

OPTIMALISATIE EN GEBRUIK VAN HET *ZYMOSEPTORIA*- TARWE PATHOSYSTEEM VOOR HET TESTEN VAN NIEUWE BIOCONTROLE ORGANISMEN

Aantal woorden: 15817

Thomas De Maeyer

Stamnummer: 01504555

Promotoren: Prof. dr. ir. Kris Audenaert, prof. dr. ir. Monica Höfte

Tutor: dr. ir. Maarten Ameye

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad in Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie

Academiejaar: 2020-2021

Deze pagina is niet beschikbaar omdat ze persoonsgegevens bevat.
Universiteitsbibliotheek Gent, 2022.

This page is not available because it contains personal information.
Ghent University, Library, 2022.

WOORD VOORAF

Allereerst wil ik mijn thesis promotor Prof. Dr. Ir. Kris Audenaert oprecht bedanken voor zijn onvoorwaardelijke steun, motivatie en begeleiding van het begin tot het einde van deze thesis. Het zou zonder hem niet mogelijk zijn geweest dit werk te voltooien. Ik wil ook dr. Ir. Maarten Ameye bedanken voor zijn hulp bij deze thesis en Noémie De Zutter voor haar feedback bij het schrijven van de thesis. Voor het praktisch werk ben ik dankbaar voor alle leden van het LAMP-labo die klaar stonden wanneer ik hulp nodig had. Deze thesis was een ongelofelijke ervaring en één waar ik zeer dankbaar voor ben om ze te mogen meemaken.

Ook wil ik mijn studiegenoten bedanken voor de ontspannende pauzes tussendoor.

Mijn familieleden en vrienden wil ik bedanken voor hun steun doorheen de jaren.

Ten slotte wil ik al mijn ouders en broer bedanken voor de steun en luisterend oor tijdens de moeilijke momenten, zonder hen zou dit allemaal niet mogelijk zijn geweest.

INHOUDSTAFEL

Woord vooraf	3
Inhoudstafel	4
Abstract	6
Abstract	7
Lijst met afkortingen	8
Lijst met figuren	9
Lijst met tabellen	12
1 Inleiding	13
1.1 <i>Septoria tritici</i> blotch	13
1.1.1 <i>Zymoseptoria tritici</i>	13
1.1.2 Infectiefases van STB	15
1.1.3 Moleculaire interactie tussen plant en pathogeen	18
1.2 Biocontrole	19
1.2.1 Inleiding	19
1.2.2 Biocontrole mechanismen	21
1.2.3 Vergelijking chemische fungiciden met biocontrole	25
1.3 <i>Actinobacteria</i>	25
1.3.1 Biologie	25
1.3.2 Taxonomie	26
1.3.3 Algemene toepassingen van <i>Actinobacteria</i>	27
1.3.4 Biocontrole applicatie van <i>Actinobacteria</i>	28
1.4 Belang van reproduceerbare infectiesystemen	31
2 Materialen en methoden	33
2.1 <i>Zymoseptoria tritici</i> : groei en sporenvorming	33
2.2 <i>Actinobacteria</i> stammen	34
2.3 <i>In vitro</i> antagonisme	35
2.4 Op punt stellen van de infectie	35
2.5 Ziektevoortgang: microscopische analyse	37
2.5.1 Lactofenol blue staining voor opvolging van <i>Z. tritici</i> in de plant	37
2.6 Eindmeting van de infectie	38

2.7	<i>In planta</i> biocontrole assay	38
2.8	RNA extractie en Real Time-PCR	39
2.9	Statistische analyse	39
3	Resultaten	40
3.1	Sporenvorming op verschillende media	40
3.2	<i>In vitro</i> antagonisme van <i>Actinobacteria</i>	41
3.3	Visualisatie <i>Z. tritici</i> infectie op tarwe bladeren	47
3.4	Impact van <i>Streptomyces rimosus</i> LMG 19352 en <i>Rhodococcus</i> sp. R-43120 op tarwebladeren geïnfecteerd met <i>Z. tritici</i>	49
3.5	Impact van <i>Streptomyces rimosus</i> LMG 19352 en <i>Rhodococcus</i> sp. R-43120 op sleutelgenen in de biosynthese van jasmijnzuur en salicylzuur	54
4	Discussie	56
5	Conclusie	59
	Referenties	60
	Bijlagen	69

ABSTRACT

Septoria tritici blotch (STB), veroorzaakt door de ascomycete *Zymoseptoria tritici* is één van de belangrijkste ziektes bij tarwe in gematigde teeltgebieden. STB heeft een enorme impact op de opbrengst van tarwe. Onderzoek naar gewasbeschermingsmiddelen is daarom zeer belangrijk. Chemische gewasbescherming zouden een eenvoudige oplossing kunnen bieden, maar een groeiend ecologisch publiek bewustzijn leidt tot een vermindering van chemische bestrijdingsmiddelen tegen plantenziekten. Anticiperend op deze veranderingen, wendt de industrie zich nu meer en meer tot bio-actieve bacteriële isolaten en zoekt men naar nieuwe innovatieve strategieën om ze in het veld toe te passen.

In een eerste deel van dit eindwerk werd de infectie van *Z. tritici* op punt gesteld. Verschillende infectie methodologieën werden uitgetest en de kolonisatie van tarwe door de schimmel werd opgevolgd via microscopie. Het op punt stellen van deze infectie is niet vanzelfsprekend door de zeer lange asymptomatische fase die de pathogeen doorloopt alvorens de symptomen zichtbaar worden op tarwe bladeren.

Eens de infectie op punt stond werd onderzocht of actinobacteriën konden worden ingezet als biocontrole organismen tegen *Z. tritici*. Actinobacteriën zijn veelzijdige biocontrole-organismen dankzij hun genoom dat uitgerust is met heel wat secundaire metaboliet clusters. Bovendien komen ze vaak voor in bodems en organisch materiaal waardoor ze kunnen worden ingezet bij het reduceren van het primair inoculum van verschillende plant pathogene schimmels. In deze thesis werden enkele Actinobacteriën onderzocht op hun direct *in vitro* antagonistische activiteit tegen *Z. tritici*. Verder werd de waarde van twee Actinobacteriën als biocontrole stammen *in planta* onderzocht. *Streptomyces rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 zijn twee stammen die in eerder onderzoek hun waarde bewezen hadden tegen een andere belangrijke pathogeen van tarwe namelijk *Fusarium graminearum* die aarfusarium veroorzaakt. Dit onderzoek had bovendien aangetoond dat beide bacteriën de plant beschermden via twee verschillende mechanismen namelijk een direct antagonisme enerzijds en een inductie van het intrinsiek plantafweersysteem anderzijds. In deze thesis konden we de biocontrole capaciteit van beide stammen tegen *Z. tritici* niet bevestigen.

ABSTRACT

Septoria tritici blotch (STB), caused by the ascomycete *Zymoseptoria tritici* is one of the most important diseases in wheat in temperate cultivation areas. STB has a huge impact on the wheat yield. Research on innovative plant protection products is therefore very important. Chemical plant protection offers a simple solution, but a growing ecological public awareness causes a reduction in chemical pesticides. Anticipating these changes, the industry has turned to bio-active bacterial isolates and explores new innovative strategies to implement in the field. In the first part of this thesis, the infection of *Z. tritici* was established and optimized. Different infection methodologies were tested and the colonization of wheat by the fungus was microscopically monitored. The fine-tuning of the infection is not evident due to the very long asymptomatic phase of the pathogen before the symptoms become visible on wheat leaves.

Using the optimized infection, we investigated the potential of two promising *Actinobacteria* as biocontrol agents against *Z. tritici*. *Actinobacteria* are versatile biocontrol organisms thanks to their genome that contains many secondary metabolite clusters. In addition, they often occur in soil and organic matter, which means that they can be used in reducing the primary inoculum of various plant pathogenic fungi. In this thesis, both *Actinobacteria* were investigated for their direct *in vitro* antagonistic activity against *Z. tritici*. Furthermore, the value of two actinobacteria as biocontrol strains *in planta* was investigated. *Streptomyces rimosus* LMG 19352 and *Rhodococcus* sp. R-43120 are two strains that have been proven in previous research against another important wheat pathogen, *Fusarium graminearum*, which causes *Fusarium* head blight. This study had also shown that both bacteria protected the plant through two different mechanisms, namely a direct antagonism on one hand and an induction of the intrinsic plant defense system on the other. In present thesis, we could not confirm the biocontrol capacity of both strains against *Z. tritici*.

Trefwoorden: *Zymoseptoria tritici*, *Actinobacteria*, *Septoria tritici* blotch, biocontrol, tarwe

LIJST MET AFKORTINGEN

STB	<i>Septoria tritici</i> blotch
HR	Hypersensitieve respons
ROS	Reactive Oxygen Species
ROI	Region of Interest
SAR	Systemisch verworven resistentie
ISR	Geïnduceerde systemische resistentie
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PTI	PAMP-triggered immunity
CEBiP	Chitin elicitor-binding protein precursor
CERK1	Chitin elicitor receptor kinase 1 precursor
LysM	Lysinmotief
MAPK	Mitrogen-activated protein kinase
BCA	Biocontrol agents
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
PBS	Phosphate buffered saline
PGNR	Plant growth-promoting <i>Rhizobacteria</i>
PCR	Polymerase chain reaction
DMI	Demethylatie inhibitor
ICS	Isochorismate synthase
PAL	Phenylalanine ammonia lyase
LOX	Lipoxygenase

LIJST MET FIGUREN

Figuur 1: Bladvlekkenziekte veroorzaakt door <i>Zymoseptoria tritici</i> bij tarwe.....	13
Figuur 2: Overzicht van de levenscyclus van <i>Z. tritici</i> (Field crop Disease Victoria, 2020). ...	14
Figuur 3:Overzicht infectiefases van <i>Z. tritici</i> . Asco- of pycnidiosporen landen op het tarwe blad waar ze na de ontkieming binnendringen via de stomata. De substomatale holte wordt gekoloniseerd, gevolgd door hyfeninvasie van de apoplast en vorming van pycnidia. Hierna volgt de overgang van de biotrofe fase naar de necrotrofe fase, waar de plantencellen geprogrammeerde celdood ondergaan. Door afgifte van plantnutriënten wordt een snelle groei en proliferatie mogelijk gemaakt. De pycnidiosporen komen vrij bij waterspatten langs de stomata en verspreiden de infectie (Steinberg, 2015).....	17
Figuur 4: Voorstelling van moleculaire interacties tussen <i>Z. tritici</i> en tarwe. Schimmel-chitine wordt herkend door gastheerreceptoren Chitin Elicitor Binding Protein (CEBiP) en Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 (CERK1), waardoor MAP-kinasecascades worden geactiveerd en immuun activering bekomen wordt. Mg3LysM afkomstig van de schimmel verwijderd chitine om immuniteit te onderdrukken. Necrosis-Inducing Protein 1/2 (<i>ZtNIP1/2</i>) induceren gastceldood via een onbekend mechanisme (Duba et al., 2018).....	19
Figuur 5: Visuele voorstelling met waargenomen en voorspelde frequenties van het resistentiefenotype van 2004 tot 2011 in Frankrijk. Echte waarnemingen zijn weergegeven door stippen. De kleur in de stip geeft de waargenomen frequentie aan. De achtergrondkleur van de kaart toont de regionale voorspelling van het model (Garnault et al, 2020).....	20
Figuur 6: Overzicht van de mechanismen waarmee biocontrol agents tegen ziekten kunnen beschermen (Newitt et al., 2019).....	22
Figuur 7: Taxonomie van de Actinobacteriën op basis van de lijst van prokaryotische namen met aanzien van nomenclatuur (LPSN) (Gao and Gupta, 2012).....	27
Figuur 8: schematische voorstelling van de in vitro plaat assay.....	35
Figuur 9: Foto's van de toegepaste infectiemethode. (A) Opgroeien van tarweplanten in potten (d=20 cm, h=25 cm) met 50 planten per pot. (B) Vochtige infectiekamer waarin gekookt bidest water werd toegevoegd. (C) Geïnfecteerde planten in de 100 % vochtige infectiekamers. De infectiemethode 1 (borstel) en infectiemethode 2 (spray) maakten gebruik van dezelfde infectiecompartimenten	36
Figuur 10: Grafische voorstelling van het aantal sporen (*10 ⁶ /ml) bij inoculatie van <i>Z. tritici</i> op verschillende media na 2 weken. De verschillende cijfers geven significante verschillen (P<0,05) weer.....	40
Figuur 11: Grafische voorstelling van het aantal sporen (*10 ⁶ /ml) bij inoculatie van <i>Z. tritici</i> op verschillende media na 7 weken. De verschillende cijfers geven significante verschillen (P<0,05) weer.....	40
Figuur 12. Groei van <i>Z. tritici</i> op PDA, YPDA and CDV8 medium. Bovenste panel top view, Onderste panel bottom view	41

Figuur 13: In vitro antagonisme van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op <i>Z. tritici</i> op PDA medium. De boxen tonen het 25% tot 75% kwartiel. De Whiskers omvatten de overige data met een maximum van 1.5 maal de interkwartielafstand.	42
Figuur 14: In vitro antagonisme van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op <i>Z. tritici</i> op CDV8 medium gedurende drie weken. De Whiskers omvatten de overige data met een maximum van 1.5 maal de interkwartielafstand.	43
Figuur 15: In vitro antagonisme van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op <i>Z. tritici</i> op YPDA medium gedurende drie weken. De boxen tonen het 25% tot 75% kwartiel. De Whiskers omvatten de overige data met een maximum van 1.5 maal de interkwartielafstand.....	44
Figuur 16: Effect van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op de groei van <i>Z. tritici</i> op PDA medium. De boxen tonen het 25% tot 75% kwartiel. De Whiskers omvatten de overige data met een maximum van 1.5 maal de interkwartielafstand. De verschillende letters geven significante verschillen ($P < 0,05$) weer tussen de behandelingen na verwerking via een one-way ANOVA analyse gevolgd door een post-hoc Tukey test met $p = 0,05$	45
Figuur 17: Effect van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op de groei van <i>Z. tritici</i> op CDV8 medium. De boxplots tonen het gemiddelde (horizontale lijn), het 25 en 75 percentiel bereik (boxen) en het tot 1.5x IQR (interquartile range). De verschillende letters geven significante verschillen ($P < 0,05$) weer tussen de behandelingen na verwerking via een one-way ANOVA analyse gevolgd door een post-hoc Tukey test met $p = 0,05$	46
Figuur 18: Effect van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op de groei van <i>Z. tritici</i> op YPDA medium. De boxplots tonen het gemiddelde (horizontale lijn), het 25 en 75 percentiel bereik (boxen) en het tot 1.5x IQR (interquartile range). De verschillende letters geven significante verschillen ($P < 0,05$) weer tussen de behandelingen na verwerking via een one-way ANOVA analyse gevolgd door een post-hoc Tukey test met $p = 0,05$	47
Figuur 19. Visualisatie van <i>Z. tritici</i> tijdens de asymptomatische fase van de infectie. A: na 2 dagen, B: na 3 dagen, C: na 5 dagen, D: na 10 dagen, E en F: na 14 dagen	48
Figuur 20: Microscopische observatie van kolonisatie van apoplastische ruimte en pycnidiumstructuur van T02596 <i>Z. tritici</i> -stam op tarwebladeren met behulp van lactofenolblauwkleuring over een periode van 4 weken	49
Figuur 21: Visuele symptomen op tarwebladeren na infectie door <i>Z. tritici</i> T02596 en behandeld met 0,05 % tween 80-oplossing, met <i>S. rimosus</i> LMG 19352 of met <i>Rhodococcus</i> sp. R-43120 na 4 weken.....	50
Figuur 22: Biocontrole capaciteit van <i>S. rimosus</i> LMG 19352 en <i>Rhodococcus</i> sp. R-43120 tegen <i>Z. tritici</i> (A) De oppervlakte niet necrotisch bladweefsel bij geïnfecteerde (grijze boxplots)/niet-geïnfecteerde (witte boxplots) en al dan niet behandelde tarwebladeren. De boxplots tonen het gemiddelde (horizontale lijn), het 25 en 75 percentiel bereik (boxen) en het tot 1.5x IQR (interquartile range). De oppervlakte wordt voorgesteld in aantal pixels. De data werden verwerkt via een one-way ANOVA analyse met post hoc Tukey test ($p = 0,05$). (B) Afbeelding van Region of Interest (ROI) filter bij een gezond tarweblad	51

Figuur 23: Microscopische observatie van behandeling met <i>S. rimosus</i> LMG 19352 of <i>Rhodococcus</i> sp. R-43120 van tarwebladeren met behulp van lactofenolblauwkleuring over een periode van 4 weken	52
Figuur 24: Microscopische observatie van behandeling met <i>S. rimosus</i> LMG 19352 of <i>Rhodococcus</i> sp. R-43120 van T02596 <i>Z. tritici</i> geïnfecteerde tarwebladeren met behulp van lactofenolblauwkleuring over een periode van 4 weken	53
Figuur 25: Expressie profiel van isochorismaat synthase (ICS) na vier weken bij verschillende behandelingen. De boxplots tonen het gemiddelde (horizontale lijn), het 25 en 75 percentiel bereik (boxen) en het tot 1.5x IQR (interquartile range). De verschillende letter geven significante verschillen ($P < 0,05$) weer tussen de behandelingen na verwerking via een two way ANOVA analyse gevolgd door een post-hoc Tukey test met $p = 0.05$. Hoofdletters geven de significante verschillen bij weken weer, kleine letters de significante verschillen bij behandelingen.....	55

LIJST MET TABELLEN

Tabel 1: Voorbeelden van antibiotica producerende Actinobacteria als bacteriële biologische bestrijdingsmiddelen (Raaijmakers et al., 2002; Yang et al., 2013; El-Refai et al., 2011; Owen et al., 2017)	28
Tabel 2: Voorbeelden van Actinobacteriën met productie van hydrolytische enzymen (Yang et al., 2013)	29
Tabel 3: Voorbeelden van Actinobacteriën die hyperparasitisme vertonen (Yang et al., 2013, Sutherland en lockwood, 2009)	30
Tabel 4: Oplijsting gebruikte media met hun ingrediënten.	33
Tabel 5: Actinobacteriale stammen voor biocontrole testen	34
Tabel 6: Overzicht van de uitgevoerde inoculaties per plant	38

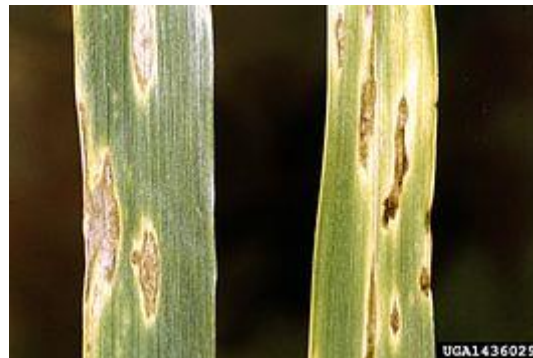
1 INLEIDING

1.1 *Septoria tritici* blotch

1.1.1 *Zymoseptoria tritici*

1.1.1.1 Situering

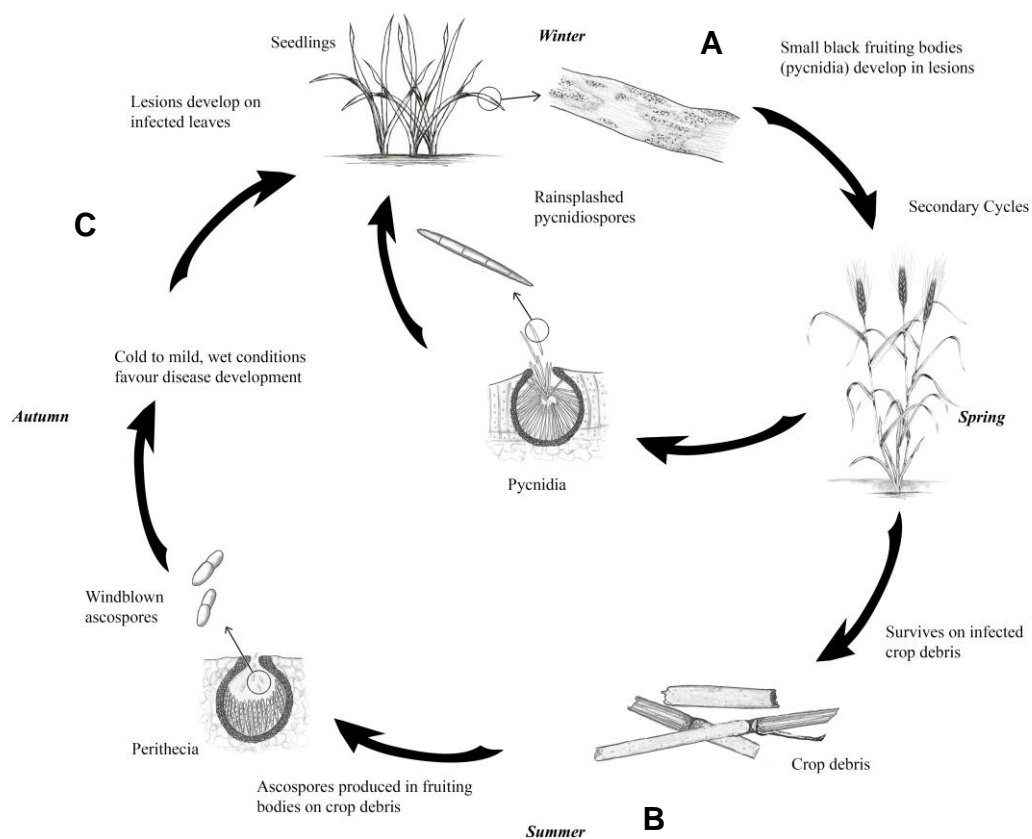
De ascomyceet *Zymoseptoria tritici* (teleomorph: *Mycosphaerella graminicola* Fückel J. Schröt) veroorzaakt de bladvlekkenziekte (*Septoria tritici* blotch, STB), die een ernstige bedreiging vormt voor de teelt van tarwe. Tarwe wordt verbouwd over heel de wereld in gematigde klimaten en is één van de belangrijkste graangewassen voor de mens. Tarwe wordt gebruikt voor verschillende toepassingen, waaronder voeding, diervoeder, bierproductie en biobrandstoffen (Fones en Gurr, 2015). In 2019 was de wereldwijde tarweproductie zo'n 766 miljoen ton. Ongeveer een vijfde van de productie bevindt zich in Europa (FAOSTAT, 2020).



Figuur 1: Bladvlekkenziekte veroorzaakt door *Zymoseptoria tritici* bij tarwe

1.1.1.2 Algemene levenscyclus

Na het kiemen van ascosporen of asexuele pycnidiosporen op het blad, dringen hyfen via de stomata de apoplast van het mesofyl weefsel binnen. Hierna ontstaan chlorotische laesies waarbinnen de sporenstructuren gevormd worden (A op Figuur 2). De ascosporen worden via de wind verspreid over langere afstanden, terwijl de pycnidiosporen zorgen voor besmetting van naburige planten via opspattende regendruppels. Per groeiseizoen kunnen meerdere infectiecycli plaatsvinden en dit maakt van STB een polycyclische ziekte. De pathogeen overleeft van het ene seizoen op het andere in stoppels (B op Figuur 2). In de herfst of vroege winter komen na regen de ascosporen vrij uit vruchtlichamen die ingebed lagen in de stoppels van eerder geïnfekteerde planten (C op Figuur 2). Zo is de cyclus rond (Steinberg, 2015; Ponomarenko et al., 2011).



Figuur 2: Overzicht van de levenscyclus van *Z. tritici* (Field crop Disease Victoria, 2020).

De verspreiding van deze sporen wordt mede bepaald door de regen, waardoor STB ernstiger is in jaren met meer regenval. Een combinatie van wind en regen zorgt voor de meest gunstige omstandigheden voor verspreiding van deze ziekte binnen gewassen (Steinberg, 2015; Ponomarenko et al., 2011).

1.1.1.3 Symptomen en gevolgen

STB valt te herkennen door de gele of bruingele vlekken die op het blad ontstaan. De vlekken komen aanvankelijk vooral voor op de lager gelegen bladeren die in contact komen met de grond. Laesies op volwassen bladeren zijn meestal lang, smal en afgebakend door bladnerven. Bij zaailingen of bladeren die jong waren bij infectie kunnen de laesies onregelmatig of elliptisch gevormd zijn (Ponomarenko et al., 2011). Naarmate de laesies ouder worden, verschijnen er zwarte stippen in de laesiescentra. Dit zijn de pycnidia van de schimmel. De laesies ontstaan door necrotische beschadiging van de plantencellen (Holloway en Henry, 2020; syngenta, 2020).

STB vormt de grootste bedreiging voor tarwe in Centraal-Europa en in landen met een vergelijkbaar klimaat, hoge luchtvochtigheid en lage gemiddelde temperaturen tijdens het groeiseizoen (Ponomarenko et al., 2011). Het is een plantpathogeen die wereldwijd enorme oogstverliezen veroorzaakt (Fones en Gurr, 2015). Ernstige epidemieën van STB kunnen de tarweopbrengst met 35 tot 50 % verminderen. In Europa en de Verenigde Staten worden de jaarlijkse verliezen door STB respectievelijk geschat op 400 miljoen dollar en meer dan 275 miljoen dollar per jaar (Ponomarenko et al., 2011). In een recentere studie van Fones en Gurr, (2015) zijn de jaarlijkse verliezen toegenomen. Er werd gerapporteerd dat de verliezen voor de landen Frankrijk, Duitsland en het Verenigd Koninkrijk door STB op respectievelijk 700, 500 en 240 miljoen euro per jaar werd geschat (Fones en Gurr, 2015).

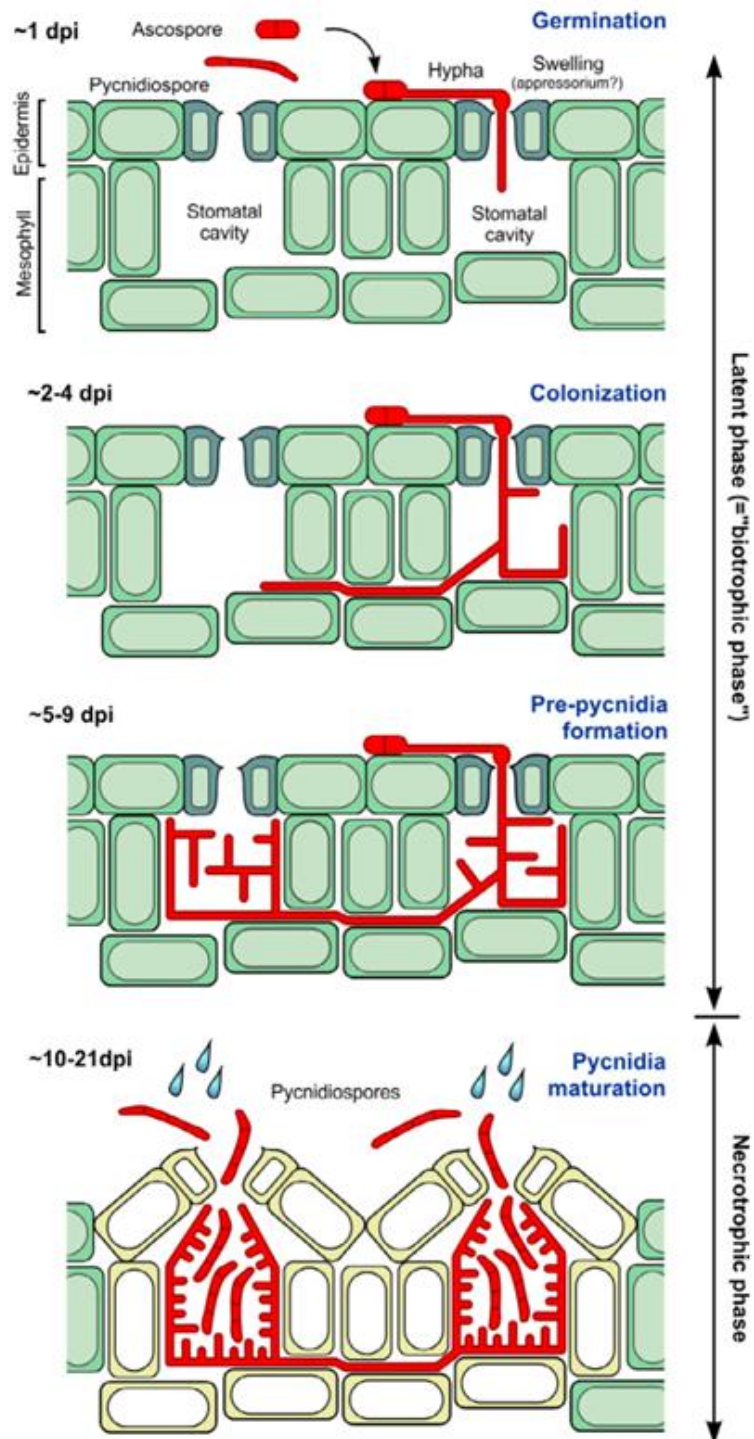
1.1.2 Infectiefases van STB

Z. tritici is een hemibiotroof met verschillende infectiefases. Zoals eerder al aangegeven bij de bespreking van de ziektecyclus, landen sporen op het bladoppervlak en vormen de start van de inoculatie. Wanneer deze sporen ontkiemen, dringen ze via de stomata binnen (Palma-Guerrero et al., 2016; Duba et al., 2018; Kettles en Kanyuka, 2016). Zodra de pathogeen het bladweefsel is binnengedrongen, dringt hij de apoplastische ruimte tussen de mesofylcellen binnen. Hier vindt een langzame groei van de hyfen plaats die asymptomatisch verloopt. Er is tot nu toe nog geen bewijs van penetratie van gastheercellen of vorming van gespecialiseerde structuren zoals haustoria of appressoria. Het is ook niet helemaal duidelijk hoe de schimmel de nodige nutriënten vindt. De eigen lipiden en vetzuren worden gebruikt als energiebron. Er wordt ook gesuggereerd dat gastheerlipiden gebruikt worden en dat eiwitten die vrijkomen uit de chloroplasten worden gemetaboliseerd (Goodwin et al., 2011).

De eerste infectiefase wordt gekenmerkt door de afwezigheid of zeer zwakke afweerreactie van de gastheer. Dit kan erop wijzen dat *Z. tritici* in staat is om een immuunreactie te onderdrukken of te vermijden. Hierbij moet vermeld worden dat de verhouding tussen de schimmel -en tarwebiomassa zeer laag is, wat ervoor kan zorgen dat de immuunreactie niet detecteerbaar is (Steinberg, 2015; Kettles en Kanyuka, 2016). Een voorbeeld waarbij *Z. tritici* de immuunreactie van de plant onderdrukt, wordt waargenomen bij de Hypersensitieve Response (HR) van de plant. HR is een plantverdedigingsroute waarbij geprogrammeerde celdood, fytoalexine productie en de accumulatie van reactieve zuurstofsoorten (*Reactive Oxygen Species*, ROS) betrokken zijn om verdere pathogeengroei te beperken. HR wordt door de gastheer meestal gebruikt om biotrofe pathogenen te bestrijden en kan systemische verworven resistentie (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) opwekken door het genereren van ROS, zoals waterstofperoxide (H₂O₂). *Z. tritici* zal endogene peroxidasen produceren, en zal op deze manier in staat zijn om het gegenereerde H₂O₂ af te breken waardoor de karakteristieke oxidatieve burst en dus de ROS, samen met de HR worden onderdrukt (Brennan et al., 2019).

De asymptomatische, biotrofe of latente fase kan variëren tussen 6 tot 36 dagen afhankelijk van plantgenotype, virulentie van de pathogeen en omgevingsfactoren (Steinberg, 2015; Kettles en Kanyuka, 2016). Na de latente fase is er een snelle overgang naar de symptomatische of necrotrofe fase. De vorming van pycnidia of vruchtlichamen wordt geïnitieerd in de substomatale holtes. Ze worden gevormd door groei, vertakking en versmelting van hyfen. Naarmate de ongeslachtelijke vruchtlichamen zich ontwikkelen, verschijnen er chlorotische laesies. De laesies worden meestal gevolgd door necrotische gebieden. De necrotische fase wordt gekenmerkt door de herprogrammering van zowel gastheer- als pathogeentranscriptomen, desintegratie van gastheerweefsels resulterend in celdood en afgifte van voedingsstoffen in de apoplast met als gevolg een aanzienlijke opbouw van schimmelbiomassa.

Het vergroten van de schimmelbiomassa leidt tot een grote proliferatie van pycnidiosporen. De sporen komen vrij uit de vruchtlichamen en kunnen verdere infecties initiëren wanneer ze via opspattende regendruppels naar gezonde weefsels worden verspreid (Steinberg, 2015; Kettles en Kanyuka, 2016).



Figuur 3: Overzicht infectiefases van *Z. tritici*. Asco- of pycnidiosporen landen op het tarwe blad waar ze na de ontkieming binnendringen via de stomata. De substomatale holte wordt gekoloniseerd, gevolgd door hyfeninvasie van de apoplast en vorming van pycnidia. Hierna volgt de overgang van de biotrofe fase naar de necrotrofe fase, waar de plantencellen geprogrammeerde celdood ondergaan. Door afgifte van plantnutriënten wordt een snelle groei en proliferatie mogelijk gemaakt. De pycnidiosporen komen vrij bij waterspatten langs de stomata en verspreiden de infectie (Steinberg, 2015).

1.1.3 Moleculaire interactie tussen plant en pathogeen

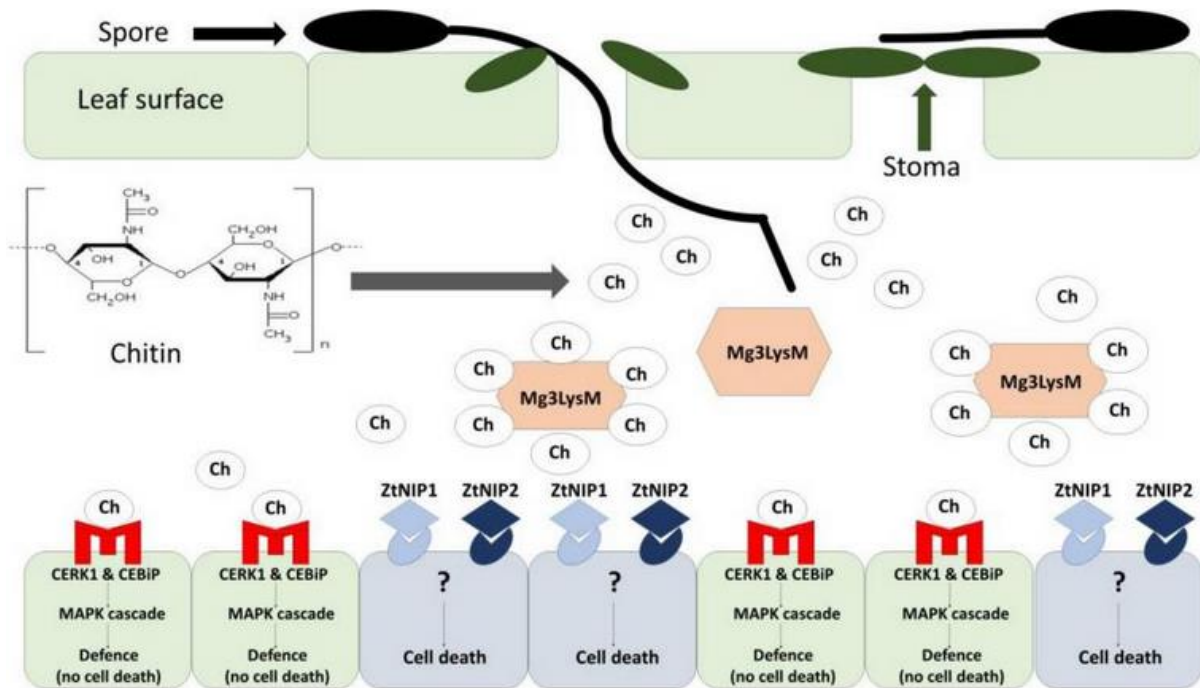
Planten hebben door de voortdurende evolutionaire wisselwerking met de pathogeen geavanceerde afweermechanismen ontwikkeld. Ze kunnen immers niet vluchten van een pathogeenaanval en zetten alles in op verdediging. Door deze mechanismen is het immuunsysteem in staat om niet-eigen moleculen te herkennen die de aanwezigheid van een indringer verraden. Deze niet-eigen moleculen die een aangeboren immuunrespons veroorzaken, worden pathogeen-geassocieerde moleculaire patronen (PAMP's) genoemd (Jones en Dangl, 2006). Een voorbeeld hiervan is chitine, dat een belangrijke bouwsteen van de celwand bij schimmels is. Een succesvolle immuun activering na PAMP-opwekking leidt tot PAMP-getriggerde immuniteit (PTI). Chitine zal afweerreacties uitlokken bij de gastheer. Vanuit het standpunt van de schimmel is het dus heel belangrijk dat de immuunrespons die wordt geïnduceerd door de respectievelijke PAMP's (bv. chitine) wordt onderdrukt. Dit gebeurt door de productie van effectoren en de respons bij de plant die daarop volgt is effector triggered susceptibility (ETS). Deze effectoren kunnen op hun beurt herkend worden door receptoren in de plant, waardoor de plant de strijd wint via de zogenoemde effector-triggered immuniteit (ETI). Wat dan ontstaat is een evolutionair zigzag mechanisme waarin de pathogeen zijn effectormoleculen aanpast en opnieuw de plantafweer doorbreekt en zo verder.

1.1.3.1 Presymptomatische effectoren

Voor de interactie van *Z. tritici* met tarwe is chitine een heel belangrijke PAMP die al snel wordt herkend door de plant in de vroegste fases van de kolonisatie. De chitine fragmenten van *Z. tritici* worden herkend door het chitin-elicitor binding protein (CEBiP) en het chitin-elicitor receptor kinase 1 (CERK1). CEBiP is een membraanewit dat een sterke glycosylering ondergaat tijdens de chitine-interacties tussen plant en pathogeen. Het lysinemotief in het extracellulaire domein van CEBiP zal chitine herkennen en binden, maar CEBiP heeft geen intracellulair signaleringsdomein en is niet in staat een immuun signaal te initiëren. Het transmembraanewit CERK1 omvat een extracellulair domein met een lysinemotief en een intracellulair kinasedomein. CERK1 is wel in staat om een signaaltransductiecascade te induceren. Tijdens de asymptotische fase zullen *Z. tritici*-genen coderen voor drie eiwitten met lysinemotieven (LysM): Mg1LysM, Mg3LysM en MgxLysM. Het Mg3LysM-motief speelt een sleutelrol in de interacties tussen tarwe en *Z. tritici*, omdat Mg3LysM het enige chitine-bindende lysinemotief is dat de immuunrespons van de gastheer in het eerste stadium van infectie onderdrukt (Kettles en Kanyuka, 2016; Duba et al., 2018). Wanneer chitine afkomstig van de schimmelcelwand wordt herkend, activeren mitogen activated protein kinases (MAPK), een afweerreactie (Figuur 4). Door de sequestering van chitine aan Mg3LysM wordt de binding van chitine aan de corresponderende receptor vermeden en wordt bijgevolg geen immuunreactie geïnitieerd (Duba et al., 2018).

1.1.3.2 Laat pre-symptomatische/necrose geassocieerde effectoren

Naast een verdedigingsrespons op basis van snelle herkenning van PAMP's tijdens de asymptotische fase, ontstaat er ook een verdedigingsrespons in de laat pre-symptomatische tot necrotische fase. Van de werkingsmechanismen van de door *Z. tritici* geproduceerde necrose-inducerende eiwitten (NEP1, ZtNIP1) is op dit moment weinig bekend. Hun aanwezigheid wijst wel op interacties tussen necrotische factoren en de afweerreactie van tarwe (Figuur 4) (Duba et al., 2018).



Figuur 4: Voorstelling van moleculaire interacties tussen *Z. tritici* en tarwe. Schimmel-chitine wordt herkend door gastheerreceptoren Chitin Elicitor Binding Protein (CEBiP) en Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 (CERK1), waardoor MAP-kinasecascades worden geactiveerd en immuun activering bekomen wordt. Mg3LysM afkomstig van de schimmel verwijdert chitine om immuniteit te onderdrukken. Necrosis-Inducing Protein 1/2 (ZtNIP1/2) induceren gastceldood via een onbekend mechanisme (Duba et al., 2018).

1.2 Biocontrole

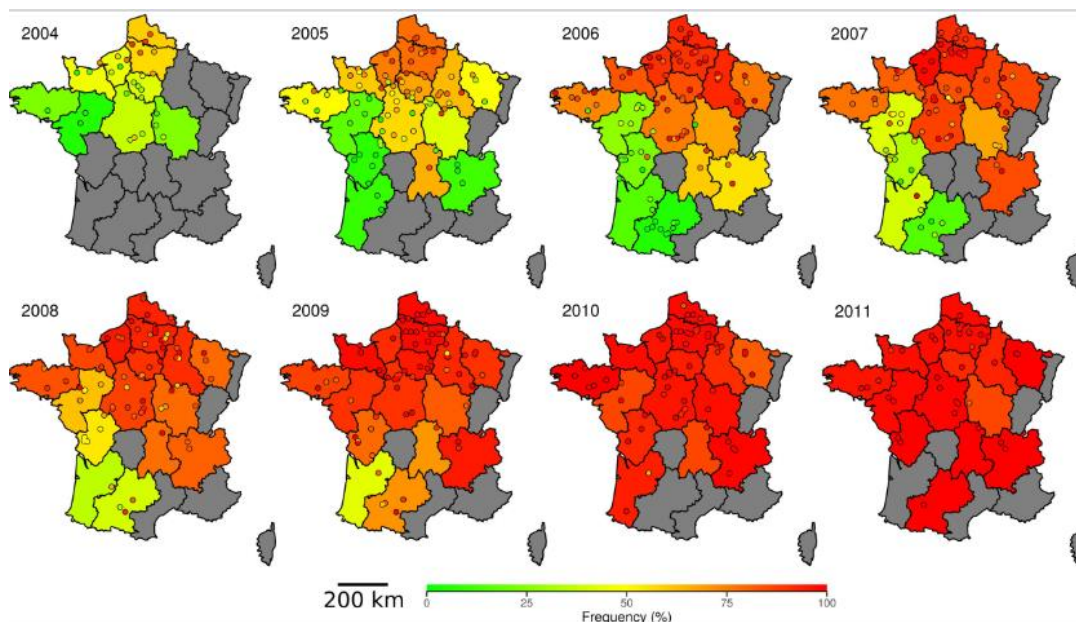
1.2.1 Inleiding

Plantenziekten moeten onder controle worden gehouden om de kwaliteit en opbrengst van de gewassen te garanderen. Er kunnen verschillende strategieën worden gebruikt om ziektes bij planten te voorkomen, te verminderen of te beheersen. Naast goede landbouw- en tuinbouwpraktijken, zijn telers vaak sterk afhankelijk van chemische pesticiden (Chandrashekara KN. et al., 2012).

Door het intensieve gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen tegen een diverse range van plantenpathogenen, hebben tal van pathogenen een resistentie tegen deze verbindingen ontwikkeld. Het regionaal fungicidegebruik van mensen werd geïdentificeerd als de belangrijkste component in de evolutie van fungicideresistentie. Dit werd geïllustreerd in de studie van Garnault et al., (2020). Zij gebruikten *Z. tritici* als een model om resistentie tegen fungiciden in kaart te brengen (Figuur 5). *Z. tritici* is een zeer interessant model gezien de genomplasticiteit, de grote populatie isolaten die aanwezig is, de hoge genetische diversiteit en de aanwezigheid van een seksuele en asexuele cyclus. Bovendien bedraagt het fungicide gebruik tegen STB in West-Europa bijna 70% van alle fungicide gebruik (Fones en Gurr, 2015). Hierdoor is *Z. tritici* een pathogeen die heel snel resistentie ontwikkelt tegen fungiciden met één mode-of action.

Er zijn veel van dergelijke fungiciden momenteel in gebruik. Strobilurinen bijvoorbeeld interfereren met de elektronentransportketen in schimmels (Qols: inhibitoren van de oxidatieve fosforylatie en dus de respiratie in de mitochondriën). Fungiciden zoals (tri)azolen en prochloraz die werken ter hoogte van de ergosterol biosynthese, werken als sterol 14 α -demethylatie inhibitors (DMIs) en vormen momenteel de belangrijkste groep aan fungiciden (Leroux en Walker, 2011).

Uit het onderzoek van Garnault et al. (2020) bleek dat bijvoorbeeld voor de strobilurine fungiciden in een periode van 8 jaar, het percentage aan resistente *Z. tritici*-isolaten steeg van ongeveer 0-50% in 2004 tot een resistentiegraad van 100% in alle onderzochte regio's in 2011. Analoge resultaten werden bekomen voor de triazolen.



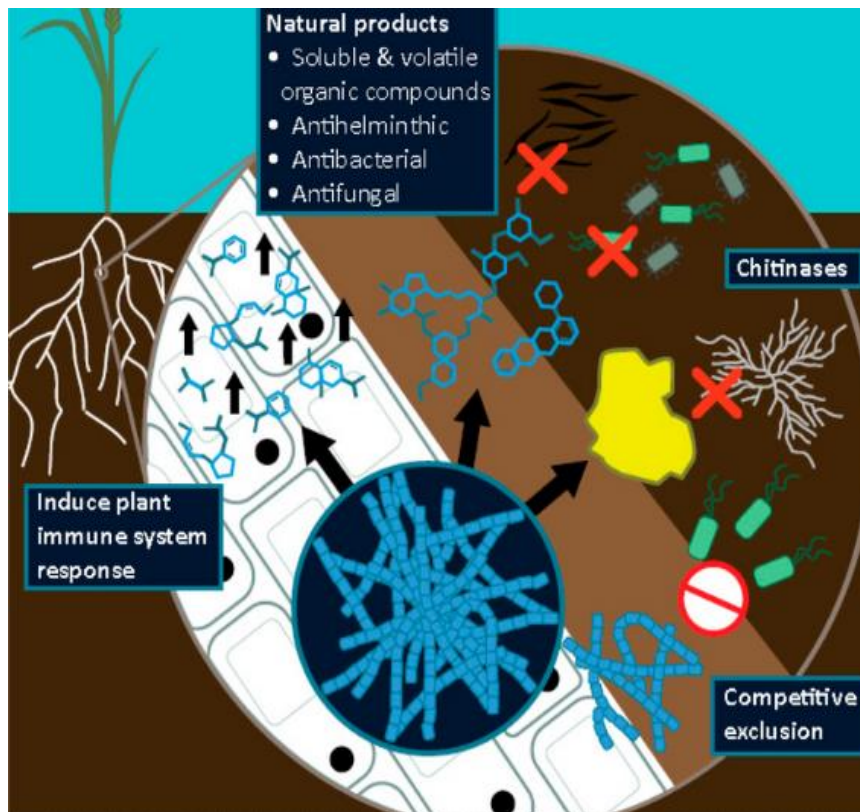
Figuur 5: Visuele voorstelling met waargenomen en voorspelde frequenties van het resistentiefenotype van 2004 tot 2011 in Frankrijk. Echte waarnemingen zijn weergegeven door stippen. De kleur in de stip geeft de waargenomen frequentie aan. De achtergrondkleur van de kaart toont de regionale voorspelling van het model (Garnault et al, 2020).

Naast de hierboven geïntroduceerde resistentie, zijn er de nadelige effecten van de chemicaliën op het milieu (Wightwick et al., 2010). Hieruit ontstaat een nood aan nieuwe mogelijkheden om plantenziekten te bestrijden. Actinobacteriën, met name het geslacht *Streptomyces*, lijken uit vorige onderzoeken van bijvoorbeeld Law et al., (2017) goede kandidaten te zijn bij de biologische bestrijding van plantenpathogenen; we spreken daarbij over een biocontrole.

Biologische bestrijding of biocontrole is een ecologisch beheer van een gemeenschap van organismen. Het omvat het gebruik van ziekte-onderdrukkende micro-organismen om de gezondheid van planten te verbeteren. Ziekteonderdrukking door biologische middelen wordt bekomen door interacties tussen de plant (gastheer), de pathogeen en het biologische bestrijdingsmiddel (antagonist) (Chandrashekara KN. et al., 2012; Dicklow M.B. 2017).

1.2.2 Biocontrole mechanismen

Ziekte-onderdrukking zal optreden wanneer antagonistische micro-organismen concurreren met pathogenen. Voor deze ziekte-onderdrukking zijn er verschillende mechanismen waaronder de productie van antibiotica, celwand afbrekende enzymen, parasitisme (direct), inductie van gastheerresistentie (indirect) en niche competitie/competitieve exclusie (Figuur 6). Antagonistische micro-organismen die meerdere van deze mechanismen volgen zijn succesvoller bij het onderdrukken van plantenziekten. Dergelijke micro-organismen zijn interessant voor de ontwikkeling van biologische bestrijdingsmiddelen (*Biocontrol agents*, BCA) (Yang et al., 2013; Chandrashekara KN. et al., 2012; Sharma V. en Salwan R., 2018; Pertot et al., 2016).



Figuur 6: Overzicht van de mechanismen waarmee biocontrol agents tegen ziekten kunnen beschermen (Newitt et al., 2019)

1.2.2.1 Antibiotica productie

Micro-organismen die de plant koloniseren kunnen antibiotica produceren om de groei van plantpathogenen te remmen.

Voor wat betreft dergelijke strategieën tegen *Z. tritici* zijn nog niet veel succesvolle moleculen uitgetest. HCN (waterstofcyanide) is een zeer toxische molecule geproduceerd door verschillende PGPR (Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria*). PGPR zijn bodembacteriën die gedijen in de rhizosfeer van planten, maar op of rond de plantweefsels kunnen groeien en de plantengroei stimuleren (Vessey, 2003). Onderzoek met *Z. tritici* toonde aan dat deze molecule actief was in de reductie van de pathogeen. De werking van HCN is gebaseerd op de inhibitie van het terminale cytochroom-c-oxidase in de elektrontransportketen van de mitochondriën. *Pseudomonaden* die in staat zijn deze molecule te produceren zouden kunnen bijdragen bij de reductie van het primaire inoculum van *Z. tritici* op oogstresten (Blumer en Haas, 2000) Een ander gekend antibioticum dat door PGPR *Pseudomonaden* kan geproduceerd worden is 2,4-diacylphloroglucinol (DAPG). Uit oud onderzoek bleek dat DAPG een direct antibiose effect vertoonde tegen *Z. tritici*. Deze molecule werd wel enkel getest *in vitro* (Levy et al., 1992).

1.2.2.2 Productie van celwand afbrekende enzymen

Sommige antagonistische micro-organismen kunnen hydrolytische enzymen produceren die de schimmel- en bacteriële celwand, celmembraan, celmembraaneiwwitten en extracellulaire virulentiefactoren kunnen afbreken. Voorbeelden van hydrolytische enzymen zijn chitinase, cellulase, glucanase, protease en fosfolipase (Yang et al., 2013; Chandrashekara KN. et al., 2012; Sharma V. en Salwan R., 2018; Pertot et al., 2016). De hydrolytische enzymen kunnen geproduceerd worden door bacteriën zoals *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Streptomyces*, *Cellulomonas*, *Bacillus* en *Erwinia*. Sommige fungi zoals *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, en *Humicola* zijn ook hiertoe in staat (Zuccaro et al., 2020). *Trichoderma* sp. produceren een hoog aantal aan chitinolytische en andere hydrolytische enzymen (Hermosa et al., 2013). Daarbovenop bleek uit de studie van Stocco et al., (2015) dat sommige *Trichoderma* sp. in staat zijn om de ernst van een *Z. tritici*-infectie significant te verminderen (Stocco et al, 2015).

1.2.2.3 Hyperparasitisme

Bij hyperparasitisme zullen schimmels en/of bacteriën zich voeden met de pathogene micro-organismen (Yang et al., 2013). Hyperparasitisme kan optreden wanneer organismen zich hebben gespecialiseerd om andere parasieten te infecteren (obligaat) of wanneer opportunistische parasieten een aantal gastheren infecteren, waarvan sommige ook parasitair zijn (facultatief) (Parratt en Laine, 2016). Het hyperparasitisme effect wordt geïllustreerd door het mycovirus CHV1 bij de schimmel *C. parasitica* die bij kastanjekanker veroorzaakt bij kastanjabomen. Bij een efficiënte overdracht van CHV1 bij de pathogene schimmel kunnen de kastanjabomen de besmetting van *C. parasitica* overleven (Milgroom en Cortesi, 2004). Een ander voorbeeld werd gerapporteerd door Tu, (1988) waarbij *S. griseus* *C. lindemuthianum* parasiteerde en groei vertoonde op het oppervlak van de hyfen. De celwanden van *C. lindemuthianum* hyfen werden gedegenereerd (Tu, 1988). Er is op dit moment nog geen geval van hyperparasitisme bij *Z. tritici* gepubliceerd.

1.2.2.4 Niche competitie

De niche van een species is zijn ecologische rol, die wordt bepaald door een reeks aan voorwaarden, hulpbronnen en interacties die het nodig heeft. Het principe van competitieve uitsluiting is dat twee soorten niet dezelfde niche in een habitat kunnen hebben en stabiel naast elkaar kunnen bestaan. Dit komt omdat soorten met identieke niches ook identieke behoeften hebben, wat betekent dat ze in competitie zouden gaan om dezelfde bronnen (Urban, 2009).

Antagonistische micro-organismen zullen met pathogenen concurreren voor essentiële voedingsstoffen (bv. suikers, aminozuren, vitaminen, ...) en plaats/ ruimte. Een voorbeeld hiervan is de competitie voor ijzer. Hierbij zullen de micro-organismen die sideroforen

(ijzerchelatoren met hoge affiniteit) produceren met een lage affiniteit geëlimineerd worden (Yang et al., 2013; Chandrashekara KN. et al., 2012; Sharma V. en Salwan R., 2018; Pertot et al., 2016). Kerdraon et al. onderzocht de interacties en competitie tussen *Z. tritici* en de microbiële gemeenschappen in tarwe. Ze suggereerden dat de interacties tussen micro-organismen niet stabiel zijn en kunnen worden gewijzigd door bijvoorbeeld veranderingen in de omgeving of door de komst van een nieuw micro-organisme. Deze bevindingen zouden het pad effenen tot verder onderzoek biologische bestrijdingsmiddelen door competitie (Kerdraon et al., 2019). *Trichoderma* sp. zullen de plant beschermen tegen plant pathogenen zoals *Z. tritici* in competitie treden voor nutriënten (Stocco et al., 2015).

1.2.2.5 Inductie van gastheerresistentie

Deze laatste biologische controle strategie is een indirecte strategie die gebruik maakt van het afweersysteem van de plant. Geïnduceerde resistentie is het opwekken van resistentie bij planten door biologische of chemische inductoren. Het zal ook niet-blootgestelde plantendelen beschermen tegen toekomstige aanvallen door pathogene micro-organismen en herbivore insecten. Planten kunnen geïnduceerde resistentie ontwikkelen als gevolg van infectie door een pathogeen, na behandeling met specifieke chemicaliën of goedaardige plantengroei bevorderende *rhizobacteriën* (Pieterse C. et al., 2014). Dergelijke geïnduceerde plantafweer is niet-specifiek en geeft meestal een verhoogde resistentie tegen een breed spectrum aan pathogenen. Deze twee soorten niet-specifieke afweerreacties worden respectievelijk systemisch verworven resistentie (SAR) genoemd en geïnduceerde systemische resistentie (ISR) (Yang et al., 2013; Chandrashekara KN. et al., 2012; Sharma V. en Salwan R., 2018; Pertot et al., 2016; Kachroo en Kachroo, 2020). Gezien de ruimtelijke scheiding tussen de plaats van inductie van resistentie (een eerste infectie bij SAR, of een rhizosfeerbacterie in ISR) en de plaats waar de resistentie optreedt, is er een systemisch signaal nodig. Verschillende van dergelijke signaalmoleculen van SAR werden tot op heden geïdentificeerd. De meest gekende zijn salicylzuur (SA) en zijn derivaten (Vlot et al., 2009). Vrije radicalen nitric oxide (NO) en ROS (Wang et al., 2014) en pipecolinezuur (Navarova et al., 2012), terwijl ISR rekent op signaaltransductieroutes die worden geactiveerd door jasmonaat (JA) en ethyleen (Pieterse C. et al, 2014). Hoewel ISR vaak gereguleerd wordt door SA-onafhankelijk mechanismen, zijn er gevallen waarbij verschillende PGPR een SA-afhankelijk type van ISR veroorzaakt wordt die lijkt op de door pathogenen geïnduceerde SAR.

Hoewel de hogervermelde SA, ethyleen en JA signaalwegen de belangrijkste zijn, zijn er nog tal van modifierende zijwegen die de finale uitkomst van de plant-pathogeen interactie zullen bepalen (Pieterse C. et al, 2014; Van Loon et al., 2006).

Een voorbeeld van een dergelijk biocontrole organisme tegen *Zymoseptoria* zijn *Bacillus* stammen. Verschillende *Bacillus* stammen produceren het cyclische lipopeptide surfactine. Dit surfactine is opgebouwd uit heptapeptiden die aan elkaar gehouden worden met een vetzuurstaart die kan variëren in lengte (Henry et al., 2011). Surfactine is een biosurfactant dat

naast een direct antimicrobieel effect (Ongena et al., 2008), ook de plantafweer kan induceren in verschillende planten zoals tomaat, tabak, boon en biet en dit tegen een breed spectrum aan pathogenen (Ongena et al., 2007). Recent werd deze molecule ook getest tegen *Z. tritici* in tarwe en hieruit bleek dat de molecule actief de plantafweer induceerde. Bovendien bleek dat de eerder geïntroduceerde SA en JA afhankelijke plantafweer door surfactine met succes tegen *Z. tritici* werd geactiveerd (Le mire et al., 2018).

1.2.3 Vergelijking chemische fungiciden met biocontrole

Voordelen van biologische bestrijding t.o.v. chemische fungiciden (Chandrashekara KN. et al., 2012; Gohel et al., 2005; Pertot et al., 2016):

- Biocontrole is goedkoper dan andere methoden;
- Biologische bestrijding is minder toxisch voor planten;
- Biocontrole-producten zijn veiliger voor de omgeving, dieren en mensen omdat er geen residu's in het finale product blijven;
- Resistentie-ontwikkeling van pathogenen voor chemische fungiciden is een groot probleem, terwijl dit nog niet het geval is voor biologische controle;
- Biocontremiddelen hebben een positieve invloed op de wortel- en plantengroei;

Nadelen van biologische bestrijding t.o.v. chemische fungiciden (Chandrashekara KN. et al., 2012; Gohel et al., 2005):

- Biocontrole kan alleen bij een bepaalde pathogeen/ziekte gebruikt worden terwijl chemische fungiciden een breed spectrum hebben;
- Fungiciden hebben onmiddellijke impact, biocontrole eerder geleidelijk;
- De effectiviteit van biocontrole hangt af van omgeving condities
- Bij een toepassing op de bodem kan er aan afname van biocontrole micro-organismen optreden door concurrentie met de aanwezige microflora

1.3 *Actinobacteria*

1.3.1 Biologie

Actinobacteria zijn grampositieve bacteriën met een hoog gehalte G+ C (guanine + cytosine) in hun DNA. Ze vormen één van de grootste bacteriële genera. De morfologie van *Actinobacteria* is compact, ze hebben een kegelvormig uiterlijk met een droog oppervlak op kweekmedia en dit oppervlak is vaak bedekt met luchtmycelium. Ze reproduceren door middel van binaire splitsing en door het produceren van sporen bij gebrek aan nutriënten. De sporulatie van *Actinobacteria* vindt plaats door fragmentatie of segmentatie (Gao en Gupta,

2012, Ul-Hassan en Wellington, 2009). De meeste *Actinobacteria* zijn saprofytisch, in de bodem levende organismen die het grootste deel van hun levenscyclus doorbrengen als semi-actieve sporen, vooral onder omstandigheden met beperkte nutriënten. *Actinobacteria* groeien door een combinatie van tipverlenging en vertakking van de hyfen. Veel *Actinobacteria* hebben een myceliale levensstijl en ondergaan een complexe morfologische differentiatie (Barka et al., 2016; Lewin, 2017; Gao en Gupta, 2012, Ul-Hassan en Wellington, 2009).

Ze hebben zich echter aangepast aan een breed spectrum aan habitatten hebben waaronder bodem-, rhizosfeer- en zee- en zoetwatersystemen:

- Bewoners van bodem of aquatische milieus (bv. *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* en *Salinispora*-soorten)
- Plantensymbionten (bv. *Frankia* spp.)
- Gastro-intestinale commensalen (bv. *Bifidobacterium* spp.)
- Plant-of dierpathogenen (bv. *Corynebacterium*, *Mycobacterium* of *Nocardia*-soorten)

1.3.2 Taxonomie

Actinobacteria vertegenwoordigen één van de grootste taxonomische eenheden binnen het domein Bacteriën (Figuur 7) en kunnen gedifferentieerd worden van de rest op basis van zijn vertakkingspositie in 16 rRNA sequentie bomen, DNA-DNA hybridisatie, genoom sequencer (Ventura et al., 2007) of via MALDI-TOF massaspectrofotometrie (Yarborough et al., 2017). DNA-DNA hybridisatie is een techniek gebaseerd op vergelijkende analyse tussen volledige DNA-sequenties van twee bacteriesoorten. Het principe achter deze techniek is gebaseerd op thermische stabiliteit van gehybridiseerd DNA van twee nauw verwante organismen. DNA-moleculen van beide soorten zullen gedeneureerd worden, met elkaar gemengd en gereatureerd worden door een temperatuurverlaging, die bekend staat als de re-associatietemperatuur. Bij sterk op elkaar lijkend strengen zal er een stabielere helix gevormd worden (Auch et al., 2010).

Binnen het fyllum van *Actinobacteria* is er een grote diversiteit bij hun morfologische, fysiologische en metabolische vermogens. Er zijn verschillende classificaties mogelijk om ze te differentiëren (Barka et al., 2016; Gao en Gupta, 2012).

1.3.2.1 Morfologische classificatie

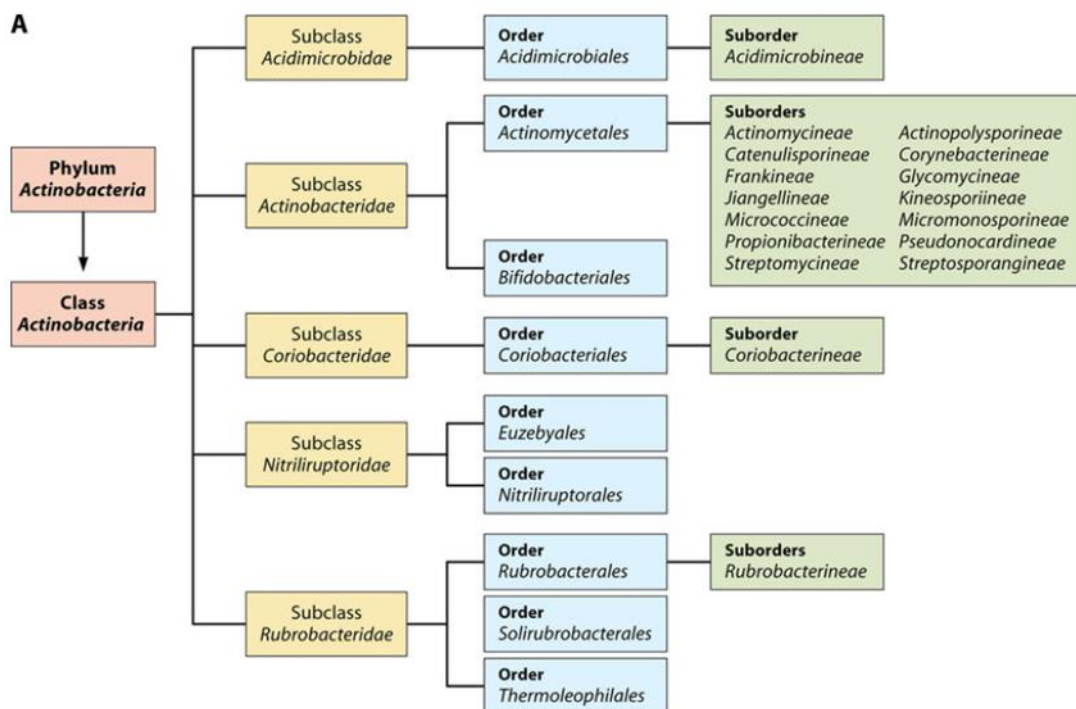
De Actinobacteriën worden hierbij geclassificeerd op basis van de grote verscheidenheid van morfologieën. Voornamelijk de verschillen bij de kleur van het mycelium, de aan- of afwezigheid van een substraatmycelium of luchtmycelium, de productie van diffundeerbare melanoïde pigmenten en de structuur/ het uiterlijk van hun sporen (Barka et al., 2016; Gao en Gupta, 2012).

1.3.2.2 Chemische classificatie

Bij chemotaxonomie zal gebruikt gemaakt worden van chemische componenten om organismen te groeperen volgens overeenkomsten van hun cellulaire chemie. De meest gebruikte chemische componenten bij Actinobacteriën zijn hierbij celwand aminozuren, vetzuren, menaquinonen, fosfolipiden en suikers (Barka et al., 2016; Gao en Gupta, 2012).

1.3.2.3 Moleculaire classificatie

Dit is de meest recente methode dankzij de snelle vooruitgang van sequentie bepaling. Hierbij wordt gebruik gemaakt van genomsequentie bepaling en genetische analyse op basis van sequentie bepaling van het 16S-rRNA-gen, DNA-DNA-hybridisatie en genoom sequenering (Barka et al., 2016; Gao en Gupta, 2012).



Figuur 7: Taxonomie van de Actinobacteriën op basis van de lijst van prokaryotische namen met aanzien van nomenclatuur (LPSN) (Gao and Gupta, 2012)

1.3.3 Algemene toepassingen van *Actinobacteria*

Actinobacteria hebben verschillende toepassingen in verschillende gebieden. Zo zijn ze een veelbelovende bron van een breed spectrum aan belangrijke enzymen die op industriële schaal kunnen worden geproduceerd. Een groot deel van de antibiotica op de markt vandaag worden verkregen uit *Actinobacteria*. Ze produceren enzymremmers die nuttig zijn bij de behandeling van kanker en immunomodificatoren die de immuunrespons versterken. Ze

hebben het vermogen om vele koolwaterstoffen, pesticiden, alifatische en aromatische verbindingen af te breken. Ze voeren microbiële transformaties uit van organische verbindingen. Verschillende geslachten van Actinobacteriën kunnen worden ingezet bij de biologische omzetting van onderbenut landbouw- en stedelijk afval in hoogwaardige chemische producten. Ze bevorderen ook de plantengroei. *Actinobacteria* met antagonistische activiteit tegen plantpathogenen kunnen nuttig zijn als biocontrole. Over deze laatste applicatie is er bij deze thesis de meeste belangstelling. (Ranjani et al., 2016; Lewin G.R. et al., 2017; Chandrashekara KN. et al., 2012; Sharma V. en Salwan R., 2018).

1.3.4 Biocontrole applicatie van *Actinobacteria*

1.3.4.1 Antibiotica productie

Sommige *Actinobacteria* produceren antibiotica waarvan is aangetoond dat ze plantenziekten onderdrukken. Er zijn bovendien verschillende onderzoeken die de onderdrukking van plantenziekten door Actinobacteriële stammen door de productie van antibiotica melden. Een oplijsting van deze stammen wordt weergegeven in Tabel 1 (Chandrashekara KN. et al., 2012).

Tabel 1: Voorbeelden van antibiotica producerende *Actinobacteria* als bacteriële biologische bestrijdingsmiddelen (Raaijmakers et al., 2002; Yang et al., 2013; El-Refai et al., 2011; Owen et al., 2017)

Antagonist	Ziektes	Veroorzakende pathogeen	Antibiotica
<i>Streptomyces kasugaensis</i>	Rice blast disease	<i>Pyricularia oryzae</i>	Kasugamycine
<i>Streptomyces melanosporofaciens</i>	Potato scab	<i>Streptomyces Scabiei</i>	Geldanamycine
<i>Streptomyces malaysiensis</i>	Blotch of wheat	<i>P. oryza</i>	Malayamycine
<i>Streptomyces griseus</i>	Asparagus root diseases	<i>Fusarium</i> spp.	Faeriefungin
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Powdery mildew of wheat	<i>Blumeria graminis tritici</i>	Gopalamycine
<i>Streptomyces humidus</i>	Culm rot of wheat Phytophthora blight of pepper	<i>Fusarium culmorum</i> <i>Phytophthora capsici</i>	Phenylacetic Acid

<i>Nocardioides luteus</i>	Bacteriële infectie in planten (bv. <i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Actinomycine
<i>Streptomyces sp. 517-02</i>	<i>Septoria tritici</i> blotch (STB) in tarwe	<i>Zymoseptoria tritici</i>	UK-2A Fenpicoxamid (Hieruit wordt Fenpicoxamid, een acyloxymethyl derivaat, Inatreq™ active gevormd)

1.3.4.2 Productie van celwand afbrekende enzymen

Chitinolytische en glucanolytische Actinobacteriën zijn belangrijke biologische bestrijdingsmiddelen voor chitine- en glucaan bevattende schimmels (Tabel 2). Het Actinobacteriële geslacht *Streptomyces* wordt ook bestudeerd voor de productie van celwand-afbrekende extracellulaire enzymen, hun expressie, substraatherkenning en hun betrokkenheid bij groei en ontwikkeling (Yang et al., 2013).

Tabel 2: Voorbeelden van Actinobacteriën met productie van hydrolytische enzymen (Yang et al., 2013)

Antagonist	Ziektes	Veroorzakende pathogeen	Enzym
<i>Streptomyces cavourensis</i>	Anthracnose	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Chitinase Glucanase
<i>Micromonospora carbonacea</i>	Root-rot in Banksia grandis	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	B-glucanase
<i>M. carbonacea</i>	Root-rot	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Cellulase

1.3.4.3 Hyperparasitisme

Hyperparasitisme treedt op wanneer een parasiet leeft ten koste van een andere parasiet. Hyperparasitisme als biocontrole-applicatie heeft nog niet veel aandacht gekregen, doch zijn er Actinobacteriën gevonden die deze eigenschap wel vertonen (Tabel 3) (Tougeron en Tena, 2018).

Tabel 3: Voorbeelden van Actinobacteriën die hyperparasitisme vertonen (Yang et al., 2013, Sutherland en Lockwood, 2009)

Antagonist	Verwachte fungale pathoogeen
<i>S. griseus</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	<i>Phytophthora citrophthora</i>
	<i>Phytophthora megasperma</i> var. <i>Glycinea</i>
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>

1.3.4.4 Inductie van resistentie

Actinobacteriën kunnen een verhoogde genexpressie van de SAR reactie en de signaalreacties van jasmonaat en ethyleen induceren bij introductie van pathogenen. (Yang et al., 2013) Er zijn verschillende gevallen gerapporteerd waar zaden van *Arabidopsis thaliana* werden geïnoculeerd met endofytische stam van *Micromonospora* sp. *EN Streptomyces* sp. *EN27*. Dit leidt tot verhoogde tolerantie in de bladeren tegen plantpathogenen *F. oxysporum/Erwinia carotovora* en geïnduceerde expressie van verdedigingsgenen gekoppeld aan jasmijnzuur/ethyleen-afhankelijke signaalroutes wanneer de ziekteverwekkers afwezig zijn (Ansari et al., 2020). Bij Noorse sporen trad systemische resistentie tegen *B. cinerea* op door wortelinoculatie met *Streptomyces* GB 4-2 (Lehr et al., 2008). Uit onderzoek van Tan et al., (2020) bleek dat *Rhodococcus* sp. R-43120 de *ICS*-, *LOX1*- en *LOX2*- genen induceert bij tarwe.

Planten bezitten een isochorismaat synthase (*ICS*) en fenylalanine ammonialyase (*PAL*) pathway om SA te synthetiseren. De *ICS* pathway voor SA-biosynthese begint bij chorismaat, dat door *ICS* omgezet wordt in isochorismaat. SA wordt uit dit isochorismaat gegenereerd door een isochorismaat pyruvaat lyase. De *ICS* pathway speelt een belangrijke rol bij de door pathogenen geïnduceerde SA-synthese (Lefever et al., 2020). De vetzuurhydroperoxiden worden verder enzymatisch of spontaan gemodificeerd oxylipinen te verkrijgen. In het geval van JA gebeurt dit via het 13-*LOX* pathway (Nalam et al., 2015).

Jasmonaat is een oxylipine met een rol in de ontwikkeling van planten en de stressrespons. De synthese van oxylipinen omvat ten eerste een oxygenatie van meervoudig onverzadigde vetzuren om vetzuurhydroperoxiden te verkrijgen. Deze oxygenatie van vetzuren wordt veroorzaakt door een katalyse door enzymen zoals lipoxygenases (*LOX*'s). Op basis van de aan -of afwezigheid van chloroplast signaal peptide, worden de *LOX*'s geclassificeerd in type-

1 of type-2. Bij type-1 LOX is het chloroplast signaal peptide afwezig (bv. LOX1), bij type-2 is dit aanwezig (bv. LOX2) (Sarde et al., 2018).

De inductie van deze genen toont aan dat deze bacteriesoort in staat is om het afweersysteem van de plant kan activeren. Dit bevestigt het belang van SA- en JA-afhankelijke afweerreacties tegen *F. graminearum*. Door gebruik van *Rhodococcus* sp. R-43120 werden de symptomen van *F. graminearum* in tarwe vermindert (Tan et al., 2021).

1.3.4.5 Competitie

Pathogene *Streptomyces scabiei* veroorzaakt de ziekte aardappelschurft. Niet-pathogene *Streptomyces diastatochromogenes* zal de site koloniseren waardoor het binnendringen van de pathogeen via competitieve uitsluiting voorkomen wordt. (Neeno-Eckwall et al., 2001)

De onderdrukking van pathogenen door betrokkenheid van sideroforen is gerapporteerd voor verschillende *Actinobacteria*. Sideroforen geproduceerd door *Streptomyces albobinaceus*, *S. griseus* en *S. virginiae* remmen de kieming van basidiosporen van *Moniliophthora perniciosa*. (Macagnan et al., 2008) Sommige *Actinomycetes spp.* produceren sideroforen die gebruikt worden tegen *Fusarium oxysporum* dat Fusariumverwelking veroorzaakt bij kikkererwten (Gopalakrishnan et al., 2011).

1.4 Belang van reproduceerbare infectiesystemen

Een groot deel van deze thesis bestond uit het optimaliseren van de infectie van tarwe met *Z. tritici*. Dit is een vaak onderschat onderdeel in de studie van interactie van planten met pathogenen. In het bijzonder infectie assays met pathogenen met een lange asymptomatische fase zijn niet eenvoudig. Nochtans behoren enkele belangrijke pathogenen op verschillende gewassen tot deze groep van pathogenen met een lange asymptomatische fase. Dit geldt voor *F. verticillioides* in mais en dus ook voor de pathogeen die werd bestudeerd in deze thesis namelijk *Z. tritici* op tarwe.

Eens het infectiesysteem op punt staat, kan in een volgende stap worden onderzocht of nieuwe bestrijdingsstrategieën mogelijk zijn. Dit is een heel belangrijk aspect in het bijzonder bij ontwikkelen van biocontrole organismen. Vaak worden dergelijke antagonisten enkel getest *in vitro* op artificieel medium, maar een dergelijke strategie vertoont verschillende tekortkomingen.

- (i) Indien biocontrole organismen werken via direct antagonisme of antibiose, dan weerspiegelt een *in vitro* test niet altijd de interactie in de plant. Antibiose is immers gebaseerd op secundaire metaboliëproductie (bv. antibiotica) en hun productie is vaak zeer sterk onderhevig aan regulatie. Dit is één van de redenen dat beloftevolle

biocontrole organismen niet of slechts beperkt functioneren wanneer ze in het veld of op een plant of in de rhizosfeer worden uitgetest (Chauhan et al., 2015).

- (ii) Indien biocontrole werken via plant-gemedieerde mechanismen, dan is de *in vitro* ook niet de correcte methode. Dit werd passend geïllustreerd in het werk van Tan et al. (2021) waarbij twee actinobacteriën *in vitro* en *in planta* werden uitgetest tegen *Fusarium graminearum*. Gezien één van beide stammen een plant-gemedieerde mode-of-action had, kon zijn antagonisme niet worden opgepikt in de *in vitro* screening.
- (iii) De 'niche competence' van biocontrole stammen wordt niet in acht genomen in *in vitro* studies. Dit wil zeggen dat de overleving van de biocontrole stam op wortel, stengel, blad, bloem, aar, ...bij een *in vitro* screening niet aan bod komt.

Uit bovenstaande voorbeelden wordt duidelijk dat het *in planta* uittesten op de juiste plantorganen van potentieel nieuwe biologische bestrijders cruciaal is in het selecteren van hoog-potentiële biocontrole organismen.

Deze strategie van *in planta* screening van goedaardige micro-organismen is niet enkele cruciaal bij de selectie van goede biocontrole organismen. In een recent onderzoek is gebleken dat een dergelijke strategie ook cruciaal is bij het selecteren van micro-organismen met biostimulant effect. Ook hier is het optimaliseren van en *in planta* en het gebruik van dit *in planta* systeem om te screenen cruciaal. Zo wordt enerzijds de screening van een bepaalde 'trait' (biocontrole, biostimulant, ...) gecombineerd met de nodige competitieve capaciteiten in een welbepaalde ecologische niche (De Zutter et al., 2021).

2 MATERIALEN EN METHODEN

2.1 *Zymoseptoria tritici*: groei en sporenvorming

De *Zymoseptoria tritici* T02596-stam werd op drie verschillende media geïnoculeerd om zo het effect van media op sporenvorming te onderzoeken (Tabel 4). De schimmel werd gegroeid over verschillende weken op 25°C.

Tabel 4: Oplijsting gebruikte media met hun ingrediënten.

Media	Ingrediënten	Merk	Lotnummer
Potato dextrose agar (PDA)	PDA (24 g/l)	Sigma-Aldrich	BCCB5966
	Technical agar (20 g/l)		
Yeast extract peptone dextrose agar (YPDA)	Yeast extract (10 g/l)	Sigma-Aldrich	BCBS5470V
	Peptone (20 g/l)	Sigma-Aldrich	BCBW3961
	Glucose (20 g/l)	Sigma-Aldrich	SLBX1648
	Technical agar (20 g/l)		
Czapek Dox-V8 juice agar (CDV8)	Czapek dox agar (46 g/l)	Sigma-Aldrich	BCBW8003
	Calcium carbonate (3 g/l)	RPL	11601223
	V8® Original vegetable juice (200 ml)	Campbell's	13322900
	Technical agar (10 g/l)		

De sporen werden geoogst door de *Z. tritici* kolonie volledig uit de media te snijden en toe te voegen aan een PBS-oplossing (VWR, lotnr. 19G1156786). Na intens mengen en suspenderen werden de sporen geteld met behulp van een bürker telkamer en lichtmicroscop (Olympus). Uiteindelijk werd de concentratie sporen per ml berekend.

2.2 Actinobacteria stammen

De actinobacteriale stammen die zowel *Streptomyces* als *Rhodococcus* species omvatten, worden vermeld in Tabel 5. De bacteriestammen werden gegroeid uit de -80°C glycerol stock bij 25°C voor 3 dagen in Tryptic Soy Broth (Sigma-Aldrich, BCCC7225, 30 g/l) onder een snelheid van 200 rpm. Vervolgens werden de bacteriën tweemaal gewassen met PBS om in biocontrol assay's gebruikt te worden.

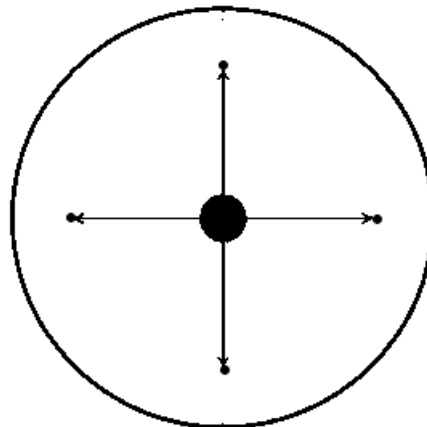
Tabel 5: Actinobacteriale stammen voor biocontrole testen

Nummer	Stamnaam	Referentie/Depositor
1	<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. Rimosus LMG 19352	1984, National collection of Industrial, Food and Marine Bacteria, Ltd. (NCIMB) <- 1951, M. Lumb
2	<i>Rhodococcus</i> sp. R 43120	Anne Willems, Research collection
3	<i>Rhodococcus erythropolis</i> LMG 16262	1995, Czech Collection of Microorganisms CCM, Masaryk University, Faculty of Sciences, Dep. of Experimental Biology (<i>Arthrobacter picolinophilus</i>) <- R. Tate
4	<i>Rhodococcus fascians</i> LMG 3629	1981, PLANTENZIEKTENKUNDIGE DIENST, Afdeling bacteriologie (<i>Corynebacterium fascians</i>). (1977)
5	<i>Rhodococcus</i> sp. LMG 3627	1981, PLANTENZIEKTENKUNDIGE DIENST, Afdeling bacteriologie (<i>Corynebacterium fascians</i>). (1977)
6	<i>Rhodococcus</i> sp. R 25614	Anne Willems, Research collection
7	<i>Rhodococcus fascians</i> LMG 3612t1	1981, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPFB), Central Science Laboratory (<i>Corynebacterium fascians</i>) <- 1965, Oxtoby J. (1965)
8	<i>Rhodococcus fascians</i> R 50936	Anne Willems, Research Collection

9	<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. <i>Rimosus</i> LMG 5984	1984, National collection of Industrial, Food and Marine Bacteria, Ltd. (NCIMB) <- 1951, M. Lumb
10	<i>Streptomyces</i> sp. LMG 16995	1996, Mergaert Joris, UGent - Fac. Wetenschappen - Vakgroep Biochemie en Microbiologie, Labo voor Microbiologie

2.3 *In vitro* antagonisme

In een *in vitro* plaat assay werd het antagonisme van Actinobacteriën (vermeld in Tabel 5) voor *Zymoseptoria tritici* beoordeeld. Er werden 4 spots (5 µl) van de actinobacteriale suspensie aangebracht op de al met *Z. tritici* geïnoculeerde petrischaal (Figuur 8). De spots werden 2 weken na de *Z. tritici* inoculatie aangebracht. De afstand van de spots tot *Z. tritici* werd gemeten en opgevolgd gedurende 4 weken. Na 1 week, 2 weken en 3 weken na inoculatie van de actinobacterie stammen werden de platen gemeten.



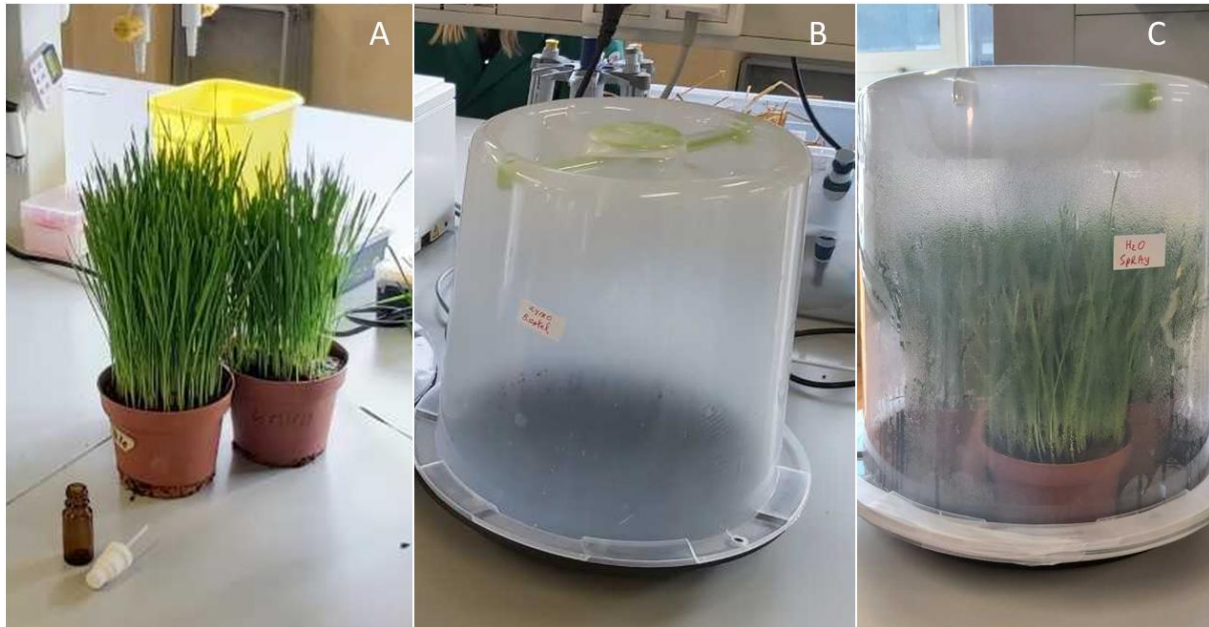
Figuur 8: schematische voorstelling van de *in vitro* plaat assay

2.4 Op punt stellen van de infectie

In een eerste experiment werd de infectie van *Z. tritici* op tarwe op punt gesteld. Hiervoor werden twee verschillende infectiemethoden uitgetest.

Methode 1: Tarweplanten werden opgegroeid in potten (diameter 10 cm, hoogte 12 cm) waarbij ongeveer 50 planten per pot werden uitgezaaid. Na 3 weken werden de planten geïnfecteerd met een sporensuspensie van 1×10^6 sporen per ml PBS+0.05% Tween80. De

infectie werd uitgevoerd via een penseel waarbij het penseel werd ondergedompeld in de sporensuspensie die vervolgens over de abaxiale zijde van het blad werd uitgestreken. De geïnfecteerde bladeren werden aangeduid met een alcoholstift. De infectie werd vervolgens opgevolgd gedurende 4 weken. Per pot werden 10 bladeren geïnfecteerd. In totaal werden 3 potten geïnfecteerd. Daarnaast werden de controle planten behandeld met een penseel ondergedompeld in PBS met 0.05% Tween80.



Figuur 9: Foto's van de toegepaste infectiemethode. (A) Opgroeien van tarweplanten in potten (d=20 cm, h=25 cm) met 50 planten per pot. (B) Vochtige infectiekamer waarin gekookt bidest water werd toegevoegd. (C) Geïnfecteerde planten in de 100 % vochtige infectiekamers. De infectiemethode 1 (borstel) en infectiemethode 2 (spray) maakten gebruik van dezelfde infectiecompartimenten

Methode 2: Tarweplanten werden opgegroeid in potten (diameter 20 cm, hoogte 25cm) waarbij ongeveer 50 planten per pot werden uitgezaaid. Na 3 weken werden de planten geïnfecteerd met een sporensuspensie van 1×10^6 sporen per ml PBS+0.05% Tween80. De infectie werd uitgevoerd via een spray infectie waarbij alle planten in de pot werden besproeid tot run-off. In totaal werden 3 potten geïnfecteerd. De infectie werd vervolgens gedurende 4 weken opgevolgd. De controle planten werden besproeid met PBS + 0.05% Tween80.

In parallel werden de infectiekamers klaargemaakt. Hiervoor werd 500 mL bidest water gekookt en vervolgens toegevoegd aan de zwarte opvangschalen onderin de infectiekamers (Figuur 9). Dit leidde ertoe dat de vochtigheid in de kamers opliep tot 100%. Deze hoge vochtigheid is cruciaal voor het ontkiemen van de sporen en een succesvolle infectie. De geïnfecteerde planten werden in deze kamers gezet en de kamers werden afgesloten met parafilm voor het behoud van de hoge luchtvochtigheid. Na 72h werden de koepels verwijderd

en werden de tarweplanten verder opgegroeid onder sunlight LED modules (Phenovation Life Sciences, Wageningen, Netherlands) (16h licht, 8h donker) bij een temperatuur van 21°C.

Op basis van dit experiment werd er beslist met welke infectiemethode (in dit geval infectiemethode 2) het biocontrole experiment zou worden uitgevoerd.

2.5 Ziektevoortgang: microscopische analyse

2.5.1 Lactofenol blue staining voor opvolging van *Z. tritici* in de plant

Visuele beoordeling van de infectie werd uitgevoerd op verschillende tijdpunten na inoculatie. In het experiment waarbij de infectie op punt werd gesteld, werd de infectie om de 2 dagen opgevolgd met de microscoop. In het biocontrole experiment werden de planten wekelijks opgevolgd. Deze opvolging gebeurde via een inverte microscoop aangezien de eerste 2-3 weken van de infectie symptomeloos verlopen.

De schimmel werd gevisualiseerd via een lactofenolblauw kleuring. Aan falcontubes met 10 ml lactofenolblauw werden 3 afgeknipte bladstukjes van elke methode en bijhorende controle toegevoegd. Lactofenolblauw of Lactophenol Cotton Blue is een kleuringsmethode gebruikt voor de visualisatie van schimmelstructuren. Het bestaat uit 3 bestanddelen: Fenol werkt als ontsmettingsmiddel dat levende organismen dood. Ten tweede wordt melkzuur gebruikt om de schimmelstructuren te behouden. Als laatste component zal lactofenol Blue de chitine op de schimmelcelwand en andere schimmelstructuren kleuren. De 4 falcontubes werden vervolgens voor 30 minuten geroteerd op een draaimolen.

Vervolgens werd een ontkleuring uitgevoerd om het bladgroen in het blad te verwijderen. Daartoe werden de bladeren na kleuring overgebracht in nieuwe falcontubes met 10 ml absolute ethanol (Sigma-Aldrich, 64175). De tubes werden verwarmd in een warmwaterbad op 80°C voor 1 uur zodat de bladeren compleet doorzichtig zijn.

Na de ontkleuring worden de bladeren in stukken geknipt en in epjes met glycerol-melkzuur (80%/20%) oplossing gebracht. Over een periode van 4 weken werden stalen genomen, gekleurd en bekeken onder de microscoop.

De ontkleurde bladeren werden in stukjes geknipt van 2 cm en vervolgens met hun abaxiale zijde naar boven op draagglaasjes gelegd. Vervolgens werd 10 µL ontkleuringsvloeistof toegevoegd waarna de bladstukjes werden gevisualiseerd via een inverte microscoop (Olympus IX-81).

2.6 Eindmeting van de infectie

Op het einde van de infectie werden de bladeren ook visueel gescoord. Hiervoor werden 6 bladeren willekeurig afgesneden van de geïnfecteerde tarwe planten. De bladeren werden op een uniform zwarte achtergrond gelegd waarna een foto werd getrokken. De necrose van het bladweefsel werd kwantitatief bepaald onder de vorm van het aantal necrotische bladpixels via het softwarepakket APS assess.

Allereerst wordt een voorverwerking uitgevoerd om de achtergrond van de bladafbeelding te scheiden van het blad voordat deze verder wordt verwerkt. Het interessegebied (ROI) wordt handmatig geselecteerd en gebinariseerd. Door de originele afbeelding aan het verkregen complement toe te voegen, wordt de irrelevante achtergrond verwijderd. Ten slotte verwijdert men via het bijnijden extra ruimtes en zo wordt de achtergrond verwijderd. Het algoritme van de APS assess software werd eerder beschreven in de literatuur (Kaur et al., 2018; Agrawal et al. 2018).

2.7 *In planta* biocontrole assay

Voor de infectieproeven met de geselecteerde biocontrole organismen werd er gewerkt met de spray inoculatiemethode (methode 2 uit §2.4). Er werden 3 potten geïnfecteerd met *Z. tritici* en 3 met de controle (0,05 % Tween 80). Dit werd in duplo uitgevoerd. Na 6 dagen werden sommige planten verder met Actinobacteriën *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 geïnoculeerd gebruik makend van de sproeimethode (Tabel 6). De *Actinobacteriale* stammen werden gekozen omwille van hun biocontrole activiteit in een ander pathogeensysteem (Tan et al, 2021). Bovendien werd in die studie aangetoond dat beide biocontrole organismen werken via verschillende modes-of-action. Het assay werd analoog uitgevoerd als eerder beschreven en gedurende 4 weken werden elke week stalen genomen, gekleurd en bekeken onder de microscoop (Olympus IX-81).

Tabel 6: Overzicht van de uitgevoerde inoculaties per plant

Duplicaat	Inoculatie van plant met					
1	<i>Z. tritici</i> T02596	<i>Z. tritici</i> + LMG 19352	<i>Z. tritici</i> + R-43120	Controle (0,05 % Tween 80)	Controle + LMG 19352	Controle + R-43120
2	<i>Z. tritici</i> T02596	<i>Z. tritici</i> + LMG 19352	<i>Z. tritici</i> + R-43120	Controle (0,05 % Tween 80)	Controle + LMG 19352	Controle + R-43120

Ook in dit experiment werd gebruikt gemaakt van APS assess software en Region of Interest filter om de invloed van *Streptomyces rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 op *Z. tritici* T02596 na te gaan (Barbedo, 2013).

2.8 RNA extractie en Real Time-PCR

RNA uit de bladeren werd geëxtraheerd met behulp van Trizol reagens (ThermoFisher Scientific) volgens de instructies van de fabrikant. Eerste streng cDNA werd gesynthetiseerd met behulp van de iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Door GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) te gebruiken werd een kwantitatieve reverse transcriptie (RT-qPCR) -analyse uitgevoerd met behulp van een CFX96-systeem (Bio-Rad) met volgende thermische instellingen: 95°C gedurende 2 min.; 40 cycli van 95°C gedurende 15 sec. en 60°C gedurende 1 min.; een smeltcurve-analyse werd uitgevoerd met behulp van een temperatuurprofiel van verwarming tot 95°C met een snelheid van 0,5°C per seconde. De primers die gebruikt zijn voor alle genen staan opgelijst in Tabel B1 in bijlage. Normalisatie van de verdedigingsgenen werden uitgevoerd door het celdelingscontrole-eiwitgen (Ta54227) in tarwe als referentie te gebruiken. Genexpressie-analyse werd uitgevoerd met behulp van qBase-software op basis van de fold change die berekend werd door de CNRQ-waarden (gekalibreerde genormaliseerde relatieve hoeveelheden) van de behandelde stalen te delen door controlestalen.

Door de Covid19 pandemie en de maatregelen die dit met zich meebrengt aangaande bezettingsgraad in de laboratoria konden niet alle QPCR-analyses worden uitgevoerd zoals gepland. Van alle stalen werd RNA geëxtraheerd, cDNA gesynthetiseerd maar de QPCR-analyses konden maar deels worden uitgevoerd. In de resultaten sectie worden enkel deze deelresultaten voorgesteld.

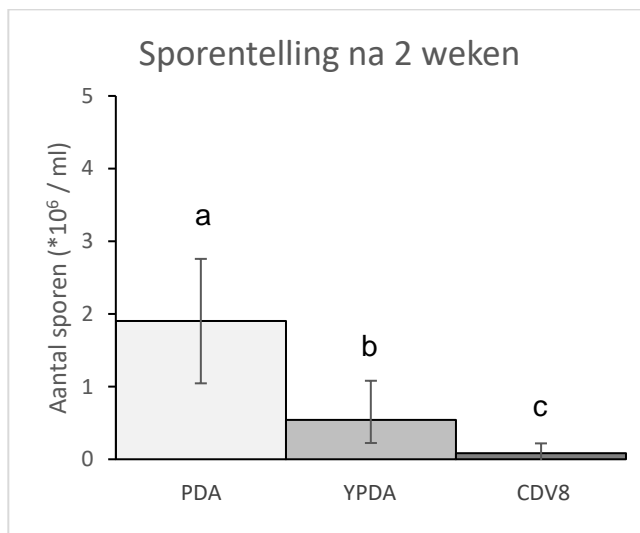
2.9 Statistische analyse

Voor de statistische evaluatie en het genereren van de plots werden de R softwareversie 3.6.2 (RCoreTeam, 2019) en de pakketten ggplot2 (Wickham, 2016) en agricolae (de Mendiburu, 2014) gebruikt. Voor meerdere vergelijkingen werden normaliteit en homoscedasticiteit aannames geverifieerd met behulp van diagnostische plots. Behandelingen werden statistisch vergeleken met behulp van ANOVA-analyses gevolgd door een post-hoc Tukey test. Alle analyses werden uitgevoerd op een significantieniveau van $P = 0,05$.

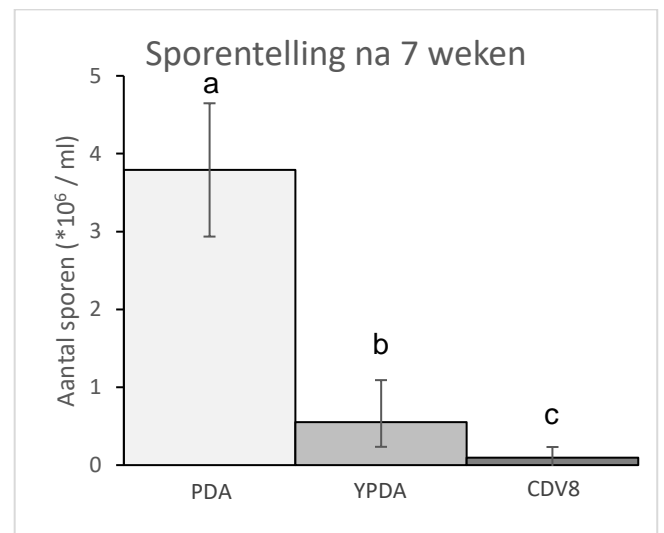
3 RESULTATEN

3.1 Sporenvorming op verschillende media

Gezien er in het laboratorium geen expertise was met *Z. tritici* werd in een eerste fase van het onderzoek onderzocht op welke media de pathogeen het meeste sporen produceerde. Dit was belangrijk aangezien de sporen gebruikt werden voor de infectie assays. Drie verschillende media werden onderzocht PDA, CDV8 en YPDA (Figuur 12). De sporen werden geteld na 2 en 7 weken en de resultaten worden voorgesteld in Figuur 10 en Figuur 11.

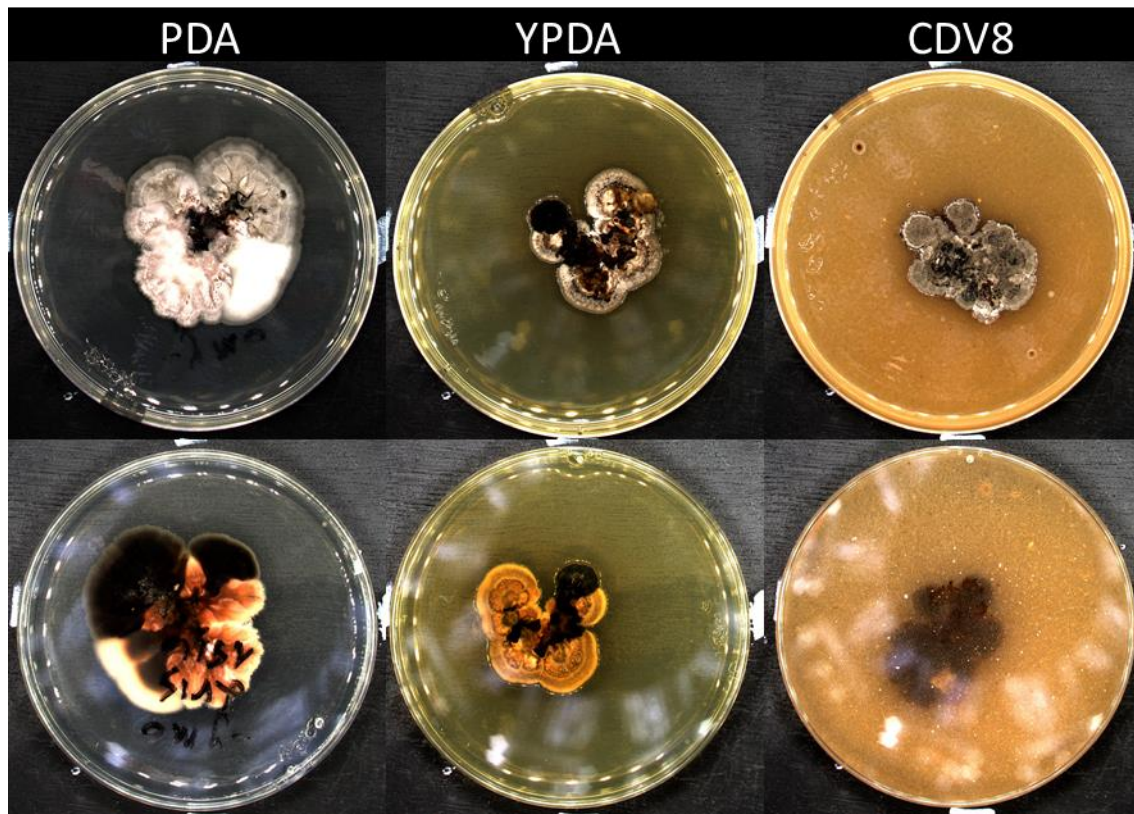


Figuur 10: Grafische voorstelling van het aantal sporen (*10⁶/ml) bij inoculatie van *Z. tritici* op verschillende media na 2 weken. De verschillende cijfers geven significante verschillen ($P < 0,05$) weer



Figuur 11: Grafische voorstelling van het aantal sporen (*10⁶/ml) bij inoculatie van *Z. tritici* op verschillende media na 7 weken. De verschillende cijfers geven significante verschillen ($P < 0,05$) weer

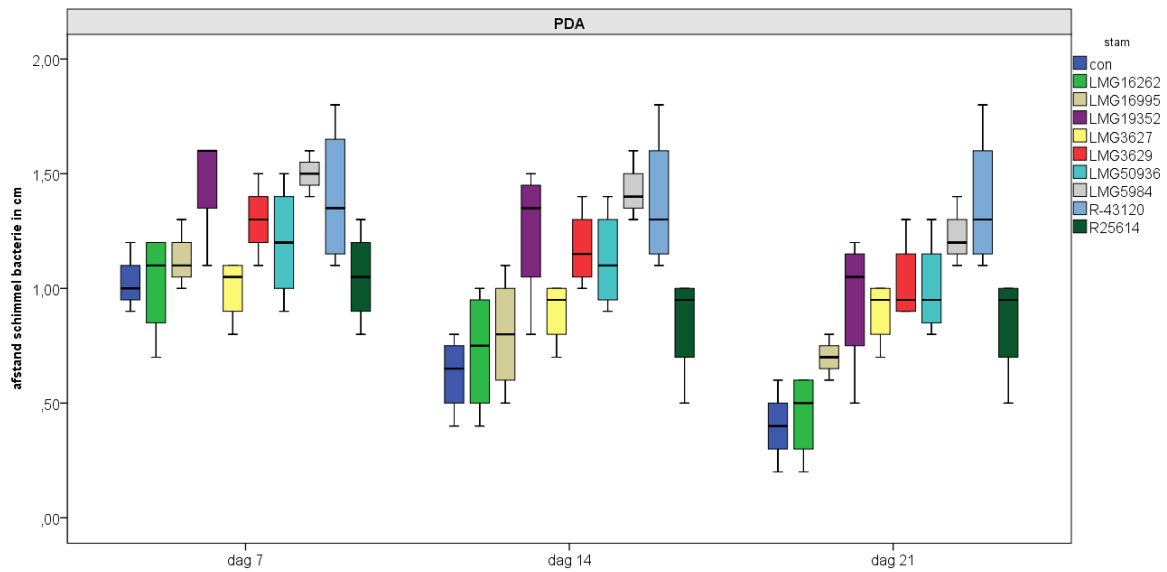
Uit ANOVA met post hoc Tukey test blijkt dat de resultaten van de verschillende media significant van elkaar verschillen. Het hoogste aantal sporen werd verkregen door *Z. tritici* te groeien op PDA, bij groei op CDV8 werd het laagste aantal sporen verkregen. Na 7 weken bleef de trend dezelfde maar er werd een hoger aantal sporen verkregen dan na 2 weken. Op basis van dit experiment werd besloten om *Z. tritici* op te groeien op PDA medium voor het bekomen van sporen.



Figuur 12. Groei van *Z. tritici* op PDA, YPDA en CDV8 medium. Bovenste panel top view, Onderste panel bottom view

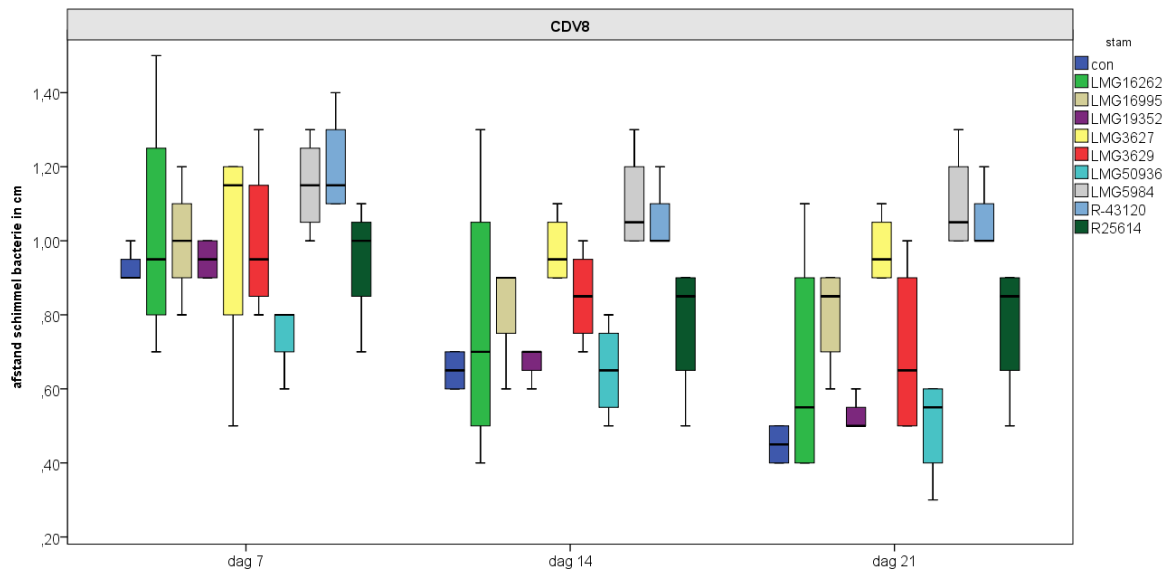
3.2 *In vitro* antagonisme van *Actinobacteria*

Het directe antagonistische effect van 10 *Actinobacteria*-stammen (Tabel 5) werd getest tegen *Z. tritici* op PDA, YPDA en CDV8 media. Bij sommige Petri-platen werd contaminatie vastgesteld. Deze platen werden bijgevolg weggelaten uit de resultaten. Een two-way ANOVA werd uitgevoerd om te onderzoeken of er interactie is tussen twee onafhankelijke variabelen (stam en dag) op de afhankelijk variabele (afstand). In Figuur 13, Figuur 14 en Figuur 15 staan de afstanden tussen de verschillende *Actinobacteria* en *Z. tritici* over de verschillende tijdstippen geïllustreerd.



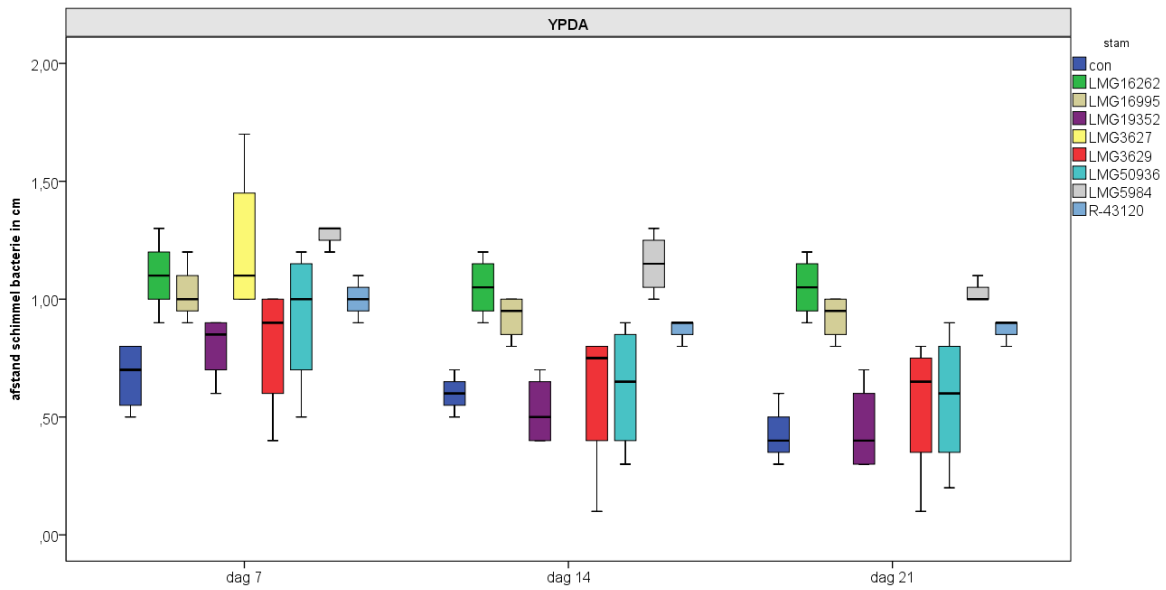
Figuur 13: *In vitro* antagonisme van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op *Z. tritici* op PDA medium. De boxen tonen het 25% tot 75% kwartiel. De Whiskers omvatten de overige data met een maximum van 1.5 maal de interkwartielafstand.

In Figuur 13 zijn de afstanden tussen bacterie en schimmel weergegeven voor 3 tijdstippen op PDA medium. Bij *Rhodococcus* sp. R-43120, *Rhodococcus* sp. LMG 3627 en *Rhodococcus* sp. R-25614 lijken de gemeten afstanden van inhibitie ten minste 2 tijdstippen constant te blijven. De uitgevoerde two-way ANOVA toonde aan dat er geen interactie was tussen de twee onafhankelijke variabelen stam en dag ($p=0,446$). Hierdoor werden de drie tijdstippen samen genomen en de statistiek daarop uitgevoerd (zie verder).



Figuur 14: In vitro antagonisme van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op *Z. tritici* op CDV8 medium gedurende drie weken. De Whiskers omvatten de overige data met een maximum van 1.5 maal de interkwartielafstand.

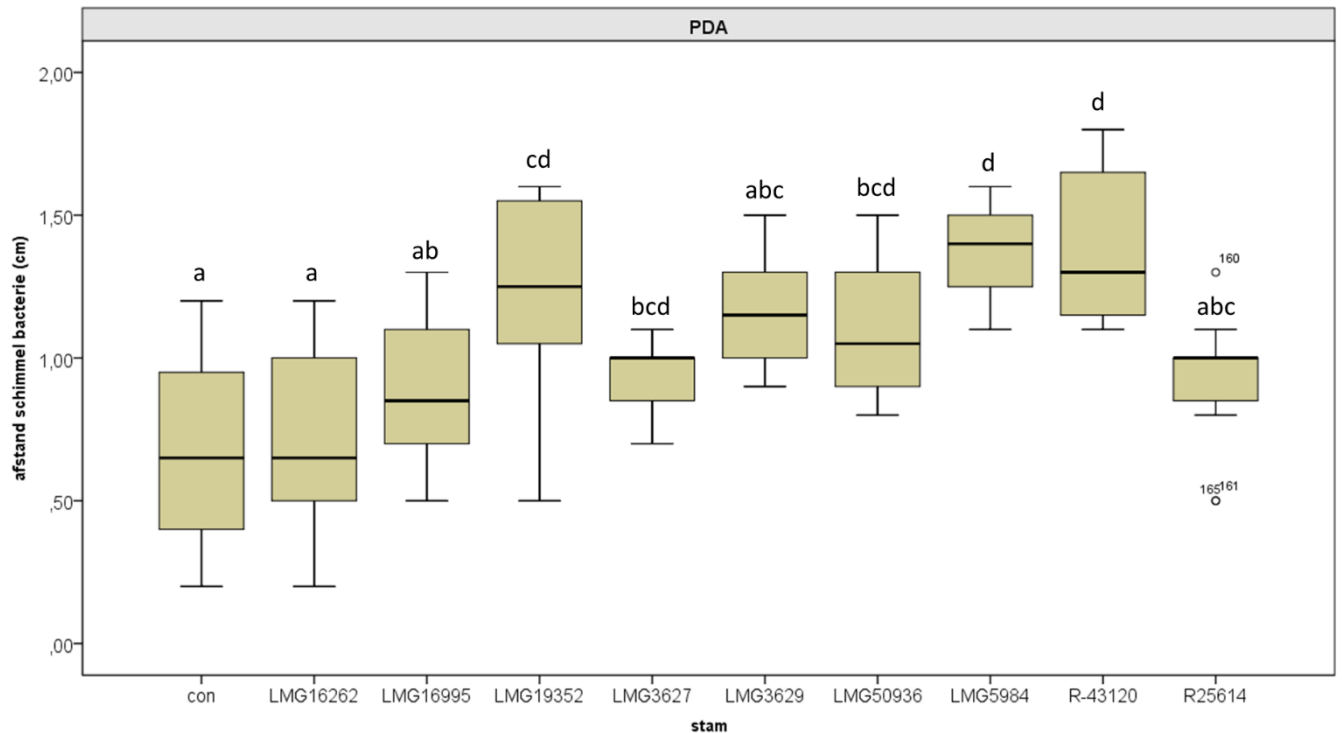
In Figuur 14 zijn de afstanden tussen bacterie en schimmel weergegeven op de 3 tijdstippen op CDV8 medium. Op dit CDV8 medium werd waargenomen dat de afstanden van *Rhodococcus sp.* LMG 3627, *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG 5984, *Rhodococcus sp.* R-25614 en *Rhodococcus sp.* R-43120 bij ten minste 2 tijdstippen constant. De P-waarde van de interactie tussen de twee onafhankelijke variabelen stam en dag was $p = 0,721$. Dit geeft weer dat er geen interactie is tussen de twee variabelen. Statistiek werd bijgevolg uitgevoerd op de samengenomen data over alle tijdstippen heen.



Figuur 15: In vitro antagonisme van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op *Z. tritici* op YPDA medium gedurende drie weken. De boxen tonen het 25% tot 75% kwartiel. De Whiskers omvatten de overige data met een maximum van 1.5 maal de interkwartielafstand.

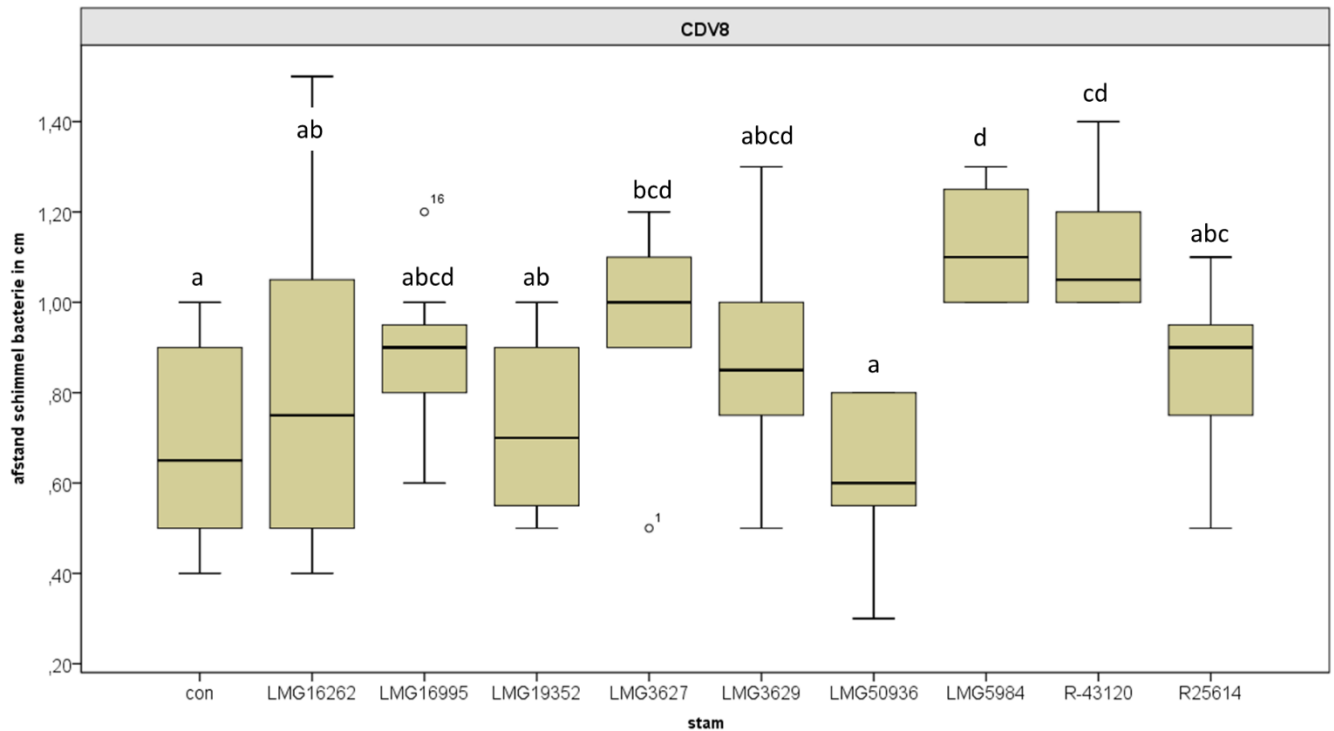
In Figuur 15 zijn de afstanden tussen bacterie en schimmel weergegeven bij 3 tijdstippen op YPDA-medium. Bij *R. erythropolis* LMG 16262, *Streptomyces* sp. LMG 16995 en *Rhodococcus* sp. R-43120 bleven de afstanden bij ten minste 2 tijdstippen constant. De P-waarde van de interactie tussen de twee onafhankelijke variabelen stam en dag was $p=0,946$. Dit geeft weer dat er geen interactie is tussen de twee variabelen.

Bij alle media is er geen interactie tussen de onafhankelijke variabelen, wat ons toe laat om alle dagen samen te beschouwen. Een one way ANOVA met post hoc Tukey test werd uitgevoerd. De verschillende letters in figuren Figuur 16, Figuur 17 en Figuur 18 duiden deze verschillende subsets aan.



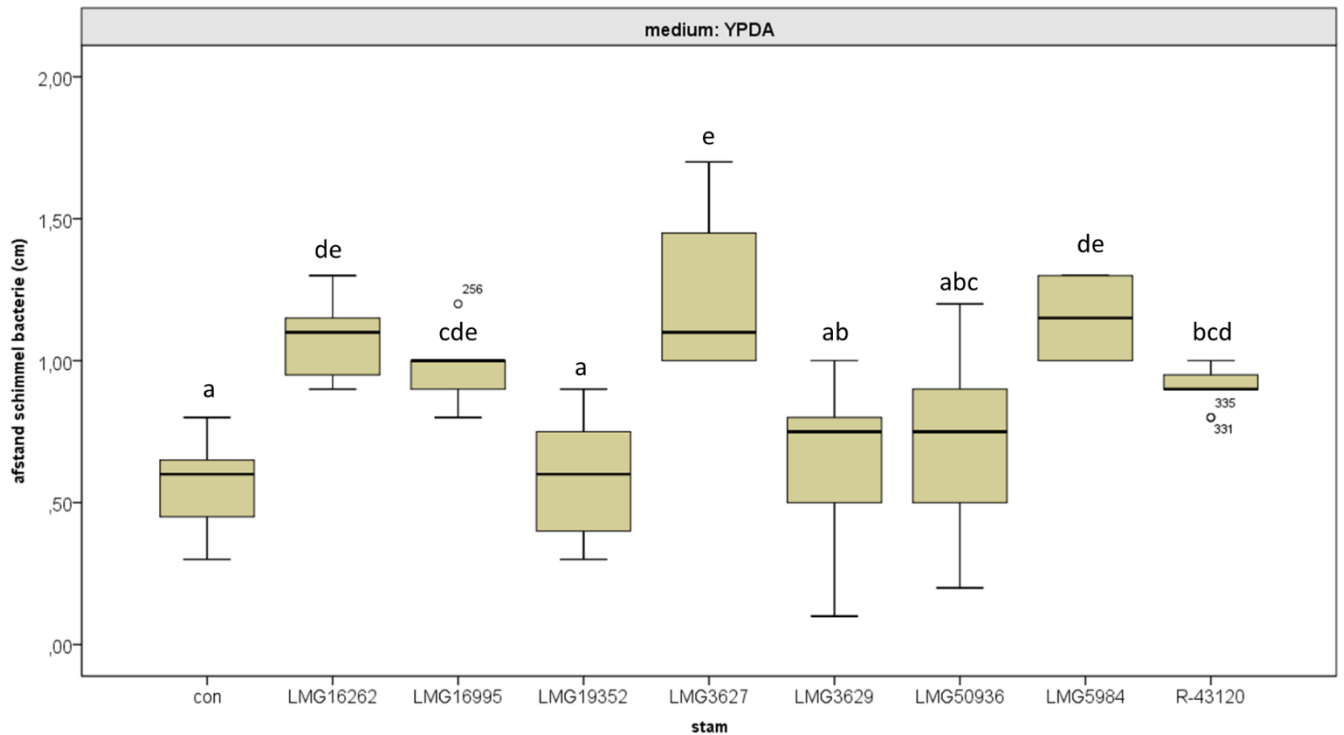
Figuur 16: Effect van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op de groei van *Z. tritici* op PDA medium. De boxen tonen het 25% tot 75% kwartiel. De Whiskers omvatten de overige data met een maximum van 1.5 maal de interkwartielafstand. De verschillende letters geven significante verschillen ($P < 0,05$) weer tussen de behandelingen na verwerking via een one-way ANOVA gevolgd door een post-hoc Tukey test met $p = 0.05$.

De gemiddelde afstanden tussen bacterie en schimmel op PDA medium zijn geïllustreerd in Figuur 16. De controle heeft de laagste afstand tussen bacterie en schimmel op het PDA medium. Dit is te verwachten omdat *Z. tritici* zonder inhibitie van bacteriën vrij kan groeien. In de figuur is waar te nemen dat de Actinobacteria *R. erythropolis* LMG 16262, *Streptomyces* sp. LMG 16995, *Rhodococcus* sp. R-25614 en *Rhodococcus* sp. LMG 3627 geen antagonistische activiteit vertonen tegen *Z. tritici*. *S. rimosus* LMG 19352, *R. fascians* LMG 3629, *R. fascians* R 50936, *Rhodococcus* sp. R-43120 en *S. rimosus* subsp. rimosus LMG 5984 vertonen wel een antagonistische activiteit.



Figuur 17: Effect van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op de groei van *Z. tritici* op CDV8 medium. De boxplots tonen het gemiddelde (horizontale lijn), het 25 en 75 percentiel bereik (boxen) en het tot 1.5x IQR (interquartile range). De verschillende letters geven significante verschillen ($P < 0,05$) weer tussen de behandelingen na verwerking via een one-way ANOVA gevolgd door een post-hoc Tukey test met $p = 0,05$.

De gemiddelde afstanden tussen bacterie en schimmel op CDV8 medium zijn geïllustreerd in Figuur 17. In de figuur valt waar te nemen dat *R. erythropolis* LMG 16262, *Streptomyces* sp. LMG 16995, *Rhodococcus* sp. R-25614, *S. rimosus* LMG 19352, *R. fascians* LMG 3629 en *Rhodococcus* sp. R-50936 geen antagonistische activiteit vertonen tegen *Z. tritici*. Bij *Rhodococcus* sp. LMG 3627, *Rhodococcus* sp. R-43120 en *S. rimosus* LMG 5984 is er wel een significant verschil met de controle en vertonen dus wel een antagonistische activiteit.



Figuur 18: Effect van een selectie Actinobacteria (tabel 5) op de groei van *Z. tritici* op YPDA medium. De boxplots tonen het gemiddelde (horizontale lijn), het 25 en 75 percentiel bereik (boxen) en het tot 1.5x IQR (interquartile range). De verschillende letters geven significante verschillen ($P < 0,05$) weer tussen de behandelingen na verwerking via een one-way ANOVA gevolgd door een post-hoc Tukey test met $p=0.05$.

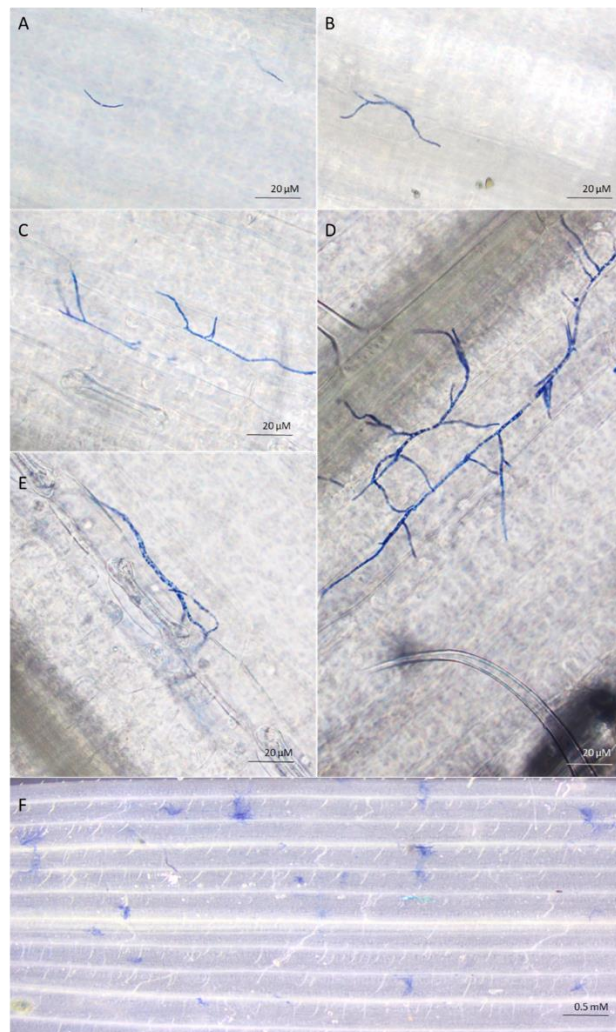
De gemiddelde afstanden tussen bacterie en schimmel op YPDA medium zijn geïllustreerd in Figuur 18. De controle heeft de laagste afstand tussen bacterie en schimmel op het YPDA medium. Dit is te verwachten omdat *Z. tritici* zonder inhibitie van bacteriën vrij kan groeien. De Actinobacteria *Rhodococcus* sp. R-50936, *R. fascians* LMG 3629 en *S. rimosus* LMG 19352, dus deze Actinobacteria vertonen geen antagonistische activiteit tegen *Z. tritici* op YPDA. *R. erythropolis* LMG 16262, *Streptomyces* sp. LMG 16995, *Rhodococcus* sp. LMG 3627, *Rhodococcus* sp. R-43120 en *S. rimosus* LMG 5984 vertonen wel een antagonistische activiteit. Uit de figuur valt ook af te leiden dat *Rhodococcus* sp. LMG 3627 een sterkere antagonistische activiteit lijkt te hebben dan *Rhodococcus* sp. R-43120 tegen *Z. tritici*.

3.3 Visualisatie *Z. tritici* infectie op tarwe bladeren

3.3.1 Visualisatie van de asymptomatische fase

De *Z. tritici* infectie en bijhorende symptomen werden beoordeeld in tarwebladeren over een periode van 4 weken (22/03-12/04). Tijdens de asymptomatische fase werd duidelijk dat de sporen na 3 dagen gekiemd waren op het blad. Na groei op het bladoppervlak (Figuur 19, B,

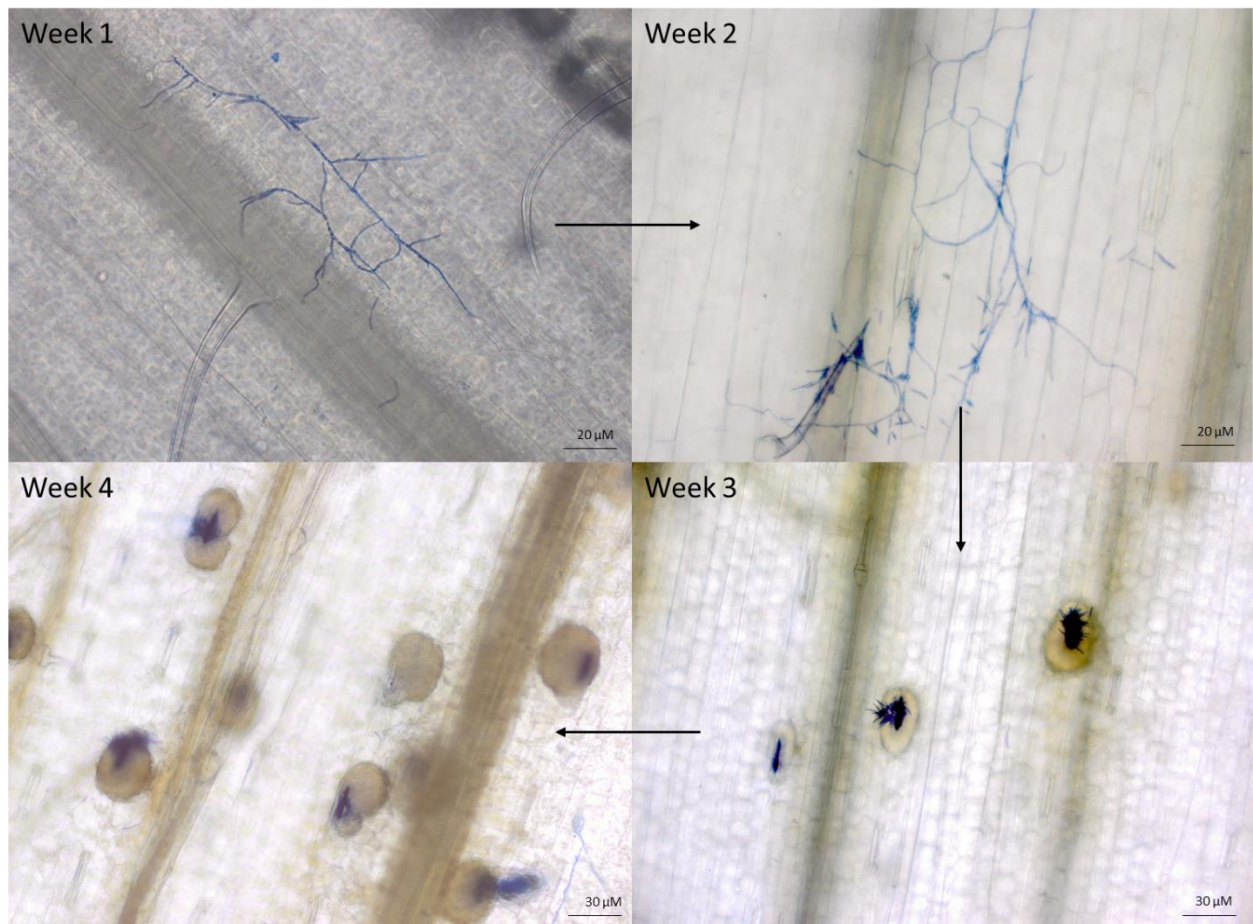
C en D) gedurende de eerste 10 dagen, werd penetratie doorheen de huidmondjes waargenomen vanaf dag 14 (Figuur 19, E).



Figuur 19. Visualisatie van *Z. tritici* tijdens de asymptotische fase van de infectie. A: na 2 dagen, B: na 3 dagen, C: na 5 dagen, D: na 10 dagen, E en F: na 14 dagen

3.3.2 Van asymptotische naar symptomatische fase

Na drie weken worden de eerste pycnidia zichtbaar. De hyfen-vormende ascosporen zijn duidelijk te zien in de stomata en substomatale holte (Figuur 20). Op week drie zijn de pycnidia nog bleek van kleur. Na 4 weken kleuren ze donkerbruin tot zwart.



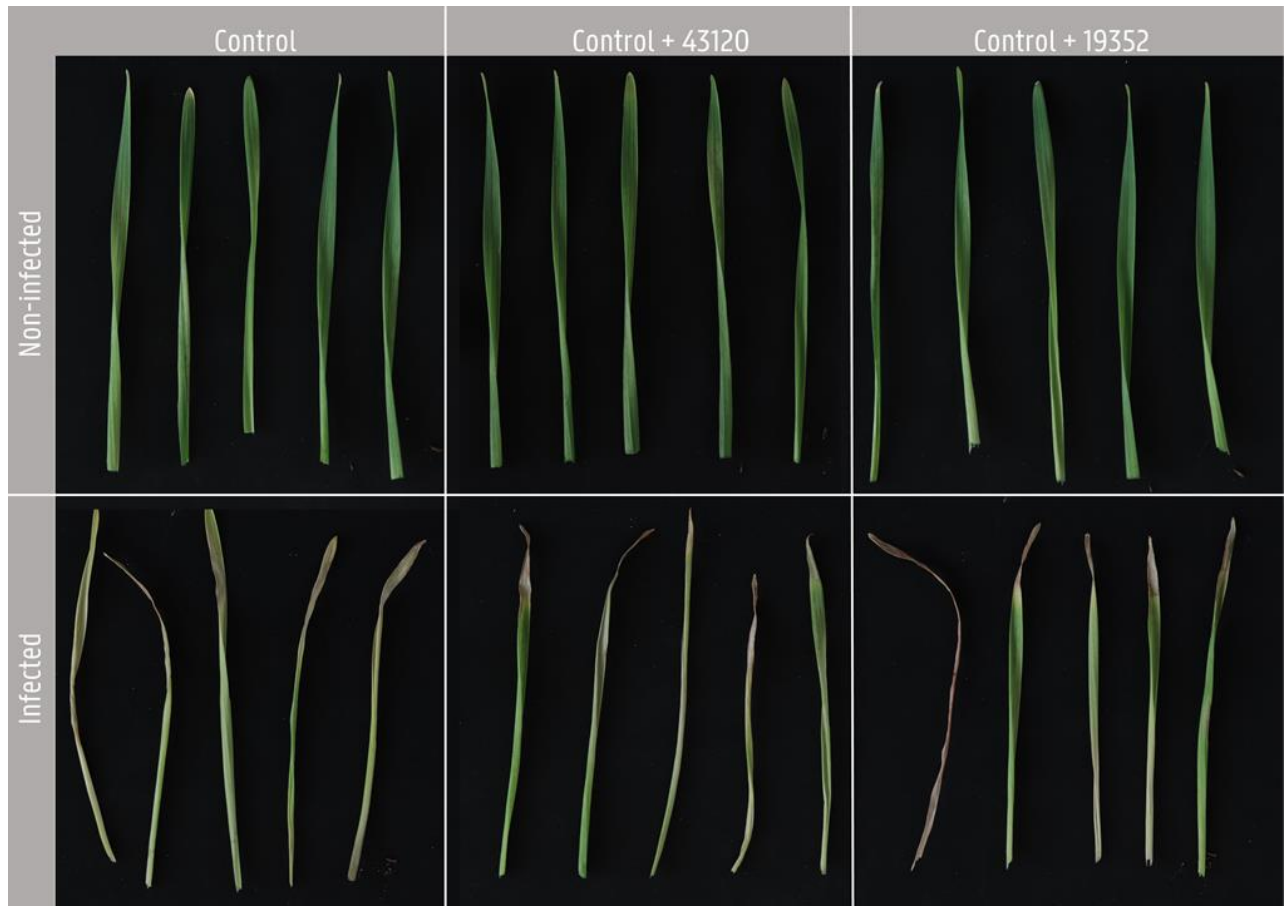
*Figuur 20: Microscopische observatie van kolonisatie van apoplastische ruimte en pycnidiumstructuur van T02596 *Z. tritici*-stam op tarwebladeren met behulp van lactofenolblauwkleuring over een periode van 4 weken*

Vanaf week 3 waren macroscopisch symptomen te zien op de bladeren van de geïnfecteerde tarwe-planten. De bladeren verkleurden geel/bruin wat een typisch symptoom van STB is. In figuur 20 is te zien dat vanaf week 3 de stomata gekoloniseerd zijn door *Z. tritici*. De hyfen verzamelden zich meestal in de substomatale holtes en leidden uiteindelijk tot volwassen pycnidia met vrijkomende pycnidiosporen.

3.4 Impact van *Streptomyces rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 op tarwebladeren geïnfecteerd met *Z. tritici*

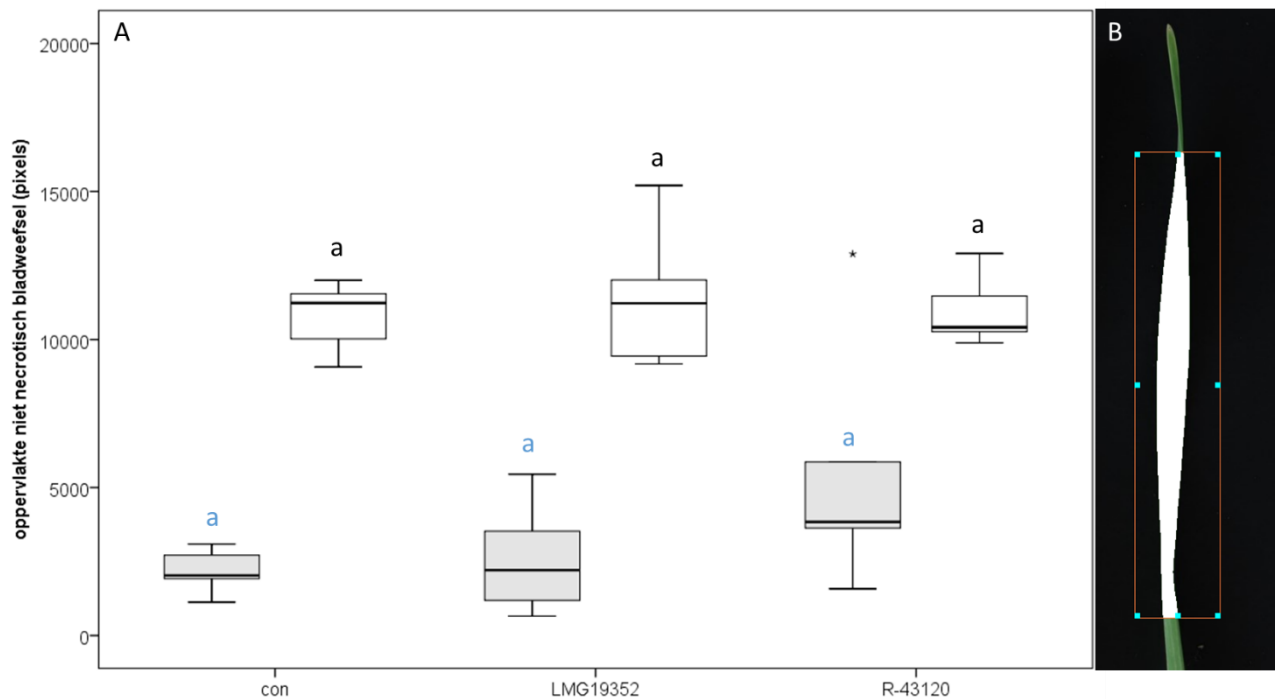
Het effect van de *Actinobacteria* *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 op de met *Z. tritici* T02596 geïnfecteerde tarwebladeren werd beoordeeld over een periode van 4 weken. In figuur 21 zijn de tarwebladeren van zowel geïnfecteerde als niet-geïnfecteerde planten te zien. De inoculatie van *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 lijkt

macroscopisch nauwelijks een effect te hebben op *Z. tritici* T02596. Het valt ook op te merken dat *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 macroscopisch geen negatieve invloed lijken te hebben op de tarwebladeren zelf.



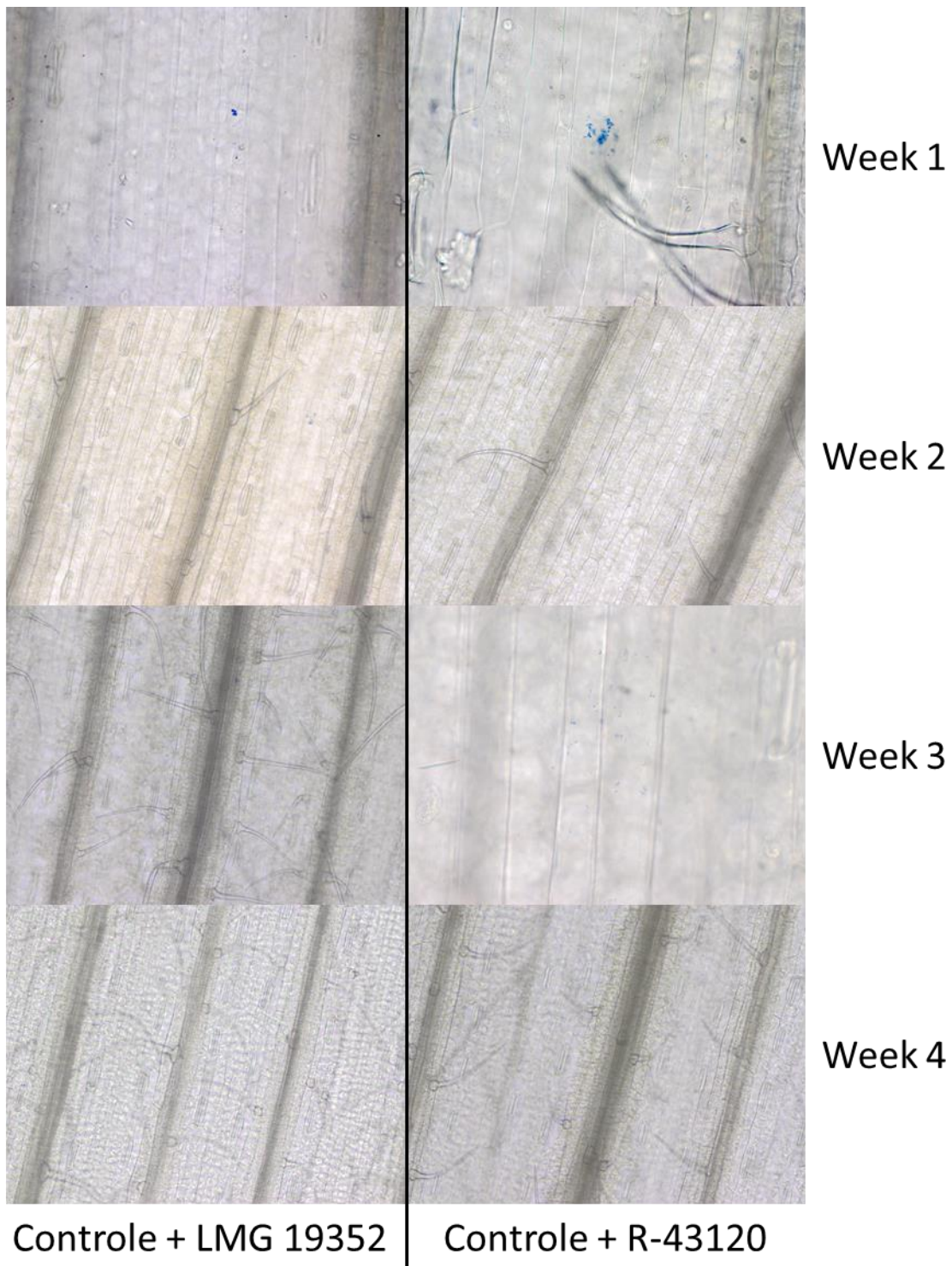
Figuur 21: Visuele symptomen op tarwebladeren na infectie door *Z. tritici* T02596 en behandeld met 0,05 % tween 80-oplossing, met *S. rimosus* LMG 19352 of met *Rhodococcus* sp. R-43120 na 4 weken

Om de invloed van *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 op *Z. tritici* T02596 te onderzoeken, werd de necrose gekwantificeerd met behulp van APS assess software en een Region of Interest (ROI) filter waarbij via segmentatie de ziekte symptoomregio's werden gedefinieerd. De kwantitatieve weergave van de necrose wordt voorgesteld in Figuur 22.



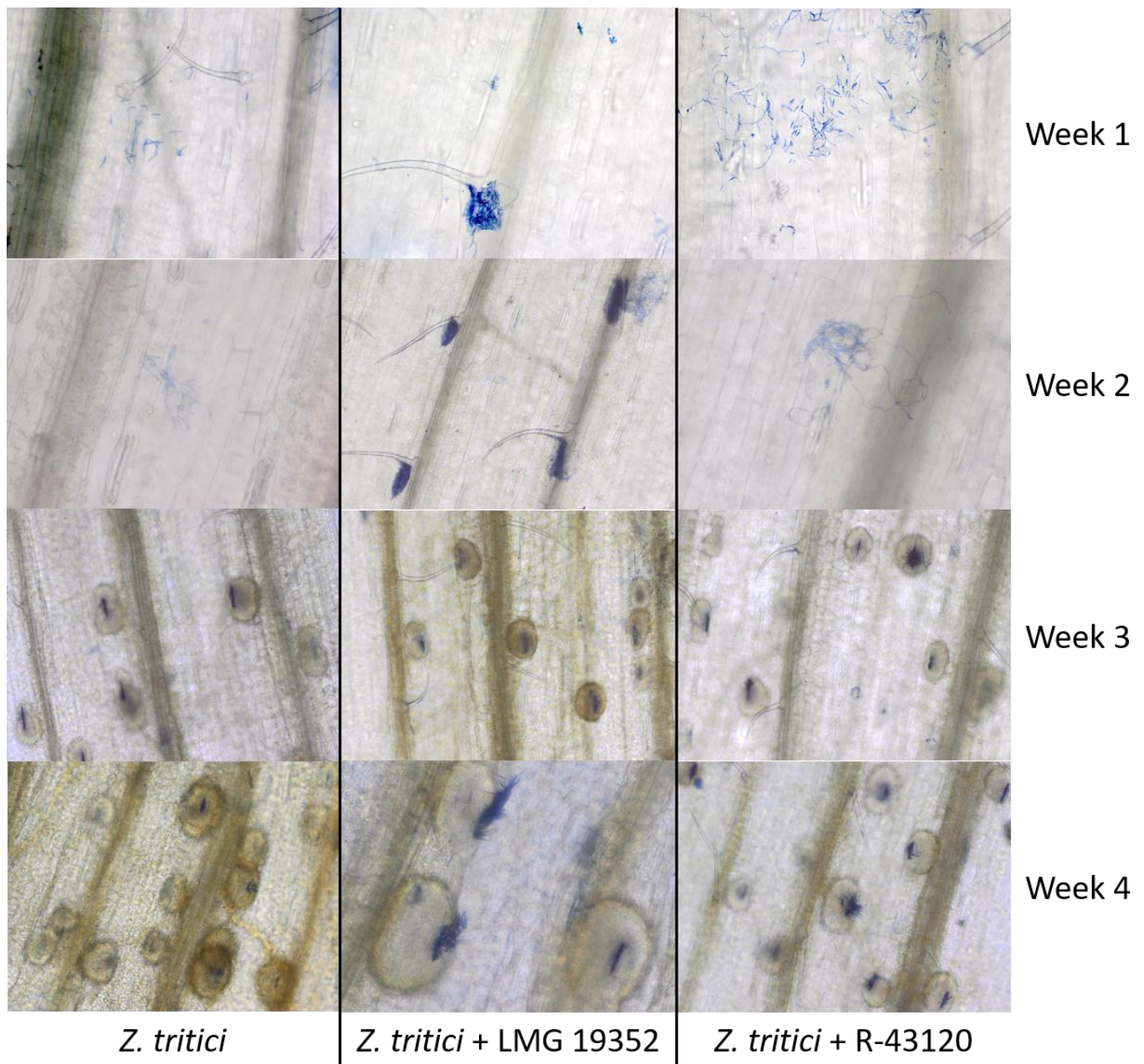
Figuur 22: Biocontrole capaciteit van *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 tegen *Z. tritici* (A) De oppervlakte niet necrotisch bladweefsel bij geïnfecteerde (grijze boxplots)/niet-geïnfecteerde (witte boxplots) en al dan niet behandelde tarwebladeren. De boxplots tonen het gemiddelde (horizontale lijn), het 25 en 75 percentiel bereik (boxen) en het tot 1.5x IQR (interquartile range). De oppervlakte wordt voorgesteld in aantal pixels. De data werden verwerkt via een one-way ANOVA met post hoc Tukey test ($p=0.05$). (B) Afbeelding van Region of Interest (ROI) filter bij een gezond tarweblad

Uit Figuur 22 A is een duidelijk verschil te zien tussen geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde bladeren. De oppervlakte van het gezond plantenweefsel in de geïnfecteerde bladeren is heel laag. Het valt op te merken dat de bladeren met een behandeling van *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 geen significant verschil in oppervlakte van niet-necrotisch bladweefsel lijken te hebben. Dit wordt statistisch ook ondersteund. In Figuur 22 B is een voorbeeld van de ROI-filter weergegeven van een gezond blad. Er is geen segmentatie op de figuur te zien, wat een hoog oppervlakte aan niet necrotisch bladweefsel weergeeft. Bij door *Z. tritici* aangetaste bladeren zou veel segmentatie te zien zijn.



*Figuur 23: Microscopische observatie van behandeling met *S. rimosus* LMG 19352 of *Rhodococcus* sp. R-43120 van tarwebladeren met behulp van lactofenolblauwkleuring over een periode van 4 weken*

In Figuur 23 werd nagegaan of *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 een negatief effect hadden op het tarweblad. Na 4 weken waren er geen fytopathogene of fytotoxische symptomen te zien op de bladeren.



Figuur 24: Microscopische observatie van behandeling met *S. rimosus* LMG 19352 of *Rhodococcus* sp. R-43120 van T02596 *Z. tritici* geïnfecteerde tarwebladeren met behulp van lactofenolblauwkleuring over een periode van 4 weken

In Figuur 24 werd het effect van *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 op de met *Z. tritici* T02596 geïnfecteerde tarwebladeren over een periode van 4 weken geobserveerd. In week 1 was te zien dat de tarweplanten succesvol geïnfecteerd werden met *Z. tritici* en dat de *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 ook aanwezig waren op het blad. Vanaf week 3 waren bij de drie behandelingen macroscopisch symptomen te zien

op de bladeren van de geïnfecteerde tarwe-planten. De bladeren verkleurden geel/bruin. In Figuur 24 is te zien dat vanaf week 3 de stomata gekoloniseerd zijn door *Z. tritici*. De behandeling met *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 heeft deze kolonisatie niet kunnen voorkomen.

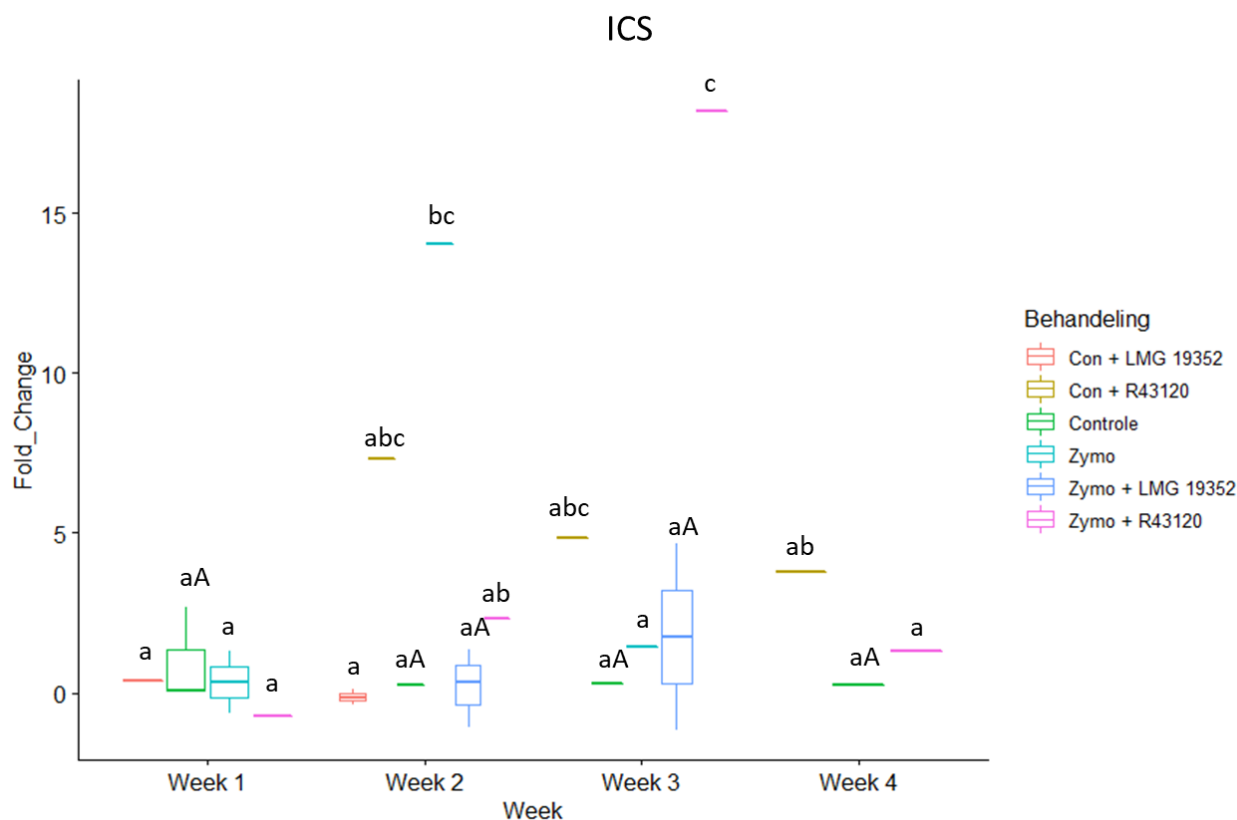
3.5 Impact van *Streptomyces rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 op sleutelgenen in de biosynthese van jasmijnzuur en salicylzuur

ICS en *LOX* genen zijn belangrijk bij de biosynthese van jasmijnzuur en salicylzuur, twee belangrijke plantenhormonen bij het tot stand komen van ISR en SAR (§1.3.4.41.2.2.5). Uit de literatuur blijkt dat beide plantenhormonen al beperkt onderzocht zijn m.b.t. het betrokkenheid in de afweer van tarwe tegen *Z. tritici*.

Er werd nagegaan of de twee actinobacteriestammen *Streptomyces rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 in staat waren om de sleutelgenen in de biosynthese van JA en SA namelijk *ICS* en *LOX* te induceren. Uit de studie van Abbasi et al. (2019) bleken *Actinobacteria* in staat om *LOX*-genen te induceren. Dit werd bevestigd door het onderzoek van Tan et al. (2021) waaruit bleek dat *Rhodococcus* sp. R-43120 in staat was om *ICS*-, *LOX1*- en *LOX2*-genen te induceren in tarwe-aren waardoor het afweersysteem van de plant werd geactiveerd.

In deze thesis werd de betrokkenheid van de *ICS*-, *LOX1*- *LOX2*-genen bij de biologische bestrijding van *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 tegen *Z. tritici* beoordeeld. De expressieniveaus van genen die coderen voor kenmerkende enzymen zoals fenylalanine ammonia lyase (PAL) en isochorismaatsynthase (*ICS*) (voor de SA-biosynthese) en lipoxygenasen *LOX1* en *LOX2* (voor de JA-biosynthese) werden beoordeeld.

Door de Covid19 pandemie en de maatregelen die dit met zich meebrengt aangaande bezettingsgraad in de laboratoria konden niet alle QPCR-analyses worden uitgevoerd zoals gepland. Een gedeelte van de QPCR-analyses voor *ICS* werd wel uitgevoerd.



Figuur 25: Expressie profiel van isochorismaat synthase (ICS) na vier weken bij verschillende behandelingen. De boxplots tonen het gemiddelde (horizontale lijn), het 25 en 75 percentiel bereik (boxen) en het tot 1.5x IQR (interquartile range). De verschillende letter geven significante verschillen ($P < 0,05$) weer tussen de behandelingen na verwerking via een two way ANOVA-analyse gevolgd door een post-hoc Tukey test met $p=0.05$. Hoofdletters geven de significante verschillen bij weken weer, kleine letters de significante verschillen bij behandelingen

In Figuur 25 is de expressie van ICS te zien na 4 weken bij de verschillende behandelingen. Omwille van de Covid maatregelen zijn nog niet alle data beschikbaar. Na 1 week wordt in geen enkele behandeling een inductie waargenomen van ICS. Wel is het belangrijk te vermelden dat de behandeling Con+R-43120 nog niet opgenomen is. Deze behandeling leidt tot een duidelijke inductie van ICS na week 2 t.e.m. week 3 zonder aanwezigheid van *Z. tritici*. Deze waarneming toont dat de stam R-43120 de plantafweer consistent en voor een langere periode kan induceren. Dit is belangrijk indien de stam werkzaam moet zijn tegen een pathogeen als *Z. tritici* die een lange asymptomatische fase heeft. De andere actinobacteriestam LMG19352 lijkt geen ICS te induceren 2 weken na toepassing. Verder blijkt ook *Z. tritici* de SA-synthese te induceren met een duidelijke inductie van SA 2 weken na infectie. Deze tijdspanne komt overeen met het penetreren van de schimmel doorheen de huidmondjes (zie microscopiebeelden). In de toekomst zullen ook de LOX genen verder worden geanalyseerd voor hun expressie tijdens een infectie met *Z. tritici* en na toepassing van de twee biocontrole stammen.

4 DISCUSSIE

Zymoseptoria tritici is een moeilijk te bestrijden fungi door de ongebruikelijke biologie voor een pathogeen en hoge genetische variabiliteit (Goodwin et al., 2011). Er is nood aan biocontrole-producten om de bedreiging van de tarweteelt te neutraliseren (Fones en Gurr, 2015). Voor onderzoek naar een biocontrole is een reproduceerbaar infectiesysteem noodzakelijk.

Voor de *in vivo* infectie van tarwebladeren door *Zymoseptoria tritici* T02596 werd eerst de groei en sporenvorming van *Z. tritici* T02596 getest op verschillende media (Tabel 4). Hierbij bleek dat het PDA medium de hoogste sporenvorming gaf. PDA is een medium dat de hyfen-groei induceert (Tiley et al., 2019), waardoor er meer sporen produceerde hyfen groeien. Dit kan het hogere sporenaantal verklaren. YPDA en CDV8 zijn media die *in vitro* een gistachtige groei van *Z. tritici* promoten (Tiley et al., 2019). Dit houdt een seksuele reproductie door productie van ascosporen in. Voor het bekomen van sporen van *Z. tritici* wordt voortaan gewerkt met PDA medium.

Nadat het medium voor optimale sporengroei bepaald was, werd het *In vitro* antagonisme van een selectie Actinobacteriën (Tabel 5) getest tegen *Z. tritici* T02596.

Uit verschillende studies is gebleken dat *Streptomyces* sp. en *Rhodococcus* sp. in staat zijn om secundaire metabolieten zoals antibiotica te produceren. Voorbeelden hiervan zijn de antifungale werking van *S. rimosus* LMG 19352 tegen *F. poae* and *F. graminearum* (Tan et al., 2021), de vele antibiotica verkregen uit verschillende *streptomyces* stammen in de studie van Procopoi et al. (2012) (zie ook Tabel 1), *Rhodococcus erythropolis* stammen die in staat zijn antibiotica te produceren (Kitagawa en Tamura, 2008) en de antifungale werking van *Rhodococcus* sp. Mer-N1033 beschreven in Pierce et al. (2011). Dergelijke antifungale moleculen zijn tegen *Z. tritici* nog niet veel succesvol uitgetest. Het onderzoek van antagonistische activiteit tegen *Z. tritici* is hierdoor noodzakelijk.

Op PDA medium leken *S. rimosus* LMG 19352, *R. fascians* LMG 3629, *R. fascians* R 50936, *Rhodococcus* sp. R-43120 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG 5984 een antagonistische activiteit te vertonen tegen *Z. tritici*. *S. rimosus* is gekend voor de productie van de antibiotica Oxytetracycline en rimocidine, dit verklaart de antagonistische activiteit (Qi et al, 2017).

Op CDV8 medium leken *Rhodococcus* sp. LMG 3627, *Rhodococcus* sp. R-43120 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG 5984 een antagonistische activiteit tegen *Z. tritici*.

Op YPDA medium leken *R. erythropolis* LMG 16262, *Streptomyces* sp. LMG 16995, *Rhodococcus* sp. LMG 3627, *Rhodococcus* sp. R-43120 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG 5984 een antagonistische activiteit tegen *Z. tritici*. Uit deze resultaten bleek *Rhodococcus* sp. LMG 3627 een sterkere antagonistische activiteit te vertonen dan *Rhodococcus* sp. R-43120

tegen *Z. tritici*. Dit is opmerkelijk omdat dit niet ondersteund wordt door de resultaten van de andere media.

Het verschil tussen de media is te wijten aan het effect van verschillende mediumcomponenten op de productie van secundaire metabolieten. Zo bleek in de studie van Frisvad (2012) een verschillende koolstofbron een lagere productie van secundaire metabolieten in *Aspergillus niger* te betekenen. Dit werd bevestigd in de studie van Raja et al. (2013) waarbij bleek dat een verschil in media een effect had op het secundaire metabolieten profiel van fungistammen. De activiteit van secundaire metabolieten geproduceerd door *Streptomyces* sp. AS4 werd significant beïnvloed door mediumcomponenten zoals Yeast extract en mineralen zoals calcium (Al Farraj et al., 2020). Deze componenten waren aanwezig in dit onderzoek wat de verschillende antagonistische activiteit op de media kan verklaren.

Wanneer alle resultaten van alle media worden samengenomen, werd voor *Rhodococcus* sp. R-43120 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG 5984 bij alle media antagonistische activiteit waargenomen. Dit resultaat is verrassend omdat Tan et al., (2021) vond dat *Rhodococcus* sp. R-43120 geen effect had op de groei van *F. poae* and *F. graminearum*. Niet alle fungi zullen op dezelfde manier beïnvloed worden door een antibioticum. Dit kan komen door eventuele resistenties maar ook door de verschillende targets van verschillende antibiotica. Er zijn celwand targets, celmembraan targets, virulentiefactoren, schimmel nucleïnezuur en proteïne-biosynthese targets en cel functie gerelateerde targets. Hierdoor kunnen bepaalde antibiotica een grotere invloed hebben op fungi dan andere (Mazu et al., 2017). Ook werd een ander medium gebruikt als in deze thesis. Dit kan zoals eerder vermeld een invloed hebben op de secundaire metabolieten. De effect van *Rhodococcus* sp. R-43120 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG 5984 moeten *In planta* verder bestudeerd worden omdat een *in vitro* test niet altijd de interactie in de plant weerspiegelt (Chauchan et al., 2015).

Uit de verkregen resultaten van *Rhodococcus* sp. R-25614 blijkt dat deze bacterie geen effect heeft op de groei van *Z. tritici*. De resterende *Actinobacteria* bekomen tegenstrijdige resultaten op de verschillende media. Meer tijdpunten en replicaten in bijkomende proeven zouden voor deze verdere experimenten een optie kunnen zijn.

Voor een *in vivo* onderzoek van het effect tussen Actinobacteriën en *Z. tritici* werd eerst de infectie van *Z. tritici* T02596 op tarwebladeren microscopisch onderzocht. Twee infectiemethoden waren toegepast om een optimale werkwijze te vinden. Uiteindelijk gaven beide methoden hetzelfde resultaat, maar werd geopteerd voor de spray-methode omdat deze praktischer is. De infectie en bijkomende symptomen werden om de week opgevolgd. De latente fase waarbij de hyfen de stomata binnendringen was waar te nemen in week 1 en 2 (Figuur 19). In week 3 en 4 was de necrotrofe fase waar te nemen met de kenmerkende pycnidia en vrijkomende pycnidiosporen (in detail weergegeven in Figuur B2/Figuur B3 in bijlage).

Uit vorige studies zoals Tan et al., 2021 bleek dat *S. rimosus* LMG 19352 een duidelijk antagonisme tegen *F. graminearum* vertoonde, terwijl *Rhodococcus* sp. R-43120 een significante inductie veroorzaakte van de plant afweer. Er werd getoond dat *Rhodococcus* sp. R-43120 ICS, LOX1 en LOX2 induceerde. Dit betekent dat deze stam in staat is om de plant afweersystemen te activeren, vooral in latere tijdpunten (Tan et al., 2021).

Over *Z. tritici* is geweten uit de studie van Somai-Jemmali et al. (2016) dat het een vroege downregulatie van LOX veroorzaakt in geïnfecteerde tarwebladeren 6–12 uur na infectie met *Z. tritici*. Vergelijkbare transcriptionele downregulatie van genen die coderen voor verschillende LOX's en andere enzymen werd gedetecteerd in met *Z. tritici* geïnoculeerde bladeren. Op latere tijdstippen, een aantal dagen na de inoculatie van *Z. tritici*, werd de totale LOX-activiteit wel significant geïnduceerd in geïnfecteerde bladeren (Somai-Jemmali et al., 2016). In de studie van Gholamnezhad et al. (2016) werd de activiteit van afweerenzymen tegen *Z. tritici* geïnduceerd door SA. Deze studie toonde aan dat SA betrokken was in resistentie in tarwe tegen *Z. tritici* (Gholamnezhad et al., 2016).

Uit de resultaten in Figuur 25 lijkt *S. rimosus* LMG19352 geen ICS te induceren in tarwe, in tegenstelling tot *Rhodococcus* sp. R-43120 die wel een inductie van ICS veroorzaakte, wat bevestigd wordt door Tan et al. 2021. Zowel *Rhodococcus* sp. R-43120 als *S. rimosus* LMG 19352 konden geen significante reductie in symptomen en necrotisch tarwebladweefsel door *Z. tritici* T02596 veroorzaken. Dit was te zien duidelijk te zien in de microscopische beelden (Figuur 24) en met de Region of Interest filter (Figuur 22). Desalniettemin blijft de inductie van SA- en JA-afhankelijke afweer een veelbelovende strategie. Met het stimuleren van SA- als JA-afweer-signalerings pathways door uit *Bacillus amyloliquefaciens* S499 verkregen surfactine werd tarwe grotendeels beschermd tegen *Z. tritici* (Le Mire et al., 2018).

Een mogelijkheid voor de toekomst kan zijn om *S. rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 in grotere concentraties aan te brengen of de tarweplant meerdere keren te behandelen. Een tweede mogelijkheid kan zijn om de tarweplanten op verschillende tijdstippen te behandelen met de actinobacteriën, op deze manier kan onderzocht worden of de bacteriën beter werken indien er meer hyfen aanwezig zijn op het blad of eerder preventief zouden gebruikt worden.

5 CONCLUSIE

In deze thesis zijn we erin geslaagd om tarwe succesvol te infecteren met *Z. tritici*. Macroscopisch en Microscopisch zijn de typische symptomen van *Z. tritici* vastgesteld. Een reproduceerbaar infectiesysteem vormt een goeie basis voor verdere onderzoeken naar de bestrijding tegen *Z. tritici*.

In de zoektocht naar de bestrijding tegen *Z. tritici* werd een *in vitro* antagonisme test uitgevoerd om het antagonistisch effect van een selectie *Actinobacteria* tegen *Z. tritici* te bepalen. Voor *Rhodococcus* sp. R-43120 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG 5984 werd dit antagonisme op alle media (PDA, CDV8, YPDA) vastgesteld. Hierdoor lijken deze organismen interessante opties om in volgende studies verder *in planta* te bestuderen.

In deze thesis werd ook de waarde van twee Actinobacteriën, met name *Streptomyces rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 als biocontrolestammen tegen *Z. tritici* *in planta* onderzocht. Op PDA media werd een antagonistische activiteit gemeld door *S. rimosus* LMG 19352. In QPCR-analyses werd de inductie van ICS door *Rhodococcus* sp. R-43120 vastgesteld, waardoor dit organisme in staat is om plant afweermechanismen te stimuleren. Dit is een veelbelovend resultaat voor toekomstige onderzoeken. Verdere analyses konden door de Covid19 pandemie en de maatregelen die dit met zich meebrengt aangaande bezettingsgraad in de laboratoria niet uitgevoerd worden.

Uit microscopisch onderzoek en visuele scoring van behandelde tarwebladeren bleken de bacteriën *Streptomyces rimosus* LMG 19352 en *Rhodococcus* sp. R-43120 geen invloed te hebben op de symptomen van de *Z. tritici* infectie in tarwe en kon hun waarde als biocontrole niet worden bevestigd.

REFERENTIES

- Abbasi S., Safaie N., Sadeghi A. en Shamsbakhsh M. (2019) *Streptomyces* Strains Induce Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 in Tomato Through Different Molecular Mechanisms; <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01505/full>
- Agrawal S., Jalal A. en Khan M. (2018) Plant Identification using Leaf Image Analysis; <https://poseidon01.ssrn.com/delivery.php?ID=59306908411208600701510401702411412702102109007807508502412106511900906809210206502405606100600004304906001802109011608310900512105703101107208311211507212412109109903002107510200010106607008412208201507211512407409502807900709801001200006069112008064&EXT=pdf&INDEX=TRUE>
- Al Farraj D., Varghese R., Vagvölgyi C., Elshikh M., Alokda A. en Mahmoud A. (2020) Antibiotics production in optimized culture condition using lowcost substrates from *Streptomyces* sp. AS4 isolated from mangrove soil sediment; <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364719318725>
- Ansari W.A., Krishna R., Zeyad M.T. en Singh S. (2020) Endophytic *Actinomycetes*-Mediated Modulation of Defense and Systemic Resistance Confers Host Plant Fitness Under Biotic Stress Conditions; https://www.researchgate.net/publication/340625392_Endophytic_Actinomycetes-Mediated_Modulation_of_Defense_and_Systemic_Resistance_Confers_Host_Plant_Fitness_Under_Biotic_Stress_Conditions
- Auch A.F., Von Jan M., Klenk H. en Göker M. (2010) Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3035253/>
- Barbedo J. (2013) Digital image processing techniques for detecting, quantifying and classifying plant diseases; <https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-2-660>
- Barka E.A. et al. (2016) Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4711186/>
- Blumer C. en Haas D. (2000) Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10763748/>
- Brennan C.J., Mullins E., Doohan F.M. en Benbow H.R. (2019) A review of the known unknowns in the early stages of *septoria tritici* blotch disease of wheat;

- https://www.researchgate.net/publication/334752883_A_review_of_the_known_unkn_owns_in_the_early_stages_of_septoria_tritici_blotch_disease_of_wheat
- Cairns T. en Meyer V. (2017) In silico prediction and characterization of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5561558/>
- Chandrashekara KN., Chandrashekara C., Chakravathi M. en Manivannan S. (2012) Biological Control of Plant Disease; https://www.researchgate.net/publication/232957601_Biological_Control_of_Plant_Disease
- Chauhan H., Bagyaraj D., Selvakumar G. en Sundaram S. (2015) Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential; <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139315300159>
- de Mendiburu F. (2014) *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R Package Version, 1
- De Zutter, N., Ameye, M., Debode, J., De Tender, C., Ommeslag, S., Verwaeren, J., Vermeir, P., Audenaert, K. en De Gelder, L (2021) Shifts in the rhizobiome during consecutive in *planta* enrichment for phosphate-solubilizing bacteria differentially affect maize P status; *Microbial Biotechnology*, doi:10.1111/1751-7915.13824
- Dicklow M.B. (2017) *Biological Control of Plant Diseases*; <https://ag.umass.edu/vegetable/factsheets/biological-control-of-plant-diseases>
- Duba A., Goriewa-Duba K. en Wachowska U. (2018) A Review of the Interactions between Wheat and Wheat Pathogens: *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium spp.* and *Parastagonospora nodorum*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5979484/>
- El-Refai H., Abdulla H., Abdelrahman H., Hanna A., Hashem A. en Ahmed E. (2011) Studies on the Production of Actinomycin by *Nocardioides luteus*; https://www.researchgate.net/publication/258999358_Studies_on_the_Production_of_Actinomycin_by_Nocardioides_luteus_a_Novel_Source
- Field crop disease Victoria (2020) *Septoria* Leaf Blotch of Wheat; <https://extensionaus.com.au/FieldCropDiseasesVic/docs/identification-management-of-field-crop-diseases-in-victoria/foiar-diseases-of-wheat/septoria-leaf-blotch-of-wheat/>
- Fones H. en Gurr S. (2015,) The impact of *Septoria tritici* blotch disease on wheat: An EU perspective; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4502551/>
- Frisvad J. (2012) Media and Growth Conditions for Induction of Secondary Metabolite Production;

https://www.researchgate.net/publication/232248011_Media_and_Growth_Conditions_for_Induction_of_Secondary_Metabolite_Production

- Gao B. en Gupta R. (2012) Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum *Actinobacteria*.; https://www.researchgate.net/publication/221888628_Gao_B_Gupta_R_S_Phylogenetic_framework_and_molecular_signatures_for_the_main_clades_of_the_phylum_Actinobacteria_Microbiol_Mol_Biol_Rev_76_66-112
- Garnault M., Duplaix C., Leroux P. en Couleaud G. (2020) Large-scale study validates that regional fungicide applications are major determinants of resistance evolution in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France; https://www.researchgate.net/publication/346597613_Large-scale_study_validates_that_regional_fungicide_applications_are_major_determinants_of_resistance_evolution_in_the_wheat_pathogen_Zymoseptoria_tritici_in_France
- Gholamnezhad J., Sanjarian F., Goltapeh E., Safaie en Razavi K. (2016) Effect of Salicylic Acid on Enzyme Activity in Wheat in Immediate Early Time after Infection with *Mycosphaerella Graminicola*; https://www.researchgate.net/publication/303129093_Effect_of_Salicylic_Acid_on_Enzyme_Activity_in_Wheat_in_Immediate_Early_Time_after_Infection_with_Mycosphaerella_Graminicola
- Gohel V., Singh A., Vimal M. en Ashwini P. (2005) Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms; https://www.researchgate.net/figure/Comparison-of-chemical-and-biological-fungicides_tbl2_27797278
- Goodwin S.B., M'Barek S.B., Dhillon B., Wittenberg A.H., Crane C.F. en Hane J.K. (2011) Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3111534/>
- Gopalakrishnan S., Pande S., Sharma M., Humayun P., Kiran B.K., Sandeep D., Vidya M.S., Deepthi K. en Rupel O. (2011) Evaluation of *actinomycete* isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea; https://www.researchgate.net/publication/251540082_Evaluation_of_actinomycete_isolates_obtained_from_herbal_vermicompost_for_biological_control_of_Fusarium_wilt_of_chickpea
- Henry G., Deleu M., Jourdan E., Thonart P. en Ongena M. (2011) The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21838773/>

- Hermosa R., Cardoza R., Monte E., Rubio B., Nicolas C. en Gutiérrez S. (2013) The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense; https://www.researchgate.net/publication/259628640_The_contribution_of_Trichoderma_to_balancing_the_costs_of_plant_growth_and_defense
- Hollaway G. en Henry F. (2020) *Septoria tritici* blotch of wheat; <https://agriculture.vic.gov.au/biosecurity/plant-diseases/grain-pulses-and-cereal-diseases/septoria-tritici-blotch-of-wheat>
- Jones J.D.G. en Dangl J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. DOI :10.1038/nature05286 ; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17108957/>
- Kachroo A. en Kachroo P. (2020) Mobile signals in systemic acquired resistance; https://www.researchgate.net/publication/345908822_Mobile_signals_in_systemic_acquired_resistance
- Kaur S., Pandey S. en Goel S. (2018) Semi-automatic leaf disease detection and classification system for soybean culture; <https://ietresearch.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1049/iet-ipr.2017.0822>
- Kerdraon L., Barret M., Laval V. en Suffert F. (2019) Differential dynamics of microbial community networks help identify microorganisms interacting with residue-borne pathogens: the case of *Zymoseptoria tritici* in wheat; <https://link.springer.com/article/10.1186/s40168-019-0736-0>
- Kettles G.J. en Kanyuka K. (2016) Dissecting the Molecular Interactions between Wheat and the Fungal Pathogen *Zymoseptoria tritici*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4832604/>
- Kitagawa W. en Tamura T. (2008) Three Types of Antibiotics Produced from *Rhodococcus erythropolis* Strains; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21558704/>
- Köhl J., Kolnaar R. en Ravensberg W. (2019) Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6658832/>
- Law J., Ser H., Khan T., Chuah L., Pusparajah P., Chan K., Goh B. en Lee L. (2017) The Potential of *Streptomyces* as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*); https://www.researchgate.net/publication/312478935_The_Potential_of_Streptomyces_as_Biocontrol_Agents_against_the_Rice_Blast_Fungus_Magnaporthe_oryzae_Pyricularia_oryzae
- Lefevere H., Bauters L. en Gheysen G. (2020) Salicylic Acid Biosynthesis in Plants; <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00338/full>

- Lehr N.A., Schrey S.D., Hampp R. en Tarkka M. (2008) Root Inoculation with a Forest Soil *Streptomyces* Leads to Locally and Systemically Increased Resistance against Phytopathogens in Norway Spruce; https://www.researchgate.net/publication/5762942_Root_Inoculation_with_a_Forest_Soil_Streptomyces_Leads_to_Locally_and_Systemically_Increased_Resistance_against_Phytopathogens_in_Norway_Spruce
- Le Mire G., Siah A., Brisset M., Gaucher M., Deleu M. en Jijakli M. (2018) Surfactin Protects Wheat against *Zymoseptoria tritici* and Activates Both Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Dependent Defense Responses; https://www.researchgate.net/publication/322351661_Surfactin_Protects_Wheat_against_Zymoseptoria_tritici_and_Activates_Both_Salicylic_Acid-_and_Jasmonic_Acid-Dependent_Defense_Responses
- Leroux P. en Walker A. (2011) Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20949586/>
- Levy E., Gough F.J., Berlin K.D., Guiana P.W. en Smith J.T. (1992) Inhibition of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics; <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.1992.tb02355.x>
- Lewin G.R. et al. (2017) Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5703056/>
- Macagnan D., Romeiro R., Pomelle A. en deSouza J.T. (2008) Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora (ex Crinipellis) pernicios* by phylloplane *actinomyces*; https://www.researchgate.net/publication/223778466_Production_of_lytic_enzymes_and_siderophores_and_inhibition_of_germination_of_basidiospores_of_Moniliophthora_ex_Crinipellis_pernicios_by_phylloplane_actinomyces
- Mazu T., Bricker B., Flores-Rozas H. en Ablordeppet S. (2017) The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5215921/>
- Milgroom M. en Cortesi P. (2004) Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15283669/>
- Nalam V., Alam S., Keereetaweeep J., Venables B., Burdan D., Lee H., Trick H., Sarowar S., Makandar R. en Shah J. (2015) Facilitation of *Fusarium graminearum* Infection by 9-Lipoxygenases in *Arabidopsis* and Wheat; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26075826/>

- Navarova H., Bernsdorff F., Döring A. en Zeier J. (2012) Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23221596/>
- Neeno-Eckwall E.C., Kinkel L.L. en Schottel J.L. (2001) Competition and antibiosis in the biological control of potato scab; https://www.researchgate.net/publication/11980231_Competition_and_antibiosis_in_the_biological_control_of_potato_scab
- Newitt J., Prudence S., Hutchings M. en Worsley S. (2019) Biocontrol of Cereal Crop Diseases Using *Streptomyces*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6630304/>
- Ongena M., Jourdan E., Adam A., Paquot M., Brans A., Joris B., Arpigny J. en Thonart P. (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17359279/>
- Ongena M. en Jacques P. (2008) *Bacillus lipopeptides* : versatile weapons for plant disease biocontrol ; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18289856/>
- Owen J.W., Yao C., Myung K., Kemmitt G., Leader A., Meyer K., Bowling A., Slanec T. en Kramer V. (2017) Biological characterization of fenpicoxamid, a new fungicide with utility in cereals and other crops; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5599960/>
- Parratt S. en Laine A. (2016) The role of hyperparasitism in microbial pathogen ecology and evolution; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5029149/>
- Pertot I., Puoplo G., Giovannini O., Angeli D., Sicher C. en Perazzolli M. (2016) Advantages and limitations involved in the use of microbial biofungicides for the control of root and foliar phytopathogens of fruit crops; <https://www.soihs.it/public/38/Pertot%20et%20al..pdf>
- Pierce G., Drago G., Ganguly S., Tucker T., Hooker J., Jones S. en Crow Jr S. (2011) Preliminary report on a catalyst derived from induced cells of *Rhodococcus rhodochromus* strain DAP 96253 that delays the ripening of selected climacteric fruit: bananas, avocados, and peaches; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21409422/>
- Pieterse C., Zamioudis C., Berendsen R.L. en Van Wees S. (2014) Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes; https://www.researchgate.net/publication/262929979_Induced_Systemic_Resistance_by_Beneficial_Microbes
- Ponomarenko A., Goodwin S.B. en Kema G.H.J. (2011) *Septoria tritici* blotch (STB of wheat); <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/Septoria.aspx>

- Procopio R., Silva I., Martins M., Azevedo J. en Araujo J. (2012) Antibiotics produced by *Streptomyces*; <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867012001341>
- Qi X., Yu J., Liu Q. en Chen C. (2017) Antifungal activity change of *Streptomyces rimosus* MY02 mediated by confront culture with other microorganism; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28211942/>
- Raaijmakers J., Vlami M. en De Souza J. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents; <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020501420831>
- Raja H., Vandermolen K., El-Elimat T. en Oberlies N. (2013) Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program; https://www.researchgate.net/publication/259348646_Evaluation_of_culture_media_for_the_production_of_secondary_metabolites_in_a_natural_products_screening_program
- Ranjani A., Dharumadurai D. en Gopinath P.M. (2016) An Introduction to *Actinobacteria*; https://www.researchgate.net/publication/294705164_An_Introduction_to_Actinobacteria
- RCoreTeam (2019) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for statistical computing
- Sarde S., Kumar A., Remme R. en Dicke M. (2018) Genome-wide identification, classification and expression of lipoxygenase gene family in pepper; <https://link.springer.com/article/10.1007/s11103-018-0785-y>
- Sharma V. en Salwan R. (2018) New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering pg. 93-108; <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444639943000060>
- Somai-Jemmali L., Randoux B., Siah A., Magnin-Robert M., Halama P., Reignault P. en Hamada W. (2016) Similar infection process and induced defense patterns during compatible interactions between *Zymoseptoria tritici* and both bread and durum wheat species; <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-016-1043-2>
- Steinberg G. (2015) Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4502449/>
- Stocco M., Monaco C., Abramoff C., Cordo C., Mansilla Y., Segarra C., Marchetti M., Consolo V., Lampugnani G. en Kripelz N. (2015) Native isolates of *Trichoderma harzianum* inducing resistance to *Zymoseptoria tritici* on wheat plants; https://www.researchgate.net/publication/288227682_Native_isolates_of_Trichoderma_harzianum_inducing_resistance_to_Zymoseptoria_tritici_on_wheat_plants

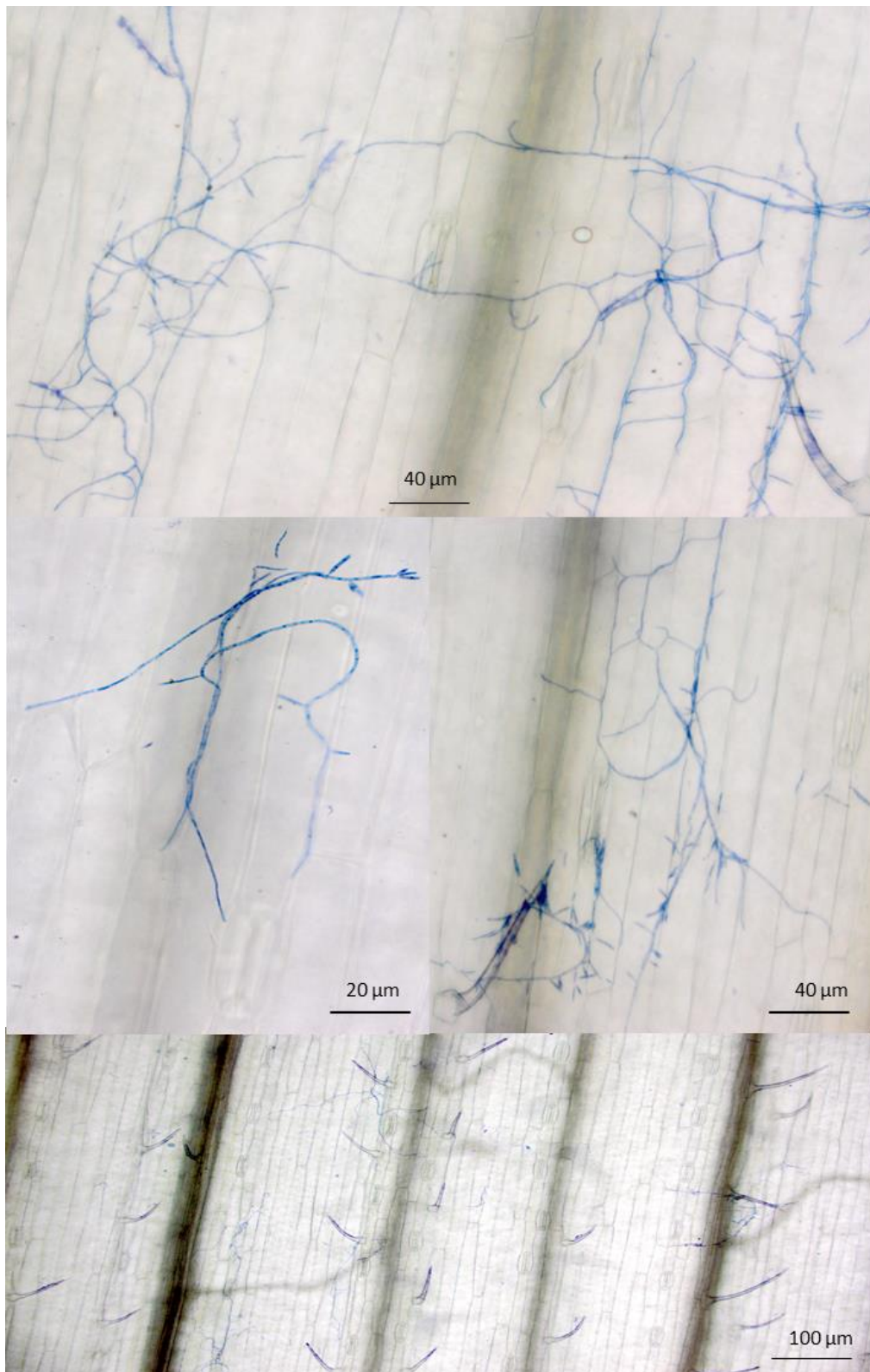
- Sutherland E.D. en Lockwood J.L. (2009) Hyperparasitism of some *Peronosporales* by *Actinoplanes missouriensis* and *Humicola fuscoatra* and other *Actinomycetes* and fungi;
https://www.researchgate.net/publication/233457235_Hyperparasitism_of_some_Peronosporales_by_Actinoplanes_missouriensis_and_Humicola_fuscoatra_and_other_Actinomycetes_and_fungi
- Syngenta (2020) Bladvlekkenziekte (*Mycosphaerelle graminicola/ Septoria tritici*);
<https://www.syngenta.nl/bladvlekkenziekte-mycosphaerelle-graminicola-septoria-tritici/bladvlekkenziekte-mycosphaerelle>
- Tan J., De Zutter N., De Saeger S., De Boevre M., Tran T.M., van de Lee T., Waalwijk C., Willems A., Vandamme P., Ameye M. en Audenaert K. (2021) Presence of the Weakly Pathogenic *Fusarium poae* in the Fusarium Head Blight Disease Complex Hampers Biocontrol and Chemical Control of the Virulent *Fusarium graminearum* Pathogen;
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.641890/full#FS4>
- Tiley A., White H., Foster G. en Bailey A. (2019) The *Ztve1B* Gene Is Required for Vegetative Growth and Sporulation in the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici*;
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02210/full>
- Tougeron K. en Tena A. (2018) Hyperparasitoids as new targets in biological control in a global change context;
https://www.researchgate.net/publication/327536263_Hyperparasitoids_as_new_targets_in_biological_control_in_a_global_change_context
- Tu J. (1988) Antibiosis of *Streptomyces griseus* Against *Colletotrichum lindemuthianum*;
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0434.1988.tb00960.x>
- Ul-Hassan A. en Wellington E.M. (2009) Encyclopedia of Microbiology (Third Edition) pg. 25-44; <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00044-4>
- Urban K. (2009) Competitive exclusion; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20205523/>
- Van Loon L., Rep M. en Pieterse C. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16602946/>
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G., Chater K.F. en Van Sinderen D. (2007) Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the evolutionary history of an ancient phylum; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168647/>
- Vessey K. (2003) Plant growth promoting *rhizobacteria* as biofertilizers;
<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1026037216893>

- Vlot A., Dempsey D. en Klessig D. (2009) Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease; <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Wang C., El-Shetehy M., Shine M.B., Yu K., Navarre D., Wendehenne D., Kachroo A. en Kachroo P. (2014) Free Radicals Mediate Systemic Acquired Resistance; <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124714002101>
- Wickham, H. (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Berlin: Springer
- Wightwick A., Walters R., Allinson G., Reichman S. en Menzies N. (2010) Environmental Risks of Fungicides Used in Horticultural Production Systems; https://www.researchgate.net/publication/221905690_Environmental_Risks_of_Fungicides_Used_in_Horticultural_Production_Systems
- Yang S.H., Palaniyandi S.A., Zhang L. and Suh J.W. (2013) Effects of *actinobacteria* on plant disease suppression and growth promotion; https://www.researchgate.net/publication/257350147_Effects_of_actinobacteria_on_plant_disease_suppression_and_growth_promotion
- Yarbrough M., Lainhart W. en Burnham C. (2017) Identification of *Nocardia*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* using MALDI-TOF MS with the Bruker Biotyper; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28811116/>
- Zuccaro G., Pirozzi D. en Yousuf A. (2020) Chapter 4 - Lignocellulosic biomass to biodiesel; <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128159361000046>

BIJLAGEN

Tabel B1: Primers gebruikt voor RT-qPCR

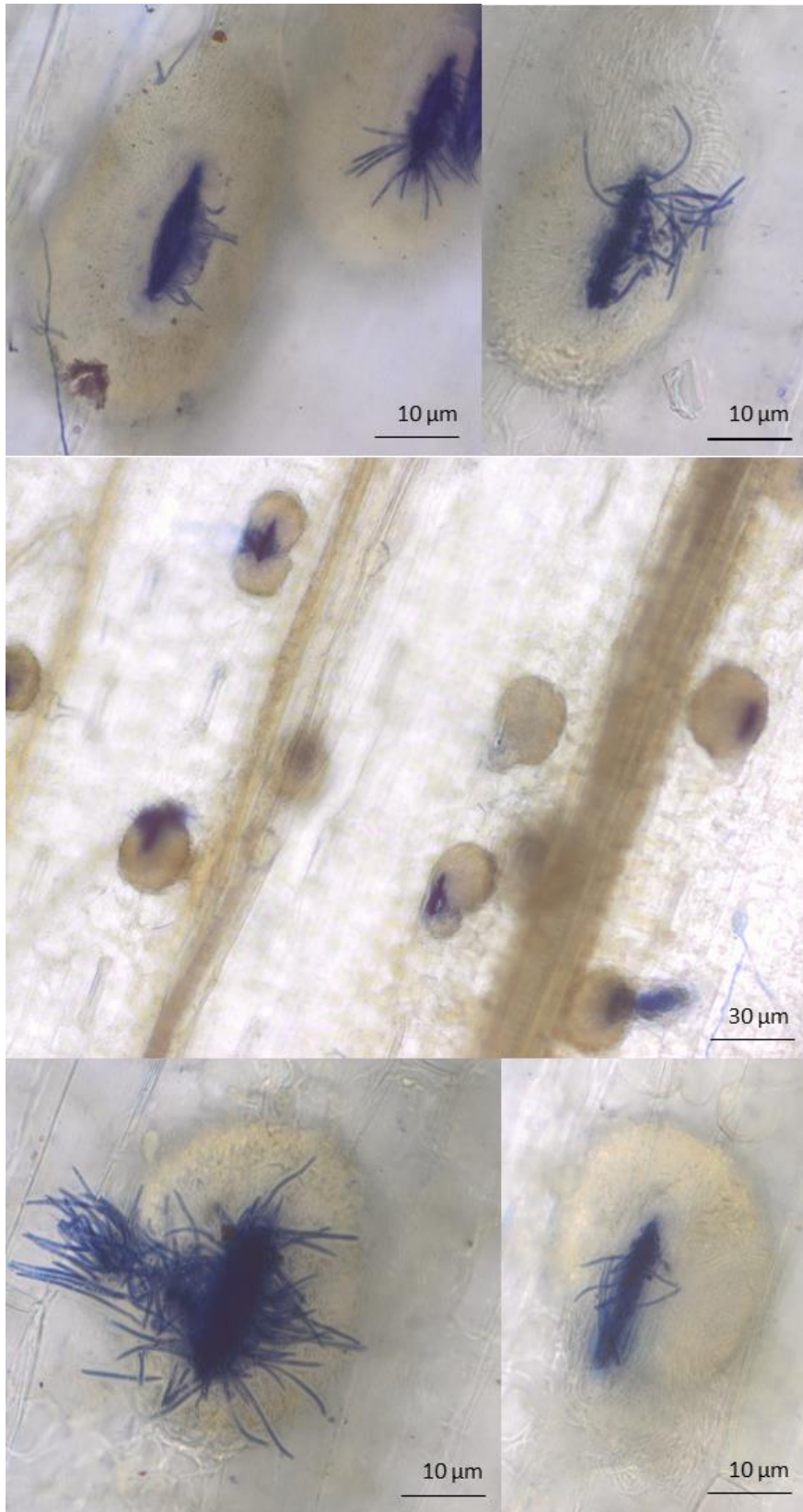
Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
LOX1	GGCAGGCCATCGAGCAGTACG	TACTGCCCCGAAGTTGACCGCC
PAL	TTGATGAAGCCGAAGCAGGACC	ATGGGGGTGCCTTGGAAGTTGC
ICS	AGAAATGAGGACGACGAGTTTGAC	CCAAGTAGTGCTGATCTAATCCCAA
Ta54227	CAAATACGCCATCAGGGAGAACATC	CGTGCCGAAACCACGAGAC
bb-actin	CGAACCTTCAGTTGCCAGCAAT	ACCATCACCAGAGTCGAGCAGAAT
PR1	CGTCTTCATCACCTGCAACTA	CAAACATAAACACACGCAGCTA
PR4	ACACCGTCTTCACCAAGATCGACA	AGCATGGATCAGTCTCAGTGCTCA



Figuur B1: Microscopische observatie van vorming van hyfen en het binnendringen van de stomata door T02596 Z. tritici-stam op tarwebladeren met behulp van lactofenolblauwkleuring in de week 2



Figuur B2: Microscopische observatie van de pycnidiumstructuur en vrijkomende pycnidiosporen van T02596 Z. tritici-stam op tarwebladeren met behulp van lactofenolblauwkleuring in de week 3



Figuur B3: Microscopische observatie van de pycnidiumstructuur en vrijkomende pycnidiosporen van T02596 Z. tritici-stam op tarwebladeren met behulp van lactofenolblauwkleuring in de week 4