

RHAMNOLIPIDEN IN ZAADCOATINGS: DE SLEUTEL TER BESTRIJDING VAN PYRICULARIA ORYZAE OP RIJST

Kilian Van Loocke

Stamnummer: 01607570

Promotoren: Prof. dr. ir. Monica Höfte, Prof. dr. ir. Pieter Spanoghe

Tutoren: Ir. Jasmine De Rop, Ir. Rutger Pipeleers

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad in

Master of Science in de bio-ingenieurswetenschappen: landbouwkunde

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

Na een volledig jaar is het zover. Met het schrijven van dit dankwoord leg ik de laatste hand aan mijn masterproef. Het was een periode waarin ik veel heb bijgeleerd, op wetenschappelijk gebied, maar ook op persoonlijk vlak. Met deze masterproef kreeg ik de kans om mijn kennis in twee vakgebieden waarin ik geïnteresseerd was, fytofarmacie en fytopathologie, verder uit te breiden. Mijn interesse en enthousiasme hierin werden gewekt tijdens de lessen van de vakken *Fytofarmacie*, *Gewasbescherming* en *Gewasbeschadigers*. Ik wil graag stilstaan bij de mensen die mij de afgelopen periode gesteund en geholpen hebben.

Eerst en vooral wil ik mijn promotoren prof. dr. ir. Monica Höfte en prof. dr. ir. Pieter Spanoghe bedanken voor de kans die ik kreeg om te mogen werken aan dit fascinerende onderwerp. Daarnaast wil ik hen bedanken voor het kritisch nalezen en het geven van interessante inzichten. Het enthousiasme van mijn tutoren, ir. Jasmine De Rop en ir. Rutger Pipeleers, werkte heel aanstekelijk waardoor ik elke dag steeds met plezier in het labo stond. Jasmine, bedankt om altijd paraat te staan om te antwoorden op mijn vragen, die niet altijd thesisgerelateerd waren. Rutger, ook jou wil ik bedanken om mij bij de aanvang van de thesis wegwijst te maken in het labo en steeds te helpen bij de proeven waar nodig. Het kritisch nalezen van mijn masterproef door jullie beiden was uiteraard een heel grote hulp.

Van het labo Fytofarmacie wil ik ook graag enkele mensen speciaal in de bloemen zetten. Eerst en vooral wil ik Liliane bedanken voor de vele uitleg en de fijne gesprekken die we tijdens de middagpauzes en op andere momenten hebben gevoerd. Jij zorgde steeds voor een aangename sfeer in het labo. Edelbis, Elena, Amber and Melissa, thank you for the nice talks during the breaks! Voor de leden van het labo Fytopathologie kan ik ook niets anders zeggen dan dankuwel! Ook daar was er steeds een aangename en losse sfeer waar iedereen steeds bereid was om mij te helpen.

Zeker is het niet onbelangrijk om de andere thesisstudenten van beide labo's te bedanken voor de fijne werksfeer en de leuke middagpauzes in de moestuin met in het bijzonder Kaat, Sofie, Elias en Laurens voor de fijne vriendschap! Elias, nog eens speciaal bedankt om af en toe mijn rijstplanten water te geven en de andere hulp in het labo.

Tot slot wil ik ook mijn ouders, zus en broer bedanken voor de vele steun, niet alleen tijdens dit jaar maar ook tijdens mijn volledige opleiding en om me steeds met beide voeten op de grond te houden. Zonder jullie zou dit werk nooit tot stand zijn gekomen!

Kilian Van Loocke

4 juni 2020

Samenvatting

Verschillende micro-organismen waaronder *Pseudomonas aeruginosa* zijn in staat om rhamnolipiden (RL) te produceren. In deze studie werd het vermogen van rhamnolipiden onderzocht om rijstblastziekte, veroorzaakt door *Pyricularia oryzae*, te bestrijden via geïnduceerde systemische resistentie (ISR). *In planta* biocontrole-experimenten werden uitgevoerd op de rijstblastgevoelige *Oryza sativa* L. indica cv. CO-39 en toonden aan dat de rhamnolipiden met succes resistentie induceren tegen *P. oryzae* VT5M1. Om de rijstplant zo snel mogelijk te beschermen tegen deze pathogeen en de rhamnolipiden zo gericht mogelijk toe te passen, werden ze geïncorporeerd in zaadencrusteringen, die opgebouwd werden uit carriers (vast dragermateriaal) en stickers (waterige plakstof). De optimalisatie van de zaadencrustering verliep aan de hand van het testen van verschillende kwaliteitsparameters: de kiemkracht, de ontwikkeling van de zaailingen (~ scheut- en wortellengte), de doorloopsnelheid (~ ruwheid), het coatingsverlies door wrijving (~ stevigheid) en de desintegratie in water. De zaadencrusteringen met de goede kwaliteitsparameters bestonden uit de carriers bentoniet, kaolien of een mengsel van bentoniet en talk en uit de stickers xanthaangom 0,1 %, methylcellulose 1 %, carboxymethylcellulose 1 %, mowiol 5 %, mowiol 10 %, polyvinylalcohol 10 % en Arabische gom 15 %. De beste combinatie (carrier: bentoniet/talk en sticker: mowiol 5%) werd gebruikt als grondlaag voor de zaadencrusteringen om het blijvend contact tussen het zaadoppervlak en de coatingsmaterialen te garanderen. Boven de grondlaag kwam een tussenlaag waarin de wateroplosbare rhamnolipiden werden verwerkt via de op water gebaseerde sticker. Tot slot zorgde een toplaag voor de bescherming van de rhamnolipiden. De werkzaamheid van de verschillende RL-concentraties aanwezig in de zaadencrusteringen werd getest via *in planta* biocontrole-experimenten waarbij de ernst van de rijstblast significant verminderde in vergelijking met de zieke controleplanten. Bovendien vertoonden ze significant hetzelfde effect als de chemische positieve controle S-methyl 1,2,3-benzothiadiazool-7-carbothioaat (BTH) waarvan reeds werd aangetoond dat het met succes resistentie kan induceren tegen *P. oryzae*. Echter, het opkomstpercentage van de zaadencrusteringen met rhamnolipiden was laag waardoor de hoeveelheid rhamnolipiden wellicht te fytotoxisch was. Als reactie hierop werden lagere concentraties rhamnolipiden geïncorporeerd in de zaadencrusteringen die een aanzienlijke verbetering aantoonde wat betreft de kiemkracht. Kortom, deze studie toont de mogelijkheid aan om rhamnolipiden te verwerken in zaadencrusteringen alsook de biologische activiteit van rhamnolipiden in de bestrijding van de rijstblastziekte veroorzaakt door *P. oryzae*.

Abstract

Several microorganisms including *Pseudomonas aeruginosa* are capable of producing rhamnolipids (RL). In this study, the ability of rhamnolipids to control rice blast disease caused by *Pyricularia oryzae* through induced systemic resistance (ISR) was investigated. *In planta* biocontrol experiments were conducted on the rice blast susceptible *Oryza sativa* L. indica cv. CO-39 and showed that the rhamnolipids successfully induce resistance to *P. oryzae* VT5M1. In order to protect the rice plant from this pathogen as quickly as possible and to apply the rhamnolipids in the most targeted manner, the rhamnolipids were incorporated into seed encrustings, which were composed of carriers (solid materials) and tickers (aqueous adhesive materials). The optimization of the seed encrustings proceeded by testing various quality parameters: germination, seedling development (~ shoot and root length), flowability (~roughness), coating loss due to friction (~sturdiness) and disintegration in water. The seed encrustings with good quality parameters consisted of the carriers bentonite, kaolin or a mixture of bentonite and talc and of the stickers xanthan gum 0.1 %, methyl cellulose 1 %, carboxymethyl cellulose 1 %, mowiol 5 %, mowiol 10 %, polyvinyl alcohol 10 % and gum Arabic 15 %. The best combination (carrier: bentonite/talc and sticker: mowiol 5%) was used as the ground layer for the seed encrustings to ensure the permanent contact between the seed surface and the encrusting materials. On top of the ground layer came an intermediate layer in which the water-soluble rhamnolipids were incorporated via the water-based sticker. Finally, a top layer provided protection for the rhamnolipids. The efficacy of the different RL concentrations present in the seed encrustings was tested via *in planta* biocontrol experiments in which the severity of the rice blast was significantly reduced compared to the diseased control plants. Moreover, they showed the same effect as the chemical positive control S-methyl 1,2,3-benzothiadiazole-7-carbothioate (BTH) which has already been shown to successfully induce resistance to *P. oryzae*. However, the emergence rate of the seed encrustings with rhamnolipids was low so the amount of rhamnolipids may have been too phytotoxic. Because of this result, lower concentrations of rhamnolipids were incorporated into the seed encrustings. This showed significant improvement in terms of germination. In summary, this study demonstrates the possibility of incorporating rhamnolipids into seed encrustings as well as the biological activity of rhamnolipids in the control of rice blast disease caused by *P. oryzae*.

Inhoudsopgave

Lijst met afkortingen	I
Inleiding	III
1 Literatuurstudie.....	1
1.1 Rijst.....	1
1.1.1 Productie.....	1
1.1.2 Teelt.....	2
1.1.3 Ziekten en plagen	3
1.2 Pyricularia oryzae	4
1.2.1 Globaal belang en taxonomie.....	4
1.2.2 Levenscyclus	4
1.2.3 Ziektesymptomen	6
1.2.4 Ziektebestrijding.....	7
1.3 Rhamnolipiden.....	8
1.3.1 Microbiële productie van rhamnolipiden	9
1.3.2 Synthetische productie van rhamnolipiden.....	12
1.3.3 Fysicochemische eigenschappen.....	12
1.3.4 Biologische eigenschappen.....	14
1.3.5 Toepassingen van rhamnolipiden.....	14
1.3.6 Wetgeving.....	15
1.4 Interactie tussen <i>P. oryzae</i> , rijst en rhamnolipiden.....	15
1.4.1 Plantenimmuunsysteem en geïnduceerde resistentie.....	16
1.4.2 Effect van rhamnolipiden op ISR	17
1.4.3 ISR in rijst tegen <i>P. oryzae</i> met rhamnolipiden als trigger	18
1.5 Zaadbehandelingen	18
1.5.1 Type zaadbehandelingen	18
1.5.2 Regulering	20
1.5.3 Gebruik	20
1.5.4 Samenstelling van een (biologische) zaadencrusterings	22
1.5.5 Kwaliteitsparameters	23
2 Materiaal en methoden.....	25
2.1 In planta bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden	25
2.1.1 Behandeling en gebruikte producten.....	25

2.1.2	Proefopzet	25
2.2	In vitro bepaling van het fytotoxisch effect van rhamnolipiden op rijstzaden	27
2.3	Extractie van rhamnolipiden uit de bodem	28
2.3.1	Bepaling oppervlaktespanning via Wilhelmy plaatmethode	28
2.3.2	Kwantificatie van rhamnolipiden uit de bodem	29
2.4	Zaadencrusterings en incorporatie met rhamnolipiden	29
2.4.1	Optimalisatie van de coatingsmethode.....	29
2.4.2	Selectie van zaadencrusterings zonder rhamnolipiden o.b.v. kwaliteitsparameters.....	31
2.4.3	Incorporatie van rhamnolipiden in zaadencrusterings (CO-39)	33
2.4.4	Kwaliteitstesten op de zaadencrusterings met rhamnolipiden (CO-39)	35
2.4.5	Bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden in de zaadencrusterings (CO-39) ..	35
2.4.6	Aanwezigheid van MO's in de zaadencrusterings met rhamnolipiden.....	36
2.5	Statistische dataverwerking.....	37
3	Resultaten	39
3.1	In planta bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden	39
3.2	In vitro bepaling van het effect van rhamnolipiden op de fytotoxiciteit van rijstzaden.....	39
3.3	Extractie van rhamnolipiden uit bodem	40
3.3.1	Bepaling van de oppervlaktespanning via Wilhelmy plaatmethode	40
3.3.2	Extractie van rhamnolipiden uit de bodem	41
3.4	Zaadencrusterings en incorporatie met rhamnolipiden	42
3.4.1	Optimalisatie van de encrusteringsmethode	42
3.4.2	Selectie van zaadencrusterings zonder rhamnolipiden o.b.v. kwaliteitsparameters.....	42
3.4.3	Incorporatie van rhamnolipiden in zaadencrusterings (CO-39)	49
3.4.4	Kwaliteitstesten op de zaadencrusterings met rhamnolipiden (CO-39)	50
3.4.5	Bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden in de zaadencrusterings (CO-39) ..	54
3.4.6	Aanwezigheid van MO's in de zaadencrusterings met rhamnolipiden.....	57
4	Discussie	59
4.1	In planta bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden	59
4.2	In vitro bepaling van het effect van rhamnolipiden op de fytotoxiciteit van rijstzaden.....	60
4.3	Extractie van rhamnolipiden uit de bodem	60
4.3.1	Bepaling van de oppervlaktespanning via Wilhelmy plaatmethode	60
4.3.2	Extractie van rhamnolipiden uit de bodem	61
4.4	Zaadencrusterings en incorporatie met rhamnolipiden	61

4.4.1	Optimalisatie van de encrusteringsmethode	61
4.4.2	Selectie van zaadencrusteringsen zonder rhamnolipiden o.b.v. kwaliteitsparameters	62
4.4.3	Incorporatie van rhamnolipiden in zaadencrusteringsen (CO-39)	64
4.4.4	Kwaliteitstesten op de zaadencrusteringsen met rhamnolipiden (CO-39)	64
4.4.5	Bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden in de zaadencrusteringsen (CO-39) ..	66
4.4.6	Aanwezigheid van MO's in de zaadencrusteringsen met rhamnolipiden.....	67
5	Conclusie.....	69
6	Verder onderzoek.....	71
7	Bibliografie.....	73
8	Bijlagen.....	85

Lijst met afkortingen

6-BA	6-benzylaminopurine
AM	Arbusculaire mycorrhiza
BCA's	Biocontrole Agenten
BI	Net voor inoculatie (<i>before inoculation</i>)
CFU	Kolonievormende eenheden
CMC	Kritische Micelconcentratie
DAMP	Damage-associated Molecular Pattern
DP	Tijdens het planten (<i>during planting</i>)
DRDL	Di-rhamno-di-lipiden
DRML	Di-rhamno-mono-lipiden
dTDP-L-rhamnose	Dioxy-thymidinedifosfo-L-rhamnose
ECHA	Europees Agentschap voor Chemische stoffen
ESA	European Seed Association
ESTA	European Seed Treatment Assurance
ET	Ethyleen
ETI	Effector-triggered Immunity
ETS	Effector-triggered Susceptibility
GA ₃	Gibberelline
HAA	3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoaat
HLB	Hydrofiele lipofiele balans
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IEC	International Electrotechnical Commission
IPM	Integrated Pest Management (Geïntegreerde gewasbescherming)
ISO	International Organization for Standardization
ISR	Induced Systemic Resistance
JA	Jasmijnzuur
LC	Liquid Chromatography
LPS	Lipopolysacchariden
MAMP	Microbe-associated Molecular Pattern
MO's	Micro-organismen
MRDL	Mono-rhamno-di-lipiden
MRML	Mono-rhamno-mono-lipiden
MS	Massaspectrometrie
NAA	Naftaleen azijnzuur
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern
PRR	Pattern-recognition Receptors
PTI	PAMP-triggered Immunity
PVA	Polyvinylacetaat

PVP	Polyvinylpyrrolidine
REACH	Registratie, Evaluatie, Autorisatie en Restrictie van Chemische stoffen
RhIA	Rhamnolipide A
RhIB	Rhamnolipide B
RhIC	Rhamnolipide C
RL	Rhamnolipiden
ROS	Reactieve zuurstofsoorten
SA	Salicylzuur
SAR	Systemic Acquired Resistance

Inleiding

Rijst of *Oryza sativa* is globaal één van de belangrijkste voedselgewassen geconsumeerd door de mens (CGIAR, 2016). Er wordt daarom ook continu gestreefd naar de hoogst mogelijke opbrengsten om deze hoge voedselvraag te kunnen halen. *Pyricularia oryzae* wordt als de meest voorkomende schimmel op rijst gezien en is dus een belangrijke factor voor het al dan niet verkrijgen van een goede oogst. Deze pathogeen kan namelijk zorgen voor een opbrengstverlies van 10 % tot 30 % (Galhano et al., 2011). Rhamnolipiden (RL) zouden hier de oplossing kunnen bieden omdat ze in de rijstplant een geïnduceerde systemische resistentie (*induced systemic resistance*, ISR) opwekken waardoor de plant zelf in staat is om *P. oryzae*-infectie te beperken. Rhamnolipiden zijn secundaire metabolieten en worden onder andere door *Pseudomonas aeruginosa* geproduceerd, maar kunnen ook synthetisch worden aangemaakt (Hogan et al., 2019; Mulligan, 2007). Het doel van deze thesis is het ontwikkelen van zaadencrusterings als carrier van natuurlijke rhamnolipiden met het oog op het induceren van resistentie in de rijstplant.

Het incorporeren van rhamnolipiden in zaadencrusterings zou op die manier niet enkel leiden tot het bestrijden van de rijstpathogeen *P. oryzae*, maar zou ook een andere problematiek aanpakken, namelijk de alsmaar grotere aandacht voor een minder gebruik van chemische gewasbeschermingsmiddelen. Omwille van de nadelige effecten op de mens en het milieu wil de EU tegen 2050 volledig klimaatneutraal zijn door een nieuwe groeistrategie uit te voeren, genaamd de *European Green Deal* (Mulvaney, 2019). In deze strategie wordt aangestuurd op de ontwikkeling van nieuwe innovaties die het pesticidegebruik drastisch kunnen reduceren. De eigenschap van rhamnolipiden voor het opwekken van geïnduceerde chemische resistentie (ISR) in de rijstplant samen met de *European Green Deal* maakt dat de incorporatie van rhamnolipiden in zaadencrusterings een belangrijke strategie kan zijn om *P. oryzae* duurzaam en efficiënt te bestrijden.

De onderzoeksvragen die relevant zijn, worden in vier thema's opgedeeld: het effect van rhamnolipiden op het induceren van een ISR-respons tegen *P. oryzae* in rijstplanten, de ontwikkeling van zaadencrusterings, de incorporatie van rhamnolipiden in zaadencrusterings en tot slot de werkzaamheid van de zaadencrusterings met rhamnolipiden. Aan elk thema wordt respectievelijk een onderzoeksvraag gelinkt:

Onderzoeksvraag 1: Welke rhamnolipidenconcentraties induceren ISR in de rijstplant tegen *P. oryzae* en speelt het moment van toepassen hierbij een rol?

Onderzoeksvraag 2: Welke combinatie carrier en sticker maakt het mogelijk om een zaadencrusterings op rijst te ontwikkelen zonder in te boeten op kieming en andere kwaliteitsparameters?

Onderzoeksvraag 3: Hoe worden de zaadencrusterings het best geselecteerd opdat rhamnolipiden erin kunnen worden verwerkt en hoe worden deze best in de zaadencrusterings verwerkt?

Onderzoeksvraag 4: Induceren de rhamnolipiden aanwezig in de zaadencrusterings een ISR-respons in de rijstplant tegen *P. oryzae* zonder in te boeten op de kieming en de ontwikkeling van rijstzaden?

In deze thesis werden verschillende stappen ondernomen om een antwoord te vinden op de onderzoeksvragen. Eerst werd een plantenproef opgestart die moest uitwijzen welke RL-concentraties een ISR-respons in de rijstplant induceerden. Een in vitro experiment gaf meer duiding over het effect van RL-concentraties op de scheut- en wortelontwikkeling van de rijstzaailingen. Ook werd de optimale coatingsmethode bepaald opdat er effectief een zaadcoating rond de rijstzaden kon worden gebracht. Daarnaast werd naar de meest optimale manier gezocht om de rhamnolipiden in de zaadencrusterings te formuleren. Na het ontwikkelen van de zaadencrusterings werd de kwaliteit ervan bepaald aan de hand van verschillende kwaliteitsparameters zoals de sterkte van de coating, de ruwheid van het oppervlak, de kiemkracht en de desintegratie van de coating in water.

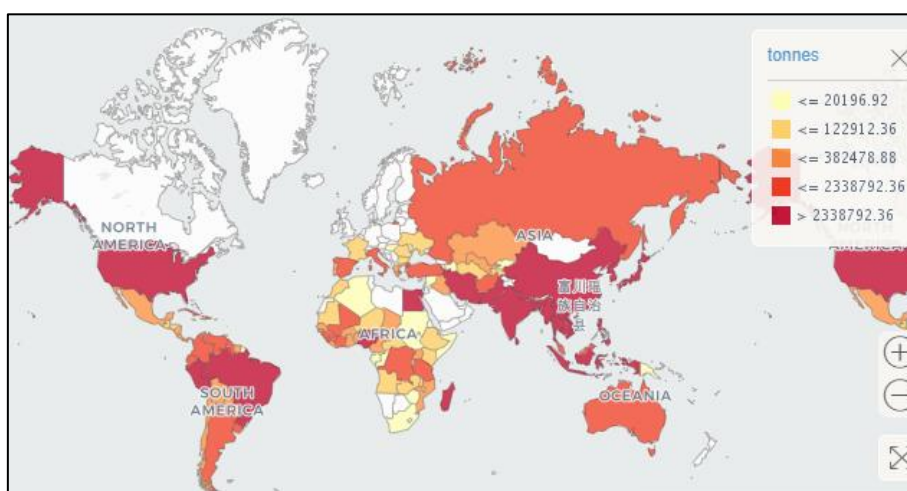
1 Literatuurstudie

1.1 Rijst

Rijst is 's werelds meest belangrijke voedselgewas en wordt door meer dan de helft van de wereldbevolking als hoofdvoedsel beschouwd. Het gewas levert meer dan één vijfde van de calorieën die wereldwijd door de mens worden geconsumeerd (CGIAR, 2016). Wereldwijd worden slechts twee rijstsoorten gecultiveerd en dit binnen het geslacht *Oryza*, namelijk: *O. sativa* (Aziatische rijst) en *O. glaberrima* (Afrikaanse rijst). De Aziatische rijst wordt wereldwijd geteeld en bestaat uit twee ondersoorten: *O. sativa spp. indica* en *O. sativa spp. japonica*. Beide variëteiten werden ongeveer 8200 tot 13500 jaar geleden in de Pearl River vallei in China gedomesticeerd. Indica-variëteiten van rijst hebben lange, niet-kleverige granen en worden voornamelijk geteeld in de (sub)tropen terwijl de granen van japonica-variëteiten eerder kort en kleverig zijn en in de koelere zones van de subtropen en in gematigde klimaten worden geteeld. De Afrikaanse rijst wordt gecultiveerd in delen van West-Afrika. Ze brengt minder op dan de Aziatische variant, maar is wel meer opgewassen tegen veranderende omgevingscondities zoals onvruchtbare bodems, fluctuaties van het waterpeil en ijzertoxiciteit (GRISP, 2013; Linares, 2002; Ricepedia, n.d.). In 2019 was de opbrengst van rijst gelijk aan 496 miljoen ton. Hiermee behoort rijst tot de top drie meest geproduceerde granen ter wereld, het moet enkel maïs en tarwe voor zich laten met respectievelijk 1116 en 764 miljoen ton opbrengst (Statistica, 2020b). Met de verwachte toenemende populatiegroei, inkomensgroei en afname van het rijstareaal zal de vraag naar rijst wereldwijd blijven toenemen met in 2030 een verwachte vraag van 535 – 551 miljoen ton rijst (CGIAR, 2016).

1.1.1 Productie

Wereldwijd wordt rijst op 160 miljoen ha verbouwd (Liu et al., 2014; Upadhyay et al., 2020). **Figuur 1** geeft de wereldwijde productie van paddy rijst weer. Azië is verantwoordelijk voor ongeveer 90% van de totale wereldproductie en -consumptie van rijst (FAO, 2020). China is de hoofdproducent met meer dan 28% van de totale rijstproductie ofwel 148 miljoen ton, gevolgd door India en Indonesië met respectievelijk 116 en 37 miljoen ton rijstproductie (Liu et al., 2014; Statistica, 2020).



Figuur 1: Wereldwijde productie van rijst uitgedrukt in ton met Azië als belangrijkste producent (FAO, 2020). Wereldwijd wordt rijst op 160 miljoen ha verbouwd en zorgt dit globaal voor 500 miljoen ton productie per jaar.

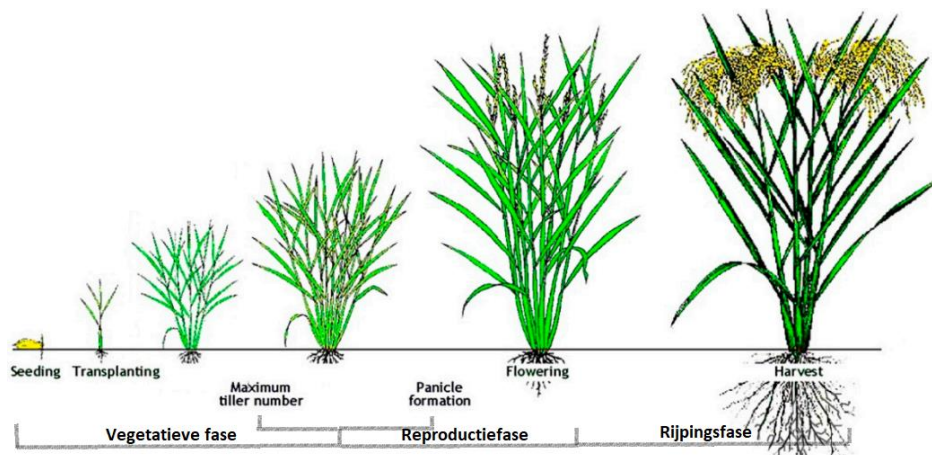
1.1.2 Teelt

1.1.2.1 *Verschillende teeltsystemen*

Bij de teelt van rijst kunnen vijf verschillende teeltsystemen worden onderscheiden, weergegeven in **Bijlage 1**. Deze teeltsystemen worden op basis van de waterbeschikbaarheid tijdens het groeiseizoen en indirect ook volgens teelthoogte gedefinieerd. Droge rijstcultivatie verwijst naar rijst die tijdens het groeiseizoen een waterbehoefte heeft van minder dan 800 mm water terwijl de waterbehoefte bij natte rijstcultivatie hoger is dan 1000 mm water. Binnen de droge rijstcultivatie worden hoogland- en laaglandrijst geclassificeerd. Onder de natte rijstcultivatie vallen de overstromde rijstteelt, geïrrigeerde (paddy)rijstteelt en diepwaterrijstteelt. Tussen de 600 mm en 999 mm water wordt het echter moeilijk om uit te maken welk systeem werkelijk wordt toegepast aangezien ze een vergelijkbare veldecologie en onkruidflora hebben (Kingwell-Banham, 2019).

1.1.2.2 *Groei van rijst*

Rijst wordt zowel verplant als direct gezaaid. Het verplanten van rijstplanten is arbeidsintensief en bestaat uit verschillende stappen: de zaailingen kweken, de planten uittrekken en bundelen en ten slotte het transport naar het veld om ze te planten. Bij direct zaaien worden de zaden rechtstreeks op het veld gezaaid (IRRI, 2019). Binnen het direct zaaien kan er nog een onderscheid worden gemaakt tussen nat en droog zaaien. Bij nat zaaien wordt het zaad voorgekiemd alvorens het naar de zaaibedden wordt overgebracht (Rice Knowledge Bank, 2020). Droog direct zaaien wordt voornamelijk in minder vochtige velden, zoals hoogland rijst toegepast (Liu et al., 2014). De groeifasen van rijst kunnen in een vegetatieve fase, een reproductieve fase en een rijpingsfase worden opgedeeld. **Figuur 2** geeft deze verschillende groeifasen weer. Tijdens de vegetatieve fase kiemen de zaden nadat de dormantie werd doorbroken. Hiervoor moeten de zaden aan een temperatuur tussen 10 °C en 40 °C (optimale temperatuur 31 °C) en een vochtgehalte tussen 9,3 % en 14 % worden blootgesteld (Moldenhauer et al., 2016; Paderes et al., 1997). Vervolgens ontwikkelt er zich een radicula en een coleoptiel. Natte of anaerobe omstandigheden leiden ertoe dat eerst de coleoptiel zal ontwikkelen. Na de kieming groeit de plant, afhankelijk van de rijstvariëteit, 55 tot 85 dagen. De reproductieve fase treedt op vanaf het moment dat de pluimvorming start en het maximaal aantal stengels zijn gevormd. Eén dag na de volledige ontwikkeling van de pluim start de bloemvorming die ongeveer zeven dagen doorgaat. Ten slotte rijpen de rijstplanten voor een periode van ongeveer 30 dagen (CGIAR, n.d.; Moldenhauer et al., 2016).



Figuur 2: Groeiproces van de rijstplant, op te delen in drie overkoepelende fasen, namelijk: vegetatieve fase (t.e.m. ontwikkeling van de pluim), reproductiefase (tussen pluimvorming t.e.m. bloemvorming) en rijpingsfase (na bloemvorming) (Nelson et al., 2014).

1.1.3 Ziekten en plagen

1.1.3.1 *Integrated Pest Management*

Het jaarlijkse opbrengstverlies door ziekten en plagen op rijst bedraagt gemiddeld 37 %. Het is uiterst belangrijk om deze verliezen te beperken door middel van een goed management, waarin geïntegreerde gewasbescherming (IPM) een centrale rol speelt. Preventief vermijden dat plagen en ziekten het gewas kunnen beschadigen, is de beste optie en omvat de volgende stappen: het grondig reinigen van het gebruikte materiaal, het gebruik van ziektevrrije zaden en resistente variëteiten, het gelijktijdig planten van het gewas met andere landbouwers, het akkerland niet overbemesten, de aanwezigheid van natuurlijke vijanden stimuleren, pesticidetoepassingen vermijden tijdens de eerste 40 dagen na het planten en het opslaan van de zaden en geoogste zaden op een reïne manier. (Rice Knowledge Bank, n.d.).

1.1.3.2 *Ziektes*

De belangrijkste ziektes op rijst zijn rijstblast (*P. oryzae*), *bacterial blight*, *sheath blight*, *brown spot*, *sheath rot*, *rice ragged stunt virus* en *rice grassy stunt virus*. De levenscyclus van *P. oryzae* en de bestrijding ervan wordt uitvoerig in **Sectie 1.2** besproken. *Bacterial blight* wordt veroorzaakt door *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *sheath blight* door *Rhizoctonia solani*, *brown spot* door *Bipolaris oryzae* en *sheath rot* door *Sarocladium oryzae*. Beide virussen worden overgedragen door de bruine sprinkhaan (Rice Knowledge Bank, n.d.). Wanneer ziektesymptomen visueel worden gerapporteerd, wordt best een bladfungicide toegepast. Het is hierbij belangrijk om zo vroeg mogelijk de fungiciden op het veld toe te passen (MU, 2021).

1.1.3.3 *Plagen*

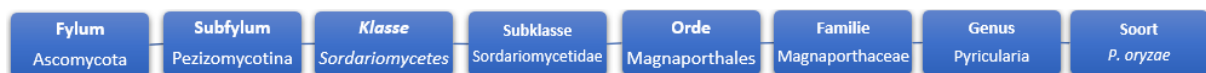
Daarnaast zorgen ook allerlei plagen voor een opbrengstverlies zoals ratten, insecten, appelslakken, vogels en nematoden. Binnen de insecten kunnen verschillende insectensoorten waaronder de eenstipgrasuil (*Mythimna unipuncta*) op rijst voorkomen. Van de meer dan honderd appelslakken zijn er twee, namelijk *Pomacea canaliculata* en *Pomacea maculata*, die bij ernstige aantasting meer dan 50 % van de rijstopbrengst laten verloren gaan (Rice Knowledge Bank, n.d.). Binnen het rijk van de vogels zijn er slechts 36 van de 1390 vogelsoorten die zich voeden op rijst, waarbij gewasschade beperkt is. Daarnaast zorgen ook verschillende plaagsoorten zoals de grote textorwever (*Ploceus cucullatus*) voor beschadiging aan de rijstplanten (de Mey et al., 2013). Ten slotte kunnen ook wortelknobbelnematoden zoals *Meloidogyne graminicola* de rijstplanten beschadigen. In hoogland rijst is er een opbrengstverlies van 2,6 % voor elke 1000 nematoden. Bij laagland rijst zou er voor evenveel nematoden maar liefst 72 % opbrengstverlies optreden (Rice Knowledge Bank, n.d.).

Wereldwijd worden voor rijst meer gewasbeschermingsmiddelen gebruikt dan voor enig ander voedingsgewas. De vele plagen en ziekten kunnen namelijk zorgen voor een aanzienlijk opbrengstverlies waardoor boeren vaker zullen kiezen voor chemische bestrijdingsmiddelen als verzekering voor de investeringen in irrigatie, kunstmest en andere inputs. Ook na de ontwikkeling van resistente rijstvariëteiten bleef het aandeel gewasbeschermingsmiddelen heel hoog (IRRI, 2007).

1.2 Pyricularia oryzae

1.2.1 Globaal belang en taxonomie

P. oryzae of de “rijst blast” schimmel is verreweg de belangrijkste pathogeen op rijst en veroorzaakt één van de meest schadelijke plantenziekten ter wereld. Deze schimmel vormt een belangrijke bedreiging voor het behoud van de voedselzekerheid waarbij wordt geschat dat de totale globale jaarlijkse opbrengstverliezen veroorzaakt door *P. oryzae* maar liefst 10 % tot 30 % bedragen. Inzicht in de biologie van deze schimmel is hierdoor uitermate van belang, omdat dit de mogelijkheid biedt om nieuwe en duurzame ziektebestrijdingsstrategieën te ontwikkelen (Galhano et al., 2011). **Figuur 3** geeft de taxonomie van *P. oryzae* weer (CABI, 2019). Van de anamorfe, ongeslachtelijke vorm zijn twee synoniemen bekend, namelijk *Dactylaria oryzae* en *P. setariae* (BC Bank, 2020). De schimmel behoort tot het fylum van de Ascomycota omdat het seksuele ascosporen produceert in structuren die asci worden genoemd. De asci zijn te vinden in gespecialiseerde structuren, genaamd perithecia (TeBeest et al., 2007).

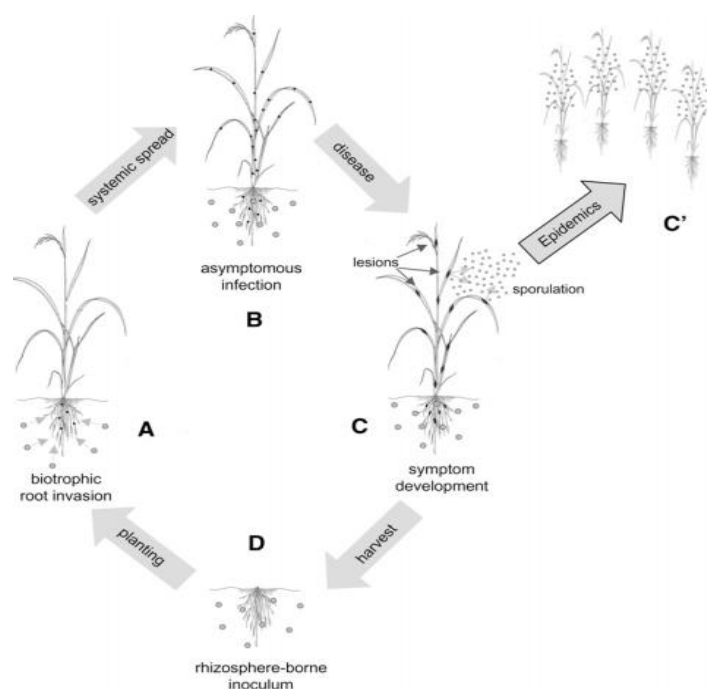


Figuur 3: Taxonomie van *P. oryzae*.

1.2.2 Levenscyclus

1.2.2.1 Infectie via het wortelstelsel

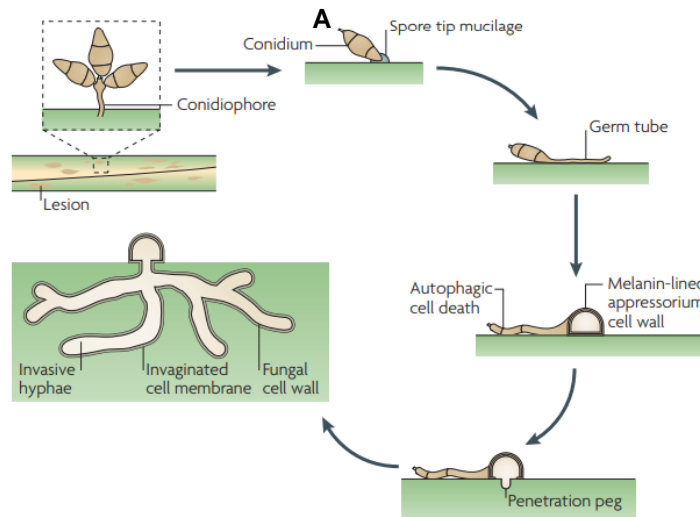
P. oryzae kan zowel de wortels als de bladeren van rijstplanten infecteren. **Figuur 4** geeft de infectiecyclus via het wortelstelsel weer. Hierbij kiemen de conidia in de bodem en worden fungale hyfen geproduceerd die in nauw contact komen met de wortels. Deze hyfen zullen vooral de rhizodermis penetreren, maar occasioneel ook de wortelharen. Bij de penetratie zijn er geen gemelaniseerde appressoria aanwezig zoals bij de bladinfectie, maar worden penetratiepinnen gevormd uit gezwollen hyfale structuren. Na de penetratie verspreiden de fungale hyfen zich systemisch tot in de cortex, endodermis en de vaatbundels. Opmerkelijk hierbij is dat de wortelinvasie niet zorgt voor het afsterven van de cellen. *P. oryzae* ontwikkelt dus een biotrofe relatie met de gastheercel van de wortels en dit gedurende minstens acht dagen na inoculatie. De levensvatbaarheid van de gastheercel is op dat moment nog niet gedaald en uiterlijk zijn ook geen symptomen visueel zichtbaar. In een later stadium wordt de schimmel necrotroof met vorming van hyfen die de met lucht gevulde delen van de plant zullen infecteren. Dit leidt tot de vorming van zichtbare laesies op het blad en resulteert in de productie van grote hoeveelheden aseksuele sporen die zich snel naar andere bladeren verspreiden en andere planten kunnen infecteren (Marcel et al., 2010).



Figuur 4: Epidemiologische levenscyclus van *P. oryzae* via het wortelstelsel. De wortelinvasie start wanneer na de oogst aangetaste plantenresten met mycelium of microsclerotia achterblijven op het veld (A). Hierbij verspreidt *P. oryzae* zich systemisch in een symptoomloze plant (B). Hyfale infectie zorgt voor ziekte bij necrotrofe groei van de schimmel met vorming van laesies (C) waarbij asexuele sporen geproduceerd worden die andere bladeren en planten infecteren (C'). Na de oogst blijven geïnfecteerde plantenresten en microsclerotia achter in de bodem (D) waardoor opnieuw biotrofe wortelinvasie kan optreden bij nieuw geplante zaailingen (A) (Marcel et al., 2010).

1.2.2.2 Infectie via het blad

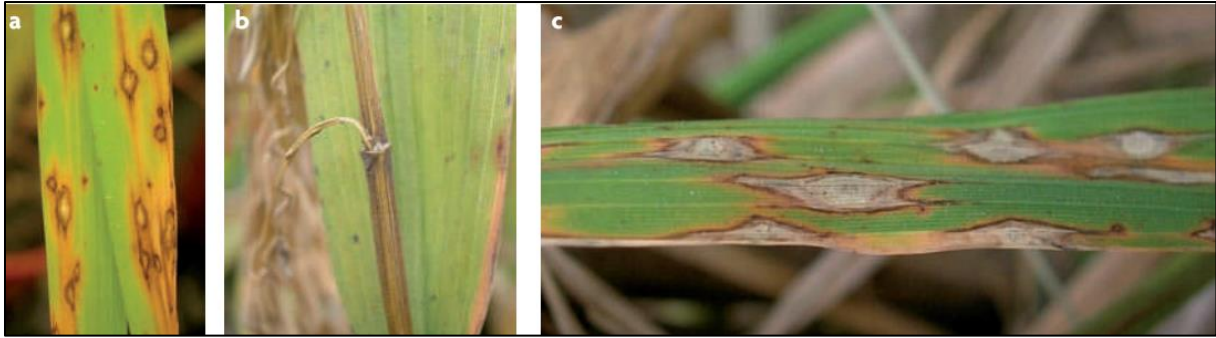
De infectiecyclus van *P. oryzae* op het rijstblad omvat enkele ontwikkelingsstappen (**Figuur 5**): de conidiale bevestiging aan het gastheeroppervlak, de kieming van de sporen, de ontwikkeling en groei van de kiembuis, de vorming van het appressorium, de opkomst van de penetratiepin en de invasieve groei in de gastheerplant. De infectiecyclus start wanneer een driecellig conidium op het rijstblad terechtkomt via wind of dauwdruppelspatten. De spore hecht zich vast aan de hydrofobe cuticula en ontkiemt met vorming van een smalle kiembuis die vervolgens afvlakt en vasthaakt aan het blad alvorens te differentiëren in een appressorium (Wilson et al., 2009). Appressoria zijn gespecialiseerde cellen en bestaan uit een eencellige, koepelvormige structuur die een druk en fysieke kracht uitoefenen om de bladepidermis te doorboren. De ontwikkeling van de appressoria hangt af van de hydrofobiciteit en de hardheid van het contactoppervlak. Daarnaast lijkt de ontwikkeling van het appressorium te worden gecontroleerd door een verandering in de kern van de kiembuis om DNA-replicatie mogelijk te maken. Op hetzelfde moment zal het conidium atrofiëren. Hierbij is er een sterk vermoeden dat geprogrammeerde celdood (autofagie) optreedt (Galhano et al., 2011). Na de vorming van het appressorium stapelt melanine zich op in de celwand. Hierdoor wordt een turgordruk ontwikkeld, wat zich vertaalt in de fysieke kracht die nodig is om met de smalle penetratiepin de bladcuticula te doorboren. De schimmel heeft vanaf nu toegang tot de epidermis van de rijstplant en dringt het rijstplasmamembraan en de epidermale cellen binnen door middel van bolvormige, invasieve hyfen. De verplaatsing naar naburige cellen vindt in eerste instantie plaats via de plasmodesmata. Tussen 72 en 96 uren na de infectie worden de eerste laesies zichtbaar op de plaats waar de spore zich initieel vasthechtte. De vorming van nieuwe sporen vindt plaats onder vochtige omstandigheden waarbij conidioforen met sympodiaal gevormde sporen via dauwdruppelspatten en wind naar nieuwe gastheerplanten worden verspreid (Wilson et al., 2009).



Figuur 5: Infectiecyclus van P. oryzae via het blad (Wilson et al., 2009). De infectie start linksboven op de figuur (A) waarbij het conidium landt op het oppervlak van het rijstblad. De spore hecht zich vast aan de hydrofobe cuticula en begint te kiemen met productie van een kiembuis als gevolg. De kiembuis vlakt af en haakt zich vast alvorens te differentiëren tot een appressorium. Na de ontwikkeling van het appressorium atrofieert het conidium door autofagie. Het appressorium vult zich met melanine en bouwt een voldoende hoge turgordruk op om met de infectiepin de bladepidermis te doorboren. Invasieve hyfen verspreiden zich via de bladepidermis en verplaatsen zich via plasmodesmata naar de verschillende cellen.

1.2.3 Ziektesymptomen

P. oryzae veroorzaakt laesies op de volledige rijstplant. Het meest voorkomende en diagnostische symptoom, diamantvormige laesies, komt echter enkel voor op de bladeren. **Figuur 6** geeft de symptomen visueel weer. Op gevoelige cultivars kleuren de laesies aanvankelijk grijsgroen met een donkergroene rand. Later kleuren deze laesies vaak lichtbruin met de ontwikkeling van necrotische randen. Op resistente cultivars blijven laesies vaak klein met een grootte van 1 mm tot 2 mm en (donker)bruin van kleur. Bij gevoelige cultivars kunnen de laesies tot enkele centimeters groot worden. De kraag van de rijstplant vertoont vaak een gebied van necrose bij de vereniging van de blad- en stengelmantel. De nek van de rijstplant wordt regelmatig bij de knoop geïnfecteerd en leidt tot een aandoening die “rotte nek” wordt genoemd. Deze aandoening leidt tot de ontwikkeling van lege, niet-levensvatbare zaden en/of het volledig afvallen van de pluim. Onderzoek toont aan dat elke procent rotte nek een opbrengstverlies van 0,5 % veroorzaakt. Infectie van de pluim zorgt voor grijsbruine laesies ter hoogte van de aren en aartjes. De zaden worden niet geproduceerd wanneer de steeltjes worden geïnfecteerd. Deze aandoening wordt “blanking” genoemd. Wanneer de geproduceerde zaden zelf geïnfecteerd raken, ontstaan bruine vlekken op de zaden (TeBeest et al., 2007; Wilson et al., 2009).



Figuur 6: Symptomen van *P. oryzae* op de rijstplant. a: Laesies op een blad van een zaailing met een necrotisch centrum. b: Rotte nek, wat zorgt voor ongevulde zaden en het afhangen van de pluim. c: Grote laesies op een blad van een volwassen plant (Wilson et al., 2009).

1.2.4 Ziektebestrijding

1.2.4.1 Integrated Pest Management

Infectie met *P. oryzae* kan op verschillende manieren worden vermeden. Cultuurtechnische maatregelen zijn hierbij heel belangrijk. Zo is gewasrotatie een techniek om levensvatbare sporen in gewasresten te scheiden van de nieuw opkomende zaailingen. Daarnaast speelt optimaal bemesten ook een zeer belangrijke rol (TeBeest et al., 2007). Overmatig gebruik van stikstofhoudende meststoffen verhoogt de totale biomassa van rijst, terwijl de opbrengsten niet significant toenemen. Dit zorgt voor meer inoculatieplaatsen voor de pathogeen wat resulteert in een opbrengstverlies (Long et al., 2000). Een derde cultuurtechnische strategie is het handhaven van een goed overstromingsniveau zodat het water steeds hoog genoeg staat zodat het aandeel gepenetreerde cellen en intracellulaire hyfale groei in de gepenetreerde cellen daalt (Cav et al., 1986). Ten slotte wordt het aanbevolen om hoogwaardig en ziektevrij zaad te gebruiken om de vorming van een inoculum van waaruit epidemieën ontstaan te vermijden (TeBeest et al., 2007). Aangezien de rijstblastschimmel in zo goed als alle rijsttelende gebieden voorkomt en daarbij een brede waardplantenreeks heeft, is het uitroeien ervan moeilijk. Controle van deze schimmel is dus essentieel. Cultuurtechnische maatregelen zorgen voor een suboptimaal milieu voor de pathogeen waardoor deze kan gecontroleerd worden (Upadhyay et al., 2020). Biologische bestrijding is mogelijk door het inzetten van natuurlijke vijanden zoals antagonistische *Trichoderma* spp. (*T. harzianum*, *T. koningii* en *T. pseudokoningii*), antagonistische *Aspergillus niger* en de pathogeen *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (CABI, 2019).

Naast cultuurtechnische strategieën is genetische resistentie uitermate belangrijk. De grootste moeilijkheid hiervan is de grote genetische diversiteit en het vermogen van *P. oryzae* tot seksuele recombinitie tussen de twee *mating types* (MAT1-1 en MAT1-2). Naast seksuele recombinitie kan ook paraseksuele recombinitie of horizontale genoverdracht optreden (Konrad et al., 2012). Hierbij neemt een organisme genetisch materiaal op van een ander organisme zonder paring (Yutin, 2013). Rijstcultivars met slechts één resistentiegen zullen na verloop van tijd vatbaarder worden door de ontwikkeling van nieuwe pathogeenstammen (TeBeest et al., 2007). Dit verklaart de soms snelle doorbraak van vrijgegeven resistente rijstcultivars, soms al na vijf jaren. Cultivars bevatten dus het best meerdere resistentiegenen zodat de pathogeen deze resistentie moeilijker kan doorbreken (Höfte, 2019). Bestrijding van de rijstblastpathogeen via genetische resistentie gebeurt via twee basisresistentietypes, namelijk volledige en gedeeltelijke resistentie. Volledige resistentie is rassocifiek

en wordt bepaald door één of enkele resistentiegenen (R-genen) die het product van het avirulentiegen (Avr-gen) van de pathogeen herkennen. Tot op vandaag zijn er 73 R-genen geïdentificeerd die weerstand bieden tegen *P. oryzae*. Gedeeltelijke resistentie is daarentegen niet rassen specifiek en wordt door *Quantitative Trait Loci* (QTL's) gecontroleerd (Ansari et al., 2019; Konrad et al., 2012). Verschillende mechanismen kunnen ertoe leiden dat rijstcultivars resistent worden tegen *P. oryzae* onder andere door resistentie tegen mechanische doorboring van de bladepidermis of door een langere accumulatie van zetmeel in de bladschede als een structurele barrière (Ansari et al., 2019).

1.2.4.2 (Bio)chemische bestrijding

Pas na het falen van de hierboven besproken preventieve IPM-strategieën worden chemische middelen ingezet om *P. oryzae* te beheersen. Zo worden zaaizaadbehandelingen gebruikt om de infectie van de zaailingen te voorkomen (TeBeest et al., 2007). Het toepassen van biofungiciden met *Bacillus subtilis* 5, *B. cereus* 3S5 of *Pseudomonas fluorescens* 10S2, allemaal via zaadbehandeling, is effectief gebleken en wordt als een veelbelovende techniek beschouwd voor het bestrijden van *P. oryzae* (Chen et al., 2019). In een studie van Kongcharoen (2020) werd de fungale activiteit van de fungiciden azoxystrobine, difenoconazole/propiconazole, carbendazim, flutriafol, fluopyram/tebuconazole, mancozeb en thiofanaat-methyl geëvalueerd tegen onder andere de rijstblastpathogeen. Daaruit bleek dat mancozeb de hoogste activiteit vertoonde tegen *P. oryzae*, met een EC₅₀ van 0,25 ppm (Kongcharoen et al., 2020). De EC₅₀ is de concentratie die nodig is om een bepaald effect van 50 % te verkrijgen (Zeomic, n.d.). In deze studie betekende dit de concentratie mancozeb die nodig is om geen ziektesymptomen te ontwikkelen op 50 % van de geteste plantenpopulatie. Echter, op 4 januari 2022 zal mancozeb niet meer worden goedgekeurd aangezien deze werkzame stof niet langer voldoet aan de huidige, strenge vereisten van de Europese wetgeving (Fytoweb, 2021).

1.3 Rhamnolipiden

Rhamnolipiden zijn glycolipidische biosurfactants die door verschillende bacteriën worden geproduceerd (Crouzet et al., 2020). Het zijn amfifiele moleculen wat betekent dat ze bestaan uit een hydrofiele en een hydrofobe groep. De hydrofiele groep kan bestaan uit mono-, oligo- of polysacchariden, peptiden of proteïnen. Het hydrofobe deel kan bestaan uit (on)verzadigde vetzuren of vetalcoholen. Rhamnolipiden worden geklasseerd onder de biosurfactants en krijgen daarom momenteel veel belangstelling omdat zij, in tegenstelling tot de synthetische surfactants, tal van voordelen bieden. Zo vertonen biosurfactants een lagere ecotoxiciteit, een potentieel hoge activiteit en een goede stabiliteit bij extreme temperaturen, pH en zoutgehaltes in vergelijking met synthetische surfactants. Een bijkomend voordeel is dat ze sneller biologisch afbreekbaar zijn (Crouzet et al., 2020; Pacwa-Płociniczak et al., 2011). Deze voordelen maken dat biosurfactants ideale vervangers zijn voor synthetische surfactants (Luiz et al., 2015). Biosurfactants worden onderverdeeld volgens hun moleculaire structuur, voornamelijk in glycolipiden (waaronder rhamnolipiden), lipopeptiden, polymere biosurfactants, vetzuren, alkaanzuren en fosfolipiden (Abdel-Mawgoud et al., 2010).

1.3.1 Microbiële productie van rhamnolipiden

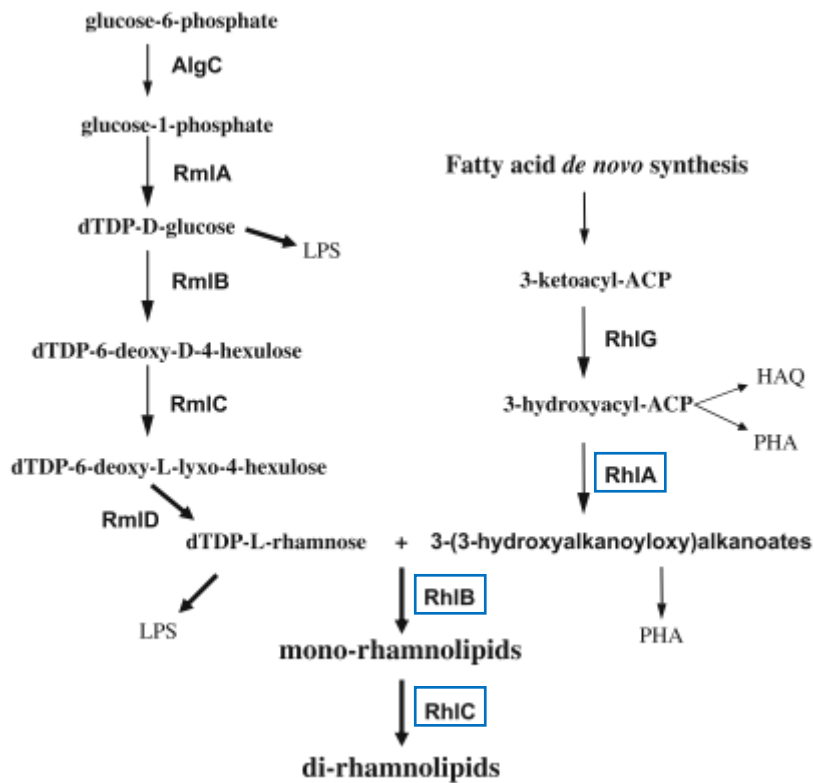
1.3.1.1 Biosynthese

Rhamnolipiden worden onder andere door *Pseudomonas* soorten waaronder *P. aeruginosa* geproduceerd. Deze bacterie kan de rhamnolipiden vanuit verschillende substraten zoals C₁₁- en C₁₂-alkanen, succinaat, pyruvaat, citraat, fructose, glycerol, olijfolie, glucose en mannitol vormen (Mulligan, 2007). Andere bacteriën die ook in staat zijn om rhamnolipiden te produceren, worden in **Tabel 1** weergegeven (Abdel-Mawgoud et al., 2010).

Tabel 1: Taxonomische classificatie van RL-producerende bacteriën (Abdel-Mawgoud et al., 2010)

Fylum	Klasse	Bacteriële soort
Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia sp.</i>
	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
		<i>Enterobacter sp.</i>
		<i>Pantoea sp.</i>
<i>Pseudomonas sp.</i>		
	<i>Pseudoxanthomonas sp.</i>	
	Deltaproteobacteria	<i>Myxococcus sp.</i>
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Cellulomonas cellulans</i>
		<i>Nocardioides sp.</i>
		<i>Renibacterium salmoninarum</i>
Firmicutes	Bacilli	<i>Tetragenococcus koreensis</i>

De biosynthese van rhamnolipiden door *P. aeruginosa* gebeurt, op genetisch vlak, door drie sequentiële reacties. Hierbij spelen de enzymen rhamnolipide A, B en C (respectievelijk RhIA, RhIB en RhIC) een belangrijke rol (Soberón-Chávez et al., 2005). **Figuur 7** geeft de biosynthese pathway schematisch weer. RhIA is betrokken in de synthese van het vetzuur-dimeer deel en de vrije 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoaat (HAA) van de rhamnolipiden via 3-hydroxyvetzuur precursors en lijkt los gebonden te zitten aan het binnenmembraan (Rahim et al., 2001; Zhu et al., 2008). Vervolgens zal het membraangebonden RhIB rhamnosyltransferase tussenkomen in de vorming van monorhamnolipiden uit dTDP-L-rhamnose en HAA (Ochsner et al., 1994; Rahim et al., 2001). Van deze monorhamnolipiden maakt het enzym RhIC gebruik als substraat en produceert samen met dTDP-L-rhamnose dirhamnolipiden. Net zoals RhIA lijkt RhIC los gebonden te zitten aan het binnenmembraan (Rahim et al., 2001). Terwijl *P. aeruginosa* in staat is om zowel mono- als dirhamnolipiden te synthetiseren, produceert *P. chlororaphis*, stam NRRL B-30761, enkel monorhamnolipiden. Deze bacterie ontbreekt een homoloog van het RhIC gen dat codeert voor het tweede rhamnosyltransferase verantwoordelijk voor de biosynthese van dirhamnolipiden (Gunther IV et al., 2005).



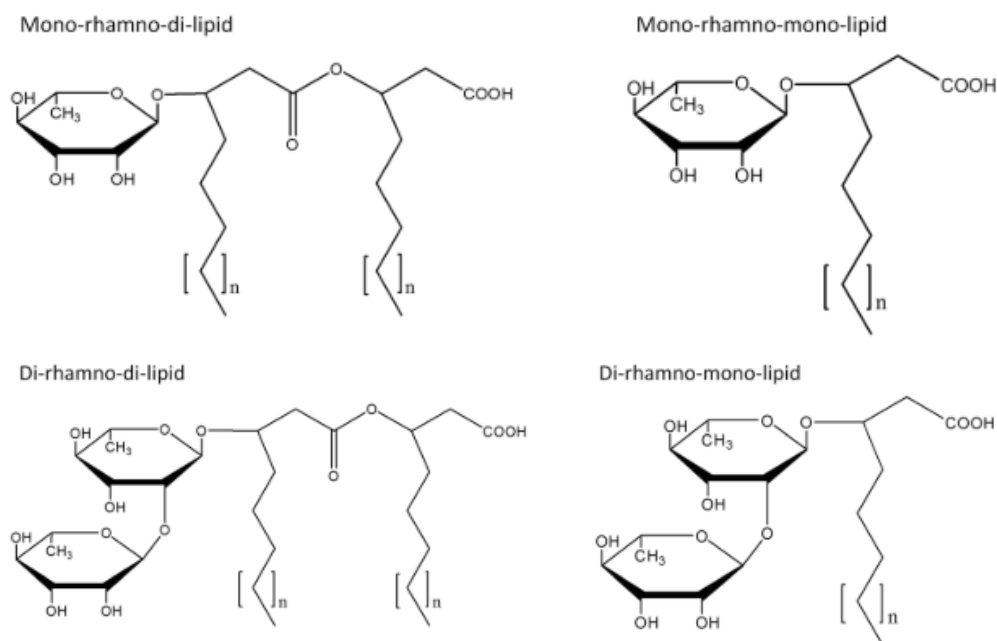
Figuur 7: Biosynthese pathway voor de vorming van rhamnolipiden (Soberón-Chávez et al., 2005). De enzymen RhIA, RhIB en RhIC spelen hierbij een belangrijke rol (blauwe rechthoeken). RhIA zorgt voor de vorming van HAA dat samen met dTDP-L-rhamnose door RhIB wordt gekatalyseerd tot monorhamnolipiden. Vervolgens zal RhIC de monorhamnolipiden omzetten in dirhamnolipiden.

1.3.1.2 Koolstof- en stikstofbronnen voor microbiële productie van rhamnolipiden

De productie van rhamnolipiden en de chemische structuur ervan is afhankelijk van de pH, nutriëntensamenstelling, type substraat en temperatuur (Mulligan, 2007). Zolang er bacteriële groei is, maakt de koolstofbron voor de productie van rhamnolipiden meestal weinig uit. Zo zijn glycerolen, suikers en koolwaterstoffen geschikte koolstofbronnen (Soberón-chávez et al., 2010). Hydrofobe koolstofbronnen van plantaardige oliën zoals sojaolie, maïsolie, canolaolie en olijfolie zorgen voor de hoogste productiviteit. Binnen de wateroplosbare substraten is mannitol bijzonder effectief. Het gebruik van naftaleen, een aromatische koolwaterstof, als substraat leidt voornamelijk tot de productie van rhamnolipiden met slechts één vetzuurgedeelte. Daarnaast is de productie van rhamnolipiden hoger bij een verhoogde C/N en C/P ratio, terwijl hoge concentraties van tweewaardige kationen zoals ijzer een negatief effect hebben op de productie (Soberón-Chávez et al., 2005). Bij een temperatuur van 37 °C, een pH van 6,5 en glucose en nitraat als respectievelijke koolstof- en stikstofbron geven C/N ratio's van 16 en 18 de hoogste productiviteit. Er worden geen rhamnolipiden geproduceerd bij C/N ratio's lager dan 11 (Soberón-chávez et al., 2010). Ook de aanwezigheid van ammonium, glutamine, asparagine en arginine als stikstofbron remt de productie van rhamnolipiden terwijl nitraat, glutamaat en aspartaat de productie stimuleren. Nitraat wordt als de beste stikstofbron gezien waarbij het een hogere expressie van het enzym RhIB uitlokt (Soberón-Chávez et al., 2005). Echter, bij een temperatuur van 25 °C en een pH gelijk aan 7 is ureum de beste stikstofbron en visolie de beste koolstofbron (Soberón-chávez et al., 2010).

1.3.1.3 Structurele varianten

Er bestaan verschillende natuurlijke varianten van rhamnolipiden waarvan de belangrijkste in **Figuur 8** worden weergegeven, namelijk: mono-rhamno-mono-lipiden (MRML), di-rhamno-mono-lipiden (DRML), mono-rhamno-di-lipiden (MRDL) en di-rhamno-di-lipiden (DRDL). De eerst ontdekte variant is een 2-O- α -1,2-L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydrodecanoyl- β -hydroxydecanoaat, een DRDL. Deze structuur wordt door verschillende stammen van *P. aeruginosa* geproduceerd en was het eerst ontdekte glycolipide met een verbinding tussen een suiker en een gehydroxyleerde vetzuurrestant. Deze structuur bestaat uit twee β -hydroxydecanoïezuren verbonden door een glycosidische binding met twee rhamnosegroepen die aan elkaar gekoppeld zijn via een 1,3-glycosidische binding. Binnen elke rhamnosegroep zijn de twee β -hydroxyvetzuren met elkaar verbonden door middel van een esterbinding. Naast di-rhamno-di-lipiden produceren verschillende *P. aeruginosa* stammen ook MRDL, voluit α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoaat. Deze structuren dienen als precursor voor DRDL (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Wanneer naftaleen als koolstofbron wordt gebruikt, kunnen ook DRML-analogen en MRML-analogen worden geproduceerd door culturen van *P. aeruginosa*. In waterige omstandigheden en normale groeiomstandigheden (33 °C, pH 6,25 en 20 g/L dextrose) komen de MRDL en de DRDL het vaakst voor (Soberón-Chávez et al., 2005).

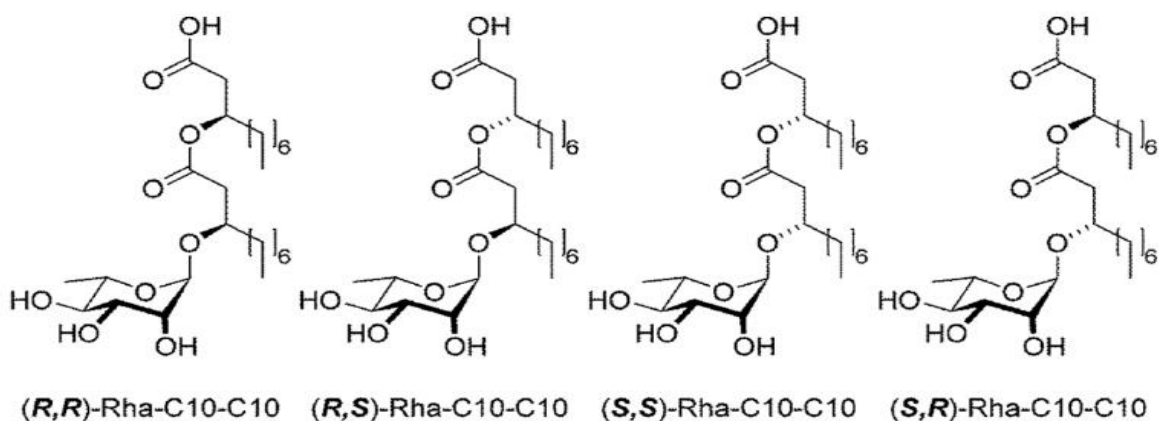


Figuur 8: Meest voorkomende natuurlijke structuren van rhamnolipiden geproduceerd door onder andere P. aeruginosa (Wittgens et al., 2018). Bovenaan worden de mono-rhamnolipiden weergegeven die één rhamnosegroep bevatten. Onderaan staan de di-rhamnolipiden die twee rhamnosegroepen bevatten. Beide groepen kunnen zowel bestaan uit één of twee vetzuurstaarten.

Naast deze groepen komen nog andere, minder geproduceerde, rhamnolipidenstructuren voor. Twee ervan zijn dilipidische rhamnolipiden met een 2-decenoylgroep bij de vrije 2-hydroxylgroep van de rhamnosegroepen. Andere structuren werden als methylesters van de vrije carboxylgroepen van twee eerder geïdentificeerde dilipidische rhamnolipiden beschreven en zijn de enige bekende niet-ionische rhamnolipiden. Nieuwere technieken zoals high-performance liquid chromatography (HPLC), massaspectrometrie (MS) en een combinatie ervan (HPLC/MS) maken het mogelijk om veel nieuwe rhamnolipidenstructuren te identificeren. Tot nu toe werden 58 varianten beschreven (Eslami et al., 2020).

1.3.2 Synthetische productie van rhamnolipiden

Synthetische monorhamnolipiden verschillen van de biologisch geproduceerde rhamnolipiden aangezien bij de productie van de synthetische variant vier verschillende diastereomeren kunnen ontstaan, namelijk: (R,R), (R,S), (S,S) en (S,R). Dit resulteert in twee chirale centra op de lipidestaart. **Figuur 9** geeft deze vier verschillende diastereomeren weer. De synthese kan naar een bepaald diastereomeer worden gestuurd, maar onvermijdelijk zullen ook andere diastereomeren worden geproduceerd (maximaal 10%). Zowel de bio-rhamnolipiden als de (R,R) en (S,S)-oriëntatie van de synthetische vorm zijn gemakkelijk biologisch afbreekbaar, waarbij de bio-rhamnolipiden het best kunnen worden afgebroken, gevolgd door het (R,R)-diastereomeer. Bio-rhamnolipiden hebben net als de (R,R) synthetische vorm dezelfde stereo-oriëntatie wat suggereert dat de (R,R)-oriëntatie een betere interactie van de afbraakenzymen met het substraat heeft (Hogan et al., 2019).



Figuur 9: Chemische structuur van synthetische monorhamnolipiden waarbij vier verschillende diastereomeren kunnen voorkomen, namelijk: (R,R), (R,S), (S,S) en (S,R) (Hogan et al., 2019).

1.3.3 Fysicochemische eigenschappen

1.3.3.1 Hydrofiele-lipofiele balans (HLB)

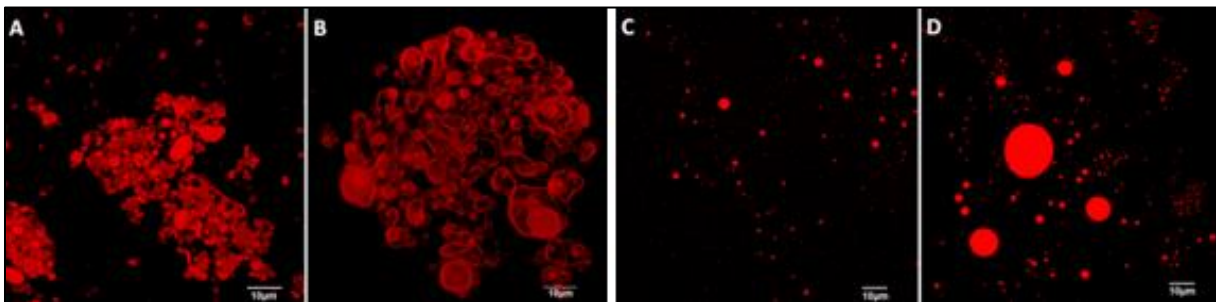
Een kenmerkende parameter van surfactants is de hydrofiele-lipofiele balans (HLB), die het aandeel van hydrofiele en hydrofobe groepen in de volledige molecule aangeeft (Pacwa-Płociniczak et al., 2011). De HLB kan waarden aannemen tussen 0 en 18 waarbij chemische moleculen met een lage HLB relatief minder oplosbaar zijn in water en vooral gebruikt worden in “water-in-olie” mengsels terwijl het omgekeerde geldt voor moleculen met een hoge HLB (Spanoghe, 2020). Over rhamnolipiden zijn tot nu toe nog geen algemene HLB-waarden in de literatuur gevonden omdat ze zo divers zijn (Tiso et al., 2016). Er werden wel enkele specifieke HLB-waarden beschreven: rhamnolipiden geproduceerd door *Burkholderia thailandensis* E264 hebben een HLB-waarde van 9,2 terwijl rhamnolipiden geproduceerd door *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 een HLB-waarde van 6,5 hebben (Díaz De Rienzo et al., 2016). Daarnaast werd ook een HLB-waarde van 10,9 gerapporteerd, maar hiervan werden geen experimentele data of informatie over de specifieke rhamnolipide meegegeven (Tiso et al., 2016).

1.3.3.2 Oplosbaarheid

Rhamnolipiden zijn door hun amfifiele structuren in zowel organische als waterige oplosmiddelen oplosbaar (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Een extra rhamnosering zorgt voor een meer hydrofiel karakter terwijl extra koolstoffen aan de vetzuurketens de hydrofobiciteit doet verhogen. Hun chemische structuur bepaalt dus de mate van oplosbaarheid in de bodem en hiermee ook de mate van biobeschikbaarheid. In waterige oplossing zijn ze oplosbaar bij een pH hoger dan 4, met een optimale oplosbaarheid bij een pH van 7 - 7,5. Deze verhoogde oplosbaarheid is te verklaren door de aanwezigheid van een vrije, zure carboxylgroep die interageert met het beta-hydroxyvetzuurgedeelte wat de rhamnolipiden hun anionische karakter geeft. Daarnaast zijn rhamnolipiden ook oplosbaar in organische solventen zoals methanol, chloroform en ethylether en vrij oplosbaar in 20 % ethylacetaat (Abdel-Mawgoud et al., 2009). Rhamnolipiden zijn minder oplosbaar naarmate het gehalte hexaan toeneemt (Jadhav et al., 2018). In hun anionische vorm zijn ze in staat om metalen en ionen zoals cadmium, koper, lood en zink in de bodem te complexeren (Mulligan, 2007).

1.3.3.3 Tenside-eigenschappen

Rhamnolipiden doen de oppervlaktespanning van waterige oplossingen tot 29 mN/m dalen. De kritische micelconcentratie (CMC), de concentratie surfactants waarboven spontaan micellen ontstaan, varieert van 10 mg/L tot 230 mg/L afhankelijk van de structuur en de pH (Mulligan, 2007; Zhong et al., 2015). De CMC van dirhamnolipiden stijgt bij een stijgende pH tot een maximale pH van 7 met een CMC van 82 μ M. Daarnaast stijgt de elektrische conductiviteit bij stijgende diRL-concentraties, ongeacht de pH. Rhamnolipiden vormen zich in de bodem om tot aggregaten die een verscheidenheid aan microstructuren bevatten, waaronder bolvormige of cilindervormige micellen alsook onregelmatige blaasjes, onregelmatige dubbellagen en lamellaire platen (**Figuur 10**) (Zhong et al., 2015). De morfologie van deze aggregaten wordt beïnvloed door de concentratie van de rhamnolipiden (Guo et al., 2009, 2014), de pH van de RL-oplossing (Champion et al., 1995), de temperatuur (Helvac et al., 2004) en de ionische sterkte (Hofer et al., 1991). Bij een pH van 5,5 - 8 en een concentratie van 60 mM rhamnolipiden verandert de vorm van de aggregaten, namelijk van dubbelgelaagde lamellen, naar grote blaasjes, verder naar kleine blaasjes en eindigend in micellen (Champion et al., 1995). Wanneer de pH niet hoger is dan 7, neemt de aggregaatgrootte af wanneer de diRL-concentratie stijgt tot 100 μ M. Bij concentraties boven 100 μ M is er geen invloed van de diRL-concentratie en de pH op de aggregaatgrootte. Een verhoging van de pH resulteert in een verbeterde dissociatie van de diRL-carboxylgroep. Wanneer de diRL-concentratie lager is dan de CMC, verkleint de aggregaatgrootte bij hogere concentraties en hogere pH (Zhong et al., 2015).



Figuur 10: Confocale scanningslaser microscopiebeelden die de vorming van aggregaten door rhamnolipiden visueel weergeven in een NaCl-oplossing. (A, B) rhamnolipidenmengsel, (C) monorhamnolipiden en (D) dirhamnolipiden. Nile Red werd gebruikt als fluorescentieprobe (Rodrigues et al., 2017).

1.3.3.4 *Metabolisatie in de bodem*

Rhamnolipiden zijn secundaire metabolieten en kunnen worden afgebroken door de aanwezige micro-organismen (MO's) in de bodem. Zo zijn *B. subtilis* en andere MO's aanwezig in compost in staat om rhamnolipiden af te breken en als koolstofbron te gebruiken. Eerst wordt vooral glucose als koolstofbron gebruikt en worden de rhamnolipiden in minder beschikbare organische moleculen gemetaboliseerd. Wanneer de meeste glucose gemetaboliseerd is, worden de minder beschikbare organische moleculen verder afgebroken (Zeng et al., 2007). De afbraaksnelheid van rhamnolipiden is sterk afhankelijk van de hoeveelheid organische metalen aanwezig in de bodem. Rhamnolipiden hebben namelijk een sterke affiniteit voor cadmium, zink en lood en hoe meer van deze metalen aanwezig zijn, hoe hoger de kans op complexvorming en hoe minder rhamnolipiden zullen worden afgebroken (Ochoa-Loza et al., 2001). Wanneer cadmium samen met zink in de bodem voorkomt, wordt de afbraak volledig verhinderd omdat microbiële populaties vaak gevoeliger zijn voor Cd- en Zn-toxiciteit (Wen et al., 2010).

1.3.4 Biologische eigenschappen

Rhamnolipiden vertonen antibacteriële activiteiten tegen planten- en menselijke pathogenen (Vatsa et al., 2010). Ze zijn actief tegen de Gram-negatieve bacteriën *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* en *Klebsiella pneumonia* en de Gram-positieve bacteriën *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. en *Bacillus* sp. (Arino et al., 1998; Benincasa et al., 2004; Haba et al., 2003; Vasileva-Tonkova et al., 2011). Rhamnolipiden hebben hierbij een directe impact op de bacteriële celoppervlakstructuren, zoals een vermindering van lipopolysacchariden (LPS) in *P. aeruginosa* stammen wat leidt tot een verhoogde hydrofobiciteit van het celoppervlak (Al-Tahhan et al., 2000). Hierdoor zal de pathogeniteit verlagen aangezien LPS een sleutelrol spelen in de gastheer-pathogeen interactie wat leidt tot het ontwijken van het plantenimmuunsysteem en verhoogde microbiële resistentie (Maldonado et al., 2016). Daarnaast vertonen rhamnolipiden antifungale activiteiten, vnl. tegen fytopathogenen waaronder *Botrytis* sp., *Rhizoctonia* sp., *Pythium* sp., *Phytophthora* sp. en *Plasmopara* sp. (De Jonghe et al., 2005; Sotirova et al., 2008; Stanghellini et al., 1997; Yoo et al., 2005). De werkwijze van rhamnolipiden tegen zoöspore-producerende fytopathogenen is de directe lyse van de zoösporen via intercalatie van de rhamnolipiden in het plasmamembraan van de zoöspore die niet door een celwand is beschermd (De Jonghe et al., 2005; Stanghellini et al., 1997). Daarnaast werken RL ook tegen bepaalde algen (*Heterosigma akashiwo*), virussen, amoebe-achtigen (*Dictyostelium discoideum*) en mycoplasma 's (Cosson et al., 2002; Remichkova et al., 2008; Wang et al., 2005).

1.3.5 Toepassingen van rhamnolipiden

1.3.5.1 *Bioremediatie*

Bioremediatie is het proces waarbij MO's, planten, microbiële enzymen of plantenzymen verschillende contaminanten uit de omgeving detoxifiëren (Vishwakarma et al., 2020). Toxische stoffen zoals metalen, polycyclische aromatische koolwaterstoffen, petroleum en pesticiden kunnen uit de omgeving via verschillende technieken worden verwijderd (Paulino et al., 2016). Rhamnolipiden zijn in staat de biodegradeerbaarheid van verbindingen zoals hexadecaan, octadecaan, n-paraffine en fenantreen te verbeteren opdat een groter aandeel door MO's kan worden afgebroken. Zo verbeteren ze de oplosbaarheid van het af te breken substraat. Daarnaast kan de interactie met het celoppervlak toenemen wat de hydrofobiciteit van het celoppervlak doet verhogen waardoor hydrofobe substraten makkelijker worden opgenomen en afgebroken (Abdel-Mawgoud et al., 2010; Mulligan, 2007).

1.3.5.2 Smaakstoffen, cosmetica, gezondheid en andere toepassingen

Rhamnolipiden zijn een bron van stereospecifieke L-rhamnosemoleculen, die voor de productie van hoogwaardige smaakstoffen worden gebruikt alsook als startmateriaal voor de synthese van bepaalde organische componenten. De rhamnosegroep wordt ook geïsoleerd na hydrolysis van de rhamnolipiden waarbij het vetzuur 3-hydroxydecanoëtzuur vrijkomt. In de cosmetica en gezondheidsindustrieën worden grote hoeveelheden surfactants, zoals rhamnolipiden, gebruikt voor de productie van o.a. insectenrepellents, scheer- en ontharingsproducten en tandpasta (Maier et al., 2000). Verder worden rhamnolipiden o.a. gebruikt in de ontginning van olie waarbij ze de oliewinning uit oliebronnen verbeteren, als plaagbestrijders met insecticidale activiteit tegen de groene perenbladvlo, als biocontrole agent tegen verschillende fytopathogene schimmels, als stimulant voor plantimmunitet, als antimicrobieel agent om voedselbederf te voorkomen en als voedingsingrediënten of additieven die fungeren als emulgator, oplosbaarheids-, schuim- en bevochtigingsmiddel (Chong et al., 2017).

1.3.6 Wetgeving

Op 1 juni 2007 werd de verordening (EG) No 1907/2006 door het Europees Parlement en de Raad inzake de Registratie, Evaluatie, Autorisatie en Restrictie van Chemische stoffen (REACH) opgesteld (ECHA, n.d.). REACH wil in de EU “de meest uitgebreide chemicaliëndatabank ter wereld creëren” en zorgt ervoor dat chemische stoffen die op de Europese markt worden gebracht geen nadelige gevolgen hebben voor de gezondheid van de mens en het milieu. De chemische stoffen moeten door fabrikanten of importeurs bij het Europees agentschap voor chemische stoffen (ECHA) worden geregistreerd (Covance, 2020). Rhamnolipiden zijn nog niet geregistreerd onder de REACH wetgeving waardoor ECHA nog geen gegevens hierover uit registratiedossiers heeft ontvangen (ECHA, n.d.).

1.4 Interactie tussen *P. oryzae*, rijst en rhamnolipiden

Goedaardige MO's in de rhizosfeer van de plantenwortels kunnen de gezondheid van de plant verbeteren. Tijdens de zaadkieming en de groei van de zaailingen ontstaat er namelijk een interactie tussen de plant en deze MO's. Zo kunnen ze de toevoer van minerale voedingsstoffen naar de plant verhogen, maar ook zorgen voor directe groeibevordering door bijvoorbeeld de productie van fytohormonen. Een derde groep, ook wel de biocontrole organismen (BCA's) genoemd, betreft de MO's die de plantengroei indirect stimuleren door de groei of activiteit van pathogenen te voorkomen (Nihorimbere et al., 2011). BCA's beschermen de plant tegen pathogenen via competitie met de pathogeen, via direct antagonisme of via geïnduceerde systemische resistentie (ISR) (Prashar et al., 2013). BCA's kunnen in competitie gaan met de pathogeen waarbij ze de nutriënten als voedingsbron gebruiken. Bij direct antagonisme kunnen twee mogelijke mechanismen optreden, namelijk hyperparasitisme (BCA is een parasiet met als gastheer een andere parasiet) en antibiose (BCA onderdrukt de pathogeen) (Köhl et al., 2019). Daarnaast kan ISR in de plant worden opgewekt voor een betere verdediging van de volledige plant tegen een breed scala aan pathogenen en insectenplagen. Een grote variëteit aan wortelgeassocieerde mutualisten, waaronder *Pseudomonas spp.* zorgen voor een trigger in de plant om het immuunsysteem te versterken zonder dat andere, meer energie vragende, verdedigingsmechanismen worden geactiveerd (Pieterse et al., 2014). Zo zou de productie van rhamnolipiden door onder andere *P. aeruginosa* een trigger kunnen zijn voor de activatie van ISR in verschillende planten (Varnier et al., 2009).

1.4.1 Plantenimmuunsysteem en geïnduceerde resistentie

1.4.1.1 PAMP, MAMP en DAMP

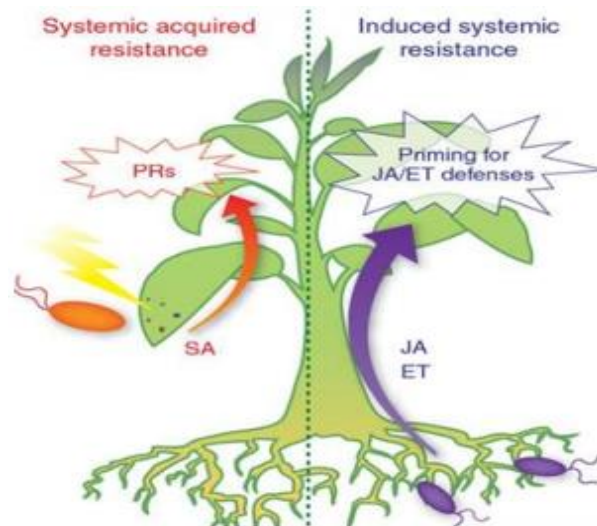
Planten worden geïnficeerd met zowel biotrofe, hemibiotrofe als necrotrofe pathogenen. Biotrofe pathogenen groeien op levende planten terwijl hemibiotrofe pathogenen zich in een later stadium necrotroof gedragen en zich voeden met dood gastheerweefsel (Höfte, 2018). Planten herkennen de indringers aan kenmerken die eigen zijn aan pathogenen (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*) of MO's (MAMP, *microbe-associated molecular pattern*) zoals flagella, celwandfragmenten (chitine, glucaan) en lipopolysacchariden (LPS) (Boller et al., 2009; Zipfel, 2009). Planten kunnen ook hun eigen afbraak herkennen, bijvoorbeeld wanneer fragmenten van de celwand of cuticula door pathogenen worden afgebroken. Dit wordt DAMP genoemd of *damage-associated molecular pattern* (Boller et al., 2009). De herkenning van deze PAMP-, MAMP- en DAMP-moleculen gebeurt door de receptoren (PRR, *pattern-recognition receptors*) aanwezig in de celmembraan van de plant. Deze herkenning leidt tot een eerste immunrespons, namelijk een PAMP-getriggerde immuniteit (PTI), die de meeste potentiële indringers in toom houdt (Dodds et al., 2010; Höfte, 2018; Pieterse et al., 2014).

1.4.1.2 ETS en ETI als trigger voor SAR

Biotrofe en hemibiotrofe pathogenen scheiden echter effectoreiwitten uit om PTI te onderdrukken. Daarnaast spelen ze ook een rol in virulentie. Dit leidt tot ziektegevoeligheid van de plant, wat ETS ofwel *effector triggered susceptibility* wordt genoemd. Door evolutie hebben planten geleerd sommige effectors te herkennen door middel van receptoren in het cytoplasma, de zogenaamde resistentieiwitten. Dit zorgt voor een tweede immunrespons, namelijk effector-getriggerde immuniteit (ETI). Dit gaat vaak gepaard met geprogrammeerde celdood op de plaats van infectie zodat biotrofe pathogenen zich niet verder kunnen verspreiden (Höfte, 2018; Pieterse et al., 2014). De activatie van PTI en ETI zorgt vaak voor een trigger van geïnduceerde resistentie (SAR, *systemic acquired resistance*) in weefsels distaal gelegen t.o.v. de infectieplaats en houdt een of meerdere lange-afstandssignalen in. Dit leidt tot een verhoogde beschermingscapaciteit op nog gezonde plantendelen (Shah et al., 2013).

1.4.1.3 Induced Systemic Resistance (ISR)

Naast deze vormen van immuniteit bestaat er ook ISR (*induced systemic resistance*). Hierbij zorgen BCA's in de rhizosfeer voor de *priming* van de volledige plant zodat de plant zich beter kan verdedigen tegen verschillende pathogenen en insectenherbivoren (Pieterse et al., 2014). SAR en ISR zijn dus beiden systemische processen. Het verschil tussen beide is dat SAR wordt geïnduceerd door pathogenen terwijl ISR wordt geactiveerd door nuttige MO's in de rhizosfeer (Romera et al., 2019). Een schematische representatie van SAR en ISR is weergegeven in **Figuur 11**.



Figuur 11: Biologisch geïnduceerde resistentie. Links: SAR, salicylzuur (SA)-afhankelijke resistentie getriggerd door pathooginfectie. Rechts: ISR door kolonisatie van de wortels met nuttige MO's. ISR bestaat uit lange-afstandssignalen die door de vaatwand worden getransporteerd naar gezonde plantendelen (Pieterse et al., 2014).

Jasmijnzuur (JA) en ethyleen (ET) zijn hormonen die belangrijk zijn voor de regulatie in de salicylzuur-onafhankelijke ISR, die wordt getriggerd door rhizobacteriën (Pieterse et al., 1998). Dit fenomeen werd vastgesteld op planten waaronder *Arabidopsis* (Ahn et al., 2007), tomaat (Hase et al., 2008; Yan et al., 2002) en rijst (De Vleeschauwer et al., 2008). JA en ET activeren beschermingsmechanismen in de plant en zorgen voor een verhoogde verdedigingscapaciteit tegen indringers die gevoelig zijn voor JA/ET-afhankelijke verdedigingsmechanismen: necrotrofe pathogenen en herbivore insecten. Echter, negatieve effecten van gunstige MO's op plant-insect interacties werden ook gerapporteerd (Pineda et al., 2010). Het proces waarbij de hele plant zich voorbereidt om de pathoog te bestrijden, wordt priming genoemd en wordt gekarakteriseerd door een snellere en/of sterkere activatie van cellulair verdediging bij een invasie van een pathoog. Dit resulteert in een verhoogde resistentie. ISR is dus een vorm van priming. Naast een verhoogde expressie van JA- en ET-afhankelijke genen, kan priming van de plant ook zorgen voor een sterkere celwandstructuur door een verhoogde aanmaak van callose onder invloed van het plantenhormoon abscisinezuur (Ton et al., 2007; Van Der Ent et al., 2009).

1.4.2 Effect van rhamnolipiden op ISR

Rhamnolipiden treden op als MAMP's voor de activatie van ISR in verschillende planten tegen allerlei pathogenen (Varnier et al., 2009). Zo zouden mono- en dirhamnolipiden geproduceerd door *P. aeruginosa* een trigger zijn voor ISR in wijnstokken waarbij het optreden van celsignalen zoals Ca^{2+} -influx en de productie van reactieve zuurstofsoorten (*reactive oxygen species*, ROS) wordt vervroegd met als gevolg dat de expressie van een hele reeks verdedigingsgenen en een hypersensitieve respons voortijdig kan optreden. Onder de verdedigingsgenen vallen pathogenese-gerelateerde eiwitgenen en genen die betrokken zijn bij de biosynthese van oxylipines en fytoalexines (Varnier et al., 2009). Rhamnolipiden vertonen ook activiteit in andere plantensoorten, waaronder in tabak, tarwe en *Arabidopsis thaliana* (Vatsa et al., 2010).

1.4.3 ISR in rijst tegen *P. oryzae* met rhamnolipiden als trigger

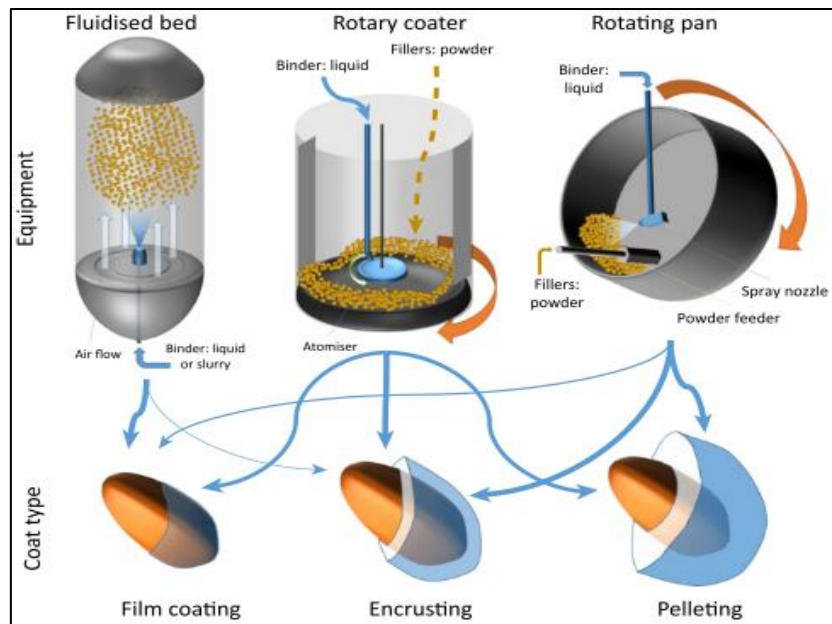
Veel studies rapporteren de antifungale activiteiten van rhamnolipiden tegen planten gecontamineerd met pathogenen waaronder *P. oryzae*, voornamelijk tegen schimmels en Oomyceten waaronder *Botrytis* spp., *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* sp. en *Plasmopara* spp. In deze studies werden rhamnolipiden, vnl. afkomstig van *P. aeruginosa* toegediend. Bovendien vertoonden ze een antimicrobieel effect, zoals de lyse van zoösporen, het onderbreken van de kieming van de sporen of de remming van de myceliumgroei (Crouzet et al., 2020). Het effect van rhamnolipiden tegen de rijstblastpathogeen in rijst werd echter nog niet getest. Een hypothese is dat lipopeptiden verdedigingsreacties induceren door membraanverstoring en dat dit mogelijk ook het geval is bij de rhamnolipiden (D'aes et al., 2010; Jourdan et al., 2009). Zo produceren de goedaardige *Pseudomonas* spp. stammen COR10, COW10 en COR5 cyclische lipopeptiden (respectievelijk lokisine, WLIP (white line inducing principle) en entolysine) die werkzaam zijn tegen *P. oryzae* in rijst. De rol van WLIP in het triggeren van ISR werd aangetoond door gebruik te maken van de WLIP-producerende stam *P. putida* RW10S2 en een WLIP-deficiënte mutant. De ISR-trigger tegen rijstblast was gelijkaardig aan het effect van de WLIP-producerende COW10 terwijl de muterende stam even gevoelig was aan rijstblast als de zieke controleplanten. Toepassing van WLIP leidde tot een lagere kieming van de sporen en een verminderde vorming van appressoria (Omoboye et al., 2019).

1.5 Zaadbehandelingen

Door de Europese *Green Deal* is de vraag naar een veiliger gebruik van pesticiden naar de gebruiker toe heel sterk gestegen. De hoge blootstelling van pesticiden kan in vele gevallen namelijk leiden tot chronische gezondheidsproblemen. Ook wordt een zo minimaal mogelijke impact op de omgeving opgelegd waarbij de toepassingsdosis van pesticiden op het veld zo laag mogelijk moet zijn. Zaadencrusteren zijn een relatief eenvoudige manier om dit te verwezenlijken. Op die manier kan er meer plantspecifiek worden gewerkt (Knowles, 2008). Naast pesticiden kunnen ook micronutriënten, zoals $ZnSO_4$, $FeSO_4$ en $CuSO_4$ in combinatie met compatibele biostimulanten via een zaadbehandeling op het veld worden gebracht (Suma et al., 2010). Bij het coaten van zaad worden exogene materialen, al dan niet drager van werkzame stoffen, op het zaadoppervlak aangebracht (Avelar et al., 2012; Kaufman, 2018). Zaadbehandelingen verbeteren o.a. de hanteerbaarheid van de zaden door standaardisatie van het gewicht en grootte van het zaad (Halmer, 2008; Pedrini et al., 2017).

1.5.1 Type zaadbehandelingen

Er zijn drie zaadbehandelingen gekend, namelijk: filmcoaten, encrusteren en pelletteren (Pedrini et al., 2017). **Figuur 12** toont deze behandelingen en welke machines hiervoor het meest geschikt zijn. Een *fluidised bed* is cilindervormig, waarbij de zaden in de lucht blijven drijven door een constante opwaartse luchtstroom. De sproeikop vernevelt de vloeistof naar de zwevende zaadmassa. Een *rotary coater* bestaat uit een cilindrische trommel met een roterende holle schijf aan de basis, die de zaadmassa langs de wanden van de trommel doet bewegen. Aan het deksel zorgt een kleinere roterende schijf voor de verstuiving en de projectie van de vloeistof op de roterende zaadmassa. Tot slot, een *rotating pan* bestaat uit een ronde pan, schuin op een draaiend gemotoriseerd scharnierpunt. Terwijl de pan draait, worden de vloeistoffen met een sproeikop aangebracht. Poeders worden door handmatig verstoven of via een trechter toegevoegd (Pedrini et al., 2017).



Figuur 12: Proces van een zaadbehandeling en het verschil tussen een zaadcoating, zaadencrusting en zaadpelleting. De benodigde ingrediënten voor een zaadbehandeling zijn een binder of sticker, een carrier en werkzame stoffen. Afhankelijk van welke type coating wordt gemaakt, is er andere apparatuur vereist (Pedrini et al., 2017).

1.5.1.1 Zaad(film)coating

Een zaad(film)coating bestaat uit het aanbrengen van een ononderbroken dunne laag over het zaadoppervlak en wordt het best met de *rotary coater* ontwikkeld. De gewichtstoename bij gecoate zaden bedraagt tussen 2 % en 5 % van het zaadgewicht. Deze techniek wordt vooral toegepast om het oppervlak van de zaden glad te maken. Echter, de vorm en grootte van de zaden wordt hierdoor niet gewijzigd. (Afzal et al., 2020).

1.5.1.2 Zaadencrustering

Bij een zaadencrustering worden exogene materialen rond de zaden aangehecht, waardoor deze volledig worden bedekt, maar de oorspronkelijke zaadvorm behouden blijft. Zaadencrusteringen worden bij voorkeur met de *rotary coater* of de *rotating pan* ontwikkeld. De gewichtstoename na het encrusteren varieert tussen 8 % en 500 %. De dikte van de zaadencrustering kan echter de kiemkracht beïnvloeden (Afzal et al., 2020). Tijdens dit proces kunnen bepaalde meststoffen en/of plantverbeterende componenten worden toegevoegd, maar ook biostimulanten zoals mycorrhiza kunnen hierin worden verwerkt (Ad Terram BV, n.d.).

1.5.1.3 Zaadpelleting

Zaadpelletieren gaat nog een stap verder en wordt het best ontwikkeld met een *rotary coater* of *rotating pan*. Dit resulteert in een gewichtstoename van 500 % tot meer dan 5000 % (Afzal et al., 2020). Een zaadpellet bestaat meestal uit een mix van klei en andere organische materialen die de vorm van een klein, niet-rond zadjie stroomlijnt. Zaden met een hoge economische waarde, zoals groentezaden, worden soms met kleien gepelleteerd om de hanteerbaarheid van de zaden te verbeteren (Knowles, 2008). Zaadpelleting wordt bij zaden van o.a. bieten, sla, wortelen, uien, maar ook bij veel kruiden en bloemen toegepast. (Gatch, 2016). Pelleting zorgt voor het gemakkelijker, veiliger en nauwkeuriger mechanisch zaaien en is dus vooral een techniek om het zaaien praktischer te laten verlopen (uniforme

zaden, voldoende hoge massa, glad oppervlak) (Croda International Plc, 2020; Pedrini et al., 2018). Het proces duurt gewoonlijk langer dan het aanbrengen van een encrusteringslaag aangezien het minder geautomatiseerd is. Idealiter laten de pelletterende materialen voldoende zuurstof door en absorberen ze snel water zodat de pelleting rond de zaden vrijwel onmiddellijk splitst of desintegreert. Daarnaast kunnen gewasbeschermingsmiddelen, voedingsstoffen en/of andere componenten worden toegevoegd (Croda International Plc, 2020; Gatch, 2016).

1.5.2 Regulering

De afgelopen jaren is de wetgeving rond zaadbehandelingen veranderd waarbij Euroseeds, vroeger ESA (*European Seed Association*), het kwaliteitsborgingssysteem ESTA (*European Seed Treatment Assurance*) ontwikkelde om de nieuwe regelgevende en politieke uitdagingen het hoofd te bieden. ESTA zorgt ervoor dat het proces van een zaadbehandeling en het resulterende behandelde zaad voldoet aan de eisen gesteld door wetgevers en de industrie. Deze strenge eisen moeten voldaan worden opdat ESTA de zaden goedkeurt zodat ze op de markt kunnen worden gebracht. Een van die eisen is het zeer beperkte gebruik van chemicaliën wat een aantal grote voordelen biedt voor het milieu en de volksgezondheid. In Frankrijk en Duitsland bestonden voor ESTA reeds nationale systemen voor kwaliteitsborging. ESTA is zo ontworpen dat ze met deze systemen in Frankrijk en Duitsland compatibel is (Euroseeds, n.d.). Daarnaast is ESTA compatibel met de kwaliteitslabels ISO 9001 en ISO/IEC 17065, resp. een kwaliteitsmanagementsysteem en een conformiteitsbeoordelingsvereiste voor instanties die producten, processen en diensten certificeren (Euroseeds, n.d.).

Er zijn specifieke vereisten waaraan zaadbehandelingsbedrijven moeten voldoen, waaronder: het voldoen aan gewasspecifieke criteria voor de te behandelen zaden (stofgehalte, aanwezigheid van gebroken of beschadigde zaden en andere materialen zoals kaf), het zaadbehandelingsproces (inclusief het proces om de zaden voor te bereiden) en het gebruikte materiaal moet van degelijke stabiliteit en betrouwbaarheid zijn, veiligheidsinformatiebladen (MSDS) en andere documentatie relevant voor een correcte en veilige werking moeten ter plaatse beschikbaar zijn, de visuele inspectie van het zaad voor en na de zaadbehandeling en het nemen van referentiemonsters (Euroseeds, 2017).

1.5.3 Gebruik

1.5.3.1 Pesticiden

Via zaadencrusteringslaag kunnen pesticiden gericht worden toegediend om de plant tijdens de eerste zes weken na het zaaien te beschermen. Vaak wordt een combinatie van pesticiden gebruikt om een zo breed mogelijk werkingsspectrum te garanderen (PGG Wrightson Seeds, 2020). Het probleem bij het toepassen van pesticidenbevattende zaadencrusteringslaag is dat de landbouwers deze zaden zullen gebruiken ook als het veld niet aangetast is. Het geeft hen een vals gevoel van zekerheid want het onnodig toepassen van pesticiden werkt resistentie in de hand (Walker et al., 2015). Een ander nadeel is dat landbouwers meestal niet weten welke (extra) pesticiden aanwezig zijn in de zaadencrusteringslaag. Dit kan op termijn schadelijk zijn voor het milieu en de gezondheid van de landbouwers (Penn State, 2020). Naast neonicotinoïden (werkzame stof: thiamethoxam) worden ook anthranilische diamidegroepen (met bijvoorbeeld de werkzame stof: chlorantriliprole of cyantriniprole) in zaadencrusteringslaag verwerkt (Stout et al., 2015). In zaadencrusteringslaag hebben fungiciden vnl. een contactwerking tegen bodempathogenen (PGG Wrightson Seeds, n.d.). Echter kunnen ook systemische

fungiciden in de zaadencrustering worden gebruikt. Zo vertoont het handelsmerk Difend Extra (suspensieconcentraat) een activiteit tegen verschillende *Fusarium*- en *Tilletia* soorten en bestaat het uit twee complementaire fungiciden: 25 g/L fludioxonil (bescherming tegen zowel zaad- als bodemziekten door mee te groeien met het coleoptiel) en 25 g/L difenoconazole (versterkt de bescherming van het coleoptiel aan het begin van de kieming) (Globachem, 2021). Een ander fungicide is fluopicolide dat werkzaam is tegen verschillende *Oomycetes*-ziekten waaronder meeldauw (*Plasmopara*, *Pseudoperonospora*, *Peronospora* en *Bremia*), *Phytophthora* en enkele *Pythium* soorten (Aizawa, 2013).

1.5.3.2 Nutriënten

Ook verschillende nutriënten worden aan de zaadencrustering toegevoegd. Het is een ideale manier om vooral “startbemesting” mee te geven aan de zaailingen en is voordelig bij immobiele nutriënten zoals fosfor, kalium en mangaan maar ook voor koper, ijzer en zink (Mortvedt, 1994; Scott, 1998; Welch et al., 1966). Zonder zaadencrustering is de kans groot dat niet alle nutriënten in de buurt van de rhizosfeer terechtkomen en worden opgenomen. Een bijkomend voordeel is dat de verdeling van de nutriënten over de zaden veel uniformer is, vergeleken met volleveldsbemesting (Scott et al., 1988a, 1988b). Een nadeel is dat er een grotere kans is op toxiciteit door het overmatig toepassen van deze nutriënten. Dit fenomeen komt vaker voor bij droge bodems (Scott, 1998).

1.5.3.3 Plantengroeistimulerende organismen

Plantengroeistimulerende organismen zoals rhizobia en arbusculaire mycorrhizale fungi worden ook in zaadencrusteringen verwerkt. Rhizobia geven fytohormonen vrij als gevolg van nodulevorming in vlinderbloemigen. Deze hormonen stimuleren direct of indirect de plantengroei door de chemie van de rhizosfeer te veranderen (Jaiswal et al., 2021). Ze worden vaak aan de coating toegevoegd m.b.v. een kleefstof zodat het inoculum beter kleeft aan de zaden (Scott, 1989). Een van de nadelige omstandigheden waarmee rhizobia na inoculatie mee te maken krijgen, is uitdroging. Dit kan worden vermeden door ze te laten groeien in een organisch substraat (turf, montmorillonietklei...) (Marshall et al., 1963). Daarnaast worden ook arbusculaire mycorrhiza (AM) in zaadencrusteringen verwerkt. Deze schimmels verhogen de groei en opbrengst van landbouwgewassen. Uit een studie blijkt dat het toepassen van meerdere AM-isolaten in zaadencrusteringen een gunstig effect heeft op de opbrengst van kikkererwten (Rocha, Duarte, et al., 2019). Daarnaast worden ook chemische biostimulantia zoals plantengroeiregulatoren waaronder gibberelline (GA_3), naftaleen azijnzuur (NAA) en 6-benzylaminopurine (6-BA) in zaadencrusteringen gebracht. Deze plantengroeiregulatoren zouden de zaadkracht en kieming bij maïszaden verbeteren (Suo et al., 2017).

1.5.3.4 Biocontrole organismen (BCA)

BCA's worden vaak gezien als een goed alternatief voor het veelvuldig toepassen van chemische componenten. Zaadencrusteringen zijn, naast bladtoepassingen en bodembehandelingen, een goede manier om BCA's toe te passen (Rocha, Ma, et al., 2019). In Europa zijn er voorlopig slechts twee BCA's erkend om toe te passen op zaden. Enerzijds is dat *Pseudomonas chlororaphis* (MA342) als fungicide, met “Cerall” als Belgisch product dat wordt toegepast op zaaizaden van winter- en zomertarwe, winter- en zomerrogge en winter- en zomertriticale. Anderzijds wordt *Bacillus firmus* t-1582 als nematicide gebruikt op zaaizaden van bieten met als Belgisch product “Votivo” (Fytoweb, 2015).

1.5.4 Samenstelling van een (biologische) zaadencruster

Zaadencrusters worden door het toevoegen van enkel een poeder (carrier) of een combinatie van een poeder (carrier) met een bindingsmateriaal (sticker) geformuleerd (Knowles, 2008). Veelgebruikte carriers zijn zeolieten, chitine, CaCO₃, bentoniet, gips, vermiculiet, kaolien en talk (Pedrini et al., 2018).

Tabel 2 geeft een overzicht van de belangrijkste carriers die in deze thesis werden gebruikt. In **Bijlage 2** staat een gelijkaardige tabel met andere veelgebruikte carriers. Voorbeelden van stickers zijn methylcellulose (methocel), carboxymethylcellulose (CMC), Arabische gom, xanthaangom, polyvinylalcohol (PVA) en polyvinylpyrrolidone (PVP). **Tabel 3** geeft een overzicht van de meest gebruikte stickers en hun concentraties toegevoegd aan zaadbehandelingen.

Tabel 2: Meest gebruikte carriers in zaadencrusters. ρ = densiteit [g/cm³], M = moleculaire massa [g/mol], s = wateroplosbaarheid [g/L].

Carrier	Eigenschappen	Gewas	Referentie
Bentoniet	$\rho = 2,15$	Sla	(Kangsopa et al., 2018)
	$M = 422,29$	Rijst	(Mei et al., 2017)
	Wateronoplosbaar		
Kaolien	$\rho \in [1,8;2,6]$		(Taylor et al., 1990)
	$M = 258,16$		
	Wateronoplosbaar		
Talk	$\rho = 2,75$	Rijst	(Mei et al., 2017)
	$M = 379,29$	Katoen	(Schoina et al., 2011)
	50g/L suspensie:	Koolzaad	(Sharifi-Tehrani et al., 2006)
	pH $\in [7,9]$	Mais	(Martínez-Álvarez et al., 2016)
	Wateronoplosbaar		

Tabel 3: Meest gebruikte stickers in zaadencrusters. Alle stickers zijn wateroplosbaar. M = moleculaire massa [g/mol], μ = viscositeit [mPa.s], s = wateroplosbaarheid [g/L].

Sticker	Eigenschappen	(w/w)%	Gewas	Referentie
Alginaat	$M = 216,12$	1	Suikerbiet	(Bardin et al., 2003)
Arabische gom	$M = 250\ 000$	50	Aardappel	(Kloepper, 1981)
	pH $\in [4,1;4,8]$			
Carboxymethyl-cellulose	$M = 263,2$	0,3	Sla	(Kangsopa et al., 2018)
	2% H ₂ O-opl.: $\mu \in [400,800]$	1	Koolzaad	(Sharifi-Tehrani et al., 2006)
	pH $\in [6,5;8,5]$			
	$s = 20$			
Methylcellulose	$M = 658,7$	1	Suikerbiet	(Bardin et al., 2003; Kloepper, 1981)
	2% H ₂ O-opl.: $\mu \in [1200,1800]$	2	Komkommer, radijs	(Cliquet et al., 1997)
		2	Tarwe	(Swaminathan et al., 2016)

Sticker	Eigenschappen	(w/w)%	Gewas	Referentie
PVA (Mowiol)	M = 31000 4% H ₂ O-opl.: $\mu \in [3,5;4,5]$	1,5		
PVP	M = 40000 g/mol 10g/L: pH $\in [5,8]$	1 – 10	Suikerbiet	(Bardin et al., 2003)
		10	Komkommer, radijs	(Bell et al., 2000) (Swaminathan et al., 2016)
		10	Tarwe	
Xanthaangom	M = 933,748 1% KCL-opl.: $\mu \in [1200,1800]$ pH $\in [6,8]$	5 – 20	Broccoli	(Amirkhani et al., 2019)

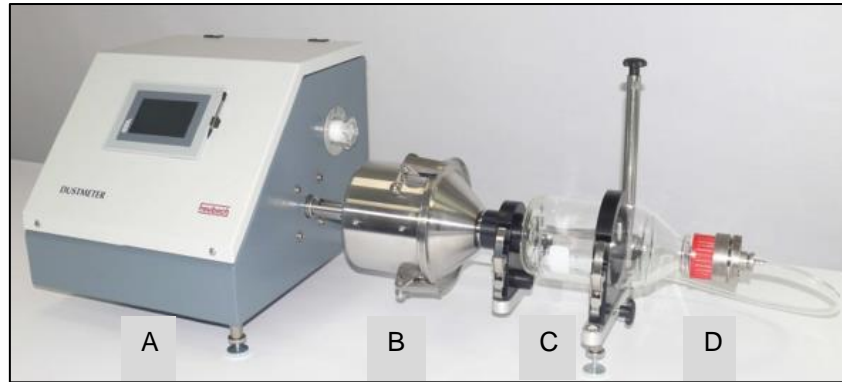
1.5.5 Kwaliteitsparameters

1.5.5.1 Lading aan werkzame stoffen in de coating

Wanneer werkzame stoffen zoals fungiciden, insecticiden, nematiciden en bactericiden aan een zaadcoating worden toegevoegd, is het belangrijk dat de nodige concentratie aan werkzame stof(fen) aanwezig is (zijn) opdat het doelwitorganisme zo optimaal mogelijk wordt bestreden. Op die manier kan de zaadcoating als effectief worden beschouwd. Hierbij moet er ook rekening mee worden gehouden dat de lading aan werkzame stoffen in de coating niet te hoog oploopt om zo fytotoxiciteit te vermijden (FBN Network, 2019). Om de lading aan werkzame stoffen te bepalen kan gebruik worden gemaakt van de LC-MS/MS analyse die de scheidingskracht van vloeistofchromatografie combineert met de gevoelige en selectieve massa-analyse van een tandemmassaspectrometrie (Eurofins Scientific, 2015). Wanneer MO's aan de zaadcoating worden toegevoegd, kan aan de hand van het aantal CFU's (kolonievormende eenheden), na uitplatingen op een voedingsmedium, het aantal MO's in de zaadcoating worden bepaald (Rocha, Ma, et al., 2019).

1.5.5.2 Heubach dust-off test

Een goede zaadencrustering verliest het best zo weinig mogelijk van zijn coating tijdens het transport. Om het stofverlies tijdens het transport te meten, is er de zogenaamde Heubach dust-off test. **Figuur 13** toont de opstelling ervan. Bij deze test worden de behandelde zaden in een roterende capsule geplaatst waarna een vacuümpomp voor een luchtstroom zorgt die doorheen de capsule, glazen cilinder en filter wordt gestuurd. Door de luchtstroom zullen de stofdeeltjes, losgekomen van de gecoate zaden, via de glazen cilinder naar de filter mee worden getransporteerd. Grote, niet-zwevende deeltjes worden afgescheiden en opgevangen in de glazen cilinder, terwijl zwevende stofdeeltjes in de filter worden afgezet. De hoeveelheid stof wordt ten slotte gravimetrisch bepaald (ILVO, 2020). Meer precies worden in deze methode 100 g zaden afgewogen en in de capsule geroteerd aan 30 rpm voor 120 s terwijl er 20 L lucht per minuut wordt geblazen (Halecky et al., 2016). Deze techniek is gecertificeerd als een standaardmethode door de *European Seed Association*. Euroseed ontwikkelde per gewas een stofreferentie die het maximale stofverlies van een zaadencrustering weergeeft. Voor rijst is dit maximum 4 g stofverlies per 100 kg gecoate rijstzaden (Euroseeds, n.d.).



Figuur 13: Principe van de Heubach meter om het stofverlies tijdens het transport te meten. Hiervoor zijn vier verschillende onderdelen nodig, namelijk: een controle-eenheid met vacuümpomp (A), een roterende capsule (B), een glazen cilinder (C) en een filter-eenheid (D) (ILVO, 2020). De vacuümpomp stuurt een luchtstroom door de capsule, glazen cilinder en filter en neemt losgekomen stofdelen van de zaadcoating mee.

1.5.5.3 Andere kwaliteitsparameters

Een andere parameter voor het bepalen van een kwaliteitsvolle zaadencrustering is de *flowability*. Deze parameter vertaalt de ruwheid van het oppervlak van de coating naar de doorloopsnelheid, uitgedrukt in gram gecoat zaad per seconde. Een hoge *flowability* betekent een glad oppervlak en is gewenst om tijdens het transport of veldtoepassing zo weinig mogelijk wrijving en andere verliezen te hebben. Een derde parameter om de kwaliteit van een zaadencrustering te meten, is de desintegratie in water. Afhankelijk van de omstandigheden is het namelijk aangeraden dat de coating al dan niet goed uiteenvalt in water en dat de beschikbaarheid van de biostimulantia in de coating al dan niet snel vrijkomt in de bodem. Daarnaast mag de zaadencrustering niet fytoxisch zijn voor het zaadje. Er mag bijvoorbeeld geen wortel- en scheutgroeiachterstand optreden. Via plantenproeven kan de fytoxiciteit worden achterhaald (Halecky et al., 2016). Ten slotte moeten de zaadencrusteringen een zekere tijd worden bewaard zonder dat de werkzame stoffen in de coating hun activiteit verliezen en waarbij de structuur van de coating zelf zo lang mogelijk stabiel blijft (Gorim, 2014).

2 Materiaal en methoden

2.1 In planta bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden

2.1.1 Behandeling en gebruikte producten

In dit experiment werd getest welke natuurlijke RL-concentraties geschikt zijn om een ISR-respons in de plant te induceren. De natuurlijke rhamnolipiden werden aangekocht bij AGAE Technologies. Volgens de productiefiche bestonden de rhamnolipiden uit een mengsel van mono- en dirhamnolipiden. De stockoplossing werd steeds in steriel water bereid. De rhamnolipiden werden op drie verschillende manieren aan de bodem toegevoegd: een *seed dip* (onderdompeling van de zaailingen in de oplossing) en een *soil mix* (menging van de bodem met de oplossing) tijdens het planten uitgevoerd en drie dagen voor de inoculatie ook een *soil drench* (RL-oplossing gegoten over het bodemsubstraat). Na inoculatie met *Pyricularia oryzae* werden de ziektesymptomen op de plant geëvalueerd. Deze data werden later gebruikt om de optimale concentratie aan rhamnolipiden in de zaadencrusterings te bepalen. **Tabel 4** geeft een overzicht van de uitgevoerde behandelingen.

Tabel 4: Behandelingen uitgevoerd tijdens de plantenproef.

Nr.	Behandeling	RL-concentratie (µM)	Seed dip	Soil mix	Soil drench	Inoculatie met <i>P. oryzae</i>
1	Zieke controle	0				Ja
2	Gezonde controle	0				Nee
3	Natuurlijke RL	50	X	X	X	Ja
4	Natuurlijke RL	10	X	X	X	Ja
5	Natuurlijke RL	1	X	X	X	Ja
6	Natuurlijke RL	50	X	X		Ja
7	Natuurlijke RL	50			X	Ja

2.1.2 Proefopzet

2.1.2.1 Voorkieming van de zaden

De rijstvariëteit die werd gebruikt, was rijst (*O. sativa*) indica cv. CO-39. Deze is gevoelig aan de rijstpathogeen *P. oryzae* (Telebanco-Yanoria et al., 2011). De zaden werden eerst ontkaft en vervolgens gesteriliseerd met 2 % javeloplossing gedurende 20 minuten, waarna de zaden met steriel water werden gespoeld. Alvorens het planten van de rijstzaden, werden ze vier dagen op vochtig steriel filterpapier voorgekiemd in een klimaatkamer (28 °C, 12 h licht/12 h donker).

2.1.2.2 Substraatvoorbereiding en plantengroei

Tijdens het planten werden de zaailingen op twee verschillende manieren aan de rhamnolipiden blootgesteld. Eerst werd een *soil mix* uitgevoerd waarbij per behandeling 750 mL RL-oplossing (Tabel 4) met 1,8 kg bodemsubstraat werd vermengd. Ook vond een *seed dip* plaats waarbij de zaailingen tien minuten met 250 mL RL-oplossing in contact werden gebracht. Per herhaling werden negen zaailingen geplant in plastic bakjes (15 cm x 20 cm x 8 cm) gevuld met 692 g vochtig bodemsubstraat (universeel type 1 Structural, Snebbout N.V.). De rijstzaden werden drie dagen met een plastic folie afgedekt en vier weken opgegroeid in een klimaatkamer (Figuur 14). Om de twee dagen kregen de planten water naargelang behoefte en elke week werd 250 mL ijzeroplossing toegediend (2 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).



Figuur 14: Groei van de rijstplanten in een klimaatkamer (28 °C, 12h dag/12h nacht). Links: drie dagen oud. Midden: vijf dagen oud. Rechts: vier weken oud.

2.1.2.3 Opweek van de rijstpathoogeen

De stock van *P. oryzae* isolaat VT5M1 werd bewaard in een 20 % steriele glyceroloplossing bij -80 °C (Thuan et al., 2006). De rijstpathoogeen werd overgeplaatst op PDA-medium (*Potato Dextrose Agar*) en vermeerderd bij 28 °C en een lichtregime van 12 h/12 h dag/nacht ter bevordering van de sporulatie. Op de dag van inoculatie werd een sporenoplossing gemaakt door de petriplaat met steriel water te spoelen. De myceliumrestanten werden door middel van filtratie verwijderd. Vervolgens werd de sporenconcentratie via een Bürker Turk telkamer bepaald waarna de oplossing tot een eindconcentratie van 5×10^4 sporen/mL werd verdund. Deze oplossing werd op ijs bewaard tot de inoculatie.

2.1.2.4 Inoculatie

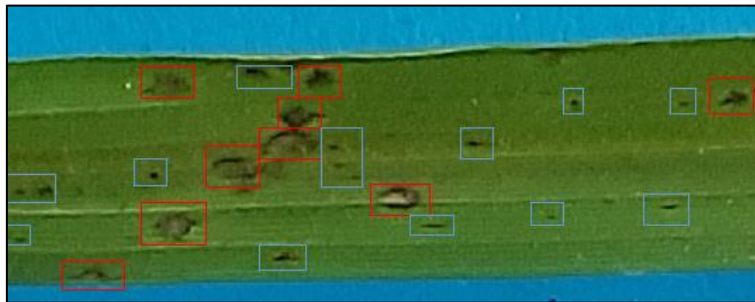
Drie dagen voor de inoculatie met *P. oryzae* kregen de planten een laatste keer rhamnolipiden toegediend, waarbij afhankelijk van de behandeling 250 mL water van 1 μM , 10 μM of 50 μM RL-oplossing over de bodem werd gegoten (*soil drench*). Behandeling 7 kreeg enkel via de *soil drench* rhamnolipiden toegediend (50 μM) (zie Tabel 4) terwijl bij behandeling 6 geen *soil drench* werd uitgevoerd waardoor de rhamnolipiden enkel tijdens het planten in contact kwamen met de zaden (*seed dip* en *soil mix*). Tijdens de inoculatie kregen alle behandelingen behalve de gezonde controle de sporenoplossing gemengd met 0,5 % gelatine toegediend. Hiervoor werd de oplossing in een vooraf gereinigd verfpistool (Badger, type 150) gegoten om ze vervolgens op de planten te vernevelen (Figuur 15). Het verfpistool werd aan een luchtcompressor aangesloten om onder constante druk (9 bar) te kunnen vernevelen zodat de oplossing homogeen over de bladeren werd verdeeld. Na de inoculatie werden de planten gedurende 22 uren blootgesteld aan een temperatuur van 26 °C en een relatieve vochtigheid van 100 %.



*Figuur 15: Inoculatie van de rijstplanten met *P. oryzae* met behulp van een verfpistool. De sporenoplossing werd via zigzagbewegingen over de bladeren heen gespoten waarbij de zwarte bak telkens een kwartslag werd gedraaid zodat alle bladeren evenveel sporenoplossing kregen toegediend.*

2.1.2.5 Symptoomevaluatie

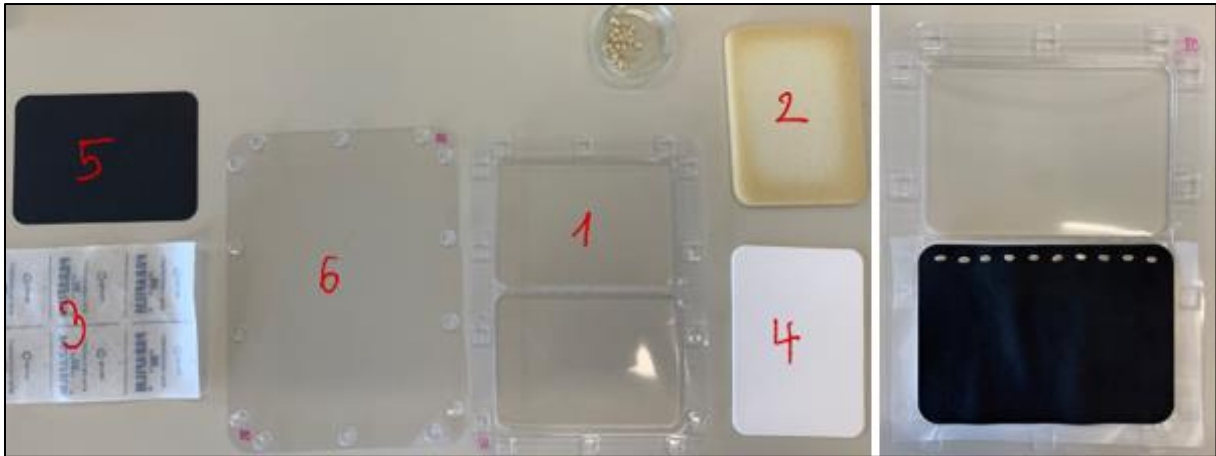
Vijf dagen na de inoculatie werden de symptomen geëvalueerd door op het tweede jongste volledig ontwikkelde blad van elke rijstplant het aantal sporulerende laesies te tellen. **Figuur 16** geeft weer welke laesies in de telling werden meegenomen (rode rechthoekjes, met mycelium) en welke niet (blauwe rechthoekjes, zonder mycelium).



Figuur 16: Symptoomevaluatie waarbij het aantal sporulerende laesies (met grijs mycelium) werd geteld (rode rechthoekjes). De blauwe rechthoekjes zijn laesies zonder myceliumvorming wat betekent dat hier ISR heeft opgetreden. Deze laesies werden niet meegeteld.

2.2 In vitro bepaling van het fytotoxisch effect van rhamnolipiden op rijstzaden

Om het effect van de rhamnolipidenconcentratie op de ontwikkeling van de rijstzaden te bepalen werden vier verschillende RL-oplossingen (1 μM , 10 μM , 50 μM en 200 μM) getest op fytotoxiciteit. Deze concentraties werden aan de rijstzaden toegevoegd via een testkit (microbiotest) die werd opgesteld volgens **Figuur 17**. De testkit bestond uit twee plastic platen die de zaden, mousse, parafilm, wit filterpapier (met 20 mL RL-oplossing) en zwart filterpapier omsloten. De plastic onderdelen werden op voorhand met een ethanoloplossing behandeld; de andere onderdelen werden geautoclaveerd. De zaden werden vooraf twintig minuten gesteriliseerd in een 2 % javeloplossing en nadien viermaal met steriel water gereinigd. De opbouw van de testkit verliep onder de laminaire flow waarna deze in aluminiumfolie werd ingewikkeld en een aantal dagen aan een temperatuur van 28 °C werd blootgesteld. Op verschillende dagen werden van alle zaadjes de wortel- en scheutlengte bepaald via het softwareprogramma ImageJ 1.52v (**Bijlage 3**). Per RL-oplossing werden drie herhalingen genomen.

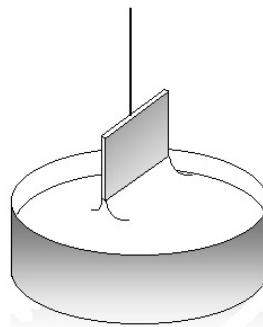


Figuur 17: Fytotoxiciteitstest waarbij het effect van de rhamnolipiden op de ontwikkeling van de scheut en wortel van de rijstzaden wordt nagegaan. Links: Opbouw van de testkit om de fytotoxtest uit te voeren. 1) Plastic onderkant, 2) Mousse, 3) Parafilm, 4) Witte filter, 5) Zwarte filter, 6) Plastic bovenkant. Rechts: Voorbeeld van een toegepaste testkit.

2.3 Extractie van rhamnolipiden uit de bodem

2.3.1 Bepaling oppervlaktespanning via Wilhelmy plaatmethode

Aangezien het niet mogelijk was om de RL-concentratie rechtstreeks via LS-MS/MS te meten, werd de Wilhelmy plaatmethode gebruikt, die de oppervlaktespanning van waterige vloeistoffen meet, als potentiële indicator van de aanwezigheid van rhamnolipiden. Hierbij werd het gewicht bepaald dat werd uitgeoefend door de verplaatste vloeistof wanneer een platina plaatje het vloeistofoppervlak doorkliefde. Het was belangrijk dat het plaatje volledig werd bevochtigd en dat onderzijde van het plaatje zich op hetzelfde niveau als het vloeistofoppervlak bevond (Figuur 18). Het plaatje werd alvorens gebruik gereinigd met chroomzuur en driemaal met gedestilleerd water (Spanoghe et al., 2020). M.b.v. de gemeten massa, kon via **Vergelijking 1** de oppervlaktespanning worden bepaald.



Figuur 18: Bepaling van de oppervlaktespanning via de Wilhelmy plaatmethode (Sinterface, n.d.).

$$\gamma = \frac{m * g}{\cos(\theta) * l} \quad (\text{Vergelijking 1})$$

γ is de oppervlaktespanning (N/m), m de massa verplaatste vloeistof (kg), g de valversnelling (m/s^2), θ de contacthoek ($^\circ$) en l de omtrek van het plaatje (m). g , θ en l zijn steeds constant en gelijk aan respectievelijk $9,81 \text{ m/s}^2$, 0° en $0,024 \text{ m}$. Om een standaardcurve op te stellen, werden van de volgende rhamnolipidenconcentraties (in $\mu\text{g/mL}$) de oppervlaktespanning bepaald: 0, 1, 5, 10, 20, 30, 50, 60, 70, 80, 90 en 100.

2.3.2 Kwantificatie van rhamnolipiden uit de bodem

Om de werking van rhamnolipiden op de rijstplanten te bepalen, is het ook belangrijk om hun gedrag in de bodem te bestuderen. De rhamnolipiden zouden namelijk door interactie met de bodemorganismen inactief kunnen worden gemaakt of geïmmobiliseerd. Hiervoor werd een proef opgesteld waarbij verschillende rhamnolipidenconcentraties aan vochtig bodemmateriaal werden toegevoegd en daarna terug uit de bodem werden geëxtraheerd. Na stevig schudden werden de stalen enkele dagen onder aluminiumfolie bewaard waarna een hoeveelheid HPCL-grade water aan de stalen werd toegevoegd. Na het schudden (15 min, 300 rpm) en vervolgens het centrifugeren (5 min, 10000 rpm) van de stalen werd het supernatans afgepipetteerd. De concentratie aan rhamnolipiden in het supernatans werd via de Wilhelmy plaatmethode aan de oppervlaktespanning gelinkt.

De Wilhelmy plaatmethode wordt standaard met oplossingen in HPLC-grade water met een pH van 8,39 uitgevoerd. Omdat echter het gedrag en oplossingsvermogen van rhamnolipiden sterk door de pH wordt beïnvloed, werd een bijkomende test uitgevoerd waarbij het HPCL-grade water werd aangezuurd. De volgende pH's werden getest: 4,16; 5,3; 6,34; 7,07 en 7,67.

2.4 Zaadencrusterings en incorporatie met rhamnolipiden

2.4.1 Optimalisatie van de coatingsmethode

2.4.1.1 Selectie en preparatie van de zaden

De beschikbare rijstvariëteit (CO-39) was helaas niet in bulk beschikbaar en bovendien moest elk zaadje van deze variëteit eerst manueel worden ontkaft, wat veel tijd vraagt. Daarom werden voor het ontwikkelen van een zaadencrusterings zonder rhamnolipiden drie verschillende rijstvormen met een vorm gelijkaardig aan de CO-39 zaden aangekocht namelijk: *Riz Long Grain*, *Thai Hom Mali Cargo Rice* en *Riz Rond Complet*. De eerste zaden waren langgerekte; de tweede zaden waren iets dikker, maar nog steeds lang en de laatstgenoemde zaden hadden een dikkere en kortere vorm (**Figuur 19**).



Figuur 19: Vorm van de drie aangekochte winkelzaden ter vervanging van de CO-39 rijstvariëteit. A: Riz Long Grain, B: Thai Hom Mali Cargo Rice, C: Riz Rond Complet, D: CO-39.

2.4.1.2 Sticker- en carrierselectie

Alle stickeroplossingen werden minstens een dag op voorhand aangemaakt waarbij gesteriliseerd water aan een hoeveelheid stickerpoeder werd toegevoegd dat met een roervlo werd gemengd tot een homogene oplossing werd bekomen. **Tabel 5** geeft een overzicht van de geteste stickers. Daarnaast werden ook de volgende carriers getest: turf, vermiculiet, perliet, bentoniet, kaolien en talk.

Tabel 5: Geteste stickers en stickerconcentraties. Ter controle werd ook zuiver water gebruikt als sticker.

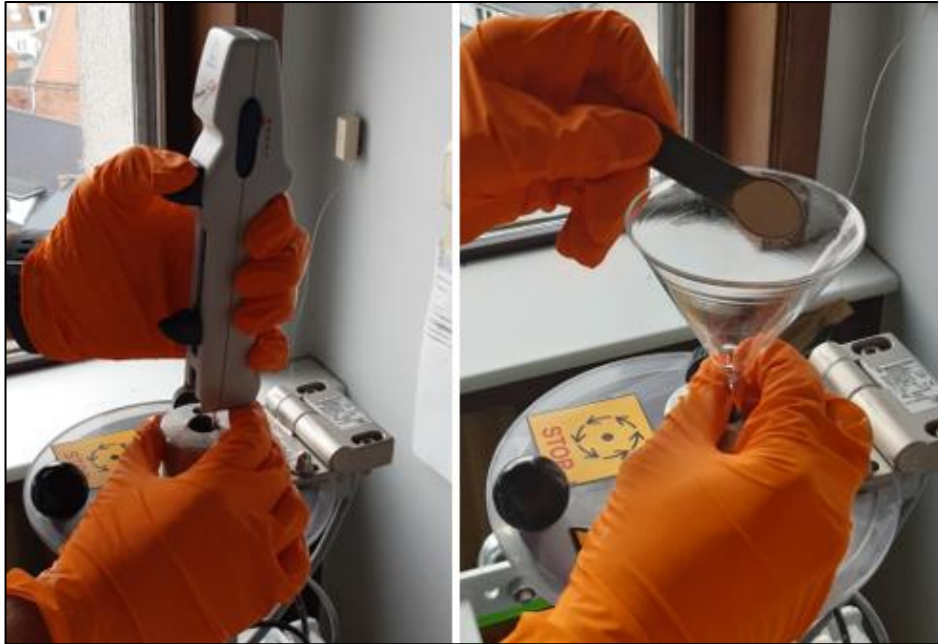
Geteste stickers	Geteste stickerconcentraties (%)
Arabische gom	15, 20
Carboxymethylcellulose natriumzout (CMC)	1; 1,5
Methocel® A15C	0,75; 1
Mowiol® 4-88	5, 10
Polyvinylalcohol (PVA) Mw 9000 - 10000	20
Polyvinylalcohol (PVA) Mw 31000 - 50000	10
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	5
Xanthaangom	0,1
Water	100

2.4.1.3 Coatingsprocedure

Het opbouwen van de zaadencrusterings gebeurde met een *rotary coater* (Wintersteiger, A-4910 Ried, Oostenrijk, **Figuur 20**) met een volume geschikt voor de behandeling van 20 tot 80 g zaden. **Figuur 21** toont hoe de sticker en de carrier aan het coatingstoestel werden toegevoegd. De sticker werd via een druppelverdeler (*HandyStep*) in contact gebracht met de zaden (telkens 0,5 mL sticker in druppels van 50 µL) waarbij alternerend een hoeveelheid carrier m.b.v. een glazen trechter werd toegevoegd. Dit proces werd acht keer herhaald waarna nog een laatste keer 0,5 mL sticker werd toegevoegd.



Figuur 20: Coatingmachine aanwezig in het labo (Wintersteiger AG, 2018). Links: zij aanzicht. Rechts: bovenaanzicht. A: holte voor applicatie van carrier en sticker tijdens rotatie. B: Zaadruimte.



Figuur 21: Methode om sticker en carrier toe te voegen aan de coatingmachine. Links: Sticker toevoegen met behulp van de druppelverdeler (HandyStep). Rechts: Carrier toevoegen met een lepel in een glazen trechter.

2.4.2 Selectie van zaadencrusteringen zonder rhamnolipiden o.b.v. kwaliteitsparameters

Op basis van enkele kwaliteitsparameters werden de beste zaadencrusteringen geselecteerd om deze verder te optimaliseren. Zo werd de bedekkingsgraad en de stevigheid van de eerste 67 zaadencrusteringen bepaald om de twintig beste zaadencrusteringen voor te selecteren. Deze zaadencrusteringen werden vervolgens opnieuw aangemaakt en op basis van het opbouwrendement, een wrijvingstest, een *flowability-test* en een kiemtest opnieuw beoordeeld om uiteindelijk de zes beste zaadencrusteringen te selecteren.

2.4.2.1 Voorselectie

De 67 zaadencrusteringen werden visueel geëvalueerd op de bedekkingsgraad van het originele zaadoppervlak met de coating waarbij per coating het oppervlak van de tien zaden onder een binoculaire lens werd gescreend. Telkens werd het percentage bedekking ingeschat. **Figuur 22** geeft een voorbeeld van een zaadencrustering met een goede en slechte bedekkingsgraad.



Figuur 22: Voorbeelden van oppervlakken van zaadencrusteringen. Links: 100% bedekt, rechts: 60% bedekt.

Daarnaast werd ook een wrijvingstest uitgevoerd die de stevigheid van de zaadencrusteren bepaalde. Hierbij werden de zaden 30 minuten op een zeef heen en weer geschud aan 300 rpm (**Figuur 23**). Na het schudden werd de massa van de zaden opnieuw bepaald om het verlies aan coating te bepalen. Aangezien de resultaten van de bepaling van de zaadbedekking en de wrijvingstest louter als een eerste, snelle voorselectiemethode dienden en de zaadbedekking subjectief werd bepaald, werd geen statistische dataverwerking uitgevoerd.



Figuur 23: Opstelling van de wrijvingstest. De zaden werden in een zeef op een schudder geplaatst gedurende 30 minuten aan 300 rpm. Het verschil in de massa voor en na het schudden wees uit hoeveel coating verloren ging tijdens dit proces.

2.4.2.2 Tweede selectie

De twintig meest succesvolle zaadencrusteren werden opnieuw aangemaakt om deze een tweede keer te testen op (dezelfde en) andere kwaliteitsparameters. Er werd opnieuw een wrijvingstest uitgevoerd, deze keer met drie herhalingen. Daarnaast werd ook het opbouwrendement bepaald m.b.v. de massa van de toegevoegde carriers en stickers alsook de massa van de zaadencrusteren net na het encrusteren en de dag erna. **Vergelijking 2** geeft weer hoe het opbouwrendement werd bepaald. De noemer geeft weer hoeveel coating in de vorm van sticker en carrier aan de zaden werd toegevoegd terwijl de teller de hoeveelheid coating weergeeft die effectief op de zaden is achtergebleven. De data van het opbouwrendement werden door een gebrek aan herhalingen niet statistisch verwerkt.

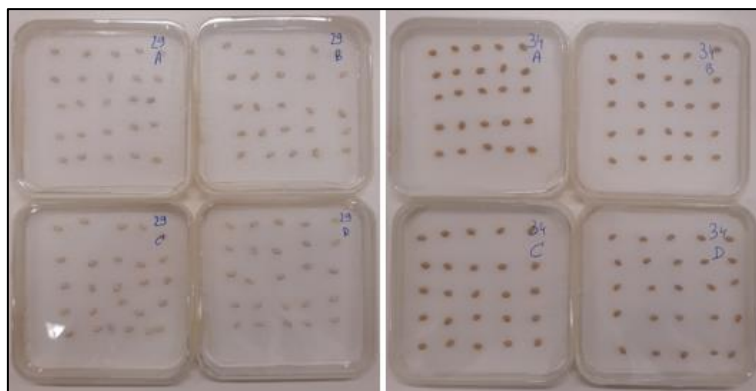
$$\text{Opbouwrendement (\%)} = \frac{m_{\text{droge gecoate zaden (g)}} - m_{\text{ongecoate zaden (g)}}}{(m_{\text{sticker (g)}} - m_{\text{verdampt water tijdens drogen (g)}}) + m_{\text{filler (g)}}} * 100 \quad (\text{Vergelijking 2})$$

De *flowability*-test of de bepaling van de doorloopsnelheid werd uitgevoerd als middel om de gladheid van het oppervlak van de zaadencrusteren te kwantificeren. Hoe hoger de *flowability*, hoe gladder het oppervlak en hoe minder wrijving er tussen de zaden zal optreden. **Figuur 24** toont de opstelling die bestaat uit een inox trechter met aan de onderkant een automatische timer (met sensor) die de tijd meet die de zaden nodig hebben om de uitgang van de trechter te passeren. Deze test werd vijf keer herhaald. Uit de data kon de doorloopsnelheid (gram zaden per seconde) worden bepaald waarbij de massa van de zaadencrusteren werd gedeeld door de gemeten doorlooptijd. Hoe korter de doorloopsnelheid, hoe sneller de zaden zich onderling bewegen en bijgevolg hoe lager de oppervlakteruwheid.



Figuur 24: Opstelling van de flowability-test. De zaden werden in een trechter gegoten en vloeiden daarna langs een sensor die mat hoelang het duurt vooraleer alle zaden de sensor waren gepasseerd.

Het kiemingspercentage van de zaadencrustering werd bepaald waarbij per geteste encrustering vier herhalingen werden uitgevoerd: 25 zaadjes op een petriplaat met een vochtig filterpapier (**Figuur 25**). De petriplaat werd vervolgens met aluminiumfolie afgedekt en in de incubator geplaatst (28 °C). Op verschillende momenten werden het aantal gekiemde zaadjes geteld om de kiemkracht te bepalen.



Figuur 25: Opstelling van de kiemtest. Per zaadencrustering werden vier herhalingen genomen waarbij een herhaling bestond uit 25 dezelfde zaadencrusteringen die op een vochtig filterpapier in een petriplaat werden geplaatst.

2.4.3 Incorporatie van rhamnolipiden in zaadencrusteringen (CO-39)

2.4.3.1 Omrekening van de benodigde massa aan rhamnolipiden per zaadje

Alvorens de rhamnolipiden aan de encrusteringen toe te voegen, werd de RL-concentratie berekend die nodig was om een ISR-respons in de rijstplant te induceren met als uitgangspunt het resultaat van de plantenproef: 50 μM RL toegevoegd op drie verschillende manieren (**Sectie 3.1**). Aangezien de RL-oplossing bij de *seed dip* niet met de bodem in contact kwam, werd deze stap verwaarloosd. Bij de *soil mix* werd 750 mL van 50 μM RL-oplossing toegevoegd ($3,75 \cdot 10^{-5}$ mol RL of 21,66 mg RL). Bij de *soil drench* werden evenveel rhamnolipiden over de bodem gegoten met dus in totaal 43,32 mg rhamnolipiden (voor 27 rijstplanten per behandeling). Elke rijstplant kwam dus met 1,604 mg rhamnolipiden in contact. Bijkomend werd er verondersteld dat 70 % van de toegevoegde rhamnolipiden met het zaadje in contact kwam, wat neerkomt op 1,115 mg RL per zaadje.

Uit de extractieproef werd geïndiceerd dat de rhamnolipiden zich mogelijk snel vasthechten aan de bodemdeeltjes en/of dat ze snel door de aanwezige MO's inactief worden gemaakt (**Sectie 3.3**). Met deze extra informatie werd de oorspronkelijke berekening van het aantal rhamnolipiden rond de zaden aangepast (zie **Bijlage 5**). In plaats van 1,115 mg RL per zaadje wordt nu 0,044 mg RL rond het zaadje gebracht.

2.4.3.2 Formulering van rhamnolipiden

Er zijn drie potentiële methoden om rhamnolipiden in een zaadencrusterings te verwerken: via de carrier, de sticker of een combinatie van carrier en sticker (slurry). Voor de verwerking in het carriermateriaal werd de correcte hoeveelheid rhamnolipiden in voldoende water opgelost en vervolgens aan bentoniet (carrier) toegevoegd. Dit mengsel werd verder 24 uren in de droogoven geplaatst (100 °C) en vervolgens drie uren met de bowl mill (Anton Paar, 80 Hz) geschud. Daarna werd het mengsel samen met 1% methocel (sticker) op de zaden gecoat. Voor de verwerking van de rhamnolipiden in een slurry werden deze gemengd met een mix van bentoniet en talk (50:50 V%) met 4,25 mL CMC (2 %) en evenveel water. Dit mengsel werd gecentrifugeerd (5 min, 300 rpm) en daarna gecoat. Voor de verwerking van de rhamnolipiden in de sticker werden de rhamnolipiden met de (poedervormige) sticker Mowiol 10 % gemengd en met de correcte hoeveelheid water verdund. Er werd hierbij goed gelet op eventuele viscositeitsveranderingen.

2.4.3.3 Zaadencrusterings met verschillende rhamnolipidenconcentraties

De verschillende zaadencrusterings die met rhamnolipiden werden geïncorporeerd, worden in **Tabel 6** weergegeven, waarbij de massa van de toegevoegde rhamnolipiden in mg RL per zaadje wordt uitgedrukt. Meer informatie over elke zaadencrusterings (massa's van grondlaag, tussenlaag, toplaag, ongecoate zaden, net gecoate zaden en droge gecoate zaden) kan worden gevonden in **Bijlage 9**. De rhamnolipiden werden telkens in een oplossing van 5% of 10 % Mowiol en water geformuleerd die als sticker werd toegevoegd, afgewisseld met een mengsel van bentoniet en talk als carrier. Voor de eenvoud worden de zaadencrusterings met 1,115 mg RL per zaadje weergegeven als 100 % RL; hogere concentraties werden in deze thesis niet getest. Het RL-aandeel in alle andere zaadencrusterings wordt steeds relatief uitgedrukt t.o.v. die 100% RL.

Tabel 6: Zaadencrusterings met het aantal toegevoegde rhamnolipiden, uitgedrukt in mg rhamnolipiden per zaadje. Voor alle zaadencrusterings werd steeds een mengsel van bentoniet en talk als carrier gebruikt (50:50 V%). De verhouding grondlaag:tussenlaag:toplaag is steeds 2:7:2.

Zaadencrusterings	Massa RL per zaadje (mg)	Relatief aandeel RL t.o.v. zaadencrusterings A (%)
A(100% RL, 10% Mow)	1,115	100
B(100% RL, 5% Mow)	1,115	100
C(75% RL, 5% Mow)	0,836	75
D(50% RL, 5% Mow)	0,558	50
E(30% RL, 5% Mow)	0,335	30
F(20% RL, 5% Mow)	0,223	20
G(10% RL, 5% Mow)	0,112	10
H(4% RL, 5% Mow)	0,044	4

2.4.4 Kwaliteitstesten op de zaadencrusterings met rhamnolipiden (CO-39)

Om de werkzaamheid van de rhamnolipiden in de zaadencrusterings te garanderen werden de zaadencrusterings aan verschillende kwaliteitscriteria onderworpen (zonder bodemsubstraat). Zo werd de kiemkracht bepaald door op verschillende dagen het aantal gekiemde zaden te tellen (vier herhalingen). Daarnaast werd een fytotoxiciteitstest uitgevoerd waarbij de scheut- en wortellengte van alle zaailingen werden opgemeten. Verder werden ook het coatingsverlies door wrijving en de doorloopsnelheid bepaald. Alle testen werden reeds beschreven in **Sectie 2.2** en **Sectie 2.4.2**. Ten slotte werd de desintegratietijd in water bepaald door de encrusterings onder te dompelen in een klein volume water. Hierbij werd de tijd gemeten die nodig was voor de encrustering om volledig van de zaden los te komen.

2.4.5 Bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden in de zaadencrusterings (CO-39)

2.4.5.1 *In planta* inoculatieproeven

Om te testen of de rhamnolipiden in de zaadencrusterings een ISR-respons in de plant opwekken, werden twee plantenproeven opgestart. In plantenproef 1 werd zaadencrustering A(100% RL, 10% Mow) vergeleken met dezelfde zaadencrustering zonder rhamnolipiden. De andere behandelingen worden in **Tabel 7** weergegeven. Er werd een chemische, positieve controle genaamd S-methyl 1,2,3-benzothiadiazool-7-carbothioaat (BTH) meegenomen waarvan reeds werd aangetoond dat het resistentie tegen *P. oryzae* in rijstplanten kon induceren (Omoboye et al., 2019). BTH werd op twee verschillende manieren aan de planten toegevoegd: via een *soil mix* (60 µM, tijdens het planten) en via een *soil drench* (60 µM, net voor de inoculatie). In plantenproef 2 werden de andere, later gecoat zaadencrusterings getest. **Tabel 8** geeft de behandelingen bij deze plantenproef weer. De voorbereiding van het substraat, het opgroeien van de planten (28 °C), de inoculatie met *P. oryzae* en de evaluatie van de symptomen gebeurden bij beide plantenproeven op dezelfde manier als de plantenproef beschreven in **Sectie 2.1**.

Tabel 7: Uitgevoerde behandelingen in plantenproef 1 waarbij twee zaadencrusterings A (100% RL, 10% Mowiol als sticker) werden getest en vergeleken met dezelfde zaadencrustering zonder rhamnolipiden. Daarnaast werd ook een zieke controle (inoculatie met P. oryzae), gezonde controle (geen inoculatie met P. oryzae) en een chemische controle (BTH) meegenomen.

Nr.	Behandeling	RL-concentratie (%)	Inoculatie met <i>P. oryzae</i>
1	Zieke controle	0	Ja
2	Gezonde controle	0	Nee
3	Chemische controle: BTH (60 µM)	0	Ja
4	Zaadencrustering A(100% RL, 10% Mow)	100	Ja
5	Gezonde controle behandeling 4	100	Nee
6	Zaadencrustering zonder rhamnolipiden, 10 % Mowiol	0	Ja
7	Gezonde controle behandeling 6	0	Nee

Tabel 8: Uitgevoerde behandelingen in plantenproef 2 waarbij twee zaadencrusterings zonder rhamnolipiden werden getest (met 5% Mowiol en 10% Mowiol als sticker) en twee zaadencrusterings met rhamnolipiden (D(75%) en C(50%)). Daarnaast werd ook een zieke controle (inoculatie met *P. oryzae*), gezonde controle (geen inoculatie met *P. oryzae*) en een chemische controle (BTH) meegenomen.

Nr.	Behandeling	Concentratie Mowiol (sticker, %)	RL-concentratie (%)	Inoculatie met <i>P. oryzae</i>
1	Zieke controle	/	0	Ja
2	Gezonde controle	/	0	Nee
3	Chemische controle: BTH	/	0	Ja
4	Zaadencrusterings zonder RL	5	0	Ja
5	Zaadencrusterings zonder RL	10	0	Ja
6	Zaadencrusterings D(50% RL, 5% Mow)	5	50	Ja
7	Zaadencrusterings C(75% RL, 5% Mow)	5	75	Ja

2.4.5.2 Opkomst, massa, scheutlengte en wortellengte

In beide plantenproeven werden op verschillende tijdstippen de massa, scheutlengte en wortellengte van de ontwikkelende planten opgemeten. Hiervoor werden de wortels met water gespoeld en met papier gedroogd om overtollige bodemdelen te verwijderen. Vervolgens werd de massa bepaald en werden de scheut- en wortellengte via de software ImageJ 1.52v gemeten. Merk op dat de factor "bodem" is inbegrepen, wat niet het geval was bij de fytotoxiciteitstesten, waarbij ook de scheut- en wortellengte met behulp van de testkit kon worden bepaald, beschreven in **Sectie 2.2** en **Sectie 2.4.4**.

2.4.6 Aanwezigheid van MO's in de zaadencrusterings met rhamnolipiden

Om de steriliteit van de zaadencrusterings te testen, werden zaadencrusterings A(100% RL, 10% Mow) en dezelfde zaadencrusterings zonder rhamnolipiden op PDA-medium (*potato dextrose agar*) uitgeplaat. Hiervoor werd 1 g gecoat zaden samen met 10 mL zoutoplossing (0,85 % NaCl) vijftien minuten geschud (70 rpm) tot de encrusterings volledig van de zaden loskwam. Vervolgens werd het volledige mengsel in een mortier gecrusht waarna 1 mL van de oplossing werd afgepipetteerd. Hiervan werden vijf verdunningen gemaakt waarbij telkens 100 µL van de vorige verdunning met 900 µL steriel water werd aangelengd. Per verdunning werd 100 µL uitgeplaat waarna deze in de incubator (28 °C) werd gezet. Daarnaast werd een mengsel van natuurlijke mono- en dirhamnolipiden uitgeplaat. Hiervoor werd 14,4 mg rhamnolipiden opgelost in 1 ml water van waaruit acht verdunningen werden gemaakt en uitgeplaat. Uit de resultaten bleek dat zowel de zaadencrusterings met 100% RL en de zuivere natuurlijke rhamnolipiden schimmelcontaminatie vertoonden. Hierdoor werden bijkomend twee geformuleerde fungiciden getest, namelijk: Infinito (62,5 g/L Fluopicolide) en Difend Extra (25 g/L difenoconazole en 25 g/L fludioxonil). Deze fungiciden werden in verschillende concentraties aan de zaadencrusterings A(100% RL, 10% Mow) en dezelfde zaadencrusterings zonder rhamnolipiden toegevoegd op een petriplaat met daarop een vochtig filterpapier (**Figuur 26**). Hiervan werd de schimmelcontaminatie (= aantal beschimmelde zaden) bepaald alsook de effectiviteit van de fungiciden door op het einde van de proef het aantal kiemvrije zaden te delen door de totale hoeveelheid geteste zaden.



Figuur 26: Opstelling van de proef waarbij fungiciden aan de zaadencrusterings zonder en met rhamnolipiden (100% RL) werden toegevoegd. Links: Toepassing van Difend Extra (25 g/L difenoconazole en 25 g/L fludioxonil), Rechts: Toepassing van Infinito (62,5 g/L Fluopicolide). Er werden drie controles meegenomen waarbij water in plaats van fungiciden werd toegevoegd aan ongecoate zaden en zaadencrusterings (0% RL, 10% Mow) en A(100% RL). Per concentratie fungicide werden twee herhalingen meegenomen.

2.5 Statistische dataverwerking

Bij de meeste uitgevoerde proeven werden de resultaten achteraf statistisch verwerkt en gevisualiseerd a.d.h.v. grafieken (boxplots, lijngrafieken, barplots...). Zo werden de verschillende behandelingen van onder andere de plantenproeven, kiemtesten en fytotoxiciteitstesten met elkaar vergeleken. Hiervoor werd van het statistische programma R (1.3.1093) gebruikt gemaakt. Voor deze vergelijkingen werd er steeds van een nulhypothese uitgegaan waarbij geen verschillen tussen de verschillende behandelingen voorkwamen. Voordat werd getest of deze nulhypothese al dan niet kon worden verworpen, werden drie assumpties nagegaan namelijk: normaliteit, homoscedasticiteit en de eventuele aanwezigheid van extreme waarden. De normaliteit werd aan de hand van de Shapiro-Wilk test (Royston, 1982) nagegaan; de homoscedasticiteit met de Levene's test.

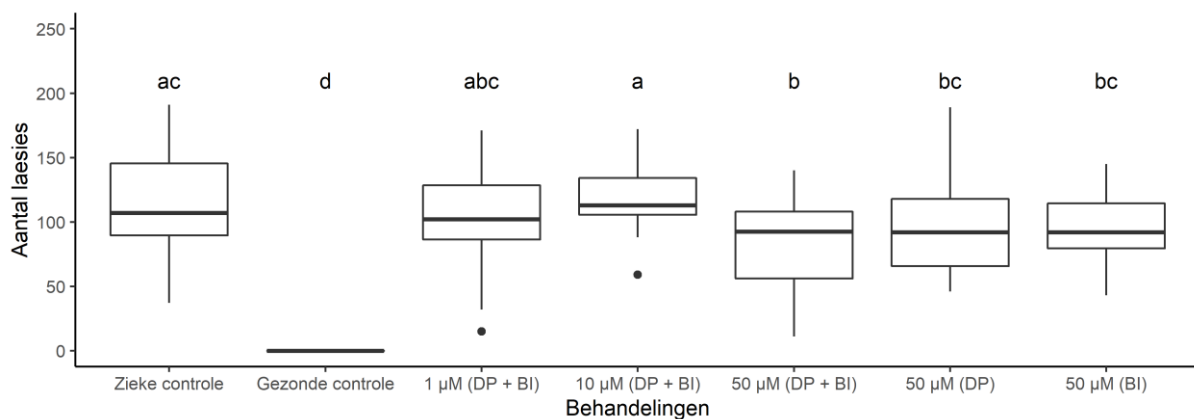
Indien normaliteit en homoscedasticiteit werden verondersteld en de dataset geen extreme waarden bevatte, werd de nulhypothese a.d.h.v. een one-way Anova (Keifer et al., 1992) bij een 5 % significantieniveau getest. Als post-hoc test werd de Tukey's Range Test (Ibrahim et al., 2009) gebruikt waarbij de significantie tussen twee behandelingen werd bepaald. Significantie tussen verschillende behandelingen werd aan de hand van significantieletters weergegeven waarbij behandelingen die dezelfde significantieletter kregen toegewezen geen significante verschillen t.o.v. elkaar vertoonden.

Indien de data niet normaal waren verdeeld, werd de one-way ANOVA vervangen door de niet-parametrische Kruskal-Wallis Rank Sum test (Hollander et al., n.d.). Een significante Kruskal-Wallis test gaf aan dat ten minste één behandeling significant verschilde t.o.v. de andere behandelingen. Echter werd met deze test niet vermeld welke behandeling(en) significant verschilde(n) met de andere behandelingen. Daarvoor werd een post-hoc Pairwise Wilcoxon Rank Sum Test uitgevoerd waarbij de p-waarde tussen alle mogelijke behandelingen werd bepaald. Indien de p-waarde tussen twee behandelingen kleiner dan 0,05 was, betekende dit dat deze twee behandelingen significant van elkaar verschilden. Opnieuw kregen niet-significante behandelingen dezelfde significantieletter toegewezen.

3 Resultaten

3.1 In planta bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden

In dit experiment werd getest welke RL-concentraties geschikt waren om ISR in de rijstplant tegen *P. oryzae* op te wekken a.d.h.v. het aantal sporulerende laesies die op de bladeren te zien waren. Daarnaast werd het verschil in activiteit nagegaan wanneer de rhamnolipiden werden toegepast enkel tijdens het planten (DP) of enkel voor de inoculatie (BI). **Bijlage 10** vat per behandeling het aantal geëvalueerde planten samen en geeft ook enkele statistische gegevens over de sporulerende laesies weer (minimum, mediaan, gemiddelde, maximum en standaardafwijking). Het resultaat van de plantenproef wordt in **Figuur 27** weergegeven. **Bijlage 11** toont het aantal sporulerende laesies per herhaling binnen de verschillende behandelingen. Ten opzichte van de zieke controle was er enkel een significant verschil met de behandeling met 50 μM RL-oplossing (DP + BI) waarbij de zieke controleplanten significant meer sporulerende laesies vertoonden. De andere behandelingen toonden een gelijkaardig verloop als de zieke controle. Wanneer 50 μM RL (DP + BI) werd toegepast, werden significant minder sporulerende laesies gevormd vergeleken met 10 μM RL (DP + BI). Ten slotte werden geen significante verschillen gevonden tussen 50 μM RL (DP) en 50 μM RL (BI).

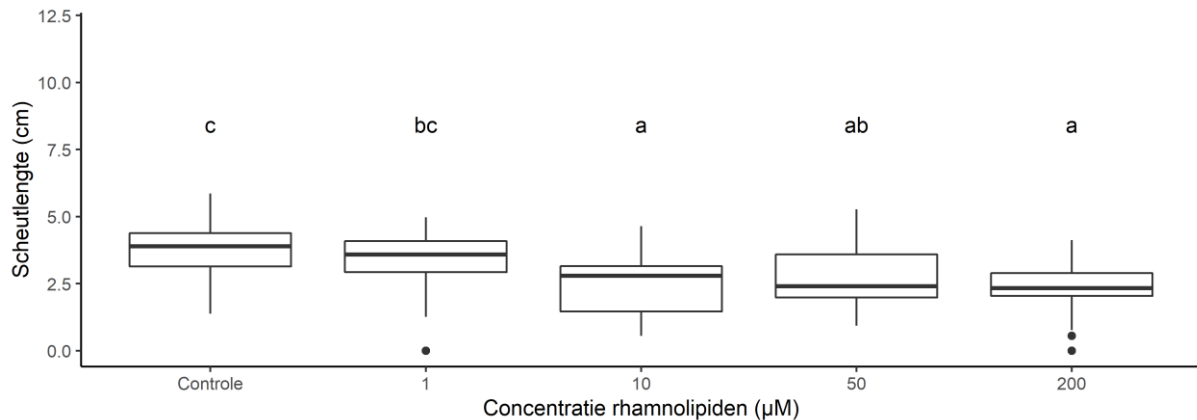


*Figuur 27: Resultaat van de in planta bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden tegen *P. oryzae* op rijst. Verschillende rhamnolipidenconcentraties en toepassingswijzen werden uitgetest. Deze figuur geeft het aantal gevormde sporulerende laesies weer per behandeling. DP = during planting, waarbij de rhamnolipiden werden toegevoegd via een seed dip en een soil mix tijdens het planten. BI = before inoculation, waarbij de rhamnolipiden werden toegevoegd via een soil drench net voor de inoculatie. De letters boven elke boxplot geven weer welke behandelingen significant met elkaar verschillen (Anova gevolgd door Kruskal Wallis post-hoc test, $n = 7$, $\alpha = 0.05$). Per behandeling werden 26 planten getest. De boxplots tonen de mediaan (horizontale lijnen), 25% en 75% percentiel (boxen) en eventuele uitschieters (punten).*

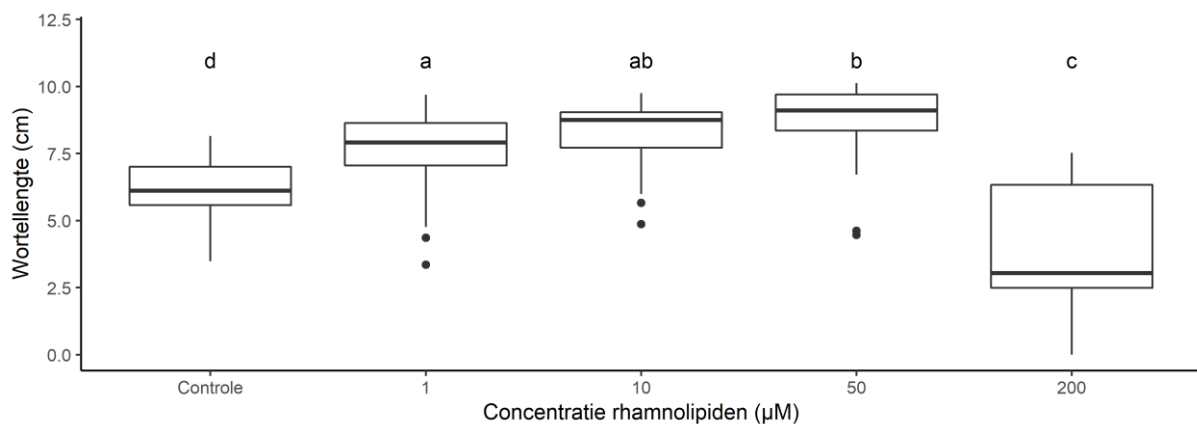
3.2 In vitro bepaling van het effect van rhamnolipiden op de fytotoxiciteit van rijstzaden

Om het effect van RL-concentraties op de scheut- en wortelontwikkeling van de naakte rijstzaden te bepalen, werd een fytotoxiciteitstest opgesteld waarbij de scheut- en wortellengte na toepassing van verschillende RL-concentraties werden opgemeten. **Bijlage 12** en **Bijlage 13** geven de absolute resultaten weer van respectievelijk de scheut- en wortellengte op alle meetmomenten. **Figuur 28** en **Figuur 29** tonen respectievelijk de scheut- en wortellengte vijf dagen na kieming. Hierop is te zien dat de gemiddelde scheutlengte bij de planten behandeld met 1 μM RL significant hoger lag dan de planten

behandeld met 10 μM , 50 μM en 200 μM RL, namelijk 3,37 cm in vergelijking met respectievelijk 2,53 cm, 2,75 cm en 2,33 cm. De gemiddelde scheutlengte bij de 1 μM RL-behandeling was niet significant lager dan deze van de controleplanten (3,79 cm). Wanneer naar de wortels werd gekeken, vertoonden de planten behandeld met 1 μM , 10 μM en 50 μM RL na vijf dagen gemiddeld langere wortels in vergelijking met de controleplanten: respectievelijk gemiddeld 18,26 %, 30,37 % en 40,23 % langer dan de controle. De planten behandeld met 200 μM RL hadden een significant kleinere wortellengte ten opzichte van de controleplanten.



Figuur 28: Effect van verschillende rhamnolipidenconcentraties op de scheutlengte van rijst na vijf dagen via een fytotoxiciteitstest. Boven elke boxplot geven significantieletters meer duidelijkheid over de relatie tussen de verschillende behandelingen (Anova gevolgd door een Tukey post-hoc test, $n = 5$, $\alpha = 0.05$). Per behandeling werden 30 zaden getest. De boxplots tonen de mediaan (horizontale lijnen), 25% en 75% percentiel (boxen) en eventuele uitschieters (punten).

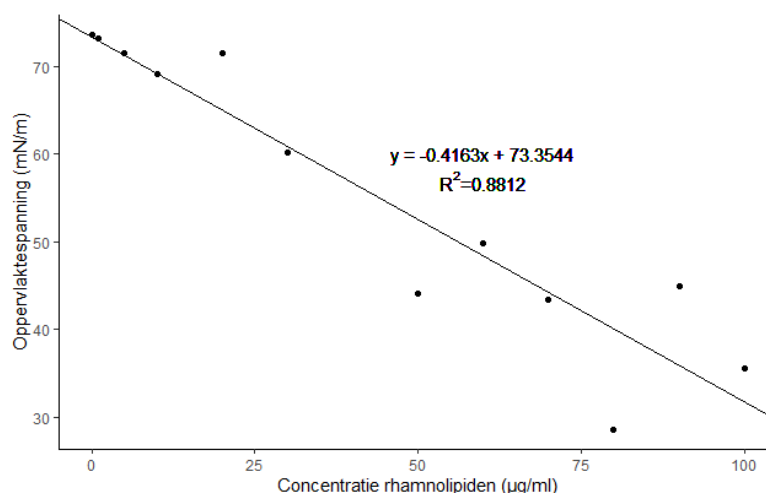


Figuur 29: Effect van verschillende rhamnolipidenconcentraties op de wortellengte van rijst na vijf dagen via een fytotoxiciteitstest. Boven elke boxplot geven significantieletters meer duidelijkheid over de relatie tussen de verschillende behandelingen (Anova gevolgd door een Kruskal Wallis test, $n = 5$, $\alpha = 0.05$). Per behandeling werden 30 zaden getest. De boxplots tonen de mediaan (horizontale lijnen), 25% en 75% percentiel en eventuele uitschieters (punten).

3.3 Extractie van rhamnolipiden uit bodem

3.3.1 Bepaling van de oppervlaktespanning via Wilhelmy plaatmethode

Om de rhamnolipidenconcentratie in de bodem te bepalen werd eerst getest of de Wilhelmy plaatmethode een geschikte methode zou kunnen zijn om aan de hand van de oppervlaktespanning de concentratie rhamnolipiden te achterhalen. Deze methode bleek vrij geschikt te zijn waardoor een standaardvergelijking kon worden opgesteld, weergegeven in **Figuur 30**.



Figuur 30: Relatie tussen de oppervlaktespanning (mN/m) en de concentratie rhamnolipiden in oplossing (µg/mL) bekomen via de Wilhelmy plaatmethode. De standaardcurve werd opgesteld via de lm-functie (lineair model) in R (Keifer et al., 1992).

3.3.2 Extractie van rhamnolipiden uit de bodem

Vervolgens werd er getest of gelijkaardige resultaten werden bekomen wanneer de rhamnolipiden alvorens de meting gedurende een periode in contact met het bodemmateriaal werden gebracht. Echter, uit de resultaten bleek dat wanneer de vloeistof terug van de bodem werd gescheiden, de oppervlaktespanning eerder deze van zuiver water benaderde (72 mN/m). Als mogelijke oplossing werd het extractiewater aangezuurd. Aangezien de literatuur beschrijft dat rhamnolipiden vanaf een pH gelijk aan 4 oplosbaar zijn en dit is optimaal bij een pH tussen 7 en 7,5, werd het HPCL water (pH 8,39) naar enkele waarden binnen deze pH-range aangezuurd. Wateroplossingen met de volgende pH's werden aangemaakt: 4,16; 5,20; 6,34; 7,07 en 7,67. **Tabel 9** geeft de resultaten van dit experiment weer. Uit de resultaten bleek dat het verlagen van de pH niet tot een betere oplosbaarheid van de rhamnolipiden in het HPLC-grade water leidde.

Tabel 9: Bepaling van de oppervlaktespanning via de Wilhelmy plaatmethode na het aanzuren van het HPCL-grade water. Zowel de pH van het aangezuurde water als de pH van het supernatans worden meegegeven, alsook de massa's bodem en de verplaatste vloeistof als gevolg van het inbrengen van het platina plaatje.

RL-conc. (µg/mL)	m bodem (g)	pH aangezuurd HPCL water	pH supernatans	m verplaatste vloeistof (g)	Oppervlakte- spanning (mN/m)
0	2,992	6,34	5,73	0,176	71,940
100	2,998	4,16	5,91	0,145	52,269
100	2,992	5,20	5,68	0,153	62,539
100	2,995	6,34	4,89	0,158	64,583
100	2,992	7,07	5,82	0,172	70,305
100	2,994	7,67	5,68	0,168	68,670

3.4 Zaadencrusterings en incorporatie met rhamnolipiden

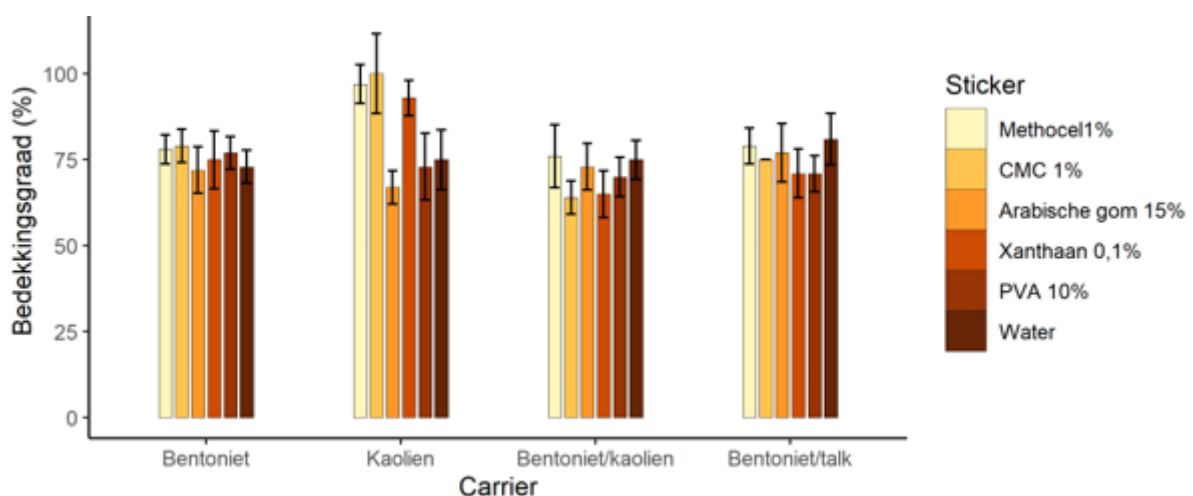
3.4.1 Optimalisatie van de encrusteringsmethode

Om een geschikte zaadencrusterings te vinden en omdat de hoeveelheid CO-39 zaden schaars waren, werden drie zaadsoorten aangekocht, namelijk: *Riz Long Grain*, *Thai Hom Mali Cargo Rice* en *Riz Rond Complet*. De vorm van de zaden werd reeds in **Figuur 19** weergegeven. De vorm van de derde vermelde zaadsoort kwam het meest overeen met deze van de CO-39 rijstvariëteit. Naar deze zaden werd verwezen als de substitutie-zaden. **Bijlage 6** geeft de gemaakte zaadencrusterings weer alsook welke rijstvariëteit werd gebruikt. Tijdens het encrusteringsproces werd op basis van eventuele moeilijkheden en visuele aspecten bepaald welke combinatie sticker en carrier het meest compatibel waren: als carrier kwamen bentoniet, kaolien en talk er als beste uit waarbij methocel 1 %, CMC 1 % en mowiol 10 % de meest compatibele stickers waren.

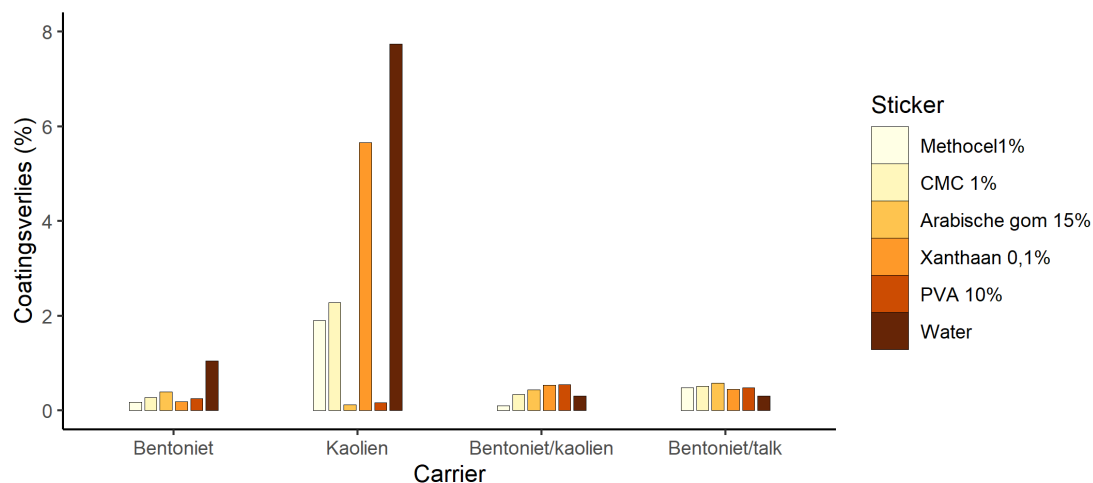
3.4.2 Selectie van zaadencrusterings zonder rhamnolipiden o.b.v. kwaliteitsparameters

3.4.2.1 Voorselectie a.d.h.v. bedekkingsgraad en wrijvingstest

Om een voorselectie van de gemaakte zaadencrusterings te maken, werd de zaadbedekking bepaald alsook een wrijvingstest uitgevoerd. De resultaten van de zaadbedekkingstest worden in **Figuur 31** weergegeven. Deze gaven voor alle geteste encrusterings gelijkaardige resultaten met enkele uitschieters wanneer kaolien als carrier werd gebruikt. In **Bijlage 14** wordt de bedekkingsgraad van de zaadencrusterings rond de andere zaadvorm weergegeven. **Bijlage 15** geeft de absolute waarden voor beide zaadvormen weer. Naast de bepaling van de zaadbedekking werd ook een wrijvingstest (bepaling van het verlies door wrijving) uitgevoerd waarvan de resultaten van de zaadencrusterings rond de substitutie-zaden in **Figuur 32** worden weergegeven. Op deze grafiek is duidelijk te zien dat slechts vier zaadencrusterings met kaolien als carrier een hoog verlies door wrijving vertoonden. **Bijlage 16** toont een dezelfde grafiek maar nu met de zaadencrusterings rond de andere geteste zaadvormen.



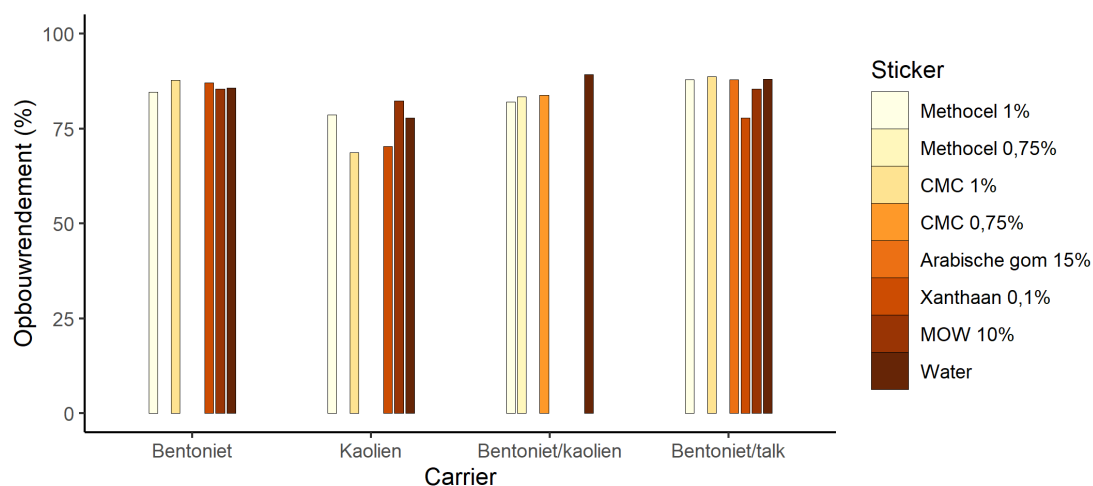
Figuur 31: Resultaat van de bepaling van de zaadbedekking van de zaadencrusterings gecoat rond de substitutie-zaden als voorselectie-criterium. De x-as verdeelt de zaadencrusterings per carrier waarbij een opsplitsing wordt gemaakt tussen de geteste stickers. Hoe hoger de bedekkingsgraad, hoe minder van het oorspronkelijk oppervlak van het naakte zaadje zichtbaar was. De foutenbalken stellen de standaardafwijking voor (tien herhalingen).



Figuur 32: Resultaten van de wrijvingstest met zaadencrusterings rond de substitueezaden als voorselectiecriteria, uitgedrukt in verlies door wrijving (%). Hoe hoger dit verlies, hoe meer van de aangebrachte coating is losgekomen tijdens het schudden. De x-as verdeelt de zaadencrusterings per carrier waarbij een opsplitsing wordt gemaakt tussen de geteste stickers. Deze test werd eenmalig uitgevoerd.

3.4.2.2 Finale selectie van de zaadencrusterings

Op basis van bovenstaande resultaten werden achttien zaadencrusterings geselecteerd die werden gecoat rond de substitueezaden (Bijlage 7). Samen met twee extra zaadencrusterings (0,75 % methocel en 0,75 % CMC als sticker en telkens bentoniet/talk als carrier) werden deze zaadencrusterings opnieuw in een dubbele hoeveelheid aangemaakt. De geschikte encrusterings werden verder volgens relevantie aan de hand van hun opbouwrendement, verlies door wrijving, flowability en kieming geselecteerd. De resultaten van het opbouwrendement staan in Figuur 33 afgebeeld. De hoogste opbouwrendementen (85 % - 90 %) werden bekomen wanneer bentoniet of een mengsel van bentoniet en talk als carrier werd gebruikt. De zaadencrusterings met kaolien als carrier bleken de laagste opbouwrendementen te hebben (tussen 68 % en 82 %).



Figuur 33: Resultaten van het opbouwrendement dat de effectiviteit van de toevoeging van materiaal aan de zaden weergeeft. De x-as verdeelt de zaadencrusterings per carrier waarbij een opsplitsing wordt gemaakt tussen de geteste stickers. De stickers "Methocel 0,75%" en "CMC 0,75%" zijn enkel aanwezig bij de zaadencrusterings met als carrier een mengsel van bentoniet en kaolien.

Vervolgens werd het coatingsverlies door wrijving via een wrijvingstest bepaald. **Figuur 34** toont de resultaten, in vier figuren onderverdeeld per carrier. Binnen de zaadencrusterings met bentoniet was het coatingsverlies bij de sticker methocel 1 % significant hoger dan bij de sticker mowiol 10 %. Binnen de zaadencrusterings met bentoniet/talk als carrier was het coatingsverlies bij de sticker methocel 1 % ook significant hoger dan bij de stickers CMC 1 % en xanthaangom 0,1 %. De zaadencrusterings met kaolien als carrier en xanthaangom 0,1 % als sticker had een significant hoger coatingsverlies dan de zaadencrusterings met dezelfde sticker maar met andere carriers namelijk bentoniet of bentoniet/talk. Ook was er significant meer coatingsverlies bij de zaadencrusterings met CMC 1% en bentoniet/kaolien in vergelijking met de encrusterings met dezelfde sticker, maar met bentoniet/talk als carrier.

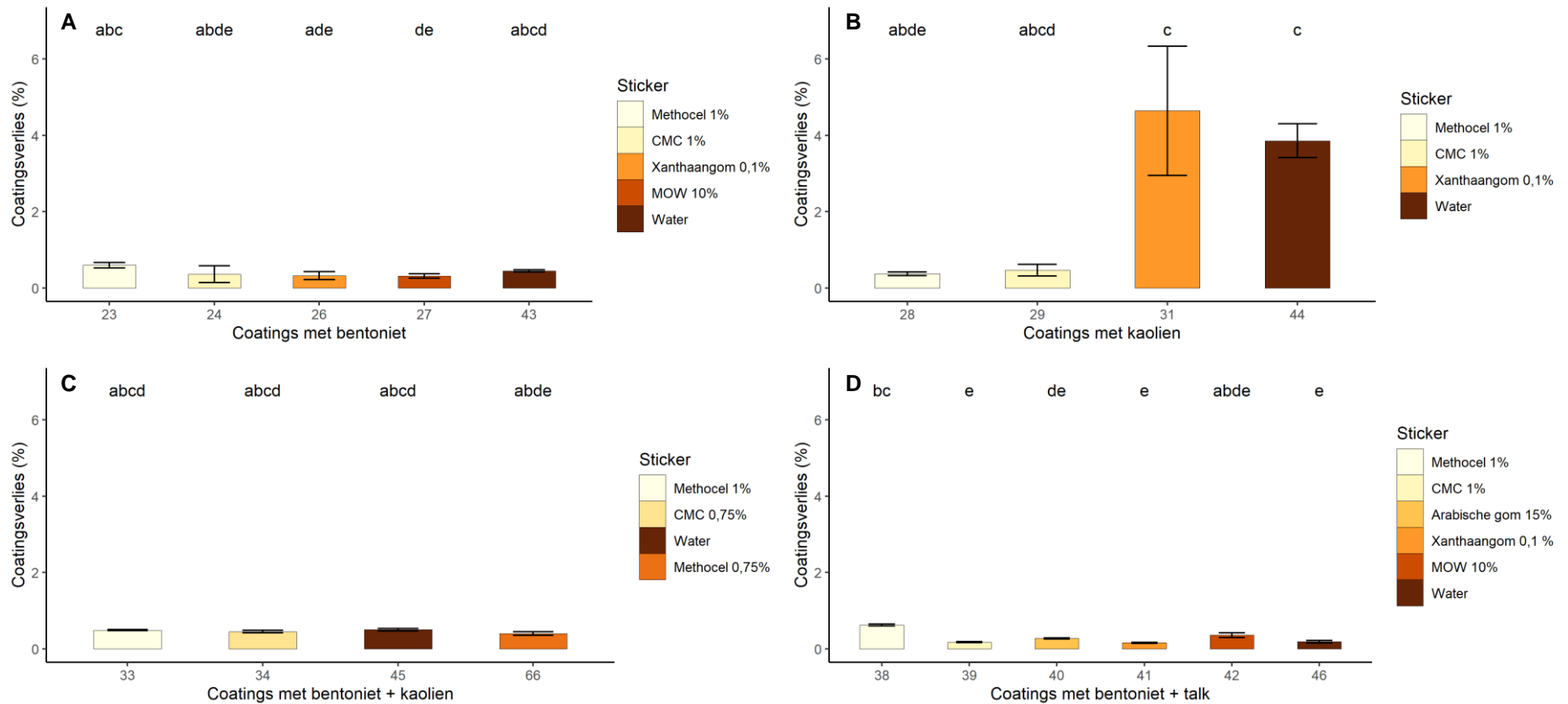
De resultaten van de *flowability*-test, die bepaalde welke zaadencrusterings al dan niet een glad oppervlak hadden, worden in **Figuur 35** weergegeven. De doorloopsnelheid van de controlezaden bedroeg 103,46 g/s. De zaadencrusterings met kaolien als carrier hadden significant de hoogste doorloopsnelheden van 85,43 g/s tot 83,47 g/s. Daarnaast waren de meeste doorloopsnelheden van de zaadencrusterings met bentoniet/talk significant hoger (80,68 g/s – 84,51 g/s) dan deze met bentoniet (73,30 g/s – 77,42 g/s) en bentoniet/kaolien (73,55 g/s – 80,35 g/s).

Tot slot werd de kiemkracht van de zaadencrusterings bepaald. De resultaten van deze test worden in **Figuur 36** weergegeven. Op het einde van deze test waren zo goed als alle geëncrusteerde zaden, samen met de controlezaden, gekiemd. Wanneer bentoniet als carrier werd gebruikt, bleek echter dat de zaadencrusterings in het begin gemiddeld trager kiemden ten opzichte van de controlezaden. Bij de zaadencrusterings met kaolien en bentoniet/kaolien als carrier werd het omgekeerde opgemerkt waarbij in het begin gemiddeld meer zaden kiemden dan de controlezaden. Met bentoniet/talk als carrier waren tijdens het eerste meettijdstip gemiddeld meer zaden gekiemd dan de controlezaden, maar tijdens het tweede tijdstip waren meer controlezaden gekiemd. Bij alle zaadencrusterings werd besloten dat het effect van de sticker binnen eenzelfde carrier kon worden verwaarloosd.

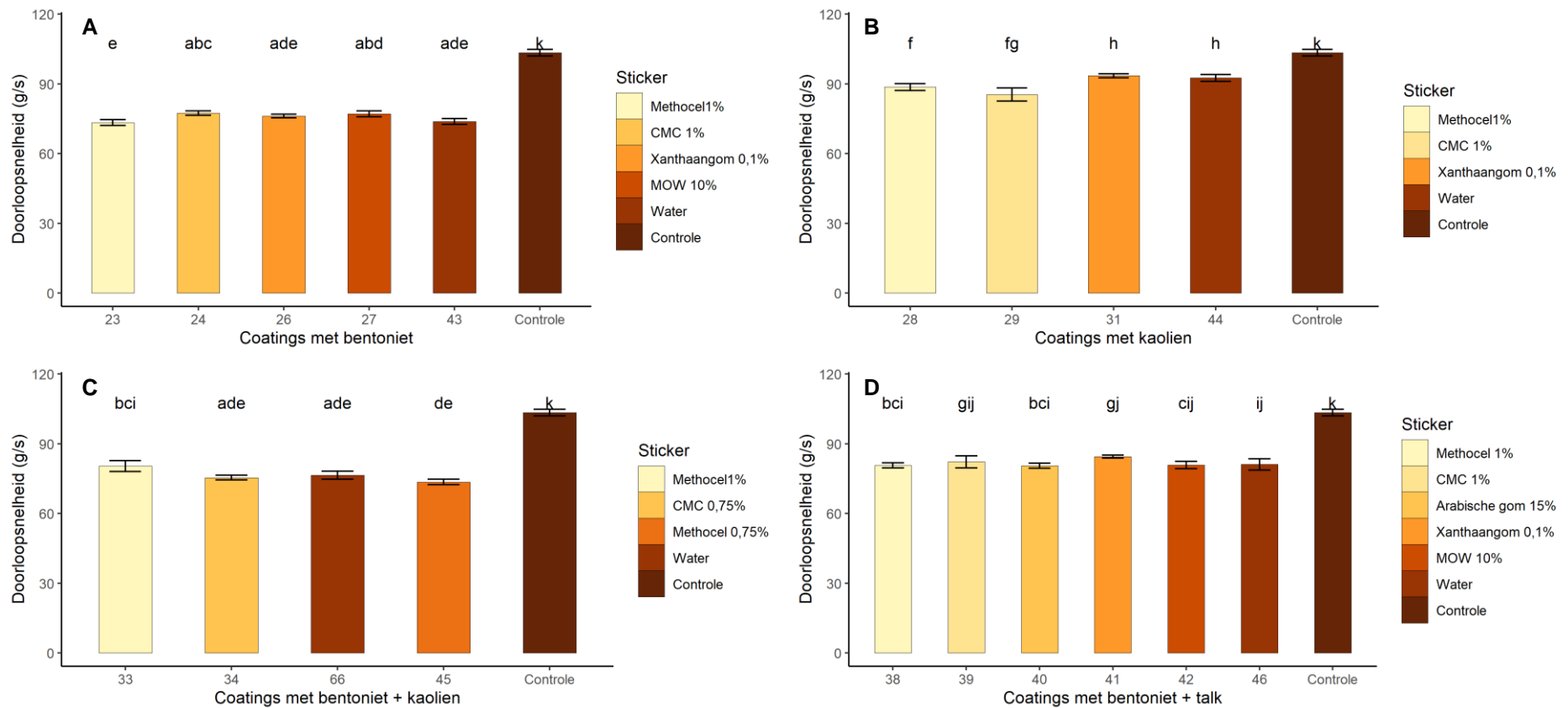
Uit de resultaten van het opbouwrendement, wrijvingstest, *flowability*-test en kiemtest werden de beste zes zaadencrusterings met het oog op de verdere incorporatie van rhamnolipiden geselecteerd. Deze worden in **Tabel 10** weergegeven, samen met de resultaten van de voorgaande testen.

Tabel 10: Top 6 beste zaadencrusterings. De waarden van de selectiecriteria worden meegegeven. De waarde van de controle staat steeds tussen haakjes weergegeven. Bij het bepalen van het opbouwrendement en het coatingsverlies door wrijving zijn drie controles relevant, waarbij telkens water als sticker werd genomen en één van de drie carriers (bentoniet, bentoniet/kaolien en bentoniet/talk) per controle. Voor de controle voor het bepalen van de doorloopsnelheid en de kiemkracht werden steeds naakte CO-39 zaden gebruikt.

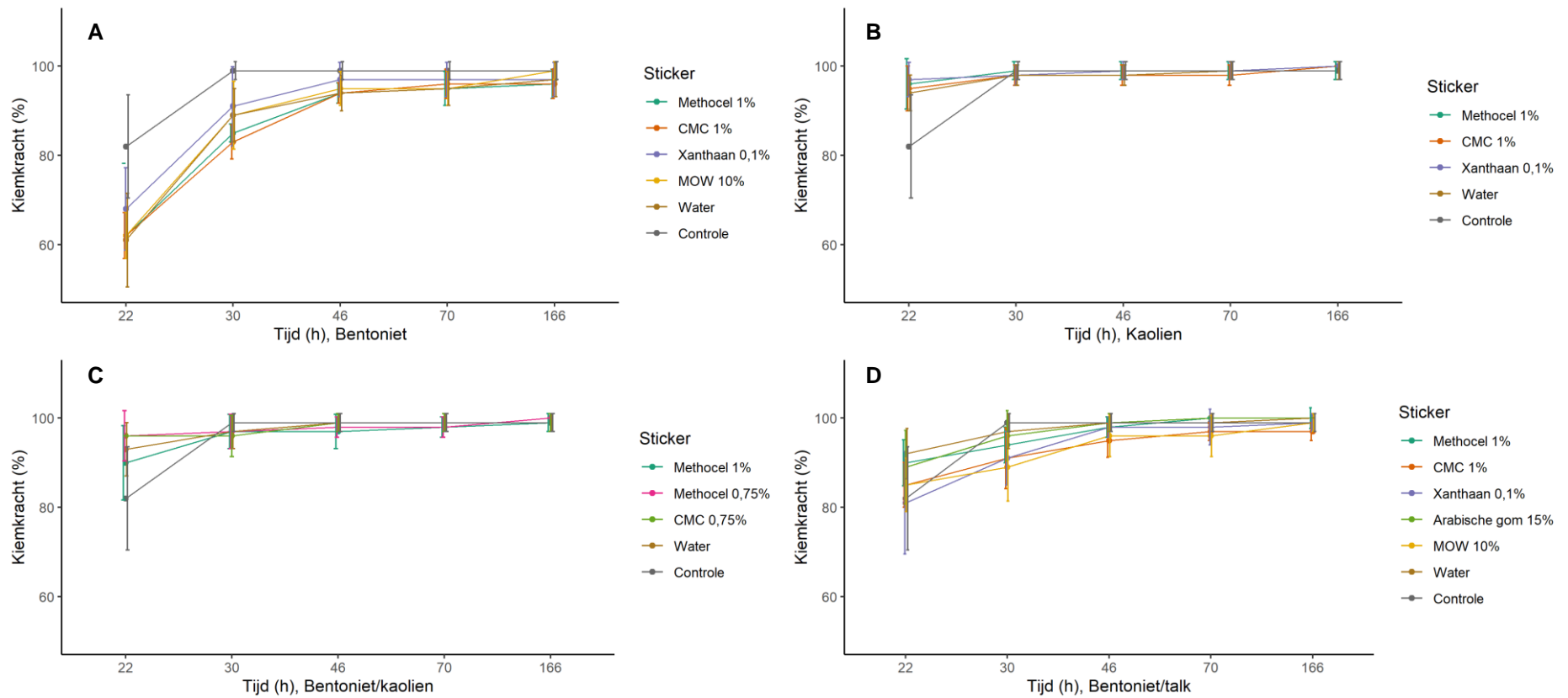
Nr.	Carrier	Sticker	Opbouwrendement (%)	Coatingsverlies (%)	Doorloopsnelheid (g/s)	Kiemkracht (%)
23	Bentoniet	Methocel 1%	84,54 (85,64)	0,60 (0,45)	73,30 (103,46)	96 (99)
26	Bentoniet	Xanthaan 0,1%	87,05 (85,64)	0,32 (0,45)	76,20 (103,46)	97 (99)
27	Bentoniet	Mowiol 10%	85,46 (85,64)	0,31 (0,45)	77,03 (103,46)	99 (99)
33	Bentoniet/kaolien	Methocel 1%	82,08 (89,27)	0,49 (0,50)	80,35 (103,46)	99 (99)
39	Bentoniet/talk	CMC 1%	88,68 (88,04)	0,17 (0,19)	82,19 (103,46)	97 (99)
42	Bentoniet/talk	Mowiol 10%	85,42 (88,04)	0,36 (0,19)	80,87 (103,46)	99 (99)



Figuur 34: Resultaten van de wrijvingstest voor de tweede selectie van de zaadencrusterings, uitgedrukt in verlies door wrijving (%), weergegeven in vier figuren onderverdeeld per carrier. Hoe hoger dit verlies, hoe meer van de aangebrachte coating is losgekomen tijdens het schudden. A: Zaadencrusterings met bentoniet, B: Zaadencrusterings met kaolien, C: Zaadencrusterings met bentoniet/kaolien en D: Zaadencrusterings met bentoniet/talk. De zaadencrusterings met water kunnen worden aanzien als controle. Boven elke barplot geven significantieletters meer duidelijkheid over de relatie tussen de verschillende zaadencrusterings (Anova, gevolgd door een Kruskal Wallis test met als post-hoc de Dunn test, $n = 19$, $\alpha = 0.05$). De foutenbalken stellen de standaardafwijking voor (drie herhalingen).



Figuur 35: Resultaten van de flowability-test voor de tweede selectie van de zaadencrusterings, weergegeven in vier figuren onderverdeeld per carrier. Hoe lager de doorloopsnelheid, hoe hoger de flowability en hoe gladder het oppervlak van de encrusterings. A: Zaadencrusterings met bentoniet, B: Zaadencrusterings met kaolien, C: Zaadencrusterings met bentoniet/kaolien en D: Zaadencrusterings met bentoniet/talk. Er is telkens een controle aanwezig waarbij de flowability van ongecoate zaden werd bepaald. Boven elke barplot geven significantieletters meer duidelijkheid over de relatie tussen de verschillende zaadencrusterings (Anova, gevolgd door een Tukey post-hoc test, $n = 19$, $\alpha = 0.05$). De foutenbalken stellen de standaardafwijking voor (vijf herhalingen).



Figuur 36: Resultaten van de kiemtest voor de tweede selectie van de zaadencrusteringen, weergegeven in vier figuren onderverdeeld per carrier. A: Zaadencrusteringen met bentoniet, B: Zaadencrusteringen met Kaolien, C: Zaadencrusteringen met Bentoniet/kaolien en D: Zaadencrusteringen met Bentoniet/talk. Er is telkens een controle aanwezig waarbij de kiemkracht van ongecoate zaden werd bepaald. De foutenbalken geven de standaardafwijking weer (vier herhalingen met 25 zaden per herhaling).

3.4.2.3 Aangepaste laagverdeling

De zes beste zaadencrusteringsen werden als basis voor de nieuwe zaadencrusteringsen met een andere laagverdeling gebruikt, maar met dezelfde coatingsmaterialen, die meer geschikt was om de rhamnolipiden in te verwerken. Deze nieuwe zaadencrusteringsen worden in **Bijlage 8** weergegeven. Hierbij werd met de dikte van drie verschillende lagen (grondlaag, tussenlaag en toplaag) geëxperimenteerd. Uit de experimenten werd duidelijk dat een grondlaag:tussenlaag:toplaag-verhouding van 2:7:2 de beste combinatie bleek om tot een goede zaadencrusteringsen te komen. Alle zaadencrusteringsen met deze 2:7:2-verhouding werden opnieuw aan de verschillende testen onderworpen (opbouwrendement, het coatingsverlies door wrijving en de doorloopsnelheid) om te bepalen welke zaadencrusteringsen het meest compatibel waren met de rhamnolipiden. **Tabel 11** geeft de resultaten van deze testen weer. Rekening gehouden met bovenvermelde criteria werden de zaadencrusteringsen 88 (sticker: 10% mowiol en carrier: bentoniet/talk) en 89 (sticker: 1 % methocel en carrier: bentoniet/talk) als beste zaadencrusteringsen uitgekozen met het hoogste potentieel om rhamnolipiden in te verwerken.

Tabel 11: Resultaten van de bepaling van het opbouwrendement, de wrijvingstest en de flowability-test op de zaadencrusteringsen met een grondlaag:tussenlaag:toplaag verhouding van 2:7:2. De controle bij de doorloopsnelheid wordt tussen haakjes weergegeven. Voor het bepalen van het opbouwrendement en het verlies door wrijving werd geen (water)controle meegenomen. MOW = Mowiol, MET = Methocel, PVA-L = polyvinylalcohol (Mw = 9000 – 10000), PVA-H = polyvinylalcohol (Mw = 31000 – 50000), PVP = polyvinylpyrrolidone, Bent/talk = bentoniet/talk (1:1 V%). Het nummer van de zaadencrusteringsen komt overeen met het nummer in Bijlage 8.

Zaad- encrusteringsen	Grond- laag	Tussen- laag	Toplaag	Opbouw- rendement (%)	Verlies door wrijving (%)	Doorloop- snelheid (g/s)
84	Bentoniet MOW 10	Bentoniet MOW 10	Talk MOW 10	83,26	1,37	95,71 (107,08)
85	Bentoniet MET 1	Bentoniet MET 1	Talk MET 1	82,18	2,44	94,56 (107,08)
86	Bentoniet MET 1	Bent/talk ^a MET 1	Talk MOW 10	81,79	2,69	89,85 (107,08)
87	Bentoniet MOW 10	Bent/talk ^a MOW 10	Talk MOW 10	80,64	2,20	91,58 (107,08)
88	Bent/talk MOW 10	Bent/talk MOW 10	Talk MOW 10	80,62	1,89	105,02 (107,08)
89	Bent/talk MET 1	Bent/talk MET 1	Talk MET 1	80,27	2,26	98,90 (107,08)
92	Bent/talk PVA-L 20	Bent/talk PVA-L 20	Talk PVA-L 20	78,80	0,24	88,78 (107,08)
93	Bent/talk PVA-H 10	Bent/talk PVA-H 10	Talk PVA-H 10	73,40	1,21	94,30 (107,08)
94	Bent/talk PVP 5	Bent/talk PVP 5	Talk PVP 5	72,41	2,05	91,30 (107,08)
95	Bent/talk MOW 5	Bent/talk MOW 5	Talk MOW 5	66,00	2,11	87,86 (107,08)

^aBent/talk (2:1 V%)

3.4.3 Incorporatie van rhamnolipiden in zaadencrusteringen (CO-39)

3.4.3.1 Formuleringswijze van rhamnolipiden

Om de rhamnolipiden in de zaadencrusteringen te incorporeren, werden drie testen uitgevoerd waarin de rhamnolipiden werden verwerkt in de carrier, sticker of slurry. De resultaten van deze testen staan in **Figuur 37** afgebeeld. Wanneer de carrier of slurry als medium van de rhamnolipiden werd gebruikt, dan bleek dat het opbouwrendement niet aanvaardbaar was en dat de coatingsmethode niet compatibel was met het gebruikte coatingstoestel (*rotary coater*). Echter, wanneer de rhamnolipiden werden toegevoegd aan de sticker, werd aan alle kwaliteitscriteria voldaan.



Figuur 37: Resultaat van verkenningstestjes waarbij rhamnolipiden op verschillende manieren in de zaadencrustering werden gebracht. A: rhamnolipiden in carrier, B: rhamnolipiden in slurry en C: rhamnolipiden in sticker. A en B geven een zeer slecht opbouwrendement waardoor de coating niet consistent aanwezig is op de zaden. C voldoet aan alle kwaliteitscriteria.

3.4.3.2 Zaadencrusteringen met verschillende rhamnolipidenconcentraties

Zaadencrusteringen 88 (sticker: 10% mowiol en carrier: bentoniet/talk) en 89 (sticker: 1% Methocel en carrier: bentoniet/talk) werden in de volgende stap geïncorporeerd met rhamnolipiden. Merk op dat tot nu toe nog geen CO-39 rijstzaden werden gebruikt, maar enkel de substitutie-zaden. Beide zaadencrusteringen toonden een succesvolle incorporatie van de rhamnolipiden. Zaadencrustering 88 gaf echter het beste resultaat aangezien het oppervlak van zaadencrustering 89 enkele barsten vertoonde. De encrusteringen van de CO-39 rijstzaden bestonden uit Mowiol 10 % (sticker) en een mengsel van bentoniet en talk (carrier), en staan in **Tabel 12** weergegeven. Deze tabel geeft ook de zaadencrusteringen met andere rhamnolipidenconcentraties weer. Verder worden ook twee controlezaden zonder rhamnolipiden meegegeven en waarbij enkel het percentage sticker (Mowiol) verschilt. Meer informatie over elke zaadencrustering (massa's van grondlaag, tussenlaag, toplaag, ongecoate zaden, net gecoate zaden en droge gecoate zaden) kan in **Bijlage 9** worden gevonden.

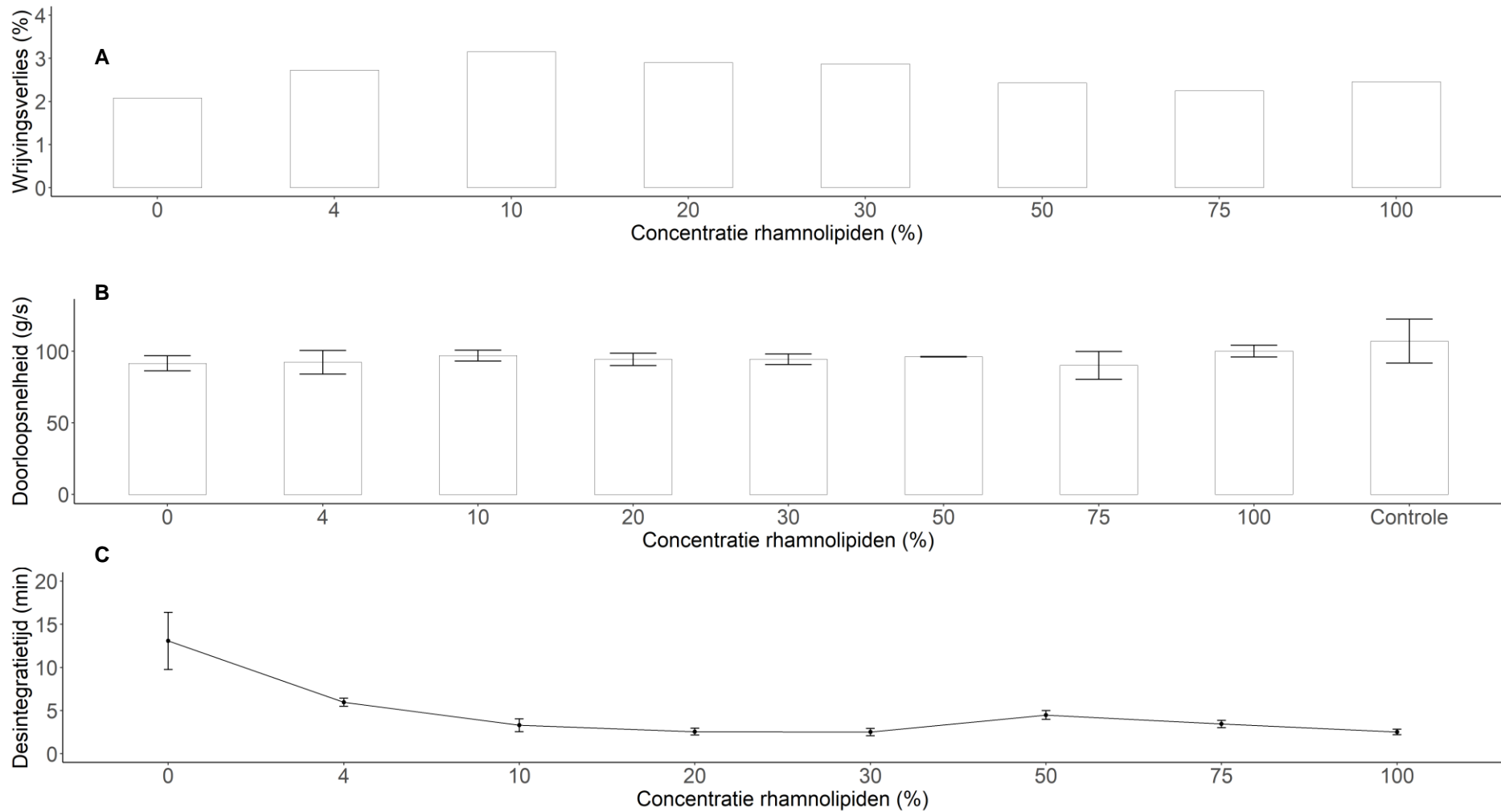
Tabel 12: Zaadencrusterings met het aantal toegevoegde rhamnolipiden, uitgedrukt in mg rhamnolipiden per zaadje. Voor alle zaadencrusterings werd steeds een mengsel van bentoniet en talk als carrier gebruikt (50:50 V%). De verhouding grondlaag:tussenlaag:toplaag is steeds 2:7:2. Zaadencrusterings I en J bevatten geen rhamnolipiden en worden beschouwd als controlezaden.

Zaadencrusterings	Concentratie Mowiol (sticker, %)	Massa RL per zaadje (mg)	Relatief aandeel RL t.o.v. zaadencrusterings A (%)
A(100% RL, 10% Mow)	10	1,115	100
B(100% RL, 5% Mow)	5	1,115	100
C(75% RL, 5% Mow)	5	0,836	75
D(50% RL, 5% Mow)	5	0,558	50
E(30% RL, 5% Mow)	5	0,335	30
F(20% RL, 5% Mow)	5	0,223	20
G(10% RL, 5% Mow)	5	0,112	10
H(4% RL, 5% Mow)	5	0,044	4
I(0% RL, 10% Mow)	10	0	0
J(0% RL, 5% Mow)	5	0	0

3.4.4 Kwaliteitstesten op de zaadencrusterings met rhamnolipiden (CO-39)

3.4.4.1 Wrijvingstest, flowability-test en desintegratietest

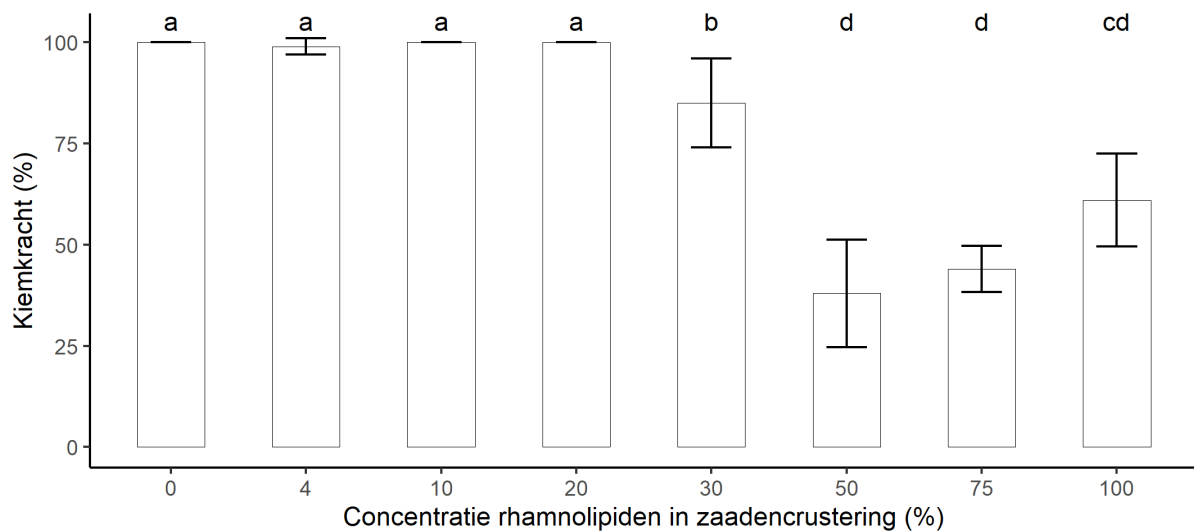
Naast een algemene kiemtest en een specifiekere fytotoxiciteitstest werden de zaadencrusterings met rhamnolipiden ook aan een wrijvingstest (bepaling van het coatingsverlies door wrijving), een *flowability*-test (bepaling van de doorloopsnelheid) en een desintegratietest (bepaling van de tijd nodig voor de encrusterings om volledig los van het zaad te komen) onderworpen. In **Figuur 38** worden de resultaten van deze drie testen weergegeven. Uit de resultaten van de wrijvingstest kon geen duidelijk verband worden besloten tussen het coatingsverlies tijdens wrijving en de concentratie rhamnolipiden. Op de middelste figuur is te zien dat er geen significante verschillen waren tussen de doorloopsnelheden van de verschillende zaadencrusterings. De onderste figuur toont de desintegratietijd in functie van de concentratie rhamnolipiden aanwezig in de zaadencrusterings. Daarop is te zien dat de desintegratietijd daalde bij stijgende concentraties rhamnolipiden.



Figuur 38: Resultaten van de wrijvingstest, flowability-test en desintegratietest uitgevoerd op de zaadencrusterings met rhamnolipiden. A: Coatingsverlies door wrijving (%). Hiervan werd één herhaling uitgevoerd. B: Doorloopsnelheid (g/s). Tussen de behandelingen worden geen significante verschillen aangetoond (Anova, gevolgd door een Kruskal Wallis Rank Sum test, $n = 9$, $\alpha = 0,05$). De foutenbalken geven de standaardafwijking weer (vijf herhalingen). C: Desintegratietijd (min). De foutenbalken geven de standaardafwijking weer (drie herhalingen).

3.4.4.2 Kiemkracht (zonder bodem)

Na het encrusteren van de CO-39 rijstzaden met en zonder rhamnolipiden werd de kiemkracht van de zaden aan de hand van een kiemtest getest. De resultaten op het einde van deze test (na een week) worden in **Figuur 39** weergegeven, waar de kiemkracht in functie van de concentratie rhamnolipiden in de zaadencrusterings wordt uitgedrukt. Daaruit bleek dat de encrusterings zelf geen invloed hebben op de gemiddelde kiemkracht, wat ook het geval was tot en met een concentratie van 20 % RL in de zaadencrusterings. Vanaf een concentratie van 30 % RL was de gemiddelde kiemkracht van de zaden significant lager dan de zaadencrusterings met lagere rhamnolipidenconcentraties, met de significant laagste gemiddelde kiemkracht vanaf de zaadencrusterings 50 % RL bevatten.



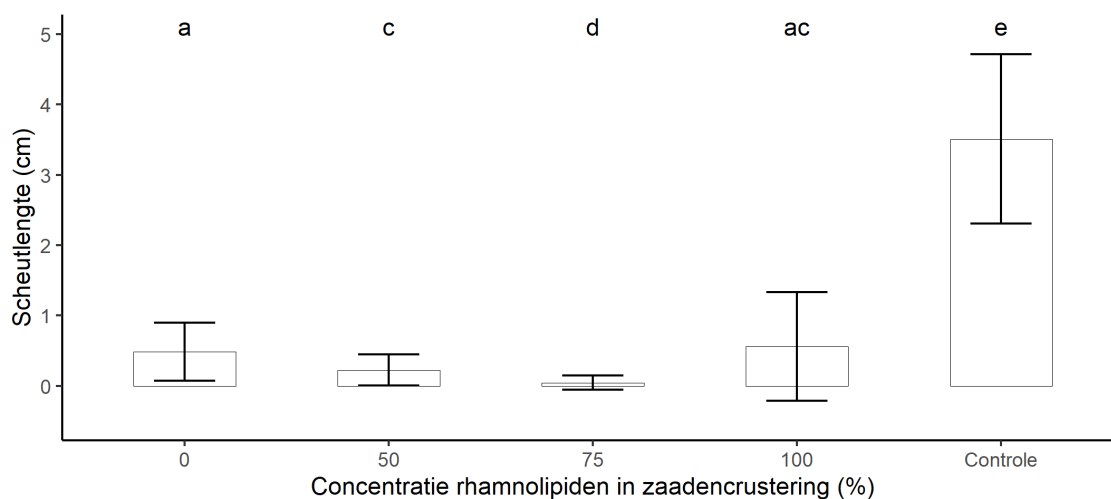
Figuur 39: Kiemkracht van de zaden in functie van de concentratie rhamnolipiden in de zaadencrusterings. Tijdens de kiemtest werden drie controles meegenomen die geen rhamnolipiden bevatten, enerzijds naakte CO-39 zaden en anderzijds twee zaadencrusterings (met 10% Mowiol en 5% Mowiol). Alle controlezaden kiemden en aangezien alle zaadencrusterings in deze grafiek gecoat zijn met 5% Mowiol als sticker, werd de controle met evenveel stickerconcentratie op de figuur geplot (aan de linkerkant op de figuur). Boven elke barplot geven significantieletters meer duidelijkheid over de relatie tussen de verschillende behandelingen (Anova, gevolgd door een Kruskal Wallis test, $n = 8$, $\alpha = 0.05$). Per behandeling werden vier herhalingen uitgevoerd met 25 zaadencrusterings per herhaling. De foutenbalken geven de standaardafwijking weer.

3.4.4.3 Fytotoxiciteitstest (zonder bodem)

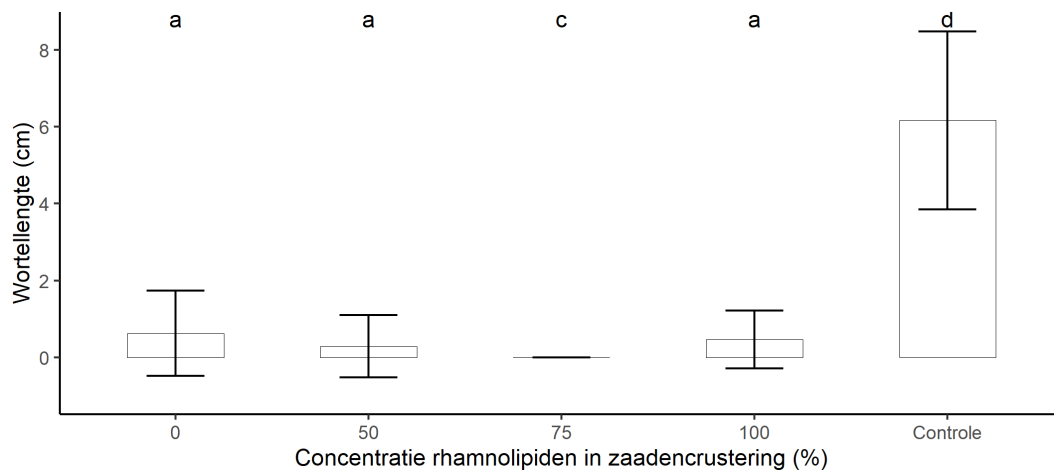
Naast de algemene kiemtest werd ook een specifiekere fytotoxiciteitstest uitgevoerd waarbij de scheut- en wortellengte van de ontwikkelende zaden met encrusterings werden bepaald. Het tijdsverloop waarin de ontwikkeling van de scheutlengte en wortellengte worden weergegeven, staat in **Figuur 40** en **Figuur 41** afgebeeld. Alle zaadencrusterings vertoonden een groeiachterstand ten opzichte van de naakte controlezaden waarbij het relatieve aandeel verminderde groei in **Tabel 13** wordt weergegeven. Daaruit bleek dat zaadencrusterings I(0% RL, 10% Mow) de beste en snelste groei vertoonde zowel als het ging over de scheut als wortel. Alle andere zaadencrusterings deden het beduidend minder goed.

Tabel 13: Fytotoxiciteitstest van de CO-39 zaadencrusterings met en zonder rhamnolipiden met de relatieve groeiachterstand t.o.v. de controlezaden op het einde van de proef. Alle zaadencrusterings zijn opgebouwd met dezelfde carriers: bentoniet/talk in de grondlaag en tussenlaag en talk in de toplaag. Tussen haakjes staan de significantieletters weergegeven die meer informatie geven over de relatie tussen de zaadencrusterings (Anova, gevolgd door een Kruskal Wallis Rank Sum test, $n = 7$, $\alpha = 0,05$). Controle: naakte CO-39 zaden.

Zaadencrusterings	Sticker	RL-concentratie (%)	Relatieve scheutlengte t.o.v. controle (%)	Relatieve wortellengte t.o.v. controle (%)
Controle	/	/	100 (e)	100 (d)
I(0% RL, 10% Mow)	MOW 10%	0	44,30 (b)	43,88 (b)
J(0% RL, 5% Mow)	MOW 5%	0	13,80 (a)	10,20 (a)
D(50% RL, 5% Mow)	MOW 5%	50	6,44 (c)	4,74 (a)
C(75% RL, 5% Mow)	MOW 5%	75	1,23 (d)	0 (c)
A(100% RL, 10% Mow)	MOW 10%	100	9,48 (c)	1,52 (a)
B(100% RL, 5% Mow)	MOW 5%	100	15,95 (ac)	7,69 (a)



Figuur 40: Resultaten van de fytotoxiciteitstest (scheutlengte) op rijst na zes dagen uitgevoerd met de CO-39 zaadencrusterings met en zonder rhamnolipiden. De percentages op de x-as verwijzen naar de hoeveelheid rhamnolipiden die in de zaadencrusterings werden toegevoegd. De letters boven de barplots geven de relatie tussen de verschillende behandelingen weer (Anova, gevolgd door Tukey post hoc test, $n = 5$, $\alpha = 0,05$). De foutenbalken geven de standaardafwijking weer (drie herhalingen met tien zaden per herhaling). De controle stelt de scheutlengte bij de naakte CO-39 zaden voor.



Figuur 41: Resultaten van de fytoxiciteitstest (wortellengte) op rijst na zes dagen uitgevoerd met de CO-39 zaadencrusterings met en zonder rhamnolipiden. De percentages op de x-as verwijzen naar de hoeveelheid rhamnolipiden die in de zaadencrusterings werden toegevoegd. De letters boven de barplots geven de relatie tussen de verschillende behandelingen weer (Anova, gevolgd door een Kruskal Wallis Rank Sum test en een Pairwise Wilcoxon Rank Sum test, $n = 5$, $\alpha = 0,05$). De foutenbalken geven de standaardafwijking weer (drie herhalingen met tien zaden per herhaling). De controle stelt de wortellengte bij de naakte CO-39 zaden voor.

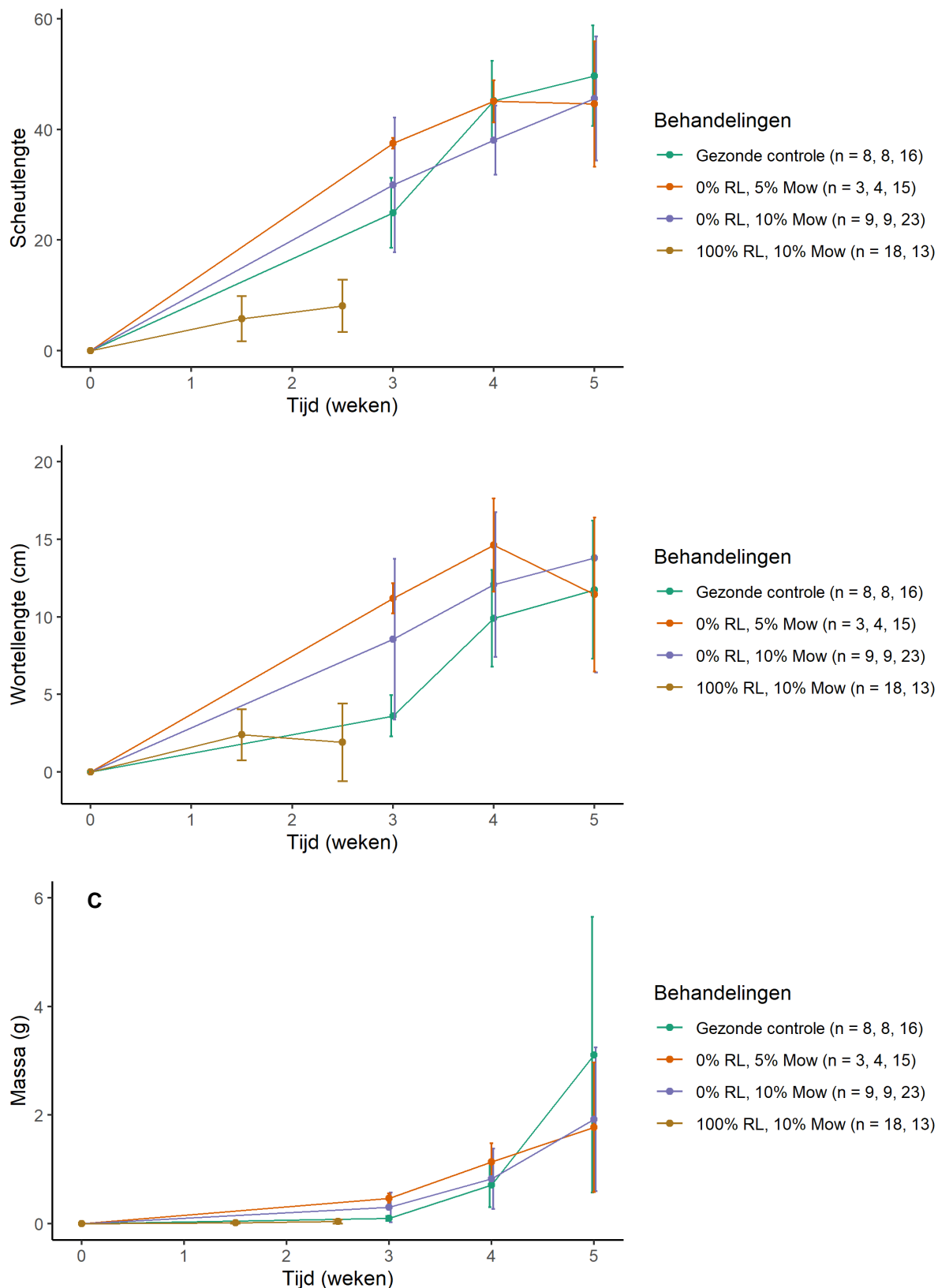
3.4.5 Bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden in de zaadencrusterings (CO-39)

3.4.5.1 Opkomst, massa, wortellengte en scheutlengte (met bodem)

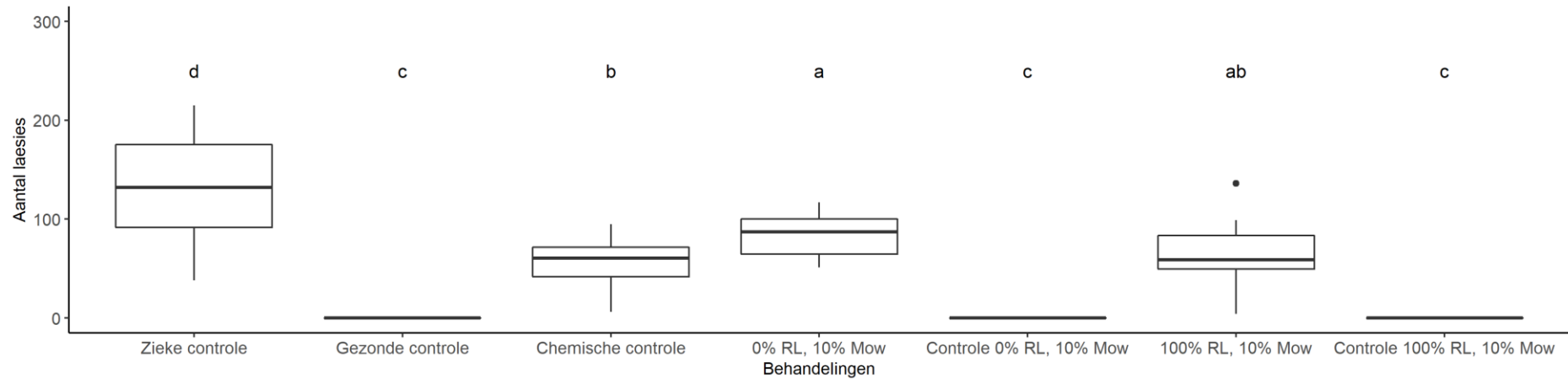
De CO-39 zaadencrusterings met en zonder rhamnolipiden (zie **Tabel 12**) werden op werkzaamheid getest, verspreid over twee plantenproeven, aan de hand van het aantal sporulerende laesies op de bladeren van de rijstplanten. In **Figuur 42** worden de gemiddelde scheutlengtes, wortellengtes en bovengrondse biomassa's van de gezaaide planten (A(100% RL, 10% Mow), I(0% RL, 10% Mow) en J(0% RL, 5% Mow)) i.f.v. de tijd weergegeven. Merk op dat hierbij de factor "bodem" is inbegrepen en niet werd gewerkt met een testkit (zie **Sectie 2.2**) Op de onderstaande figuur is te zien dat zaadencrusterings I(0% RL, 10% Mow) sneller groeide dan zaadencrusterings A(100% RL, 10% Mow). Echter, de opkomst bij zaadencrusterings I(0% RL, 10% Mow) lag een pak hoger dan deze bij zaadencrusterings A(100% RL, 10% Mow), respectievelijk 75,93 % en 53,70 %. De gemiddelde scheutlengte, wortellengte en biomassa lag systematisch hoger bij de zaden gecoat met 0% RL vergeleken met de zaden gecoat met 100% RL.

3.4.5.2 In planta inoculatieproeven

De resultaten van de eerste plantenproef als gevolg van de inoculatie met *P. oryzae* worden in **Figuur 43** weergegeven. Wat de resultaten van de symptoomevaluatie na inoculatie betrof, werden significant minder sporulerende laesies geteld op de bladeren van planten gegroeid uit zaadencrusterings I(0% RL, 10% Mow) en A(100% RL, 10% Mow) t.o.v. de zieke controle (respectievelijk gemiddeld 83 en 65 laesies t.o.v. 130 laesies). Daarnaast bevatten de bladeren van de planten van de chemische controle (BTH, bestand tegen inoculatie met *P. oryzae*) en van zaadencrusterings A(100% RL, 10% Mow) significant even veel sporulerende laesies. Bij de tweede plantenproef werd de effectiviteit van de zaadencrusterings C(75% RL, 5% Mow) en D(50% RL, 5% Mow) achterhaald. Echter was het niet mogelijk om hier degelijke resultaten uit te halen, aangezien geen enkele zaadencrusterings uitgroeide tot een plant. Hierdoor was het niet mogelijk om de planten met de rijstblastschimmel te inoculeren.



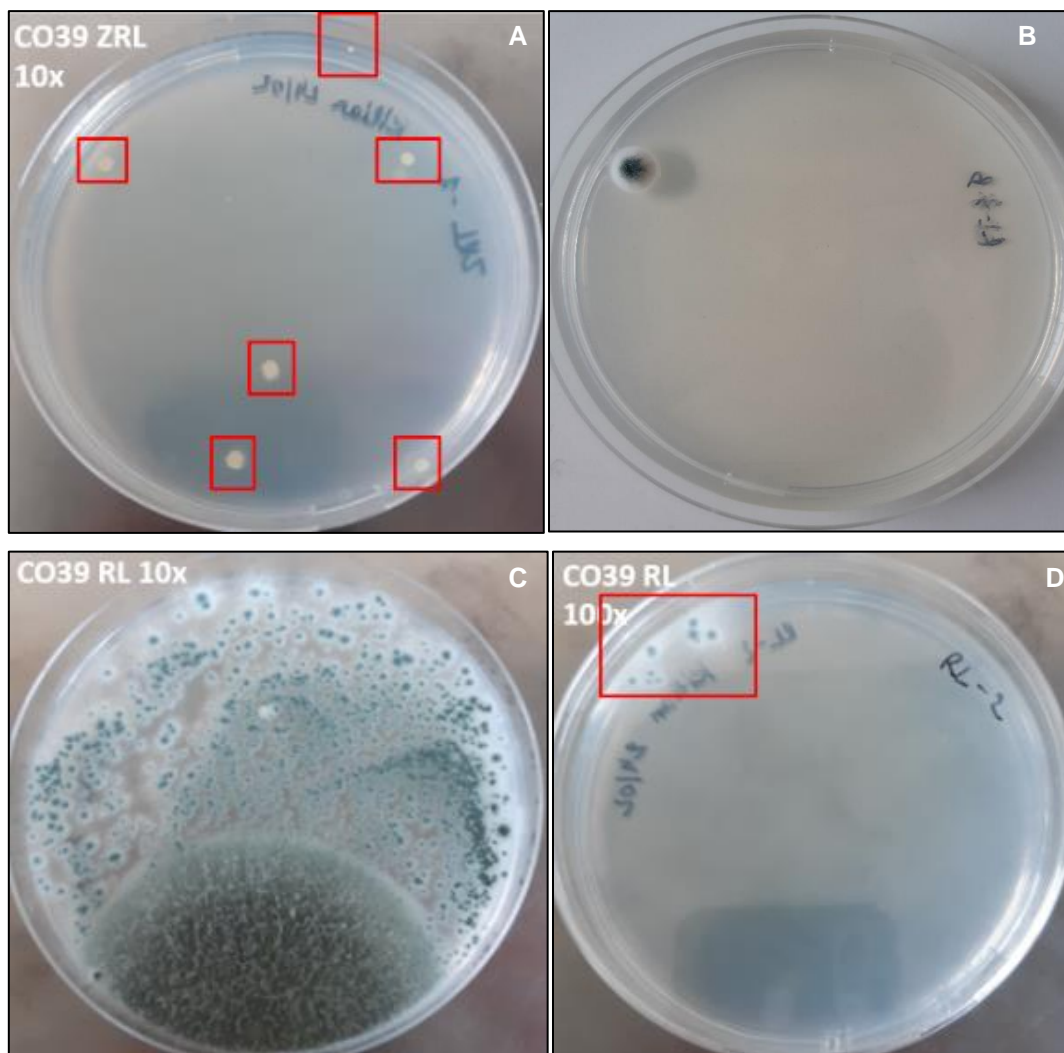
Figuur 42: Effect van de zaadencrusterings met en zonder rhamnolipiden op (A) de gemiddelde scheutlengte, (B) de gemiddelde wortellengte en (C) de gemiddelde biomassa van de ontwikkelde planten in de plantenproef. Deze planten werden niet geïnfecteerd. De foutenbalken geven telkens de standaardafwijking weer. Op elk ander meetpunt in de tijd werd van een andere herhaling per behandeling de scheutlengte, wortellengte en biomassa gemeten. Vandaar dat een waarde verder in de tijd soms lager kan liggen. In de legende staat telkens vermeld van hoeveel planten de parameters werd gemeten per behandeling en dit chronologisch in de tijd.



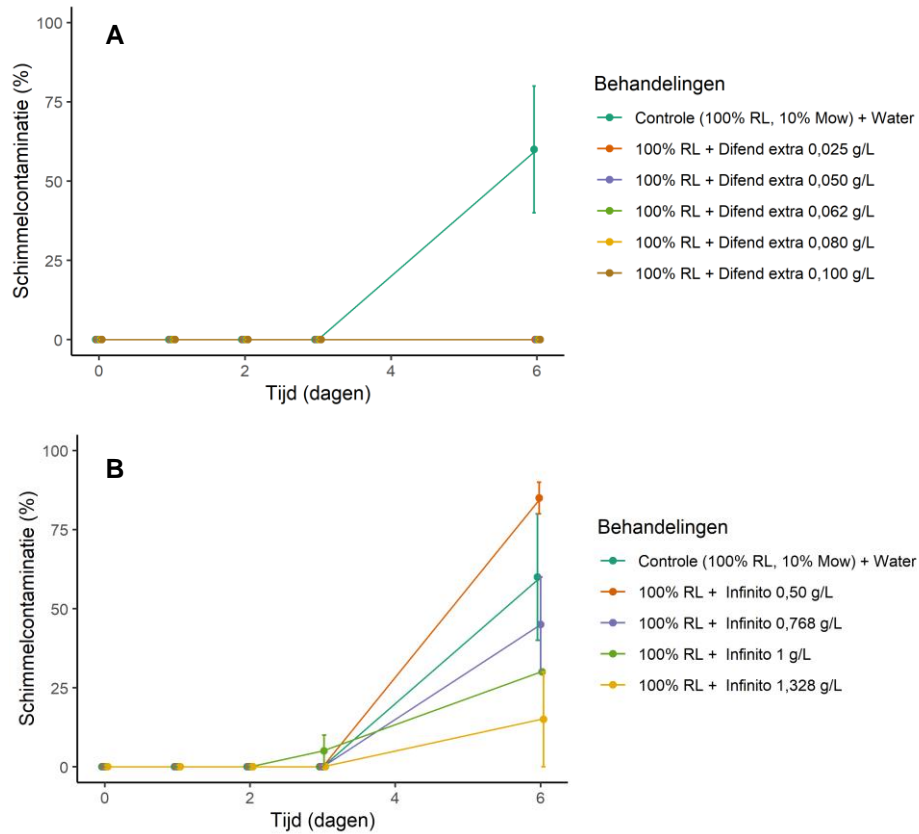
Figuur 43: Resultaat van de eerste plantenproef waarin zaadencrusterings I (0% RL, 10% Mow) en A (100% RL, 10% Mow) werden getest op effectiviteit aan de hand van het aantal sporulerende laesies aanwezig op het tweede jongste ontwikkelde rijstblad. Er werd een zieke controle, drie gezonde controles ("Gezonde controle", "Controle 0% RL, 10% Mow" en "Controle 100% RL, 10% Mow") en een chemische controle meegenomen. Als chemische controle werd BTH (60 μ M, soil mix en soil drench) gebruikt dat reeds actief werd bevonden tegen *P. oryzae* op rijstplanten. Boven elke boxplot geven significantieletters meer informatie over de relatie tussen de verschillende behandelingen (Anova, gevolgd door een Kruskal Wallis Rank Sum test en een Pairwise Wilcoxon Rank Sum test, $n = 7$, $\alpha = 0,05$). De boxplots tonen de mediaan (horizontale lijn), 25% en 75% percentiel en niet-extreme uitschieters.

3.4.6 Aanwezigheid van MO's in de zaadencrusterings met rhamnolipiden

Tijdens de kiemtest en fytoxiciteitstest werd schimmelcontaminatie rond de zaadencrusterings vastgesteld. Om te bepalen of deze contaminatie afkomstig was van de zaadencrusterings of van de natuurlijke rhamnolipiden die erin zaten verwerkt, werden de zaadencrusterings I(0% RL, 10% Mow) en A(100% RL, 10% Mow) op PDA-platen uitgeplaat, alsook de natuurlijke rhamnolipiden. Enkele dagen later was er wel degelijk sprake van schimmelvorming, wanneer er rhamnolipiden in de zaadencrusterings aanwezig waren en bij de zuivere rhamnolipiden. **Figuur 44** toont deze gecontamineerde PDA-platen. Na microscopisch onderzoek bleek dat de zaadencrusterings met rhamnolipiden alsook de zuivere rhamnolipiden met *Aspergillus niger* waren gecontamineerd. Om dit probleem te verhelpen werden twee verschillende fungiciden (Difend Extra (25 g/L difenoconazole en 25 g/L fludioxonil) en Infinito (62,5 g/L Fluopicolide)) aan zaadencrusterings A(100% RL, 10% Mow) toegevoegd. **Figuur 45** toont het resultaat. Daarop is te zien dat Difend Extra een geschikt fungicide was met een effectiviteit van 100 %. Fluopicolide bleek niet geschikt te zijn en toonde een effectiviteit van amper 56,25 %.



Figuur 44: Schimmelcontaminatie bij het uitplaten van zaadencrusterings I(0% RL, 10% Mow) en A(100% RL, 10% Mow) alsook de zuivere natuurlijke rhamnolipiden. A: Zaadencrusterings I(0% RL, 10% Mow), 10 keer verdund. Hierop is geen schimmelvorming te zien, maar wel bacterievorming, hoogstwaarschijnlijk opgelopen tijdens het uitplaten. B: Natuurlijke rhamnolipiden gecontamineerd met *A. niger*. C: Zaadencrusterings A(100% RL, 10% Mow), 10 keer verdund, met *A. niger*. D: Zaadencrusterings A(100% RL, 10% Mow), 100 keer verdund, met *A. niger*.



Figuur 45: Effect van twee fungiciden Difend Extra (25 g/L difenoconazole + 25 g/L fludioxonil) en Infinito (62,5 g/L fluopicolide) op de schimmelcontaminatie rond de zaadencruster met 100% RL. A: behandeld met Difend Extra, B: behandeld met Infinito. De foutenbalken geven telkens de standaardafwijking weer (twee herhalingen, met tien zaden per herhaling).

4 Discussie

4.1 In planta bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden

In dit experiment werd getest welke RL-concentraties geschikt waren om ISR in de rijstplant tegen *P. oryzae* op te wekken a.d.h.v. het aantal sporulerende laesies die op de bladeren te zien waren. Hiervoor werden de rhamnolipiden op drie verschillende manieren met de rijstzaden/planten in contact gebracht: een *seed dip* (onderdompeling van de zaailingen in de RL-oplossing), een *soil mix* (menging van de bodem met de RL-oplossing) tijdens het planten uitgevoerd en drie dagen voor de inoculatie met *P. oryzae* ook een *soil drench* (RL-oplossing gegoten over bodemsubstraat). De aanwezigheid van veel sporulerende laesies op de rijstbladeren na infectie met *P. oryzae* betekent dat de rhamnolipiden er niet of moeilijk in slaagden om een ISR-respons in de plant op te wekken, terwijl het omgekeerde gold bij weinig sporulerende laesies. Uit de resultaten van dit experiment bleek dat het minst aantal sporulerende laesies werden gevormd na het toevoegen van 50 μM natuurlijke RL op de drie verschillende manieren. In een tweede experiment werden drie andere rhamnolipidenconcentraties getest (25 μM , 200 μM en 300 μM), maar aangezien het klimaat in de infectiekamer op het moment van inoculatie niet optimaal genoeg was, verliep de infectie van de rijstblastpathogeen moeizaam waarbij sommige zieke controleplanten volledig gezond bleken te zijn. Daarom werd besloten om dit experiment in deze thesis niet mee te nemen. Echter, een studie wees uit dat door het toevoegen van 50 μM en 200 μM RL (zowel via *seed dip*, *soil mix* als *soil drench*) een ISR-respons in de rijstplanten tegen *P. oryzae* werd opgewekt (Pipeleers, 2020). De optimale RL-concentratie voor het induceren van een ISR-respons ligt dus mogelijk ergens vanaf 50 μM .

Verder werd in dit experiment ook onderzocht of het moment van toepassing van natuurlijke rhamnolipiden een rol speelde in het induceren van een ISR-respons in de rijstplant. Hiervoor werden twee aparte behandelingen uitgevoerd waarbij de ene behandeling enkel rhamnolipiden kreeg toegediend tijdens het planten (DP), terwijl de andere behandeling enkel rhamnolipiden kreeg toegediend drie dagen voor inoculatie met *P. oryzae* (BI). Uit de plantenproef bleek dat het tijdstip van het toevoegen van rhamnolipiden (50 μM) onderling geen significant verschil gaf. Alle behandelingen bleken even effectief te zijn in het induceren van een ISR-respons. Eén enkel contact met de rhamnolipiden tijdens het planten was voor de zaden en toekomstige planten voldoende om zich voor te bereiden op een eventuele inoculatie met *P. oryzae*. Andere studies over de langdurige activiteit van rhamnolipiden in het induceren van ISR, zoals aangetoond in de plantenproef (tot vijf weken oude planten), werden voorlopig nog niet uitgevoerd. Echter werd door Monnier et al. (2018) een in vitro experiment uitgevoerd waarbij de activiteit van rhamnolipiden om koolzaad (*Brassica napus*) te beschermen tegen *Botrytis cinerea* werd bestudeerd. De activiteit van rhamnolipiden bleef tot en met acht dagen na toepassing stabiel (Monnier et al., 2018).

4.2 In vitro bepaling van het effect van rhamnolipiden op de fytotoxiciteit van rijstzaden

Om verder te beantwoorden aan de eerste onderzoeksvraag (effect van de rhamnolipiden op de ontwikkeling van de rijstzaden) werd een fytotoxiciteitstest op de naakte rijstzaden uitgevoerd m.b.v. een testkit (zonder bodemsubstraat) die bepaalde welke RL-concentraties al dan niet zorgden voor een groeiachterstand van de zaailingen t.o.v. de controlezaden. Op de foto's in **Bijlage 4** is visueel zichtbaar dat het toevoegen van 200 μM RL tijdens het zaaien leidde tot een groeiachterstand van de zaden, zowel bij de scheutvorming als bij de wortelvorming. Uit de resultaten bleek dat 200 μM RL er inderdaad voor zorgde dat zowel de scheut- als wortelvorming trager verliep in vergelijking met de controle. Er kan dus worden gesteld dat 200 μM RL-oplossing licht fytotoxisch is voor de rijstzaden. Echter bleek dat de aanwezigheid van 1 μM , 10 μM of 50 μM RL bij het zaaien na vijf dagen een positief effect had op de wortelgroei en een licht inhiberend effect op de scheutgroei. Er wordt dus verondersteld dat de fytotoxische rhamnolipidenconcentratie ergens start vanaf 50 μM per rijstzaadje. Bij de uitgevoerde fytotoxiciteitstest werd 20 mL van 50 μM RL-oplossing aan tien zaden toegevoegd, ofwel 0,578 mg RL per rijstzaadje. Wanneer de methodiek voor het uitvoeren van de plantenproef beschreven in **Sectie 2.1** wordt aangenomen (27 rijstzaden zaaien in 0,692 kg vochtige bodem) samen met bovenstaande berekening, zou een RL-concentratie vanaf 22,54 mg/kg vochtige bodem mogelijk fytotoxisch kunnen zijn. Uit een studie van Marecik et al. (2012) werd aangetoond dat het fytotoxisch effect van rhamnolipiden wellicht plantensoortspecifiek is waarbij het op de kiemkracht van alfalfa, sorghum, mosterd en pinksterbloem werd bepaald. Daaruit bleek dat een rhamnolipidenconcentratie van meer dan 75 mg/kg vochtige bodem resulteerde in een afname van de kiemingsindex voor alfalfa, mosterd en sorghum (Marecik et al., 2012). Een andere studie toonde ook de verminderde kieming van slazaden (*Lactuca sativa*) na toevoeging van rhamnolipiden waarbij de kiemingsindex tot minder dan 50 % daalde bij een RL-concentratie vanaf 4 g/kg (Millioli et al., 2009). Andere plantensoorten zoals kool (*Brassica oleracea*) tolereerden dan weer wel de aanwezigheid van rhamnolipiden (Silva et al., 2010).

4.3 Extractie van rhamnolipiden uit de bodem

4.3.1 Bepaling van de oppervlaktespanning via Wilhelmy plaatmethode

Om het gedrag van de rhamnolipiden in de bodem te bepalen werd eerst experimenteel gezocht naar een methode om de RL-concentratie te bepalen. Door het ontbreken van een gevalideerde analysemethode via LC-MS/MS werd de Wilhelmy plaatmethode als potentieel alternatief getest om indirect de RL-concentratie in waterige oplossingen a.d.h.v. de oppervlaktespanning te bepalen. De relatie tussen de oppervlaktespanning en de RL-concentratie bleek negatief gecorreleerd te zijn; de oppervlaktespanning daalde bij stijgende RL-concentraties. Dit wordt bevestigd in de literatuur waarin staat dat rhamnolipiden de oppervlaktespanning van waterige oplossingen reeds in lage concentraties tot 29 mN/m doen dalen door hun surfactantactiviteit (Mulligan, 2007). Cohen en Exerowa (2007) rapporteerden drie transitiepunten in het verloop van de oppervlaktespanning in functie van de RL-concentratie, geproduceerd door *P. aeruginosa* AT10, te verklaren door respectievelijk de vroegtijdige vorming van aggregaten, de vorming van micellen bestaande uit monorhamnolipiden en het bereiken van de kritische micelconcentratie van het RL-mengsel (Cohen et al., 2007). Dit effect werd niet verder in het labo onderzocht aangezien de focus elders lag.

4.3.2 Extractie van rhamnolipiden uit de bodem

Ook werd er getest of gelijkaardige resultaten werden bekomen wanneer de rhamnolipiden alvorens de meting gedurende een periode in contact met het bodemmateriaal werden gebracht. De relatie tussen de oppervlaktespanning en de rhamnolipidenconcentratie zoals uitgelegd in **Sectie 4.3.1**, kon nu echter niet worden gereproduceerd. Ook het aanzuren van het HPLC-grade water voor het verhogen van de wateroplosbaarheid van de rhamnolipiden, kon dit probleem niet verhelpen. Het blijkt dus dat de bodem hierin een bepalende rol speelt. Enerzijds treedt de bodem mogelijk als een buffer op waardoor het toevoegen van aangezuurd water geen effect heeft op de oplosbaarheid van de rhamnolipiden. Anderzijds lijkt het dat de rhamnolipiden zich vrij snel aan de bodemdeeltjes vasthechten en/of dat de rhamnolipiden inactief worden gemaakt, mogelijk door micro-organismen in de bodem. Het geteste bodemsubstraat werd namelijk niet geautoclaveerd aangezien dit ook niet tijdens de plantenproeven gebeurde. Meer waarschijnlijk is de vasthechting van rhamnolipiden aan de bodemdeeltjes dan de afbraak ervan. In bovenstaande plantenproef bleek namelijk dat de activiteit van de rhamnolipiden die vijf weken voor de inoculatie werden toegevoegd niet verschilde met de rhamnolipiden die net voor de inoculatie werden toegevoegd. De wortels krijgen de rhamnolipiden dus naarmate ze ouder worden op een of andere manier meer en meer los van de bodemdeeltjes. In de literatuur worden verschillende technieken beschreven waarbij rhamnolipiden uit de bodem kunnen worden geëxtraheerd, waaronder zure precipitatie (analoog aan methode uitgevoerd in dit experiment), ammoniumsulfaatprecipitatie, zinksulfaatprecipitatie en solventextractie. Van deze methoden bleek de oplosmiddelextractie met aceton de beste terugwinningstechniek te zijn (Shah et al., 2016).

4.4 Zaadencrusterings en incorporatie met rhamnolipiden

4.4.1 Optimalisatie van de encrusteringsmethode

Verschillende stickers en carriers werden met elkaar gecombineerd om een compatibele zaadencrusterings te vormen. Algemeen kon worden gesteld dat de zaadvorm, het zaadgewicht en de behandelde hoeveelheid van vrij groot belang is in de encrusteringsmethode. Dit kan worden verklaard door de beweging die de zaden ondervinden in de draaiende trommel. Over het algemeen verliep het encrusteringsproces relatief vlot, maar de meeste problemen traden op bij het encrusteren van Arabische gom en xanthaangom als sticker, vaak in combinatie met kaolien als carrier. Beide stickers zorgden namelijk voor een hoge aggregatiegraad van de rijstzaden. Dit in combinatie met kaolien (carrier), dat daarnaast ook niet genoeg aan de zaden bleef kleven. De oorzaak hiervan is hoogstwaarschijnlijk de te hoog geconcentreerde sticker (15 % Arabische gom en 0,1 % xanthaangom). Echter was het praktisch niet mogelijk om een lagere concentratie van xanthaangom dan 0.1 % te bekomen gezien de hoge vochtabsorptie ervan. In de literatuur wordt hiervoor een mogelijke oplossing beschreven, namelijk het toevoegen van een kleine hoeveelheid vocht aan het kaolienpoeder alvorens het aan de zaden toe te voegen. Op die manier worden de stickers automatisch verdund en is de werkzaamheid van kaolien hoger (State of Queensland, 2017).

4.4.2 Selectie van zaadencrusterings zonder rhamnolipiden o.b.v. kwaliteitsparameters

4.4.2.1 Voorselectie a.d.h.v. bedekkingsgraad en wrijvingstest

Tijdens de voorselectie werden de zaadencrusterings rond de substitutieozaden aan de hand van de bedekkingsgraad en het coatingsverlies door wrijving beoordeeld. Bij het bepalen van de bedekkingsgraad vertoonden alle zaadencrusterings een gelijkaardig resultaat met enkele uitschieters met kaolien als carrier. Kaolien zorgt dus voor een hoge, egale bedekking van de encrusterings. Echter, uit de wrijvingstest bleek dat de zaadencrusterings met kaolien het grootste aandeel coating verloren tijdens het schudden, zowel met 1 % methocel, 1 % CMC als 0,1 % xanthaangom als sticker. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat kaolien, in vergelijking met andere carriers zoals bentoniet, een lage densiteit heeft, waardoor het sneller zal loskomen bij wrijving. Een andere, maar mogelijk belangrijkere reden is dat kaolien een lager vochtabsorberend vermogen heeft dan bentoniet wanneer het met de op water gebaseerde sticker in contact komt. Hierdoor is de interactie tussen de carrier en sticker mogelijk niet optimaal genoeg om bestand te zijn tegen wrijving. Bij de voorselectie van de zaadencrusterings werd rekening gehouden met de resultaten van de bedekkingsgraad en de wrijvingstest, maar het was zeker ook belangrijk om verschillende combinaties van carriers en stickers met het oog op de incorporatie van de rhamnolipiden te selecteren. De interactie tussen de encrusteringsmaterialen en de rhamnolipiden werd namelijk nog niet onderzocht.

4.4.2.2 Finale selectie van de zaadencrusterings

Na de voorselectie bleven de meest beloftevolle zaadencrusterings over, die opnieuw werden aangemaakt. Er werden twee nieuwe zaadencrusterings toegevoegd met een licht aangepaste concentratie aan sticker (sticker: 0,75 % methocel en 0,75 % CMC en carrier: telkens bentoniet/kaolien) om de selectie verder uit te breiden. De zaadencrusterings met bentoniet of bentoniet/talk gaven de hoogste opbouwrendementen (85 % – 90 %) vergeleken met kaolien (68 % - 82 %). Dit is mogelijk te verklaren door de hoge waterabsorberende capaciteit van bentoniet. Aangezien de sticker in water werd opgelost, werd op die manier een stevige encrusterings gecreëerd (Imerys, 2021). Kaolien heeft deze eigenschap in mindere mate en heeft daarnaast ook een laag moleculair gewicht waardoor het minder snel aan de zaden zal vasthechten (PubChem, n.d.). Uit de resultaten van de wrijvingstest bleek dat er in bepaalde gevallen significante verschillen optraden tussen zaadencrusterings met dezelfde carrier maar met een verschillende sticker. Er kan namelijk worden opgemerkt dat de gevallen met het hoogste coatingsverlies corresponderen met de zaadencrusterings met de laagste concentratie sticker. Een lagere concentratie aan sticker leidt dus mogelijk tot een zwakkere encusterings. Ook was er een significant hoger coatingsverlies op te merken wanneer kaolien werd gebruikt i.p.v. bentoniet (waterabsorberende capaciteit). De hoogste doorloopsnelheden, als resultaat van de *flowability*-test, werden bekomen bij de zaadencrusterings met kaolien als carrier gevolgd door deze met bentoniet/talk. Kaolien en talk zorgen er namelijk voor dat alle poriën in de encrusterings worden opgevuld waardoor de ruwheid van het oppervlak verlaagt. Deze encrusterings geven daarom ook een meer glanzend uitzicht. Talk daarentegen zorgt ook voor een verminderde vorming van statische elektriciteit tussen de zaden onderling waardoor ze minder wrijving veroorzaken en bijgevolg sneller door de trechter bewegen (Sensient Colors LLC, 2020). Tot slot werd ook de kiemkracht van de zaadencrusterings bepaald. Op het einde van deze test waren zo goed als alle zaadencrusterings gekiemd. Echter bleek dat vooral de zaadencrusterings met bentoniet initieel trager kiemden. Een

gelijkaardig effect werd bekomen met een mengsel van bentoniet en talk. Zoals eerder aangehaald, heeft bentoniet de eigenschap dat het vrij goed water kan absorberen en bijgevolg zorgt voor een goede interactie met andere stickers. Om die reden zullen de zaadencrusteringslagen extra stevig zijn, waardoor het voor de scheut en wortel van het zaad moeilijker is om deze te doorbreken. O.b.v. de bovenstaande resultaten werden de zes beste encrusteringslagen geselecteerd. Hierbij woog het opbouwrendement het meeste door en werd net zoals bij de voorselectie rekening gehouden met het gebrek aan kennis over de interactie tussen de rhamnolipiden en de encrusteringsmaterialen.

4.4.2.3 Aangepaste laagverdeling

Om de rhamnolipiden in de zaadencrusteringslagen te verwerken, werd gezocht naar een geschikte manier om dit te verwezenlijken. Hierdoor werd gekozen om drie verschillende lagen aan de rijstzaden toe te voegen: grondlaag, tussenlaag en toplaag. De zes geselecteerde zaadencrusteringslagen verzekerden een blijvend contact tussen het zaadoppervlak en de geteste encrusteringsmaterialen en werden daarom als grondlaag gebruikt. Deze laag bevatte geen rhamnolipiden omdat het effect van de rhamnolipiden op het aanhechtingsvermogen op de zaden nog niet was gekend. Hiervoor bleken uit de voorgaande resultaten de stickers mowiol 10 %, methocel 1 % en het carriermengsel bentoniet/talk en bentoniet het meest geschikt. De tweede laag (tussenlaag) bevat de rhamnolipiden. Bij deze laag werden dezelfde carriers en stickers gebruikt als in de grondlaag. Door de rhamnolipiden in de tussenlaag te verwerken, zorgden eventuele verliezen van de zaadencrusteringslagen door wrijving niet voor het verlies van de rhamnolipiden aangezien een finale toplaag de rhamnolipiden van buitenaf beschermt. Voor deze laag werd een carrier gebruikt die zorgde voor een hogere *flowability*. Talk bleek een goed voorbeeld van zo'n carrier te zijn en zorgde daarbij ook voor een hoger opbouwrendement aangezien het de vasthechting van het bentoniet in de onderliggende lagen verbeterde. Als stickers gaven mowiol 10 % en methocel 1 % opnieuw het beste resultaat. Voor deze aangepaste laagverdeling werd een verhouding van 2:7:2 aangehouden. Hoger toegevoegde volumes gaven meer moeilijkheden tijdens het encrusteringsproces wat leidde tot de vorming van barsten in de encrusteringslagen na het drogen. Gezien de hoge waterabsorberende capaciteit van bentoniet wordt verwacht dat er dus meer vocht door de encrusteringslagen zal worden opgenomen. Tijdens het drogen verdampt echter het water waardoor de aanwezige bentoniet terug zal krimpen wat aanleiding kan geven tot het barsten van de encrusteringslagen. Een mogelijke oplossing hiervoor is het toevoegen van een aantal druppels olie, zoals lijnzaadolie, om het barsten tegen te gaan aangezien bentoniet ook olie absorbeert (Glazacheva et al., 2015). Gezien de fytotoxische effecten van olie in zaadencrusteringslagen, die het zuurstoftransport doorheen de encrusteringslagen afsluiten, werd deze piste niet verder onderzocht.

Er werden twee zaadencrusteringslagen geselecteerd die volgens de criteria het meest geschikt leken om er rhamnolipiden in te verwerken: zaadencrusteringslagen 88 (sticker: 10 % mowiol en carrier bentoniet/talk) en 89 (sticker: 1 % Methocel en carrier: bentoniet/talk). De selectie gebeurde eerst a.d.h.v. een visuele beoordeling. Later werden andere parameters bepaald: het opbouwrendement (één herhaling), de doorloopsnelheid (vijf herhalingen) en het coatingsverlies door wrijving (één herhaling). De geselecteerde zaadencrusteringslagen gaven resp. het 2^e en 5^e hoogste opbouwrendement, de 1^e en 2^e laagste doorloopsnelheid en het 4^e en 8^e laagste verlies door wrijving. Wat dat laatste betrof, vormde dit geen probleem aangezien enkel de toplaag en niet de rhamnolipiden tijdens wrijving verloren gingen.

4.4.3 Incorporatie van rhamnolipiden in zaadencrusterings (CO-39)

4.4.3.1 Formuleringswijze van rhamnolipiden

Om ervoor te zorgen dat de rhamnolipiden in de zaadencrusterings werden opgenomen, werden de rhamnolipiden op drie verschillende manieren in de zaadencrusterings verwerkt: via de carrier, via de sticker of via een combinatie van beiden (slurry). Uit de resultaten bleek dat de wateroplosbare rhamnolipiden best in de op water gebaseerde sticker werden verwerkt. Dit was mogelijk in methocel 1 %, mowiol 5 % en mowiol 10 %. Echter kunnen ook andere stickers hiervoor geschikt zijn. In de literatuur is nog geen informatie beschikbaar over de interactie tussen rhamnolipiden en bepaalde stickers. Door de schaarsheid van de rhamnolipiden werden ze enkel in de drie boven vermelde stickers verwerkt. Aan het sticker/RL-mengsel werd ook een druppel geschikt antischuimmiddel toegevoegd om schuimvorming van de rhamnolipiden te voorkomen (Dow, n.d.). Dit vergemakkelijkt het encrusteringsproces en zorgde voor een meer precieze toevoeging van de rhamnolipiden aan de zaden.

4.4.3.2 Omrekening van de benodigde massa aan rhamnolipiden per zaadje

Alvorens de resultaten van de extractieproef van rhamnolipiden uit de bodem (**Sectie 2.3**) bekend waren, werd op basis van de plantenproef (**Sectie 2.1**) berekend welke hoeveelheid rhamnolipiden rond het zaadje moest worden gebracht (1,115 mg). Echter, na de extractieproef werd geïndiceerd dat de rhamnolipiden weinig of niet vrij beschikbaar in de bodem zijn en/of snel inactief worden gemaakt. Hierdoor werd vermoed dat tijdens de plantenproef een deel van de rhamnolipiden niet tot aan de plant kon migreren, waardoor 1,115 mg RL per zaadje mogelijk een overschatting was. Als reactie hierop werd een meer realistische schatting gemaakt, namelijk 0,044 mg RL per zaadje.

4.4.3.3 Zaadencrusterings met verschillende rhamnolipidenconcentraties

Enkel zaadencrusterings 88 (10 % mowiol en bentoniet/talk) werd geselecteerd om rhamnolipiden in te verwerken gezien de schaarsheid van de CO-39 zaden. Wanneer 100 % RL, de maximaal toegediende concentratie rhamnolipiden in deze thesis, werd toegevoegd in combinatie met 10 % mowiol (sticker), kon er een hoge mate van aggregatie van de rijstzaden worden waargenomen. Dit kon worden verklaard door de hoge viscositeit van het mengsel. De rhamnolipiden hebben dus een merkbaar effect op de viscositeit van de sticker. Hierdoor werd de concentratie aan sticker tot 5 % verlaagd. Er kan worden besloten dat de fysicochemische eigenschappen van rhamnolipiden een rol kunnen spelen wanneer deze aan een encrusterings worden toegevoegd. De compatibiliteit van de rhamnolipiden met de gebruikte encrusteringsmaterialen moet dus nauwgezet worden nagegaan, ook om te vermijden dat de werking van de rhamnolipiden in de plant verloren gaat bij de encrusterings ervan.

4.4.4 Kwaliteitstesten op de zaadencrusterings met rhamnolipiden (CO-39)

4.4.4.1 Wrijvingstest, flowability-test en desintegratietest

Uit de resultaten van de wrijvingstest, waarbij de zaadencrusterings werden geschud om het verlies aan coating door wrijving te bepalen, kon geen duidelijk verband tussen de zaadencrusterings worden aangetoond. Hierbij moet rekening worden gehouden met het gebrek aan voldoende herhalingen wegens de schaarsheid van de zaden. Het zou hierbij kunnen dat de rhamnolipiden een effect hebben op de algemene stevigheid van de encrusterings of dat de rhamnolipiden een effect hebben op de vasthechting van de toplaag op de RL-bevattende tussenlaag. Zo is er een lichte trend te zien waarbij

er minder wrijvingsverliezen van de toplaag zijn bij de zaadencrusteringen met een hogere rhamnolipidenconcentratie. Dit zou betekenen dat de rhamnolipiden in de tussenlaag de interactie tussen de carrier en sticker versterken, maar zoals eerder aangehaald moeten in toekomstige proeven meer herhalingen worden uitgevoerd om diepgaandere conclusies te trekken. Bij de *flowability*-test, waar de zaden doorheen een trechter werden verplaatst om te bepalen hoe lang het duurde vooraleer alle zaden de trechter waren gepasseerd, waren er geen significante verschillen tussen de doorloopsnelheden van de verschillende zaadencrusteringen, ook niet met de ongecoate controlezaden. Dit is aannemelijk aangezien de *flowability*-test enkel iets zegt over de karakteristieken van het oppervlak van de zaadencrusteringen. Alle geteste zaadencrusteringen bezitten daarnaast dezelfde toplaag en zouden dus in principe dezelfde doorloopsnelheid moeten hebben. Tot slot wees de desintegratietijd uit hoe snel de encrusteringen van de zaden loskwamen na contact met leidingwater. Daaruit bleek dat de desintegratietijd daalde bij stijgende concentraties rhamnolipiden in de zaadencrusteringen. Rhamnolipiden zijn namelijk zeer goed wateroplosbaar en mede door hun surfactantactiviteit zal de encrustering dus sneller loskomen bij hogere concentraties rhamnolipiden.

4.4.4.2 Kiemkracht en fytoxiciteit

Een kiemttest werd uitgevoerd om te bepalen of er een effect was van de encrusteringen al dan niet in combinatie met de rhamnolipiden op de kiemkracht van de rijstzaden. De kiemkracht i.f.v. de RL-concentratie in de encrusteringen (met 5 % mowiol als sticker) was de volgende: een maximale kiemkracht werd waargenomen tussen 0 % en 20 % RL, waarna een sterke daling tussen 30 % en 50 % RL merkbaar was. Vanaf 50 % RL bleef deze vrij constant. Het lijkt er dus op dat lage RL-concentraties geen of licht fytoxische effecten op de zaden teweegbrengen, terwijl dat wel het geval is vanaf 30 % RL. Zoals eerder werd aangehaald, kunnen rhamnolipiden fytoxische effecten in verschillende plantensoorten vertonen en dus hoogstwaarschijnlijk ook bij rijst (Marecik et al., 2012). In de fytoxiciteitstest werden de gemiddelde scheut- en wortellengtes van de encrusteringen met 0 %, 50 %, 75 % en 100 % RL bepaald. Na zes dagen werden deze geëvalueerd en kon tot 75 % RL een gelijkaardig verloop als bij de kiemttest worden opgemerkt. De grootste scheut- en wortellengtes werden bekomen bij 0 % RL. De encrusteringen met 50 % en 75 % RL gaven aanleiding tot lagere waarden, die terug een stijgend verloop toonden tussen 75 % en 100 % RL. Over het algemeen werd bij stijgende RL-concentraties in de encrusteringen een inhibitie van de algemene ontwikkeling van de rijstzaden waargenomen.

Volgens de resultaten lijkt er dus een soort grens te zijn tussen 75 % RL en 100 % RL waar de rhamnolipiden opnieuw een significant stimulerend effect op de gemiddelde lengte van de wortel en scheut van de rijstzaailingen hebben. Er is een kans dat er tijdens het encrusteringsproces iets fout liep waardoor er in werkelijkheid minder dan 100 % RL in de zaadencrusteringen aanwezig waren. Gedurende het encrusteringsproces geldt namelijk dat hoe meer rhamnolipiden worden toegevoegd, hoe groter de kans wordt op verliezen tijdens het proces. Om deze theorie te bekrachtigen, moeten de RL-concentraties in de zaadencrusteringen analytisch worden bepaald via LC-MS/MS. Dit kon echter niet experimenteel worden uitgevoerd wegens de afwezigheid van een gevalideerde analysemethode. Daarnaast worden in de toekomst beter ook meerdere batchen met dezelfde RL-concentratie aangemaakt en getest om de reproduceerbaarheid te staven. Dit was binnen de thesis praktisch niet mogelijk.

Indien de effecten niet kunnen worden toegeschreven aan de werkelijk aanwezige RL-concentraties in de encrusteringen, zal de verklaring in de complexe fysicochemische eigenschappen van rhamnolipiden moeten worden gezocht. Ze vertonen namelijk sterke tenside-eigenschappen die tot anti-adhesieve interacties tussen vaste oppervlakken en gevormde biofilms kunnen leiden (Zezzi do Valle Gomes et al., 2012). De interactie van deze componenten met niet alleen de aanwezige encrustingsmaterialen, maar ook met de bodem, het bodemleven en het bodemvocht kan tot moeilijk verklaarbare effecten leiden. Ook hier wordt aangeraden om de mobiliteit en interactie van de rhamnolipiden met de omgeving analytisch en experimenteel na te gaan.

4.4.5 Bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden in de zaadencrusteringen (CO-39)

4.4.5.1 Massa, scheutlengte en wortellengte (met bodem)

Bij het meten van de massa, scheutlengte en wortellengte van de gezaaide (en uitgekomen) planten gedurende de plantenproef kon na vijf weken geen significant verschil tussen de gezonde controleplanten en de planten uit de zaden met zaadencrusteringen zonder rhamnolipiden worden aangetoond. Dit indiceert dat op lange termijn (vijf weken) het licht groei-inhiberend effect van de zaadencrusteringen kan worden verwaarloosd. De massa, scheutlengte en wortellengte van de zaden gecoat met 100 % RL konden echter slechts tot en met 2,5 weken na het zaaien worden opgevolgd wegens het tekort aan rijstplanten. Gedurende deze periode kon worden opgemerkt dat deze rijstplanten zich visueel beduidend trager ontwikkelden in vergelijking met de zaadencrusteringen met 0 % RL.

4.4.5.2 In planta inoculatieproeven

Om te bepalen of de rhamnolipiden in de zaadencrusteringen nog steeds een ISR-respons opwekken in de rijstplant, werden de zaadencrusteringen met rhamnolipiden (100%, 75% en 50%) in bodemsubstraat gezaaid. De werkzaamheid ervan werd zes weken na het zaaien aan de hand van het aantal sporulerende laesies op de bladeren van de rijstplanten bepaald. De planten die zich ontwikkelden uit de zaadencrusteringen met 100 % RL vertoonden een gelijkaardige ISR-respons als deze van de zaden die met de chemische controle BTH werden behandeld, dat eerder al resistentie in de rijstplanten tegen *P. oryzae* kon induceren (Omoboye et al., 2019). Daarnaast induceerden de encrusteringen met 100 % RL een significant hogere ISR-respons ten opzichte van de zieke controleplanten. Geen enkele van de zaadencrusteringen met 50 % RL en 75 % RL groeiden uit tot volwassen planten terwijl meer dan de helft van de zaadencrusteringen met 100 % RL dat wel deden. Dit resultaat ligt opnieuw in dezelfde lijn als tijdens de fytotoxiciteitstest werd bekomen, waar de zaadencrusteringen met 100 % RL een hogere scheut- en wortellengte vertoonden. Deze effecten kunnen mogelijk opnieuw worden toegeschreven aan de foutieve interpretatie van de werkelijk aanwezige concentratie aan rhamnolipiden wegens de afwezigheid van een gevalideerde analysemethode (LC-MS/MS). Ook bij de zaadencrusteringen zonder rhamnolipiden was het opkomstpercentage niet maximaal (ongeveer 77 %). Dit betekent dat ongeveer 23 % van de zaden niet in staat was om uit te groeien tot volwaardige rijstplanten. Dat de volledig uitgegroeide planten mogelijk sterker waren, kan ook verklaren waarom de zaadencrusteringen zonder rhamnolipiden een gelijkwaardige ISR-respons in de planten induceerden in vergelijking met de chemische controle. Daarnaast zal de aanwezigheid van de (vrij dikke) encrustering rond de zaden er hoogstwaarschijnlijk voor hebben gezorgd dat de planten al vanaf de kieming een zeker niveau van stress ondervonden

waardoor ze mogelijk minder vatbaar waren voor ziektes. De immuniteit van planten is namelijk geëvolueerd om veranderingen in het milieu te monitoren en is nauw verbonden met de detectie van abiotische stress. Dat zou dus betekenen dat abiotische stress immuniteit in de plant triggert (Saijo et al., 2020).

4.4.6 Aanwezigheid van MO's in de zaadencrusterings met rhamnolipiden

Uit de kiemttest en de fytotoxiciteitstest bleek dat de zaadencrusterings waren gecontamineerd met bepaalde schimmels. Om te bepalen welke schimmels aanwezig waren en om de bron van contaminatie te achterhalen, werden de zaadencrusterings met en zonder rhamnolipiden uitgeplaat op PDA-medium, alsook de zuivere natuurlijke rhamnolipiden. Dit resulteerde zowel bij de uitplantingen van de zaadencrusterings met rhamnolipiden als bij de natuurlijke rhamnolipiden in de groei van een schimmel m.n. *Aspergillus niger*. De encrusterings zonder rhamnolipiden vertoonden hier geen aanwezigheid van. Hieruit kan met voorzichtigheid worden geconcludeerd dat het gebruikte rhamnolipidenmateriaal was gecontamineerd. De rhamnolipiden dienen in de toekomst dus zeker steriel te worden aangeleverd, aangezien autoclaveren mogelijk de activiteit ervan wijzigt door de hoge temperaturen. Een studie van Noll et al. (2019) wees namelijk uit dat de activiteit van rhamnolipiden daalt bij temperaturen vanaf 37 °C (Noll et al., 2019). Over het algemeen is het gebruik van steriele materialen zeker cruciaal. Het is daarom heel belangrijk dat de encrusteringsmaterialen steriel worden aangeleverd ofwel plaatselijk worden geautoclaveerd. De carrier wordt tot driemaal toe geautoclaveerd; de sticker slechts eenmaal.

Indien niet meteen steriele encrusterings kunnen worden bekomen, is het toevoegen van fungiciden aan de zaadencrusterings een mogelijke oplossing. Zo is experimenteel gebleken dat het product Difend Extra (25 g/L difenoconazole en 25 g/L fludioxonil) effectief was in het weghouden van schimmels op de zaadencrusterings. Difend Extra is actief tegen verschillende door zaad en bodem overgedragen ziekten. Fludioxonil wordt vaak in de rijstteelt gebruikt voor de behandelingen van de zaailingen (Ko et al., 2014). Daarnaast kunnen de fungiciden propiconazole 250 EC, iprodione 50 WP en PCNB + triazole 29 EC de myceliumgroei en sporenproductie van *A. niger* inhiberen (Butranu et al., 1991). Ook de zaden van uien kunnen met verschillende fungiciden die werkzaam zijn tegen *A. niger* worden behandeld waaronder prochloraz en een mengsel van benomyl en thiram (Özer et al., 1998). Het gebruik van fungiciden in combinatie met rhamnolipiden kan een mogelijk piste zijn voor toekomstig onderzoek.

5 Conclusie

De zoektocht naar de ontwikkeling van een goede encrusteringsmethode om de rhamnolipiden te incorporeren in de zaadencrusterings kon opgedeeld worden in vier onderzoeksvragen. De eerste onderzoeksvraag luidde: *“Welke rhamnolipidenconcentraties induceren ISR in de rijstplant tegen P. oryzae en speelt het moment van toepassen hierbij een rol?”*. De beschouwde rhamnolipidenconcentraties waren 1 µM, 10 µM en 50 µM die op drie verschillende manieren aan de planten werden toegevoegd: een *seed dip* en een *soil mix* tijdens het planten en een *soil drench* net voor de inoculatie met de rijstpathogeen. Uit de plantenproef bleek dat het minst aantal sporulerende laesies werden gevormd na het toevoegen van 50 µM rhamnolipiden aan de planten. Deze concentratie is dus gebleken het meest effectief te zijn om een ISR-respons in de rijstplant op te wekken. Verder had het moment van toepassing van de rhamnolipiden (enkel tijdens het planten vs. enkel net voor de inoculatie) geen invloed op het induceren van een ISR-respons in de planten.

Daarnaast kon ook de tweede onderzoeksvraag worden beantwoord: *“Welke combinatie carrier en sticker maakt het mogelijk om een zaadencrustering op rijst te ontwikkelen zonder in te boeten op kieming en andere kwaliteitsparameters?”*. Verschillende carriers en stickers bleken voldoende compatibel om een zaadencrustering te vormen. De belangrijkste carriers waren kleimineralen zoals bentoniet, kaolien of een mengsel van bentoniet en talk, gecombineerd met de stickers methocel 1 %, carboxymethylcellulose 1 % en mowiol 10 %. Bij deze zaadencrusterings werden optimale resultaten voor de kwaliteitsparameters bekomen: een hoog opbouwrendement, een laag coatingsverlies door wrijving, een lage doorloopsnelheid en een hoge kiemkracht.

Vervolgens werd de derde onderzoeksvraag aangepakt: *“Hoe worden de zaadencrusterings het best geselecteerd opdat rhamnolipiden erin kunnen worden verwerkt en hoe worden deze best in de zaadencrustering verwerkt?”*. Hiervoor werd de laagverdeling van de zaadencrusterings aangepast waarbij voor een grondlaag:tussenlaag:toplaag-verhouding van 2:7:2 werd gekozen. Op die manier verzekerde de grondlaag het kleefvermogen met het zaadoppervlak, werden de rhamnolipiden verwerkt in de tussenlaag en zorgde de toplaag voor de optimale bescherming van de rhamnolipiden.

Tot slot werd de vierde en laatste onderzoeksvraag bestudeerd: *“Induceren de rhamnolipiden aanwezig in de zaadencrusterings een ISR-respons in de rijstplant tegen P. oryzae zonder in te boeten op de kieming en de ontwikkeling van rijstzaden?”*. Op deze onderzoeksvraag kon deels positief worden geantwoord waarbij de rhamnolipiden in de zaadencrusterings wel degelijk een ISR-respons in de rijstplant kunnen opwekken. Hierbij moest wel de nuance worden gemaakt dat de kieming en ontwikkeling van de rijstzaden nog niet optimaal genoeg verliep bij de zaadencrusterings met (te) hoge rhamnolipidenconcentraties. Na verder onderzoek moet het zeker mogelijk zijn om ook dit probleem te verhelpen.

6 Verder onderzoek

Deze studie biedt zeker mogelijkheden voor verder onderzoek. Door een mislukte plantenproef konden de vaststellingen van 25 μM , 200 μM en 300 μM op het induceren van een ISR-respons in de rijstplanten niet worden gevalideerd. Daardoor werden slechts drie concentraties rhamnolipiden op het induceren van een ISR-respons in rijstplanten getest: 1 μM , 10 μM en 50 μM . Het verder testen van meerdere rhamnolipidenconcentraties alsook het uitvoeren van meer herhalingen kan op die manier een duidelijker beeld geven van welke rhamnolipidenconcentraties de beste ISR-respons opwekken. Hiervoor kan dezelfde proefopzet als deze in de thesis worden gebruikt.

Verder kon de werkzaamheid van een aantal concentraties rhamnolipiden in de zaadencrusteringen binnen de tijd van de thesis niet in de bodem worden getest. Het gaat hier over de volgende massa's RL per zaadje (mg): 0,044; 0,112; 0,223 en 0,335. Van deze zaadencrusteringen is gebleken dat de kiemkracht niet of nauwelijks wordt beïnvloed door zowel de encrustering als de aanwezigheid van de rhamnolipiden. Deze encrusteringen bieden dus potentieel om ook een goede ISR-respons in de rijstplant op te wekken. Opnieuw kan dit eenvoudig worden bepaald door dezelfde proefopzet als deze in de thesis te volgen.

In deze thesis is het tevens niet gelukt om de detectiemethode van rhamnolipiden in de bodem te optimaliseren volgens zure precipitatie. Andere technieken zoals ammoniumsulfaatprecipitatie, zinksulfaatprecipitatie en solventextractie kunnen hierbij verder worden onderzocht. Wegens de afwezigheid van een gevalideerde analysemethode via de LC-MS/MS kon niet experimenteel worden bepaald hoeveel rhamnolipiden effectief in de zaadencrusteringen aanwezig waren. Het valideren van de analysemethode is dus essentieel.

Aangezien reeds een goede encrusteringsmethode werd ontwikkeld om rhamnolipiden in zaadencrusteringen te verwerken, zou het ook uitermate interessant zijn om RL-producerende MO's zoals *Pseudomonas aeruginosa* in de zaadencrusteringen te verwerken. Wat *P. aeruginosa* betreft, moet uiteraard rekening worden gehouden met de humane pathogene eigenschappen. De MO's kunnen eventueel in het carriermateriaal worden opgekweekt, dat mits de juiste samenstelling na het drogen op de zaden kan worden aangebracht. Op basis van het meest geschikte carriermateriaal kan een aangepaste encrusteringsmethode worden ontwikkeld.

Aangezien de beschikbaarheid van de natuurlijke rhamnolipiden helaas niet in bulkhoeveelheden beschikbaar waren en de zaden van de CO-39 rijstvariëteit telkens manueel moesten worden ontkaft alvorens ze werden gecoat, werden verschillende potentiële combinaties van carriers en stickers niet getest op deze zaden zoals: bentoniet/talk + methocel 1 %, bentoniet/talk + polyvinylalcohol 20 % ($M = 9000 - 10000 \text{ g/mol}$), bentoniet/talk + polyvinylalcohol 10 % ($M = 31000 - 50000 \text{ g/mol}$) en bentoniet/talk + polyvinylpyrrolidine 5 %. Dit kan dus in de toekomst verder worden onderzocht.

7 Bibliografie

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A. H. (2009). Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 329–345. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8285-1>
- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1323–1336. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>
- Ad Terram BV. (n.d.). *Encrusting & Pelleting*. <https://ad-terram.nl/products/encrustingpelleting/>
- Afzal, I., Javed, T., Amirkhani, M., & Taylor, A. G. (2020). Modern seed technology: Seed coating delivery systems for enhancing seed and crop performance. *Agriculture (Switzerland)*, 10(11), 1–20. <https://doi.org/10.3390/agriculture10110526>
- Ahn, I. P., Lee, S. W., & Sun, S. C. (2007). Rhizobacteria-induced priming in *Arabidopsis* is dependent on ethylene, jasmonic acid, and NPR1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(7), 759–768. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-7-0759>
- Aizawa, H. (2013). Fluopicolide. *Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics*, 235, 1–4. <https://doi.org/10.1002/9781118541203.xen172>
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A., & Maier, R. M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3262–3268. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3262-3268.2000>
- Amirkhani, M., Mayton, H. S., Netravali, A. N., & Taylor, A. G. (2019). A seed coating delivery system for bio-based biostimulants to enhance plant growth. *Sustainability (Switzerland)*, 11(19). <https://doi.org/10.3390/su11195304>
- Ansari, R. A., & Mahmood, I. (2019). Plant health under biotic stress. In *Plant Health Under Biotic Stress* (Vol. 1, Issue October). <https://doi.org/10.1007/978-981-13-6043-5>
- Arino, S., Marchal, R., & Vandecasteele, J. P. (1998). Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 769–776. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00412.x>
- Avelar, S. A. G., Sousa, F. V. de, Fiss, G., Baudet, L., & Peske, S. T. (2012). The use of film coating on the performance of treated corn seed. *Revista Brasileira de Sementes*, 34(2), 186–192. <https://doi.org/10.1590/s0101-31222012000200001>
- Bardin, S. D., & Huang, H. (2003). Efficacy of Stickers for Seed Treatment with Organic Matter or Microbial Agents for the Control of Damping-off of Sugar Beet. *Plant Pathology Bulletin*, 19–26. <http://140.112.183.1/cpps/pdf/12-1/12-1-3.pdf>
- BC Bank. (2020). *Magnaporthe oryzae*. http://www.mycobank.org/name/Magnaporthe_oryzae
- Bell, J. V., Stewart, A., & Rowarth, J. S. (2000). Application method and growing medium affects the response of cucumber seedlings to inoculation with *Trichoderma harzianum*. *Australasian Plant Pathology*, 29(1), 15–18. <https://doi.org/10.1071/ap00002>
- Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., & Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 85(1), 1–8. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020148.45523.41>

- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379–407. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Butranu, W., Suriya, S., & Somabhi, M. (1991). *Chemical control on peanut crown rot (Aspergillus niger)*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TH1997020242>
- CABI. (2019). *Magnaporthe oryzae (rice blast disease)*. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/46103#totaxonomicTree>
- Cav, O., & Kim, C. (1986). *Effect of Water-Management on the Etiology and Epidemiology of Rice Blast Caused by Pyricularia U TA / T-T*.
- CGIAR. (n.d.). *Growth phases*. <http://ricepedia.org/rice-as-a-plant/growth-phases#:~:text=Germination&text=To germinate%2C rice seeds need,shoot has reached the air>.
- CGIAR. (2016). *Importance of rice*. <http://ricecrp.org/importance-of-rice/>
- Champion, J. T., Gilkey, J. C., Lamparski, H., Retterer, J., & Miller, R. M. (1995). Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: Effects of pH, cadmium, and octadecane. In *Journal of Colloid And Interface Science* (Vol. 170, Issue 2, pp. 569–574). <https://doi.org/10.1006/jcis.1995.1136>
- Chen, W. C., Chiou, T. Y., Delgado, A. L., & Liao, C. Sen. (2019). The control of rice blast disease by the novel biofungicide formulations. *Sustainability (Switzerland)*, 11(12), 1–9. <https://doi.org/10.3390/su10023449>
- Chong, H., & Li, Q. (2017). Microbial production of rhamnolipids: Opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0753-2>
- Cliquet, S., & Scheffer, R. J. (1997). Influence of culture conditions on growth and survival of conidia of *Trichoderma* spp. coated on seeds. *Biocontrol Science and Technology*, 7(2), 171–182. <https://doi.org/10.1080/09583159730875>
- Cohen, R., & Exerowa, D. (2007). Surface forces and properties of foam films from rhamnolipid biosurfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 134–135, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.04.018>
- Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., Van Delden, C., Kocjancic Curty, L., & Köhler, T. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *Journal of Bacteriology*, 184(11), 3027–3033. <https://doi.org/10.1128/JB.184.11.3027-3033.2002>
- Covance. (2020). *EU Reach*. [https://www.covance.com/services/product-testing/chemical-testing/regulatory-consultancy/regulatory-support-for-all-global-regulations/eu-reach.html?keyword=reach regulation&gclid=CjwKCAiA25v_BRBNEiwAZb4-ZaY-3znRVzy4EI8eoHFyF_I1tu5n4VjXDAAdtCfMw1PM5poXP9bn](https://www.covance.com/services/product-testing/chemical-testing/regulatory-consultancy/regulatory-support-for-all-global-regulations/eu-reach.html?keyword=reach%20regulation&gclid=CjwKCAiA25v_BRBNEiwAZb4-ZaY-3znRVzy4EI8eoHFyF_I1tu5n4VjXDAAdtCfMw1PM5poXP9bn)
- Croda International Plc. (2020). *Encrusting and pelleting*. <https://www.incotec.com/en-gb/technologies/encrusting-and-pelleting>
- Crouzet, J., Arguelles-Arias, A., Dhondt-Cordelier, S., Cordelier, S., Pršić, J., Hoff, G., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Baillieul, F., Clément, C., Ongena, M., & Dorey, S. (2020). Biosurfactants in Plant Protection Against Diseases: Rhamnolipids and Lipopeptides Case Study. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.01014>
- D'aes, J., De Maeyer, K., Pauwelyn, E., & Höfte, M. (2010). Biosurfactants in plant-*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. *Environmental Microbiology Reports*, 2(3), 359–372. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00104.x>

- De Jonghe, K., De Dobbelaere, I., Sarrazyn, R., & Höfte, M. (2005). Control of *Phytophthora cryptogea* in the hydroponic forcing of witloof chicory with the rhamnolipid-based biosurfactant formulation PRO1. *Plant Pathology*, *54*(2), 219–226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01140.x>
- de Mey, Y., & Demont, M. (2013). Bird damage to rice in Africa: evidence and control. *Realizing Africa's Rice Promise*, 241–249. <https://doi.org/10.1079/9781845938123.0241>
- De Vleeschauwer, D., Djavaheri, M., Bakker, P. A. H. M., & Höfte, M. (2008). *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiology*, *148*(4), 1996–2012. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127878>
- Díaz De Rienzo, M. A., Kamalanathan, I. D., & Martin, P. J. (2016). Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. *Process Biochemistry*, *51*(7), 820–827. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.007>
- Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: Towards an integrated view of plant-€" pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, *11*(8), 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Dow. (n.d.). *XIAMETER™ AFE-1510 Antifoam Emulsion*. <https://www.dow.com/en-us/pdp.xiameter-afe-1510-antifoam-emulsion.01943448z.html>
- ECHA. (n.d.-a). *Legislation*. <https://echa.europa.eu/nl/regulations/reach/legislation>
- ECHA. (n.d.-b). *Rhamnolipids: fermentation products of glucose with Pseudomonas bacteria*. <https://echa.europa.eu/nl/substance-information/-/substanceinfo/100.242.705>
- Eslami, P., Hajfarajollah, H., & Bazsefidpar, S. (2020). Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*, *10*(56), 34014–34032. <https://doi.org/10.1039/d0ra04953k>
- Eurofins Scientific. (2015). *Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS)*. <https://www.eag.com/techniques/mass-spec/lc-ms-ms/#:~:text=Liquid Chromatography with tandem mass,of triple quadrupole mass spectrometry.>
- Euroseeds. (n.d.-a). *Dust reference values Heubach test method*. <https://www.euroseeds.eu/esta-the-european-seed-treatment-assurance-industry-scheme/dust-reference-values-heubach-test-method/>
- Euroseeds. (n.d.-b). *ESTA*. <https://www.euroseeds.eu/esta-the-european-seed-treatment-assurance-industry-scheme/>
- Euroseeds. (n.d.-c). *ESTA Standaard ESTA Checklist ESTA Governance*. <https://www.euroseeds.eu/esta-the-european-seed-treatment-assurance-industry-scheme/esta-standard-checklist-2/>
- Euroseeds. (2017). *ESTA Standard European Seed Treatment Assurance. February*, 1–17.
- FAO. (2020). *FAOSTAT*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- FBN Network. (2019). *Seed Treatment Basics: Do you know what's being added to your seed?* <https://emergence.fbn.com/agronomy/seed-treatment-basics-do-you-know-whats-being-added-to-your-seed>
- Fytoweb. (2015). *Formuleringstype: FS (Suspensieconcentraat voor zaadbehandeling)*. <https://fytoweb.be/nl/toelatingen>
- Fytoweb. (2021). *Intrekking van de toelatingen van middelen op basis van mancozeb*. <https://fytoweb.be/nl/nieuws/intrekking-van-de-toelatingen-van-middelen-op-basis-van-mancozeb>

- Galhano, R., & Talbot, N. J. (2011). The biology of blast: Understanding how *Magnaporthe oryzae* invades rice plants. *Fungal Biology Reviews*, 25(1), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2011.01.006>
- Gatch, E. (2016). *Organic Seed Treatments and Coatings*. <https://eorganic.org/node/749>
- Glazacheva, E. N., Uspenskaya, M. V., & Strelnikova, I. E. (2015). Bentonite acrylic copolymers modified as effective oil absorbents. *Water Resources Management VIII*, 1, 529–535. <https://doi.org/10.2495/wrm150451>
- Globachem. (2021). *Difend Extra*. <https://www.globachem.com/en/agrochemicals/difend-extra#>
- Gorim, L. (2014). Effects of seed coating on germination and early seedling growth in cereals. *Dissertation*, 1–132.
- GRISP. (2013). Rice Almanac. In *IRRI, Los Baños, Philippines*. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Rice+Almanac#1>
- Gunther IV, N. W., Nuñez, A., Fett, W., & Solaiman, D. K. Y. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2288–2293. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2288-2293.2005>
- Guo, Y. P., & Hu, Y. Y. (2014). Solubilization of moderately hydrophobic 17 α -ethinylestradiol by mono- and di-rhamnolipid solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 445, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.076>
- Guo, Y. P., Hu, Y. Y., Gu, R. R., & Lin, H. (2009). Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331(2), 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.11.039>
- Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M. J., Infante, M. R., & Manresa, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(3), 316–322. <https://doi.org/10.1002/bit.10474>
- Halecky, A., Ren, N., Lu, J., Wang, J. Q., & Lockwood, F. E. (2016). Correlation of the mechanical properties of seed coating films and dust-off, flowability, and plantability tests. *ASTM Special Technical Publication, STP 1595*(September), 183–201. <https://doi.org/10.1520/STP159520160082>
- Halmer, P. (2008). Seed technology and seed enhancement. *Acta Horticulturae*, 771(2), 17–26. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.771.1>
- Hase, S., Takahashi, S., Takenaka, S., Nakaho, K., Arie, T., Seo, S., Ohashi, Y., & Takahashi, H. (2008). Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathology*, 57(5), 870–876. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01858.x>
- Helvac, S. S., Peker, S., & Özdemir, G. (2004). Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35(3–4), 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.01.001>
- Hofer, M., Hampton, R. Y., Raetz, C. R. H., & Yu, H. (1991). Aggregation behavior of lipid IVA in aqueous solutions at physiological pH. 1: Simple buffer solutions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 59(2), 167–181. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(91\)90005-V](https://doi.org/10.1016/0009-3084(91)90005-V)
- Höfte, M. (2018). *Gewasbescherming*.
- Höfte, M. (2019). *Gewasbeschadigers: plantenziekten*.

- Hogan, D. E., Tian, F., Malm, S. W., Olivares, C., Palos Pacheco, R., Simonich, M. T., Hunjan, A. S., Tanguay, R. L., Klimecki, W. T., Polt, R., Pemberton, J. E., Curry, J. E., & Maier, R. M. (2019). Biodegradability and toxicity of monorhamnolipid biosurfactant diastereomers. *Journal of Hazardous Materials*, 364(September 2018), 600–607. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.050>
- Hollander, M., & Wolfe, D. A. (n.d.). *Nonparametric Statistical Methods SECOND EDITION*.
- Ibrahim, J., Chen, M.-H., & Sinha, D. (2009). Simultaneous Statistical Inference. In *The Elements of Statistical Learning* (Vol. 27, Issue 2). <http://www.springerlink.com/index/D7X7KX6772HQ2135.pdf>
- ILVO. (2020). *Heubach dustmeter*. <https://www.ilvo.vlaanderen.be/spraytechlab/Spraytechlab/Experimentalfacilities/Heubachdustmeter/tabid/6532/language/en-US/Default.aspx>
- Imerys. (2021). *Bentonite*. <https://www.imerys.com/minerals/bentonite#:~:text=Bentonite presents strong colloidal properties,water absorption%2C viscosity and thixotropy.>
- IRRI. (2007). *Introduction to Integrated Pest Management (IPM)*. http://www.knowledgebank.irri.org/ericeproduction/V.1_Pest_and_IPM_.htm
- IRRI. (2019). *JFE Steel Joins Direct Seeded Rice Consortium, tests for performance of Iron-Coating Technology of rice in Asia*. <https://www.irri.org/news-and-events/news/jfe-steel-joins-direct-seeded-rice-consortium-tests-performance-iron-coating>
- Jadhav, J., Dutta, S., Kale, S., & Pratap, A. P. (2018). *Fermentative production of Rhamnolipid and purification by adsorption chromatography*. *Fermentative production of Rhamnolipid and purification by adsorption chromatography*, 6068(January), 0–33. <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1421967>
- Jaiswal, S. K., Mohammed, M., Ibny, F. Y. I., & Dakora, F. D. (2021). Rhizobia as a Source of Plant Growth-Promoting Molecules: Potential Applications and Possible Operational Mechanisms. In *Frontiers in Sustainable Food Systems* (Vol. 4). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.619676>
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J. P., Thonart, P., & Ongena, M. (2009). Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(4), 456–468. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-4-0456>
- Kangsopa, J., Hynes, R. K., & Siri, B. (2018). Lettuce seeds pelleting: A new bilayer matrix for lettuce (*Lactuca sativa*) seeds. *Seed Science and Technology*, 46(3), 521–531. <https://doi.org/10.15258/sst.2018.46.3.09>
- Kaufman, G. (2018). Seed Coating: A Tool for Stand Establishment; a Stimulus to Seed Quality. *HortTechnology*, 1(1), 98–102. <https://doi.org/10.21273/horttech.1.1.98>
- Keifer, G., & Effenberger, F. (1992). Statistical Models in S edited by John M. Chambers and Trevor J. Hastie. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.
- Kingwell-Banham, E. (2019). Dry, rainfed or irrigated? Reevaluating the role and development of rice agriculture in Iron Age-Early Historic South India using archaeobotanical approaches. *Archaeological and Anthropological Sciences*, 11(12), 6485–6500. <https://doi.org/10.1007/s12520-019-00795-7>
- Kloepper, J. W. (1981). Development of a Powder Formulation of Rhizobacteria for Inoculation of Potato Seed Pieces. *Phytopathology*, 71(6), 590. <https://doi.org/10.1094/phyto-71-590>

- Knowles, A. (2008). Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *Environmentalist*, 28(1), 35–44. <https://doi.org/10.1007/s10669-007-9045-4>
- Ko, A.-Y., Abd El-Aty, A. M., Jang, J., Choi, J.-H., Rahman, M. M., Kim, S.-W., Shin, H.-C., & Shim, J.-H. (2014). *Detecting fludioxonil residues in brown rice and rice straw using gas chromatography-nitrogen phosphorus detector*. <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0040-z>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10(July), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Kongcharoen, N., Kaewsalong, N., & Dethoup, T. (2020). Efficacy of fungicides in controlling rice blast and dirty panicle diseases in Thailand. *Scientific Reports*, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73222-w>
- Konrad, K., Vieira, J., Marschalek, R., de, A., & Wickert, E. (2012). Magnaporthe oryzae Genetic Diversity and Its Outcomes on the Search for Durable Resistance. *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*, March. <https://doi.org/10.5772/33479>
- Linares, O. F. (2002). African rice (*Oryza glaberrima*): History and future potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 16360–16365. <https://doi.org/10.1073/pnas.252604599>
- Liu, H., Hussain, S., Zheng, M., Peng, S., Huang, J., Cui, K., & Nie, L. (2014). Dry direct-seeded rice as an alternative to transplanted-flooded rice in Central China. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 285–294. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0239-0>
- Long, D. H., Lee, F. N., & TeBeest, D. O. (2000). Effect of nitrogen fertilization on disease progress of rice blast on susceptible and resistant cultivars. *Plant Disease*, 84(4), 403–409. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.403>
- Luiz, V., Lovaglio, R. B., Tozzi, H. H., & Contiero, J. (2015). *Rhamnolipids : A New Application in Seeds Development*. 1(8), 100–106.
- Maier, R. M., & Soberón-Chávez, G. (2000). Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: Biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(5), 625–633. <https://doi.org/10.1007/s002530000443>
- Maldonado, R. F., Sá-Correia, I., & Valvano, M. A. (2016). Lipopolysaccharide modification in gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 480–493. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>
- Marcel, S., Paszkowski, U., Sawers, R., Oakeley, E., & Angliker, H. (2010). Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. *Plant Cell*, 22(9), 3177–3187. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.078048>
- Marecik, R., Wojtera-Kwiczor, J., Ławniczak, Ł., Cyplik, P., Szulc, A., Piotrowska-Cyplik, A., & Chrzanowski, Ł. (2012). Rhamnolipids increase the phytotoxicity of diesel oil towards four common plant species in a terrestrial environment. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(7), 4275–4282. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1190-9>
- Marshall, & Roberts. (1963). *Influence of Fine Particle Materials on Survival of Rhizobium trifolii in Sandy Soil*.
- Martínez-Álvarez, J. C., Castro-Martínez, C., Sánchez-Peña, P., Gutiérrez-Dorado, R., & Maldonado-Mendoza, I. E. (2016). Development of a powder formulation based on Bacillus cereus sensu lato strain B25 spores for biological control of Fusarium verticillioides in maize plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(5). <https://doi.org/10.1007/s11274-015-2000-5>

- Mei, J., Wang, W., Peng, S., & Nie, L. (2017). Seed Pelleting with Calcium Peroxide Improves Crop Establishment of Direct-seeded Rice under Waterlogging Conditions. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04966-1>
- Millioli, V. S., Servulo, E. L. C., Sobral, L. G. S., & De Carvalho, D. D. (2009). Bioremediation of crude oil-bearing soil: Evaluating the effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. *Global Nest Journal*, 11(2), 181–188.
- Moldenhauer, K., Counce, P., & Hardke, J. (2016). *Rice Growth and Development*. 9–20.
- Monnier, N., Furlan, A., Botcazon, C., Dahi, A., Mongelard, G., Cordelier, S., Clément, C., Dorey, S., Sarazin, C., & Rippa, S. (2018). Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* are elicitors triggering *Brassica napus* protection against *Botrytis cinerea* without physiological disorders. *Frontiers in Plant Science*, 9(August), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01170>
- Mortvedt, J. J. (1994). Needs for controlled-availability micronutrient fertilizers. *Fertilizer Research*, 38(3), 213–221. <https://doi.org/10.1007/BF00749694>
- MU. (2021). *Rice Disease Management*. <https://extension.missouri.edu/programs/rice-extension/rice-diseases/rice-disease-management>
- Mulligan, C. N. (2007). Rhamnolipid biosurfactants: Solubility and environmental issues. *Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues*, 279–298. <https://doi.org/10.1016/B978-044452707-3/50017-3>
- Mulvaney, D. (2019). Green New Deal. *Solar Power*, 47–65. <https://doi.org/10.2307/j.ctvd1c6zh.7>
- Nelson, A., Setiyono, T., Rala, A. B., Quicho, E. D., Raviz, J. V., Abonete, P. J., Maunahan, A. A., Garcia, C. A., Bhatti, H. Z. M., Villano, L. S., Thongbai, P., Holecz, F., Barbieri, M., Collivignarelli, F., Gatti, L., Quilang, E. J. P., Mabalay, M. R. O., Mabalot, P. E., Barroga, M. I., ... Ninh, N. H. (2014). Towards an operational SAR-based rice monitoring system in Asia: Examples from 13 demonstration sites across Asia in the RIICE project. *Remote Sensing*, 6(11), 10773–10812. <https://doi.org/10.3390/rs61110773>
- Nihorimbere, V., Ongena, M., Smargiassi, M., & Thonart, P. (2011). *Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health*. 15(2), 327–337.
- Noll, P., Treinen, C., Müller, S., Senkalla, S., Lilge, L., Hausmann, R., & Henkel, M. (2019). *Evaluating temperature-induced regulation of a ROSE-like RNA-thermometer for heterologous rhamnolipid production in Pseudomonas putida KT2440*. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0883-5>
- Novembre, F., Dionisa A. (2011). *Pearl millet seed pelleting*.
- Ochoa-Loza, F. J., Artiola, J. F., & Maier, R. M. (2001). Stability Constants for the Complexation of Various Metals with a Rhamnolipid Biosurfactant. *Journal of Environmental Quality*, 30(2), 479–485. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.302479x>
- Ochsner, U. A., Fiechter, A., & Reiser, J. (1994). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 19787–19795.
- Omoboye, O. O., Oni, F. E., Batool, H., Yimer, H. Z., De Mot, R., & Höfte, M. (2019). *Pseudomonas* cyclic lipopeptides suppress the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* by induced resistance and direct antagonism. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00901>
- Özer, N., & Köycü, N. D. (1998). *Evaluation of seed treatments for controlling Aspergillus niger and Fusarium oxysporum on onion seed* Author (s): N . Özer and N . D . Köycü Published by : Firenze University Press on behalf of the Mediterranean Phytopathological Union Stable URL : <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00901>, 33–40.

- Pacwa-Płociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 633–654. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>
- Paderes, D. E., Mew, T. W., & Ilag, L. L. (1997). Influence of Moisture Content and Length of Storage on Fungal Invasion of Paddy Rice. *Biotropia*, 0(10), 1–13. <https://doi.org/10.11598/btb.1997.0.10.129>
- Paulino, B. N., Pessôa, M. G., Mano, M. C. R., Molina, G., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2016). Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(24), 10265–10293. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7980-z>
- Pedrini, S., Bhalsing, K., Cross, A. T., & Dixon, K. W. (2018). Protocol Development Tool (PDT) for seed encrusting and pelleting. *Seed Science and Technology*, 46(2), 393–405. <https://doi.org/10.15258/sst.2018.46.2.21>
- Pedrini, S., Merritt, D. J., Stevens, J., & Dixon, K. (2017). Seed Coating: Science or Marketing Spin? *Trends in Plant Science*, 22(2), 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.002>
- Penn State. (2020). *Pesticide seed coatings are widespread but underreported*. <https://www.sciencedaily.com/releases/2020/03/200317215632.htm#:~:text=Seed-coated pesticides -- such,an international team of researchers.>
- PGG Wrightson Seeds. (n.d.). *Seed Treatment Product Guide*.
- PGG Wrightson Seeds. (2020). *Benefits of seed treatment*. <https://www.seedtreatment.co.nz/about/benefits-of-seed-treatment.html>
- Pieterse, C. M. J., Wees, S. C. M. Van, Pelt, J. A. Van, Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., & Loon, L. C. Van. (1998). A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. 10(September), 1571–1580.
- Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C. M., & Bakker, P. A. H. M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pineda, A., Zheng, S. J., van Loon, J. J. A., Pieterse, C. M. J., & Dicke, M. (2010). Helping plants to deal with insects: The role of beneficial soil-borne microbes. *Trends in Plant Science*, 15(9), 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.05.007>
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2013). *Biocontrol of Plant Pathogens Using Plant Growth Promoting Bacteria* (Issue January). https://doi.org/10.1007/978-94-007-5961-9_10
- PubChem. (n.d.). *Kaolin, light*. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kaolin_light
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S., & Soberón-Chávez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology*, 40(3), 708–718. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02420.x>
- Remichkova, M., Galabova, D., Roeva, I., Karpenko, E., Shulga, A., & Galabov, A. S. (2008). Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas* sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 63(1–2), 75–81. <https://doi.org/10.1515/znc-2008-1-214>
- Rice Knowledge Bank. (n.d.-a). *How to manage pests and diseases*. <http://www.knowledgebank.irri.org/step-by-step-production/growth/pests-and-diseases>

- Rice Knowledge Bank. (n.d.-b). *Root knot nematode*. http://www.knowledgebank.irri.org/training/fact-sheets/item/root-knot?category_id=385
- Rice Knowledge Bank. (n.d.-c). *Snails*. <http://www.knowledgebank.irri.org/training/fact-sheets/pest-management/item/golden-apple-snails-fact-sheet>
- Rice Knowledge Bank. (2020). *Wet direct seeding*. <http://www.knowledgebank.irri.org/training/fact-sheets/crop-establishment/item/wet-direct-seeding-fact-sheet>
- Ricepedia. (n.d.). *Cultivated rice species*. <http://ricepedia.org/rice-as-a-plant/rice-species/cultivated-rice-species>
- Rocha, I., Duarte, I., Ma, Y., Souza-Alonso, P., Látr, A., Vosátka, M., Freitas, H., & Oliveira, R. S. (2019). Seed coating with arbuscular mycorrhizal fungi for improved field production of chickpea. *Agronomy*, 9(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/agronomy9080471>
- Rocha, I., Ma, Y., Souza-Alonso, P., Vosátka, M., Freitas, H., & Oliveira, R. S. (2019). Seed Coating: A Tool for Delivering Beneficial Microbes to Agricultural Crops. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01357>
- Rodrigues, A. I., Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2017). Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13424-x>
- Romera, F. J., García, M. J., Lucena, C., Medina, A. M., Aparicio, M. Á., Ramos, J., Alcántara, E., Angulo, M., & Pérez-, R. (2019). *Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00287>
- Royston, J. P. (1982). An Extension of Shapiro and Wilk ' s W Test for Normality to Large Samples Author(s): J . P . Royston Source : Applied Statistics , Vol . 31 , No . 2 (1982), pp . 115-124 Published by : Blackwell Publishing for the Royal Statistical Society Stable UR. *Applied Statistics*, 31(2), 115–124.
- Saijo, Y., & Loo, E. P. iian. (2020). Plant immunity in signal integration between biotic and abiotic stress responses. *New Phytologist*, 225(1), 87–104. <https://doi.org/10.1111/nph.15989>
- Schoina, C., Stringlis, I. A., Pantelides, I. S., Tjamos, S. E., & Paplomatas, E. J. (2011). Evaluation of application methods and biocontrol efficacy of *Paenibacillus alvei* strain K-165, against the cotton black root rot pathogen *Thielaviopsis basicola*. *Biological Control*, 58(1), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.04.002>
- Scott, J. M. (1989). Seed Coatings and Treatments and Their Effects on Plant Establishment. *Advances in Agronomy*, 42(C), 43–83. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60523-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60523-4)
- Scott, J. M. (1998). Delivering Fertilizers Through Seed Coatings. *Journal of Crop Production*, 1(2), 197–220. https://doi.org/10.1300/J144v01n02_08
- Scott, J. M., & Blair, G. J. (1988a). Phosphorus seed coatings for pasture species. I. Effect of source and rate of phosphorus on emergence and early growth of phalaris (*Phalaris aquatica* L.) and lucerne (*Medicago sativa* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 39(3), 437–445. <https://doi.org/10.1071/AR9880437>
- Scott, J. M., & Blair, G. J. (1988b). Phosphorus seed coatings for pasture species. II* Comparison of effectiveness of phosphorus applied as seed coatings, drilled or broadcast, in promoting early growth of phalaris (*Phalaris aquatica* L.) and lucerne (*Medicago sativa* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 39(3), 447–455. <https://doi.org/10.1071/AR9880447>

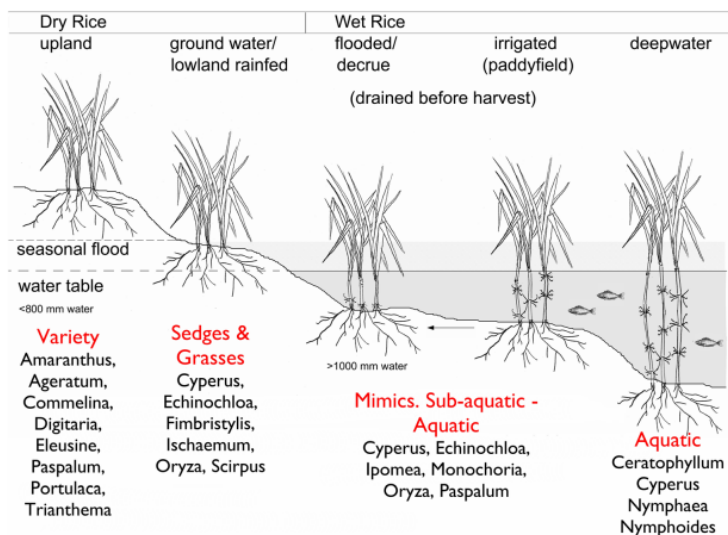
- Sensient Colors LLC. (2020). *Seed Flowability: Beyond Talc and Graphite*. <https://www.sensientindustrial.com/emea/color-insights/beyond-talc-and-graphite#:~:text=%22Talc fills the pores%2C smoothes,seeds%2C and improves flowability.%22&text=Like talc%2C graphite also provides the benefits of a dry lubricant.>
- Shah, J., & Zeier, J. (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4(FEB), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00030>
- Shah, Sivapragasam, M., Moniruzzaman, M., & Yusup, S. B. (2016). A comparison of Recovery Methods of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. *Procedia Engineering*, 148, 494–500. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.538>
- Sharifi-Tehrani, A., Ahmadzadeh, M., Farzaneh, M., & Sarani, S. (2006). *Powder formulations of two strains of Bacillus subtilis for control of rape seed damping-off caused by Rhizoctonia solani*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17390784/>
- Sikhao, P., Taylor, A. G., Marino, E. T., Catranis, C. M., & Siri, B. (2015). *Development of seed agglomeration technology using lettuce and tomato as model vegetable crop seeds*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20153121710>
- Silva, S. N. R. L., Farias, C. B. B., Rufino, R. D., Luna, J. M., & Sarubbo, L. A. (2010). Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(1), 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050>
- Sinterface. (n.d.). *Methods for surface and interfacial tension measurements*. <http://www.sinterface.com/service/fundamentals/methods/index.html>
- Soberón-chávez, G., Abdel-mawgoud, A. M., Hausmann, R., & Lépine, F. (2010). *Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation and Bioengineering of Production*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5>
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 718–725. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0150-3>
- Sotirova, A. V., Spasova, D. I., Galabova, D. N., Karpenko, E., & Shulga, A. (2008). Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Current Microbiology*, 56(6), 639–644. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9139-3>
- Spanoghe, P. (2020). *Fytofarmacie*.
- Spanoghe, P., & De Rop, J. (2020). *Practicumnotities Fytofarmacie*.
- Stanghellini, M. E., & Miller, R. M. (1997). Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Disease*, 81(1), 4–12. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.1.4>
- State of Queensland. (2017). *Kaolin*. <https://ipmguidelinesforgrains.com.au/ipm-information/cultural-and-physical-control/kaolin/>
- Statistica. (2020a). *Leading countries based on the production of milled rice in 2018/2019*. <https://www.statista.com/statistics/255945/top-countries-of-destination-for-us-rice-exports-2011/>
- Statistica. (2020b). *World production volume of milled rice from 2008/2009 to 2019/2020*. <https://www.statista.com/statistics/271972/world-husked-rice-production-volume-since-2008/>
- Stout, M. J., & Lanka, S. K. (2015). Insecticidal Seed Treatments in Rice. *Rice Research: Open Access*, 03(02), 2014–2015. <https://doi.org/10.4172/2375-4338.1000e112>
- Suma, N., Srimathi, P., & Sumathi, S. (2010). Influence of Seed Priming Techniques on Seed Quality of Sesame (*Sesamum indicum* L .). *Madras Agric. J.*, 97(March), 21–22.

- Suo, H. C., Wang, K. H., Ashraf, U., Liu, J. H., Hu, J. G., Li, Z. J., Zhang, X. L., Xie, J., & Zheng, J. R. (2017). Plant growth regulators in seed coating agent affect seed germination and seedling growth of sweet corn. *Applied Ecology and Environmental Research*, 15(4), 829–839.
- Swaminathan, J., van Koten, C., Henderson, H. V., Jackson, T. A., & Wilson, M. J. (2016). Formulations for delivering *Trichoderma atroviridae* spores as seed coatings, effects of temperature and relative humidity on storage stability. *Journal of Applied Microbiology*, 120(2), 425–431. <https://doi.org/10.1111/jam.13006>
- Taylor, A. G., & Harman, G. E. (1990). Selected Seed Treatments. *New York, d*, 321–339.
- TeBeest, D. O., Guerber, C., & Dittmore, M. (2007). *Rice blast*. <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalasco/pdlessons/Pages/RiceBlast.aspx>
- Telebanco-Yanoria, M. J., Koide, Y., Fukuta, Y., Imbe, T., Tsunematsu, H., Kato, H., Ebron, L. A., Nguyen, T. M. N., & Kobayashi, N. (2011). A set of near-isogenic lines of Indica-type rice variety CO 39 as differential varieties for blast resistance. *Molecular Breeding*, 27(3), 357–373. <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9437-x>
- Thuan, N. T. N., Bigirimana, J., Roumen, E., Van Der Straeten, D., & Höfte, M. (2006). Molecular and pathotype analysis of the rice blast fungus in North Vietnam. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), 381–396. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-0002-8>
- Tiso, T., Thies, S., Müller, M., Tsvetanova, L., Carraresi, L., Bröring, S., Jaeger, K., & Blank, L. M. (2016). Rhamnolipids: Production, Performance, and Application. In *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31421-1>
- Ton, J., & Jakab, G. (2007). *Dissecting the β -Aminobutyric Acid – Induced Priming Phenomenon in Arabidopsis*. 17(March 2005), 987–999. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029728.2>
- Upadhyay, K., & Bhatta, B. (2020). Rice Blast (*Magnaporthe oryzae*) Management: A Review . *Agricultural Journal*, 15(3), 42–48. <https://doi.org/10.36478/aj.2020.42.48>
- Van Der Ent, S., Van Hulten, M., Pozo, M. J., Czechowski, T., Udvardi, M. K., Pieterse, C. M. J., & Ton, J. (2009). Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and β -aminobutyric acid: Differences and similarities in regulation. *New Phytologist*, 183(2), 419–431. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02851.x>
- Varnier, A. L., Sanchez, L., Vatsa, P., Boudesocque, L., Garcia-Brugger, A., Rabenoelina, F., Sorokin, A., Renault, J. H., Kauffmann, S., Pugin, A., Clement, C., Baillieul, F., & Dorey, S. (2009). Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant, Cell and Environment*, 32(2), 178–193. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01911.x>
- Vasileva-Tonkova, E., Sotirova, A., & Galabova, D. (2011). The effect of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* on model bacterial strains and isolates from industrial wastewater. *Current Microbiology*, 62(2), 427–433. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9725-z>
- Vatsa, P., Sanchez, L., Clement, C., Baillieul, F., & Dorey, S. (2010). Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5095–5108. <https://doi.org/10.3390/ijms11125095>
- Vishwakarma, G. S., Bhattacharjee, G., Gohil, N., & Singh, V. (2020). Current status, challenges and future of bioremediation. *Bioremediation of Pollutants*, 403–415. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819025-8.00020-x>
- Walker, L., & Naylor, G. (2015). *Pesticide seed coatings: No good for farmers and bees*. <https://thehill.com/blogs/congress-blog/economy-budget/247292-pesticide-seed-coatings-no-good-for-farmers-and-bees>

- Wang, X., Gong, L., Liang, S., Han, X., Zhu, C., & Li, Y. (2005). Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae*, 4(2), 433–443. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.06.001>
- Welch, L. F., Mulvaney, D. L., Boone, L. V., McKibben, G. E., & Pendleton, J. W. (1966). Relative Efficiency of Broadcast Versus Banded Phosphorus for Corn 1. *Agronomy Journal*, 58(3), 283–287. <https://doi.org/10.2134/agronj1966.00021962005800030011x>
- Wen, J., McLaughlin, M. J., Stacey, S. P., & Kirby, J. K. (2010). Is rhamnolipid biosurfactant useful in cadmium phytoextraction? *Journal of Soils and Sediments*, 10(7), 1289–1299. <https://doi.org/10.1007/s11368-010-0229-z>
- Williams, M. I., Dumroese, R. K., Page-Dumroese, D. S., & Hardegree, S. P. (2016). Can biochar be used as a seed coating to improve native plant germination and growth in arid conditions? *Journal of Arid Environments*, 125, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2015.09.011>
- Wilson, R. A., & Talbot, N. J. (2009). Under pressure: Investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews Microbiology*, 7(3), 185–195. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2032>
- Wintersteiger AG. (2018). *Laboratory preparation In the earth lies the seed of new growth*.
- Wittgens, A., Santiago-Schuebel, B., Henkel, M., Tiso, T., Blank, L. M., Hausmann, R., Hofmann, D., Wilhelm, S., Jaeger, K. E., & Rosenau, F. (2018). Heterologous production of long-chain rhamnolipids from *Burkholderia glumae* in *Pseudomonas putida*—a step forward to tailor-made rhamnolipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1229–1239. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8702-x>
- Yan, Z., Reddy, M. S., Ryu, C. M., McInroy, J. A., Wilson, M., & Kloepper, J. W. (2002). Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 92(12), 1329–1333. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.12.1329>
- Yoo, D. S., Lee, B. S., & Kim, E. K. (2005). Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus. In *Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 15, Issue 6, pp. 1164–1169).
- Yutin, N. (2013). *Horizontal Gene Transfer*.
- Zeng, G., Fu, H., Zhong, H., Yuan, X., Fu, M., Wang, W., & Huang, G. (2007). Co-degradation with glucose of four surfactants, CTAB, Triton X-100, SDS and Rhamnolipid, in liquid culture media and compost matrix. *Biodegradation*, 18(3), 303–310. <https://doi.org/10.1007/s10532-006-9064-8>
- Zeomic. (n.d.). *Effective Concentration 50*. [https://www.zeomic.co.jp/en/glossary/antibacterial/62#:~:text=The median effective concentration \(EC50,a defined set of conditions](https://www.zeomic.co.jp/en/glossary/antibacterial/62#:~:text=The median effective concentration (EC50,a defined set of conditions)
- Zezzi do Valle Gomes, M., & Nitschke, M. (2012). Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control*, 25(2), 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.025>
- Zhong, H., Yang, L., Yang, X., Zeng, G., Liu, Z., Liu, Y., & Yuan, X. (2015). Aggregation of low-concentration dirhamnolipid biosurfactant in electrolyte solution. *RSC Advances*, 5(108), 88578–88582. <https://doi.org/10.1039/c5ra16817a>
- Zhu, K., & Rock, C. O. (2008). RhIA converts β -hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 190(9), 3147–3154. <https://doi.org/10.1128/JB.00080-08>
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.003>

8 Bijlagen

Bijlage 1: Grafische weergave van de verschillende rijstteeltsystemen, gerangschikt volgens hoogte en waterbeschikbaarheid samen met de mogelijke onkruidprofielen per teeltsysteem. Droge teeltsystemen verbruiken minder dan 800 mm water per groeiseizoen en omvatten hoogland- en laaglandrijst. Natte teeltsystemen verbruiken meer dan 1000 mm water en omvatten overstromde, geïrrigeerde en diepwaterrijst (Kingwell-Banham, 2019).

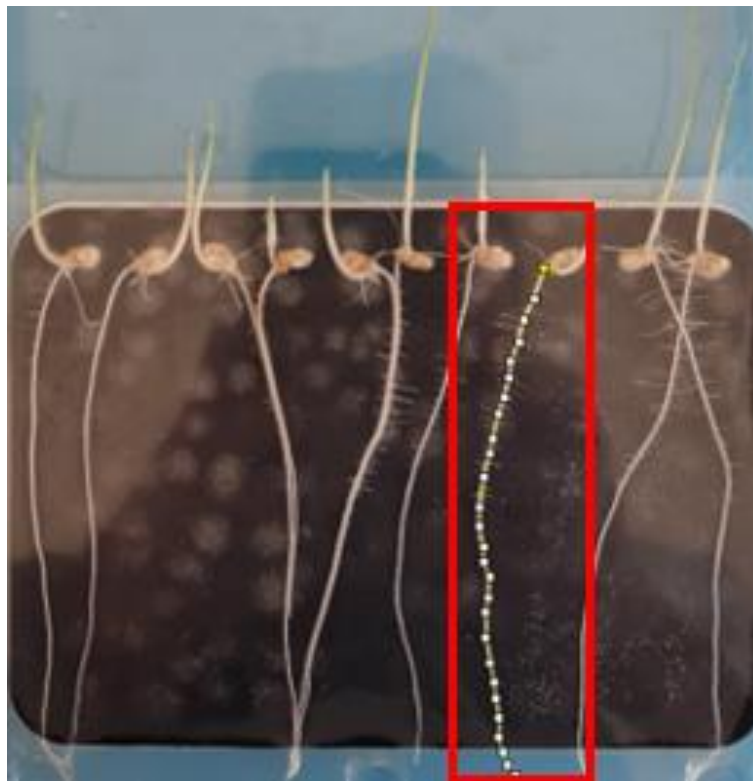


Bijlage 2: Meest gebruikte carriers in zaadencusterings. ρ = densiteit [g/cm^3], M = moleculaire massa [g/mol], s = wateroplosbaarheid [g/L].

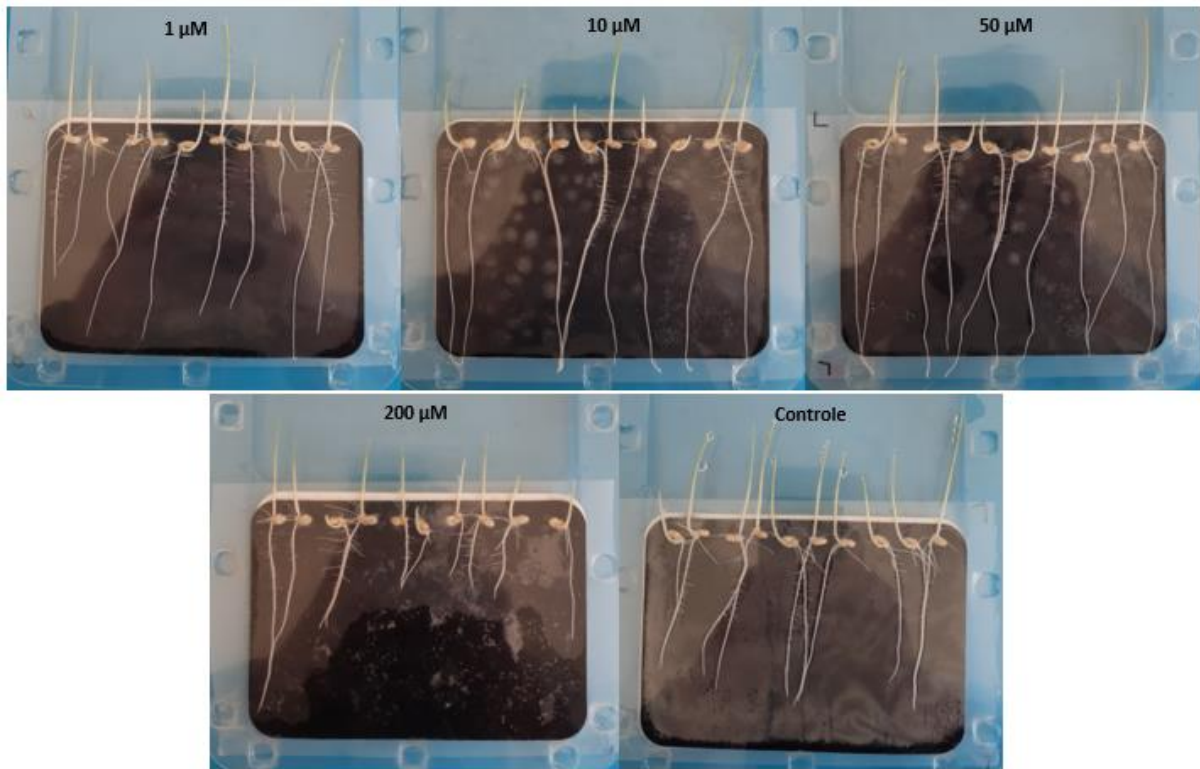
Carrier	Eigenschappen	Gewas	Referentie
Biochar		Mountain brome, boekweit en duizendblad	(Williams et al., 2016)
CaCO_3	$\rho = 2,93$ $M = 100,09$ 10% watersusp.: pH \in [8,9] Wateronoplosbaar	Sla	(Kangsopa et al., 2018)
CaO_2	$\rho = 2,9$ $M = 72,08$ Licht oplosbaar in water	Rijst	(Mei et al., 2017)
Gips	$\rho = 0,8$ $M = 145,15$ In water: pH \in [10,12] $s = 5$	Sla	(Kangsopa et al., 2018)
Microcellulose	$\rho \in 1,5$ $M = 370,35$ pH \in [5;7,5] Wateronoplosbaar	Parelgierst	(Novembre, 2011)

Carrier	Eigenschappen	Gewas	Referentie
Perliet	$\rho \in [2,2; 2,4]$ $M = 574,29$ 10% watersusp: pH \in $[6,5; 7,5]$ Wateronoplosbaar		(Taylor et al., 1990)
Zeolieten	$\rho \in [1,8; 2,6] \text{ g/cm}^3$ $M = 162,143 \text{ g/mol}$	Sla Tomaat	(Sikhao et al., 2015)

Bijlage 3: Meting van wortellengte via een segmented line in ImageJ 1.52v. Krommingen kunnen hierdoor ook nauwkeurig gemeten worden (rode rechthoek).



Bijlage 4: Resultaten fytotoxtest na vijf dagen. De scheutlengte was het hoogst bij de controle gevolgd door 1 μM , 50 μM , 10 μM en 200 μM rhamnolipidenoplossing. De wortellengte was het hoogst bij 50 μM gevolgd door 10 μM , 1 μM , controle en 200 μM .



Bijlage 5: Vernieuwde berekening van het aantal rhamnolipiden op een zaadje.

Deze berekening is opnieuw gebaseerd op 50 μM RL-oplossing toegevoegd tijdens de oriënterende plantenproef waarbij de rhamnolipiden op drie verschillende manieren werden toegevoegd. (zie **Sectie 2.1**):

- *Seed dip*
 - Verwaarloosbaar aangezien de zaailingen slechts 10 minuten in contact komen met de RL-oplossing.
- *Soil mix*
 - Per behandeling werd 750 mL van 50 μM RL-oplossing gemixt met 1800g droge bodem \rightarrow 2250 g natte bodem. Hierdoor kan bepaald worden hoeveel mol rhamnolipiden in de natte bodem aanwezig zijn:

$$n_{RL \text{ in } 2250 \text{ g natte bodem}} = 0,750 \text{ l} * 50 * 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{l}} = 3,75 * 10^{-5} \text{ mol rhamnolipiden}$$

- Per herhaling werd telkens 692 g natte bodem gebruikt waardoor via de regel van drie kan berekend worden hoeveel rhamnolipiden per herhaling aanwezig zijn in de bodem:

$$n_{RL \text{ in } 692 \text{ g natte bodem}} = \frac{3,75 * 10^{-5} \text{ mol RL}}{2250 \text{ g}} * 692 \text{ g} = 1,15 * 10^{-5} \text{ mol rhamnolipiden}$$

- 692 g natte bodem neemt ongeveer een volume in van 1800 cm³ (15 cm x 20 cm x 6 cm). Een zaadje neemt ongeveer een volume in van 1 cm³. Als gevolg van het resultaat van de bodemproef (zie **Sectie 3.3**) kan bijgevolg berekend worden hoeveel rhamnolipiden in contact komen met een zaadje:

$$n_{RL \text{ per zaadje}} = \frac{1,15 * 10^{-5} \text{ mol RL}}{1800 \text{ cm}^3} * 1 \text{ cm}^3 = 6,407 * 10^{-9} \text{ mol rhamnolipiden}$$

- Het aantal mol rhamnolipiden omgerekend naar aantal gram rhamnolipiden:

$$m_{RL \text{ per zaadje}} = 6,407 * 10^{-9} \text{ mol} * 577,72 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 3,702 \mu\text{g rhamnolipiden}$$

- **Soil drench**

- Per herhaling werd 250 mL van 50 μM RL-oplossing over de bodem gegoten. Het aantal mol rhamnolipiden toegevoegd, is:

$$n_{RL \text{ toegevoegd}} = 0,250 \text{ l} * 50 * 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{l}} = 1,25 * 10^{-5} \text{ mol rhamnolipiden}$$

- Er werd aangenomen dat de rhamnolipiden zich meteen verspreiden in de bodem op het moment van toepassing als gevolg van de zwaartekracht. Op het moment dat de *soil drench* werd toegepast, waren de rijstplanten ongeveer drie weken oud en hadden de wortels een volume vergelijkbaar met het volume van een rechtopstaande balk met een hoogte van 10 cm en een grondoppervlak van 1 cm² (V = 10 cm³). Per herhaling nam de bodem nog steeds 1800 cm³ in, waardoor kan berekend worden hoeveel mol rhamnolipiden in contact komen met een plantenwortel opnieuw met de aanname dat de rhamnolipiden bijna niet migreren in de bodem:

$$n_{RL \text{ per plantenwortel}} = \frac{1,25 * 10^{-5} \text{ mol}}{1800 \text{ cm}^3} * 10 \text{ cm}^3 = 6,94 * 10^{-8} \text{ mol rhamnolipiden}$$

- Het aantal mol rhamnolipiden omgerekend naar aantal gram rhamnolipiden:

$$m_{RL \text{ per plantenwortel}} = 6,94 * 10^{-8} \text{ mol} * 577,72 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 40,12 \mu\text{g rhamnolipiden}$$

- Na de berekening van het aantal rhamnolipiden toegevoegd tijdens de *soil mix* en de *soil drench* kan bepaald worden hoeveel rhamnolipiden er rond het zaadje kunnen gecoat worden:

$$m_{RL \text{ rond zaadje}} = 3,702 \mu\text{g} (\text{soil mix}) + 40,12 \mu\text{g} (\text{soil drench}) = 0,0438 \text{ mg rhamnolipiden}$$

Bijlage 6: Gemaakte zaadencrusterings met onderscheid van gebruikte sticker en carrier met bijhorende concentratie en hoeveelheid alsook het type zaad dat werd gebruikt (gekocht uit winkel). Riz Rond Complet verwijst naar de substitutiezaaden in de tekst. Alle coatings in deze bijlage bestaan uit acht dezelfde lagen waarbij één laag bestaat uit 0,5 mL sticker en een constante hoeveelheid carrier. Elke batch ongecoate zaden weegt ongeveer 60g. CMC = carboxymethylcellulose.

Nr.	Sticker	Sticker- concentratie (%)	Carrier	Type zaden
1	Methocel® A15C	1	Bentoniet	Riz Long Grain
2	CMC	1	Bentoniet	Riz Long Grain
3	Methocel® A15C	1	Bentoniet	Riz Long Grain
4	Methocel® A15C	1,5	Bentoniet	Riz Long Grain
5	CMC	1,5	Bentoniet	Riz Long Grain
6	Arabische gom	20	Bentoniet	Riz Long Grain
7	Xanthaangom	0,1	Bentoniet	Riz Long Grain
8	Methocel® A15C	1	Kaolien	Riz Long Grain
9	Methocel® A15C	1	Bentoniet	Thai Hom Mali Cargo Rice
10	CMC	1	Bentoniet	Thai Hom Mali Cargo Rice
11	Methocel® A15C	1	Bentoniet	Thai Hom Mali Cargo Rice
12	Methocel® A15C	1,5	Bentoniet	Thai Hom Mali Cargo Rice
13	CMC	1,5	Bentoniet	Thai Hom Mali Cargo Rice
14	Arabische gom	20	Bentoniet	Thai Hom Mali Cargo Rice
15	Xanthaangom	0,1	Bentoniet	Thai Hom Mali Cargo Rice
16	Methocel® A15C	1	Kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
17	Methocel® A15C	1	Kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
18	CMC	1	Kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
19	Arabische gom	20	Kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
20	Xanthaangom	0,1	Kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
21	Mowiol	10	Bentoniet	Thai Hom Mali Cargo Rice
22	Mowiol	10	Kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
23	Methocel® A15C	1	Bentoniet	Riz Rond Complet
24	CMC	1	Bentoniet	Riz Rond Complet
25	Arabische gom	15	Bentoniet	Riz Rond Complet
26	Xanthaangom	0,1	Bentoniet	Riz Rond Complet
27	Mowiol	10	Bentoniet	Riz Rond Complet
28	Methocel® A15C	1	Kaolien	Riz Rond Complet
29	CMC	1	Kaolien	Riz Rond Complet
30	Arabische gom	15	Kaolien	Riz Rond Complet
31	Xanthaangom	0,1	Kaolien	Riz Rond Complet
32	Mowiol	10	Kaolien	Riz Rond Complet
33	Methocel® A15C	1	Bentoniet/kaolien	Riz Rond Complet
34	CMC	1	Bentoniet/kaolien	Riz Rond Complet
35	Arabische gom	15	Bentoniet/kaolien	Riz Rond Complet
36	Xanthaangom	0,1	Bentoniet/kaolien	Riz Rond Complet

Nr.	Sticker	Sticker- concentratie (%)	Carrier	Type zaden
37	Mowiol	10	Bentoniet/kaolien	Riz Rond Complet
38	Methocel® A15C	1	Bentoniet/talk	Riz Rond Complet
39	CMC	1	Bentoniet/talk	Riz Rond Complet
40	Arabische gom	15	Bentoniet/talk	Riz Rond Complet
41	Xanthaangom	0,1	Bentoniet/talk	Riz Rond Complet
42	Mowiol	10	Bentoniet/talk	Riz Rond Complet
43	Water	100	Bentoniet	Riz Rond Complet
44	Water	100	Kaolien	Riz Rond Complet
45	Water	100	Bentoniet/kaolien	Riz Rond Complet
46	Water	100	Bentoniet/talk	Riz Rond Complet
47	Arabische gom	15	Bentoniet	Thai Hom Mali Cargo Rice
48	Arabische gom	15	Kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
49	Mowiol	10	Bentoniet	Thai Hom Mali Cargo Rice
50	Methocel® A15C	1	Bentoniet/kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
51	CMC	1	Bentoniet/kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
52	Arabische gom	15	Bentoniet/kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
53	Xanthaangom	0,1	Bentoniet/talk	Thai Hom Mali Cargo Rice
54	Mowiol	10	Bentoniet/talk	Thai Hom Mali Cargo Rice
55	Methocel® A15C	1	Bentoniet/talk	Thai Hom Mali Cargo Rice
56	CMC	1	Bentoniet/talk	Thai Hom Mali Cargo Rice
57	Arabische gom	15	Bentoniet/talk	Thai Hom Mali Cargo Rice
58	Xanthaangom	0,1	Bentoniet/talk	Thai Hom Mali Cargo Rice
59	Mowiol	10	Bentoniet/talk	Thai Hom Mali Cargo Rice
60	Mowiol	10	Bentoniet	Riz Long Grain
61	Arabische gom	15	Bentoniet	Riz Long Grain
62	Water	100	Bentoniet	Thai Hom Mali Cargo Rice
63	Water	100	Kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
64	Water	100	Bentoniet/kaolien	Thai Hom Mali Cargo Rice
65	Water	100	Bentoniet/talk	Thai Hom Mali Cargo Rice
66	Methocel® A15C	0,75	Bentoniet/kaolien	Riz Rond Complet
67	CMC	0.75	Bentoniet/kaolien	Riz Rond Complet

Bijlage 7: Opnieuw gecoate zaadencrusterings in dubbele batch gerangschikt volgens carrier. Alle coatings bestaan uit acht dezelfde lagen bestaande uit 0,5 mL sticker en een constante hoeveelheid carrier. De gebruikte rijstzaden zijn van het type Riz Rond Complet. Op deze coatings werden verschillende testen uitgevoerd (kiemtest, wrijvingstest, flowability). CMC = carboxymethylcellulose.

Nr.	Sticker	Sticker-concentratie (%)	Massa sticker (g)	Massa carrier (g)	Massa ongecoate zaden (g)	Massa net gecoate zaden (g)	Massa droge zaden (g)
BENTONIET							
23	Methocel® A15C	1	9,644	28,670	120,030	153,345	147,367
24	CMC	1	9,279	29,120	120,016	154,478	148,305
26	Xanthaangom	0,1	8,531	29,830	120,113	154,187	148,923
27	Mowiol® 4-88	10	9,748	29,960	120,102	154,778	149,678
43	Water	100	8,6762	28,305	120,025	152,620	146,194
KAOLIEN							
28	Methocel® A15C	1	8,940	14,209	120,029	139,720	132,724
29	CMC	1	9,341	14,179	120,026	138,268	131,594
31	Xanthaangom	0,1	8,548	14,169	119,988	137,716	131,765
44	Water	100	9,187	14,439	120,017	139,648	134,004
BENTONIET/KAOLIEN							
33	Methocel® A15C	1	8,855	22,012	120,062	146,260	141,450
66	Methocel® A15C	0,75	8,794	19,686	120,027	144,646	139,344
67	CMC	0,75	8,902	20,576	120,009	145,649	139,939
45	Water	100	9,242	20,645	120,077	147,469	140,870
BENTONIET/TALK							
38	Methocel® A15C	1	8,917	21,767	120,058	147,768	141,705
39	CMC	1	10,653	22,919	120,056	150,943	141,085
40	Arabische gom	15	9,994	23,895	120,038	150,801	142,638

Nr.	Sticker	Stickerconcentratie (%)	Massa sticker (g)	Massa carrier (g)	Massa ongecoate zaden (g)	Massa net gecoate zaden (g)	Massa droge zaden (g)
41	Xanthaangom	0,1	10,802	23,531	119,968	148,689	140,049
42	Mowiol® 4-88	10	8,631	22,782	120,005	147,967	140,223
46	Water	100	9,061	23,266	120,050	149,590	140,563

Bijlage 8: Zaadencruster met nieuwe laagverdeling (grondlaag, tussenlaag en toplaag). Voor deze coatings werden de Riz Rond Complet zaden gebruikt. MO = Mowiol® 4-88, MET = Methocel® A15C, XA = xanthaangom, CMC = Carboxymethylcellulose, PVA-L = polyvinylalcohol (Mw = 9000 – 10000), PVA-H = polyvinylalcohol (Mw = 31000 – 50000), Bent = bentoniet, Bent/Kao = bentoniet/kaolien, Bent/talk = bentoniet/talk.

Nr	Grondlaag				Tussenlaag				Toplaag				Massa ongecoate zaden (g)	Massa net gecoate zaden (g)	Massa droge zaden (g)
	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)			
68	MO 10	0,056	Bent	1,988	MO 10	4,233	Bent	7,999	Geen toplaag				20,016	33,816	29,412
69	MO 10	1,069	Bent	1,929	MO 10	4,223	Bent	8,045	MO 10	2,155	Talk	1,793	20,010	37,765	32,030
70	MO 10	1,060	Bent	1,965	MO 10	4,214	Bent	8,077	MO 10	1,055	Talk	1,345	20,010	35,673	30,651
71	MO 10	1,054	Bent	1,988	MO 10	3,155	Bent	8,012	MO 10	1,652	Talk	2,038	20,002	35,328	30,957
72	MO 10	1,149	Bent	1,936	MO 10	4,630	Bent	8,095	MO 10	1,742	Talk	2,111	20,018	36,701	31,178
73	MO 10	1,138	Bent	1,921	MO 10	4,416	Bent	8,015	MO 10	1,665	Talk	1,652	20,013	36,640	30,667
74	MET 1	1,155	Bent	1,957	MET 1	4,767	Bent	8,075	Geen toplaag				20,007	33,584	28,797
75	MET 1	1,229	Bent	2,060	MET 1	4,713	Bent	8,187	MET 1	1,378	Talk	1,364	20,017	35,551	30,237
76	XA 0,1	1,055	Bent	2,059	XA 0,1	4,399	Bent	8,255	Geen toplaag				20,010	34,421	27,906
77	XA 0,1	1,109	Bent	2,058	XA 0,1	4,369	Bent	8,368	XA 0,1	1,094	Talk	1,292	19,996	32,736	28,360
78	MET 1	1,161	Bent/ Kao	1,472	MET 1	4,630	Bent/ Kao	5,877	Geen toplaag				20,003	32,182	27,309

Nr	Grondlaag				Tussenlaag				Toplaag				Massa ongecoate zaden (g)	Massa net gecoate zaden (g)	Massa droge zaden (g)
	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)			
79	MET 1	1,172	Bent/Kao	1,412	MET 1	4,461	Bent/Kao	5,802	MO 10	1,154	Talk	1,278	20,000	32,982	27,557
80	CMC 1	1,203	Bent/Talk	1,512	CMC 1	4,734	Bent/Talk	6,392	Geen toplaag				20,016	29,728	25,736
81	CMC 1	1,236	Bent/Kao	1,446	CMC 1	4,868	Bent/Kao	6,90	MO 10	1,181	Talk	2,004	20,003	30,575	26,360
82	MET 1	1,299	Bent	1,935	MET 1	2,238	Bent	3,765	MET 1	1,099	Talk	1,448	19,994	30,071	26,353
83	MO 10	1,072	Bent	1,990	MO 10	3,268	Bent	5,833	MO 10	1,115	Talk	2,550	19,998	33,259	29,045
84	MO 10	1,100	Bent	2,020	MO 10	3,334	Bent	6,950	MO 10	1,113	Talk	2,584	19,999	34,420	29,958
85	MET 1	1,066	Bent	2,005	MET 1	3,776	Bent	6,890	MET 1	1,112	Talk	2,676	20,011	35,112	30,108
86	MET 1	1,072	Bent	2,050	MET 1	3,710	Bent/Talk ^a	6,254	MO 10	1,103	Talk	2,680	19,995	34,891	29,81
87	MO 10	1,047	Bent	2,020	MO 10	3,727	Bent/Talk ^a	6,084	MO 10	1,137	Talk	2,720	20,008	34,371	29,657
88	MO 10	1,081	Bent/Talk	1,724	MO 10	2,769	Bent/Talk	5,772	MO 10	1,102	Talk	2,838	20,015	33,375	28,900
89	MET 1	1,025	Bent/Talk	1,712	MET 1	3,725	Bent/Talk	5,774	MET 1	1,057	Talk	2,670	19,996	33,823	28,979
90	MO 10	1,054	Bent/Talk	1,692	MO 10	4,245	Bent/Talk	6,736	MO 10	1,091	Talk	2,626	20,006	35,092	29,392
91	MET 1	1,019	Bent/Talk	1,728	MET 1	4,132	Bent/Talk	6,746	MO 10	1,051	Talk	2,678	20,007	35,419	29,389

Nr	Grondlaag				Tussenlaag				Toplaag				Massa ongecoate zaden (g)	Massa net gecoate zaden (g)	Massa droge zaden (g)
	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)			
92	PVA-L 20	1,264	Bent/Talk	1,710	PVA-L 20	4,633	Bent/Talk	6,020	PVA-L 20	2,660	Talk	1,325	19,997	34,097	29,213
93	PVA-H 10	1,242	Bent/Talk	1,694	PVA-H 10	4,125	Bent/Talk	5,988	PVA-H 10	1,226	Talk	2,726	20,003	33,941	28,455
94	PVP 5	1,084	Bent/Talk	1,600	PVP 5	3,830	Bent/Talk	5,670	PVP 5	1,091	Talk	2,570	20,001	33,958	28,480
95	MO 5	1,075	Bent/Talk	1,635	MO 5	3,697	Bent/Talk	5,642	MO 5	1,059	Talk	2,566	19,994	31,403	28,273

^a Bentoniet/Talk (2:1 V%) i.p.v. Bentoniet/Talk (1:1 V%) in alle andere gevallen.

Bijlage 9: Nieuwe zaadencrusteringen met rijstvariëteit CO-39 zowel met als zonder rhamnolipiden.

Nr	Grondlaag				Tussenlaag				Toplaag				Massa ongecoate zaden (g)	Massa net gecoate zaden (g)	Massa droge zaden (g)
	Sticker (%)	m sticker (g)	Carrier	m carrier (g)	Sticker (%)	m sticker (g)	Carrier	m carrier (g)	Sticker (%)	m sticker (g)	Carrier	m carrier (g)			
A(100%)	MO 10	1,050	Bent/Talk	1,617	RL ^a	4,1099	Bent/Talk	6,170	MO 10	1,075	Talk	2,681	20,005	34,3433	34,072
B(100%)	MO 5	1,079	Bent/Talk	1,772	RL ^b	3,932	Bent/Talk	5,970	MO 5	1,107	Talk	2,612	19,992	34,234	33,406
C(75%)	MO 5	1,078	Bent/Talk	1,624	RL ^c	4,037	Bent/Talk	5,914	MO 5	1,083	Talk	2,432	20,045	33,628	32,331

Nr.	Grondlaag				Tussenlaag				Toplaag				Massa ongecoate zaden (g)	Massa net gecoate zaden (g)	Massa droge zaden (g)
	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)	Sticker (%)	Massa sticker (g)	Carrier	Massa carrier (g)			
D(50%)	MO 5	1,605	Bent/ Talk	1,704	RL ^d	3,654	Bent/ Talk	5,966	MO 5	1,060	Talk	2,508	19,997	33,967	33,027
E(30%)	MO 5	1,328	Bent/ Talk	1,586	RL ^e	3,034	Bent/ Talk	4,886	MO 5	1,272	Talk	2,357	20,017	31,989	27,979
F(20%)	MO 5	1,058	Bent/ Talk	1,650	RL ^f	3,347	Bent/ Talk	5,715	MO 5	1,066	Talk	2,672	20,005	33,602	29,275
G(10%)	MO 5	1,286	Bent/ Talk	1,660	RL ^g	3,283	Bent/ Talk	5,565	MO 5	1,088	Talk	2,584	20,004	33,326	29,150
H(4%)	MO 5	1,209	Bent/ Talk	1,586	RL ^h	2,875	Bent/ Talk	4,684	MO 5	1,613	Talk	2,543	20,009	31,639	27,353
I(0%)	MO 10	1,044	Bent/ Talk	1,686	MO 10	3,8957	Bent/ Talk	6,189	MO 10	1,057	Talk	2,594	20,006	34,2039	32,526
J(0%)	MO 5	1,700	Bent/ Talk	1,688	MO 5	3,677	Bent/ Talk	5,936	MO 5	1,116	Talk	2,566	19,995	34,006	28,767

^a Sticker tussenlaag: Mowiol 10% + 100% RL + water

^b Sticker tussenlaag: Mowiol 5% + 100% RL + water + Xiameter

^c Sticker tussenlaag: Mowiol 5% + 75% RL + water + Xiameter

^d Sticker tussenlaag: Mowiol 5% + 50% RL + water + Xiameter

^e Sticker tussenlaag: Mowiol 5% + 30% RL + water

^f Sticker tussenlaag: Mowiol 5% + 20% RL + water + Xiameter

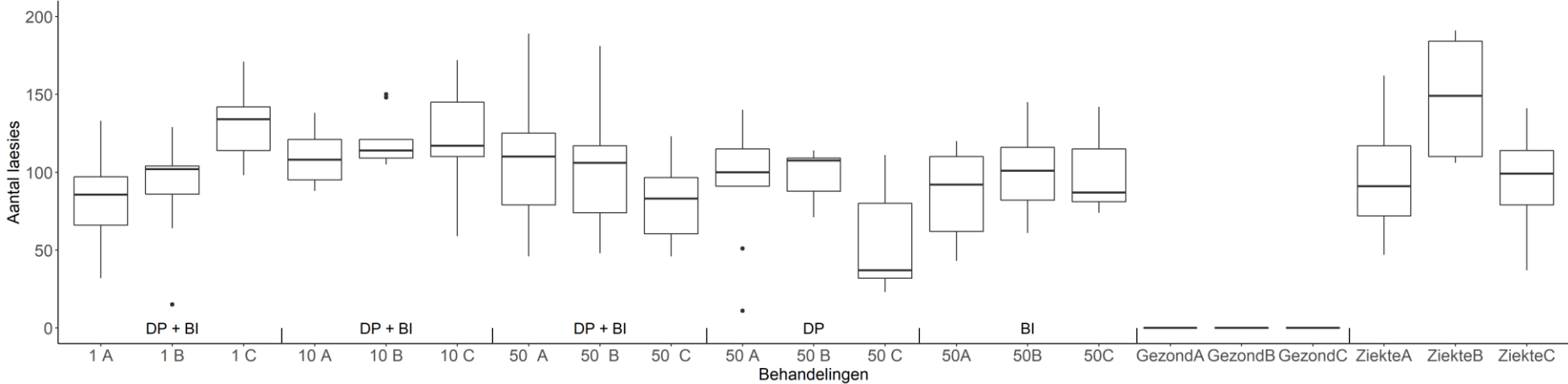
^g Sticker tussenlaag: Mowiol 5% + 10% RL + water + Xiameter

^h Sticker tussenlaag: Mowiol 5% + 4% RL + water + Xiameter

Bijlage 10: Samenvatting van de resultaten van de in planta bepaling van de werkzaamheid van rhamnolipiden. In totaal werden zeven behandelingen uitgevoerd. Per behandeling wordt het minimum aantal sporulerende laesies weergegeven (Min.) van het aantal geëvalueerde planten (n), de mediaan, het gemiddelde, het maximum (Max.) en de standaardafwijking. DP = during planting, BI = before infection.

Nr.	Behandeling	RL- concentratie (μM)	n	Min.	Mediaan	Gemiddelde	Max.	Standaard- afwijking
1	Zieke controle	0	27	37	107	114,20	191	42,34
2	Gezonde controle	0	27	0	0	0	0	0
3	Natuurlijke RL 3x toegepast	50	26	11	92,50	92,85	140	36,18
4	Natuurlijke RL 3x toegepast	10	27	59	113	117,80	172	24,44
5	Natuurlijke RL 3x toegepast	1	26	15	105	100,96	171	32,50
6	Natuurlijke RL 2x toegepast (enkel tijdens planten)	50	26	46	92	97,23	189	38,90
7	Natuurlijke RL 1x toegepast (net voor inoculatie)	50	27	43	92	94,96	145	27,06

Bijlage 11: Resultaat van de in planta bepaling van de werkzaamheid van de rhamnolipiden. Deze figuur geeft het aantal gevormde sporulerende laesies weer per behandeling én per herhaling in de vorm van een boxplot. DP = during planting, waarbij de rhamnolipiden werden toegevoegd via een seed dip en een soil mix tijdens het planten. BI = before inoculation, waarbij de rhamnolipiden werden toegevoegd via een soil drench net voor de inoculatie.



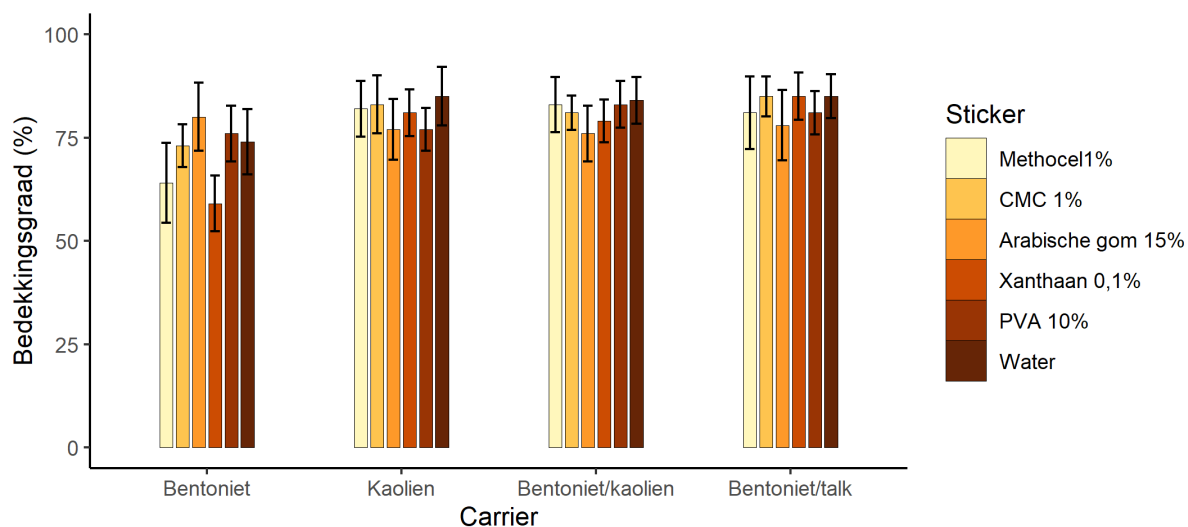
Bijlage 12: Deel van de resultaten van de fytoxiciteitstest. Deze tabel geeft de scheutlengte in cm weer van alle planten binnen de verschillende behandelingen na drie, vier en vijf dagen.

Concentratie RL (μM)	Dag 3	Dag 4	Dag 5
1	0,51	1,84	3,37
10	0,53	1,44	2,53
50	0,42	1,47	2,75
200	0,54	1,68	2,33
Controle	0,55	1,90	3,79

Bijlage 13: Deel van de resultaten van de fytoxiciteitstest. Deze keer wordt de wortellengte van alle planten binnen de verschillende behandelingen in cm weergegeven na drie, vier en vijf dagen.

Concentratie RL (μM)	Dag 3	Dag 4	Dag 5
1	2,94	5,67	7,32
10	3,50	6,93	8,07
50	3,13	6,60	8,68
200	2,11	3,50	4,04
Controle	3,26	5,34	6,19

Bijlage 14: Resultaat van de bepaling van de zaadbedekking van de zaadencrusters gecoat rond de Thai Hom Mali Cargo Rice zaden. De x-as verdeelt de zaadencrusters per carrier terwijl de legende duidelijk maakt welke sticker werd gebruikt. De foutenbalken geven de standaardafwijking weer (10 herhalingen).



Bijlage 15: Absolute waarden van de bepaling van de zaadbedekkingsgraad. Per zaadencrusterings werden tien zaden beoordeeld op het aandeel van het zaadoppervlak dat bedekt was met coatingsmaterialen. De rijen geven de stickers weer terwijl de carriers weergegeven staan in de kolommen. De Riz Rond Compleet zaden zijn de substitutie-zaden; de Thai Hom Mali zaden werden niet gebruikt om rhamnolipiden in te verwerken.

Riz Rond Compleet	Bentoniet	Kaolien	Bentoniet/kaolien	Bentoniet/talk
Methocel 1 %	78	97	76	79
CMC 1 %	79	100	64	75
Arabische gom 15 %	72	67	73	77
Xanthaangom 0,1 %	75	93	65	71
PVA 10 %	77	73	70	71
Water	73	75	75	81
Thai Hom Mali	Bentoniet	Kaolien	Bentoniet/kaolien	Bentoniet/talk
Methocel 1 %	64	83	83	81
CMC 1 %	73	83	81	85
Arabische gom 15 %	80	77	76	78
Xanthaangom 0,1 %	59	81	79	85
PVA 10 %	76	77	83	81
Water	74	85	84	85

Bijlage 16: Resultaten van de wrijvingstest met zaadencrusterings rond de Thai Hom Mali Cargo Rice zaden, uitgedrukt in verlies door wrijving (%). Hoe hoger dit verlies, hoe meer coating is losgekomen tijdens het schudden.

