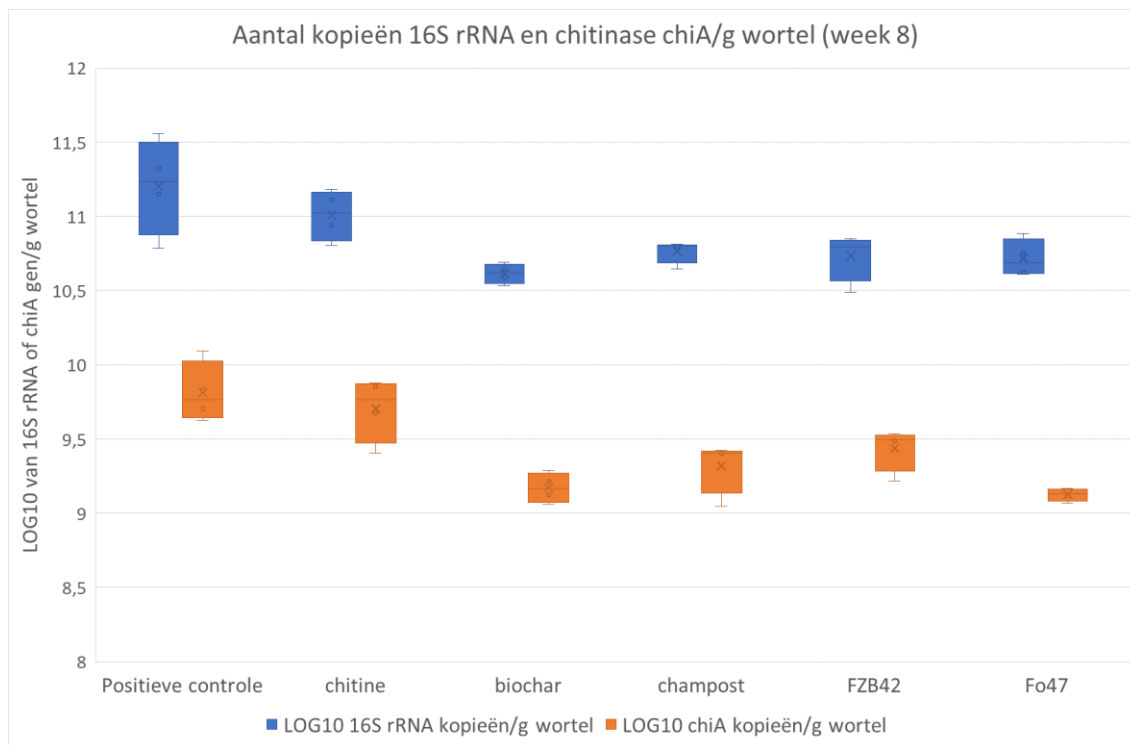
Figuur 3.23 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële diversiteit (fylum niveau) in de rhizosfeer van lisianthus planten op het eind van kasexperiment. positieve controle (geen behandeling, inoculatie plantpathogene *F. oxysporum*); chitine- 0.1% chitine; biochar- 1% biochar; champost- 1% champost; FZB42- *Bacillus velezensis* FZB42; Fo47- niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo47). Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terechtkomen van een bepaalde behandeling.



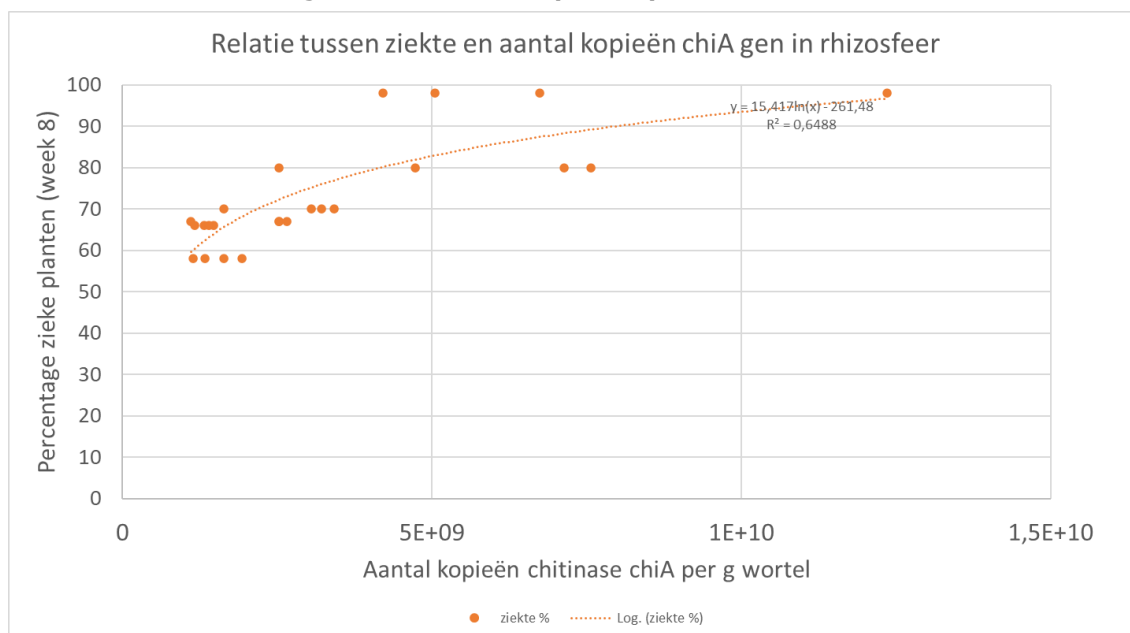
Figuur 3.24 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële diversiteit (geslacht niveau) in de rhizosfeer van lisianthus planten op het eind van kasexperiment. positieve controle (geen behandeling, inoculatie plantpathogene *F. oxysporum*); chitine- 0.1% chitine; biochar- 1% biochar; champost- 1% champost; FZB42- *Bacillus velezensis* FZB42; Fo47- niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo4. Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terechtkomen van een bepaalde behandeling.

Er zijn tussen 10^{10} en 10^{11} kopieën van 16S rRNA gen/g wortel gemeten in lisianthus rhizosfeer aan het eind van de teelt (Figuur 3.25). Er lijkt ook een positieve correlatie te zijn tussen de aantallen kopieën van *chiA* gen in rhizosfeer (eind van de proef) en het percentage zieke planten (Figuur 3.25). Dat zou kunnen betekenen dat aanwezigheid van *Fusarium* in rhizosfeer van de planten zorgt voor ontwikkeling van meer bacteriën die chitine kunnen afbreken. Chitine is aanwezig in celwanden van schimmels zoals o.a. *Fusarium*. In dit geval is het waarschijnlijk dat snelle ontwikkeling van chitinase producerende bacteriën is pas na de komst van *Fusarium* geïnitieerd. Dat betekent dat er niet genoeg van deze bacteriën aanwezig waren in rhizosfeer voordat de planten met *Fusarium* waren geïnfecteerd om *Fusarium* tegen te houden.

A rhizosfeer aantallen bacteriën en chitinase chiA (week 8)



B relatie tussen aanwezigheid chitinase chiA (week 8) in rhizosfeer en ziekte



Figuur 3.25 Aantallen van totale bacteriën (op basis van qPCR 16S rRNA kopieën) en chitinase chiA producerende bacteriën (op basis van qPCR kopieën chiA gen) in de rhizosfeer van lisianthus planten aan het einde van de kasproef (week 8) en relatie tussen aanwezigheid chiA en percentage zieke planten. Er zijn 4 rhizosfeer monsters geanalyseerd van elk behandeling. positieve controle (onbehandeld, met *Fusarium*) chitine- behandeling 0.1% (v/v) chitine; biochar- behandeling 1% (v/v) biochar; champost- behandeling 1% (v/v) champost; T22- behandeling met *T. afroharzianum* T22; FZB42- *Bacillus velezensis* FZB42; Fo47- niet plantpathogene *Fusarium oxysporum* Fo47.

3.3 Lisianthus proef 3 (mei-juli 2022)

3.3.1 Ziekteontwikkeling

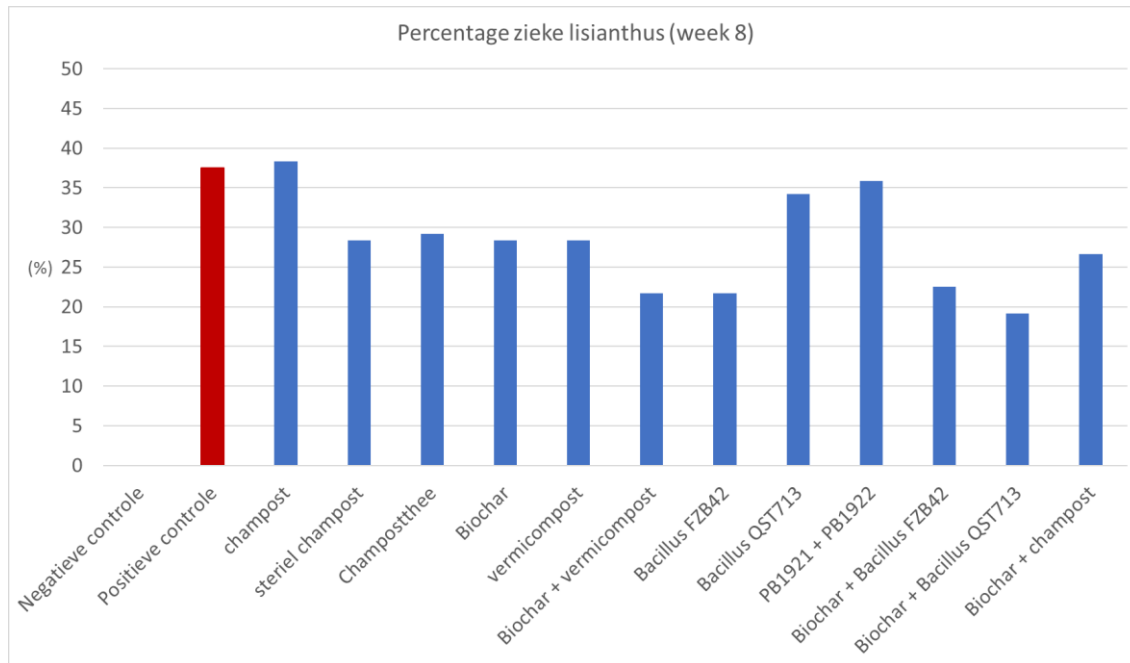
De eerste symptomen van verwelking, veroorzaakt door *Fusarium oxysporum*, waren ongeveer in week 6 zichtbaar (4 weken na inoculatie met pathogeen). In 2022 zijn er geen symptomen waargenomen die op infectie met *Fusarium solani* lijken, wel was infectie met *Fusarium oxysporum* duidelijk zichtbaar. (Figuur 3.26).



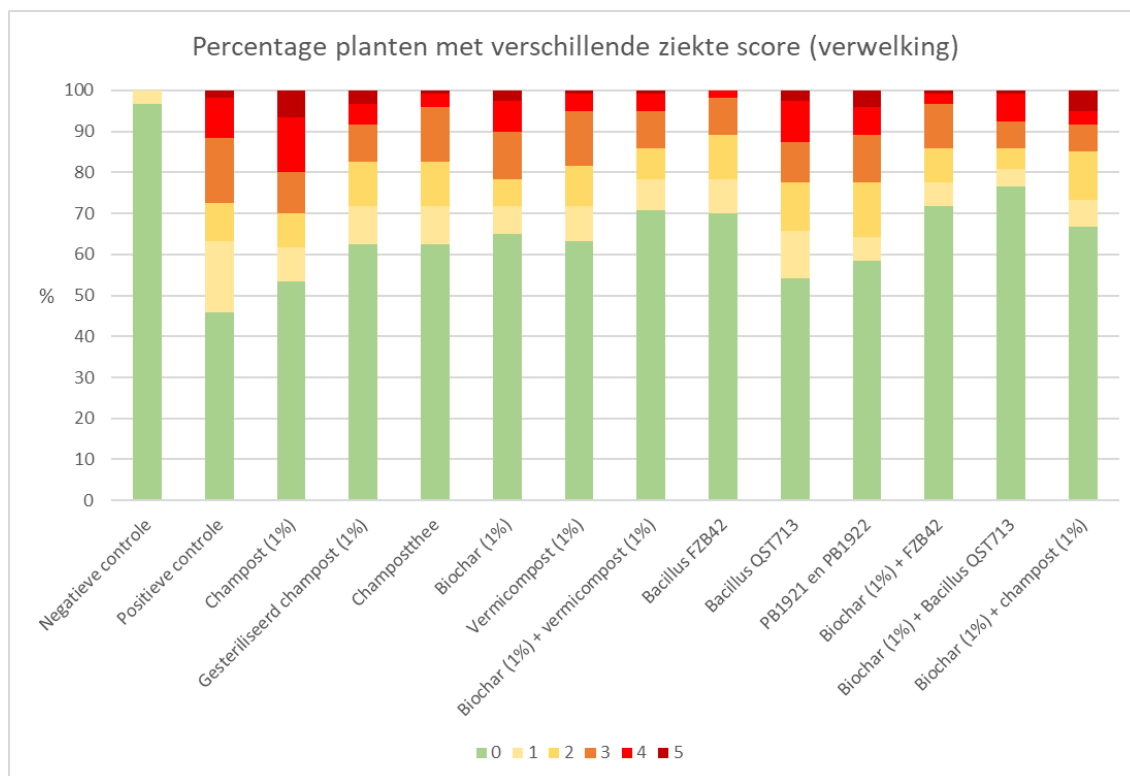
Figuur 3.26 Symptomen van *Fusarium oxysporum f.sp. eustomae* infectie in lisianthus planten

Na acht weken teelt was meer dan 1/3 van de planten in de positieve controle ziek (38%), terwijl in de negatieve controle geen planten ziek zijn geworden (0%) (Figuur 3.27).

Combinatie behandelingen biochar + wormhumus; biochar + *Bacillus velezensis* FZB42; biochar + *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 en behandeling met alleen *Bacillus velezensis* FZB42 waren het meest effectief tegen *Fusarium* verwelking (onder 23% zieke planten; dat is dus 40% reductie van de zieke percentage) (Figuur 3.28). De meeste lisianthus planten (78-80%) uit deze behandelingen zijn verkoopbaar (ziekte index 0 of 1) ten opzichte van 63% verkoopbare planten in positieve controle (Figuur 3.28). Voorbeelden van ziektesymptomen zijn weergegeven in Figuren 3.29A t/m 3.29E.



Figuur 3.27 Percentage zieke lisianthus na 8 weken teelt in verschillende behandelingen (PDI- eng. percentage disease incidence), combinatie score verwelking (≥ 2) + vergeling (≥ 1)



Figuur 3.28 Percentage planten met verschillende ziekte scores (0-5) in verschillende behandelingen (week 8). Planten met ziekte index 0 of 1 zijn verkoopbaar.

Negatieve controle



Positieve controle



Champost



Figuur 3.29A Voorbeelden van ziekte symptomen in lisianthus uit verschillende behandelingen (week 8).

Steriel champost



Champostthee



Vermicompost



Figuur 3.29B Voorbeelden van ziekte symptomen in lisianthus uit verschillende behandelingen (week 8).

Biochar



Biochar+Vermicompost



Bacillus FZB42



Figuur 3.29C Voorbeelden van ziekte symptomen in lisianthus uit verschillende behandelingen (week 8).

***Bacillus* QST713**



PB1921 + PB1922



Biochar+Bacillus FZB42



Figuur 3.29D Voorbeelden van ziekte symptomen in lisianthus uit verschillende behandelingen (week 8).

Biochar+Bacillus QST713



Biochar+champost



Figuur 3.29E Voorbeelden van ziekte symptomen in lisianthus uit verschillende behandelingen (week 8).

3.3.2 Microbioom analyse

3.3.2.1 Bodemmicrobioom

Grondmonsters zijn ook op twee verschillende momenten in de teelt genomen: 1) week 2, net voor inoculatie met plantpathogene *Fusarium oxysporum* en 2) week 4, twee weken na inoculatie van plantpathogene *Fusarium oxysporum*.

Uit de analyse van het bacteriële microbiom in de bodem blijkt dat *Proteobacteria* de fyllum is met het hoogste percentage van relatieve aanwezigheid in de bodemmonsters, zowel in de tweede (Figuur 3.30) als in de vierde week (Figuur 3.31) van het kasexperiment, met tot 46% van alle bacteriële sequenties die in de bodem zijn gevonden. Grond gebruikt voor de kasproef in 2022 lijkt ook rijk te zijn in *Actinobacteria* (tussen 26% en 42% alle gevonden bacteriële sequenties) (Figuur 3.30 en Figuur 3.31).

In de proef zijn verschillende behandelingen toegepast die op verschillende manieren effect kunnen hebben op het onderdrukken van *Fusarium* pathogeen. Enerzijds zijn er behandelingen uitgevoerd met toevoeging van organische stof, die effect kunnen hebben op de samenstelling van het bacteriële microbiom in de bodem. Anderzijds zijn er antagonistische bacteriën toegevoegd, die direct effectief zouden kunnen zijn op *Fusarium*, zonder effect op samenstelling van de totale bacteriële bodemmicrobioom.

Uit PCA analyse blijkt dat toevoeging van biochar, biochar en champost, champost, steriel champost resulteert in significante verandering in het bacteriële microbiom in week 2 van de proef (voor inoculatie met pathogene *Fusarium*) (Figuur 3.32). Terwijl in week 4 het bodemmicrobiom van de behandelingen met biochar, biochar en vermicompost of vermicompost alleen verschillend is van het bodemmicrobiom in de controle (onbehandeld) (Figuur 3.33).

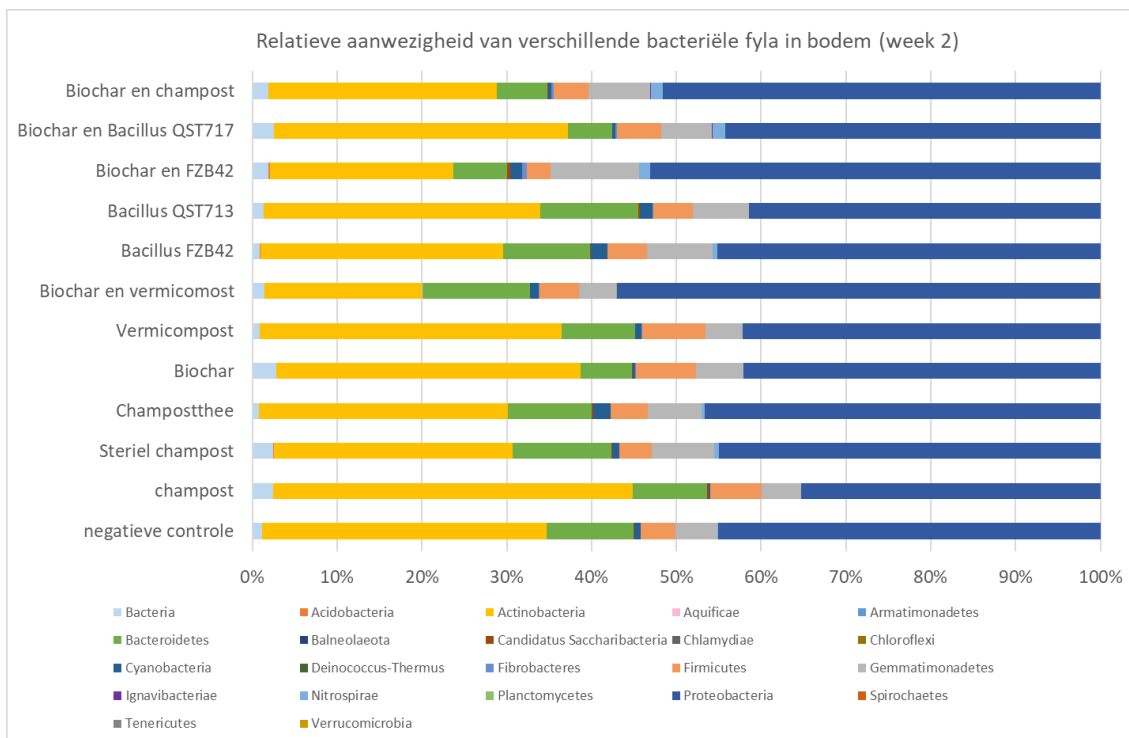
Toevoeging van *Bacillus* antagonisten alleen heeft geen significant effect op het bacteriële deel van bodemmicrobiom, zowel in week 2 als week 4 (Figuur 3.32 en Figuur 3.33). Terwijl toepassing van biochar of combinaties van biochar met *Bacillus* bacteriën leidt tot significante verschillen in taxonomische samenstelling van het bodemmicrobiom in de week 2 en week 4 (Figuur 3.32 en Figuur 3.33). Biochar lijkt dus een belangrijk effect te hebben op het bodemmicrobiom.

Toepassingen van organische stof en micro-organismen hadden geen significant effect op totale aantallen bacteriën in de grond. In alle behandelingen zijn rond 10^{10} kopieën van 16S rRNA/g bodem gevonden ($\approx \text{LOG}_{10}=10$), zowel in week 2 als in week 4 van de proef (Figuur 3.34). Uit specifieke qPCR blijkt dat *Bacillus velezensis* FZB42 alleen in week 4 is gevonden in de bodem, terwijl *B. amyloliquefaciens* QST713 in lage dichtheden aanwezig was in de bodem in week 2 en week 4 van de proef (tussen 10^3 - 10^4 cellen *Bacillus*/ g bodem) (Figuur 3.35). Gevonden dichtheden zijn laag ten opzichte van de totale bacteriële dichtheden rond 10^{10} kopieën 16S rRNA/ g bodem (minder dan 0,0001% totaal). Toevoeging van *Bacillus* producten heeft ook geen effect op relatieve aanwezigheid van *Bacillus* geslacht in bodemmicrobiom, die van nature in de grond aanwezig was met relatieve aanwezigheid tussen 0.15% en 1.6% van alle bacteriële sequenties.

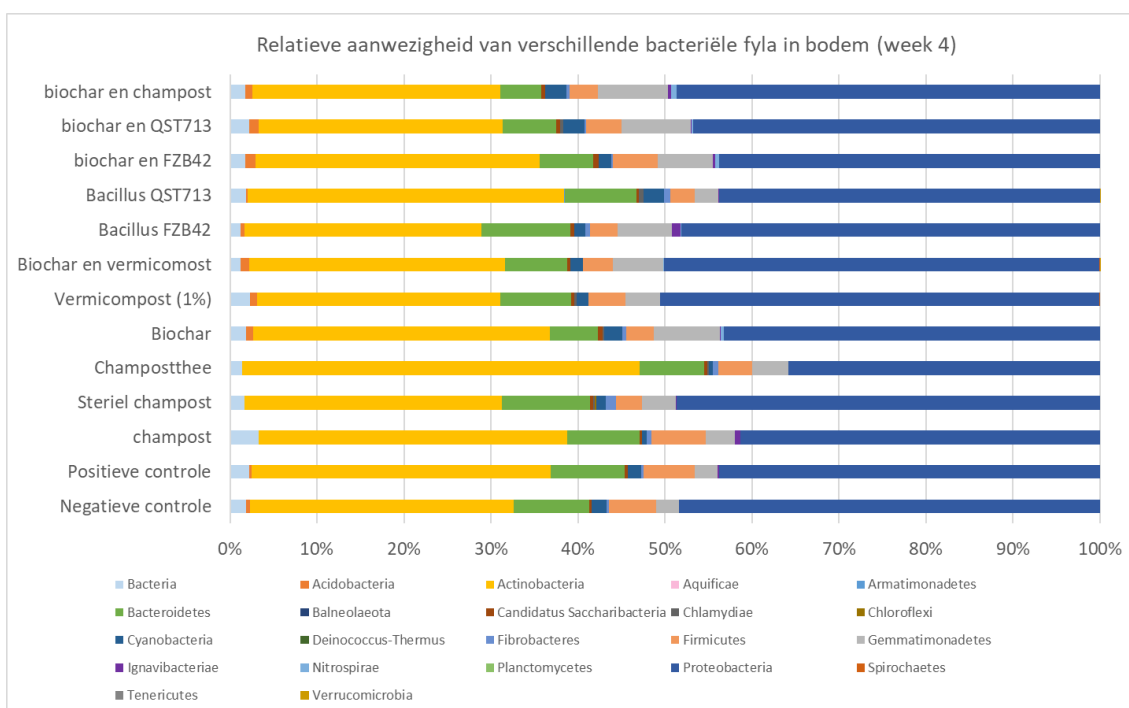
Voor de proeven met lisianthus in 2021 en 2022 zijn bodems gebruikt afkomstig van verschillende bedrijven. In 2021 is er grond bemonsterd (na het stomen) op lisianthus kwekerij, in 2022 is er in de kasproef grond gebruikt die afkomstig was van chrysanten kwekerij (om besmetting met *Fusarium* pathogeen voor lisianthus vanuit de grond te voorkomen). Het bacteriële microbiom van de grond in 2021 was significant anders dan in de grond gebruikt in 2022 (Figuur 3.36). In de grond, die gebruikt was in 2022, was fyllum *Actinobacteria* aanwezig met hogere relatieve aanwezigheid (26-42% ten opzichte van 8,5% tot 14% in grond uit kasproef 2021), terwijl fyllum *Bacteroidetes* en *Firmicutes* een lagere relatieve aanwezigheid hadden in de bodem in kasproef 2022 t.o.v. de kasproef in 2021.

In de grond uit kasproef 2022 was er ook duidelijke dominantie van 1 bacterieel geslacht te zien, *Streptomyces* is met 27% van relatieve aanwezigheid (in controle behandeling) het meest dominant. Terwijl de geslachten die in de grond uit 2021 dominant waren, bij voorbeeld *Pseudomonas*, in de grond uit kasproef 2022 te vinden zijn in zeer lage percentages van relatieve aanwezigheid (<0,1%).

Samenstelling van natuurlijke, "start" microbiom in de bodem kan een significant effect hebben op hoe de behandelingen aan de bodem, het microbiom in de bodem en uiteindelijk effect op onderdrukking van pathogeen beïnvloeden.

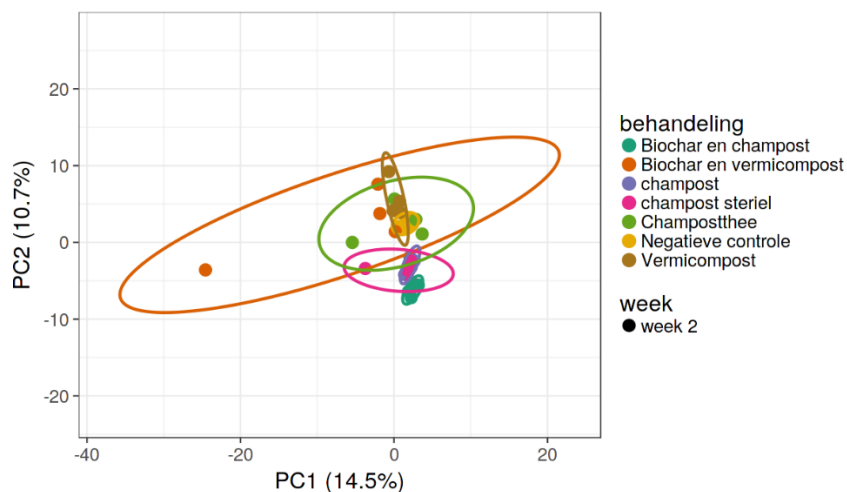


Figuur 3.30 Diversiteit van bacteriële microbiom op fylum niveau in de bodem in de 2^{de} week van de teelt (voor inoculatie van plantpathogene *Fusarium oxysporum*).

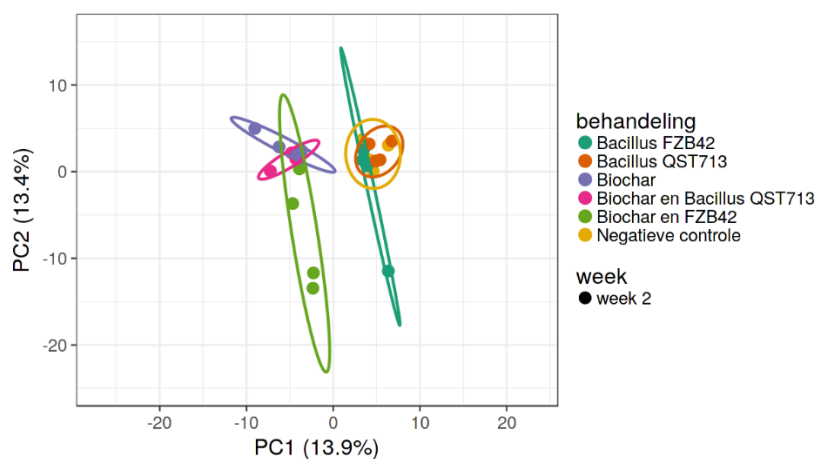


Figuur 3.31 Diversiteit van bacteriële microbiom op fylum niveau in de bodem in de 4^{de} week van de teelt (2 weken na inoculatie van plantpathogene *Fusarium oxysporum*)

A week 2 bodem behandelingen

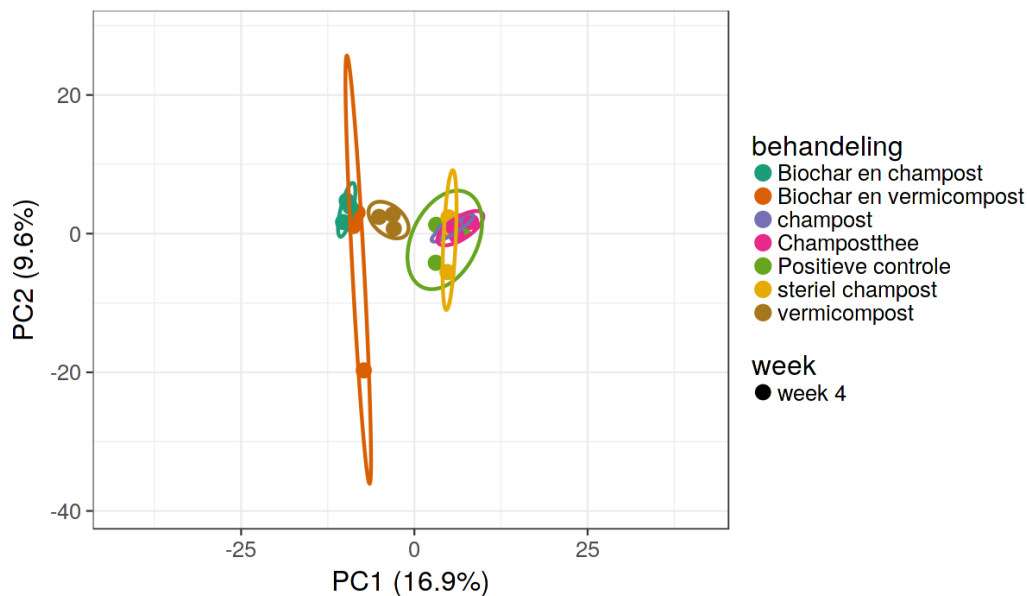


B week 2 behandelingen met toevoegingen van biofungiciden

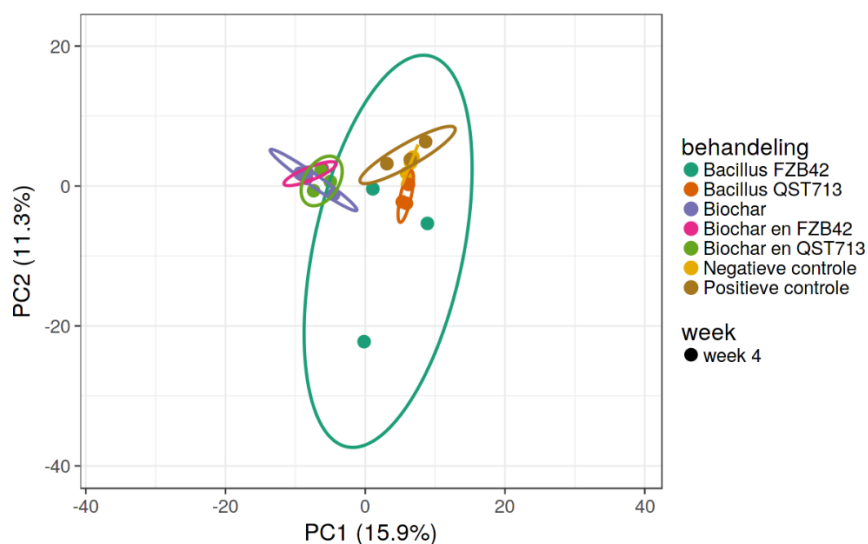


Figuur 3.32 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële diversiteit (geslacht niveau) in de bodem in de 2^{de} week (voor de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*). Er zijn 4 bodemonsters geanalyseerd van elk behandeling. Negatieve controle- controle (geen behandeling). Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terechtkomen van een bepaalde behandeling.

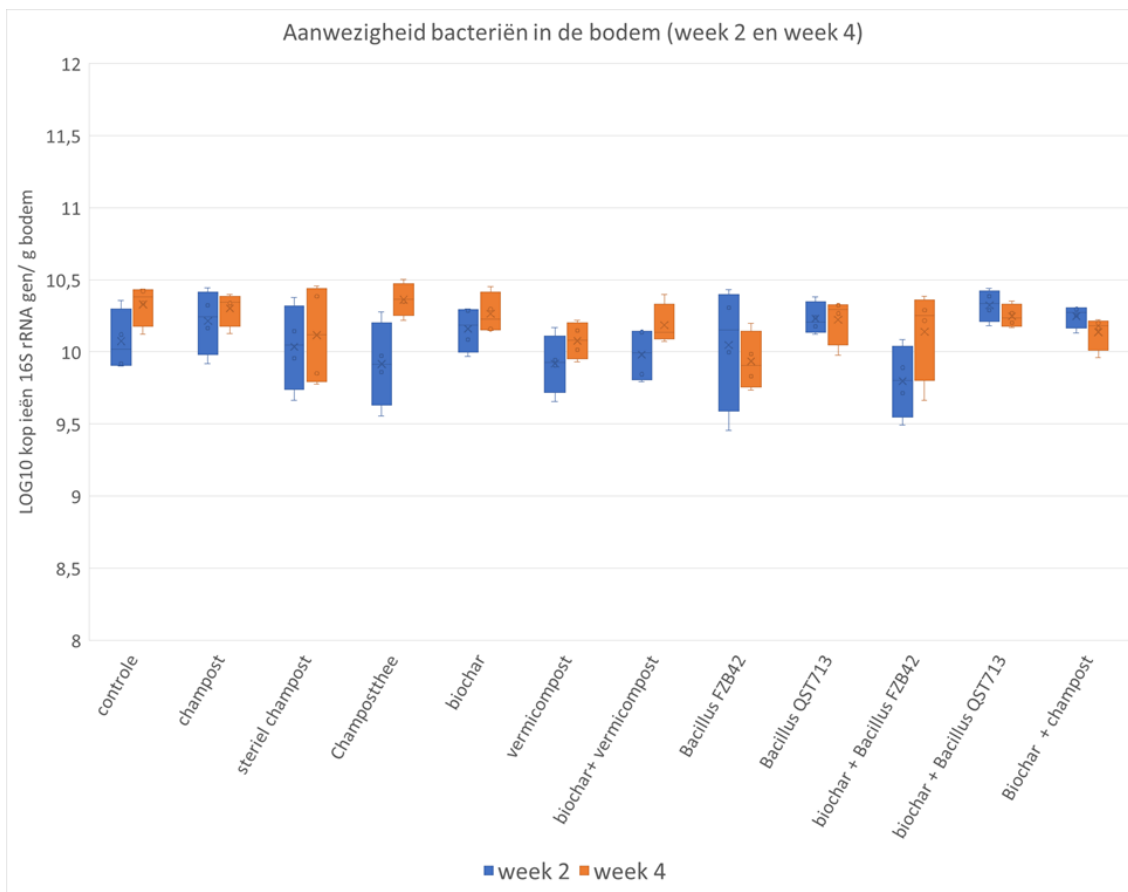
A week 4 bodem behandelingen



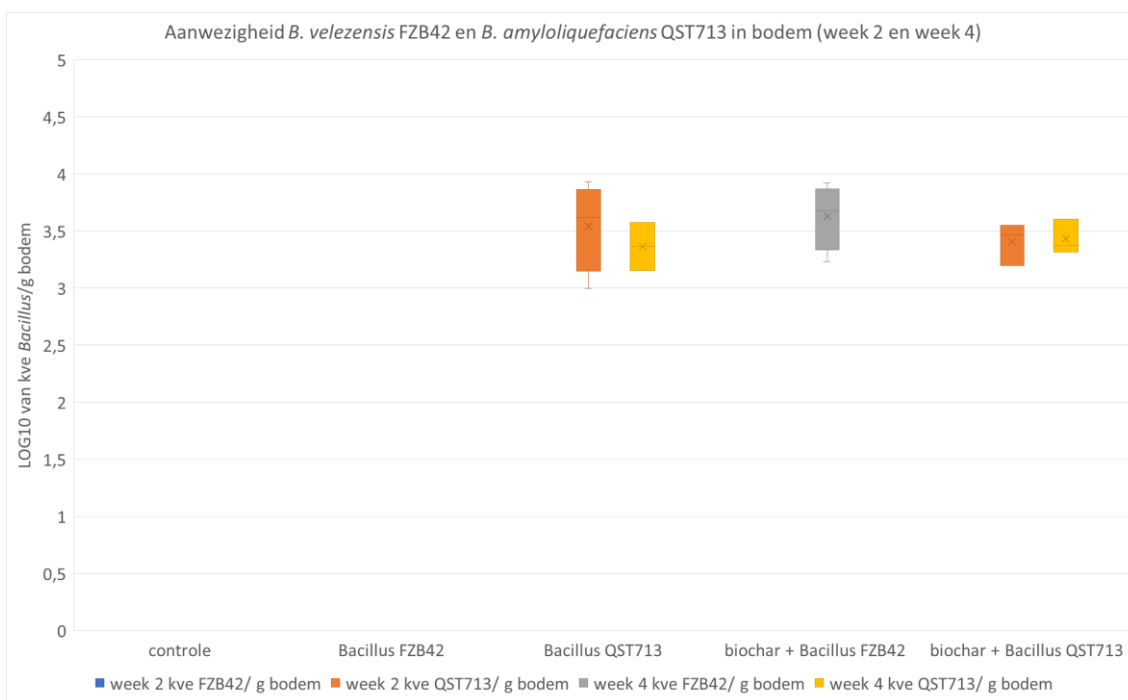
B week 4 behandelingen met toevoegingen van biofungiciden



Figuur 3.33 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële diversiteit (geslacht niveau) in de bodem in de 4^{de} week (2 weken na de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*). Er zijn 4 bodemmonsters geanalyseerd van elk behandeling. Negatieve controle- controle (geen behandeling). Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terecht komen van een bepaalde behandeling.

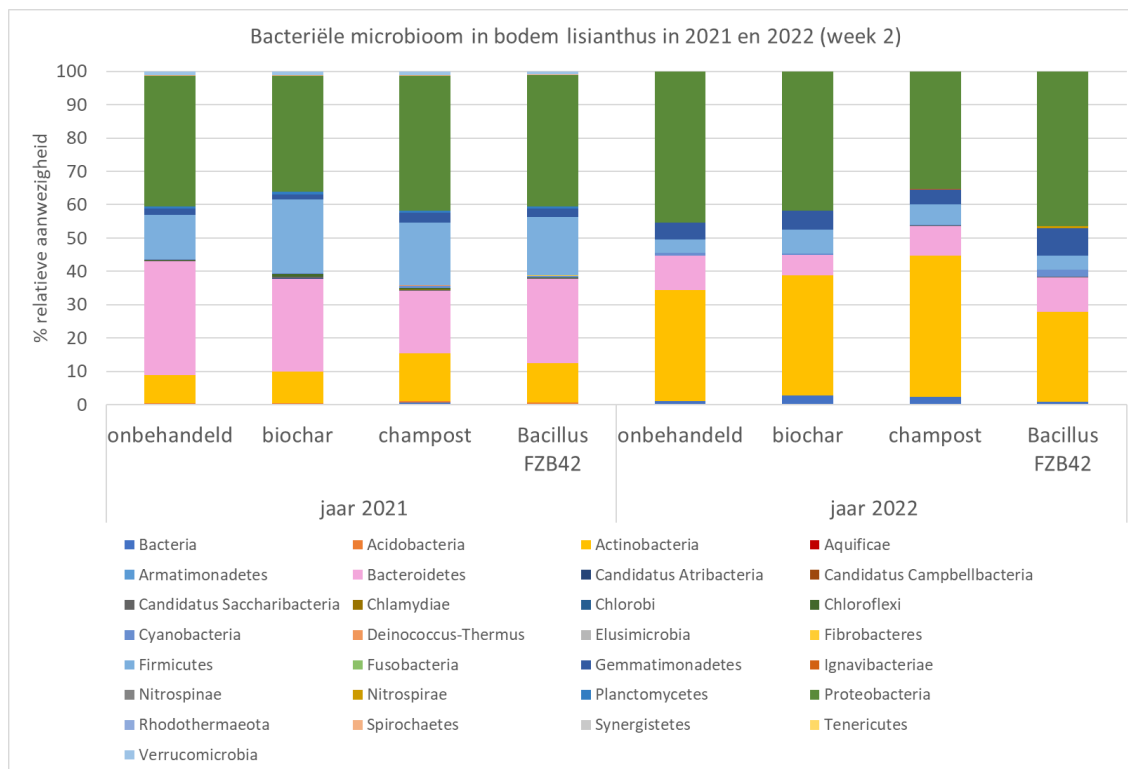


Figuur 3.34 Aantallen van totale bacteriën (op basis van qPCR 16S rRNA kopieën) in de onbehandelde en behandelde bodem in de 2^{de} week (voor de inoculatie met *Fusarium oxysporum f sp eustomae*) en 4^{de} week van teelt (na de inoculatie met *Fusarium oxysporum f sp eustomae*)

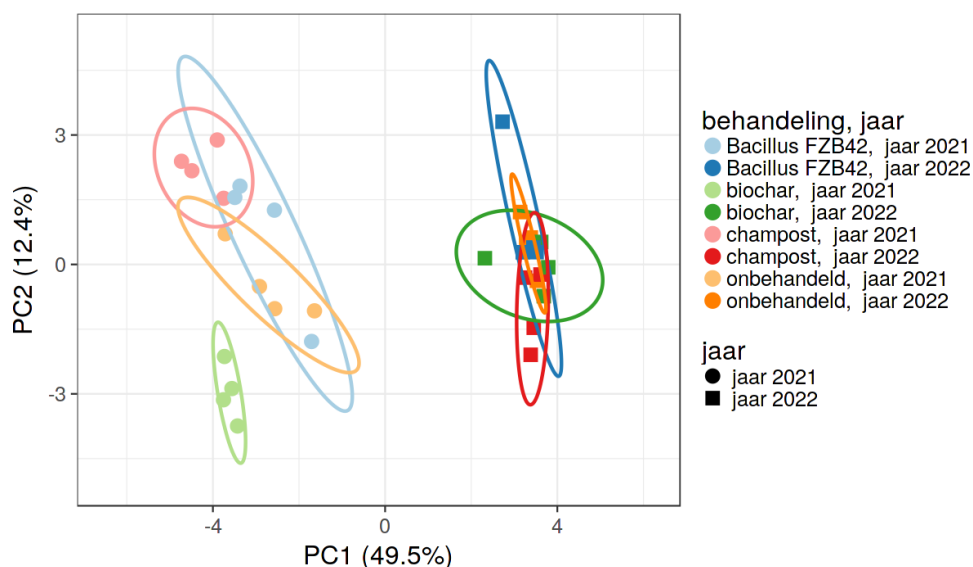


Figuur 3.35 Aantallen van kolonie vormende eenheden (kve's) van *Bacillus velezensis* FZB42 en *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in de onbehandelde en behandelde bodem in de 2^{de} week (voor de inoculatie met *Fusarium oxysporum f sp eustomae*) en 4^{de} week van teelt (na de inoculatie met *Fusarium oxysporum f sp eustomae* (bepaling met qPCR op basis van eijklijn met bacteriële cellen)).

A bacteriële microbiom in bodem lisianthus kasproeven 2021 en 2022 (week 2)



B PCA analyse bacteriële microbiom in de bodem lisianthus kasproeven 2021 en 2022 (week 2)



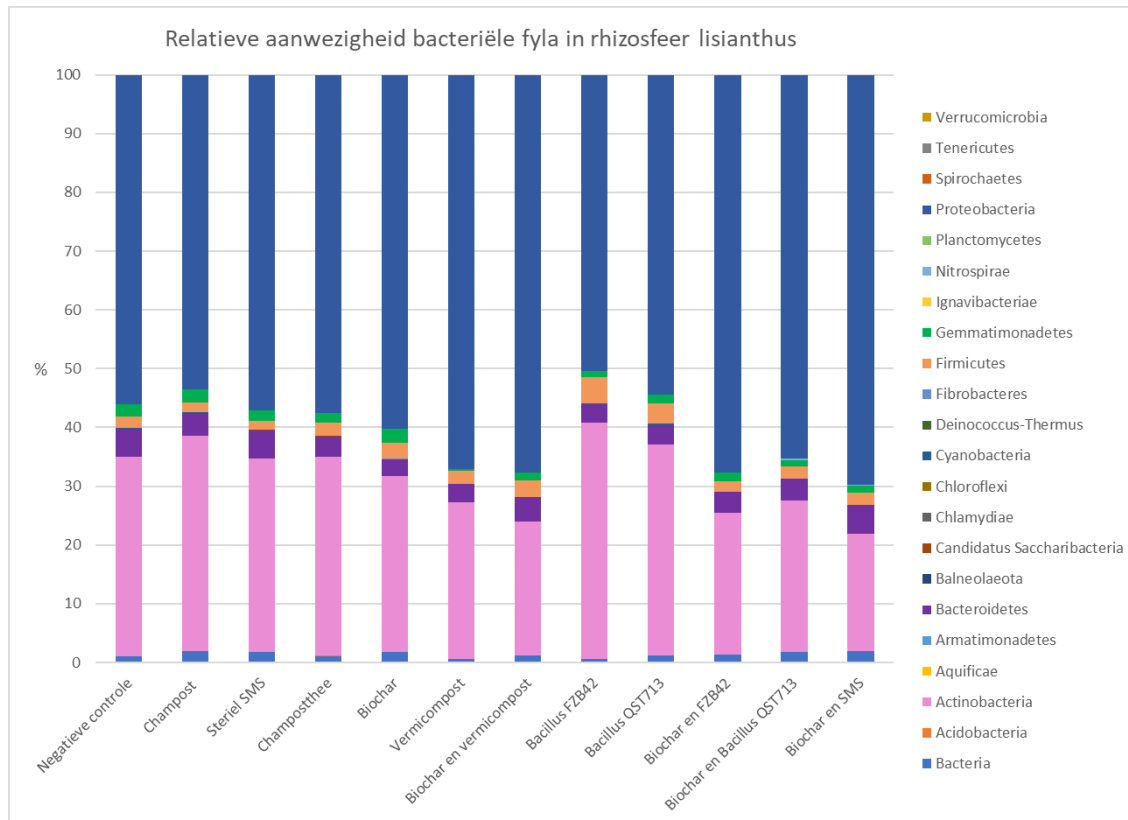
Figuur 3.36 Diversiteit van bacteriële microbiomen in de bodem in de 2^{de} week van de teelt in de kasproeven lisianthus in 2021 en 2022 (A) en verschillen tussen de bodemmicrobiom in de bodems gebruikt voor de kasproeven in 2021 en 2022 (B). Er zijn 4 bodemmonsters geanalyseerd van elk behandeling. onbehandeld- controle (geen behandeling). Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terechtkomen van een bepaalde behandeling.

3.3.2.2 Rhizosfeer microbiom

In kasproef 2022 zijn de rhizosfeer monsters genomen in week 2 van de teelt, niet aan het einde van de teelt zoals in 2021. Daarom is directe vergelijking tussen rhizosfeer microbiom in 2021 en 2022 niet mogelijk.

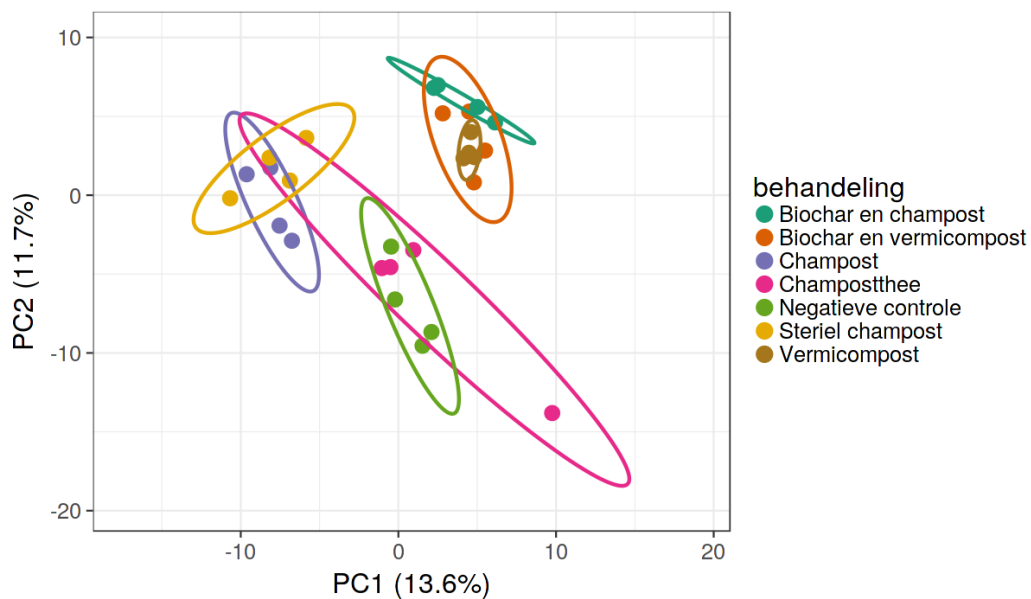
Wel is het duidelijk dat de samenstelling van het bodemmicrobiom effect heeft op de samenstelling van lisianthus rhizosfeer microbiom, omdat in 2022 zijn er veel *Actinobacteria* gevonden in lisianthus rhizosfeer (met relatieve aanwezigheid tussen 20% en 40%) (Figuur 3.37).

Bodembehandelingen, behalve champostthee, evenals behandelingen met antagonistische *Bacillus* stammen hebben effect op de samenstelling van rhizosfeer microbiom van lisianthus (Figuur 3.38). In behandelingen met beide *Bacillus* stammen, zonder biochar, was de samenstelling van rhizosfeer significant anders dan controle planten, terwijl dat in de bodem niet het geval was (Figuur 3.39). De vraag blijft wat is het precieze, onderliggende mechanisme daarvan, omdat beide *Bacillus* stammen niet in hoge dichtheden aanwezig waren in de rhizosfeer van lisianthus, onder 10^4 kve's/g wortel (Figuur 3.40).

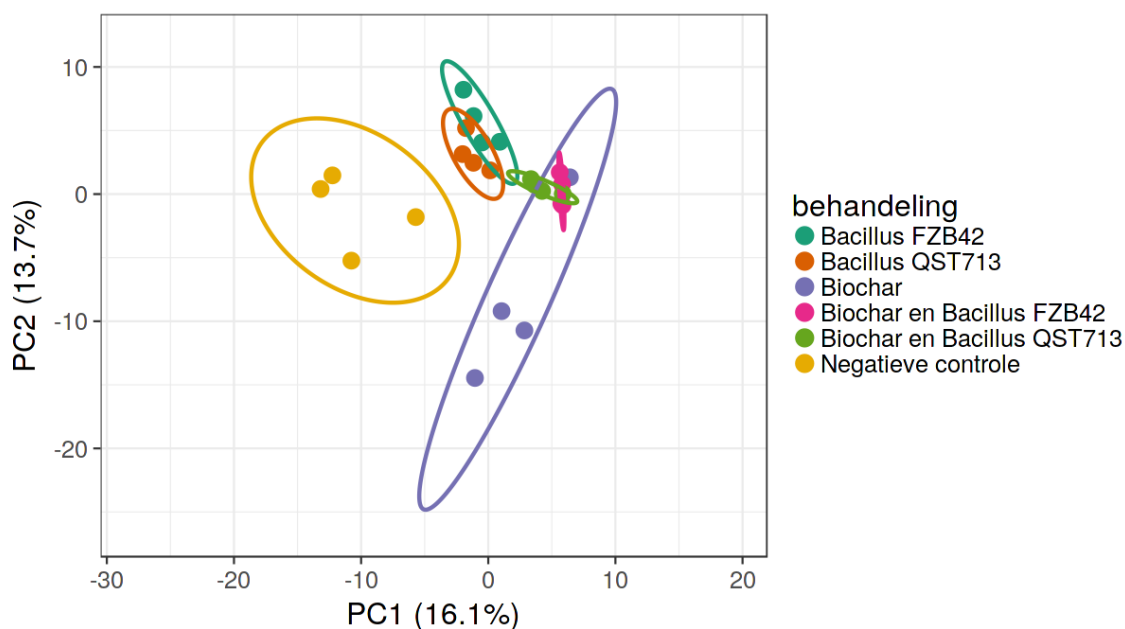


Figuur 3.37 Diversiteit van het bacteriële microbiom op fyllum niveau in de lisianthus rhizosfeer in de 2^{de} week van de teelt (voor de inoculatie van plantpathogene *Fusarium oxysporum*).

A bacteriële microbiom rhizosfeer: bodembehandelingen

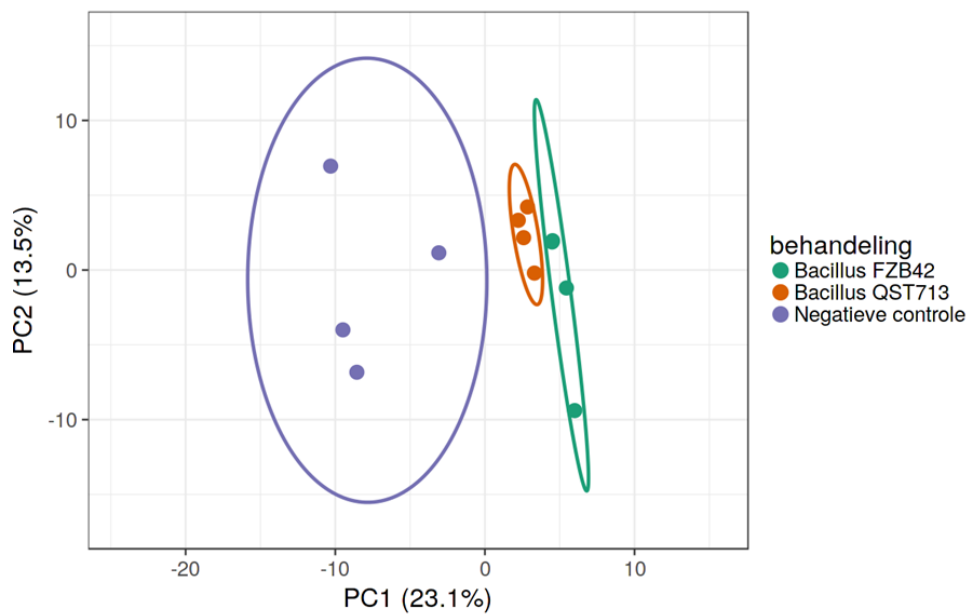


B rhizosfeer behandelingen met toevoeging van biofungiciden en/of biochar

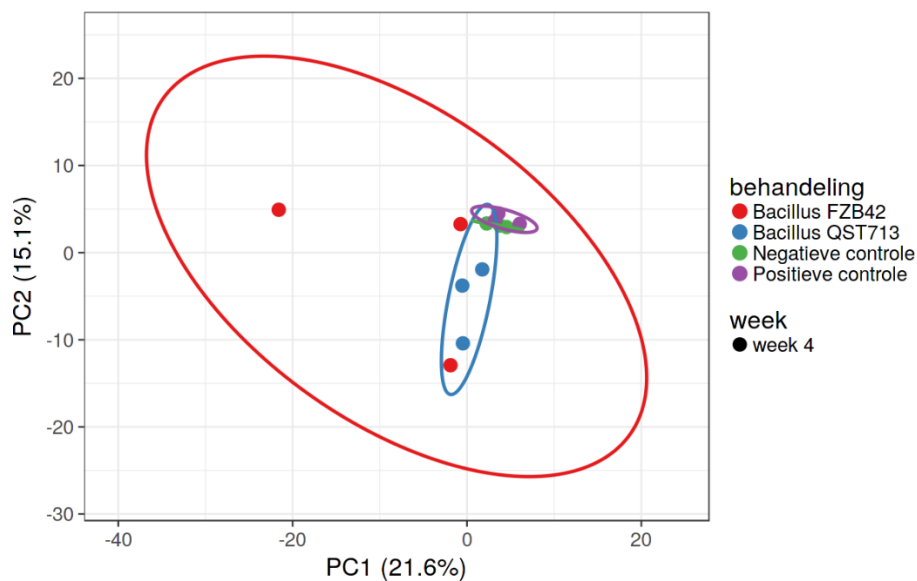


Figuur 3.38 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële diversiteit (geslacht niveau) in de *lisanthus* rhizosfeer in de 2^{de} week van de teelt (voor de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*). Er zijn 4 rhizosfeer monsters geanalyseerd van elk behandeling. Negatieve controle- controle (geen behandeling). Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terechtkomen van een bepaalde behandeling.

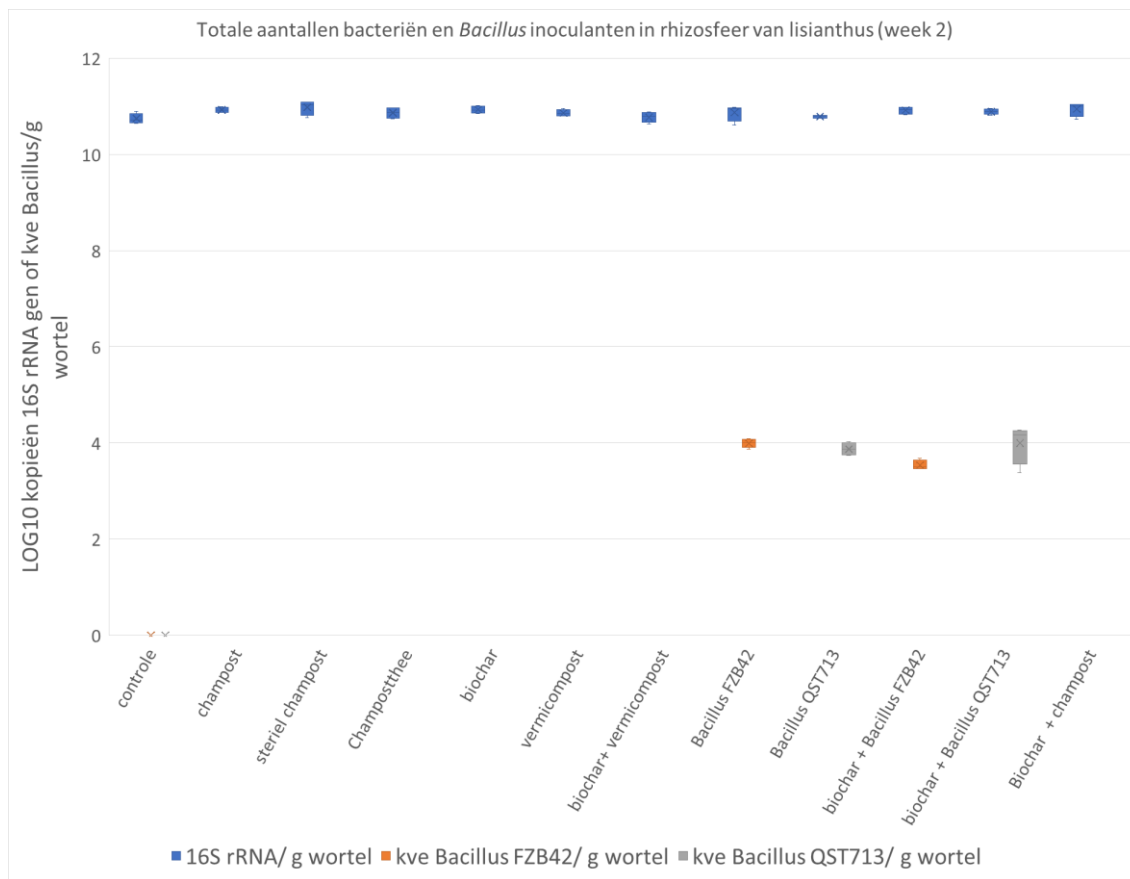
A rhizosfeer: alleen toevoeging biofungiciden (week 2)



B bodem: alleen toevoeging biofungiciden (week 4)



Figuur 3.39 Principal component analysis (PCA) van de bacteriële diversiteit in de *lisianthus* rhizosfeer in de 2^{de} week van de teelt (voor de inoculatie met *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*) en in de bodem (week 4 van de teelt, na inoculatie van de pathogene *Fusarium*) in de behandelingen waarin bacteriële antagonisten van *Fusarium* (*Bacillus velezensis* FZB42 of *Bacillus amyloliquefaciens* QST713) zijn gebruikt. Er zijn 4 rhizosfeer monsters geanalyseerd van elk behandeling. Negatieve controle- controle (geen behandeling). Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terechtkomen van een bepaalde behandeling.



Figuur 3.40 Totale aantallen bacteriën en specifieke *Bacillus velezensis* FZB42 of *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 (op basis van specifieke qPCR's) in lisianthus rhizosfeer (week 2, voor inoculatie van plant pathogenen *Fusarium oxysporum* f sp *eustomae*). Er zijn 4 bodemonsters geanalyseerd van elk behandeling.

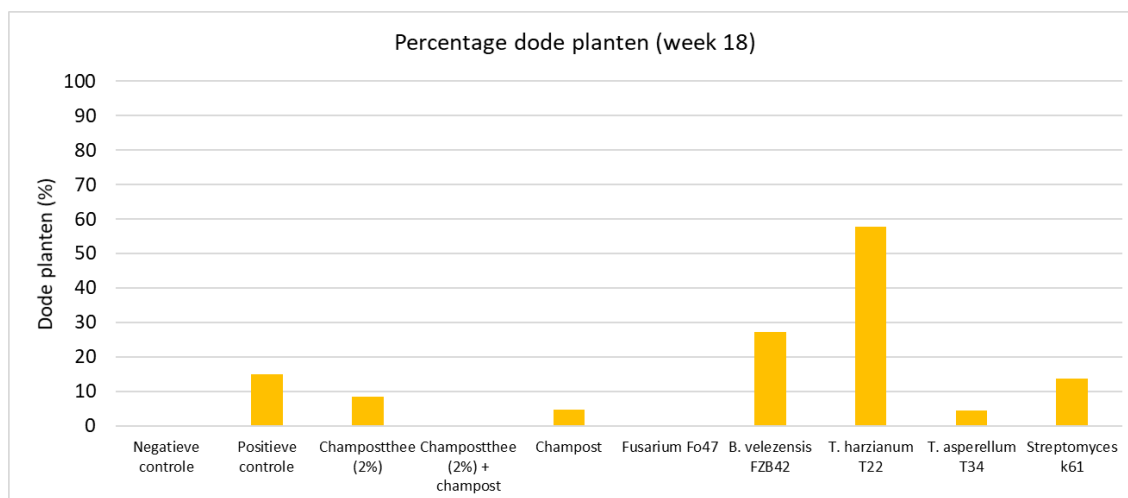
3.4 Komkommer proef 1 (november 2021-maart 2022)

3.4.1 Metingen organische koolstof in voeding met/zonder champostthee

Tijdens de proef zijn er meermaals voedingsmonsters opgestuurd voor analyse, ter controle van voedingswaarde en hoeveelheid organisch C in voedingswater. Er zijn geen tekorten in minerale voeding geconstateerd. Hoeveelheid organisch koolstof (TOC- Eng. total organic carbon) was met 11-12 mg TOC/L hoger in voeding met 2% (v/v) champostthee dan in standaard minerale voeding (4.8-5.4 mg TOC/L).

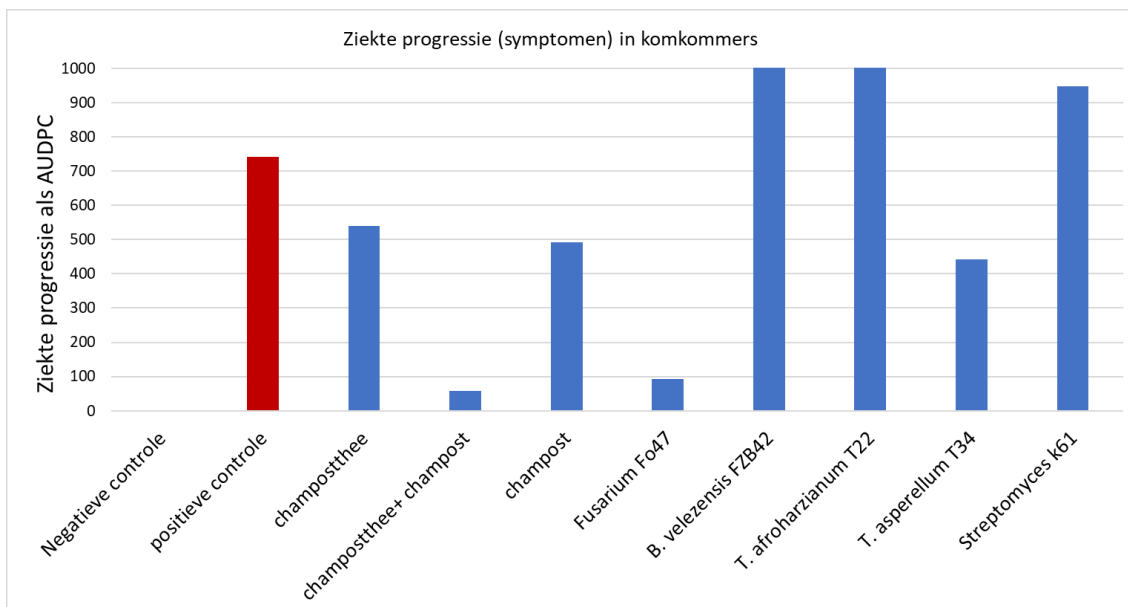
3.4.2 Ziekteontwikkeling in komkommer

Infectie met *Fusarium* resulteerde in relatief lage uitvalpercentage in komkommer (% dode planten). In onbehandelde en met *Fusarium* geïnoculeerd controle (positieve controle) was er uitval van 15% geconstateerd. Alleen de behandelingen met *B. velezensis* FZB42 en *T. harzianum* T22 hadden hogere uitvalpercentage, respectievelijk 27% en 56% (Figuur 3.41). Behandelingen champostthee + champost; champost, *F. oxysporum* Fo47 en *T. asperellum* T34 resulteerden in significant lagere uitval van planten ten opzichte van de positieve controle behandeling (Figuur 3.41). Er waren ook duidelijke verschillen in ziekte progressie tussen verschillende behandelingen (Figuur 3.42). Ziekte progressie is een meting die informatie geeft over hoe snel de ziektesymptomen zichtbaar worden in de planten. Ziekte progressie wordt berekend door de ziekteontwikkeling tussentijds te beoordelen. Bijvoorbeeld, het kan zo zijn dat aan het eind van de teelt is vergelijkbare percentage van de planten ziek in verschillende behandelingen, maar in de behandeling met lagere waarde voor ziekte progressie, zijn de symptomen later waargenomen. Dat is belangrijk bijvoorbeeld in de teelten waar de vruchten worden geoogst een geen hele planten. Als ziekte progressie langzaam is (lage waardes) dan kunnen de vruchten bijvoorbeeld langer geoogst worden van de planten omdat planten langer asymptomatisch zijn in de kas.



Figuur 3.41 Uitvalpercentage van komkommers na inoculatie met *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* 13 weken na infectie met pathogeen. Inoculatie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* heeft in de loop van de 6^{de} week van de teelt plaatsgevonden (3 weken opweek+3 weken op de mat).

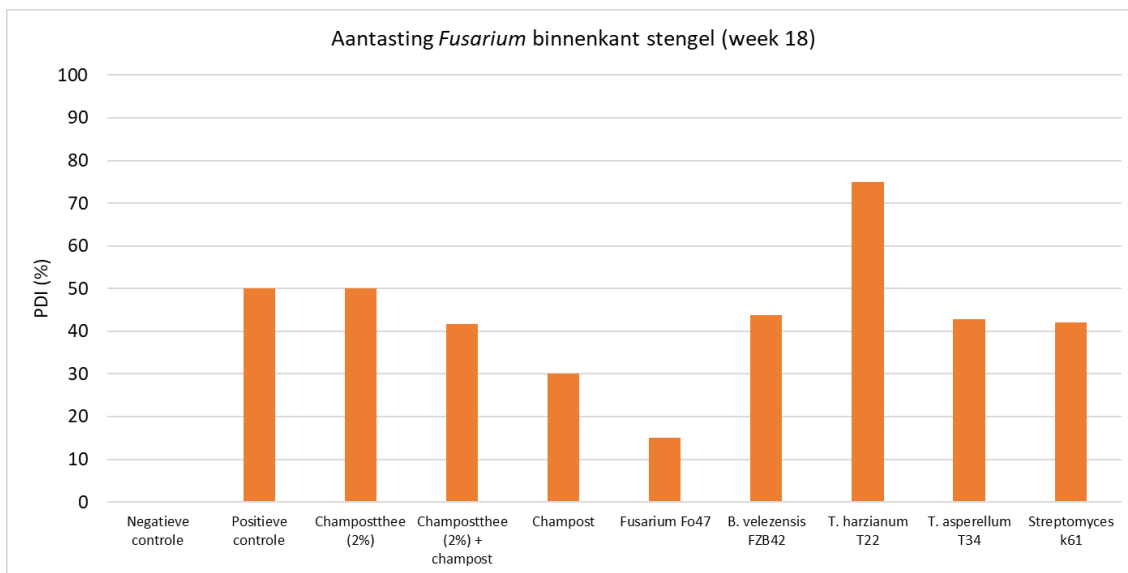
Aantasting met *Fusarium* was zichtbaar aan de binnenkant van komkommerstengels (beoordeling week 18, einde kasproef), met *Fusarium* aanwezig aan de binnenkant van de stengel (Figuur 3.43) in 50% van de komkommerplanten in de positieve controle (zonder behandeling, met inoculatie plantpathogene *Fusarium*) (Figuur 3.44). Aantasting van *Fusarium* was ook duidelijk zichtbaar in de komkommerwortels (Figuur 3.45).



Figuur 3.42 Progressie van de ziekte (ontwikkeling van symptomen van infectie met *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*) in komkommers, weergegeven als AUDPC- eng. Area under disease progression curve.



Figuur 3.43 Voorbeelden aantasting binnenkant van de stengel door *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (week 18, eindproef)

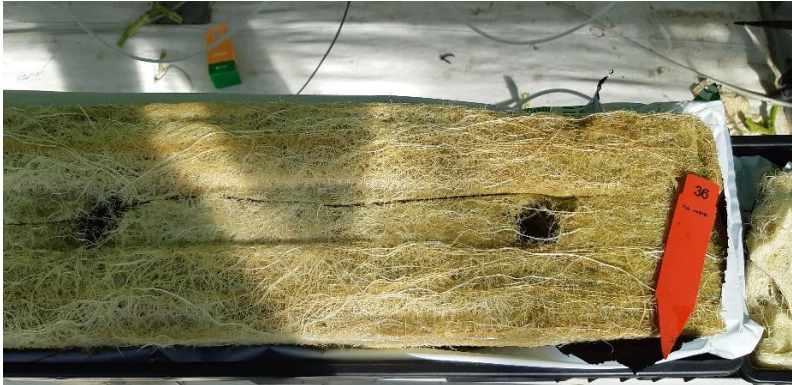


Figuur 3.44 Aantasting binnenkant van de stengel door *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-cucumerinum* (week 18, eindproef). Percentage van planten met aangetaste binnenkant van de stengel (%PDI) is berekend als volgt: (aantal planten met aangetaste binnenkant stengel/aantal levende planten in behandeling in week 18)*100

Negatieve controle (zonder plantpathogene *Fusarium*)



Positieve controle (met plantpathogene *Fusarium*)



Champost (met plantpathogene *Fusarium*)

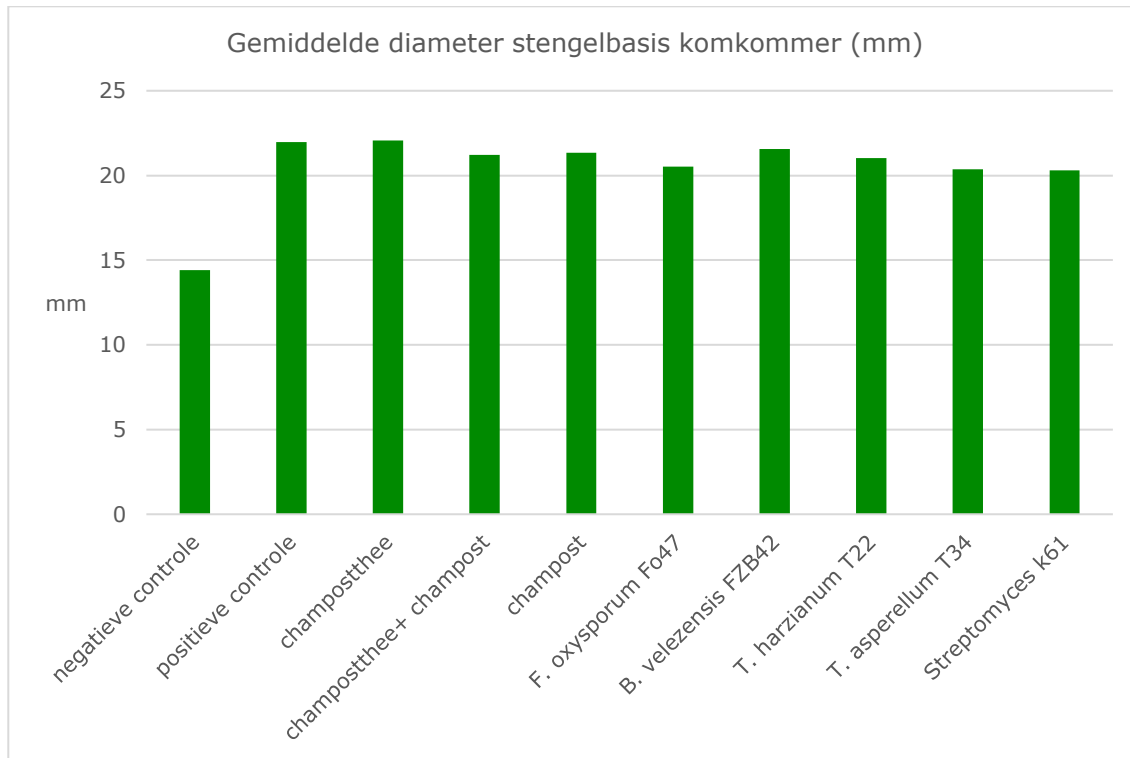


***Fusarium oxysporum* Fo47 (met plantpathogene *Fusarium*)**



Figuur 3.45 Voorbeelden aantasting wortels door *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (week 18, eindproef).

Er is ook verschil gemeten in diameter van de stengelbasis van komkommerplanten uit verschillende behandelingen. Komkommerplanten, die niet geïnoculeerd zijn met plantpathogene *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (negatieve controle), hadden stengels met significant kleinere diameter dan de planten die geïnoculeerd waren met *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (Figuur 3.46). Stengels met grotere diameter ontstaan waarschijnlijk op het moment dat de plant extra vaatbundels aan het aanmaken is om te compenseren voor de vaatbundels die verstopt zijn door de groei van pathogeen.



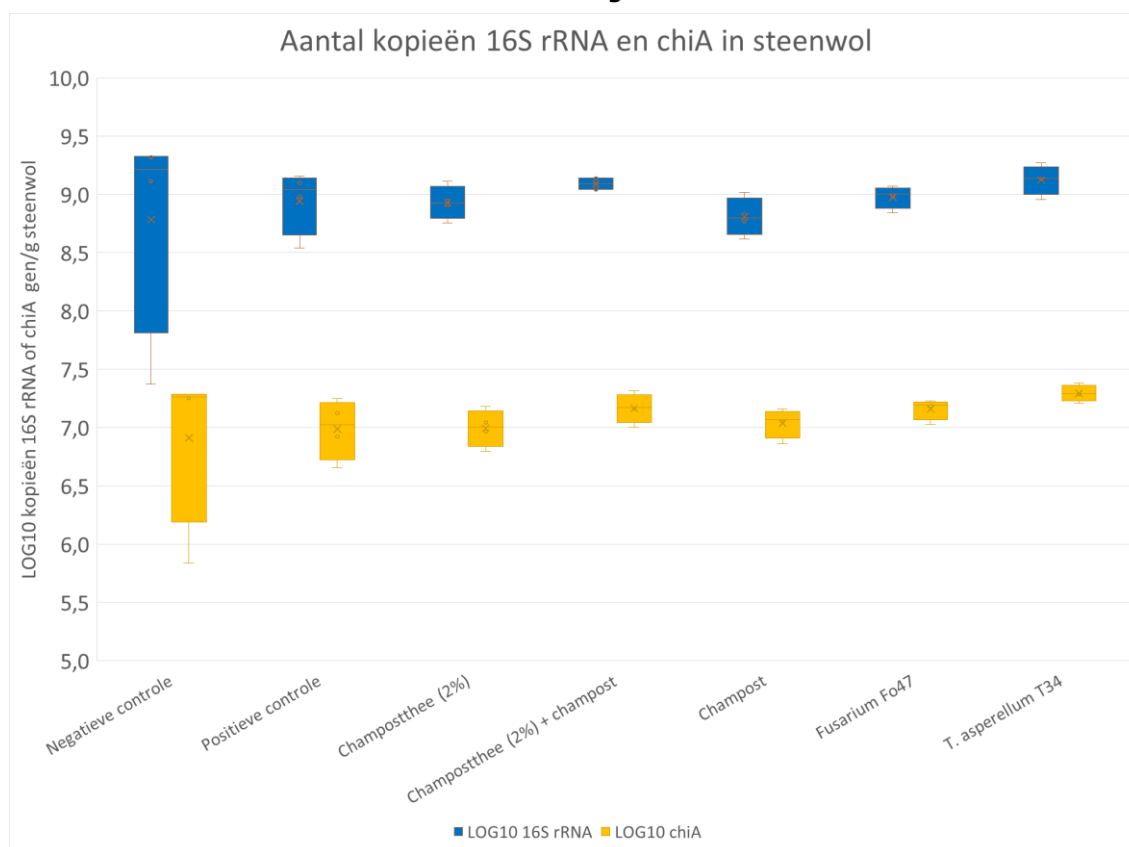
Figuur 3.46 Gemiddelde diameter (Ømm) van komkommerstengels (week 18, eindproef).

3.4.3 Aanwezigheid micro-organismen in steenwol en rhizosfeer komkommer 2021

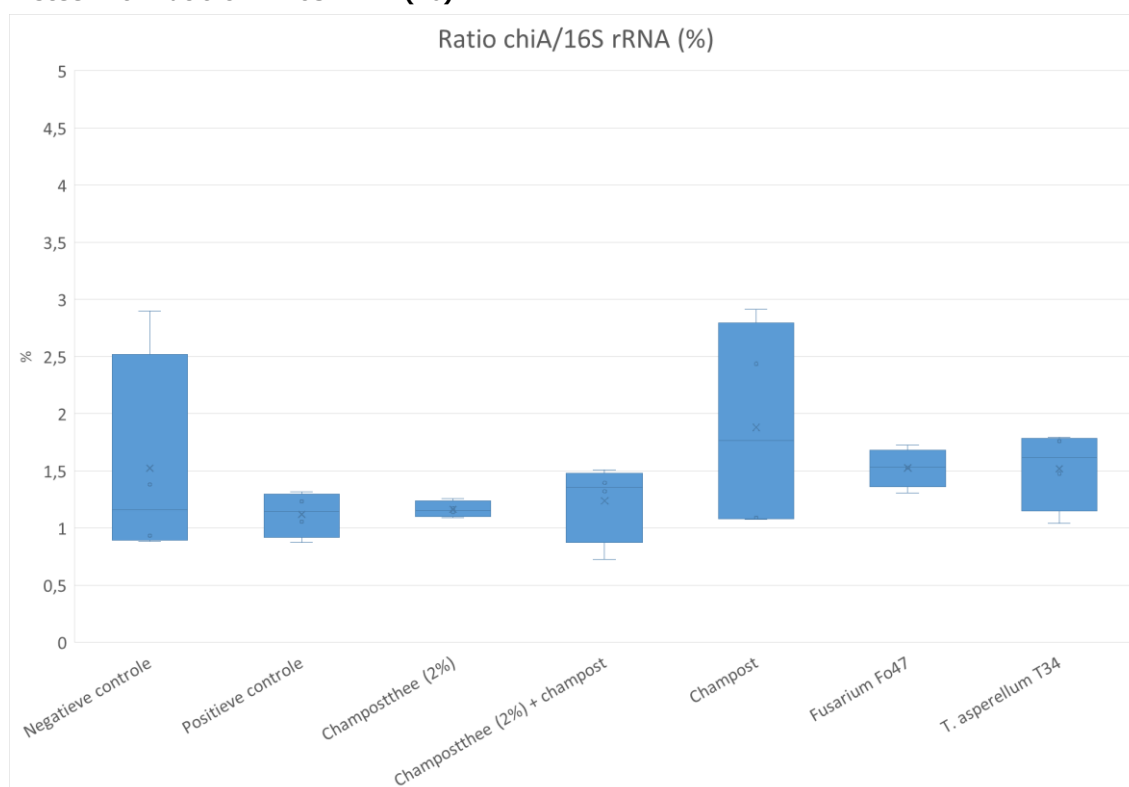
3.4.3.1 Kwantitatieve beoordeling bacteriën in steenwol tijdens komkommerteelt

Monsters van steenwol voor microbiologische analyses zijn genomen twee weken na het plaatsen van de komkommers op de steenwolmat. Het blijkt dat bacteriën in staat waren om de steenwol te koloniseren, omdat er rond 10^9 kopieën van 16S rRNA gen/g steenwol zijn gevonden (Figuur 3.47). Bacteriën die chitine kunnen afbreken waren ook aanwezig in steenwol, met dichtheden rond 10^7 kopieën van chiA gen/g steenwol (Figuur 3.47). Verhoudingsgewijs vormen de bacteriën, die chitine afbreken, ongeveer 1-2.5% van de totale bacteriële populatie (Figuur 3.47).

A steenwol: aantallen bacteriën en chitinase chiA gen



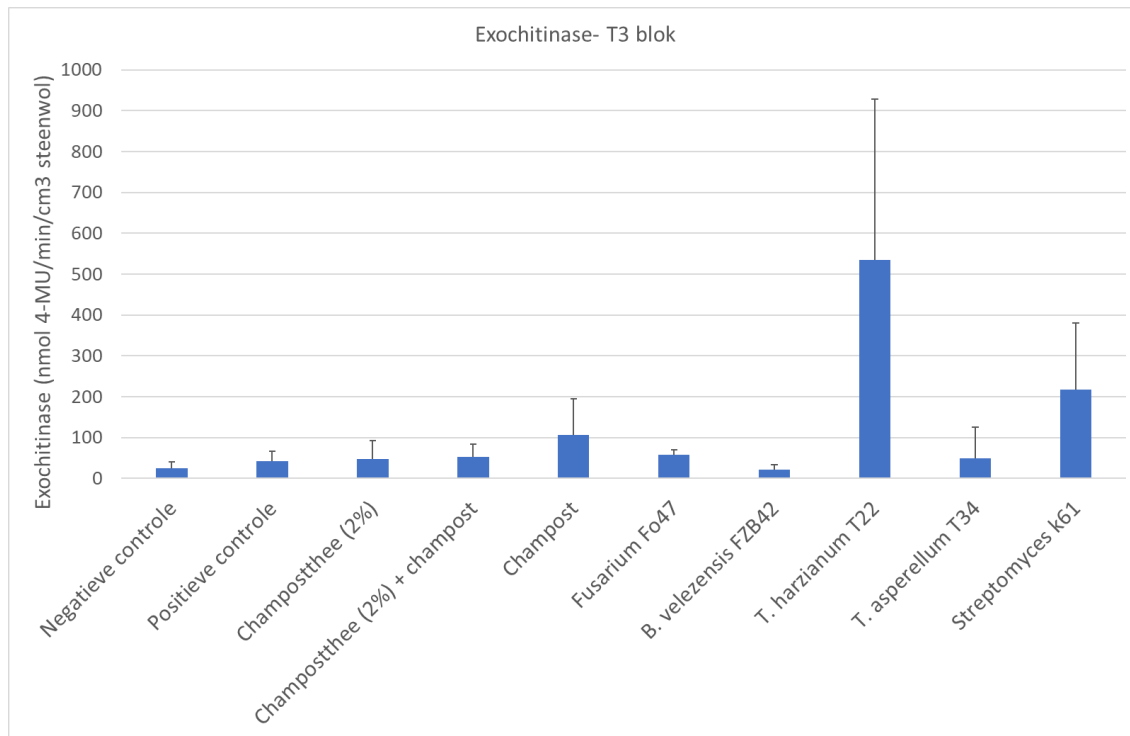
B steenwol: ratio chiA:16S rRNA (%)



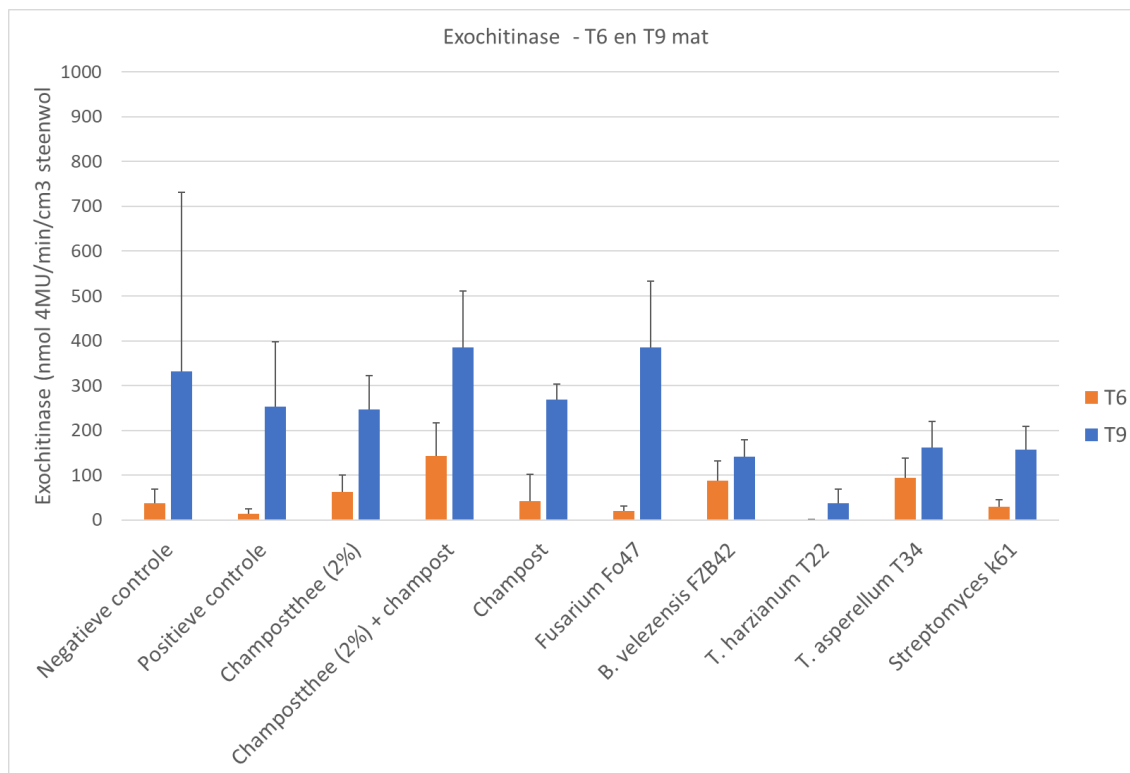
Figuur 3.47 Aantallen van totale bacteriën (op basis van qPCR 16S rRNA kopieën) en chitinase chiA (chiA gen) (A) en ratio chitinase chiA ten opzichte van 16S rRNA (%) in steenwolmatten tijdens komkommerteelt (3 weken na planten op de mat).

Activiteit van endo- en exochitinasen in de steenwol is gemeten op verschillende tijdstippen tijdens de teelt (in het blok en in steenwolmatten in week 6 en 9). Activiteit van exochitinasen was het hoogst in steenwolmatten de week 9 van de teelt (3.48). Opvallend is dat in steenwolblokken van de behandeling met *Trichoderma afroharzianum* T22 de hoogste exochitinasen activiteit is gemeten, terwijl de exochitinasen activiteit bijna niet meetbaar was in steenwolmatten van deze behandeling. In het algemeen was de exochitinasen activiteit hoger in steenwolmatten dan in steenwolblokken (Figuur 3.48).

A steenwol: activiteit exochitinasen- steenwolblok (week 3)



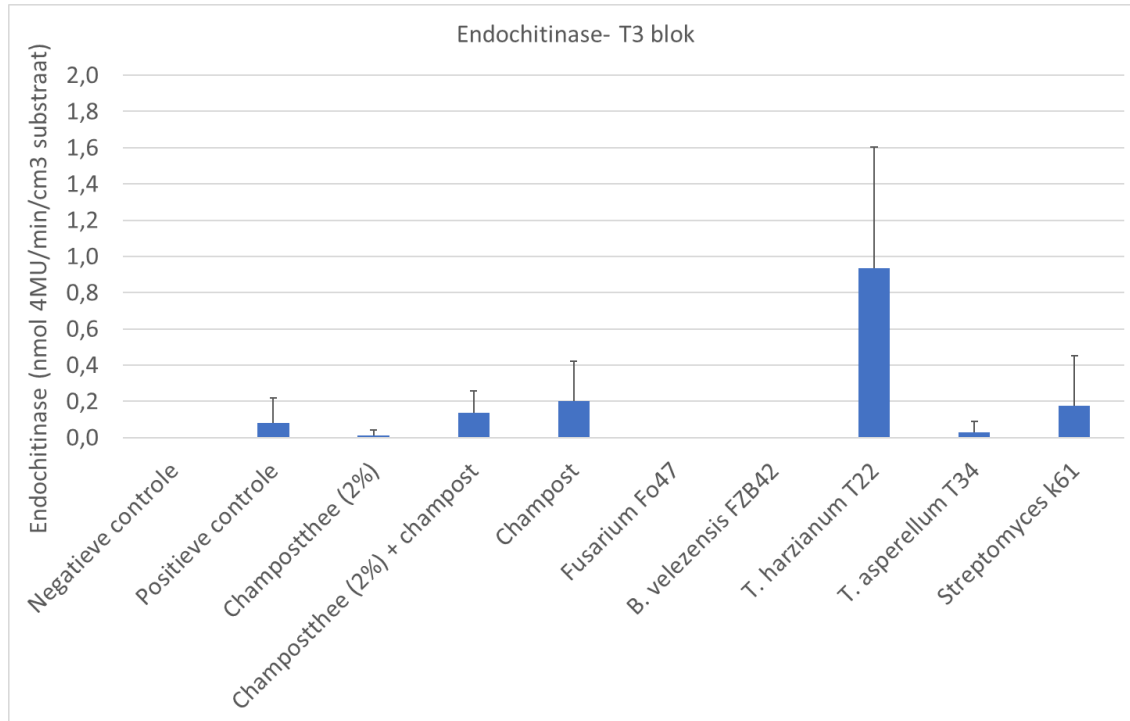
B steenwol: activiteit exochitinasen- steenwolmat (week 6 en week 9)



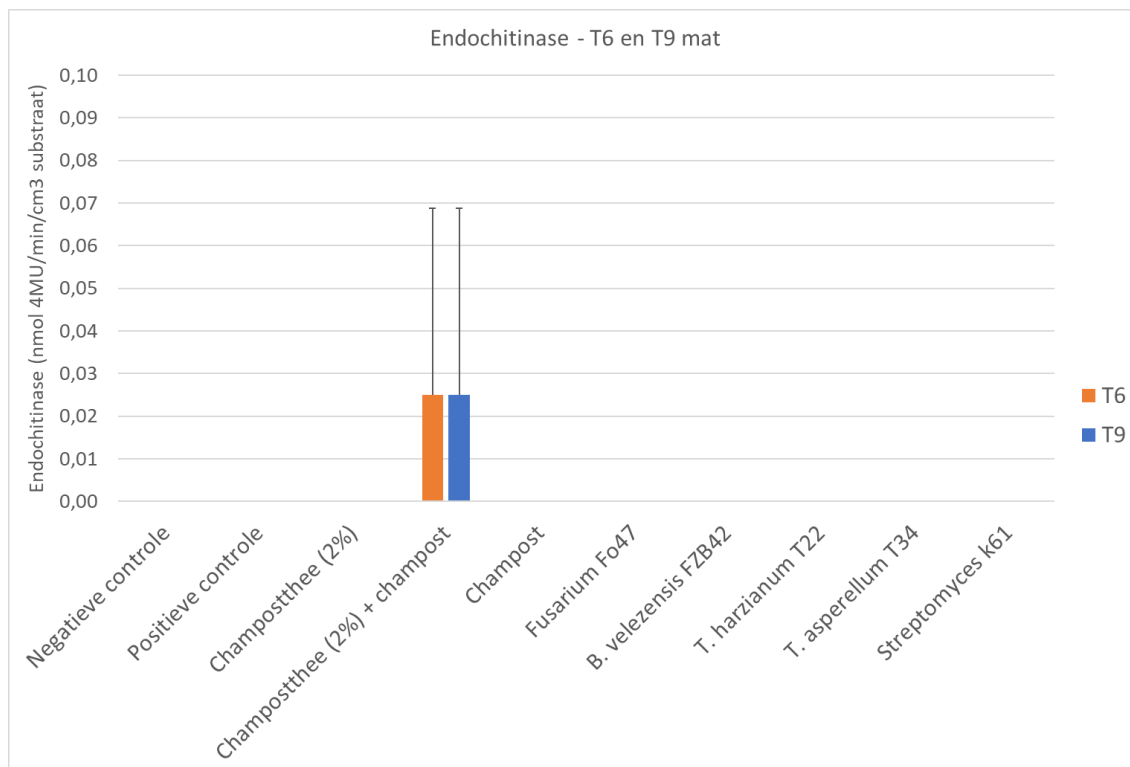
Figuur 3.48 Exochitinasen activiteit in steenwolblokken en matten tijdens teelt van komkommer.

Activiteit van endochitinase was het hoogst in steenblokken in week 3 van de teelt (3.49). Ook is de endochitinase activiteit het hoogst in steenwolblokken van de behandeling met *Trichoderma afroharzianum* T22, terwijl de exochitinase activiteit was niet meetbaar in steenwolmatten van dit behandeling. In het algemeen was de endochitinase activiteit niet meetbaar in steenwolmatten, behalve behandeling champostthee en champost (Figuur 3.49).

A steenwol: activiteit endochitinase- steenwolblok (week 3)



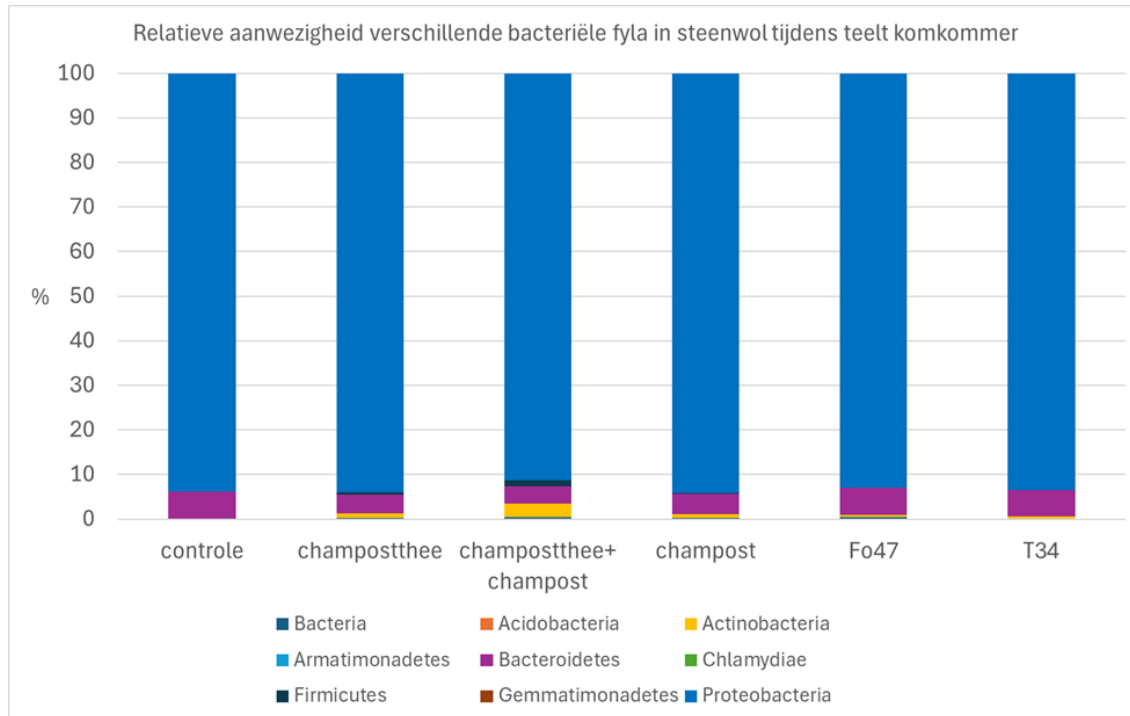
B steenwol: activiteit endochitinase- steenwolmat (week 6 en week 9)



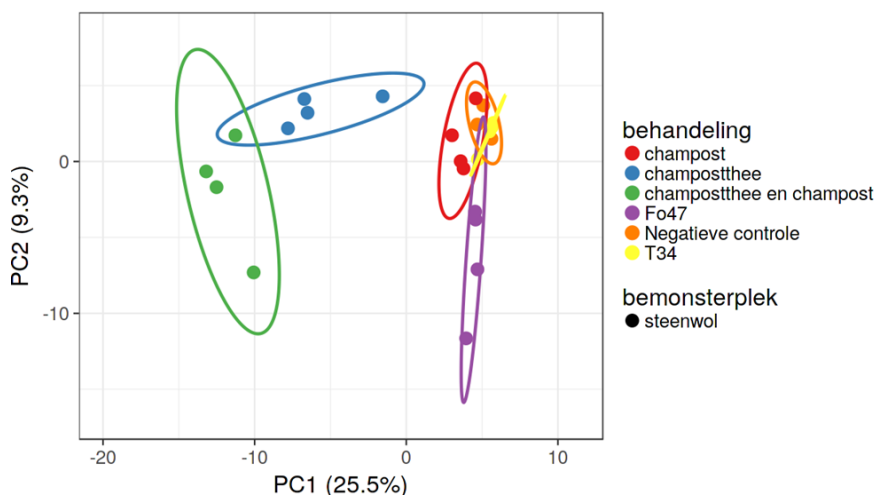
Figuur 3.49 Endochitinase activiteit in steenwolblokken en matten tijdens teelt van komkommer.

Het bacteriële microbiom van steenwol werd gedomineerd door *Proteobacteria* fyllum (>90% relatieve aanwezigheid) (Figuur 3.50). Tijdens de kasproef in 2021 hadden alleen behandelingen met champostthee of champostthee en champost significant effect op de diversiteit van het bacteriële microbiom in steenwolmatten (Figuur 3.50). Toepassing van champostthee en champost resulteerde in hogere relatieve aanwezigheid van fyla *Firmicutes* (1.7% in plaats van <0.4% in controle) en *Actinobacteria* (2.9% in plaats van 0.1% in controle) (Figuur 3.50).

A bacteriële microbiom in steenwol tijdens komkommerteelt (week 6)



B PCA analyse bacteriële microbiom in steenwol tijdens komkommerteelt (week 6)

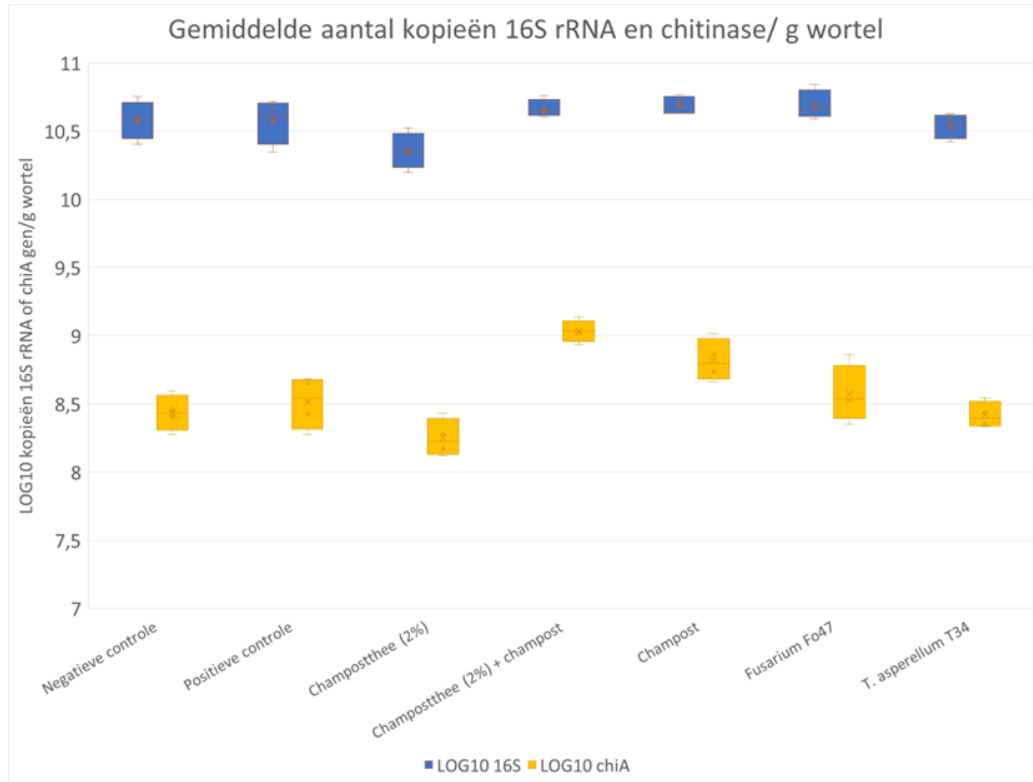


Figuur 3.50 Diversiteit van bacteriële microbiom in steenwol tijdens de komkommerteelt (week 6). Er zijn 4 steenwolmonsters geanalyseerd van elk behandeling. onbehandeld- negatieve controle (geen behandeling). Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terechtkomen van een bepaalde behandeling.

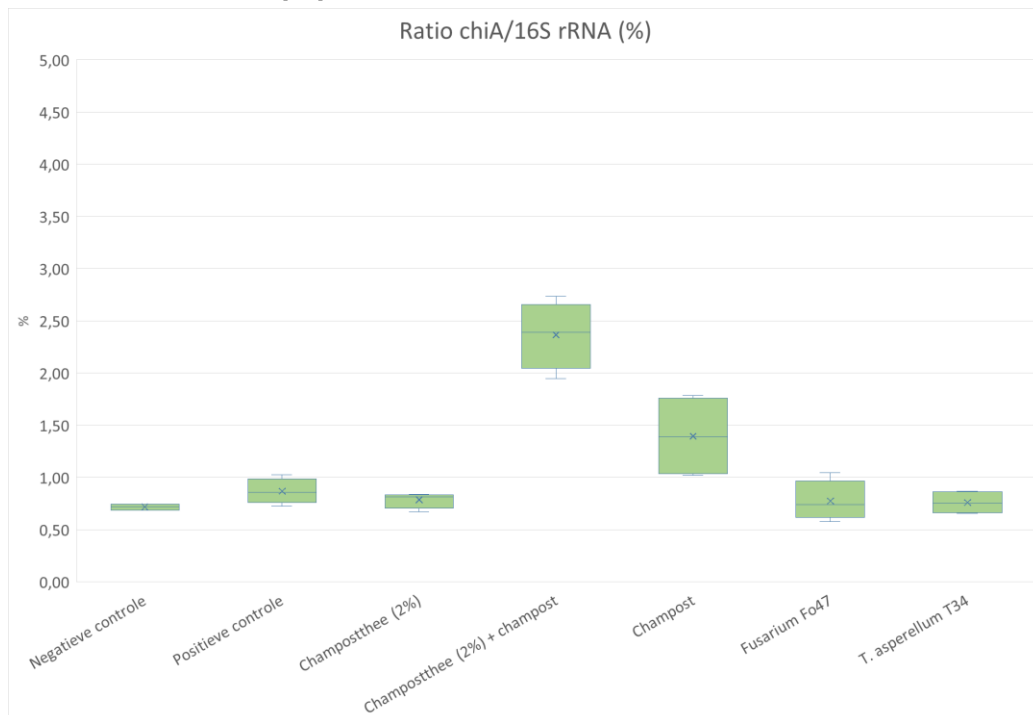
3.4.3.2 Kwantitatieve beoordeling bacteriën in rhizosfeer van komkommer tijdens teelt

Bacteriën zijn aanwezig in hoge aantallen in de rhizosfeer van komkommers tijdens teelt op steenwol, ook bij bemonstering vroeg in de teelt (na 3 weken opkweek) (Figuur 3.51). Bacteriën die chitine kunnen afbreken waren ook aanwezig in de rhizosfeer, met dichtheden rond 10^8 kopieën van *chiA* gen/g wortel (Figuur 3.51). Verhoudingsgewijs vormen de bacteriën, die chitine afbreken, ongeveer 1-2.5% van de totale bacteriële populatie, met het hoogste percentage in behandeling champostthee en champost (Figuur 3.51).

A rhizosfeer: aantallen bacteriën en chitinase *chiA* per g wortel



B ratio *chiA*:16S rRNA (%)



Figuur 3.51 Aantallen van totale bacteriën (op basis van qPCR 16S rRNA kopieën) en chitinase *chiA* (*chiA* gen) (A) en ratio chitinase *chiA* ten opzichte van 16S rRNA (%) in komkommer rhizosfeer (na 3 weken opkweek in steenwol).

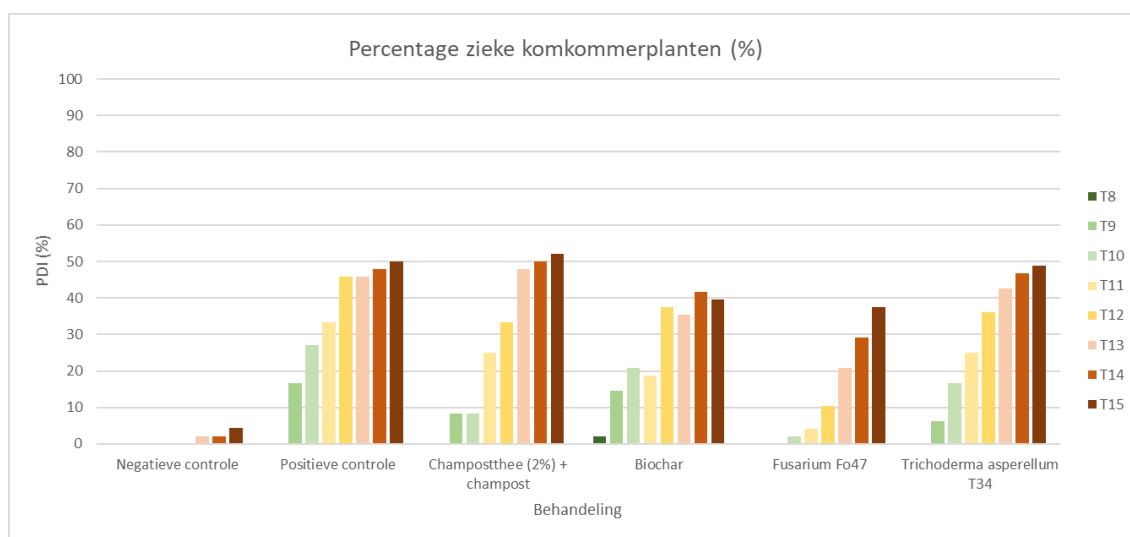
3.5 Komkommer proef 2 (juni 2022-september 2022)

3.5.1 Metingen organische koolstof in voeding met/zonder champostthee

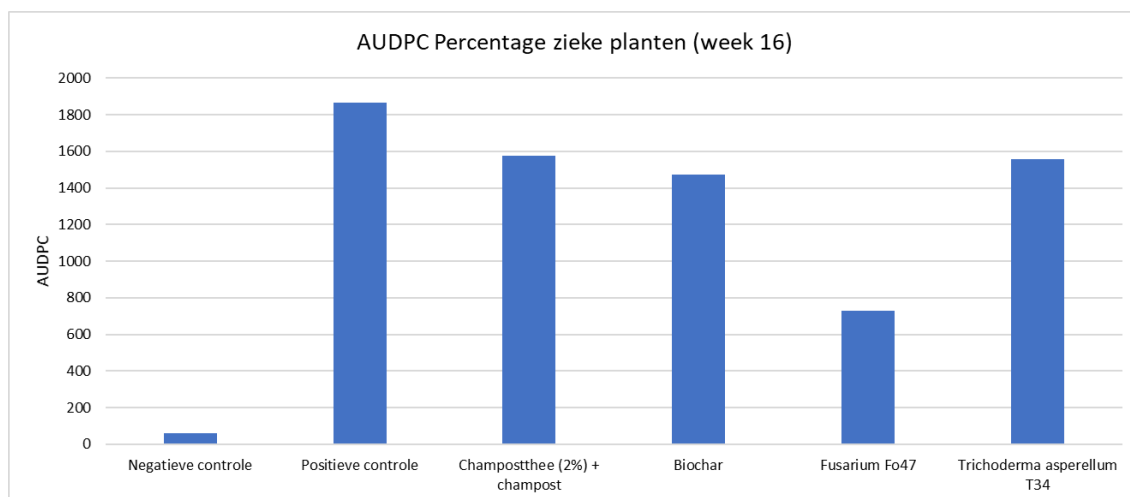
Tijdens de proef zijn er meermaals voedingsmonsters opgestuurd voor analyse, ter controle van voedingswaarde en hoeveelheid organisch C in voedingswater. Er zijn geen tekorten in minerale voeding geconstateerd. Hoeveelheid van organisch koolstof (TOC- Eng. total organic carbon) was relatief stabiel, rond 10 mg TOC/L in controle behandeling en 20 mg TOC/L in behandeling champostthee + champost.

3.5.2 Ziekteontwikkeling in komkommer

Ziekte heeft zich goed ontwikkeld in alle behandelingen (met uitzondering van de negatieve controle, zonder inoculatie van plantpathogene *Fusarium*) (Figuur 3.52). Wel is het duidelijk dat de ziekte zich significant langzamer ontwikkelde in behandeling met *Fusarium oxysporum* Fo47 (Figuur 3.53). In die behandeling is snelle symptomenontwikkeling pas in de laatste drie weken van de teelt geconstateerd.

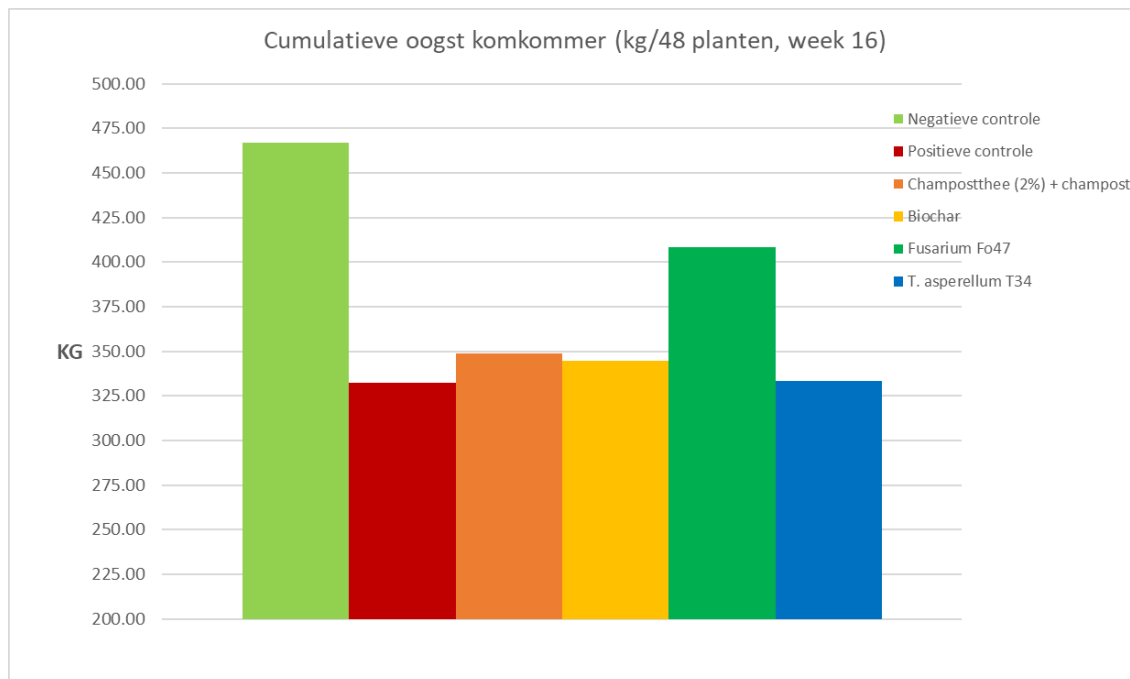


Figuur 3.52 Percentage zieke komkommers in verschillende behandelingen.

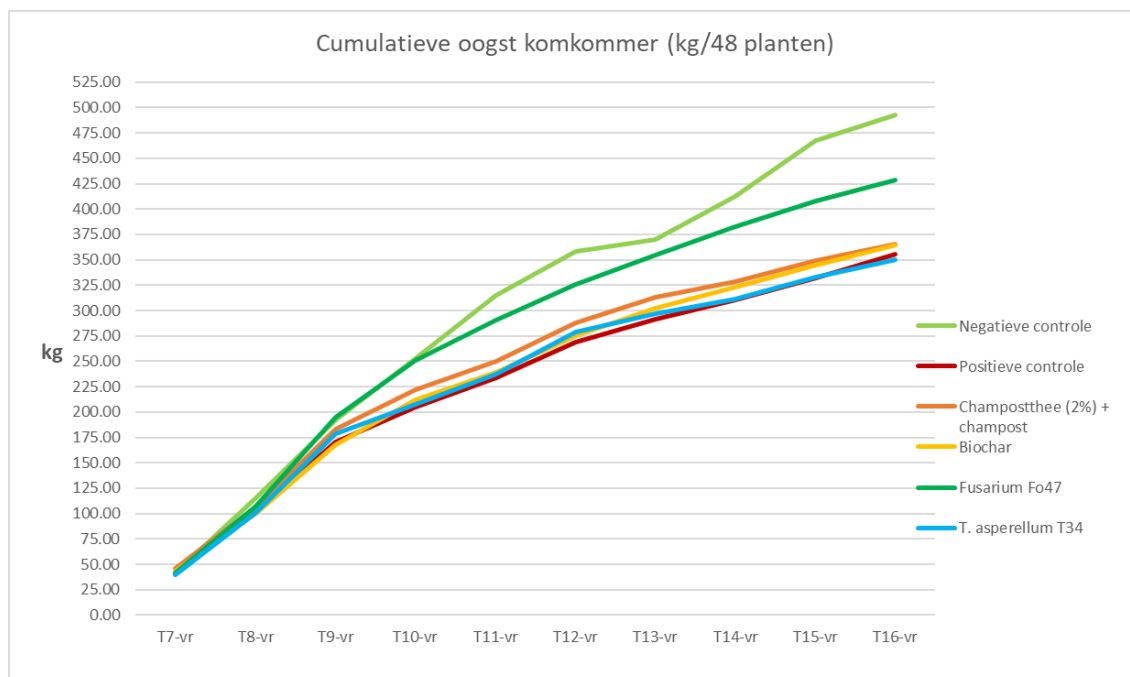


Figuur 3.53 Ziekte progressie in komkommer (als cumulatieve AUDPC: eng. Area Under Disease Progression Curve) in verschillende behandelingen.

Behandeling met *Fusarium oxysporum* Fo47 (+ inoculatie plantpathogene *Fusarium*) resulteerde in significant hogere komkommeroogst dan in positieve controle (geen behandeling + inoculatie plantpathogene *Fusarium*) (Figuur 3.54). Tot ongeveer 5 weken na inoculatie met plantpathogene *Fusarium* was de oogst in de behandeling met *Fusarium oxysporum* Fo47 vergelijkbaar met negatieve controle (geen behandeling, geen inoculatie van plantpathogene *Fusarium*) (Figuur 3.55).



Figuur 3.54 Cumulatieve oogst komkommer (eind van de teelt) in verschillende behandelingen.



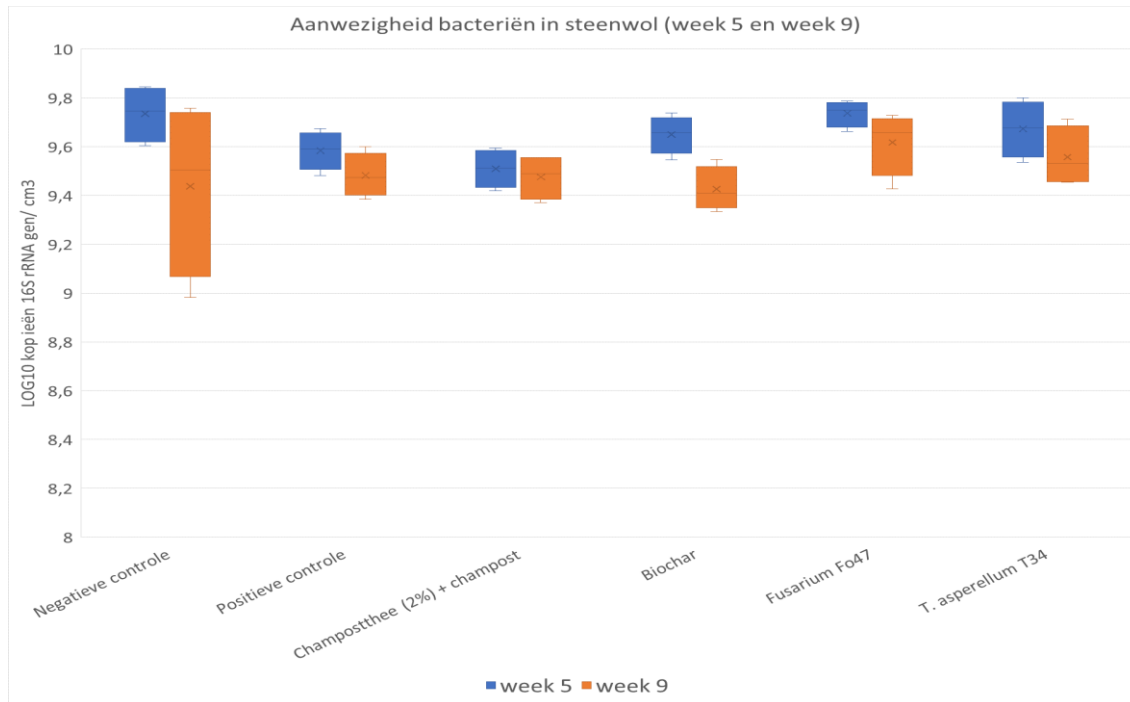
Figuur 3.55 Cumulatieve oogst komkommer tijdens de teelt in verschillende behandelingen.

3.5.3 Aanwezigheid micro-organismen in steenwol en rhizosfeer komkommer 2022

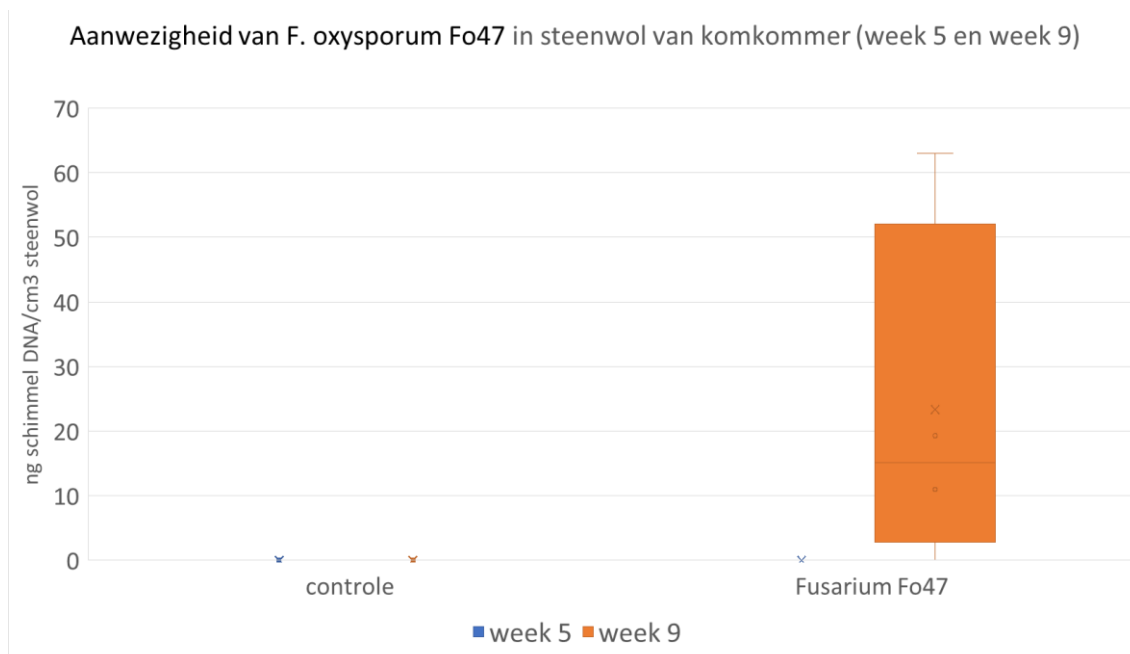
3.5.3.1 Bacteriën in steenwol tijdens komkommerteelt met recirculatie van drainwater

Monsters van steenwol voor microbiologische analyses zijn genomen 2 en 6 weken na het plaatsen van de komkommers op de steenwolmat. Bacteriën waren in staat om de steenwol te koloniseren, omdat er tussen 10^9 en 10^{10} kopieën van 16S rRNA gen/g steenwol zijn gevonden (Figuur 3.56). Verhoudingswijs vormen de bacteriën, die chitine afbreken, ongeveer 1-2.5% van de totale bacteriële populatie (Figuur 3.56).

A steenwol: aantallen bacteriën in steenwol



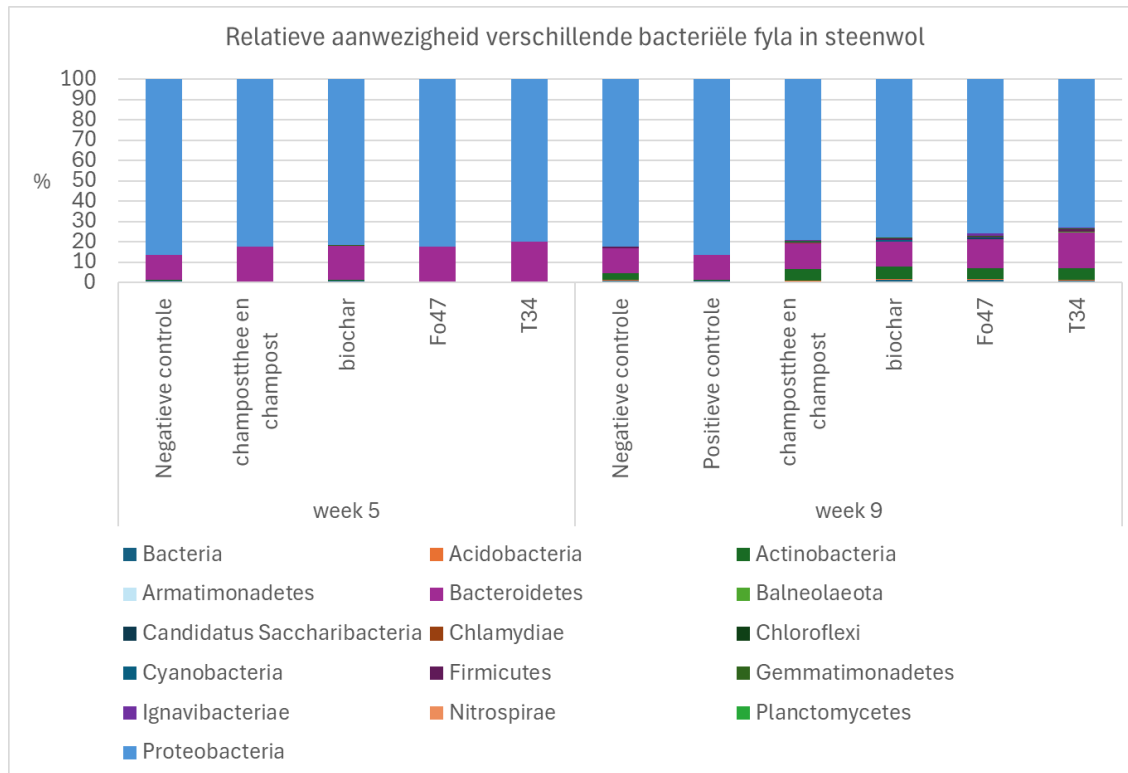
B aanwezigheid *F. oxysporum* Fo47 in steenwol tijdens komkommerteelt



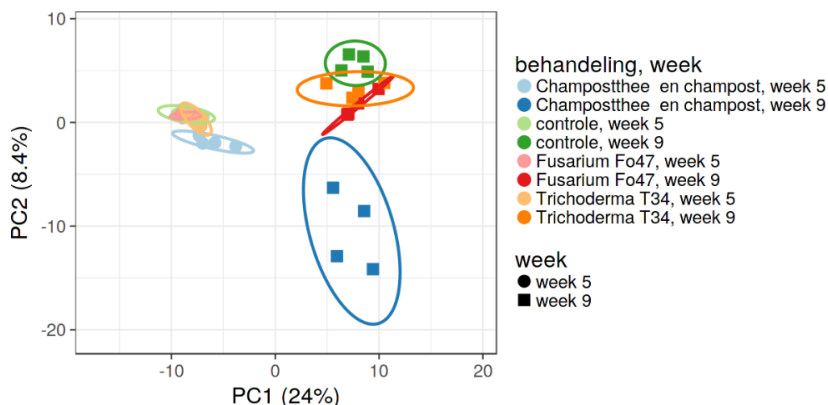
Figuur 3.56 Aantallen van totale bacteriën (op basis van qPCR 16S rRNA kopieën) en aanwezigheid *Fusarium oxysporum* Fo47 in steenwolmatten tijdens komkommerteelt (week 5 en week 9; 3 en 6 weken na planten op de mat, respectievelijk).

Ook in kasproef 2022 werd het bacteriële microbiom van de steenwol tijdens komkommerteelt gedomineerd door *Proteobacteria* fyllum (>90% relatieve aanwezigheid) (Figuur 3.57). Tijdens de kasproef in 2022 had alleen behandelingen met champostthee of champostthee significant effect op de diversiteit van het bacteriële microbiom in steenwolmatten (Figuur 3.57). Toepassing van champostthee en champost resulteerde in hogere relatieve aanwezigheid van fyllum *Actinobacteria* (5.8% in plaats van 0.3% in controle) (Figuur 3.57).

A bacteriële microbiom in steenwol tijdens komkommerteelt (week 6)



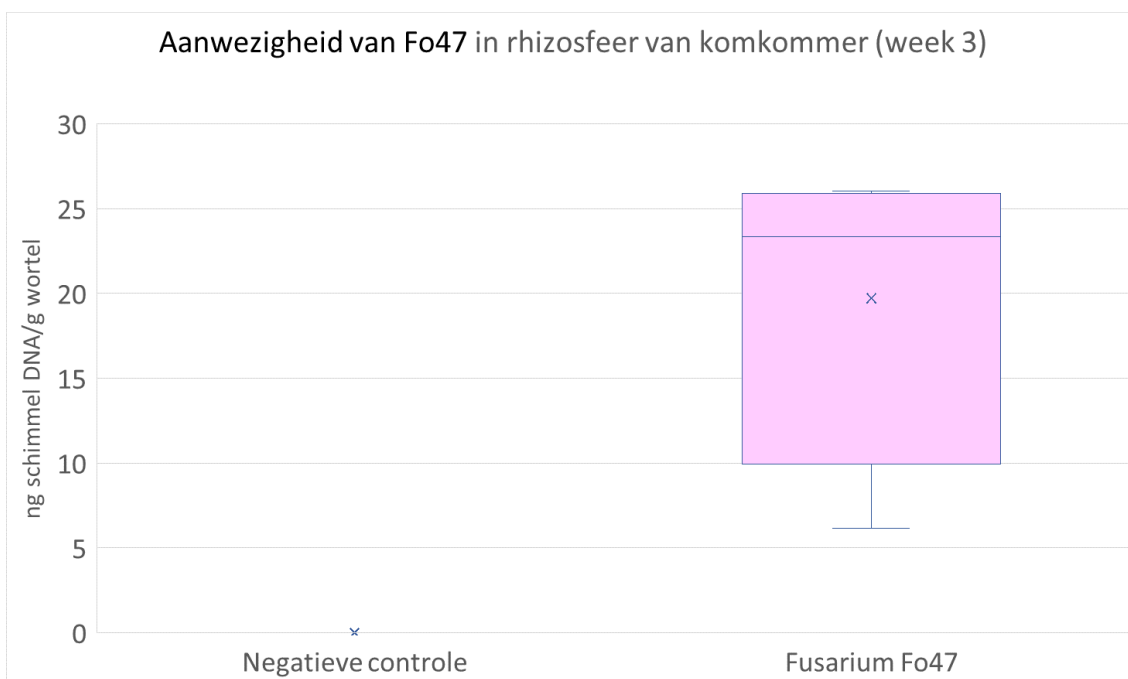
B PCA analyse bacteriële microbiom in steenwol tijdens komkommerteelt (week 6)



Figuur 3.57 Diversiteit van bacteriële microbiom in steenwol tijdens de komkommerteelt (week 5 en 9). Er zijn 4 steenwolmonsters geanalyseerd van elk behandeling. onbehandeld- negatieve controle (geen behandeling). Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terechtkomen van een bepaalde behandeling.

3.5.3.2 Bacteriën in rhizosfeer komkommer tijdens de teelt met recirculatie van drainwater

Bacteriën waren in hoge aantallen aanwezig in komkommer rhizosfeer (na 3 weken opkweek), met tussen 10^9 en 10^{10} kopieën van 16S rRNA gen/g steenwol (Figuur 3.58). *Fusarium oxysporum* Fo47 koloniseerde rhizosfeer van komkommer goed (Figuur 3.58).

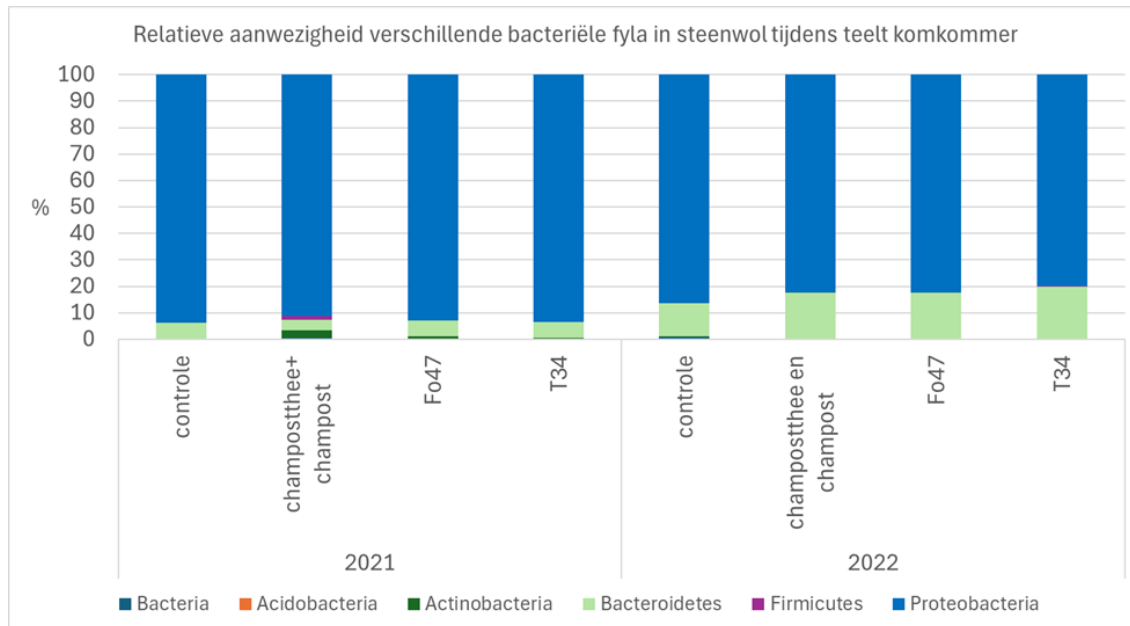


Figuur 3.58 Aantallen van totale bacteriën (op basis van qPCR 16S rRNA kopieën) en aanwezigheid *Fusarium oxysporum* Fo47 in komkommer rhizosfeer (na 3 weken opkweek).

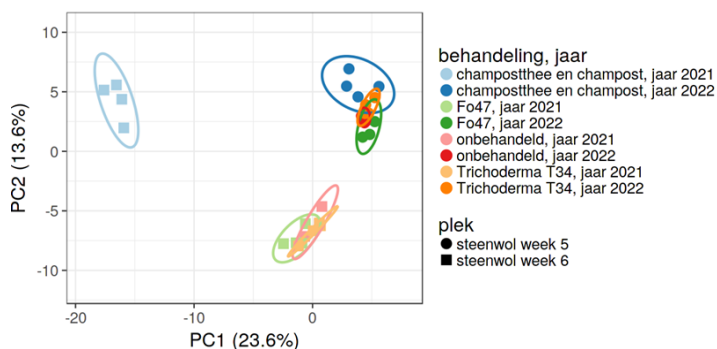
3.5.3.3 Vergelijking bacteriële microbiom in steenwol tijdens komkommerteelt (jaar 2021 en 2022)

Belangrijkste verschil tussen de kasproeven met komkommers in 2021 en 2022 was het feit dat in kasproef 2022 drainwater werd gerecirculeerd in de teelt (apart per behandeling) en in kasproef 2021 was er geen recirculatie. In 2022 kasproef was er ook geen ontsmetting van drainwater uitgevoerd voordat die hergebruikt werd, wat kan betekenen dat verspreiding van plantpathogene *Fusarium* mogelijk is tijdens de kasproef via het watersysteem.

A bacteriële microbiom in steenwol tijdens komkommerproeven in 2021 en 2022 (week 6 in 2021 en week 5 in 2022)

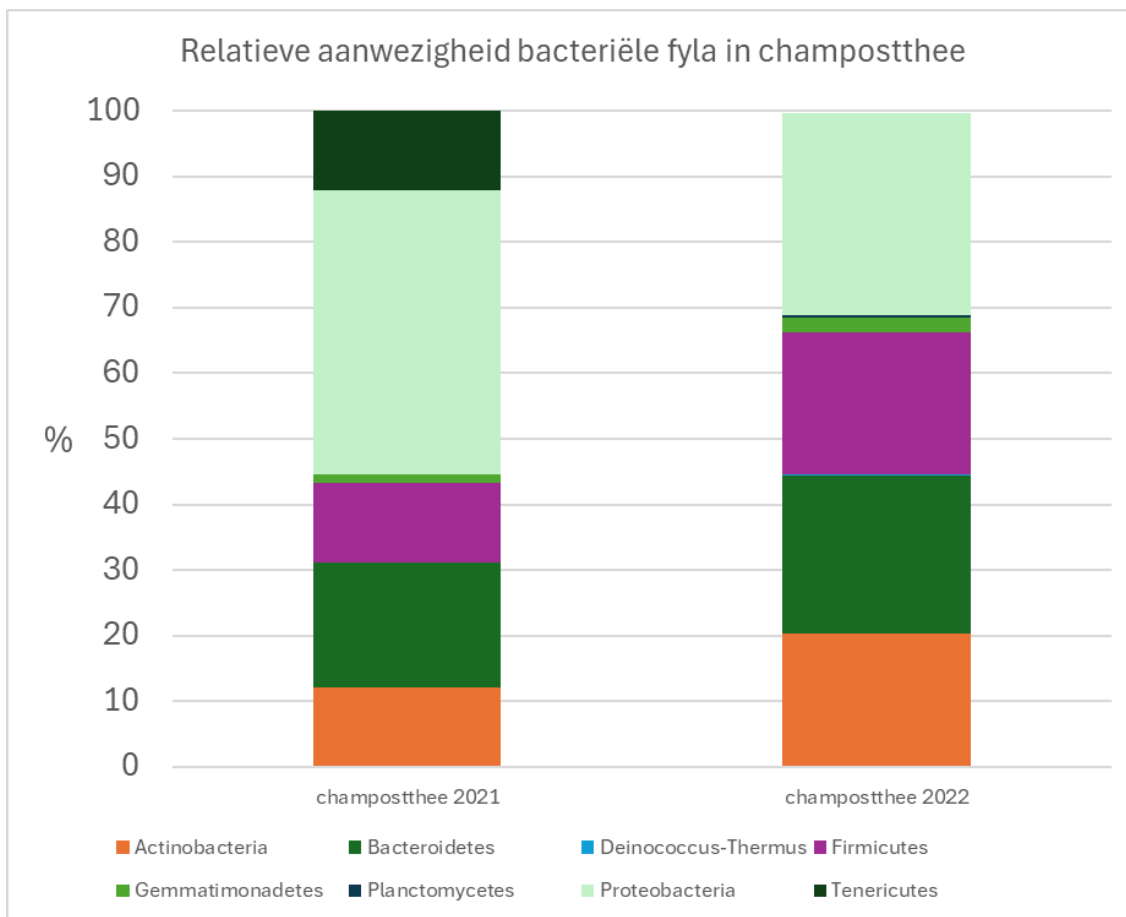


B PCA analyse bacteriële microbiom in steenwol (geslacht niveau) tijdens komkommerproeven in 2021 en 2022 (week 6 in 2021 en week 5 in 2022)



Figuur 3.59 Diversiteit van bacteriële microbiom in steenwol tijdens de komkommerteelt (week 6 in 2021 en week 5 in 2022). Er zijn 4 steenwolmonsters geanalyseerd van elk behandeling. onbehandeld- negatieve controle (geen behandeling). Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terechtkomen van een bepaalde behandeling.

Om te checken of kwaliteit van in verschillende jaren geproduceerd champostthee vergelijkbaar is, is er ook microbiom analyse uitgevoerd op champostthee monsters (Figuur 3.60). Uit analyse blijkt dat in champostthee uit 2021 gedomineerd was door *Proteobacteria* (bijna 50% relatieve aanwezigheid), terwijl in 2022 verdeling tussen *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* en *Actinobacteria* meer gelijk was (Figure 3.60). Het verschil in microbiologische samenstelling van champostthee kan mogelijk verschillen in effect tijdens de teelt in 2021 en 2022 gedeeltelijk verklaren.

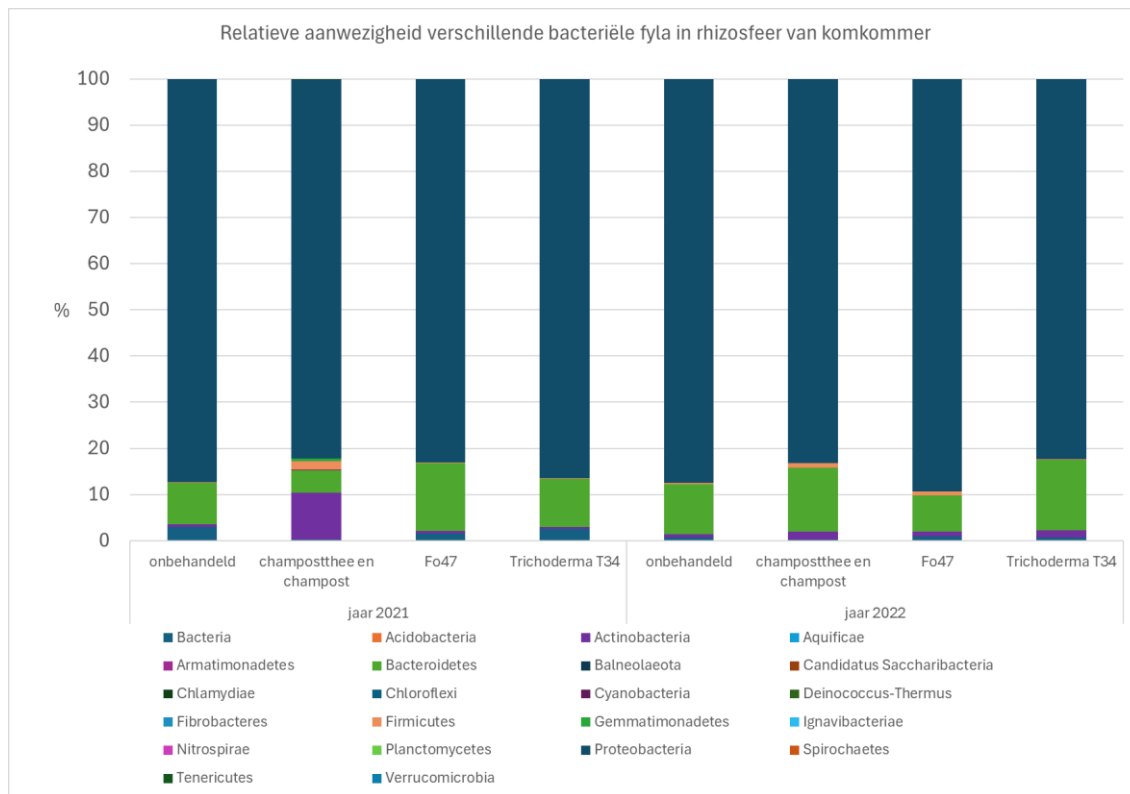


Figuur 3.60 Diversiteit van bacteriële microbiom in champostthee die geproduceerd is 2021 en 2022.

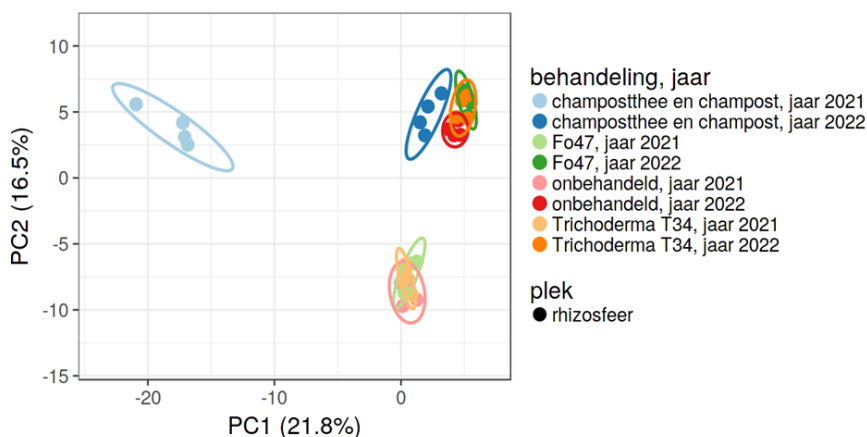
3.5.3.4 Vergelijking bacteriële microbiom in komkommer rhizosfeer tijdens teelt in steenwol (jaar 2021 en 2022)

Effect van champostthee en champost behandeling op microbiom van komkommer rhizosfeer was meer significant in de kasproef 2021 (Figuur 3.61). Behandelingen met twee antagonisten van plantpathogene Fusarium: *T. asperellum* T34 en *F. oxysporum* Fo47 hebben geen significante veranderingen in het bacteriële microbiom van komkommer rhizosfeer veroorzaakt. Het is niet uit te sluiten dat deze micro-organismen wel effect hebben gehad op schimmelpopulaties in de rhizosfeer, die zijn echter niet onderzocht in dit project.

A bacteriële microbiom in rhizosfeer in komkommerproeven in 2021 en 2022 (week 3 in 2021 en week 3 in 2022)



B PCA analyse bacteriële microbiom in steenwol (geslacht niveau) tijdens komkommerproeven in 2021 en 2022 (week 3 in 2021 en week 3 in 2022)



Figuur 3.61 Diversiteit van bacteriële microbiom in rhizosfeer tijdens de komkommerteelt (week 3 in 2021 en week 3 in 2022). Er zijn 4 rhizosfeer monsters geanalyseerd van elk behandeling. onbehandeld- negatieve controle (geen behandeling). Ellipsen geven de aan (met 95% zekerheid) in welke positie op PCA plot zullen de nieuwe monsters terechtkomen van een bepaalde behandeling.

4 Discussie en conclusie

Uitval van planten in verschillende teeltsystemen, veroorzaakt door bodem- of groeimedium gebonden pathogenen, vormt een steeds grotere uitdaging. Pathogenen, zoals *Pythium* en *Fusarium*, zijn heel goed aangepast aan teeltsystemen die gebruikt worden in de glastuinbouw en kunnen zich snel verspreiden o.a. via watersysteem. Additioneel is de beschikbaarheid van traditionele gewasbeschermingsmiddelen (chemie) steeds minder geworden in de afgelopen jaren. Telers en andere belanghebbenden in de sector, zoals opkweek en veredelingsbedrijven, hebben daarom behoefte aan alternatieve strategieën ter beheersing van wortelpathogenen. Deze strategieën zullen in de toekomst gebaseerd worden op waar mogelijk resistent uitgangsmateriaal. In dit onderzoek is aangetoond dat genetische resistentie in lisianthus cultivars de symptomen van *Fusarium* infectie significant kan onderdrukken.

In grondgebonden teelten, zoals die van lisianthus, kan gebruik gemaakt worden van biorationele producten, zoals biofungiciden, om pathogene *Fusarium* tegen te houden. Effectiviteit van deze producten is echter sterk afhankelijk van de compatibiliteit tussen gewas en gebruikt micro-organisme. De in dit onderzoek gebruikte *B. velezensis* FZB42 en *B. amyloliquefaciens* QST713 konden de ontwikkeling van *Fusarium* verwelking gedeeltelijk onderdrukken in lisianthus. Deze producten werken via een direct effect op *Fusarium*, effect op plant metabolisme (plantweerbaarheid) of indirect via effect op microbiom van plant rhizosfeer (Tian *et al.*, 2023; Hauschild *et al.*, 2024; ook aangetoond in dit onderzoek). Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat zowel *B. velezensis* FZB42 als *B. amyloliquefaciens* QST713 significant effect hadden op rhizosfeer microbiom, maar niet op totale microbiom van de bodem. Het is wel interessant dat effectiviteit van *B. velezensis* FZB42 alleen tegen *Fusarium* was hoger dan die van *B. amyloliquefaciens* QST713. Echter toepassing van *B. amyloliquefaciens* QST713 in combinatie met biochar onderdrukte de *Fusarium* beter dan toepassing van de bacterie alleen, terwijl er geen verschil was gemeten in kolonisatie van de wortels door *B. amyloliquefaciens* QST713 in behandeling met of zonder biochar. Combinatie van biochar en *B. velezensis* FZB42 was niet effectiever tegen de *Fusarium* dan de toepassing van de bacterie alleen. Ondanks het feit dat beide bacteriën behoren tot het geslacht *Bacillus*, zijn ze dusdanig verschillend qua hun activiteit en productie van secundaire metabolieten dat het de antagonistische effect tegen *Fusarium* van bacterie alleen of in combinatie met andere maatregelen op een andere wijze beïnvloed wordt. Effectiviteit tegen pathogenen en werkingsmechanismen kunnen aanzienlijk anders zijn in verschillende *Bacillus* stammen, daarom is het belangrijk om deze micro-organismen te testen in het teeltsysteem, ook op compatibiliteit met het gewas (Calvo *et al.*, 2021; Akintayo *et al.*, 2023). In de andere onderzoeken is aangetoond dat *B. velezensis* FZB42 kan zowel marginale effect hebben op rhizosfeer microbiom in sla, maar wel effectief was tegen *Rhizoctonia* (Chowdhury *et al.*, 2013; Kröber *et al.*, 2014) of dat deze bacterie wel significant rhizosfeer microbiom kan beïnvloeden (Hauschild *et al.*, 2024). Vergelijkbare resultaten zijn ook verkregen met *B. amyloliquefaciens* QST713 (Tian *et al.*, 2023), met verwijzingen dat het effect van *Bacillus* inoculant op totale microbiom kan zelf afhankelijk zijn van de gebruikte cultivar. Toepassing van *B. amyloliquefaciens* QST713 resulteerde ook in kortdurend aanpassing van bodemmicrobiom in aardappelteelt (Adamo *et al.*, 2024).

Toevoegen van producten op basis van één stam van antagonistische bacterie of schimmel is een voorbeeld van zogenaamd inundatieve biocontrole strategie. Deze strategie is niet altijd succesvol in praktijk situaties, omdat de toegevoegde micro-organismen zich niet goed kunnen vestigen in de bodem/groeimedium of kunnen ze de *in situ* (in bodem/groeimedium) geen metabolieten, zoals antibiotica of vluchtige stoffen (VOC), produceren om plantpathogenen succesvol, tegen te houden (Mazzola en Freilich, 2017).

Andere mogelijke antagonisten van de plant pathogene *Fusarium* zijn verschillende niet plantpathogene stammen van *Fusarium oxysporum*. Eén daarvan, *Fusarium oxysporum* Fo47, die al meer dan 40 jaar in wetenschap bekend is van effectiviteit tegen verschillende bodempathogenen (Alabouvette, 1986; Edel-Hermann *et al.*, 2011), is in dit onderzoek succesvol toegepast in komkommer tegen infectie van *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*.

De afgelopen jaren groeit de kennis over microbiologie van de bodems en groeimediums. Dat is een belangrijke stap in het begrijpen van interacties tussen de plant en micro-organismen, inclusief plantpathogenen, en mogelijk maken van op maat gemaakte oplossingen voor specifieke problemen met wortelziektes. Natuurlijk bodemweerbaarheid tegen wortelziektes in sommige bodems is geen nieuwe thema, bodems die weerbaar zijn tegen *Fusarium* waren al in jaren tachtig van vorige eeuw gekarakteriseerd door o.a. Franse onderzoekers (Alabouvette, 1986). Met de komst van DNA technieken is de microbiële diversiteit in deze bodems ook vaak onderzocht (Ossowicki *et al.*, 2020; Todorović *et al.*, 2023). Afhankelijk van de pathogeen spelen algemene of specifieke bodem weerbaarheid een rol (Duran en de la Luz, 2021). Algemene bodemweerbaarheid maakt gebruik van de algehele activiteit van de micro-organismen in de bodem of groeimedium, waarbij pathogenen worden weggeconcentreerd door de activiteit van het hele microbiom, geen specifieke bacteriën of schimmels. Algemene bodemweerbaarheid speelt vaak een rol in onderdrukking van *Pythium* infecties. Over specifieke bodemweerbaarheid wordt gesproken als er specifieke groep micro-organismen nodig is, die bijvoorbeeld antibiotica of andere secundaire metabolieten produceren, om pathogeen specifiek tegen te houden. Specifiek bodemweerbaarheid speelt een rol in tegenhouden van *Fusarium* infecties.

Manipulatie van het natuurlijke microbiom in de bodem en groeimedium biedt ook mogelijk (gedeeltelijk) een oplossing voor de problematiek van wortelziektes. Het is al langer bekend dat toevoegingen van organische stof, o.a. chitine houdende restproducten, in de bodem kan zorgen voor een specifieke onderdrukking van wortelpathogenen zoals *Rhizoctonia* en *Fusarium* (Andreo-Jimenez *et al.*, 2021; Wang *et al.* 2020; Martin *et al.*, 2023). Er zijn veel micro-organismen, onder andere bacteriën, zoals *Pseudomonas* en *Flavobacterium*, die als mogelijke natuurlijke antagonisten van *Fusarium* in de bodem en andere groeimedia kunnen fungeren (Validov *et al.*, 2007). Bijvoorbeeld ook in grond, die meerjarig gebruikt wordt voor lisianthus teelt, en in rhizosfeer van lisianthus zijn deze bacteriën door ons onderzoek gevonden, maar ook in onderzoek van lisianthus teelt buiten in o.a. China (Huang *et al.*, 2019). Deze micro-organismen worden op dit moment niet geformuleerd in de commerciële producten, omdat het soms heel lastig is, maar zijn heel vaak van nature aanwezig in de bodem en groeimedium en uiteindelijk in rhizosfeer van de planten, zelfs in inerte groeimedia zoals steenwol (Koohakan *et al.*, 2004; Postma *et al.*, 2005). Het opent de deur voor de manipulatie van natuurlijke microbiomen in teeltsystemen specifiek voor ziekteonderdrukking.

Welke micro-organismen belangrijk zijn voor onderdrukking van *Fusarium* in bepaalde gronden is sterk afhankelijk van de voorgeschiedenis en type bodem. Bijvoorbeeld, in de proeven binnen dit project zijn bodems gebruikt die bemonsterd zijn op bedrijven met lisianthus teelt (2020 en 2021) of chrysantteelt (2022). De microbiomen, die zich ontwikkelden in deze bodems, zijn van elkaar verschillend. Bijvoorbeeld in de bodem van chrysanten teelt waren meer *Actinobacteria* aanwezig, wat uiteindelijk resulteerde in hogere relatieve aanwezigheid van *Streptomyces* ook in rhizosfeer van lisianthus tijdens de proef in 2022. In 2021 was *Pseudomonas* een dominant geslacht in rhizosfeer lisianthus. De samenstelling van de natuurlijke bodemmicrobiom heeft dus een belangrijke invloed op welke bacteriële soorten, en waarschijnlijk ook schimmelsoorten, aanwezig zijn in plant rhizosfeer. Dit is een bekend fenomeen, al eerder gerapporteerd door andere onderzoekers, o.a. Schreiter *et al.*, (2014) en Anzalone *et al.*, (2022). Het is daarom belangrijk om in de toekomst niet alleen naar taxonomische samenstelling van (rhizosfeer)microbiomen te gaan kijken, omdat die kunnen verschillen afhankelijk van de type bodem of groeimedium, maar ook naar de diversiteit van microbiële functies. Er bestaat geen één juist microbiom samenstelling (op basis van taxonomie) die groei en functioneren van de planten ondersteunt.

In dit onderzoek is voor het eerst aangetoond dat de specifieke weerbaarheid tegen *Fusarium* uit champost overgedragen kan worden naar inerte groeimedia zoals steenwol. Het was voldoende om de ontwikkeling van *Fusarium* infectie te vertragen in teeltsysteem zonder recirculatie van het voedingswater. Het was echter niet voldoende om *Fusarium* tegen te houden in recirculerend systeem zonder ontsmetting van drainwater. Waarschijnlijk komt dat door het feit dat *Fusarium* kan zich heel goed verspreiden via waterstromen. Daarom zou het in de toekomst wel belangrijk blijven om het drainwater te blijven ontsmetten, om inoculum dichtheid van plantpathogenen te verlagen, voordat die hergebruikt wordt in de kas.

In dit onderzoek hebben wij ook gekeken naar andere organische reststromen, zoals biochar, als mogelijke organische toevoegingen die effect zouden hebben op bodem- of groeimediuu weerbaarheid tegen *Fusarium*. Zowel in de bodem als in steenwol zorgt toevoeging van biochar voor veranderingen in het microbiom van planten rhizosfeer en bodem/groeimediuu. Er was eerder echter nog weinig bekend over optimale concentraties nodig voor ziekte-onderdrukking en goede plantengroei. In dit onderzoek hebben wij waargenomen, dat toevoeging van 1% biochar in de grond een positief effect heeft op onderdrukking van *Fusarium*. Echter, toevoeging van 5% (v/v) kan voor vertraagde groei in lisianthus zorgen. In verschillende onderzoeken kwam naar voren dat effect van biochar op ziekte een U-vormige dosis-responscurve heeft, wat betekend dat er optimale biochar bijmenging percentage voor ziekteonderdrukking is, meestal tussen 1-2%, maar toevoegen van hogere hoeveelheden van biochar juist tot verergeren van de ziektesymptomen kan leiden (Graber *et al.*, 2014; Bonanomi *et al.*, 2015). Toegevoegde waarde van biochar als modulator van bodem/groeimedia weerbaarheid is op dit moment nog relatief onderbelicht, maar krijgt afgelopen jaren steeds meer aandacht vanuit wetenschap en de praktijk (o.a. Dror *et al.*, 2022; Bonanomi *et al.* 2022).

Literatuur

- Adam, E., Groenenboom, A. E., Kurm, V., Rajewska, M., Schmidt, R., Tyc, O., *et al.* 2016.
Controlling the Microbiome: Microhabitat Adjustments for Successful Biocontrol Strategies in Soil and Human Gut. *Frontiers in microbiology*, 7, 1079. doi:10.3389/fmicb.2016.01079
- Adam, M., Heuer, H., Hallmann, J. 2014.
Bacterial Antagonists of Fungal Pathogens Also Control Root-Knot Nematodes by Induced Systemic Resistance of Tomato Plants. *PloS one*. 9. e90402. 10.1371/journal.pone.0090402.
- Adamo, I., Acin-Albiac, M., Röttgers, S., de Prado, D.R., Benito, B.M, Zamora, J., Godara, R., García-Jiménez, B., Jiang-Rempel, P., Cline, L.C., Acedo, A. 2024.
Short impact on soil microbiome of a *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 based product that correlates with higher potato yield across USA. *Front Plant Sci*. 2024 Mar 12;15:1332840.
- Adesina, M., Grosch, R., Lembke, A., Vatchev, T., Smalla, K. 2009.
In vitro antagonists of *Rhizoctonia solani* tested on lettuce: Rhizosphere competence, biocontrol efficiency and rhizosphere microbial community response: Research article. *FEMS microbiology ecology*. 69: 62-74. 10.1111/j.1574-6941.2009.00685.x.
- Akintayo, S.O., Hosseini, B., Vahidinasab, M., Messmer, M., Pfannstiel, J., Bertsche, U., Hubel, P., Henkel, M., Hausmann, R., Voegelé, R.T., Lilge, L. 2023.
Characterization of antifungal properties of lipopeptide-producing *Bacillus velezensis* strains and their proteome-based response to the phytopathogens, *Diaporthe* spp. *Front Bioeng Biotechnol*. 7;11:1228386
- Alam, M. Z., Braun, G., Norrie, J., and Hodges, D. M. 2013.
Effect of *Ascophyllum* extract application on plant growth, fruit yield and soil microbial communities of strawberry. *Can. J. Plant Sci*. 93, 23-36. doi: 10.4141/cjps2011-260
- Alabouvette, C. 1986.
Fusarium-wilt suppressive soils from the Châteaurenard region: Review of a 10-year study.
<http://dx.doi.org/10.1051/agro:19860307>. 6. 10.1051/agro:19860307.
- Andreo-Jimenez, B., Schilder, M.T., Nijhuis, E.H., Te Beest, D.E., Bloem, J., Visser, J.H.M., van Os, G., Brolsma, K., de Boer, W., Postma, J. 2021.
Chitin- and Keratin-Rich Soil Amendments Suppress *Rhizoctonia solani* Disease via Changes to the Soil Microbial Community. *Appl Environ Microbiol*. 2021 May 11;87(11):e00318-21. doi: 10.1128/AEM.00318-21. PMID: 33771785; PMCID: PMC8208141.
- Antoniou, A., Tsolakidou, M., Stringlis, I., Pantelides, I. 2017.
Rhizosphere Microbiome Recruited from a Suppressive Compost Improves Plant Fitness and Increases Protection against Vascular Wilt Pathogens of Tomato. *Frontiers in Plant Science*. 8. 10.3389/fpls.2017.02022.
- Anzalone, A., Mosca, A., Dimaria, G., Nicotra, D., Tessitori, M., Privitera, G.F., Pulvirenti, A., Leonardi, C., Catara, V. 2022.
Soil and Soilless Tomato Cultivation Promote Different Microbial Communities That Provide New Models for Future Crop Interventions. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 8;23(15):8820. doi: 10.3390/ijms23158820. PMID: 35955951; PMCID: PMC9369415.
- Bakker, P. A., Doornbos, R. F., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., & Pieterse, C. M. 2013.
Induced systemic resistance and the rhizosphere microbiome. *The plant pathology journal*, 29(2), 136-143. doi:10.5423/PPJ.SI.07.2012.0111
- Berg, G., Köberl, M., Rybakova, D., Müller, H., Grosch, R., Smalla, K. 2017.
Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. *FEMS Microbiology Ecology*. 93. fix050. 10.1093/femsec/fix050.
- Berg, G., Dorador, C., Egamberdieva, D., Kostka, J.E., Ryu, C.M., Wassermann, B. 2024.
Shared governance in the plant holobiont and implications for one health. *FEMS Microbiol Ecol*. 2024 Feb 14;100(3):fia004. doi: 10.1093/femsec/fiae004. PMID: 38364305; PMCID: PMC10876113.
- Bonanomi, B., Ippolito, F., Scala, F. 2015.
A "black" future for plant pathology? biochar as a new soil amendment for controlling plant diseases. *J PI Path*. 2015;97(2):223-234.

- Bonanomi, G., Zotti, M., Idbella, M., Cesarano, G., Al-Rowaily, S.L. & Abd-ElGawad, A.M. 2022. Mixtures of organic amendments and biochar promote beneficial soil microbiota and affect *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor* disease suppression. *Plant Pathology*, 71, 818–829. Available from: <https://doi-org.ezproxy.library.wur.nl/10.1111/ppa.13514>
- Bowers, J., Locke, J.C. 2000. Effect of Botanical Extracts on the Population Density of *Fusarium oxysporum* in Soil and Control of *Fusarium* Wilt in the Greenhouse. *Plant Disease - PLANT DIS.* 84. 300-305. 10.1094/PDIS.2000.84.3.300.
- Bubici, G. 2018. *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Fusarium* species. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources.* 13. 10.1079/PAVSNNR201813050.
- Calvo, H., Roudet, J., Gracia, A. P., Venturini, M. E., & Feraud, M. (2021). Comparison of efficacy and modes of action of two high-potential biocontrol *Bacillus* strains and commercial biocontrol products against *Botrytis cinerea* in table grapes. *OENO One*, 55(3), 229–243. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.3.4688>
- Chowdhury, S.P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H, *et al.* 2013. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on Lettuce Growth and Health under Pathogen Pressure and Its Impact on the Rhizosphere Bacterial Community. *PLoS ONE* 8(7): e68818. doi:10.1371/journal.pone.0068818
- Clinckemaillie, A., Decroës, A., van Aubel, G., Carrola dos Santos, S., Renard, M.E., van Cutsem, P., Legrève, A. 2016. The novel elicitor COS-OGA enhances potato resistance to late blight. *Plant Pathology*. 10.1111/ppa.12641.
- Derkx, M.P.M., Doorn, J., van der, Wolf, J.M. 2012. Toepassing van elicitors ter verhoging van de plantweerstand. Rapportage PPO nr. 3236144000/ PT nr. 14443
- Dror, B., Amutuhaire, H., Frenkel, O., Jurkevitch, E., Cytryn, E. 2022. Identification of Bacterial Populations and Functional Mechanisms Potentially Involved in Biochar-Facilitated Antagonism of the Soilborne Pathogen *Fusarium oxysporum*. *Phytobiomes Journal* 2022 6:2, 139-150
- Durán, P., de la Luz Mora, M. 2021. Plant–Soil–Microorganism Interaction Involved in Natural Suppression of *Take-All* Disease. In: Kaushal, M., Prasad, R. (eds) *Microbial Biotechnology in Crop Protection*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0049-4_7
- Durán, P., Tortella, G., Sadowsky, M. J., Viscardi, S., Barra, P. J., & Mora, M. d. I. L. (2021). Engineering Multigenerational Host-Modulated Microbiota against Soilborne Pathogens in Response to Global Climate Change. *Biology*, 10(9), 865. <https://doi.org/10.3390/biology10090865>
- Edel-Hermann, V., Aimé, S., Cordier, C., Olivain, C., Steinberg, C., Alabouvette, C. 2011. Development of a strain-specific real-time PCR assay for the detection and quantification of the biological control agent Fo47 in root tissues. *FEMS Microbiol Lett.* 2011 Sep;322(1):34-40. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02332.x. Epub 2011 Jul 13. PMID: 21658107.
- Erlacher, A., Cardinale, M., Grosch, R., Grube, M., and Berg, G. 2014. The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome. *Front. Microbiol.* 5:175. doi: 10.3389/fmicb.2014.00175
- Fiorentino, Nunzio., Ventrino, V., Woo, S., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, M., Colla, G., Rouphael, Y. 2018. Trichoderma-Based Biostimulants Modulate Rhizosphere Microbial Populations and Improve N Uptake Efficiency, Yield, and Nutritional Quality of Leafy Vegetables. *Frontiers in Plant Science.* 9. 10.3389/fpls.2018.00743.
- Fira, D., Dimkić, I., BeriĆ, T., Lozo, J., Stanković, S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology.* 285. 44–55. 10.1016/j.jbiotec.2018.07.044.
- Graber, E. R., Frenkel, O., Jaiswal, A. K., Elad, Y. 2014. How may biochar influence severity of diseases caused by soilborne pathogens? *Carbon Management*, 5(2), 169–183. <https://doi.org/10.1080/17583004.2014.913360>

- Hafiz, F.B., Moradtalab, N., Goertz, S., Rietz, S., Dietel, K., Rozhon, W., Humbeck, K., Geistlinger, J., Neumann, G., Schellenberg, I. 2022.
Synergistic Effects of a Root-Endophytic *Trichoderma* Fungus and *Bacillus* on Early Root Colonization and Defense Activation Against *Verticillium longisporum* in Rapeseed. *Mol Plant Microbe Interact.* 2022 May;35(5):380-392. doi: 10.1094/MPMI-11-21-0274-R. Epub 2022 Mar 23. PMID: 35147443.
- Hale, L., Luth, M., Crowley, D. 2014.
Biochar characteristics relate to its utility as an alternative soil inoculum carrier to peat and vermiculite. *Soil Biol. Biochem.* 81,228–235.doi:10.1016/j.soilbio.2014.11.023
- Hauschild, K., Orth, N., Liu, B., Giongo, A., Gschwendtner, S., Beerhues, L., Schloter, M., Vetterlein, D., Winkelmann, T., Smalla, K. 2024.
Rhizosphere competent inoculants modulate the apple root-associated microbiome and plant phytoalexins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2024 May 27;108(1):344. doi: 10.1007/s00253-024-13181-8. PMID: 38801472; PMCID: PMC11129989.
- Hu, J., Wei, Z., Friman, V-P., Gu, S-H., Wang, X-F., Eisenhauer, N., Yang, T-J., Ma, J., Shen, Q-R., Xu, Y-C., Jousset, A. 2016.
Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression. *mBio* 7(6):e01790-16. doi:10.1128/mBio.01790-16.
- Huang, X., Zhou, X., Zhang, J., Cai, Z. 2019.
Highly connected taxa located in the microbial network are prevalent in the rhizosphere soil of healthy plant. *Biology and Fertility of Soils.* 55. 10.1007/s00374-019-01350-1.
- Katan, J. 2017.
Diseases caused by soilborne pathogens: Biology, management and challenges. *Journal of Plant Pathology.* 99. 305-315. 10.4454/jpp.v99i2.3862.
- Ke Xing, Xiao Zhu, Xue Peng, Sheng Qin. 2015.
Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA*, 2015, 35 (2), pp.569-588. 10.1007/s13593-014-0252-3. hal-01284280
- Koohakan, P., Ikeda, H., Jeanaksorn, T., Tojo, M., Kusakari, S.-I., Okada, K., Sato, S. 2004.
Evaluation of the indigenous microorganisms in soilless culture: Occurrence and quantitative characteristics in the different growing systems. *Sci. Hortic.* 2004;101:179–188.
- Köhl J., Kolnaar R., Ravensberg W.J., 2019.
Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Front Plant Sci.* 19:845- doi: 10.3389/fpls.2019.00845. eCollection 2019.
- Kröber, M., Wibberg, D., Grosch, R., Eikmeyer, F., Verwaaijen, B., Chowdhury, S.P., Hartmann, A., Pühler, A., Schlüter, A. 2014.
Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing. *Front Microbiol.* 2014 May 27;5:252. doi: 10.3389/fmicb.2014.00252. PMID: 24904564; PMCID: PMC4033844.
- van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Kohl, J., Ravensberg, W. J., Urbaneja, A. 2018.
Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63: 39-59
- Martín, C., Zervakis, G.I., Xiong, S., Koutrotsios, G., Strættkvern, K.O. 2023. Mazzola, M., Freilich, S. 2016.
Prospects for Biological Soilborne Disease Control: Application of Indigenous Versus Synthetic Microbiomes. *Phytopathology.* 107. 10.1094/PHYTO-09-16-0330-RVW.
- Mendis, H.C., Thomas, V.P., Schwientek, P., Salamzade, R., Chien, J.T., Waidyaratne, P., Kloepper, J., De La Fuente, L. 2018
Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. *PLoS One.* 2018 Feb 15;13(2):e0193119. doi: 10.1371/journal.pone.0193119. PMID: 29447287; PMCID: PMC5814090.
- Mueller, U.G., Sachs, J.L. 2015.
Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health. *Trends in microbiology.* 23. 10.1016/j.tim.2015.07.009.

- Ossowicki, A, Tracanna, V, Petrus, M.L.C., van Wezel, G., Raaijmakers, J.M., Medema, M.H., Garbeva, P. 2020.
Microbial and volatile profiling of soils suppressive to *Fusarium culmorum* of wheat. *Proc Biol Sci.* 2020 Feb 26;287(1921):20192527. doi: 10.1098/rspb.2019.2527. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32070256; PMCID: PMC7062018.
- Postma, J., Geraats, B.P., Pastoor, R., van Elsas, J.D. 2005.
Characterization of the Microbial Community Involved in the Suppression of *Pythium aphanidermatum* in Cucumber Grown on Rockwool. *Phytopathology.* 2005 Jul;95(7):808-18. doi: 10.1094/PHYTO-95-0808. PMID: 18943014.
- Postma, J., Nijhuis, E. 2019.
Pseudomonas chlororaphis and organic amendments controlling *Pythium* infection in tomato. *European Journal of Plant Pathology.* 10.1007/s10658-019-01743-w.
- Raaijmakers J.M., Weller D.M. 1998.
Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Mol Plant-Microbe Interact.* 11:144–152
- Sahariah, P., Måsson, M. 2017.
Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules.* 18. 10.1021/acs.biomac.7b01058.
- Schreiter, S., Ding, G.C., Heuer, H., Neumann, G., Sandmann, M., Grosch, R., Kropf, S., Smalla, K. 2014.
Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Front Microbiol.* 2014 Apr 8;5:144. doi: 10.3389/fmicb.2014.00144. PMID: 24782839; PMCID: PMC3986527.
- Shaltiel-Harpaz, L., Masaphy, S., Tsrur, L., Palevsky, E. 2016.
Biorational, Environmentally Safe Methods for the Control of Soil Pathogens and Pests in Israel. 10.1007/978-981-10-2576-1_16.
- Shukla, P. S., Mantin, E. G., Adil, M., Bajpai, S., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. 2019.
Ascomycellum nodosum-Based Biostimulants: Sustainable Applications in Agriculture for the Stimulation of Plant Growth, Stress Tolerance, and Disease Management. *Frontiers in plant science*, 10, 655. doi:10.3389/fpls.2019.00655
- Singh, R., Chinnasri, B., De Smet, L., Haeck, A., Demeestere, K., van Cutsem, P., van Aubel, G., Gheysen, L., Kyndt, T. 2019.
Systemic defense activation by COS-OGA in rice against root-knot nematodes depends on stimulation of the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology and Biochemistry.* 142. 10.1016/j.plaphy.2019.07.003
- Streminska M.A., Hollander P., de Boer A., Ayik, A., 2019.
Systeemaanpak bodemgebonden ziekten en plagen. Rapport WPR-861
- Tian, L., Zhang, W., Zhou, G.D., Li, S., Wang, Y., Yang, B., Bai, T., Fan, H., He, P., Zheng, S.J. 2023.
A biological product of *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 strain for promoting banana plant growth and modifying rhizosphere soil microbial diversity and community composition. *Front Microbiol.* 2023 Nov 2;14:1216018. doi: 10.3389/fmicb.2023.1216018. PMID: 38029129; PMCID: PMC10653307.
- Todorović, I., Moëgne-Loccoz, Y., Raičević, V., Jovičić-Petrović, J., Muller, D. 2023.
Microbial diversity in soils suppressive to *Fusarium* diseases. *Front Plant Sci.* 2023 Dec 4;14:1228749.
- Validov, S., Kamilova, F., Qi, S., Stephan, D., Wang, J.J., Makarova, N., Lugtenberg, B., 2007.
Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stonewool substrate. *J Appl Microbiol.* 2007 Feb;102(2):461-71. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03083.x. PMID: 17241352.
- Van Aubel, G., Buonatesta, R., van Cutsem, P. 2014.
COS-OGA: a novel oligosaccharidic elicitor that protects grapes and cucumbers against powdery mildew. *Crop Protection* 65: 129-137
- van Pelt J.A., van der Sluis, I., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M. 2008.
Induced systemic resistance Bioassays in *Arabidopsis thaliana*. In: Sorvari S, Pirttilä AM, editors. Prospects and applications for plant-associated microbes A laboratory manual Part A: Bacteria. BBI Piikkio; Finland: 2008. pp. 113–118
- Xu, X.-M., Jeffries, P., Pautasso, M., Jeger, M. J. 2011.
Combined Use of Biocontrol Agents to Manage Plant Diseases in Theory and Practice. *Phytopathology* 101: 1024-1031
- Yan, Y., Kuramae, E.E., de Hollander, M. *et al.* 2017.
Functional traits dominate the diversity-related selection of bacterial communities in the rhizosphere. *ISME J* 11:56–66.

Bijlage 1 Protocol beoordeling op aantasting door *F. oxysporum* in Lisianthus

Protocol - Beoordeling op aantasting door *F. oxysporum* in Lisianthus

Door *F. oxysporum* worden de vaatbundels van de plant aangetast. Dit veroorzaakt verwelking en vergeling van de plant.

Verwelking

Voor de mate van verwelking wordt een score van 0 tot en met 5 gegeven, waarbij 0 = geen aantasting en 5 = volledige aantasting (zie Figuur B1.1).

Score 0:

Geen verwelkte bladeren. Alle bladeren zijn goed op spanning. Mogelijk is een enkel blad niet op spanning, maar bij onduidelijkheid wordt er geen score hoger dan 0 gegeven.

Score 1:

De bladeren staan minder goed op spanning. Met name bij de onderste bladeren van de plant.

Score 2:

Bijna alle bladeren van de plant staan niet meer goed op spanning. Alleen de bovenste 2 tot 4 bladeren zijn niet verwelkt.

Score 3:

Bijna alle bladeren staan helemaal niet meer op spanning. De bovenste 2 tot 4 bladeren staan wel of met mindere mate op spanning.

Score 4:

Alle bladeren staan helemaal niet meer op spanning. De bladeren en de stengel worden bruin en beginnen te sterven.

Score 5:

Alle bladeren van de plant zijn helemaal bruin en gestorven. Ook de stengel is bruin en verwelkt.

Opmerking: Verwelking van de plant moet niet worden verward verminderde bladspanning door een tekort aan water. De dagelijkse watergift moet daarom zorgvuldig in de gaten worden gehouden.

Vergeling

Voor de mate van vergeling wordt een score van 0 tot en met 3 gegeven, waarbij 0 = geen vergeling en 3 = volledige vergeling.

Score 0:

Geen vergeelde bladeren. Alle bladeren zijn groen. Mogelijk is bij een enkel blad vergeling zichtbaar. Maar bij onduidelijkheid wordt er geen score hoger dan 0 gegeven.

Score 1:

Bij (bijna) alle bladeren is lichte vergeling zichtbaar. Of bij enkele bladeren is vergeling zichtbaar en de rest van de bladeren zijn groen.

Score 2:

Bij (bijna) alle bladeren is vergeling zichtbaar. Of er is bij een deel van de plant sterke vergeling en bij een deel lichte vergeling of geen vergeling zichtbaar.

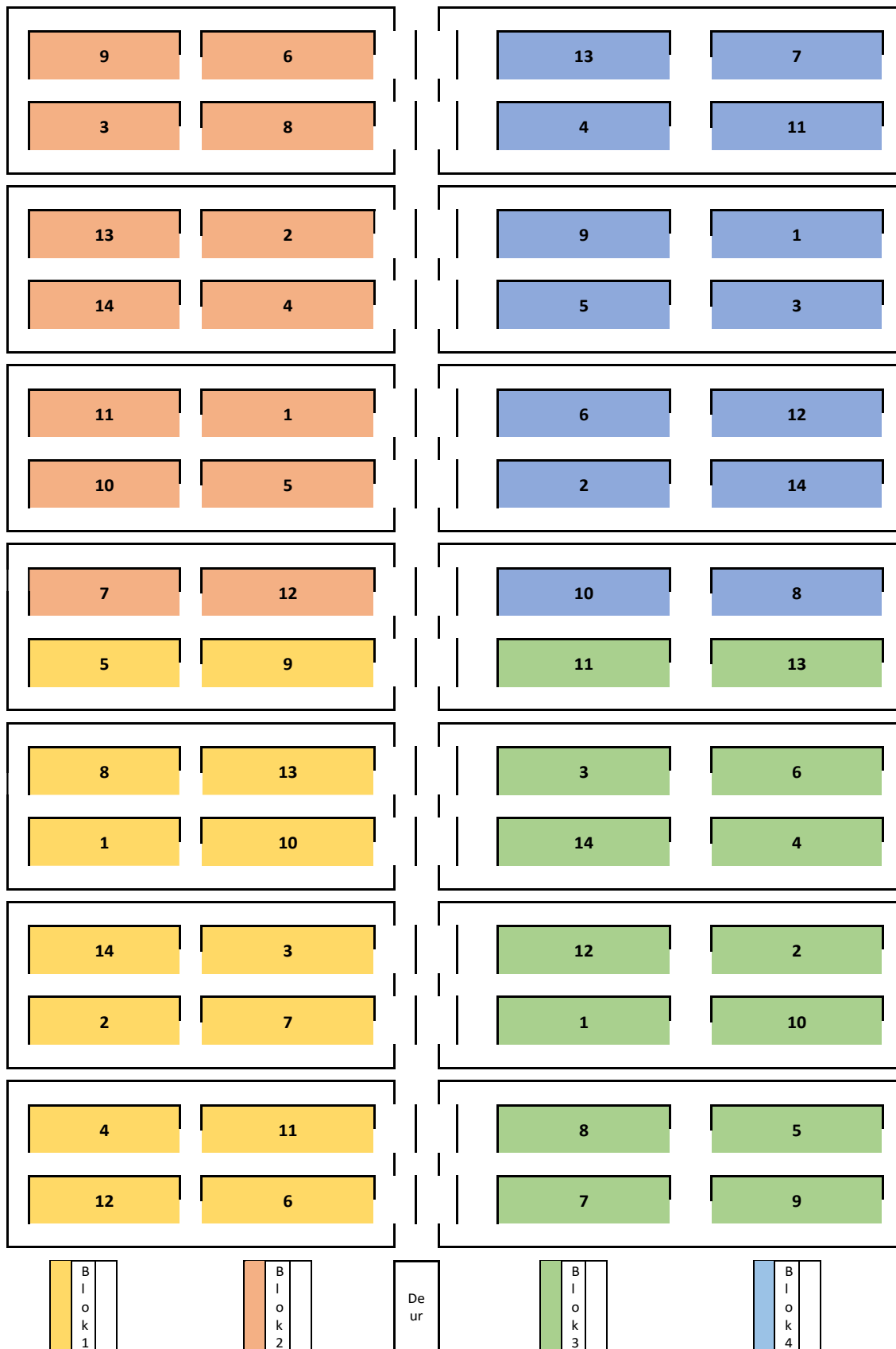
Score 3:

Bij (bijna) alle bladeren is sterke vergeling zichtbaar.



Figuur B1.1 Verwelking van lisianthus index score 0-5 (index score 0 niet weergegeven).

Bijlage 2 Plattegrond lisianthus proef 2020

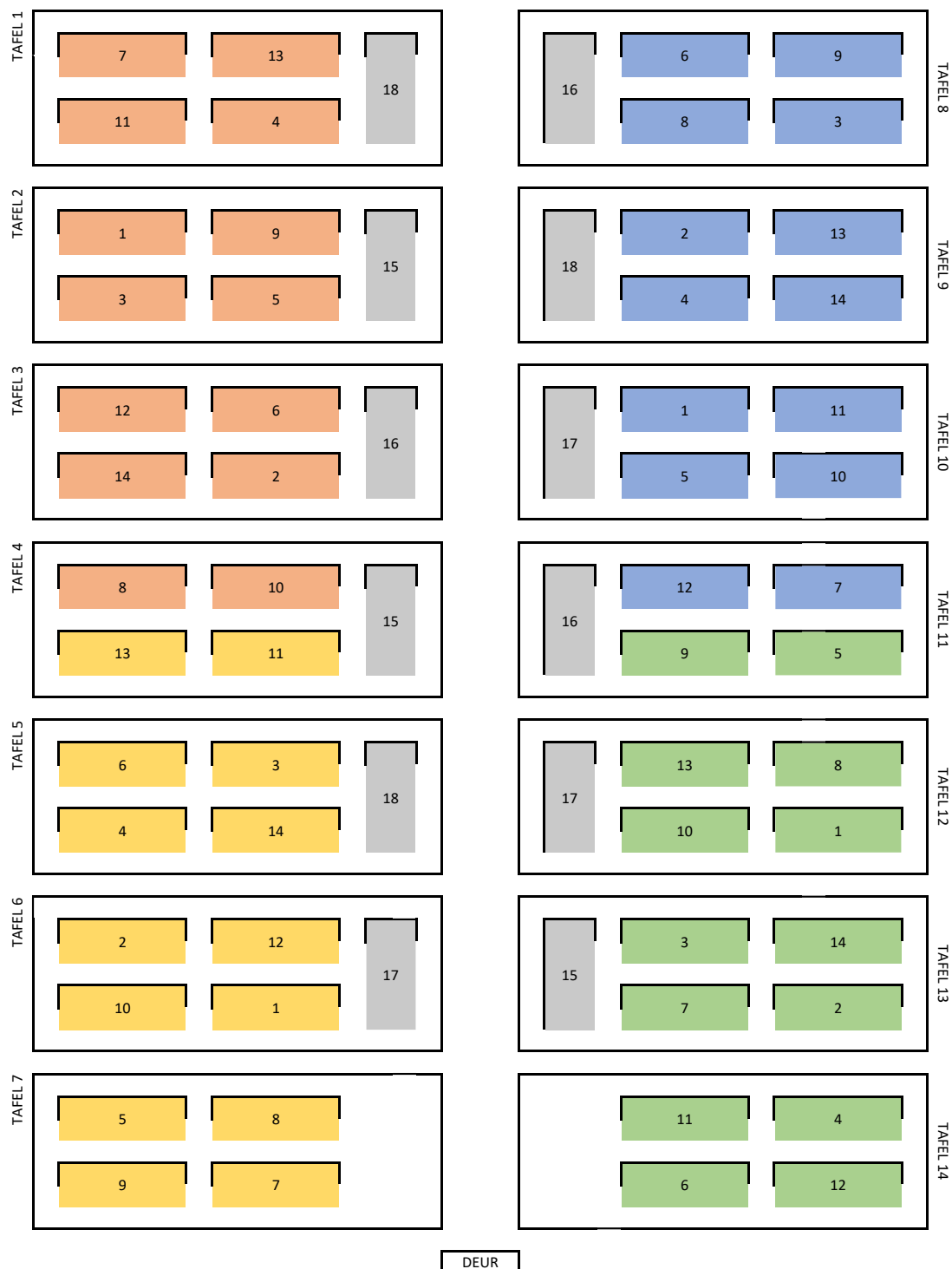


Bijlage 3 Resultaten grondvoorraad lisianthus proef 2020

Grondvoorraad lisianthusproef 2020

Meeting	Eenheid	Controle grond	0.1% chitine	5% Biochar	Trianum G
N-totale bodemvoorraad	kg N/are	105	100	100	95
C/N-ratio		14	14	15	15
N-leverend vermogen	kg N/are	1.5	1.49	1.33	1.32
S-totale bodemvoorraad		27	31	30	30
C/S-ratio		54	47	49	49
S-leverend vermogen	kg S/are	0.45	0.45	0.45	0.45
P-bodemvoorraad	kg P/are	27	27	28	28
K-bodemvoorraad kg K/are	kg K/are	22.9	23.2	25.9	24
Ca-bodemvoorraad	kg Ca/are	167	165	158	166
Mg-bodemvoorraad	kg Mg/are	21.9	21.2	23.2	25.4
Na-bodemvoorraad	kg Na/are	3.9	4	4.1	4.3
Zuurgraad (pH)		7.2	7.2	7.2	7.2
C-organisch	%	6.1	5.9	6	6.1
Organische stof	%	12.2	12.3	11.8	12.7
C/OS-ratio		0.49	0.48	0.51	0.48
Koolzure kalk	%	2.6	2.5	2.8	3
Klei (<2 µm)	%	22	23	21	23
Silt (2-50 µm)	%	46	43	44	44
Zand (>50 µm)	%	17	19	20	17
Klei-humus (CEC)	mmol+/kg	448	441	433	462
CEC-bezetting % 100 > 95	%	100	100	100	100
Ca-bezetting % 77 75 - 85	%	77	77	74	74
Mg-bezetting % 17 6,0 - 10	%	17	16	18	19
K-bezetting % 5,4 2,0 - 5,0	%	5.4	5.5	6.2	5.5
Na-bezetting % 1,6 1,0 - 1,5	%	1.6	1.6	1.7	1.7
H-bezetting % < 0,1 < 1,0	%	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Al-bezetting % < 0,1 < 1,0	%	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Verkruijmbaarheid	rapportcijfer	8.1	8	8.1	8.1
Verslumping	rapportcijfer	7.2	7.1	7.2	7.2
Microbiële biomassa	mg C/kg	725	549	362	712
Microbiële activiteit mg	mg N/kg	92	95	55	88
Schimmel/bacterie-ratio		0.5	0.6	0.3	0.6

Bijlage 4 Plattegrond lisianthus proef 2021



Bijlage 5 Resultaten grondvoorraad en uitgebreide grondanalyse lisianthus proef 2021

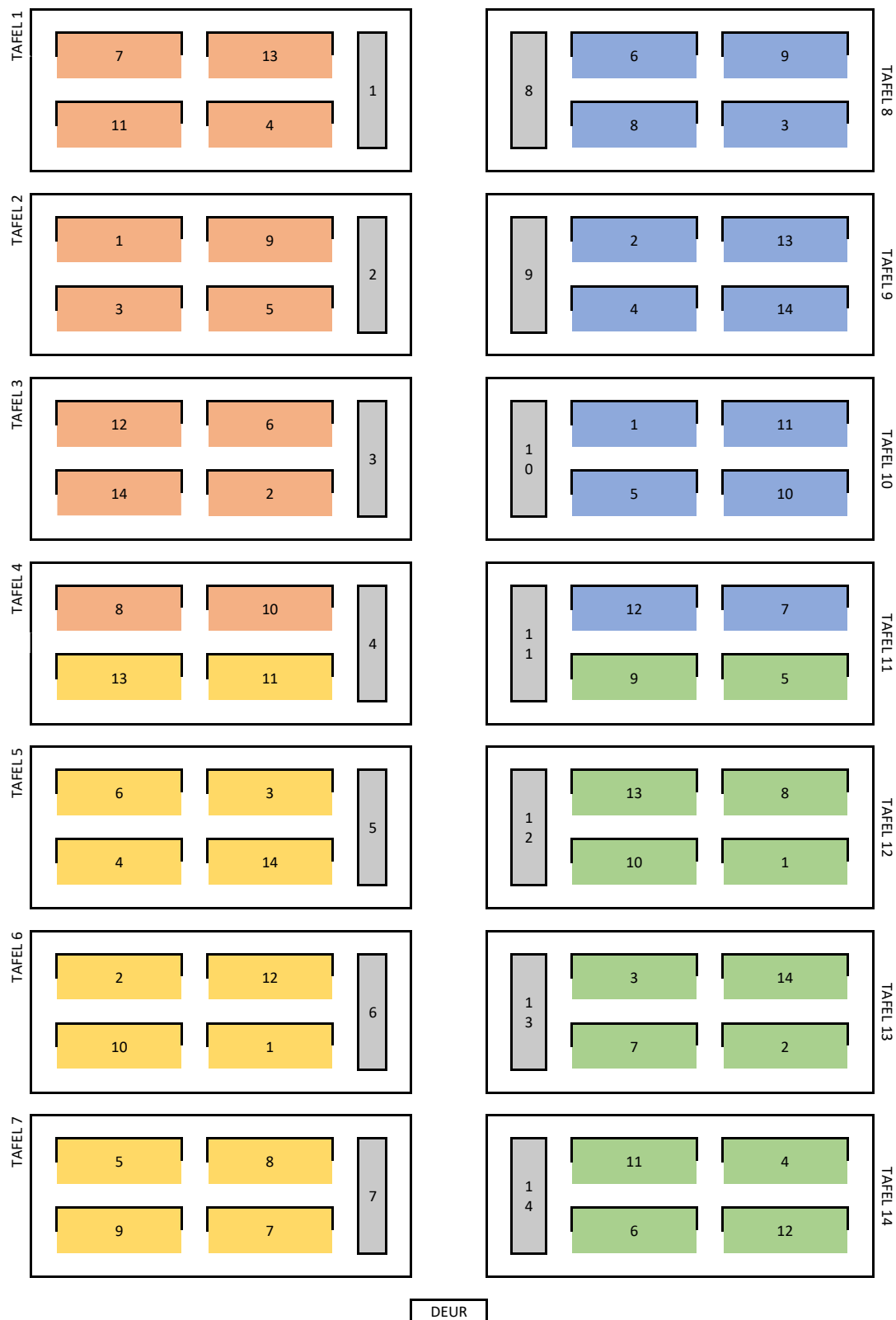
Grondvoorraad lisianthusproef 2021

Meeting	Eenheid	Controle grond	0.1% chitine	1% Biochar	1% champost
N-totale bodemvoorraad	kg N/are	110	110	105	115
C/N-ratio		16	16	18	16
N-leverend vermogen	kg N/are	1.38	1.41	1.16	1.43
S-totale bodemvoorraad		19	18	20	18
C/S-ratio		93	96	97	103
S-leverend vermogen	kg S/are	0.19	0.17	0.19	0.15
P-bodemvoorraad	kg P/are	18	18	18	19
K-bodemvoorraad kg K/are	kg K/are	16.9	16.4	17.1	19.9
Ca-bodemvoorraad	kg Ca/are	169	177	163	168
Mg-bodemvoorraad	kg Mg/are	24.5	22.3	23.6	25.6
Na-bodemvoorraad	kg Na/are	2.7	2.7	3.0	3.1
Zuurgraad (pH)		6.7	6.7	6.7	6.8
C-organisch	%	7.5	7.7	8.4	7.7
Organische stof	%	14.4	15.0	15.8	14.5
C/OS-ratio		0.52	0.51	0.53	0.53
Koolzure kalk	%	0.9	0.9	1.2	1.1
Klei (<2 µm)	%	30	20	19	20
Silt (2-50 µm)	%	32	36	37	32
Zand (>50 µm)	%	33	28	27	32
Klei-humus (CEC)	mmol+/kg	469	481	463	476
CEC-bezetting % 100 > 95	%	100	100	99	100
Ca-bezetting % 77 75 - 85	%	77	79	76	75
Mg-bezetting % 17 6,0 - 10	%	18	16	18	19
K-bezetting % 5,4 2,0 - 5,0	%	3.9	3.7	4.1	4.6
Na-bezetting % 1,6 1,0 - 1,5	%	1.1	1.0	1.2	1.2
H-bezetting % < 0,1 < 1,0	%	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Al-bezetting % < 0,1 < 1,0	%	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Verkruimelbaarheid	rapportcijfer	8.4	8.5	8.6	8.4
Verslumping	rapportcijfer	8.1	8.2	8.7	8.1
Microbiële biomassa	mg C/kg	424	650	403	512
Microbiële activiteit	mg N/kg	51	70	27	71
Schimmel/bacterie-ratio		0.4	0.4	0.2	0.7

Grondanalyse (1:2 extract) *Lisianthus* proef 2021

Meting	Eenheid	controle grond	0.1% chitine	1% Biochar	1% champost
EC	(mS/cm)	1.3	1.4	1.4	1.7
pH		6.6	6.7	6.8	6.7
NH4	mmol	0.1	0.4	0.2	0.2
K	mmol	2.1	2	2.2	2.5
Na	mmol	0.8	0.7	1.1	0.9
Ca	mmol	3.6	3.7	3.7	4.6
Mg	mmol	1.1	1.2	1.2	1.4
NO3	mmol	6.3	6.7	6.4	7.6
Cl	mmol	1.1	1.2	1.5	1.7
SO4	mmol	1.6	1.7	1.8	2.4
HCO3	mmol	0.1	0.1	0.1	0.1
P	mmol	0.19	0.15	0.19	0.2
Si	mmol	0.26	0.24	0.26	0.25
Fe	μmol	3.6	3.3	3.4	4
Mn	μmol	31	31	30	38
Zn	μmol	0.7	0.3	0.3	0.5
B	μmol	23	21	23	23
Cu	μmol	0.5	0.3	0.3	0.3
Mo	μmol	1.5	1.2	1.3	1.3

Bijlage 6 Plattegrond lisanthus proef 2022

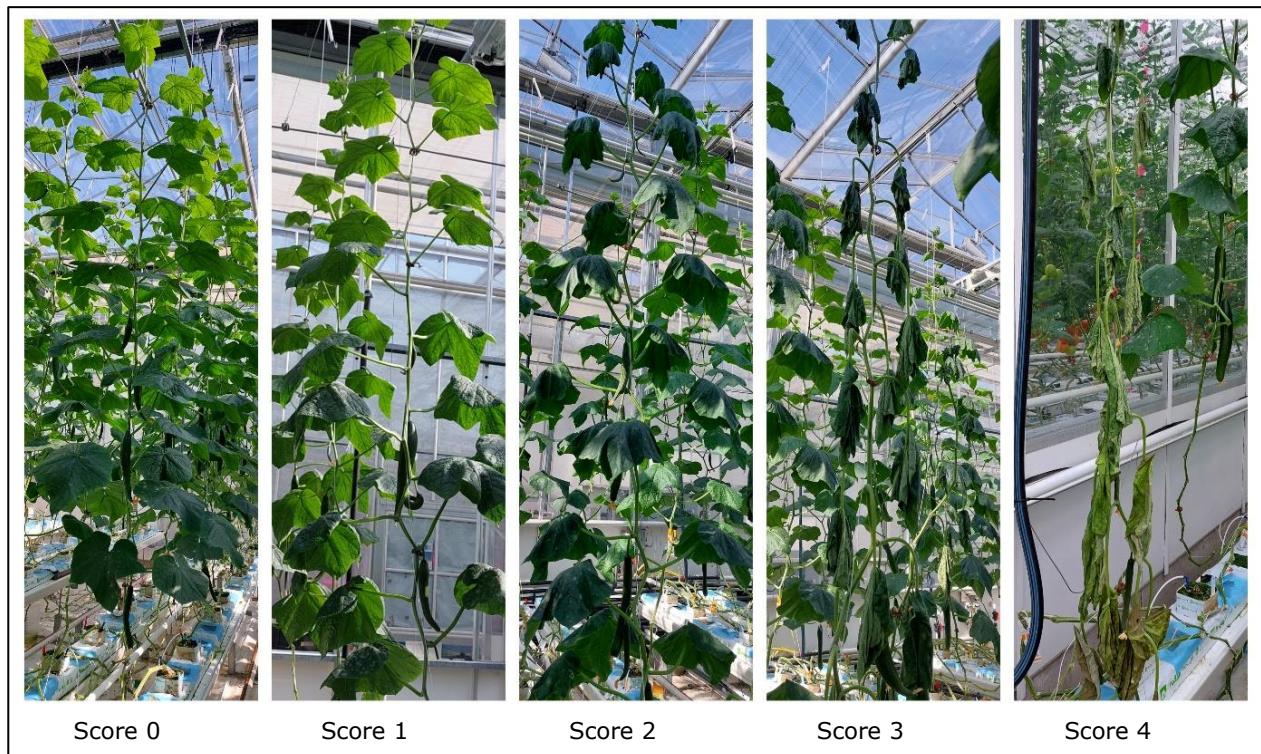


Bijlage 7 Resultaten grondvoorraad en uitgebreide grondanalyse lisianthus proef 2022

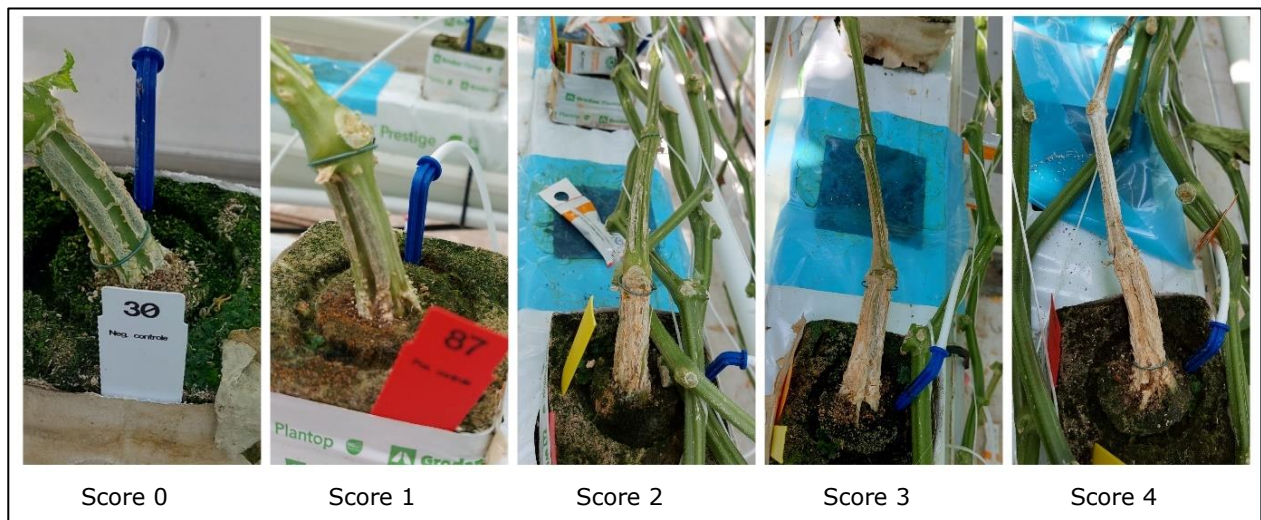
Meting	eenheid	controle	1% champost	1% champost steriel	champostthee	1% Biochar	1% Vermicompost	1% Biochar+ 1% Vermicompost	1% Biochar+ 1% champost
CaCO ₃	%	1.2	0.8	1	1.2	1.1	1	1.7	0.9
LUT2	%	18	23	18	19	18	17	13	20
C_N ratio		15	17	16	18	19	16	18	18
pH_CaCl ₂		7.2	7	7.1	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
Org. stof	%	20.9	21.2	22	24.6	22.4	22.3	21.6	25.7
Klei_humus	(mmol/kg)	551	533	568	619	575	539	520	627

	1 Controle	2 Champost	3 Champost steriel	4 Champostthee	5 Biochar	6 Vermicompost	7 Biochar+Vermicompost	8 Biochar+champost
EC(mS/cm)	0,9	1,2	1,7	0,9	1,0	0,8	0,9	1,2
pH	7,2	7,0	7,1	7,2	7,1	7,1	7,1	7,2
NH ₄ (mmol)	1,1	1,7	2,9	1,2	0,9	0,6	0,7	1,0
K(mmol)	1,7	2,7	3,8	1,8	1,8	1,8	1,7	2,1
Na(mmol)	1,3	1,7	2,3	1,3	1,7	1,2	1,4	2,0
Ca(mmol)	1,4	1,8	2,6	1,4	1,7	1,2	1,4	2,3
Mg(mmol)	0,6	1,0	1,4	0,7	0,9	0,6	0,7	1,2
NO ₃ (mmol)	1,0	1,3	1,5	1,1	0,9	1,0	0,8	0,8
Cl(mmol)	2,2	2,7	3,9	2,4	2,5	2,1	2,3	3,3
SO ₄ (mmol)	1,5	2,8	4,3	1,6	2,2	1,3	1,6	3,0
HCO ₃ (mmol)	0,4	0,4	0,7	0,5	0,3	0,5	0,4	0,5
P(mmol)	0,2	0,5	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
Si(mmol)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Fe(μmol)	14,0	9,2	5,5	11,0	12,0	9,8	15,0	6,7
Mn(μmol)	2,9	2,4	3,7	3,7	2,7	3,4	3,6	2,4
Zn(μmol)	2,5	2,7	2,6	2,6	3,6	2,4	2,5	3,7
B(μmol)	14,0	17,0	17,0	14,0	16,0	15,0	15,0	15,0
Cu(μmol)	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4
Mo(μmol)	3,0	2,3	2,7	3,2	2,5	3,1	3,1	2,9

Bijlage 8 Protocol beoordeling op aantasting door *F. oxysporum* in komkommer

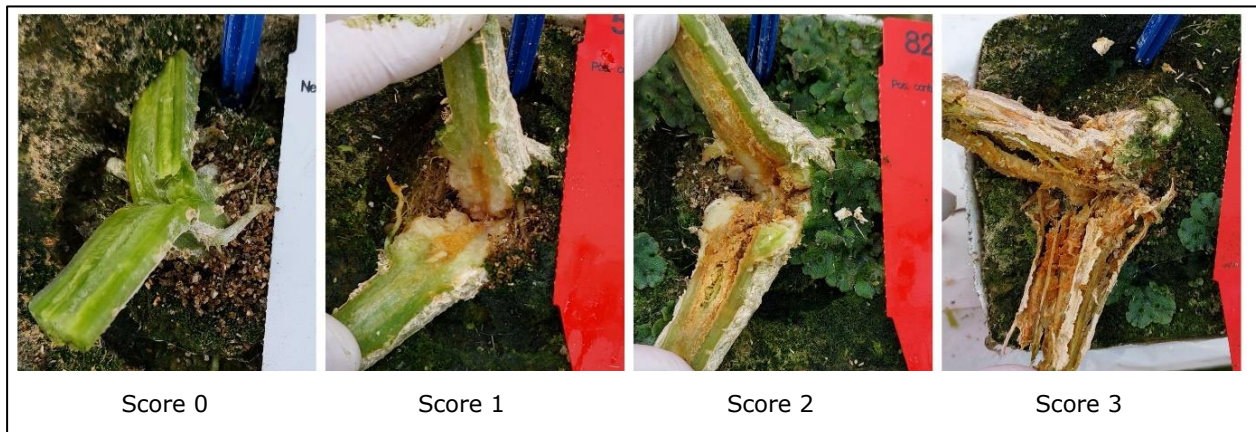


Figuur B8.1 Score 0-4 voor mate van verwelking van komkommer.



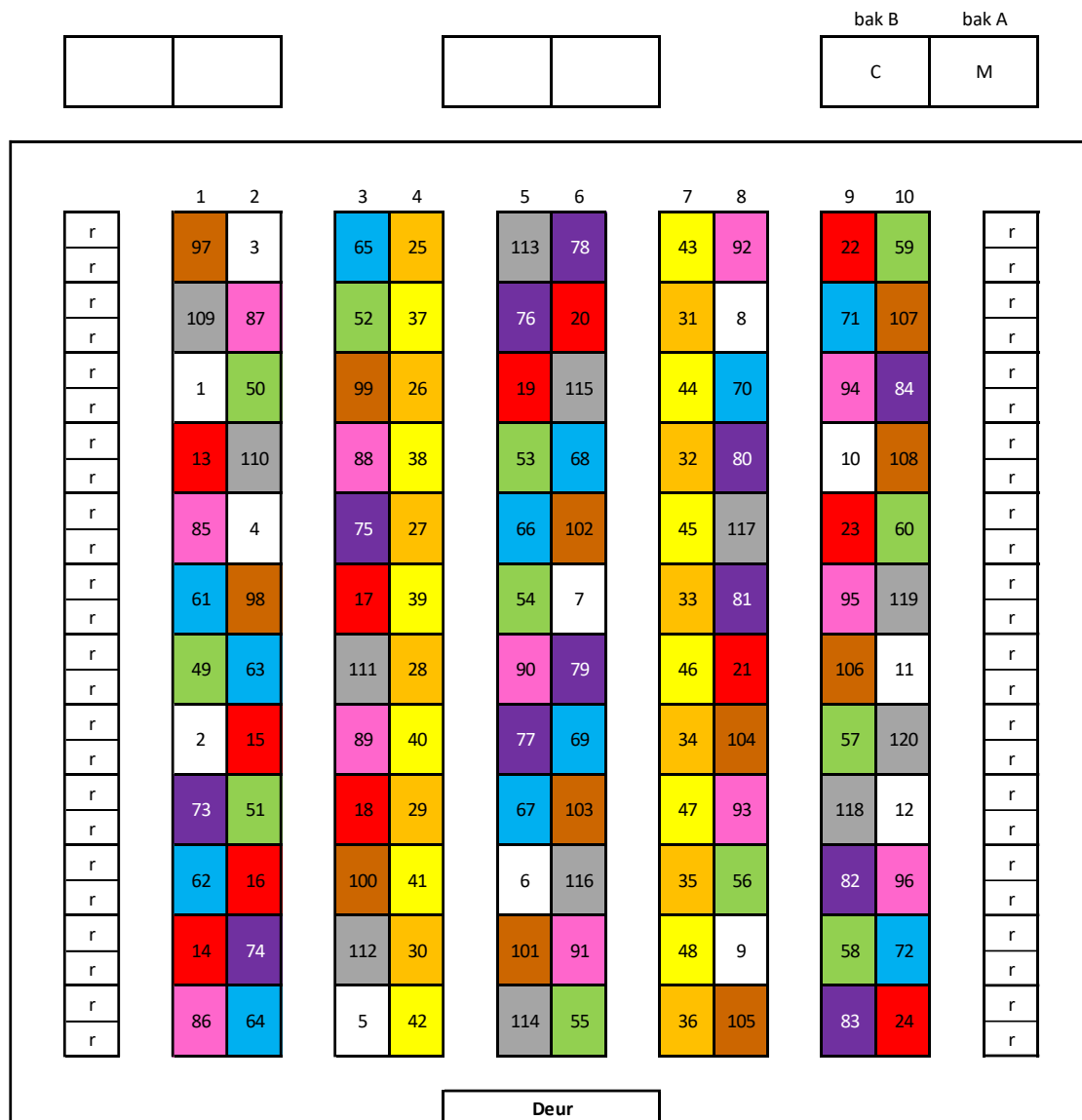
Figuur B8.2 Score 0-4 voor mate van aantasting door *Fusarium oxysporum* aan buitenkant stengel van komkommer.

Daarnaast is de Percentage Disease Incidence (PDI) berekend. Dit is het percentage planten met een ziektesymptoom binnen een behandeling. Aan het eind van de proef zijn naast de wekelijkse beoordelingen ook de binnenkant van de stengels en aantasting van de wortels beoordeeld. Voor beide beoordelingen is een score van 0 (gezond) t/m 3 (volledige aantasting) gegeven.



Figuur B8.3 Score 0-3 voor mate van aantasting door *Fusarium oxysporum* aan het binnenkant van de stengel van komkommer.

Bijlage 9 Plattegrond komkommer proef 1



Nr.	Behandeling	Fusarium	Steeketiket
1	Negatieve controle	-	Wit
2	Positieve controle	+	Rood
3	Champostthee (2%)	+	Oranje
4	Champostthee (2%) + champost	+	Geel
5	Champost	+	Groen
6	Fusarium Fo47	+	Blauw
7	B. velezensis FZB42	+	Paars
8	Trichoderma afroharzianum T22	+	Roze
9	Trichoderma asperellum T34	+	Bruin
10	Streptomyces k61	+	Grijs

r = randplant
M = minerale voeding
C = champostthee

Kas met komkommer op steenwol

Inoculatie met Fusarium; minerale voeding

12 m goten = 12 matten (1 m) in librabakken/goot = 24 planten/goot

Bijlage 10 Samenstelling komkommervoeding

Voedingsoplossing SUBSTRAFEED

Standaard EC : 2.2
Gewenste EC : 2.2

Gewas : Komkommer in steenwol
Datum : 09-11-2021 12:31:06
Naam : Evele003
Ingestelde pH : 5.5 (standaard)

Hoeveelheden per m3	Oplossing mmol in bak	Correctie mmol
1 kalisalpetierzuur (NITRAKAL) : 0.552 l	NH4 : 1.250	0.000
2 kalizwavelzuur (ZWAKAL) : 0.347 l	K : 8.000	0.000
3 kalifosforcarbonaat (BFK) : 0.368 l	Ca : 4.000	0.000
4 kalicarbonaat (BASKAL) : 0.406 l	SO4 : 1.375	0.000
5 Reserve (reserve) : 0.000 l	SO4 : 0.000	0.000
6 kalksalpeter (CALSAL) : 0.855 l	Mg : 1.375	0.000
7 magnesiumnitraat (MAGNITRA) : 0.244 l	NO3 : 16.000	0.000
8 ammoniumnitraat (AMNITRA) : 0.157 l	P : 1.250	0.000
9 Calciumchloride (CaCl2) : 0.000 l	SO4 : 0.000	0.000
10 ijzerchelaat DTPA 6% : 0.375 l	Fe : 15.000	0.000
11 borax : 1.000 l	B : 25.000	0.000
12 kopersulfaat : 0.500 l	Cu : 0.750	0.000
13 natriummolybdaat : 0.500 l	Mo : 0.500	0.000
14 zinksulfaat : 1.000 l	Zn : 5.000	0.000
15 mangaansulfaat : 1.000 l	Mn : 10.000	0.000

OPMERKINGEN:

Dit is een evaluatieversie i.v.m. toevoegen CaCl2.

Voedingsoplossing in de mestunit ingevoerd door:

Naam :

Datum :

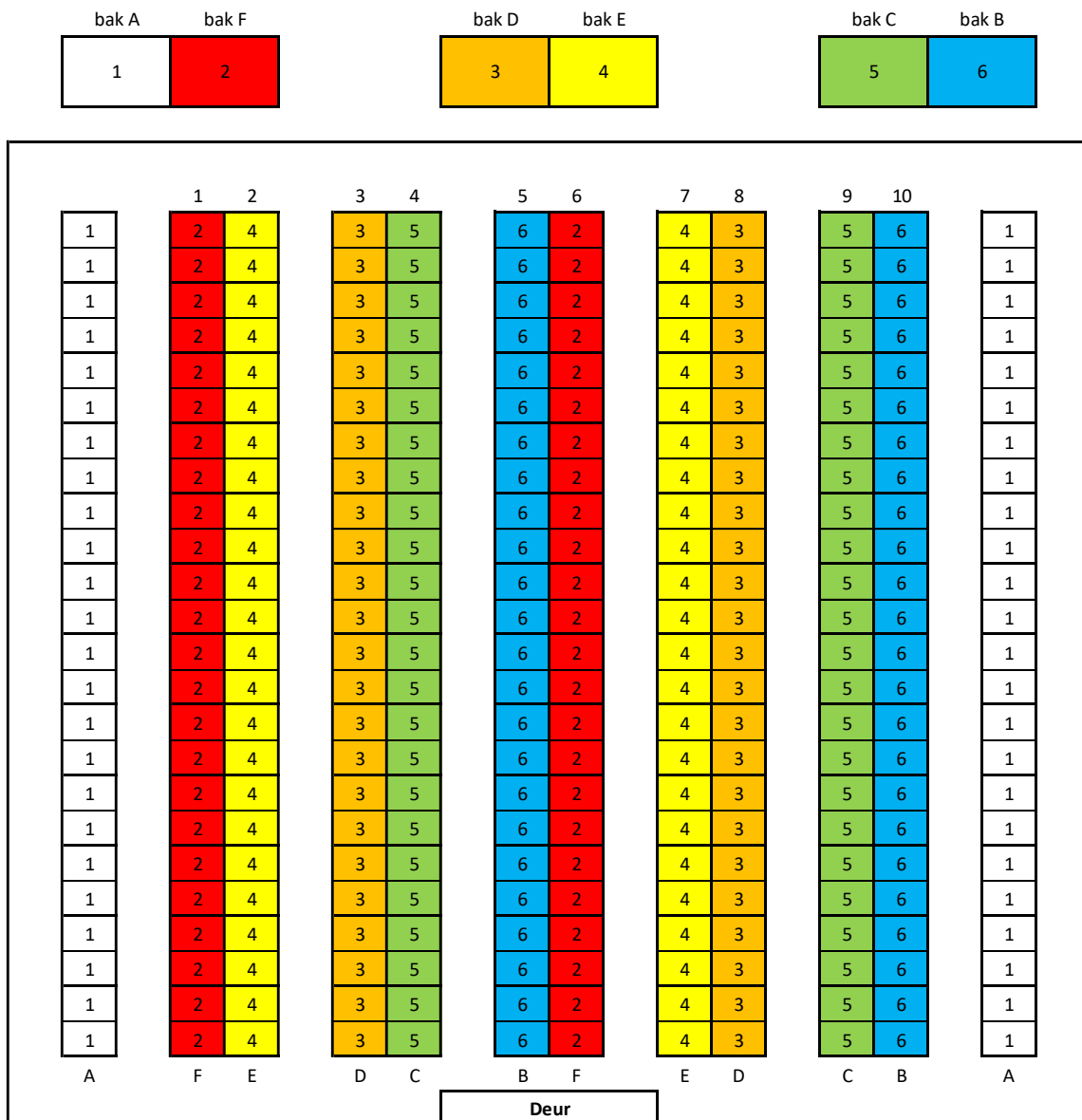
Paraaf:

Laatste update: 05/01/2009 door F. Steinbuch.

WUR/ICTIS stelt zich niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij het gebruik van de berekende gegevens

Figuur B10.1 Samenstelling komkommervoeding.

Bijlage 11 Plattegrond komkommer proef 2



Nr.	Behandeling	Fusarium	Steeketiket	Bak
1	Negatieve controle	-	Wit	A
2	Positieve controle	+	Rood	F
3	Champosthee (2%) + champost	+	Oranje	E
4	Biochar	+	Geel	D
5	Fusarium Fo47	+	Groen	C
6	Trichoderma asperellum T34	+	Blauw	B

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



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

Rapport WPR-1410



De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 7.700 medewerkers (7.000 fte), 2.500 PhD- en EngD-kandidaten, 13.100 studenten en ruim 150.000 Leven Lang Leren-deelnemers behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.
