

Versterking van plantweerbaarheid tegen ziekten en plagen door aanpassing van het plant microbioom

Leo van Overbeek, Marie Duhamel en Stefan Aanstoot

Wageningen University & Research

Wageningen, April 2023

Voorwoord

Gepresenteerd onderzoek komt voort uit het publiek-private samenwerkingsproject getiteld ‘Versterking van plant-weerbaarheid tegen ziekten en plagen door aanpassing van het plant microbiom’, uitgevoerd binnen de topsector Tuinbouw en Uitgangsmaterialen (T&U) onderzoeksprogrammering onder TKI nummer 1605 041. In dit project is samengewerkt met LTO Noord Glaskracht, Stichting Programmafonds Glastuinbouw, Stichting Chrysant NL, Incotec Holding BV, Enza Zaden Research and Development BV, BEJO Zaden BV en Stichting Wageningen Research, onderdeel van Wageningen University and Research, als uitvoerend instituut. Het gepresenteerde onderzoek is een overzicht van het volledige project. Delen van het onderzoek zal nog worden gepubliceerd in een internationaal wetenschappelijk tijdschrift. Om deze reden moet dit rapport nog als vertrouwelijk worden behandeld.

Samenvatting

Producten op basis van micro-organismen worden steeds vaker toegepast in de land en tuinbouw. De resultaten van deze microbiologische middelen variëren, afhankelijk van de omstandigheden waaronder ze worden toegepast. Om meer grip te krijgen op de werkzaamheid van microbiologische middelen is fundamentele kennis over werkingsmechanismen en interacties met de plant noodzakelijk. Het plant-microbioom, dat alle microbiële levensgemeenschappen die geassocieerd zijn met de plant omvat, is nog een onbekende factor in de toepassingsmogelijkheden van microbiologische middelen. Om deze reden is de interactie van taxonomisch uiteenlopende micro-organismen met het plant-microbioom en metaboolom onderzocht, met als doelstelling om de relatie vast te stellen tussen microbioom-samenstelling en weerbaarheid tegen ziekte en plaag veroorzakende organismen. In de aanpak is gekozen voor 10 microbiële stammen bestaande uit bacteriën en schimmels die in eerste instantie zijn toegepast op tomatenplanten en waarvan in tweede instantie een selectie van vier stammen zijn toegepast op sla en chrysantenplanten. Als model ziekte en plaag veroorzakende organismen (belagers) is gekozen voor *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Tomaat) en *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (sla) en Californische trips (chrysant). Via microbioom (bacteriën en schimmels) en secundaire metaboolom analyses zijn de interacties tussen de microbiële stammen en de modelplanten vastgesteld in aanwezigheid en afwezigheid van de respectievelijke belagers. Alle microbiële stammen waren in staat om de modelplanten endofytisch te koloniseren en met uitzondering van *Pseudomonas putida* stam P9 in chrysant, hadden alle stammen een aantoonbaar (statistisch significant) effect op de microbioom en/ of metaboolom-samenstelling van de modelplanten. Twee stammen bij uitstek waren opvallend in hun interacties met de modelplanten: *Isaria javanica* FE9901 en *P. putida* P9. Na toediening had stam FE9901 een effect op de microbioom-samenstelling van alle drie de plantensoorten en kan zodanig als een universele microbioom-inducer worden aangemerkt. Stam P9 daarentegen beïnvloedde de secundaire metaboolom-samenstelling van tomaten en sla planten en daarmee gecorreleerd beperkte het de initiële groei van beide plantensoorten, maar verhoogde het de weerbaarheid tegen *F. oxysporum*. Omdat de microbiële stammen via grond aan de planten werden toegediend, is ook de mogelijkheid van zaadcoating als toedieningswijze onderzocht met twee stammen, P9 en *Trichoderma viride* TV02. Zaadcoating versterkte het weerbaarheids-effect van stam P9 in tomatenplanten, maar de overlevingsduur op tomaten en slazaden was beperkt. Verbetering van de overlevingsduur van microbiële preparaten op zaad is noodzakelijk om toepassingsmogelijkheden te verbeteren. Uit het onderzoek concluderen we dat er weliswaar aantoonbare effecten van biologische preparaten zijn op microbioom en metaboolom-samenstelling van planten, maar dat het nog niet duidelijk is wat de consequenties van deze veranderingen zijn op plant-weerbaarheid tegen ziekte en plaag-veroorzakende organismen en dit verdient aandacht in vervolgonderzoek.

Summary

Microbial agents are frequently applied in agriculture and horticulture. The effects of these agents on plants are not always consistent, and variation depend on the practical circumstances they are applied. It is therefore necessary to gain more fundamental insight in the mode of action of microbial agents in their interactions with plants. The plant microbiome, encompassing all microbial communities associated with plants, is still a relatively unexplored aspect in the application of microbial agents. For this reason, the interaction of 10 microbial strains, representing taxonomically diverse groups, on plant microbiome and metabolome composition was investigated in three model plant species, i.e. tomato, lettuce and chrysanthemum, with the purpose to establish the relationship between microbiome composition and plant resilience against pest and disease causing agents. The impact of the 10 microbial strains was first evaluated on tomato plants and, in a later stage, on lettuce and chrysanthemum plants, using a selection of four strains. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (tomato) and f. sp. *lactucae* (lettuce) and *Frankliniella occidentalis* (chrysanthemum) were used as plant damage-causing agents and via microbiome and secondary metabolome analyses the impact of the 10 strains on the three model plants was investigated, either in the absence or presence of these damage-causing agents. All microbial agents were recovered from surface-sterilized plants and thus all were shown to endophytically colonize plants. With the exception of *Pseudomonas putida* strain P9 in chrysanthemum plants, all microbial strains had an impact on microbiome and/ or metabolome composition upon application to the three model plants. Two strains were specific in their interactions with the model plants: *Isaria javanica* FE9901 and *P. putida* P9. Strain FE9901 had an impact on microbiome composition in all three plant species, upon application, and therefore this strain can be classified as a ‘universal microbiome inducer’. This contrasting strain P9 that impacted, upon application, for a large deal the secondary metabolomes of tomato and lettuce plants. The observed metabolome shifts in both plant species correlated with reductions in initial plant growth, but also in increases in resilience towards *F. oxysporum*. Because the microbial strains were applied to soil under the experimental circumstances, an alternative option for plant inoculation via seed coating was investigated with two strains, strain P9 and *Trichoderma viride* TV02. Via seed coating, the effect of strain P9 on resilience in tomato plants was more obvious than with soil drenching, although the survival time of both strains on the seeds was short, which may hamper further practical applications of the two strains. Improvement of the survivability of both strains on coated seeds would benefit to further practical application of microbial agents. From conducted research we concluded that, upon application to plants, clear and significant effects of the 10 strains were present on the microbiome and metabolome composition. However, about the consequences of these compositional shifts on plant resilience towards biotic stresses nothing is clear yet and this will require attention for further research.

Rapportgegevens

Projectnummer: TU1605 041

Dit project / onderzoek is mede tot stand gekomen door de bijdrage van Topsector T&U, BEJO Zaden BV, Enza Zaden Research and Development BV, Incotec Holding BV, LTO Noord Glaskracht, Stichting Chrysant NL en Stichting Programmafonds Glastuinbouw.



T&U-Board
Bezuidenhoutseweg 12
NL - 2594 AV Den Haag
Postbus 93002
NL - 2509 AA Den Haag
T 070 3490301
info@topsectorTU.nl
www.topsectorTU.nl



Stichting
Programmafonds
Glastuinbouw



ENZA ZADEN



Disclaimer

© 2023 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Bio-interacties en Plantgezondheid, Postbus 69, 6700AB Wageningen T 0317 48 06 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104

BTW nr.: NL 8113.83.696.B07

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

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

Adresgegevens

Wageningen University & Research

Business unit Bio-interacties en Plantgezondheid

Postbus 69, 6700AB, Wageningen

Droevendaalsesteeg 1, gebouw 107, Wageningen

T +31 (0)317 - 48 06 06

leo.vanoverbeek@wur.nl

<https://www.wur.nl/en/Research-Results/Research-Institutes/plant-research/Biointeractions-Plant-Health.htm>

Inhoudsopgave

1. Inleiding	7
1.1 Achtergrond over het plant-microbioom	7
1.2 Analyse van het microbiom in interactie met de plant	8
1.3 Aanpak van het onderzoek	9
1.4 Doelstellingen en afbakening van het onderzoek	11
2. Methode van onderzoek	12
2.1 Proefopzet en analyse	12
2.2 Criteria voor beoordeling van BA's op interactie met planten	14
2.3 Coaten en pileren van tomaten en slazaden met stammen TV02 en P9	15
3. Resultaten	17
3.1 Plant-kolonisatie door BA's	17
3.2 Effect van plantbehandelingen met belagers	18
3.3 Interactie van BA op het plant-microbioom en metabooloom	18
3.4 Tomatenzaadbehandelingen met stammen TV02 en P9	21
4. Discussie en conclusies	22
4.1 Discussie	22
4.2 Conclusies	24
Literatuur	25
Dankwoord	27

1. Inleiding

1.1. Achtergrond over het plant-microbioom.

Planten leven in associatie met bacteriën en schimmels en deze micro-organismen spelen een belangrijke rol bij de groei en ontwikkeling van planten. Een klein deel van de plant-geassocieerde micro-organismen hebben een nadelige invloed op plantengroei en ontwikkeling, en kunnen zelfs ziekten veroorzaken. Een ander deel stimuleert juist groei en ontwikkeling van planten, verbetert de opname van voedingsstoffen uit de bodem en onderdrukt veroorzakers van ziekte en plagen. Tenslotte is van een groot deel van de groep van plant-geassocieerde micro-organismen niet bekend wat hun relatie met de plant is en deze groep wordt dan ook vaak aangeduid als ‘commensalen’. Gezamenlijk vormen deze drie groepen het plant-microbioom, oftewel de microbiële levensgemeenschappen die geassocieerd zijn met planten. Het plant-microbioom strekt zich uit van de rhizosfeergrond (grond die nog wordt beïnvloed door plantenwortels via exudatie) tot wortel, stengel en blad oppervlakten en inwendige weefsels van planten. Bacteriën en schimmels die tenminste een deel van hun levenscyclus doorbrengen in planten worden endofyten genoemd (Hardoim e.a., 2015).

Binnen het plant-microbioom vinden er voortdurend interacties plaats tussen micro-organismen en de plant en tussen micro-organismen onderling. Dit zorgt ervoor dat er een stabiele toestand ontstaat tussen plant en microbioom en bij verstoring van deze balans kunnen de micro-organismen die een nadelige invloed hebben op de plant de overhand krijgen. Hierdoor groeien planten minder goed en worden ze vatbaarder voor belagers. Wanneer de plant zich belaagd voelt, dan zal die zich gaan verdedigen (Pieterse e.a. 2014). Met behulp van aangeboren verdedigingsmechanismen zullen planten stoffen aanmaken die ervoor zorgen dat het voor belagers moeilijker wordt om de plant binnen te dringen, te verzwakken, en te doden.

In gewasproductie wordt gebruik gemaakt van micro-organismen als actieve componenten in producten die een direct effect hebben op belagers en dit kan gaan: 1) door productie van stoffen die toxisch zijn voor de belager, 2) door concurrentie om dezelfde (essentiële) voedingsstoffen, of 3) door parasiteren op de belager (hyperparasitisme), en deze producten vallen onder de categorie van biologische bestrijdingsmiddelen (Köhl e.a., 2019). Dan wordt er gebruik gemaakt van micro-organismen die een indirect effect hebben op plantbelagers via activatie van plantverdediging-mechanismen en deze micro-organismen vallen onder de categorie van ‘elicitors’. Tenslotte is er een groep van micro-organismen die de plant ondersteunen in groei en ontwikkeling door verbeterde voedselopname of verhoogde weerbaarheid tegen uitwendige stressfactoren en deze groep van micro-organismen vallen onder de categorie van

‘biostimulanten’. Microbiologische stammen behorend tot deze drie categorieën worden in dit rapport ‘biologische agentia’ (BA) genoemd.

Bij de toepassing van BA’s worden vaak wisselende resultaten bereikt en het is niet altijd duidelijk wat daar de oorzaak van is. Gebrekkige groei of vestiging in, of rondom planten kan leiden tot sterfte of inactiviteit van de BA waardoor het niet meer werkzaam is (van Overbeek e.a., 1994). Weliswaar zijn er mogelijkheden om de werkzaamheid van BA’s te verbeteren, bijvoorbeeld door formulering en/ of toedieningswijze. Echter, over de rol van het plant-microbioom in relatie tot de toepassing van BA’s is nog weinig bekend en het is aannemelijk dat BA’s in behandelde planten het microbioom beïnvloeden. Er is namelijk eerder aangetoond dat de toepassing van een endofytische bacterie (*Pseudomonas putida* P9, die ook werd toegepast in dit project) leidde tot een verandering in microbioom-samenstelling (Andreote et al., 2009). Het was echter niet verder onderzocht wat het effect van het veranderde microbioom was op de plant en of deze waargenomen verschuiving in microbioom-samenstelling leidde tot een positieve balans tussen gunstige en nadelige micro-organismen of juist andersom tot een negatieve balans waarbij (opportunistische) pathogenen de overhand krijgen. Uit ongepubliceerd onderzoek met stam P9 in aardappelplanten bleek ook dat er een verandering plaatsvond in de chemische samenstelling van de plant. Vandaar de hypothese die werd getoetst in dit project, namelijk dat het microbioom en de fysiologische toestand van de plant gestuurd kan worden door behandelingen met BA’s. Deze aanname wordt verder uitgewerkt met een taxonomisch diverse groep van microbiële stammen bij verschillende plantensoorten.

1.2 Analyse van het microbioom in interactie met de plant

Technologische ontwikkeling op het gebied van DNA sequentie analyse maakt het mogelijk om microbiële levensgemeenschappen in, en rondom te plant te onderzoeken, zonder dat er een kweekstap aan voorafgaat (Inceoğlu e.a., 2010). Deze technologie is gebaseerd op het feit dat er stukken DNA zijn binnen bacteriën en schimmels die algemeen voorkomen (universeel zijn), of die uniek zijn per soort (variabele delen). Voor het bepalen van de bacteriële soortensamenstelling in een monster wordt gebruik gemaakt van de DNA basepaar-volgorde die codeert voor ribosomaal RNA (16S rRNA gen). Met behulp van kleine stukjes gesynthetiseerd DNA (primers) die gelijk zijn aan twee universele delen in het 16S rRNA gen wordt een tussenliggend variabel deel vermeerderd. Van alle vermeerderde DNA fragmenten wordt de DNA basepaar-volgorde van het variabele deel bepaald en met behulp van bio-informatica vergeleken met overeenkomstige 16S rRNA genen van bekende bacteriesoorten in DNA databestanden (Akkermans e.a. 1995). Op deze wijze wordt de bacteriesoorten-samenstelling in een monster bepaald. Voor schimmels wordt een andere deel van het ribosomale RNA gen gebruikt, maar het

gebruikte principe blijft hetzelfde als hiervoor beschreven met bacteriën. Met de huidige technieken kunnen grote aantallen bacterie en schimmelsoorten binnen één monster worden bepaald. Hierdoor is het mogelijk om verschillen in soortensamenstelling tussen monsters onderling vast te stellen en te koppelen aan externe parameters (Inceoğlu e.a., 2012), zoals in dit project aan plant-drooggewicht en mate van aantasting door belagers, waardoor er een verband kan worden gelegd tussen de behandeling van de plant, bijvoorbeeld met een BA, en de microbiom-samenstelling.

Echter, zoals eerder vermeld kunnen behandelingen van planten met BA's ook leiden tot een verandering van de samenstelling van inhoudsstoffen (metabolieten). Deze inhoudsstoffen zijn te meten via gevoelige scheidingsmethoden (HPLC) en massaspectrometrie, en twee categorieën kunnen worden onderscheiden: 1) primaire inhoudsstoffen die betrokken zijn bij het metabolisme van planten en 2) secundaire inhoudsstoffen die betrokken zijn bij verdediging tegen belagers. De laatste groep was voor dit project het meest interessant, omdat verwacht wordt dat deze groep van inhoudsstoffen een relatie zullen hebben met weerbaarheid tegen belagers.

Verschuivingen in plant-microbiom en inhoudsstoffen (metaboloom) samenstelling kan dus een indicatie zijn voor veranderingen in weerbaarheid tegen plantbelagers. Verschuivingen in microbiom en/of metaboloom-samenstelling door plant behandelingen met BA's duiden op interacties tussen de betreffende BA's met het microbiom van de plant en, direct of indirect (via het microbiom), met de plant zelf. Deze toetsing is waardevol omdat daarmee aangetoond wordt dat er onder de toegepaste omstandigheden interactie met de plant tot stand komt, of niet, zonder dat er uitvoerige microbiële ecologische metingen hoeven te worden uitgevoerd. Het is alleen niet bekend welke kant deze interactie opgaat en vandaar dat er een toetsing met een toegediende belager plaats vond in dit project. Experimenten door BA behandeling van planten moet dus inzicht geven over de mogelijke sturing van weerbaarheid door middel van het microbiom, het metaboloom, of de combinatie van beide. Dit moet leiden tot nieuw inzicht in de rol van het plant microbiom en metaboloom in weerbaarheid tegen belagers. Op den duur zou dit ook tot ontwikkeling van nieuwe procedures of producten kunnen leiden die de weerbaarheid van planten tegen biotische en/ of abiotische factoren verhogen.

1.3 Aanpak van het onderzoek

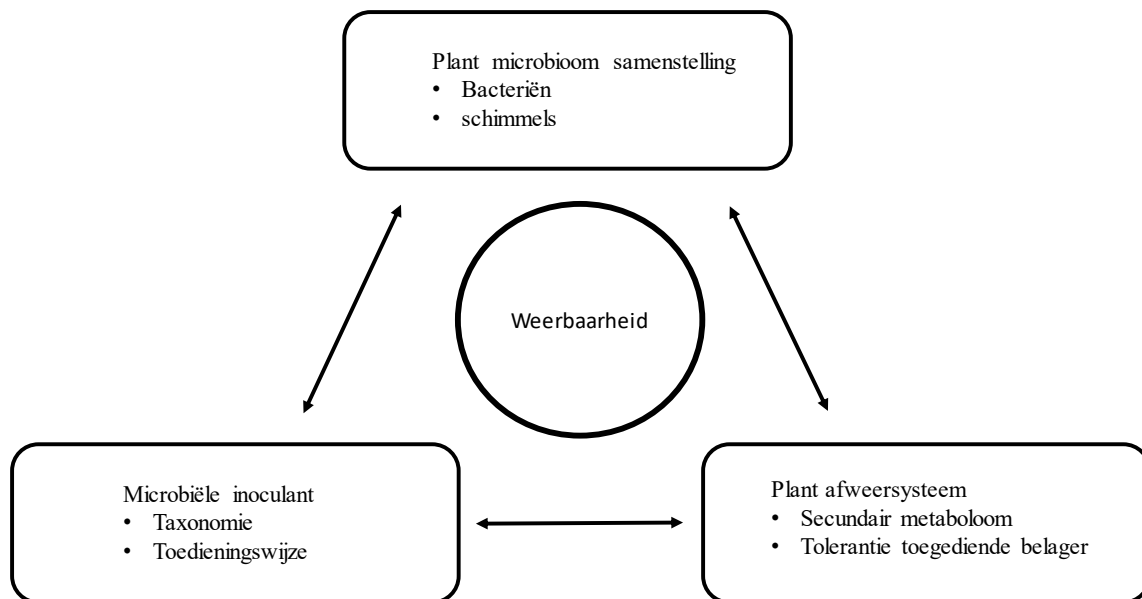
In het onderzoek wordt ervan uitgegaan dat BA's uit verschillende taxonomische groepen ook uiteenlopende effecten zullen hebben op microbiom (bacteriën en schimmels) en metaboloom (secundaire metabolieten) samenstelling van behandelde planten en dat deze effecten ook weer zullen verschillen, afhankelijk van de plantensoort. Om deze reden zijn er 10 BA's geselecteerd waarvan uit eerder onderzoek bekend was dat ze: 1) effecten hadden op plant belagers en 2) dat

ze samen leefden met planten, hetzij in, of nabij wortels, of in de plant als endofyten (Tabel 1). Selectie heeft plaatsgevonden op basis van taxonomische diversiteit en herkomst van de geselecteerde stammen.

Schimmel-stammen BbRb (*Beauveria bassiana*), F52 (*Metarhizium brunneum*), FE9901 (*Isaria javanica*) en TD50 (*Trichoderma viride*) zijn eerder toegepast in de bestrijding van plaagveroorzakers in sierteelt gewassen, waaronder chrysant (Messelink e.a. 2019) en zijn dus entomopathogenen. Stam A2 (*Serratia marcescens*) is een entomopathogene bacteriestam afkomstig uit zandraket (*Arabidopsis thaliana*), maar is nooit geregistreerd als een actieve component van een biologische bestrijdingsmiddel. Stam TV02 is geïsoleerd uit een sparrenboom en behoort tot dezelfde soort als TD50 (*Trichoderma viride*) en voor deze stam is gekozen om een vergelijking te kunnen maken met stam TD50 in reactie met planten. De overige stammen behoren tot de groep van bacteriën, waarvan stammen P9 (*P. putida*), 2003/84 (*Bacillus mycoides*) en VC20 *Verrucomicrobium* subdivisie 1 afkomstig zijn uit aardappelplanten. Stam C17 (*P. fluorescens*) is geïsoleerd uit chrysant en behoort tot hetzelfde geslacht als P9. Stammen TV02, A2, C17, P9 en 2003/84 zijn geïsoleerd uit oppervlakte gesteriliseerd weefsel en worden dus instaat geacht om planten endofytisch te koloniseren. Stam VC20 behoort tot een soort die niet eerder beschreven is en die mogelijk wortelgroei stimuleert. De mogelijkheid tot endofytische kolonisatie door deze stam is nog niet bekend (Nunes da Rocha e.a., 2013). Net zoals stam A2, zijn stammen TV02, P9, C17, 2003/84 en VC20 niet geregistreerd als biologisch bestrijdingsmiddel en ook niet als groeistimulant.

Geselecteerde stammen worden toegepast in drie plantensoorten: tomaat, sla en chrysant. Behandeling van verschillende plantensoorten met dezelfde BA's moet inzicht geven in eventuele variaties in kolonisatie gedrag, effecten op microbiom en metabool samenstellingen en/of weerbaarheid tegen plantbelagers. Hiermee kan een uitspraak worden gedaan of waargenomen effecten 'universeel' of gewas specifiek zijn. Als gewasbelagers is gekozen voor *Fusarium oxysporum* in tomaten (formae specialis -f.sp.- *lycopersici*) (Fox lyc) en *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* (Fox lac) in sla planten en Californische trips (*Frankliniella occidentalis*) in chrysanten planten. Voor deze belagers is gekozen omdat: 1) ze dikwijls schade aanrichten in de teelten van deze gewassen, en 2) omdat er uitgebreide onderzoekservaringen zijn met deze plant-belager combinaties. Verder is bekend dat *Fusarium* soorten van nature (endofytisch) in planten aanwezig zijn en dat sommige van deze soorten mogelijk plantengroei en ontwikkeling stimuleren. Vanuit dat oogpunt is het interessant om de relatie tussen gewas-belagende (*F. oxysporum*) en microbiom-intrinsieke *Fusarium* soorten te bepalen.

Het onderzoek richt zich op de driehoeksrelatie tussen BA, microbiom en metabool die gezamenlijk een uitwerking kunnen hebben op de weerbaarheid tegen toegediende schadeveroorzakers (Figuur 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de dynamische interactie tussen microbiële inoculanten die worden toegediend aan planten, het plant microbiom en het afweersysteem van de plant, bepaald aan de hand van het plant-metaboloom.

1.4 Doelstellingen en afbakening van het onderzoek

Het doel van het onderzoek is om fundamenteel inzicht te krijgen in processen die verantwoordelijk zijn voor weerbaarheid van planten tegen belagers (biotische stressfactoren). Dit gebeurt door sturing van het plant-microbiom en metaboloom met behulp van verschillende BA's. Gemeten effecten van weerbaarheid tegen *F. oxysporum* in tomaat en sla en tegen Californische trips in chrysanthe worden afgezet tegen verschuivingen in bacterie en schimmelsoorten-samenstelling in wortels en in de secundaire metabolieten-samenstelling in bladeren. Gezamenlijk moet dit inzicht geven in verhoogde, of juist verminderde weerbaarheid tegen aangebrachte belagers door aangebrachte veranderingen in microbiom en/of metaboloom samenstelling na behandelingen met BA's in drie verschillende experimentele model gewassen.

2. Methode van onderzoek

2.1 Proefopzet en analyse

In de proefopzet (schematische weergave in Figuur 2) werd gekozen voor een vergelijking tussen vier behandelingen: 1) onbehandelde controle planten [C], 2) behandelingen met 10 BA's (zie Tabel 1) voor tomaat en met vier BA's (FE9901, TV01, P9 en 2003/84) voor sla en chrysant [BA], 3) behandeling met belager (Fox lyc voor tomaat, Fox lac voor sla en Californische trips voor chrysant) [B] en 4) combinatie van afzonderlijke BA's met belager [BA+B]. Alle planten werden behandeld met suspensies van iedere BA afzonderlijk, eerst via zaad (tomaat en sla) of stekken (chrysant) en daarna via toediening aan grond. Voor de vierde behandeling met BA+B werden eerst de planten behandeld met afzonderlijke BA's en daarna met de belager.

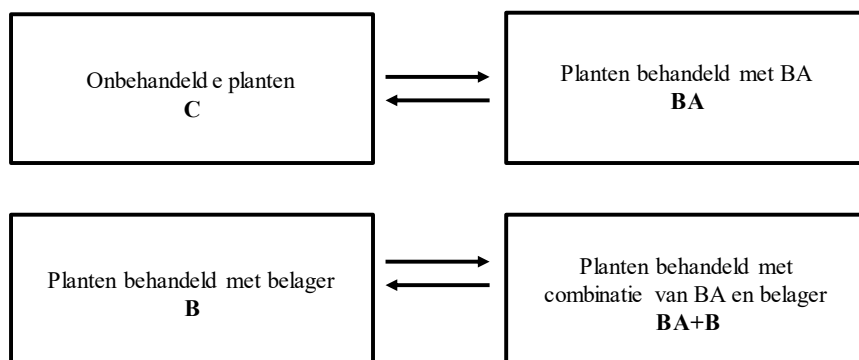
Op het moment van monsternamen werd de mate van aantasting en hoeveelheid van de nog aanwezige aangebrachte belagers vastgesteld. Verder werden van alle behandelde planten vers en drooggewichten van de bovengrondse delen bepaald en werden wortels, stengelbasis (overgangszone tussen wortel en stengel), en bladeren geoogst. Uit een deel van de wortels en de stengelbasis werd DNA geëxtraheerd dat werd gebruikt voor microbiom-analyse (alleen wortels) en moleculaire analyse op aanwezigheid van *Fusarium* (wortels). Een ander deel van de wortels en stengelbasis werd gebruikt voor microbiologische analyse op aanwezigheid van de toegediende BA's. De bladeren werden gebruikt voor metabool-analyse. Een overzicht van monsternamen en analyse is weergegeven in Figuur 3.

Om vast te stellen of de toegediende BA's de behandelde planten konden binnendringen zijn delen van de wortels en stengelbasis van vijf planten per behandeling oppervlakte-gesteriliseerd, vervolgens fijngemalen, waarna extracten zijn uitgestreken op kweekmedia. Na uitgroei werd op basis van morfologie vastgesteld of de toegediende BA wel of niet aanwezig was in het monster. Op basis van DNA profielen werd bevestigd of de herisolaten daadwerkelijk overeenkwamen met de toegediende stammen.

Bacterie en schimmel samenstelling van wortel DNA werd bepaald met behulp van twee verschillende moleculaire amplificatie systemen die specifiek zijn voor bacteriën en voor schimmels. Op deze wijze kon van ieder monster afzonderlijk de bacterie en schimmelsamenstelling binnen het plant microbiom worden vastgesteld. Voor metabool-analyse werd de secundaire metaboliet-samenstelling van alle bladextracten bepaald.

Tabel 1. Micro-organismen die zijn gebruikt voor het behandelen van tomaten, sla en chrysanten planten.

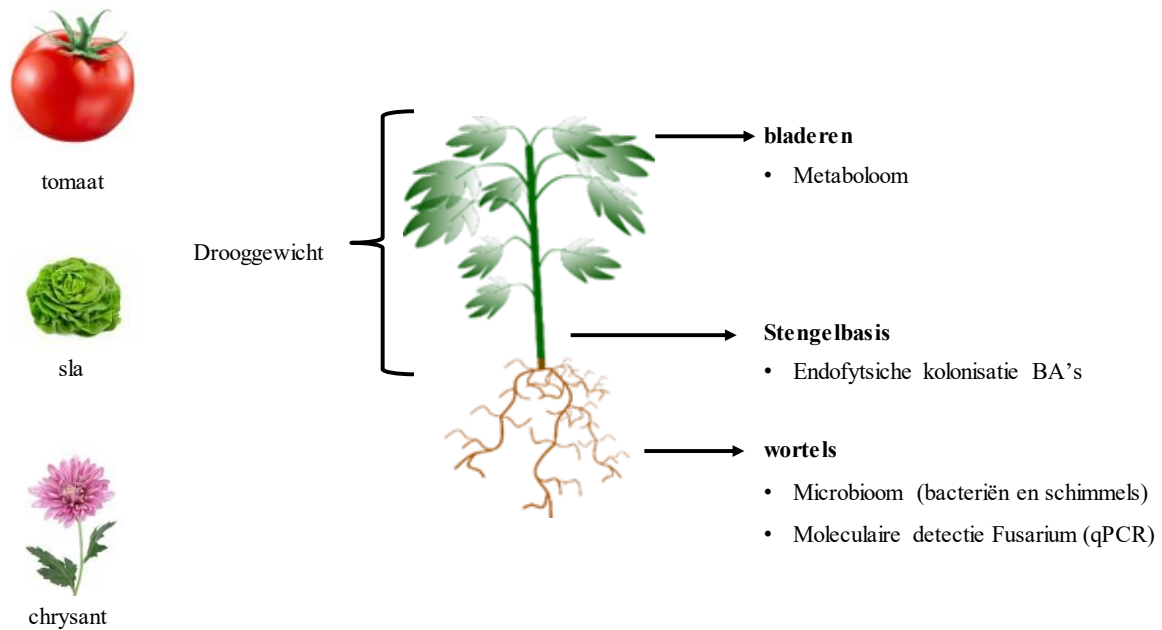
Stam naam	Categorie: soortnaam	Oorsprong
BbRb	Schimmel: <i>Beauveria bassiana</i>	RDIPP, Roemenië
F52	Schimmel: <i>Metarhizium brunneum</i>	(Bio 1020) Bayer
FE9901	Schimmel: <i>Isaria javanica</i>	(PreFeRal) Biobest
TD50	Schimmel: <i>Trichoderma viride</i>	RDIPP, Roemenië
TV02	Schimmel: <i>Trichoderma viride</i>	WUR: Sparrenboom, Duitsland
A2	Bacterie: <i>Serratia marcescens</i>	WUR: Arabidopsis: inwendig stengel
C17	Bacterie: <i>Pseudomonas fluorescens</i>	WUR: Chrysant: inwendig stengel
P9	Bacterie: <i>Pseudomonas putida</i>	WUR: Aardappel: inwendig stengel
2003/84	Bacterie: <i>Bacillus mycoides</i>	WUR: Aardappel: inwendig stengel
VC20	Bacterie: <i>Verrucomicrobium</i> subdivisie 1	WUR: Aardappel rhizosfeer grond
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Bejo Zaden, Nederland
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lactucae</i>	NVWA, Nederland (PD015-4750888)



Significante verschuiving in soortensamenstelling

C t.o.v. BA	B t.o.v. BA+B	Scenario	Verklaring in bacterieel/ schimmel microbioom of metaboolom verschuiving:
niet	niet	1	NVT
wel	niet	2	effect van BA
niet	wel	3	BA effect alleen bij interactie met P
wel	wel	4	Priming door BA, gevolgd door interactie tussen BA en B

Figuur 2. Schematisch weergave van de uitwerking van meetgegevens, verkregen met bacterie en schimmel-microbioom en secundair metaboolom analyses, in scenario's. De meetgegevens zijn gebaseerd op microbiële soorten en metabolieten-samenstellingen van individuele monsters van planten die: 1) onbehandeld bleven, 2) behandeld waren met een bacterie of schimmelstam (BA), 3) een belager (B) of 4) een combinatie van beide (BA + B).



Figuur 3. Monsternameschema van tomaten, sla en chrysanthenplanten in relatie tot beoogde analyses.

2.2 Criteria voor beoordeling van BA's op interactie met planten

De bacterie en schimmel-diversiteit en soorten-samenstellingen (microbioom) en de (secundaire) metabolieten-samenstelling (metabooloom) werden vastgesteld bij alle behandelingen van de drie plantensoorten. Diversiteit wordt alleen bij microbioom analyse gebruikt en is een maat voor het aantal soorten in ieder monster afzonderlijk, maar deze waarde geeft geen kwalitatief oordeel over welke soorten aanwezig zijn. De soortensamenstelling geeft meer informatie over het monster en verschillen in soortensamenstelling tussen monsters van verschillende behandelingen kunnen worden uitgedrukt in ordinaat-afstanden na matrix berekeningen. Vervolgens worden deze ordinaat-afstanden omgezet naar coördinaten en visueel weergegeven in een 2-dimensioneel diagram (zogenaamde PCoA plot). Een voorbeeld hiervan is weergegeven in Figuur 4. Een vergelijkbare analyse wordt ook uitgevoerd op de metabolieten-samenstelling van een monster en ook hierbij wordt de metabolieten-samenstelling per individueel monster uitgedrukt in een coördinaat. Via matrix berekeningen kan de waarschijnlijkheid in overeenkomstigheid tussen monsters van verschillende behandelingen worden uitgedrukt in een percentage (waarschijnlijkheid). Wanneer deze waarschijnlijkheid kleiner is dan 5%, dan is er sprake van

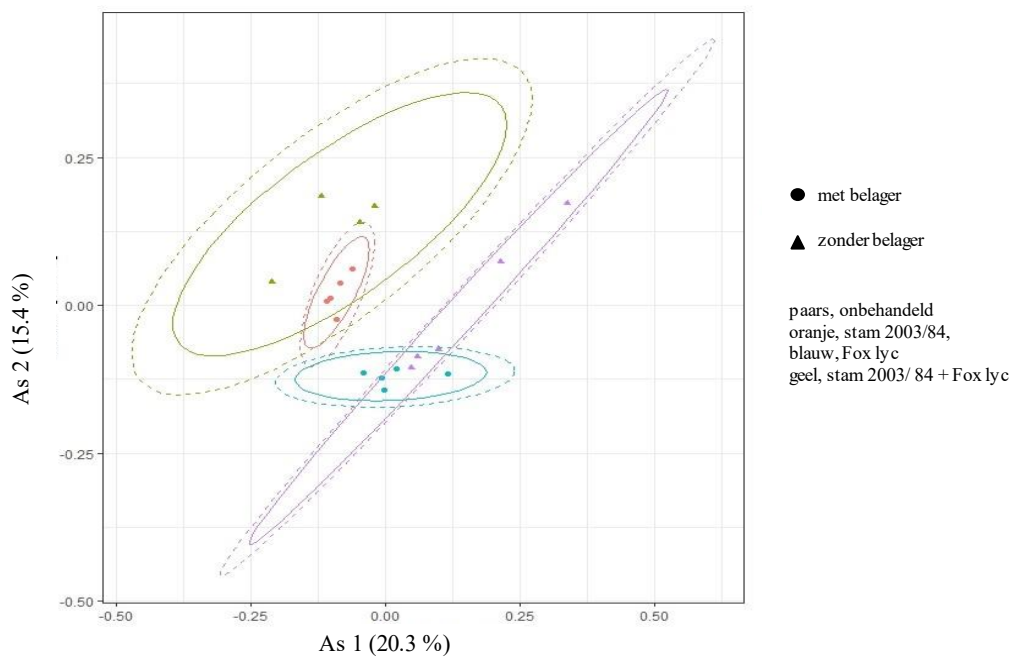
een statistisch significant verschil en worden de effecten van de behandelingen op microbiom en/of metaboolom-samenstelling als ‘aantoonbaar’ aangemerkt.

In de beoordeling van de verkregen microbiom en metaboolom data werden er twee vergelijkingen gemaakt op basis van, respectievelijk, bacterie/ schimmel of metaboliëten samenstelling: 1) tussen onbehandelde planten (C) en planten behandeld met afzonderlijke BA's (BA) en 2) tussen planten behandeld met de belager (B) en planten behandeld met afzonderlijke BA's en de belager (BA+B) (Figuur 2). Bij deze vergelijkingen zijn er vier scenario's mogelijk op basis van microbiom of metaboolom-samenstelling: 1) er is geen effect van de BA en ook niet in aanwezigheid van de belager, 2) er is alleen een effect van de BA, maar geen additioneel effect in aanwezigheid van de belager, 3) er is alleen een effect van de BA in aanwezigheid met de belager, en 4) er is een effect van de BA met een additioneel effect in aanwezigheid met de belager. Scenario's 2-4 zijn het meest interessant omdat de BA een aantoonbaar priming-effect zou kunnen hebben op microbiom en/of metaboolom-samenstelling (scenario's 2 en 4) waarna er een additioneel aantoonbaar effect is met de belager (scenario's 3 en 4). Scenario's zijn afzonderlijk uitgewerkt voor iedere BA, in afwezigheid en aanwezigheid van de belager bij de drie verschillende plantensoorten op basis van significante effecten op bacterie en schimmel en metaboliëten-samenstelling.

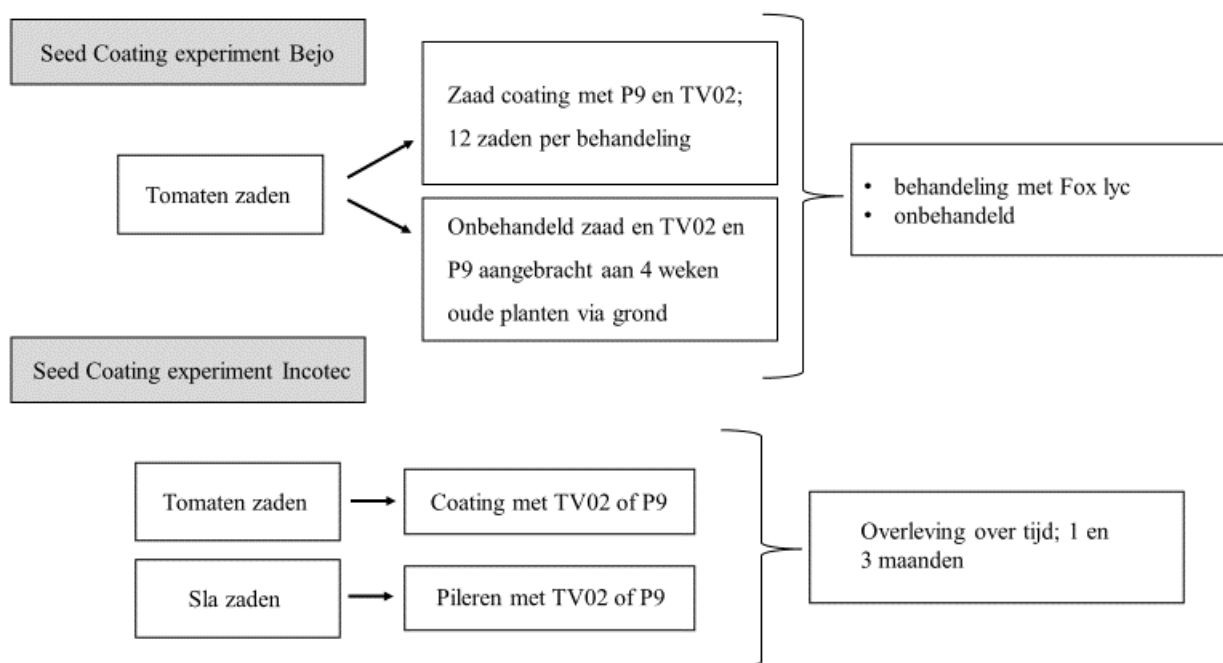
2.3 Coaten en pileren van tomaten en sla zaad met stammen TV02 en P9

Coating van tomatenzaad met de stammen TV02 en P9 en coating zonder toevoeging (controle) werd uitgevoerd bij Bejo, volgens interne procedure (Figuur 5). Na coating werden gecoate en niet gecoate zaden (n=12) uitgezaaid in potgrond. Aan jonge planten opgekweekt uit niet-gecoate zaden werden suspensies van stammen TV02, P9 of water (controle) aan de grond toegevoegd. Na vier weken werd de helft van alle planten (n=6) behandeld met Fox lyc en de andere helft bleef onbehandeld. Symptomen voor Fox lyc werden gescoord en vers en drooggewicht bepalingen werden gedaan op de bovengrondse delen van alle planten. Na drie maanden werd van 10 gecoate zaden per behandeling de hoeveelheid TV02 en P9 bepaald via kweekprocedures. Overleving op het zaad werd uitgedrukt in percentage ten opzichte van de oorspronkelijk aangebrachte hoeveelheid.

Coating van tomaten, en pileren van slazaden met de stammen TV02 en P9 werd uitgevoerd bij Incotec, volgens interne procedure (Figuur 5). De overleving van beide stammen op het zaad werd in de tijd gevolgd via opkweek. Per behandeling werden 10 zaden onderzocht op aanwezigheid van stammen TV02 en P9 en de hoeveelheden van beide stammen werd uitgedrukt als percentage van de oorspronkelijk aangebrachte hoeveelheid.



Figuur 4. Ordinatie-diagram (PCoA plot) op basis van de bacteriesoorten-samenstelling van tomatenplanten behandeld met *B. mycooides* stam 2003/84. As 1 is de meest verklarende as die 20.3% van de variatie tussen monsters beschrijft, gevolgd door as 2 met 15.4%. Symbolen: gesloten cirkels in de symbolen geven de behandelingen met belager (Fox lyc) weer en gesloten driehoeken behandelingen zonder belager. Kleurcodes: paars, onbehandeld; oranje, alleen stam 2003/84, blauw, alleen Fox lyc en geel, stam 2003/ 84 met Fox lyc.



Figuur 5. Experimenteel overzicht van de zaadbehandelingsexperimenten uitgevoerd bij Bejo en Incotec met stammen P9 en TV02.

3. Resultaten

3.1 Plant-kolonisatie door BA's

Na de BA behandelingen zijn oppervlakte-gesteriliseerde wortel en stengeldelen van de planten onderzocht op aanwezigheid van de toegediende BA's. Alle toegediende BA's werden teruggevonden in de wortels van tomaat, en voor stammen FE9901, TV02, P9 en 2003/84 ook in die van sla en chrysant (Tabel 2). Dit toont aan dat alle BA's in staat waren om de geteste planten endofytisch te koloniseren. Echter gold voor de meeste BA's dat deze niet in alle herhalingen (n=5) van dezelfde behandeling aantoonbaar aanwezig waren. Alle bacteriestammen (A2, C17, P9, 2003/84 en VC20) werden endofytisch aangetroffen in stengels van tomaat, en voor P9 en 2003/84 ook in die van sla en chrysant. Van de schimmelstammen werden F52 en FE9901 endofytisch teruggevonden in één van de vijf stengeldelen van tomaat en werden FE9901 en TV02 ook endofytisch teruggevonden in stengeldelen van chrysant, maar niet in die van sla.

Tabel 2. Endofytische kolonisatie van tomaten, sla en chrysanten planten door toegediende BA's. Het aantal stengel (s) en wortel (w) delen waarin de toegediende BA's zijn aangetroffen is weergegeven. Stengel en worteldelen (n=5) zijn oppervlakte gesteriliseerd met bleekloog (s, w) en na uitwendige verhitting (alleen w) uitgelegd op semi-selectieve kweekmedia. Het uitgegroeide kolonie-materiaal is op basis van morfologische eigenschappen vergeleken met de toegediende stammen.

Stam	Tomaat		Sla		Chrysant	
	stengel	wortel	stengel	wortel	stengel	wortel
BbRb	0	3				
F52	1	2				
FE9901	1	2	0	4	1	4
TD50	0	5				
TV02	0	3	0	4	4	5
A2	2	3				
C17	1	3				
P9	5	5	3	5	3	2
2003/84	5	2	4	3	3	1
VC20	2	3				

3.2 Effect van plant-behandelingen met belagers

De toegediende belagers Fox lyc voor tomaat, Fox lac voor sla en Californische trips voor chrysanthe, werden na behandelingen in alle gevallen teruggevonden in de planten. In alle BA-behandelde tomaten en slaplanten werd een significant grotere hoeveelheid Fusarium DNA (als maat voor de totale hoeveelheid biomassa van aanwezige Fusarium soorten) aangetroffen in de wortels van *F. oxysporum*-behandelde planten ten opzichte van overeenkomstige onbehandelde planten. Dit wijst erop dat de toegediende *F. oxysporum* stammen in alle gevallen de wortels van sla en tomaat hadden gekoloniseerd. Het drooggewicht van de bovengrondse delen van alle *F. oxysporum*-behandelde tomaten en sla planten waren significant lager dan overeenkomstige onbehandelde planten. Een significant lagere plant biomassa wijst erop dat behandeling van planten met *F. oxysporum* leidde tot significante groeivermindering. Voor tomatenplanten werden er geen significante interacties tussen BA en de belager aangetroffen, wat erop wijst dat er geen significante onderdrukking of stimulatie van de toegediende *F. oxysporum* stammen was. In slaplanten behandeld met Fox lac was er ten opzichte van de controle een significant hoger drooggewicht van planten behandeld met de stammen P9 en TV02. Dit wijst op een Fox lac-onderdrukkend effect van beide BA's in sla. Daarbij moet echter worden vermeld dat het plant drooggewicht van P9-behandelde planten zonder belager significant lager was dan de overeenkomstige controle behandeling. Dat wijst erop dat stam P9 de groei van slaplanten remt, waarna er in aanwezigheid van Fox lac geen extra groeiremming meer optreedt. Voor Californische trips in chrysanthenplanten werden juveniele (nymph) en adulte stadia waargenomen in de bloemen en werden er zilverschurft plekken (als gevolg van schade veroorzaakt op door trips) waargenomen op de bladeren. Echter, er waren geen significante effecten van BA-behandeling op genoemde parameters. Verder was het door de gekozen proefopzet niet mogelijk om betrouwbare vers en drooggewicht-bepalingen te doen op de planten, waardoor een uitspraak over effecten van BA-behandelingen in aanwezigheid of afwezigheid van Californische trips niet kan worden gemaakt.

3.3 Interactie van BA's op het plant-microbioom en metabooloom

De 10 geteste BA's hadden allemaal aantoonbare interacties met tomatenplanten (Tabel 3). Behandelingen van de tomatenplanten met de schimmelstammen TD50, TV02, BbRb, FE9901 en F52 en de bacteriestammen A2, C17 en VC20 leidden tot een aantoonbaar effect op het bacterie-deel van het microbioom. Het bacterie-deel van het tomaat-microbioom wordt dus het sterkst beïnvloed door behandeling met de BA's. Daarnaast werd het schimmel-deel van het microbioom aantoonbaar beïnvloed na behandeling van de tomatenplanten met TD50, FE9901 en F52. Het

tomaat-metabooloom werd aantoonbaar beïnvloed na behandelingen met stammen FE9901, F52, P9 en 2003/84. Behandelingen van de tomatenplanten met BA's leidde in enkele gevallen ook tot veranderingen van beide, het microbioom en het metabooloom, wat het geval was na behandeling met stammen TV02, FE9901 en F52. Scenario 1, geen effect van BA-behandelingen op microbioom en metabooloom, ook niet in aanwezigheid van Fox lyc als toegediende belager, was niet aanwezig bij tomatenplanten. Scenario's 2 (effect BA zonder Fox lyc) en 3 (alleen effect van BA met Fox lyc) kwamen respectievelijk drie en zes keer voor. Scenario 4 kwam voor na behandelingen van tomatenplanten met stammen FE9901 en F52 en beide BA's hadden effect op het bacterie-deel van het microbioom in afwezigheid, maar ook in aanwezigheid van Fox lyc. Daarnaast hadden beide stammen ook een effect op het schimmel-deel van het microbioom en op het metabooloom in afwezigheid van Fox lyc. Dit wijst er op dat met name deze twee stammen, FE9901 en F52, tomatenplanten voorbereiden op belagers door de weerbaarheid van tomatenplanten te verhogen. Mogelijk induceren de stammen TD50, TV02 en P9 ook weerbaarheid van de tomatenplanten, maar deze drie behandelingen leidden niet tot aantoonbare interacties met Fox lyc, wat wel het geval was met FE9901 en F52.

Slaplant-behandelingen met stammen TV02, FE9901, P9 en 2003/84 leidde in alle gevallen tot aantoonbare effecten op het bacterie-deel van het microbioom en na behandeling met de belager, Fox lac, was er een additioneel effect op het bacterie-deel van het microbioom met stam FE9901 en 2003/84 behandelingen. Behandeling van slaplanten met TV02 leidde ook tot een aantoonbare verandering van het schimmel-deel van het microbioom, zowel in afwezigheid als in aanwezigheid van Fox lac. Scenario 4 was dus van toepassing voor stammen TV02, FE9901 en 2003/84. Behandeling van slaplanten met stam P9 leidde weliswaar tot veranderingen van het bacterie-deel van het microbioom en van het metabooloom, maar in aanwezigheid van Fox lac waren er geen additionele effecten waarneembaar. Wel was het schimmel-deel van het microbioom aantoonbaar veranderd in de combinatie van behandelingen met stam P9 en Fox lac. In chrysantenplanten waren er aantoonbare effecten op het bacteriële en schimmeldeel van het microbioom gemeten na behandelingen met stammen TV02, FE9901 en 2003/84. Behandelingen met de belager, Californische trips, leidde in geen van de drie gevallen tot een additionele verandering van het microbioom. Opvallend was dat er geen waarneembare effecten van de behandeling met stam P9 op microbioom en metabooloom-samenstellingen waren, ondanks het feit dat stam P9 chrysanten planten endofytisch koloniseerde. Ook na plant-behandeling met Californische trips waren er geen aantoonbare effecten op het microbioom en metabooloom waarneembaar waardoor scenario 1 van toepassing was voor stam P9 in chrysant. Voor de andere drie BA's was scenario 2 van toepassing. Verder was opvallend dat het metabooloom van chrysantenplanten in geen van de drie gevallen aantoonbaar werd beïnvloed, ook niet in combinatie met Californische trips.

Tabel 3. Interactie van BA's met de bacterie, schimmel en metabolieten-samenstelling van tomaten, sla en chrysantenplanten in afwezigheid en aanwezigheid van een toegediende belager (Fox lyc voor tomaat, Fox lac voor sla en Californische trips voor chrysant). Scenario's zijn beschreven in Figuur 1.

A, D: interactie BA (A) en BA+B (D) op bacteriesoortensamenstelling

B, E: interactie BA (B) en BA+B (E) op schimmelsoortensamenstelling

C, F: interactie BA (C) en BA+B (F) op secundaire metabolietensamenstelling

*, significant effect van BA op soorten of metabolieten samenstelling op het niveau van $0.01 = P < 0.05$ en **, op het niveau van $P < 0.01$.

BA stam	Scenario's						
	Tomaat			Sla			Chrysant
	2	3	4	2	3	4	2
TD50	B**	D*					
TV02	A*C**					A**B* E*	A*B*
BbRb		D*					
FE9901			A*B*C*D*			A**D**E**	A**B**
F52			A*B*C*D*				
P9	C*			A**C**	E**		
A2		D*					
C17		D*					
VC20		D**					
2003/84		F*				A**D**E**	A*B*

3.4 Tomatenzaad behandelingen met stammen TV02 en P9

Het drooggewicht van tomatenplanten opgegroeid vanuit zaad gecoat met stam P9 (toegepast volgens de procedure bij Bejo) was significant lager dan van planten opgekweekt vanuit controle zaad en zaad gecoat met stam TV02 en van planten opgekweekt vanuit onbehandeld zaad waaraan later stammen P9 of TV02 of water (controle) via grond was toegediend. Na toediening van Fox lyc was de ziektedruk in planten opgekweekt vanuit stam P9-gecoat zaad lager ten opzichte van de overige behandelingen. Behandeling van tomaten zaad met stam P9 resulteerde in een lagere groei, maar hogere weerbaarheid tegen ziektedruk veroorzaakt door Fox lyc. In vergelijking met het aanbrengen via grond was de werking van stam P9 via zaadcoating effectiever. Stam TV02 had geen meetbare effecten op groei en weerbaarheid tegen Fox lyc in tomatenplanten, noch door toediening via zaad, noch via grond.

Overleving van stammen P9 en TV02 op het zaad na coaten of pileren was beperkt. Binnen drie maanden na coaten/ pileren konden beide stammen niet meer worden opgekweekt vanaf de behandelde zaden (n=10). De overleving van stam P9 op gecoate tomaten, en gepileerde slazaden (toegepast volgens de procedure bij Incotec) resulteerde na een maand tot een opbrengst van 0.02% bij tomaten, en 0% bij slazaden ten opzichte van de oorspronkelijk aangebrachte hoeveelheid van stam P9. Drie maanden na zaadbehandelingen werd stam P9 niet meer op tomaten en slazaden waargenomen. Stam TV02 overleefde langer en na een maand was 7.4% nog aanwezig op tomaten, en 26.2% op slazaden. Drie maanden na zaadbehandelingen was nog 0.5% van de oorspronkelijk aangebrachte hoeveelheid TV02 aanwezig op tomaten, en 8.84% op slazaden en na zes maanden nog 0.2 en 0.6% op, respectievelijk of tomaten en slazaden.

4 Discussie en conclusies

4.1 Discussie

De 10 BA stammen toegepast in dit onderzoek bleken alle in staat te zijn om tomaten, sla en chrysantenplanten endofytisch te koloniseren. In tomatenplanten waren er na de behandelingen met de 10 BA's effecten op het microbiom en/ of metabooloom aantoonbaar. Ook plantbehandelingen met vier geselecteerde BA's in sla en chrysant resulteerde in microbiom en/ of metabooloom-veranderingen en hieruit kan dus worden geconcludeerd dat in ieder geval stammen TV02, FE9901 en 2003/84 effecten hebben op de microbiomen van uiteenlopende plantensoorten. Stam P9, had naast een effect op het microbiom, ook effecten op het (secundaire) metabooloom van tomaat en sla. Stam P9 is de enige van de 10 BA's die interacties aangaat met planten van verschillende soorten, want stammen TV02 en FE9901 hebben, naast stam P9, weliswaar een aantoonbaar effect op het metabooloom van tomaat, maar niet op dat van sla of chrysant.

De behandelingen met de 10 BA's hadden voornamelijk effect op het microbiom van de plant en dat geeft een vernieuwend inzicht in de effecten van plant-behandelingen met microben. Stammen TD50, BbRb, FE9901 en F52 zijn actieve componenten van biologische producten en bij toepassingen van deze producten zal er dus ook rekening mee gehouden moeten worden met bij-effecten op het plant-microbiom. Verschuivingen in het plant-microbiom zouden kunnen leiden tot verhoging of juist tot afname van weerbaarheid tegen (a) biotische stressfactoren. Dit is een belangrijke boodschap die voortkomt uit dit project en dat verder uitgezocht zou moeten worden in toekomstige onderzoeksprogramma's. Naast stammen uit biologische producten werden ook bacteriële en schimmelstammen onderzocht die niet worden toegepast als bacterieel preparaat om groei te bevorderen of ziektes en plagen te onderdrukken. Deze stammen zijn taxonomisch sterk van elkaar verschillend en het is opvallend dat een vertegenwoordiger van een tot-nu-toe onbekende bacteriële groep van *Verrucomicrobium*, waar stam C20 toe behoort, ook in staat was om het schimmeldeel van het microbiom te beïnvloeden. Een andere opvallende observatie was dat stammen die behoren tot dezelfde soort, zoals stammen TD50 en TV02 (*T. viride*), of tot hetzelfde geslacht, zoals stammen C17 en P9 (*Pseudomonas* spp.), verschillende effecten teweegbrachten in het microbiom en/ of metabooloom van tomatenplanten. Waargenomen effecten op planten zijn dus stam-afhankelijk en het lijkt daarom niet mogelijk te zijn om op basis van taxonomische indeling een algemene uitspraak te doen over effecten van micro-organismen op planten.

Bijzondere aandacht is er voor twee geselecteerde stammen, FE9901 en P9, omdat beide stammen uiteenlopende effecten teweegbrachten op de onderzochte planten. Stam FE9901

beïnvloedde het microbioom (bacterie en schimmel-deel) van tomaat, sla en chrysant. Deze stam is kennelijk in staat om microbiële interacties aan te gaan in diverse plantensoorten. Zoals alle BA's werd FE9901 aangebracht aan de plant via grond. Endofytische kolonisatie zou dus vanuit de wortel moeten optreden naar de overige delen van de plant. Deze stam was in wortels van alle drie de plantensoorten aangetroffen, en dit wijst erop dat deze stam een breed spectrum aan plantensoorten kan koloniseren en dat dat ook leidt tot verandering van het plant-microbioom. Kolonisatie van de overgangszone van wortel naar de stengel treedt ook op, maar wel minder in vergelijking tot wortels. Het meest waarschijnlijke model is dan ook dat stam FE9901 interacties met wortel-gebonden micro-organismen aangaat, maar over het effect van deze interacties kan op basis van de opgeleverde gegevens geen uitspraak worden gedaan. Er was namelijk geen aantoonbaar effect op het plant-drooggewicht en na behandelingen met beide *F. oxysporum* stammen in tomaat en sla en met Californische trips in chrysant ook geen aantoonbare effecten op weerbaarheid tegen belagers. Dit in tegenstelling tot stam P9 dat opvallend genoeg het metabooloom van tomaat en sla beïnvloedde, naast een effect op het microbioom van sla. Uit de drooggewicht-bepalingen van stam P9-behandelde slaplanten bleek dat de ontwikkeling van de planten behandeld met stam P9 lager was dan die van onbehandelde planten. Dat beeld werd bevestigd met stam P9-behandelde tomatenplanten die opgegroeid waren vanuit gecoat zaad. In tegenstelling tot combinatie behandelingen van BA's met plant-belagers leidde de combinatie van stam P9 met beide belagers voor tomaat en sla niet tot een grote reductie in drooggewicht. Het lijkt er dus op dat stam P9 het secundaire metabooloom van tomaat en sla stimuleert, wat ten koste gaat van de initiële groei van beide plantensoorten. Echter, hierbij wordt de weerbaarheid tegen *F. oxysporum* verhoogd en zou er na behandeling met stam P9 sprake kunnen zijn van geïnduceerde weerbaarheid. Opvallend is wel dat het toedienen van stam P9 via grond aan tomatenplanten niet tot groeireductie en weerbaarheid leidde, maar aan slaplanten wel. Zodra P9 via zaadcoating aan kiemende planten werd toegediend traden groeireductie en geïnduceerde weerbaarheid wel op. Er zou dus sprake kunnen zijn van een dichtheidsafhankelijk effect van P9 op plantweerbaarheid, maar dat effect zou ook gerelateerd kunnen zijn aan het moment van toediening en er zou ook nog sprake kunnen zijn van een plantensoort-afhankelijk effect.

Op basis van alle BA-behandelingen blijkt dat aantoonbare veranderingen in het microbioom niet altijd hoeven samen te vallen met aantoonbare veranderingen in het secundaire metabooloom van planten. In vier behandelingen was er sprake van een microbioom en een metabooloom effect (met stammen TV02, FE9901 en F52 in tomaat, en met stam P9 in sla). Het is in deze gevallen nog steeds aannemelijk dat veranderingen in het microbioom leiden tot verschuivingen in het metabooloom van de plant en vice versa. Hiermee zou er dan sprake kunnen zijn van een dynamische interactie tussen gastheerplant en diens microbioom. Echter, het bleek ook duidelijk dat microbioom-verschuivingen niet perse hoefden te leiden tot metabooloom-

verschuivingen en dat deze dynamische interactie in een relatief beperkt aantal gevallen aantoonbaar optrad.

Ten slotte lijkt het erop dat zaadcoating met stam P9 tot een betere interactie met de plant leidt, maar dat de beperkte overlevingsduur van stam P9 op het gecoate zaad verdere praktische toepassingen nog in de weg staat. Verlenging van de overlevingstijd van de toegevoegde stam op het zaad zou tot verbeterde zaadbehandelingen kunnen leiden en daarmee nieuwe perspectieven bieden om planten in een vroeg ontwikkelingsstadium te behandelen met een biologisch preparaat. Op basis van de waargenomen verschillen in het effect op tomatenplanten door de wijze van toediening, via zaad of via grond, lijkt de werking van stam P9 via zaadcoating te worden versterkt.

4.2 Conclusies

- Effecten van toegediende BA's op het microbiom en metaboolom van planten is uiteenlopend en stam-afhankelijk.
- Effecten van BA's, die als actieve component in biologische producten op planten worden toegepast, leiden tot veranderingen in het microbiom en over de effecten van deze veranderingen bestaat op dit moment nog onduidelijkheid.
- Toegepaste BA's kunnen 'universele microbiom inducers' zijn, zoals aangetoond bij stam FE9901 in tomaat, sla en chrysant, maar kunnen ook 'universele metaboolom inducers' zijn, zoals aangetoond met stam P9 in tomaat en sla.
- Stam P9 stimuleert de weerbaarheid tegen biotische stressfactoren in tomaat en sla via inductie van specifieke secundaire metabolieten waardoor groei in eerste instantie afneemt, maar de weerbaarheid wordt verhoogd.
- Effectiviteit van stam P9 in tomatenplanten wordt verhoogd door bacteriën via zaadcoating aan kiemende planten toe te dienen. Echter, de korte overlevingsduur van stam P9 op tomatenzaad beperkt op dit moment nog de toepasbaarheid van zaadcoating als middel om weerbaarheid via stam P9 in tomatenplanten te verhogen.

Literatuur

Hardoim, P., van Overbeek, L., Berg, G., Pirttilä, A., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., and Sessitsch, A (2015) The Hidden World Within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79, 293-320.

Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>

Köhl J, Kolnaar R and Ravensberg WJ (2019) Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Front. Plant Sci.* 10:845. doi: 10.3389/fpls.2019.00845

Van Overbeek, L.S., Eberl, L., Givskov, M., Molin, S., and van Elsas, J.D. 1994. Induced stress resistance in *Pseudomonas fluorescens* residing in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4202-4208.

Andreote, F.D., Araújo, W.L., Azevedo, J.L., Van Elsas, J.D., Nunes da Rocha, U. and Van Overbeek, L.S., 2009, Endophytic colonization of potato (*Solanum tuberosum* L.) by a novel competent bacterial endophyte, *Pseudomonas putida* strain P9, and its effect on associated bacterial communities. *Appl. Environ Microbiol.* 75: 3396-3406.

Inceoğlu, O, Falcão Salles, J., van Overbeek, L. and van Elsas, J.D. 2010 Effects of plant genotype and growth stage on the Betaproteobacterial communities associated with different potato cultivars in two fields. *Appl. Environ Microbiol.* 76: 3675-3684.

Akkermans, A. D. L., van Elsas, J. D., & de Bruijn, F. J. (1995). *Molecular microbial ecology manual*. Kluwer Academic Publishers.

Inceoğlu, Ö., van Overbeek, L., Falcão Salles, J. and van Elsas, J.D. 2012. The normal operating range of bacterial communities in soil used for potato cropping. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 1160 – 1170.

Messelink, G.J., Leman, A., van Holstein-Saj, R., van Tol, R., Vijverberg, R., Elfferich, C., Catalá Senent, L., Huang, T-Y, Shresta, K., Kruidhof, H.M. (2019) Nieuwe mogelijkheden voor de bestrijding van trips in de sierteelt onder glas. Rapport GTB-895. DOI, 10.18174/503830.

Nunes da Rocha, U., Plugge, C., George, I., Jan Dirk van Elsas and Leonard Simon van Overbeek. (2013) The rhizosphere selects for particular groups of *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia*. PLoSOne 8 e82443.

Dankwoord

Bij deze willen wij iedereen bedanken die betrokken zijn geweest bij de planning en realisatie van het project. Met name willen we bedanken: Helma Verberkt, Robert Stolker, Liesbeth van der Heijden, Manja Hoogeboom, Gerbert Hiddink, Joop van Doorn, Pauline Bernardo, Olesya Khrabrykh, Anne Peereboom, Carola Peters, Gerben Messelink, Hessel van der Heide, Laura Catalá Senent, Valeria Chiatti, Verónica Barajón Santos, Gwennaëlle Henry, Juliane Ferreira, Lina Russ, Marc Hendriks, Dirk-Jan Valkenburg, Els Nijhuis en Beatriz Andreo Jimenez.

Correspondentieadres voor dit rapport:

Postbus 69
6700AB, Wageningen
Droevendaalsesteeg 1

T +31 (0)317 48 06 06

<https://www.wur.nl/en/Research-Results/Research-Institutes/plant-research/Biointeractions-Plant-Health.htm>

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, 7.200 medewerkers (6.400 fte) en 13.200 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.
