

ACTINOBACTERIËN ALS BIOCONTROLE TOOL TEGEN DE BELANGRIJKSTE FUNGALE PLANTPATHOGENEN OP TARWE

Lies Van Vlierberghe

Studentennummer: 02006536

Promotoren: Prof. dr. Ir. Kris Audenaert en prof. dr. Ir. Leen De Gelder,

Tutor : Ing. Larissa De Troyer

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

Academiejaar: 2023 – 2024



De auteur en de promotor geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van de masterproef te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit de masterproef.

The author and the promotor give permission to use this thesis for consultation and to copy parts of it for personal use. Every other use is subject to the copyright laws, more specifically the source must be extensively specified when using results from this thesis.

WOORD VOORAF

Het schrijven van deze thesis was een intensieve en leerzame ervaring, waarbij ik op de steun van velen heb mogen rekenen. Zonder jullie bijdrage zou dit werk niet mogelijk zijn geweest, en daarom wil ik graag een aantal mensen bedanken.

Allereerst wil ik mijn dank uitspreken aan mijn promotoren, prof. dr. Ir. Kris Audenaert en prof. dr. Ir. Leen De Gelder. Hun feedback en begeleiding hebben een cruciale rol gespeeld in de ontwikkeling van dit onderzoek. Bedankt voor de kans die jullie mij hebben gegeven.

Naast hen wil ik mijn tutor, ing. Larissa De Troyer, bijzonder bedanken. Haar scherpe opmerkingen en inzichten hebben aanzienlijk bijgedragen aan de kwaliteit van dit werk. Bovendien kon ik altijd op haar rekenen voor praktische ondersteuning en advies, wat enorm heeft geholpen tijdens het onderzoeksproces.

Naast de academische begeleiding wil ik ook de mensen bedanken die mij emotioneel hebben ondersteund. De prettige sfeer in het LAMP-labo heeft mijn onderzoeksperiode verrijkt en aangenaam gemaakt. In het bijzonder wil ik Trang en Dylan bedanken voor hun vriendschap en betrokkenheid.

Mijn allergrootste dank gaat uit naar Marie en Hannelore. Jullie waren altijd bereid om naar mijn vragen te luisteren en gaven waardevol advies wanneer ik dat nodig had. Jullie steun heeft me door de uitdagende momenten heen geholpen. Daarnaast ook bedankt aan Sofie, Jasper en mijn ouders voor hun begrip en geduld tijdens het schrijven van deze masterthesis, vooral op momenten waarop mijn humeur niet altijd even goed was.

Tot slot wil ik iedereen bedanken die, op welke manier dan ook, een bijdrage heeft geleverd aan deze thesis. Jullie steun, zowel praktisch als emotioneel, heeft ervoor gezorgd dat ik dit project met succes heb kunnen afronden.

Lies Van Vlierberghe

ABSTRACT

Wheat is one of the world's most important crops, but it is threatened by various fungal pathogens such as *Fusarium graminearum*, *Zymoseptoria tritici*, *Blumeria graminis*, and *Puccinia striiformis*, each causing devastating diseases. In 2018, it was estimated that 15-20% of wheat yield loss was due to fungal diseases (Figueroa et al., 2018). The primary method of controlling fungal diseases remains the use of chemical fungicides, but alternative approaches are needed due to the increasing resistance to fungicides, their negative environmental impact, and initiatives such as the "Green Deal". The use of biocontrol organisms is gaining recognition as an alternative approach. It is a natural method to manage crop diseases and pests by using living organisms, such as bacteria, fungi, or insects. Research in this area is important because it offers a sustainable alternative to chemical pesticides, reduces environmental impact, and helps manage resistance issues.

This research focuses on Actinobacteria as biocontrol organisms against fungal wheat pathogens, due to their promising diverse properties as biocontrol agents and their ability to promote beneficial interactions with plants. Through various *in vitro* and *in planta* experiments, the effectiveness of different Actinobacteria as biocontrol agents against wheat pathogens *Fusarium graminearum*, *Zymoseptoria tritici*, and *Blumeria graminis* is evaluated.

From these experiments, the Actinobacteria *Streptomyces. rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 and *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 emerged as potential biocontrol organisms against *F. graminearum* and *Z. tritici*. No biocontrol organisms were identified against *B. graminis* due to the failure of the infection trial. These findings contribute to the development of sustainable and environmentally friendly approaches for the control of fungal plant pathogens in wheat. Further research and repeated trials are necessary for the proper implementation and application of Actinobacteria as biocontrol organisms.

Keywords: biocontrol, Green Deal, mode of action, Actinobacteria, fungal wheat pathogens

ABSTRACT

Tarwe is een van 's werelds belangrijkste gewassen, maar wordt bedreigd door verschillende fungale pathogenen zoals *Fusarium graminearum*, *Zymoseptoria tritici*, *Blumeria graminis* en *Puccinia striiformis*, die elk verwoestende ziekten veroorzaken. In 2018 werd er geschat dat 15-20% opbrengstverlies van tarwe te wijten was aan fungale ziekten (Figueroa et al., 2018). Het gebruik van chemische fungiciden blijft de voornaamste methode voor de bestrijding hiervan, maar alternatieve benaderingen zijn nodig vanwege toenemende resistentie tegen fungiciden, hun negatief effect op het milieu en initiatieven zoals de “Green Deal”. Het gebruik van biocontrole organismen wint aan populariteit als alternatieve benadering. Het is een natuurlijke methode om gewasziekten en plagen te beheersen door het gebruik van levende organismen, zoals bacteriën, schimmels, of insecten. Onderzoek hiernaar is belangrijk omdat het een duurzaam alternatief biedt voor chemische bestrijdingsmiddelen, de milieu-impact vermindert en helpt bij het beheersen van resistentieproblemen.

De focus in dit onderzoek ligt op Actinobacteriën als biocontrole organismen tegen fungale tarwepathogenen vanwege hun veelbelovende diverse eigenschappen als biocontrole organisme en hun vermogen om gunstige interacties met planten te bevorderen. Door verschillende *in vitro* en *in planta* experimenten uit te voeren, wordt de effectiviteit van verschillende Actinobacteriën als biocontrole organismen tegen de tarwepathogenen *Fusarium graminearum*, *Zymoseptoria tritici* en *Blumeria graminis* geëvalueerd.

Uit deze experimenten kwamen de Actinobacteriën *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 naar voor als potentiële biocontrole organismen tegen *F. graminearum* en *Z. tritici*. Tegen *B. graminis* werden er geen biocontrole organismen geïdentificeerd door het mislukken van de infectieproef. Deze bevindingen dragen bij aan de ontwikkeling van duurzame en milieuvriendelijke benaderingen voor de beheersing van fungale plantpathogenen op tarwe. Verder onderzoek en het herhalen van proeven blijft noodzakelijk voor een goede implementatie en toepassing van Actinobacteriën als biocontrole organisme.

Sleutelwoorden: biocontrole, Green Deal, mode-of-action, Actinobacteriën, fungale tarwepathogenen

INHOUD

Lijst van figuren.....	3
Lijst van tabellen.....	5
Lijst van afkortingen	6
Inleiding.....	7
1 Literatuurstudie	9
1.1 <i>Infectie fungale tarwepathogenen</i>	9
1.1.1 Hechting en penetratie.....	9
1.1.2 Biotrofe en hemibiotrofe infectiestructuren	10
1.2 <i>Fungale tarwepathogenen</i>	11
1.2.1 <i>Fusarium graminearum</i>	11
1.2.2 <i>Zymoseptoria tritici</i>	13
1.2.3 <i>Blumeria graminis</i>	14
1.2.4 <i>Puccinia striiformis</i>	15
1.3 <i>Verdedigingsmechanisme van planten</i>	17
1.4 <i>Nood aan duurzame alternatief voor chemische fungiciden</i>	18
1.5 <i>Actinobacteriën</i>	18
1.5.1 Kenmerken Actinobacteriën	18
1.5.2 Actinobacteriën als biocontrole organismen.....	19
1.5.2.1 Directe werkingsmechanismen	19
1.5.2.2 Indirecte werkingsmechanismen	21
1.5.2.3 Actinobacteriën als stimulant voor plantengroei.....	21
1.5.3 Geslachten <i>Rhodococcus</i> en <i>Streptomyces</i>	22
2 Onderzoeksvraag en doelstellingen	24
3 Materiaal en methode.....	25
3.1 <i>Media</i>	25
3.2 <i>Tarwe</i>	25
3.3 <i>Opgroeien fungale tarwepathogenen</i>	25
3.3.1 <i>Fusarium graminearum</i>	25
3.3.2 <i>Zymoseptoria tritici</i>	26
3.3.3 <i>Blumeria graminis</i>	26
3.3.4 Sporensuspensies.....	26
3.4 <i>Opgroeien potentiële biocontrole stammen</i>	26
3.5 <i>In vitro plate assay</i>	27
3.5.1 <i>Fusarium graminearum</i>	27
3.5.2 <i>Zymoseptoria tritici</i>	27
3.6 <i>Detached leaf assay</i>	28
3.6.1 <i>Fusarium graminearum</i>	28
3.6.2 <i>Blumeria graminis</i>	28
3.7 <i>Whole leaf assay : Zymoseptoria tritici</i>	30
3.8 <i>Detached ear assay : Fusarium graminearum</i>	31

3.9	<i>Ziekteopvolging</i>	31
3.9.1	Multispectrale beeldanalyse : PathoViewer.....	31
3.9.2	Canon camera.....	33
3.10	<i>Dataverwerking</i>	33
3.11	<i>Overzicht</i>	33
4	Resultaten	34
4.1	<i>Assays Fusarium graminearum</i>	34
4.1.1	<i>In vitro</i> plate assay.....	34
4.1.2	Detached leaf assay.....	36
4.1.2.1	Effect Actinobacteriën op de gezondheid van tarwe.....	36
4.1.2.2	Effect Actinobacteriën op infectie met <i>F. graminearum</i>	37
4.1.3	Detached ear assay.....	39
4.2	<i>Detached leaf assay Blumeria graminis</i>	40
4.2.1	Effect Actinobacteriën op de gezondheid van tarwe.....	40
4.2.2	Effect Actinobacteriën op infectie met <i>B. graminis</i>	40
4.3	<i>Assays Zymoseptoria tritici</i>	41
4.3.1	<i>In vitro</i> plate assay.....	41
4.3.2	Whole leaf assay.....	46
4.3.2.1	Effect Actinobacteriën op de gezondheid van tarwe.....	46
4.3.2.2	Effect Actinobacteriën op infectie van <i>Z. tritici</i>	48
5	Discussie	49
5.1	<i>Fytotoxicisch effect van Actinobacteriën op tarwe</i>	49
5.2	<i>Biocontrole effect van Actinobacteriën tegen Fusarium graminearum</i>	50
5.3	<i>Biocontrole effect van Actinobacteriën tegen Blumeria graminis</i>	50
5.4	<i>Biocontrole effect van Actinobacteriën tegen Zymoseptoria tritici</i>	51
5.5	<i>Algemeen en verder onderzoek</i>	52
6	Conclusie	53
7	Referenties	54
Bijlages	60	
	<i>Bijlage 1</i>	60
	<i>Bijlage 2</i>	61
	<i>Bijlage 3</i>	61
	<i>Bijlage 4</i>	62

LIJST VAN FIGUREN

Figuur 1 (A) infectie proces van een biotrofe schimmel in een dikaryotische toestand. (U) = uredosporen kiemen met de vorming van een kiembuis (GT). Vorming van een appressorium (A) boven de substomatale openingen (G). Vanuit de substomatale blaasjes (SV) worden de intercellulaire hyfe gevormd (IH). IH komt in contact met de mesofyl cellen (M) en vormen haustoria moeder cellen (HMC). Vorming van neckbands (N) en intracellulaire haustoria (H). (B) Infectieproces van een intracellulaire hemibiotroof. Sporen (S) kiemen tot een appressorium (A). Vorming van intracellulaire hyfe (IH) in de epidermale cellen (E). Uit de IH vorming zich secundaire necrotrofe hyfe (SH) (afkomstig van Perfect & Green (2001)).....	11
Figuur 2 De levenscyclus van <i>Fusarium graminearum</i>. De seksuele cyclus start bij de productie van ascosporen geproduceerd door een peritheciën dat gevormd is op achtergebleven, aangetaste gewasresten. Ascosporen verspreiden zich over lange afstanden. Bij de asexuele cyclus is er de productie van conidia die zich eerder lokaal verspreiden. Beide cyclussen brengen ziekte teweeg waarbij er een productie is van mycotoxinen. (afkomstig van Turkington et al. (2017))	13
Figuur 3 Levenscyclus <i>Zymoseptoria tritici</i>, weergegeven in de latente fase (1 tot 9 dagen na infectie) en in de necrotrofe fase (10 tot 21 dagen na infectie). De latente fase bestaat uit de kieming, kolonisatie en pre-pycnidia vorming. In de necrotrofe fase ontstaan de volwassen pycnidia. (afkomstig van Steinberg (2015)) ...	14
Figuur 4 Levenscyclus <i>P. striiformis</i>, weergegeven in een asexuele fase die plaats vindt op tarwe, en een seksuele fase die plaats vindt op <i>Berberis</i> spp.. In de asexuele fase zorgen urediniosporen voor een re-infectie van tarwe. Telia worden geproduceerd uit verouderd geïnfecteerd weefsel en zorgt voor de productie van teliosporen die op hun beurt basidiosporen vormen. Basidiosporen starten door het infecteren van de <i>Berberis</i> spp.. de seksuele cyclus. Gevormde pycnia produceren pycniosporen waarna er de vorming is van aesciosporen die opnieuw tarwe kunnen infecteren (afkomstig van Khanfri et al., 2018).....	16
Figuur 5. Zelf gebouwd spraykamer met bench protective paper	29
Figuur 6. Inoculatietoren gebruikt bij detached leaf assay met <i>B. graminis</i>.....	29
Figuur 7 Infectiekamer afgesloten met parafilm waarin de tarwe planten gedurende 3 dagen werden bewaard., gebruikt bij de in planta assay met <i>Z. tritici</i>.....	30
Figuur 8. Infectiekamers waarin de oasis blokken met hierop de aren werden bewaard, gebruikt bij de detached aer assay met <i>F. graminearum</i>	31
Figuur 9. Overzicht van de opgestelde proeven bij de bijhorende onderzochte fungale tarwepathogenen.	33
Figuur 10. Barplots van de groei van <i>F. graminearum</i> (Fg), op dag 3, 4, 5 en 6, onder de behandeling met de verschillende Actinobacteriën (BacX) bij de in vitro plate assay met <i>F. graminearum</i>	34
Figuur 11. Groeicurves van de groei van <i>F. graminearum</i> (Fg), op dag 3, 4, 5 en 6, onder de behandeling Bac4 en Bac5 bij de in vitro plate assay met <i>F. graminearum</i>	35
Figuur 12. Foto's van de agarplaten van de behandelingen: Fg (geïnfecteerde controle), Bac4+Fg en Bac5+Fg dag 3, 4, 5 en 6 opgezet bij de in vitro plate assay met <i>F. graminearum</i>	35
Figuur 13. Boxplots van de resultaten van de parameters Fv/Fm (A) en ChIdx (B) van de blanco en negatieve controles op de dagen waar significante verschillen optreden	36
Figuur 14. Boxplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm bij de behandeling van <i>F. graminearum</i> met de verschillende Actinobacteriën (BacX+Fg), de blanco controle en de geïnfecteerde controle (Fg) op dag 2, 3 en 4 bij de detached leaf assay met <i>F. graminearum</i>.....	37
Figuur 15. Boxplots van de resultaten van de parameter ChIdx bij de behandeling van <i>F. graminearum</i> met de verschillende Actinobacteriën (BacX+Fg), de blanco controle en de geïnfecteerde controle (Fg) op dag 3 en 4 bij de detached leaf assay met <i>F. graminearum</i>.....	38
Figuur 16. Boxplots van de resultaten van de parameter cGFP bij de behandeling van <i>F. graminearum</i> met de verschillende Actinobacteriën (BacX+Fg), de blanco controle en de geïnfecteerde controle (Fg) op dag 2, 3 en 4 bij de detached leaf assay met <i>F. graminearum</i> Detached ear assay.....	38
Figuur 17. Multispectrale foto's van de parameters Fv/Fm en cGFP op dag 4, buiten de foto's van de blanco op dag 3, opgezet bij de behandelingen : Fg, Bac4+Fg, Bac5+Fg, Blanco bij de detached leaf assay met <i>F. graminearum</i>. De bijhorende klassen van elke parameter worden weergegeven aan de rechter kant van elke parameter	39
Figuur 18. Boxplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm op dag 14 uit de fytotoxiciteit dataset van de detached leaf assay met <i>B. graminis</i>.....	40

Figuur 19. Boxplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm (A) en ChIldx(B) bij de behandeling van <i>B. graminis</i> met de subset Actinobacteriën (BacX+Fg), de blanco controle en de geïnfecteerde controle (Bg) op de daggen met significante verschillen bij de detached leaf assay met <i>B. graminis</i>	41
Figuur 20. Foto's van de agarplaten van de behandeling van Bac4+Zt, Bac5+Zt, Bac8+Zt en de geïnfecteerde controle Zt, genomen op dag 7 opgezet bij de in vitro plate assay met <i>Z. tritici</i> methode 1.....	42
Figuur 21. Foto's van de agarplaten van de behandelingen geïnfecteerde controle Zt, Bac1+Zt, Bac4+Zt, Bac5+Zt en Bac11+Zt, genomen op dag 7 en 14 opgezet bij de in vitro plate assay met <i>Z. tritici</i> methode 2.....	42
Figuur 22. Barplots van de groei oppervlakte van <i>Z. tritici</i> (Zt) op dag 7 en 14 onder behandeling met de verschillende Actinobacteriën (BacX) opgezet bij methode 2 van de in vitro plate assay met <i>Z. tritici</i>	43
Figuur 23. Scatterplots van de bepaalde sporenconcentraties per behandeling van <i>Z. tritici</i> (Zt) met de subset van Actinobacteriën (BacX) opgezet bij de in vitro plate assay methode 2.....	43
Figuur 24. Foto's van de agarplaten van de behandelingen Zt (geïnfecteerde controle), Bac4+Zt, Bac5+Zt, Bac10+Zt en Bac11+Zt, genomen op dag 7 en 14 opgezet bij de in vitro plate assay met <i>Z. tritici</i> methode 3.....	44
Figuur 25 Barplots die het aantal KVE per petriplaat weergeven per behandeling van <i>Z. tritici</i> (Zt) met een subset van Actinobacteriën (BacX) met significante letters in hoofdletters, scatterplots die de sporenconcentratie ($\cdot 10^4$ sporen per mL) weergeven per behandeling met significante letters in kleine letters opgezet bij de in vitro plate assay methode 3.....	45
Figuur 26. Scatterplots van de afstanden tot de dichtstbijzijnde kolonie per behandeling van <i>Z. tritici</i> (Zt) met de subset van Actinobacteriën (BacX) opgezet bij de in vitro plate assay methode 3	46
Figuur 27 Barplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm bij de negatieve controles (BacX) en de blanco controle behandeling op dag 7,21,30 en 37 bij de whole leaf assay met <i>Z. tritici</i>	47
Figuur 28 Barplots van de resultaten van de parameter ChIldx bij de negatieve controles (BacX) en de blanco controle behandeling op dag 7, 14 en 37 bij de whole leaf assay met <i>Z. tritici</i>	47
Figuur 29. Boxplots van de resultaten van de parameter cGFP van de blanco en negatieve controles op dag 2, 3 en 4 bij de detached leaf assay met <i>F. graminearum</i>	60
Figuur 30. Barplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm (A) en ChIldx (B) bij de behandeling van <i>F. graminearum</i> met de subset Actinobacteriën (BacX+Fg), de blanco controle behandeling en de positieve geïnfecteerde behandeling (Fg) op dag 14 en 19 bij de detached aer assay met <i>F. graminearum</i>	61
Figuur 31. Correlatieplot tussen het aantal kolonies per petriplaat en de sporenconcentratie bij de in vitro plate assay methode 3. R = correlatiecoëfficiënt en p is het significantieniveau	61
Figuur 32. Boxplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm bij de behandeling van <i>Z. tritici</i> met de verschillende Actinobacteriën (BacX+Fg), de blanco controle en de positieve geïnfecteerde controle (Zt) op dag 21, 30 en 37 bij de whole leaf assay met <i>Z. tritici</i>	62
Figuur 33. Boxplots van de resultaten van de parameter ChIldx bij de behandeling van <i>Z. tritici</i> met de verschillende Actinobacteriën (BacX+Fg), de blanco controle en de positieve geïnfecteerde controle (Zt) op dag 14, 21, 30 en 37 bij de whole leaf assay met <i>Z. tritici</i>	62

LIJST VAN TABELLEN

Tabel 1. Hoeveelheid gebruikte media per liter gedestilleerd water.....	25
Tabel 2. Gebruikte Actinobacteriën gedurende deze thesis.....	26
Tabel 3. Overzicht van gebruikte de spectrale parameters en hun afgeleiden.	32

LIJST VAN AFKORTINGEN

ACC	Aminocyclopropan-Carboxylaat
cGFP	Gecorrigeerd green fluorescent protein signaal
ChIF	Chlorofylfluorescentie
ChIIdx	Chlorofyl Index
DNA	Deoxyribonucleic acid
DON	Deoxynivalenol
EHM	Extrahaustoriale membraam
ET	Ethyleen
FHB	Fusarium head blight
Fm	Maximale fluorescentie
Fv	Variabele fluorescentie
GFP	Green fluorescent protein
IAA	Indolazijnzuur
IC	Infectiekussens
ISR	Geïnduceerde systemische resistentie
JA	Jasmonaat
KVE	kolonie vormende eenheden
LED	Light emitting diode
LOX	Lipoxygenase
LPMO	Lytisch polysaccharide monooxygenase
OD	Optische dichtheid
PAL	Fenylalanine ammoniak-lyase
PAMP	pathogeen-geassocieerde moleculair patroon
PBS	Phosphate bufferd saline
PDA	Potato dextrose agar
PGPR	Planten groeibevorderende rhizobacteriën
PPO	Polyfenoloxidase
PR	Pathogenese-gerelateerde
PTI	Patroon-getriggerde immuniteit
RH	Relative humidity
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactieve zuurstofsoorten
rpm	Revolutions per minute
SA	Salicylzuur
SAR	Systemische verworven resistentie
STB	Septoria Tritici Blotch
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
UV	Ultraviolet
VOC	Vluchtige organische component

INLEIDING

In een tijdperk waarin de wereld geconfronteerd wordt met een snel veranderend klimaat en toenemende druk op natuurlijke hulpbronnen, wordt de urgentie om duurzame oplossingen te vinden voor essentiële problemen steeds groter. Een van deze dringende kwesties is het gebruik van pesticiden in de landbouw en de schadelijke effecten ervan op het milieu, de gezondheid van mens en dier. In deze context is het verkennen en ontwikkelen van duurzame alternatieven voor pesticiden van cruciaal belang voor het behoud van ecosystemen en het waarborgen van een gezonde toekomst voor de mensheid. Pesticiden zijn lange tijd beschouwd als een essentieel instrument in de landbouw voor het bestrijden van plagen en het beschermen van gewassen tegen ziekten. Echter, het overmatige en vaak ondoordachte gebruik van deze chemicaliën heeft ernstige negatieve gevolgen gehad voor het milieu en de gezondheid. Pesticiden dragen bij aan bodemverontreiniging, watervervuiling en het verlies van biodiversiteit door het doden van niet-doelorganismen, zoals nuttige insecten en micro-organismen. Bovendien kan volgens Ruparathna et al. (2018) voortdurende blootstelling aan pesticideresiduen in fruit en groenten leiden tot acute en chronische toxiciteit en andere gezondheidsproblemen.

De Green Deal, een ambitieus initiatief van de Europese Unie, vormt een cruciale pijler in de transitie naar een duurzamere landbouwsector. Met als doel om tegen 2050 klimaatneutraliteit te bereiken, benadrukt de Green Deal de noodzaak van een grondige herziening van landbouwpraktijken en beleidsmaatregelen. Door te streven naar meer biodiversiteit, minder gebruik van chemische stoffen en een efficiënter gebruik van natuurlijke hulpbronnen, biedt de Green Deal een kader waarbinnen innovatieve oplossingen zoals Actinobacteriën als biocontrole middel kunnen gedijen, terwijl ze tegelijkertijd de langetermijndoelen van duurzaamheid en milieubescherming ondersteunen.

Een van de meest veelbelovende benaderingen om de nadelen van pesticiden te verminderen, is het ontwikkelen en implementeren van duurzame alternatieven die minder schadelijk zijn voor het milieu en de menselijke gezondheid. Deze alternatieven omvatten een breed scala aan methoden, variërend van geïntegreerde plaagbestrijding tot biologische bestrijdingsmiddelen en innovatieve technologieën zoals biologische controle. In het bijzonder heeft biologische controle aandacht getrokken als een veelbelovende strategie om plagen en ziekten in de landbouw aan te pakken zonder de negatieve effecten van traditionele pesticiden. Deze aanpak maakt gebruik van natuurlijke vijanden, concurrenten of micro-organismen om plagen en pathogenen te beheersen en schade aan gewassen te verminderen (Gurr et al., 2017). Een opkomende klasse van biologische bestrijdingsmiddelen die bijzondere interesse wekt, zijn Actinobacteriën, een diverse groep van bacteriën die wijdverspreid zijn in verschillende omgevingen, waaronder de bodem.

Actinobacteriën hebben bewezen potentieel als biocontrole middel tegen een verscheidenheid aan fungale plantpathogenen die ernstige schade aan landbouwgewassen veroorzaken, waaronder tarwe. Deze bacteriën kunnen verschillende mechanismen gebruiken om de groei en verspreiding van schimmelziekten te remmen, zoals de productie van antischimmelverbindingen, competitie om voedingsstoffen en ruimte, en het stimuleren van de plantafweermechanismen. Een van de meest veelbelovende aspecten van het gebruik van Actinobacteriën als biocontrole middel is hun vermogen om specifiek te targeten op pathogene schimmels, terwijl ze geen schadelijke effecten hebben op niet-doelorganismen of het milieu (Sharma & Salwan, 2018). Dit maakt ze een veilig en duurzaam alternatief voor chemische fungiciden, die vaak brede en niet-specifieke effecten hebben. Bovendien hebben actinobacteriën het voordeel dat ze natuurlijk voorkomen in de bodem, wat betekent dat ze kunnen worden geïntegreerd in bestaande landbouwpraktijken met minimale verstoring van het ecosysteem. Door het stimuleren van de natuurlijke populaties van Actinobacteriën in de bodem of door de toepassing van geïsoleerde stammen als inoculant, kunnen landbouwers de ziektedruk verminderen en de gezondheid en opbrengst van hun gewassen verbeteren zonder volledig afhankelijk te zijn van synthetische chemicaliën (Yadav et al., 2018). Echter, ondanks de

veelbelovende vooruitzichten van Actinobacteriën als biocontrole middel, zijn er nog steeds uitdagingen en beperkingen die moeten worden aangepakt voordat ze op grote schaal kunnen worden toegepast in de landbouwpraktijk. Deze omvatten kwesties zoals de optimalisatie van productie- en toepassingsmethoden, de identificatie van effectieve stammen voor specifieke pathogenen en het begrip van de interacties tussen Actinobacteriën, planten en pathogenen op moleculair niveau. In deze context is verder onderzoek en ontwikkeling essentieel om de potentie van Actinobacteriën volledig te benutten en te integreren in duurzame landbouwsystemen.

Kortom, het vinden van duurzame alternatieven voor pesticiden is van vitaal belang voor het behoud van gezonde ecosystemen, het waarborgen van voedselzekerheid en het beschermen van de gezondheid van mens en milieu. Actinobacteriën vertegenwoordigen een veelbelovende biocontrole tool tegen fungale plantpathogenen op tarwe en bieden een innovatieve en milieuvriendelijke aanpak om de uitdagingen van de moderne landbouw aan te pakken.

1 LITERATUURSTUDIE

1.1 Infectie fungale tarwepathogenen

Fungale plant pathogenen zijn één van de belangrijkste oorzaken van oogstverliezen in gewassen (Perfect & Green, 2001). Ze kunnen bij een hoge infectiedruk een enorme impact hebben op de plantengroei, ontwikkeling en opbrengst. Tot op heden worden ze voornamelijk bestreden met chemische fungiciden. Vanwege veranderde wetgeving binnen de Europese Green Deal zullen vele van deze chemische fungiciden worden uitgefaseerd, waardoor er behoefte is aan minder milieubelastende alternatieven. Hoewel er onderzoek gaande is naar nieuwere biologische bestrijdingsmiddelen, blijken deze vaak minder effectief te zijn dan hun chemische tegenhangers. Daarom is het van cruciaal belang om een grondig begrip te hebben van het infectieproces van de fungale tarwepathogeen, zodat bestrijdingsmaatregelen hierop beter kunnen worden afgestemd (Kaur et al.).

1.1.1 Hechting en penetratie

De infectie van een plant door een pathogene schimmel start bij de hechting van de schimmelsporen aan het gastheeroppervlak. Dit is een essentiële pre-infectieuze gebeurtenis die het succes van de infectie zal bepalen (Mendgen & Deising 1993). De hechting omvat zowel de herkenning van het gastheeroppervlak, de adhesie van de sporen als het creëren van een infectieveld. Hoewel hechting bij veel schimmelsoorten voorkomt, is er een verscheidenheid in de samenstelling van de adhesieve componenten (Tucker & Talbot, 2001), dewelke in sommige gevallen zeer specifiek zijn voor de herkenning van en binding aan een bepaald gastheeroppervlak (Mendgen & Deising 1993 ; Cole & Hoch, 1991). Deze componenten bevatten o.a. in water oplosbare glycoproteïnen, vetten, polysachariden en eiwitten (Mendgen & Deising 1993 ; Cole & Hoch, 1991; Tucker & Talbot, 2001). De precieze samenstelling van deze componenten is zeer heterogeen en er is geen bewijs voor een gemeenschappelijke adhesieve verbinding. De sporen kunnen aan het oppervlak hechten door middel van o.a. lectines, ionische interacties of hydrofoob contact met de cuticula van de plant (Tucker & Talbot, 2001).

Het voorbereiden van het infectieveld houdt in dat er vloeistoffen worden geproduceerd door de sporen die in staat zijn om de ontwikkeling van de morfologische stadia van kieming van de schimmel mogelijk te maken op het gastheeroppervlak (Cole & Hoch, 1991). Deze vloeistoffen zijn in staat om erosie van de cuticula te veroorzaken naast en onder de sporen waardoor de sporenkieming vergemakkelijkt. Op deze manier wordt er een oppervlak gecreëerd met hechtende eigenschappen (Mendgen & Deising, 1993 ; Cole & Hoch, 1991). De sporenkieming start met vorming van een appressoriale kiembuis die beperkt is tot de zone waar de vloeistoffilm wordt afgezet. In deze film zijn verschillende enzymen aanwezig waaronder esterasen, invertasen, β -glucosidasen, cutinasen, peroxidasen en DNasen (Mendgen & Deising 1993 ; Cole & Hoch, 1991; Tucker & Talbot, 2001). Esterasen en cutinasen zorgen voor afbraakproducten van de cuticula die dan onmiddellijk beschikbaar zijn als voedingsstoffen voor de appressoriale kiembuis (Tucker & Talbot, 2001). Specificiteit voor de enzymatische afbraak van cuticulacomponenten van een bepaalde gastheer kan dus bijdragen aan de uiteindelijke specificiteit van interactie. Voornamelijk de esterasen en cutinasen spelen in een rol in de hechting, maar ook in de penetratie. De exacte enzymen kunnen variëren afhankelijk van het type schimmel en de interactie met de gastheer (Cole & Hoch, 1991).

Uit de vastgehechte sporen kunnen kiembuizen worden gevormd. Het ontkiemingsproces vereist de mobilisatie van opslagreserves en snelle membraan- en celwandbiosynthese tijdens de verlenging van de kiembuis (Tucker & Talbot, 2001). In de apicale tip van de kiembuis verzamelen zich cytoplasmatische vesikels. Deze tip is extreem gevoelig aan elke mogelijke vorm van verstoring waardoor de groei zal stoppen en de vesikels zich onmiddellijk zullen verspreiden (Mendgen & Deising 1993 ; Cole & Hoch, 1991; Tucker & Talbot, 2001). De hyfe zal door het cytoskelet aangezet worden tot beweging en de vorm en stevigheid van

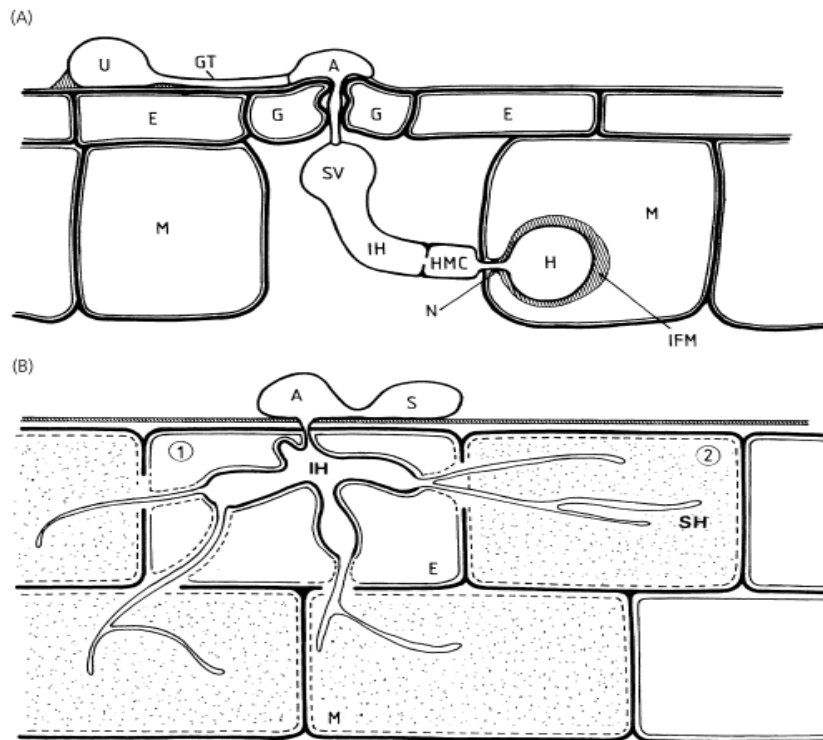
de hyfewand wordt bepaald door continue afscheiding van celwandpolymeren vanuit de hyfe die rigide worden naarmate ze verder komen te liggen van de uitgroeiende hyfetip. De groeiende schimmelhyfe zal een penetratieplaats zoeken waarover de schimmel een appressorium maakt (Mendgen & Deising, 1993). De differentiatie kan optreden als reactie op een aantal signalen, waaronder oppervlaktehardheid, hydrofobiciteit, plantsignalen en oppervlakte-topografie vallen (Tucker & Talbot, 2001). De structuur van het appressorium bevat verschillende wandlagen die de toenemende druk ondersteunen tijdens het penetratieproces. Uit het appressorium wordt een penetratiehyfe gevormd die de cuticula van de waardplant doorboort dankzij de geproduceerde enzymen. De penetratiehyfe is ook in staat om de epidermis te doorbreken dankzij opgebouwde osmotische druk die wordt geproduceerd door glycogeenafbraakproducten in de hyfe, waar glycogeen de energiebron is. Bij vele schimmels is het zo dat de lengte en breedte van de hyfe onafhankelijk zijn van de gastheerplant. Indien de cuticula en epidermis doorbroken zijn, stoot de schimmelpathogeen op een nieuwe barrière, namelijk de plantencelwanden (Mendgen & Deising, 1993). Plantencelwanden bestaan uit cellulosemicrofibrillen ingebed in een matrix van pectine, hemicellulose, lignine en structurele eiwitten. Om de barrière van de plantencel te overwinnen, produceren de fytopathogene schimmels enzymen die zich richten op de deconstructie van cellulose, xylaan en pectine. Deze enzymen zijn voornamelijk belangrijk bij schimmels die geen gespecialiseerde penetratiestructuren hebben (Kubicek et al., 2014). Indien de penetratiehyfe in contact komt met de plantencellen, differentieert de hyfe tot een infectiehyfe. De infectiehyfe kan gezien worden als een aparte morfologische eenheid met speciale fysiologische functies. De infectiehyfe is de eerste structuur van de schimmel die toegang krijgt tot de nutriënten van de gastheer (Mendgen & Deising, 1993).

1.1.2 Biotrofe en hemibiotrofe infectiestructuren

Plant pathogene schimmels kunnen op basis van hun voedingspatroon onderverdeeld worden in necrotrofe en biotrofe schimmels. Necrotrofe schimmels infecteren levende weefsels, veroorzaken celdood en voeden zich met dode of stervende plantencellen. Daartegenover staan de biotrofe schimmels dewelke de cellen van de geïnfecteerde waardplant nog dagen in leven houden, hierop parasiteren en voedingsstoffen uit de levende cellen extraheren. De biotrofe schimmels hebben een infectieproces waarbij er vorming is van gespecialiseerde voedingsstructuren, haustoria, die zich in de geïnfecteerde plantencellen ontwikkelen zoals te zien is in Figuur 1.A. Haustoria zijn draden van intercellulaire, intracellulaire en epicuticulaire hyfen die eindigen in een gastheercel en die zorgen voor een langdurige biotrofe relatie tussen schimmel en plant. Het zijn bovendien erg metabool actieve structuren die een belangrijke rol spelen in de nutriëntenopname (Perfect & Green, 2001).

De biotrofe schimmels kunnen nog verder onderverdeeld worden, zo bestaan er facultatieve-biotrofen, hemibiotrofen en obligaat-biotrofen. Facultatief-biotrofe schimmels kunnen saprofytisch overleven maar hebben een succesvolle biotrofe infectie met planten nodig voor de voltooiing van hun levenscyclus. Hemibiotrofe schimmels infecteren de plant, houden een initiële biotrofe fase, om dan in een later stadium van de infectie secundaire necrotrofe hyfen te ontwikkelen die zich verspreiden door gastheerweefsels af te doden. De hemibiotrofen hebben dus een infectie mechanisme dat een soort mix is van de mechanismes van biotrofe en necrotrofe schimmels. Het verschil tussen de obligaat biotrofen en hemibiotrofen zit hem in de infectiestructuren, zoals wordt weergegeven in Figuur 1. Obligaat biotrofe schimmels ontwikkelen enkel haustoria terwijl hemibiotrofen ook necrotrofe intracellulaire hyfen ontwikkelen. Zowel de haustoria als de necrotrofe intracellulaire hyfen penetreren de celwand om zich achteraf in de cel verder te ontwikkelen. De necrotrofe intercellulaire hyfen doden de cellen af, terwijl haustoria de cellen in leven houden. In de cel worden beide structuren omgeven door een geïnvagineerd plantenplasmamembraan. Het geïnvagineerd plantenplasmamembraan dat de haustoria omringt, staat bekend als het extrahaustoriale membraan (EHM). Het EHM heeft ribbels en uitsteeksels die in aantal stijgen naarmate haustoria ouder worden. Deze ribbels en uitsteeksels vergroten de oppervlakte van haustoria waardoor de nutriëntenopname wordt bevorderd.

EHM bindt zich aan “neckbandes”, dit zijn kraagachtige structuren gevormd rond het punt waar haustoria en de wand van de gastheercel in contact staan. Intracellulaire hyfen en haustoria zijn naast hun voedingsfunctie ook betrokken bij signalering, communicatie en het vermijden van herkenning door de gastheer. Toch zijn er ook hemibiotrofe schimmelsoorten die al deze structuren niet hebben of structuren hebben die verschillend zijn van de hierboven besproken structuren. Dit suggereert dat infectiestructuren bij elke interactie uniek gedifferentieerd zijn en dat de precieze specialisatie die optreedt afhankelijk is van de betrokken schimmel en gastheer. Deze fenomenen zijn bovendien ook nog eens moeilijk te onderzoeken omdat de *in planta* infectie van schimmelpathogenen een levende plant vereisen (Perfect & Green, 2001).



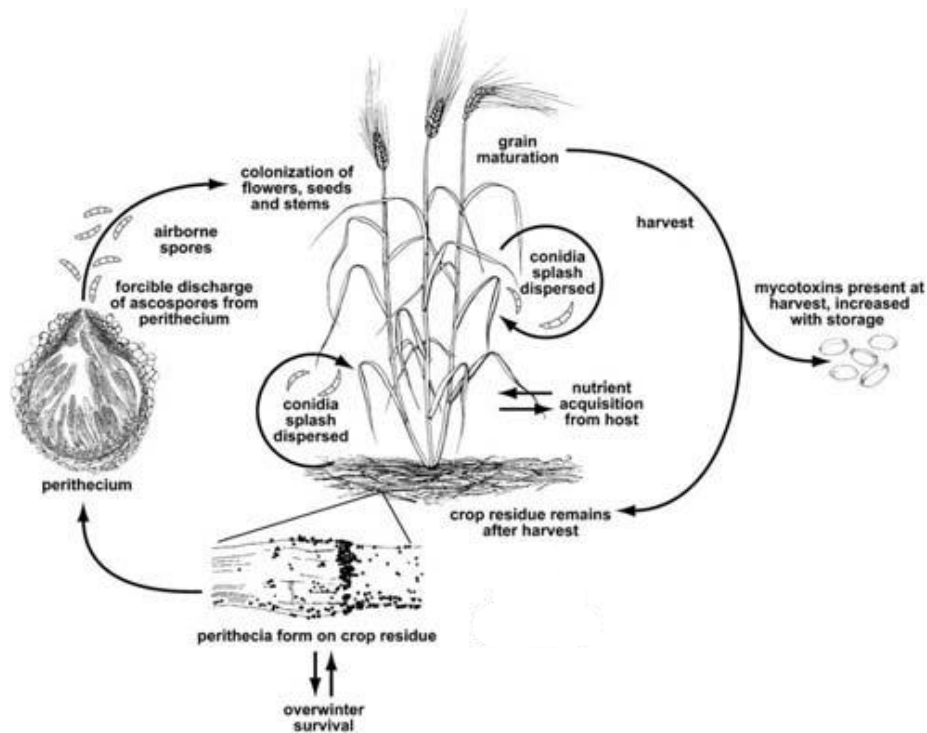
Figuur 1 (A) infectie proces van een biotrofe schimmel in een dikaryotische toestand. (U) = uredosporen kiemen met de vorming van een kiembuis (GT). Vorming van een appressorium (A) boven de substomatale openingen (G). Vanuit de substomatale blaasjes (SV) worden de intercellulaire hyfe gevormd (IH). IH komt in contact met de mesofyl cellen (M) en vormen haustoria moeder cellen (HMC). Vorming van neckbands (N) en intracellulaire haustoria (H). (B) Infectieproces van een intracellulaire hemibiotroof. Sporen (S) kiemen tot een appressorium (A). Vorming van intracellulaire hyfe (IH) in de epidermale cellen (E). Uit de IH vorming zich secundaire necrotrofe hyfe (SH) (afkomstig van Perfect & Green (2001))

1.2 Fungale tarwepathogenen

1.2.1 *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum is een hemibiotrofe, filamentachtige schimmel die behoort tot het geslacht *Fusarium* afkomstig uit de stam Ascomycota. Aan dit geslacht kunnen verschillende ziekten worden gelinkt, waarvan de meest vooraanstaande *Fusarium* head blight (FHB) is. FHB is een plantenziekte die wordt veroorzaakt door een complex van meerdere *Fusarium*-soorten (Leplat et al., 2013). De ziekte wordt internationaal erkend als één van de meest destructieve ziekten van tarwe, gerst en andere kleine granen, vanwege de verminderde marktwaarde door verlaagde opbrengsten en de accumulatie van mycotoxinen. Mycotoxinen zijn giftige stoffen die geproduceerd kunnen worden door bepaalde schimmels als secundaire metabolieten. Het bekendste mycotoxine geproduceerd door *F. graminearum* is deoxynivalenol (DON). DON is een remmer van de eiwitsynthese en kan schadelijke gezondheidseffecten veroorzaken bij mens en dier (Keller et al., 2014). Een ander mycotoxine geproduceerd door *F. graminearum* is het oestrogene zearalenon en kan problemen bij de reproductie veroorzaken (Turkington et al., 2017).

F. graminearum is in staat om in gematigde klimaten te overwinteren in de bodem en op aangetaste gewasresten dankzij het enzymatisch vermogen om deze gewasresten af te breken via de productie van o.a. pectinasen, cellulasen en hemicellulasen en ze te gebruiken als voedingsstoffen (Brauer et al., 2020 ; Leplat et al., 2013). Het mycelium op aangetaste gewasresten produceert zowel macro- en microconidia (asexuele sporen) als ascosporen (seksuele sporen), die het primaire inoculum vormen voor de ontwikkeling van FHB (Leplat et al., 2013). *F. graminearum* kent dus zowel een seksuele als asexuele levenscycli. De seksuele voortplanting duurt gemiddeld 2 weken waarin via meiose ascosporen worden geproduceerd, die via een flesvormig perithecium met kracht in de lucht worden geloosd zoals weergegeven in Figuur 2. De asexuele levenscyclus komt voor onder bijzonder natte periode met de productie van de asexuele conidia (Turkington et al., 2017). Zowel macro-, microconidia als ascosporen kunnen ziekten teweeg brengen, maar macro- en microconidia hebben de neiging om zich eerder lokaal te verspreiden, terwijl ascosporen de mogelijkheid hebben om zich over grote afstanden te verspreiden (Keller et al., 2014). Ascosporen hebben het vermogen om aanzienlijke afstanden af te leggen doordat ze worden verspreid door de wind of via regendruppels. Indien ze verspreid worden door de wind wordt dit droge depositie genoemd, indien verspreid door de regen is er sprake van natte depositie (Brauer et al., 2020 ; Keller et al., 2014). De asexuele conidia verspreiden zich over kortere afstanden dankzij spatverspreiding (Brauer et al., 2020). Deze verspreiding van sporen vormt een cruciale fase in de kolonisatie van nieuwe substraten en leefgebieden door de schimmel (Keller et al., 2014). Het begin van het infectieproces van *F. graminearum* bij tarwe is de afzetting van sporen op of in de aren van de plant, aangezien deze gevoeligste zijn voor infectie (Goswami & Kistler, 2004). Kieming op de opkomende aren van tarwe tijdens de anthese (bloei) van de plant is het meest succesvol voor het initiëren van de ziekte (Seong et al., 2008). Het kiemen van de sporen gebeurt snel, namelijk al na twee tot zes uur en is afhankelijk van de hoeveelheid licht, vochtigheid, temperatuur als de aanwezigheid van een koolstofbron (Brauer et al., 2020). Hierna is er een ontwikkeling van kiembuizen die groeien naar gevoelige plekken van de plant om binnen te dringen. Een voorbeeld van gevoelige plekken zijn de huidmondjes op het tarweblad of afbrekend helmknopweefsel (Turkington et al., 2017 ; Goswami & Kistler, 2004). De schimmel verspreidt zich in de plant via de vaatbundels van de plant en heeft een korte biotrofe relatie met de gastheer alvorens over te schakelen naar de necrotrofe fase. Het is dus een hemibiotrofe schimmel en het infectieproces verloopt verder zoals beschreven onder de paragraaf “Biotrofe en hemibiotrofe infectiestructuren” (Goswami & Kistler, 2004). Wat wel typisch is aan een *F.graminearum* infectie is dat de hyfen meercellige complexe appressoria ontwikkelen die infectiekussens (IC) worden genoemd. Deze IC zijn in staat om meerdere penetratieplaatsen te genereren, waardoor *F.graminearum* gemakkelijker de cuticula van de plant kan binnendringen (Mentges et al., 2020). Na infectie zal de schimmel beginnen met de productie van mycotoxinen (Turkington et al., 2017). De necrotrofe fase gaat gepaard met een toename van de kolonisatiekracht en uiteindelijk leidt plantensterfte tot een grondige kolonisatie van het gastheersubstraat (Goswami & Kistler, 2004).

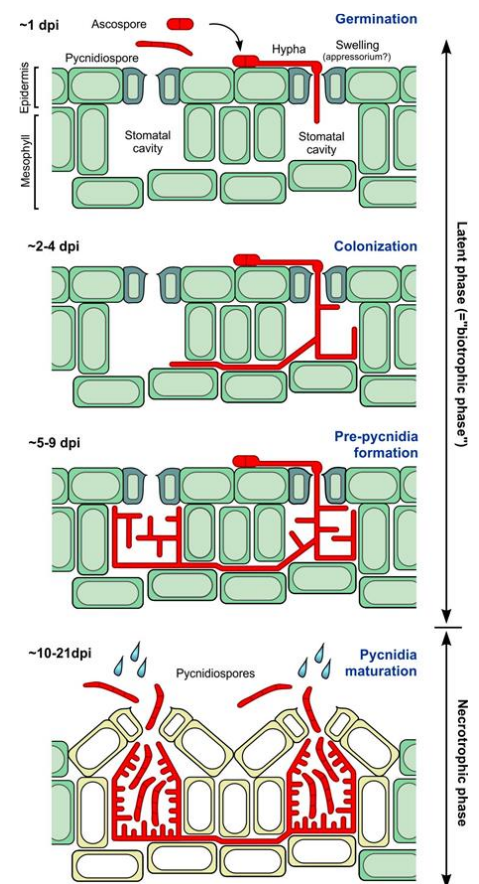


Figuur 2 De levenscyclus van *Fusarium graminearum*. De seksuele cyclus start bij de productie van ascosporen geproduceerd door een peritheciën dat gevormd is op achtergebleven, aangetaste gewasresten. Ascosporen verspreiden zich over lange afstanden. Bij de asexuele cyclus is er de productie van conidia die zich eerder lokaal verspreiden. Beide cyclussen brengen ziekte teweeg waarbij er een productie is van mycotoxinen. (afkomstig van Turkington et al. (2017))

1.2.2 *Zymoseptoria tritici*

Zymoseptoria tritici is een wereldwijd verspreide Ascomycete fungale plantpathogeen behorend tot het geslacht *Zymoseptoria* die Septoria Tritici Blotch (STB), ook wel bladvlekkenziekte genoemd, op tarwe veroorzaakt. De schimmel zal na een biotrofe fase er voor zorgen dat de tarweplant zal afsterven, hierdoor valt deze schimmel onder de groep van de hemibiotrofe schimmels. *Z. tritici* is in staat om zowel seksuele als asexuele sporen te produceren. Macrospycnidosporen zijn de asexuele sporen van de schimmel die multicellulaire structuren hebben, bestaande uit 4-8 elongate cellen die kunnen ontkiemen tot dunne hyfen en zich uitstrekken door polaire tipgroei. De seksuele sporen spelen een rol bij de overwintering en worden door de lucht verspreid. Ook bij deze schimmel zullen de seksuele sporen honderden kilometers ver verspreid worden terwijl de asexuele sporen eerder lokaal blijven. Afhankelijk van de milieuomstandigheden kunnen de seksuele of asexuele sporen de primaire bron zijn van inoculum bij STB (Steinberg, 2015). De infectie van *Z. tritici* kan opgedeeld worden in drie fasen. Als eerste is er het binnendringen van de schimmel, hierna volgt de kolonisatie van het plantenweefsel om tot slot de vorming van het vruchtlichaam te hebben. Indien een spore zich hecht op een tarweblad schakelt deze over naar de hyfale groei. Deze hyfen zullen de plant penetreren via substomatale openingen waar een appressorium-achtige zwelling wordt waargenomen. Er wordt geen volledig appressorium gevormd omdat het genoom van *Z. tritici* genen mist om dit te ontwikkelen (Steinberg, 2015).

De levenscyclus van *Z. tritici* bevat verschillende stadia, weergegeven in Figuur 3. De schimmelhyfen die ontstaan in de substomatale holte zullen het mesofylweefsel van de plant binnendringen en zich in de bladlenge ontwikkelen. Alle hyfen zullen zich voortdurend verspreiden in de intercellulaire ruimtes van het plantenweefsel. Na twee tot negen dagen infectie vormen de hyfen een vertakt netwerk dat de bladmoes van de plant koloniseert. Gedurende deze kolonisatieperiode is STB asymptomatisch en is het nog onduidelijk of de schimmel afhankelijk is van plantaardig materiaal voor zijn levensonderhoud. Deze fase wordt ook wel de latente fase genoemd. Ongeveer vijf tot negen dagen na infectie beginnen de hyfen de substomatale holte volledig te vullen, dit leidt tot de verschijning van pre-pycnidia. Pycnidia zijn ongeslachtelijke vruchtlichamen die voorkomen bij bepaalde schimmels die behoren tot de Ascomycota. Ze zijn verantwoordelijk voor de productie en opslag van asexuele sporen. Na gemiddeld 10-21 dagen verschijnen er chlorotische laesies gevolgd door necrotische gebieden. Chlorotische laesies zijn geelachtige of bleekgroene verkleuringen die zich vormen op bladeren door een gebrek aan chlorofyl. Vanaf de vorming van laesies spreken we over de necrotrofe fase. Deze fase start meestal in de buurt van de substomatale holttes. Door het uiteenvallen van de gastheercellen krijgt de schimmel veel voedingsstoffen die nodig zijn om de schimmelbiomassa te vergroten. Hierdoor zullen ook uiteindelijk volwassen pycnidia gevormd worden, die meercellige macropycnidiosporen produceren die op hun beurt opnieuw lokaal verspreid worden dankzij spatverplaatsing naar andere planten (Steinberg, 2015). Gemiddeld bevatten volwassen pycnidia 300 sporen (Fones & Gurr, 2015).



Figuur 3 Levenscyclus *Zymoseptoria tritici*, weergegeven in de latente fase (1 tot 9 dagen na infectie) en in de necrotrofe fase (10 tot 21 dagen na infectie). De latente fase bestaat uit de kieming, kolonisatie en pre-pycnidia vorming. In de necrotrofe fase ontstaan de volwassen pycnidia. (afkomstig van Steinberg (2015))

De timing voor het toepassen van fungiciden tegen STB is moeilijk omdat men, omwille van de latente fase, niet met zekerheid de progressie van de ziekte kan waarnemen. Het is namelijk zo dat fungiciden die bij het begin van de infectie worden gebruikt, maar zeven dagen werkzaam zullen zijn tijdens de latente fase. Het is dus mogelijk dat de landbouwer er vanuit gaat dat de schimmel is uitgeroeid, terwijl hij zich juist aan het vermenigvuldigen is gedurende deze fase. Het bestrijden van de ziekte met fungiciden zal dus het best gebeuren bij het ontwikkelen van de plant, dus nog voor de ziekte kan optreden en dan opnieuw bij het opkomen van de aren. Indien er laesies waargenomen worden op de bladeren is het eigenlijk al te laat om het gewas te behandelen, aangezien STB heeft zijn intrede dan al gemaakt heeft (Fones & Gurr, 2015).

1.2.3 *Blumeria graminis*

Blumeria graminis is een lid van het geslacht *Erysiphe* uit de stam van Ascomycete schimmels en is de veroorzaker van de ziekte echte meeldauw op tarwe (Talbot, 2004). De meest opvallende symptomen van de ziekte omvatten de witte donzige kolonies mycelium en conidiosporen op het plantenoppervlak. De ziekte zal leiden tot een groeiachterstand van de planten (Basandrai et al., 2023). *B. graminis* is een obligaat biotrofe plantpathogeen, wat betekent dat het een levende gastheer nodig heeft voor zijn groei en de geïnfecteerde cellen niet doodt. Dit resulteert in de onmogelijkheid om de schimmel op te kweken in axenische culturen, omdat hij de waardplant nodig heeft om te groeien. Onder *B. graminis* zijn er nog verschillende ondersoorten, waaronder *B. graminis* f.sp *hordei* en *B. graminis* f.sp *tritici* (Talbot, 2004). *B. graminis* probeert via het appressorium tarwe binnen te dringen in de epidermale cellen en hierin haustoria te vormen. Hierna

is er vorming van oppervlakkige hyfen en het starten van conidiogenese. De epidermale cellen van tarwe hebben een algemene resistentie methode ontwikkeld tegen *B. graminis*. Dit doen ze door onder het schimmelappressorium een apoplastische wand te vormen, ook wel een papil genoemd, die de penetratie van de schimmel doet stoppen. Een papil bestaat uit een callose matrix verrijkt met eiwitten, fenolen en andere elementen (Lyngkjær & Carver, 1999).

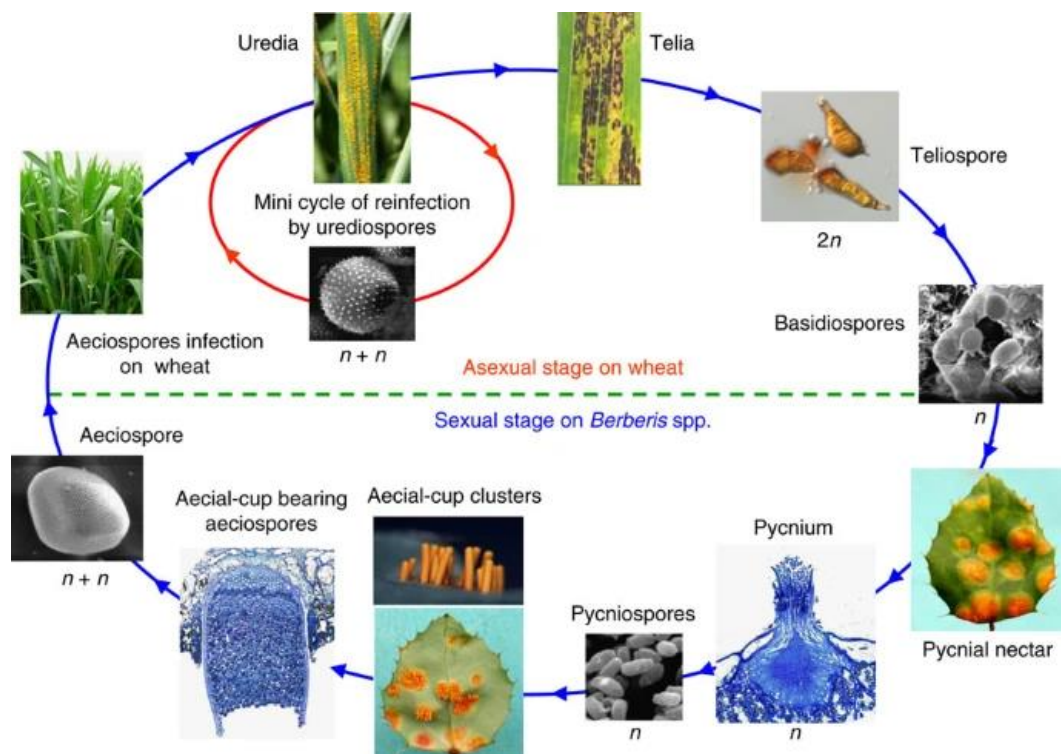
Er zijn twee methodes van voortplanting van *B. graminis*, namelijk een seksuele en asexuele voortplanting. Bij de seksuele cyclus worden er seksuele ascosporen gevormd terwijl er bij de asexuele cyclus asexuele conidia worden gevormd. Indien asexuele conidia op een geschikt gastheeroppervlak vallen, is er de productie van een extracellulaire matrix/film die de hechting van de sporen aan het wandoppervlak ondersteunt. Ascosporen produceren een eerste kiembuis die betrokken is bij de perceptie van de gastheer afgeleide signalen, de opname van water, de hechting van de sporen en de onderdrukking van resistentie. Hierna initiëren de conidia de verdere kiem- en appressorium differentiatieprocessen waardoor er een secundaire kiembuis wordt gevormd, deze kiembuis kan de cuticula en epidermale celwand van de gastheer doorbreken. Hierna is er de vorming van het haustorium in een geïnfecteerde cel. *B. graminis* heeft veel minder koolhydraatactieve enzymcoderende genen dan andere fytopathogene schimmels waardoor voornamelijk de fysieke kracht van de kiembuis om de gastheer binnen te dringen van belang is. Het haustorium transporteert voedingsstoffen en water van de gastheer naar de epifytische hyfen, die zich hierdoor verder kunnen ontwikkelen en nieuwe appressoria kunnen vormen. In deze ketens van epifytische hyfen, die steeds verder uitgroeien, worden asexuele conidia geproduceerd. De seksuele cyclus start wanneer hyfen van tegengestelde paringsstammen aan het einde van de zomerperiode samensmelten en een chasmothecium (vruchtlichaam) vormen. Indien er optimale omstandigheden zijn voor de schimmel en deze dus geen stress ervaart is er een productie van seksuele ascosporen die afrijpen in asci. Over het algemeen bevat elke ascus acht volwassen ascosporen. De ascosporen worden met kracht geloosd en indien ze een geschikt gastheeroppervlak bereiken vormen ze een kiembuis of meerdere kiembuizen. Hierna produceren ze uit een hun kiembuis een appressorium waaruit een hyfe de cuticula als ook de epidermale cellen van de gastheer doorboort en zich ontwikkelt tot een haustorium. Deze jonge kolonie ascosporen ontwikkelt en initieert conidioforen, een keten van asexuele conidia. Het zijn voornamelijk deze asexuele conidia die verspreid worden en zorgen voor de infectie in gastheerplanten (Zhu, 2020).

1.2.4 *Puccinia striiformis*

De ziekte streeproest op tarwe wordt veroorzaakt door *Puccinia striiformis* (Chen, 2005). *P. striiformis* is een schimmel die behoort tot het geslacht *Puccinia* van de familie Pucciniaceae binnen de orde Pucciniales, ook wel roetschimmels genoemd uit de stam Basidiomycota. *P. striiformis* is in staat om het groene weefsel van tarwe te infecteren. De schimmel heeft een erg ingewikkelde levenscyclus met tarwe als primaire gastheer en *Berberis* spp. als alternatieve gastheer, ook heeft de schimmel wel vijf verschillende sporenstadia (Hovmøller et al., 2011). De asexuele reproductie gebeurt op tarwe en de sexuele reproductie vindt plaats op *Berberis* spp. (Khanfri et al., 2018). Symptomen van streeproest verschijnen gemiddeld na één week infectie en de schimmel zal sporuleren twee weken na infectie, met optimale temperatuuromstandigheden als voorwaarde. De opvallendste symptomen van de ziekte zijn oranjekleurige roestpuisten, ook wel uredia genoemd (Hovmøller et al., 2011).

Uredia bevatten elk duizenden urediniosporen (n+n) (Chen, 2005). Deze sporen worden ongeslachtelijk geproduceerd via herhaalde infectiecycli en kunnen leiden tot de start van ziekteverschijnselen op tarwe (Hovmøller et al., 2011) en re-infectie van de tarwe plant (Khanfri et al., 2018). Naarmate de plant ouder wordt zullen deze uredia strepen op de bladeren veroorzaken zoals weergegeven op Figuur 4 (Chen, 2005 ; Hovmøller et al., 2011). Het verouderd geïnfecteerde weefsel van de gastheer kan telia produceren, een voorplantingsstructuur die in staat is om tweecellige teliosporen (2n) te produceren (Hovmøller et al., 2011). Telia komen meestal tevoorschijn indien de nutriënten van het geïnfecteerde weefsel opgeraken (Khanfri et

al., 2018). Teliosporen dienen als overlevingsstructuren die bijdragen aan de verspreiding en overleving van de schimmel. Als teliosporen ontkiemen, produceren ze basidiosporen (n) dewelke dan de alternatieve berberisgastheer kunnen infecteren en zorgen voor de productie van pycnia-infecties aan de bovenzijde van het blad (Figuur 4), waar de seksuele reproductie start. Pycnia zijn structuren die pycniosporen (n) produceren die betrokken zijn bij de seksuele voortplanting van een cel. Hierna worden er aecia gevormd aan de onderkant van het blad, weergegeven in Figuur 4, wat opnieuw specifieke voortplantingsstructuren zijn. De aeciosporen ($n+n$) die door de aecia worden voortgebracht op de bladeren van de alternatieve gastheer, kunnen vervolgens tarwe opnieuw infecteren met streepoestziekte. *P. striiformis* is een obligaat biotrofe schimmel die afhankelijk is van een levende gastheer. De start van de infectie begint met urediniosporen die op de bladeren van tarwe een kiembuisje vormen waardoor ze door de stoma dringen en differentiëren in substomatale blaasjes. Uit deze blaasjes vormen zich infectiehyfen waaruit haustoria worden gevormd. De eerste haustoria vormen zich al na 24u infectie (Hovmøller et al., 2011). Opvallend is dat *P. striiformis* geen appressorium zal vormen (Khanfri et al., 2018).



Figuur 4 Levenscyclus *P. striiformis*, weergeven in een aeksuele fase die plaats vindt op tarwe, en een seksuele fase die plaats vindt op *Berberis* spp.. In de aeksuele fase zorgen urediniosporen voor een re-infectie van tarwe. Telia worden geproduceerd uit verouderd geïnfecteerd weefsel en zorgt voor de productie van teliosporen die op hun beurt basidiosporen vormen. Basidiospore n starten door het infecteren van de *Berberis* spp.. de seksuele cyclus. Gevormde pycnia produceren pycniosporen waarna er de vorming is van aeciosporen die opnieuw tarwe kunnen infecteren (afkomstig van Khanfri et al., 2018)

1.3 Verdedigingsmechanisme van planten

Planten kunnen zich op meerdere manieren verdedigen tegen invasieve pathogenen, zoals de hierboven besproken schimmels.

Ten eerste kan een planteigen anatomische barrière, bestaande uit o.a. de cuticula en de wasachtige laag, de infectie bemoeilijken. De cuticula bedekt de stomatale poriën, waarlangs de fungale plantpathogenen vaak binnendringen. De mechanische eigenschappen van de wasachtige laag kunnen de hechting en ontwikkeling van schimmelsporen beïnvloeden. Alsook beïnvloedt de dikte de weerstand tegen pathogene infecties. Namelijk, hoe dikker de laag, hoe minder goed de pathogeen kan binnendringen.

Eens er effectief contact optreedt tussen de plant en pathogeen kunnen systemische verworven resistentie (SAR) en geïnduceerde systemische resistentie (ISR) optreden. SAR zorgt ervoor dat de plant na blootstelling aan een pathogeen een algemene immuunrespons activeert. SAR wordt dus geactiveerd door interactie met de pathogeen en gaat gepaard met een ophoping van pathogenese-gerelateerde (PR) eiwitten en salicylzuur (SA). Dit mechanisme zal de plant beter voorbereiden op toekomstige infecties met die specifieke pathogenen. ISR wordt geactiveerd door gunstige micro-organismen en is afhankelijk van de door jasmonaat (JA) en ethyleen (ET) gereguleerde routes. Het zorgt voor een immuunrespons die helpt tegen een bredere reeks pathogenen (Salas-Marina et al., 2011).

Een volgende mechanisme is patroon-getriggerde immuniteit (PTI), dat als respons biochemische veranderingen in gang zal zetten. Bij PTI worden geconserveerde virulentiefactoren zoals chitine en β -1,3-glucaan, de belangrijkste bouwstenen van de schimmelcelwanden, herkend door de waardplant dankzij patroonherkenningsreceptoren. De pathogeen-geassocieerde moleculaire patronen (PAMP's), die worden herkend door de receptoren activeren de biochemische veranderingen in de plant en zorgen zo voor o.a. de accumulatie van reactieve zuurstofsoorten (ROS), PR-eiwitten en de versteviging van de celwand met lignine of callose. PR-eiwitten kunnen direct gericht zijn tegen de pathogeen of bijdragen aan het versterken van het verdedigingsmechanisme (Glazebrook, 2005). De versteviging van de celwand met lignine of callose zorgt niet alleen voor het moeilijker afbreekbaar maken van de plantencelwanden voor de pathogeen, maar zorgt er ook voor dat pathogene toxinen moeilijker diffunderen doorheen de celwand (Bellincampi, Cervone, & Lionetti, 2014). De ROS-productie gaat vaak gepaard met een hypersensitieve respons gevolgd door een geprogrammeerde celdood (Audenaert et al., 2013), hieraan zijn necrotrofe schimmels eerder ongevoelig, terwijl biotrofe schimmels wel goed te reguleren zijn via ROS-productie (Glazebrook, 2005).

Tot slot produceren planten ook een breed scala aan antimicrobiële verbindingen als reactie op pathogeneninfecties. Phytoalexines, *de novo* gesynthetiseerde antimicrobiële verbindingen, bieden ziekteresistentie door de celwanden van pathogenen te doorbreken en hun metabolisme te verstoren. Andere belangrijke antimicrobiële verbindingen zijn flavonoïden, die o.a. bescherming bieden tegen destructieve processen in plantencellen. De productie van bepaalde enzymen kan ook gezien worden als verdedigingsmechanisme. Zo is bijvoorbeeld fenylalanine ammoniak-lyase (PAL) een belangrijk enzym dat betrokken is bij het metabolisme van fenylpropanoïden en de synthese van verschillende secundaire metabolieten, waaronder fenolen en lignine. Polyfenoloxidase (PPO) katalyseert de oxidatie van fenolen tot quinonen en vertoont een positieve correlatie met ziekteresistentie in verschillende gewassen (Kaur et al., 2022).

1.4 Nood aan duurzame alternatief voor chemische fungiciden

Het verdedigingsmechanisme van de plant is soms niet voldoende om infecties door pathogenen te voorkomen. In een agro-economische context wordt dan gebruik gemaakt van bestrijdingsmiddelen. De toenemende druk op de landbouwsector om duurzame en milieuvriendelijke praktijken te omarmen, heeft geleid tot een groeiende interesse in biologische bestrijdingsmiddelen als alternatief voor chemische fungiciden. Chemische fungiciden hebben decennialang een cruciale rol gespeeld bij de bescherming van gewassen tegen ziekten, waaronder tarwe (Zubrod et al., 2019). Hun gebruik heeft echter geleid tot diverse nadelige effecten op het milieu. Deze omvatten vervuiling van bodem en water, schade aan niet-doelorganismen, ontwikkeling van resistentie bij pathogenen, en risico's voor de menselijke gezondheid bij blootstelling. Bovendien zijn de langetermijneffecten van deze chemische stoffen op ecosystemen zorgwekkend (Carisse, 2010) en staan ze onder druk door de stijgende aanwezigheid van resistentie fytopathogenen. Met de groeiende erkenning van de impact van chemische gewasbeschermingsmiddelen wordt de noodzaak voor duurzame alternatieven steeds urgenter.

Het gebruik van biologische bestrijdingsmiddelen vereist echter een bredere implementatie van duurzame landbouwpraktijken. Dit omvat onder meer het bevorderen van biodiversiteit op landbouwgronden, het verbeteren van de bodemgezondheid en het stimuleren van geïntegreerde plaagbeheersingsstrategieën (Jacquet et al., 2022). Deze benaderingen zijn in lijn met de doelstellingen van de "Green Deal" en dragen bij tot een veerkrachtigere en duurzamere landbouwsector. De "Green Deal" is een initiatief opgesteld in december 2019 door de Europese Unie waarmee ze haar engagement voor een duurzamere landbouw wil versterken. Het is een actieplan met als doel het verminderen van uitstoot en broeikasgassen en bevorderen van de duurzaamheid. Deze strategie streeft naar een klimaatneutrale, circulaire economie waarin de landbouw een sleutelrol speelt. De "Farm to Fork"-strategie binnen de Green Deal benadrukt specifiek de noodzaak om het gebruik van chemische gewasbeschermingsmiddelen te verminderen en duurzame alternatieven te bevorderen (European Commission, 2020). Bovendien zorgen de Europese "Green Deal" en de "Farm to Fork"-initiatieven ervoor dat de bestrijding via chemische gewasbescherming steeds moeilijker te implementeren valt (Kaur et al.). Dit creëert een gunstige omgeving voor onderzoek en ontwikkeling naar micro-organismen als biologische bestrijdingsmiddelen.

Zo vertonen Actinobacteriën potentieel in het onderdrukken van verschillende fungale plantpathogenen, waaronder die welke tarwe aantasten (Ebrahimi-Zarandi et al, 2022). Door hun natuurlijke aanwezigheid in de bodem en hun vermogen om te concurreren met pathogenen, bieden Actinobacteriën een duurzame benadering van ziektebeheersing zonder de negatieve effecten van chemische middelen (Kaur et al.). In de volgende paragraaf wordt een algemeen beeld geschetst van Actinobacteriën en de geslachten *Rhodococcus* en *Streptomyces*, alsook hun potentieel als biocontrole organisme.

1.5 Actinobacteriën

1.5.1 Kenmerken Actinobacteriën

Actinobacteriën zijn Gram-positieve bacteriën die gekenmerkt worden door een hoog percentage aan guanine-cytosine basenparen in hun DNA. Actinobacteriën vormen één van de grootste taxonomische eenheden binnen het Bacteria-domein en worden opgedeeld in zes klasse, 46 orden, 79 families en 425 geslachten. De Actinobacteriën vonden hun belang binnen de farmaceutische industrie vanwege hun vermogen om antibiotica als secundaire metabolieten te produceren (Kaur et al. ; Barka et al., 2016). In de agrarische sector worden ze dan weer gewaardeerd vanwege hun potentieel als bron voor antischimmelverbindingen, celwandafbrekende enzymen, plantengroeiregulatoren, antiparasitaire en insectendodende middelen – allemaal gunstig voor een verhoogde gewasopbrengst (Kaur et al.).

Actinobacteriën vertonen een grote verscheidenheid aan morfologieën, die voornamelijk verschillen in wat o.a. de aan- of afwezigheid van substraatmycelium of luchtmycelium, de kleur van het mycelium en de productie en structuur van hun sporen. Actinobacteriën staan bekend om hun filamentachtige structuur, waarbij individuele cellen zich verlengen en vertakken tot een complex netwerk en groeien over het algemeen door middel van binaire deling (Ranjani et al., 2016; Barka et al., 2016). Ze kunnen zowel substraatmycelium in vaste als ondergedompelde culturen vormen die ontstaat uit ontkiemende sporen en waarvan de vertakkingen monopodiaal zijn. Op de vaste culturen zullen sommige Actinobacteriën na een tijd differentiëren om ook luchtmycelium te produceren, die nodig zijn voor de productie van voortplantingssporen. Zodra er genoeg luchtmycelium is gevormd wordt er een signaal verzonden dat zal resulteren in de start van de sporulatie. Hierbij worden in de luchthyfen veel septa gelijktijdig en op zeer symmetrische manier gevormd, gevolgd door sporencompartimentering en celsplijting. Bij een binaire deling zal de moedercel zich symmetrisch verdelen in identieke dochtercellen dankzij de vorming van een cytokinetische ringstructuur. De hyfen zelf kunnen er ook volledig anders uit zien, zo bestaan er coccoïde, staafcoccoïde, gefragmenteerde en permanente sterk gedifferentieerde vertakte hyfen. Sporen kunnen gevormd worden als afzonderlijke cellen of in ketens van verschillende lengte, evenals kunnen de sporen zich in speciale blaasjes bevinden (sporangia) en zijn ze voorzien van flagellen. De sporen zelf kunnen glad, waterachtig, stekelig, harig of ruwe oppervlakken hebben. Actinobacteriën produceren verschillende pigmenten die een rode, gele, oranje, roze, bruin, groen, blauw of zwarte kleur kunnen geven aan de bacterie, die ook gebruikt kunnen worden in de taxonomische studies (Barka et al., 2016).

1.5.2 Actinobacteriën als biocontrole organismen

Biologische gewasbescherming maakt gebruik van microbiële biocontrolemiddelen om planten te beschermen tegen ziekteverwekkers via directe en indirecte mechanismen. Actinobacteriën zijn aantrekkelijk voor het gebruik als biologisch bestrijdingsmiddel vanwege hun capaciteit om de groei van diverse fytopathogenen zowel direct als indirect te remmen. Ook zijn ze betrokken bij gunstige interacties met planten waardoor de plantengroei en ziekteresistentie worden gestimuleerd. Directe mechanismen bevatten: hyperparasitisme, productie van celwandafbrekende enzymen, antibiose, predatie en concurrentie op het vlak van voedingsstoffen en ruimte met de pathogeen. Indirecte mechanismen bevatten daarentegen het induceren van gastheerresistentie (Ebrahimi-Zarandi et al, 2022). Actinobacteriën die verschillende bestrijdingsmechanismes combineren, zijn succesvoller in het onderdrukken van plantenziekten en zijn dus geschikte kandidaten voor de ontwikkeling van biologische bestrijdingsmechanismes (Palaniyandi et al., 2013).

1.5.2.1 Directe werkingsmechanismen

Een eerste directe methode is de productie van antibiotica. Symbiotische Actinobacteriën die plantenwortels koloniseren kunnen antibiotica produceren. Hierdoor vermijden ze concurrentie van andere microben, waaronder de pathogenen, met als gevolg de onderdrukking van ziektes in de plant (Palaniyandi et al., 2013). De geproduceerde antibiotica werken grotendeels in op meerdere cellulaire doelwitten zoals de DNA-replicatie, RNA-synthese, celwandsynthese en eiwitsynthese van de pathogeen (Sharma & Salwan, 2018). Het vermogen om verschillende antibiotica te produceren door eenzelfde biocontrole organisme is wenselijk omdat dit kan leiden tot de onderdrukking van diverse pathogenen (Palaniyandi et al., 2013).

Naast de productie van antibiotica, kunnen Actinobacteriën ook vluchtige organische componenten (VOC's) produceren. Deze componenten vertonen een antischimmelactiviteit waarvan het merendeel afkomstig is uit de groep terpenoïden maar ook isopreen, aceton, dimethyldisulfide en 1-butanol kunnen worden geproduceerd. Ze zijn in staat om morfologische afwijkingen te veroorzaken bij schimmels, zoals o.a. de remming van de groei van mycelia, het inhiberen van kieming van sporen en het verhinderen van de vorming

van een appressorium (Sharma & Salwan, 2018 ; Palaniyandi et al., 2013). VOC's vertonen in het algemeen een groot potentieel in de landbouw als biofumigatiemiddel (Palaniyandi et al., 2013).

Een volgende direct werkingsmechanisme is de productie van lytische enzymen die inwerken op de celwand, het celmembraan, de celmembraaneiwitten en de extracellulaire virulentiefactoren van schimmels en bacteriën. Ze omvatten o.a. chitinase, cellulase, glucanase, protease en fosfolipase. Chitinolytische en glucaanbevattende Actinobacteriën zijn belangrijke biologische bestrijdingsmiddelen voor chitine- en glucaanbevattende schimmels (Kaur et al. ; Palaniyandi et al., 2013). De geproduceerde proteasen spelen een rol in het remmen van de adhesie en kieming van schimmelsporen (Sharma & Salwan, 2018). Zo wordt door Gaber et al. (2016) beschreven dat Actinobacterie *Thermobifida fusca* verschillende nuttige enzymen produceert, waaronder een chitine-actief lytisch polysaccharide monooxygenase (LPMO) en CH18 chitinase waarbij LPMO inwerkt op cellulose en complexe koolhydraten en CH18 chitinase op polymere substraten zoals colloïdaal chitine en chitosan. Meestal worden hydrolytische enzym producerende fyta gebruikt in combinatie met een antibiotica-producerend fyllum voor een effectieve behandeling van de pathogeen. De inwerking van de hydrolytische enzymen zorgen voor een hogere gevoeligheid voor het antibioticum bij de pathogeen (Palaniyandi et al., 2013).

Een vierde werkingsmechanisme is hyperparasitisme. Hierbij voeden de biocontrole stammen zich met een andere parasiet die al op of in de gastheer leeft en uiteindelijk zal de parasiet hierdoor afsterven (Shrivastava & Kumar, 2018 ; Kaur et al.). Er wordt gesproken van mycoparasitisme indien de Actinobacteriën parasiteren op een schimmel. Hyperparasieten zullen de schimmelhyfen binnendringen, vertakkingen vormen en het cytoplasma ervan coaguleren wat zal leiden tot de vernietiging van de hyfen (Shrivastava & Kumar, 2018). Mycoparasitisme zal vaak in combinatie gebruikt worden met andere methodes en niet alleen worden ingezet als biocontrole mechanisme. Het is namelijk zo dat als fyta met hyperparasitisme gecombineerd worden met fyta die antibiotica en hydrolytische enzymen produceren, de schimmelhyfen vatbaarder worden voor parasitering (Kaur et al. ; Palaniyandi et al., 2013). Zo toonde Sabaou et. al reeds in 1983 al aan dat de biocontrole bacterie *Nocardopsis dassonvillei* naast antibacteriële eigenschappen ook parasitaire activiteit vertoonde op *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

Competitie voor essentiële voedingsstoffen en ruimte is de laatste methode waarop Actinobacteriën een fytopathogeen direct kunnen onderdrukken. Actinobacteriën concurreren met de pathogenen om ruimte en voeding waardoor een nutriëntenbeperkende omgeving ontstaat voor de ziekteverwekker met als gevolg dat hun overleving bemoeilijkt wordt. Diverse mechanismen zijn verantwoordelijk voor de dominantie van bepaalde microbiële populaties in de bodem. De concurrentie vindt voornamelijk plaats in de buurt van de plantenwortels, de rhizosfeer, waar de concentratie aan uitgescheiden voedingsstoffen door de plant hoog is. Hier bevinden zich zowel schadelijke als nuttige micro-organismen. Schadelijke microben strijden om voedingsstoffen van de plant en veroorzaken ziekten terwijl nuttige microben de plant ondersteunen door mobilisatie van voedingsstoffen, bescherming tegen abiotische stress en ziekteonderdrukking.

De meest onderzochte vorm van competitie, is de competitie voor ijzer waarvan over het algemeen de beschikbare concentratie in de bodem vrij laag is. Ijzer is namelijk een essentieel groei-element voor alle levende organismen (Palaniyandi et al., 2013 ; Shrivastava & Kumar, 2018). Actinobacteriën zijn in staat om ijzerchelatoren met hoge affiniteit te produceren, sideroforen genaamd (Palaniyandi et al., 2013). Deze sideroforen binden Fe^{3+} moleculen en vormen complexen die door bacteriën worden opgenomen met behulp van gespecialiseerde receptoren en beschikbaar worden gemaakt voor planten (Shrivastava & Kumar, 2018). De rhizobacteriën die sideroforen met de hoogste affiniteit produceren, zullen de rhizosfeer het efficiënts koloniseren en zo de andere microben in de rhizosfeer verdringen (Palaniyandi et al., 2013).

1.5.2.2 Indirecte werkingsmechanismen

Actinobacteriën kunnen ook via indirecte werkingsmechanismen gebruikt worden als biocontrole organisme. Deze werkingsmechanismen omvatten het induceren van gastheerresistentie en het stimuleren van de plantengroei. Zoals vermeld onder paragraaf “Verdedigingsmechanisme van planten”, vertonen planten 2 soorten niet-specifieke afweerreacties tegen verschillende ziekteverwekkers, namelijk ISR en SAR. De hormonen die centraal staan bij deze afweerreacties stimuleren de synthese van PR-eiwitten die bijdragen aan plantenresistentie (Sharma & Salwan, 2018). Het begrijpen van deze interacties is cruciaal voor het ontwikkelen van effectieve biocontrolestrategieën voor plantenziekten, zoals FHB (Tan et al., 2021).

Actinobacteriën zijn in staat om het verdedigingsmechanisme in een plant te triggeren alsook de lipoxygenase (LOX)-genen te induceren. LOX-genen coderen voor enzymen, lipoxygenasen, die betrokken zijn bij het metabolisme van lipiden in planten (Abbasi et al., 2019). De enzymen produceren oxylipinen die een rol spelen in verschillende biochemische processen, waaronder de synthese van plantenhormonen zoals JA en ET (Mariutto et al., 2011). Actinobacteriën primen via transcriptiefactoren de verdedigingsroutes in planten waarbij ze de genen opwaarts reguleren (Palaniyandi et al., 2013 ; Shrivastava & Kumar, 2018). Met priming wordt bedoeld dat de bacteriën de planten in een veranderde staat brengen waardoor ze sneller en sterker kunnen reageren op een daaropvolgende infectie met de pathogeen, wat dus ISR is (Ebrahimi-Zarandi et al, 2022).

Actinobacteriën hebben het vermogen om zowel afweerreacties van planten te activeren in afwezigheid van een ziekteverwekker en de afweerreacties te versterken bij de aanwezigheid van de ziekteverwekker. Een ideale benadering voor biologische bestrijding zou zijn om de antibiose en hydrolytische enzymproductie van een Actinobacterieel biocontrole organisme te combineren met deze priming-activiteit van hetzelfde fyllum of een ander fyllum (Ebrahimi-Zarandi et al, 2022).

1.5.2.3 Actinobacteriën als stimulant voor plantengroei

Actinobacteriën bezitten ook het vermogen om groeibevorderend te werken, wat ingezet kan worden als biocontrole mechanisme aangezien gezondere planten zijn nu eenmaal minder vatbaar zijn voor ziektes. Zulke bacteriën worden ook wel planten groeibevorderende rhizobacteriën (PGPR) genoemd vanwege hun vermogen om plantengroeieregulatoren uit te scheiden, stikstoffixatie en fosfaatsolubilisatie te bevorderen, stress te verlichten, symbioses te bevorderen en de ijzeropname te verhogen.

Het uitscheiden van plantengroeieregulatoren is een belangrijk mechanisme van PGPR, waarvan het groeihormoon indolazijnzuur (IAA) goed gekend is (Palaniyandi et al., 2013; Sharma & Salwan, 2018). Plantengroeieregulatoren, ook wel bekend als plantenhormonen of fytohormonen, zijn chemische stoffen die van nature in planten voorkomen en de groei en ontwikkeling reguleren. IAA veroorzaakt de stimulatie van de zijwortelontwikkeling, wortelharen en het vrijkomen van suikers die een nutriëntenbron vormen voor wortel koloniserende bacteriën (Ebrahimi-Zarandi et al, 2022). Het is echter wel zo dat de productie van IAA niet rechtstreeks gecorreleerd staat aan groeibevordering, maar dat ook nog verschillende andere factoren hierop een invloed uitoefenen zoals o.a. de concentratie IAA, de aanwezigheid van fytoxisen die het IAA-effect maskeren of de behoefte aan aanvullende factoren voor groeibevordering. Naast IAA is ook cytokine een ander gekend plantengroeieregulator (Palaniyandi et al., 2013).

Zoals vermeld produceren Actinobacteriën sideroforen. Deze verbindingen assimileren ijzer en verhogen de opname van het element (Ebrahimi-Zarandi et al, 2022). Ijzer is namelijk een belangrijk mineraal voor de plantengroei en is in de bodem beschikbaar in zijn onoplosbare vorm Fe^{3+} . Dit terwijl planten ijzer beter opnemen in zijn oplosbare vorm Fe^{2+} . Indien Actinobacteriën in staat zijn om Fe^{3+} te reduceren naar Fe^{2+} verhogen ze hierdoor de beschikbaarheid van ijzer in de rhizosfeer.

Ook bij het proces van fosforsolubilisatie en stikstoffixatie levert de aanwezigheid van Actinobacteriën een voordeel op. Het fosforgehalte in de bodem is zeer laag en is beschikbaar in de vorm van onoplosbare metaalcomplexen met o.a. ijzer, aluminium, silicium in zure gronden en calciumcarbonaat in alkalische gronden. PGPR's kunnen deze fosfaten oplosbaar maken, zo produceren ze o.a. sideroforen die een chelatie aangaan met de fosforadsorbanten waardoor de fosfor vrij komt te liggen. Op deze manier stimuleren de PGPR's de plantengroei. Daarnaast kunnen PGPR's de plantengroei ook bevorderen door stikstoffixatie, het proces waarbij atmosferische stikstof (N_2) wordt omgezet in ammoniak (NH_3). Ammoniak is de voornaamste vorm van stikstof dat door planten wordt opgenomen en nodig is voor de synthese van stikstofhoudende biomoleculen. Stikstoffixatie lijkt overvloedig voor te komen onder heel wat verschillende Actinobacteriën. Ze versterken ook de symbiose tussen mycorrhiza en planten. Mycorrhiza zijn intieme associaties van plantenwortels en symbiotische schimmels, waarbij de sporenkieming van de symbiotische schimmel gestimuleerd kan worden door vluchtige stoffen geproduceerd door de bacterie.

Indien planten biotische of abiotische stress ervaren produceren ze ethyleen, dit is een stof die een negatieve invloed heeft op de groei. PGPR's staan bekend om hun capaciteit om toch de groei van planten te bevorderen in deze stress situaties via verschillende mechanismes. Een bekend mechanisme is de productie van het enzym 1-aminocyclopropaan-1-carboxylaat (ACC)-deaminase. Dit enzym zal ACC, wat de voorloper van ethyleen is, in planten omzetten tot ammoniak en α -ketobutyrat, waardoor het stressniveau wordt verlaagd (Palaniyandi et al., 2013). Ook zullen Actinobacteriën door het activeren van de LOX-genen, planten kunnen laten reageren op biotische en abiotische stressfactoren (Tan et al., 2021).

1.5.3 Geslachten *Rhodococcus* en *Streptomyces*

Beide geslachten worden binnen de Actinobacteriën al erkend vanwege hun gunstige eigenschappen als biocontrole organisme.

Rhodococcus

Het geslacht *Rhodococcus* bevat zowel symbionten als ziekteverwekkers voor plant, dier en mens. Het zijn aërobe, Gram-positieve, niet beweeglijke bacteriën die kunnen groeien als staafjes maar ook als uitgebreid vertakte substraathyfen (Barka et al., 2016). Het geslacht bestaat uit genetisch en fysiologisch diverse bacteriën die in verschillende habitats leven (Martínková et al., 2009). Sommige stammen kunnen schaarse luchthyfen produceren die vertakt of onvertakt kunnen zijn. Het zijn zeer belangrijke bacteriën met een opmerkelijke katabole veelzijdigheid doordat ze in staat zijn enzymen te produceren die een indrukwekkend scala aan xenobiotische en organische verbindingen kunnen afbreken. Naast hun potentieel in de bioremediatie kunnen ze ook metabolieten produceren met een industrieel potentieel zoals carotenoiden, biosurfactanten en bioflocculatiemiddelen (Barka et al., 2016). Sommige *Rhodococcus* stammen hebben een hoge recombinatiefrequentie die kan bijdragen aan de flexibiliteit van het genoom en het vermogen om gemakkelijk nieuwe genen te verwerven en bijgevolg nieuwe enzymatische activiteiten (Martínková et al., 2009).

Het geslacht toont verschillende eigenschappen die gebruikt kunnen worden als biocontrole mechanisme. Zo toonde Tan et al. (2021) aan dat *Rhodococcus* sp. R-43120 gemedieerde onderdrukking van *F. graminearum* kan veroorzaken gekoppeld aan de archetypische SA- en JA-verdediging die de activering van LOX-genen omvatten. Ook Hong et al. (2016) onderzocht hoe *Rhodococcus* sp. KB6 een invloed uitoefent op de groei van *Ceratocytis imbricata* in zoete aardappel. Hij toonde aan dat de aanwezigheid van het *Rhodococcus* sp. de symptomen van de ziekte verminderen en vermoede dat de bacterie indirecte resistentie tegen deze plantenziekte verleende aan de zoete aardappel. In een andere onderzoekspaper van Corrêa et al (2008) werden verschillende bacterie isolaten geëvalueerd op hun mogelijke invloed op de overdracht van

Colletotrichum lindemuthianum naar bonenzaailingen. In deze bacteriële isolaten zaten o.a. 2 *Rhodococcus fascians* spp. DFs843 en DFs912. Als resultaat verkreeg men dat beide *Rhodococcus* isolaten antibiotica produceerde en zo de overdracht van de ziekte naar bonenzaailingen verminderde. Vooral isolaat DFs912 sprong hier uit met een overdrachtsverminderingen van 40 tot 67% in alle experimenten. Ook zijn *Rhodococcus* spp. in staat om de symbiose tussen mycorrhiza en planten te versterken waardoor plantengroei wordt gestimuleerd (Palaniyandi et al., 2013).

Streptomyces

Streptomyces bacteriën zijn overvloedig aanwezig in de bodem waar ze een belangrijke rol vervullen in de koolstofcyclus. Ze stellen koolstof vrij dat vast zit in organisch materiaal van planten en schimmels door de productie van diverse hydrolytische exo-enzymen. Naast de productie van exo-enzymen produceren ze een grote diverse hoeveelheid aan bioactieve secundaire metabolieten en kunnen ze van groot belang zijn in de geneeskunde en industrie. *Streptomyces* spp. zijn een zeldzaam voorbeeld van meercellige bacteriën, de celdeling leidt niet tot een effectieve celdeling maar tot dwarswanden in de hyfen. Deze dwarswanden scheiden de hyfen in onderling verbonden compartimenten met elk meerdere kopieën van het chromosoom. De levenscyclus van een meercellige myceliale *Streptomyces* sp. start bij het ontkiemen van een spoor dat uitgroeit tot vegetatieve hyfen en evolueert tot een ingewikkeld vertakt vegetatief mycelium. Exponentiële groei van de hyfen wordt bereikt door combinatie van topgroei en vertakking. Onder ongunstige omstandigheden kan het vegetatieve mycelium zich differentiëren tot luchtmycelium. Het vegetatieve mycelium wordt afgebroken door een geprogrammeerde celdood om bouwstenen te verwerken, nodig om voldoende massa luchtmycelium op te bouwen. In deze fase worden er ook antibiotica geproduceerd door de bacteriën (Barka et al., 2016).

Streptomyces spp. worden erkend als krachtig biocontrole organismen (Kaur et al.). Ze zijn in staat tot het produceren van antibiotica. Zo werd al weergegeven door Trejo-Estrada et al. in 1998 dat *Streptomyces violaceusniger* YCED-9 in staat is om 3 antimicrobiële verbindingen te produceren die alle een antischimmelactiviteit vertonen. Ook kunnen *Streptomyces* spp. VOC's produceren. Als voorbeeld kunnen de VOC's geproduceerd door *Streptomyces alboflavus* TD-1 worden gegeven. Deze VOC's zullen een negatieve werking hebben op de groei van *Fusarium moniliforme*. De geproduceerde VOC's onderdrukken de myceliumgroei, sporulatie en sporenkieming, alsook werd de membraanpermeabiliteit van *F. moniliforme* verstoord (Wang et al., 2013). Shirvastava en Kumar (2018) bewezen dat *Streptomyces* spp. gekend zijn voor de productie van lytische enzymen. Het geslacht bevat enkele gekende producenten van chitinase en tonen hierdoor hun potentieel als biologische controlemiddel tegen fungale fytopathogenen. Ook werd in hetzelfde onderzoek aangetoond dat *Streptomyces* spp. sideroforen produceren. De productie van het hydroxamaatype siderofoor uit *Streptomyces acidiscabies* kan worden gelinkt aan de groeibevordering van *Vigna unguiculata* (Dimkpa et al., 2008). Het geslacht vertoont een sterke kolonisatievermogen van de rhizosfeer, wat zou kunnen resulteren in succesvolle concurrentie tegen fytopathogene schimmels en onderdrukking van hun groei (Shrivastava & Kumar, 2018). Ook zijn *Streptomyces* spp. in staat om de symbiose tussen mycorrhiza en planten te versterken waardoor opnieuw plantengroei wordt gestimuleerd.

2 ONDERZOEKSVRAAG EN DOELSTELLINGEN

In deze masterproef werd onderzocht of een selectie van elf Actinobacteriën werkzaam kunnen zijn als biocontrole organismen tegen enkele belangrijke fungale tarwepathogenen, namelijk *Fusarium graminearum*, *Blumeria graminis* en *Zymoseptoria tritici*. Het doel van deze masterproef was dus om te onderzoeken welke van deze elf Actinobacteriën het meeste potentieel bezitten om gebruikt te worden als biocontrole organisme tegen deze drie fungale tarwepathogenen. Om dit doel te bereiken werden per fungale tarwepathogeen enkele onderzoeksvragen opgesteld:

Fusarium graminearum

- Beïnvloedt de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de groei van *F. graminearum*?
- Beïnvloedt de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van een met *F. graminearum* geïnfecteerde blad/aar?

Blumeria graminis

- Beïnvloedt de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van een met *B. graminis* geïnfecteerde blad?

Assays met *Zymoseptoria tritici*

- Beïnvloedt de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de groei van *Z. tritici* ?
- Beïnvloedt de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van een met *Z. tritici* geïnfecteerde blad?

Om een antwoord te kunnen bieden op deze onderzoeksvragen werden er verschillende *in vitro* en *in planta* experimenten opgezet met de Actinobacteriën en de verschillende fungale tarwepathogenen. Zo zijn er *in vitro* plate assays, detached leaf assays, een whole leaf assay en een detached ear assay opgesteld. Er is gestart met een selectie van 11 Actinobacteriën waarvan na een *in vitro* plate assay en een detached leaf assay met *F. graminearum*, een subselectie gemaakt werd van zes Actinobacteriën. Deze subselectie werd gebaseerd op een visuele beoordeling van de *in vitro* plate assay met *F. graminearum*, waarbij de bacteriën werden gekozen die op dat moment de beste antifungale werking leken te vertonen. Bij de keuze werd geen gebruik gemaakt van statistische analyse. Achteraf bleek ook dat deze selectie niet zo accuraat was, omdat na statistische verwerking zelf één van de bacteriën uit de subset geen invloed bleek te hebben op de groei van *F. graminearum* bij de *in vitro* plate assay. Deze subset aan bacteriën werd vervolgens ook getest via een *in vitro* plaatstest op *Z. tritici*, een detached leaf assay op *B. graminis*, een whole leaf assay op *Z. tritici*, alsook een detached ear assay op *F. graminearum*.

Algemeen werd ook nog volgende onderzoeksvraag opgesteld :

- Beïnvloedt de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van het tarwe blad ?

Deze onderzoeksvraag werd onderzocht door bij de detached leaf assays met *F. graminearum* en *B. graminis*, alsook bij de whole leaf assay met *Z. tritici* een fytotoxiciteit experiment op te zetten.

3 MATERIAAL EN METHODE

3.1 Media

In Tabel 1 worden de hoeveelheden van de verschillende gebruikte media per liter gedestilleerd water weergegeven. De media werden telkens geautoclaveerd bij 121°C gedurende 20 minuten voor gebruik. Benzimidazole werd pas na autoclaveren toegevoegd daar deze zijn activiteit kan verliezen bij hoge temperaturen.

Tabel 1. Hoeveelheid gebruikte media per liter gedestilleerd water

Medium	Component	Hoeveelheid per L gedestilleerd water
Potato dextrose agar (PDA)	PDA	39 g/L
Tryptic soy broth (TSB)	TSB	30 g/L
Tryptic soy agar (TSA)	TSA	40 g/L
Wateragar + benzimidazole	Plant agar Benzimidazole	15 g/L 40 mg/L
Phosphate bufferd saline (PBS)	PBS	10 tabletten/L
PBS + Tween 80%	PBS Tween 80%	10 tabletten/L 0,5 mL/L
50% glycerol	Glycerol	

3.2 Tarwe

In deze masterproef is er bij de *in planta* assays gewerkt met zomertarwe (*Triticum aestivum* L.) cultivar Tybalt. Voor de detached leaf assays werden 12 tarwezaden gezaaid in potten van 6 cm diameter x 8,5 cm hoogte gevuld met potgrond en gedurende 10 dagen opgegroeid bij 21°C onder sunlight LED-lampen (Phenovation, Wageningen). Het lichtregime bestond uit 16 uur licht en 8 uur duisternis. Voor de detached ear assay werden 25 tarwezaden gezaaid in potten van 15 cm diameter x 30 cm hoogte gevuld met potgrond en opgegroeid tot bloeifase (Zadok's Cereal Growth Stage 65). Afhankelijk van de weersomstandigheden werden de potten of in de serre of binnen bewaard bij omstandigheden van 24°C overdag en 18°C 's nachts. Voor de whole leaf assay met *Z. tritici* werden 20-25 tarwezaden opgegroeid in potten van 6 cm diameter x 8,5 cm onder sunlight LED-lampen (Phenovation, Wageningen), na twintig dagen werden de planten overgepot naar potten van 15 cm diameter x 30 cm hoogte.

3.3 Opgroeien fungale tarwepathogenen

3.3.1 *Fusarium graminearum*

Een Green fluorescent protein (GFP)-getransformeerde *F. graminearum* PH-1 (Jansen et al., 2005) werd opgegroeid op PDA vanop een al bestaande, reeds gesporuleerde plaat. Met behulp van een kurkboor werd een ponsje van 0,7 cm diameter overgebracht naar het centrum van een nieuwe PDA plaat. De platen werden gedurende 14 dagen geïncubeerd bij 25°C, voor de productie van mycelium, of in de UV-kast (UVA- en UVC-licht) bij 21°C met een lichtregime van 12 uur duisternis en 12 uur licht voor de productie van sporen. Na deze 14 dagen werden de platen voor maximaal drie maanden bewaard in de koelkast bij 5°C.

3.3.2 *Zymoseptoria tritici*

Z. tritici werd opgegroeid door op een PDA plaat 50 µL van een al bestaande glycerolstock van *Z. tritici* te brengen en open te smeren met behulp van een drigalski spatel. De platen werden achteraf vier weken in de UV-kast (UVA- en UVC-licht) geïncubeerd voor sporen productie bij 21°C met 12 uur duisternis en 12 uur licht. Na deze vier weken werden de platen voor maximaal drie maanden bewaard in de koelkast bij 5°C.

3.3.3 *Blumeria graminis*

B. graminis werd opgekweekt op afgeknipte tarweblad stukken van ongeveer 4 cm die lagen op een 0,5% wateragar(v%) + 40 mg/L benzimidazole bodem. De sporen waarmee gestart werd, waren verzameld van al eerder besmette planten door lichtjes met de bladeren te schudden of de sporen ervan te schrappen. Om de twee weken werden de wateragar platen ververs. Hierbij werden de geïnfecteerde bladstukken boven nieuwe bladstukken geschud, zodanig dat de sporen terecht kwamen op vers plantenmateriaal. De wateragar platen werden geïncubeerd in een incubator bij 18°C met 12 uur duisternis en 12 uur licht.

3.3.4 Sporensuspensies

Voor de assays met *F. graminearum* en *Z. tritici* werden er sporensuspensies van de schimmels aangemaakt. Hiervoor werd op een al opgegroeide plaat van de schimmel, afkomstig uit de UV-kast, 10 mL PBS + Tween 80 gegoten. Met behulp van een Drigalski spatel werden de sporen los gewreven en de oplossing werd over een stuk miracloth gebracht om het mycelium af te scheiden. De gefilterde sporensuspensie werd opgevangen in een falcon buis. Met een Bürker telkamer werden de sporen geteld onder een microscoop en werd de suspensie verdund totdat deze een concentratie van $1 \cdot 10^6$ sporen per mL bevatte, wat overeenkomt met 4 sporen per hokje ($0,004 \text{ mm}^3$) van de Bürker telkamer. Vanuit deze sporensuspensie werd er nog een glycerolstock aangemaakt die bewaard werd bij -80°C. Deze stock werd aangemaakt door 750 µL van een 50% glycerol-oplossing samen te voegen met 750 µL sporensuspensie in een steriele cryovial.

3.4 Opgroeien potentiële biocontrole stammen

De 11 gebruikte Actinobacteriën kregen gedurende deze masterproef een volgnummer, weergegeven in **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden..** Vanaf nu zullen deze Actinobacteriën dus telkens met hun volgnummer worden benoemd.

Table 2. Gebruikte Actinobacteriën gedurende deze thesis

Volgnummer	Naam
1	<i>Rhodococcus</i> sp. R25614
2	<i>R. erythropolis</i> LMG16262
3	<i>R. fascians</i> R50936
4	<i>Streptomyces. rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> LMG5984
5	<i>S. rimosus</i> subsp. <i>rimosus</i> LMG19352
6	<i>R. sp.</i> LMG3627
7	<i>R. fascians</i> LMG3629
8	<i>R. fascians</i> LMG3612t1
9	<i>S. sp.</i> LMG16995
10	<i>R. sp.</i> R43120
11	<i>S. sp.</i> ST03

De Actinobacteriën werden opgegroeid op de voedingsbodem TSA. Er werd gestart van een glycerolstock oplossing van elke bacterie, dewelke via de kwadrantenmethode op de TSA platen uitgestreken werd. De platen werden omgekeerd geïncubeerd in een incubator bij 25°C gedurende 3 dagen, m.u.v. bacterie 1 en 9 dewelke respectievelijk twee en zes dagen nodig hadden om op te groeien. Na hun incubatie periode werden de platen bewaard in de koelkast bij 5°C voor maximum 3 maanden.

Vervolgens werd er van elke bacterie een precultuur aangemaakt door met een steriele oogennaald een kolonie vanop TSA over te brengen in een falcon gevuld met 10 mL TSB. De falcons werden in een incubator gebracht die bij 28°C op 180 rpm shakete gedurende 3 dagen, m.u.v. bacterie 1 en 9 dewelke respectievelijk twee en zes dagen nodig hebben om op te groeien. Nadat de preculturen voldoende waren opgegroeid, werden de bacteriële suspensies twee maal gewassen met PBS. Hiervoor werden de bacteriële suspensies eerst 10 min gecentrifugeerd bij 4000 rpm. Het supernatans werd afgegoten en vervolgens werd de pellet heropgelost in 5 mL PBS. De absorbanties van de bacteriële oplossingen werden gemeten bij 600 nm met behulp van een TECAN Spark plate reader (Tecan, Mechelen, Belgium). Op basis van de resultaten werd berekend hoeveel mL PBS nodig was om de verkregen absorptiewaarden naar een optische dichtheid (OD) van 0,6 te brengen. Een OD van 0,6 komt bij de bacterie *Escherichia coli* overeen met een concentratie van $6 \cdot 10^8$ kolonievormende eenheden per mL (Sezonov et al., 2007). Hierna werden opnieuw de falcons gecentrifugeerd, het supernatans afgegoten, de berekende PBS toegevoegd en de bacteriële pellets opgelost.

3.5 *In vitro* plate assay

Voor elke onderzochte fungale tarwepathogeen bij de *in vitro* plate assays werden volgende behandelingen opgezet :

- Geïnfecteerde controle platen: hierbij werd enkel de fungale tarwepathogeen samen met PBS gespot.
- Geïnfecteerde platen: hierbij werd de fungale tarwepathogeen samen met één van de bacteriën gespot.

3.5.1 *Fusarium graminearum*

Voor de assay met *F. graminearum* werd 5 µL sporensuspensie geënt in het centrum van een petrischaal met TSA. Rondom deze inoculatie werden op uniforme afstanden van elkaar en van de sporensuspensie, vier druppels bacteriële suspensie aangebracht (3,2 cm van het midden en 4,5 cm van elkaar), waarna de platen werden bewaard in een incubator bij gecontroleerde omstandigheden met een temperatuur van 25°C. Voor elke behandeling werden vijf replicaties gebruikt, alsook werden er vijf controleplaten opgezet. Gedurende een periode van zes dagen werden dagelijks foto's genomen van de agarplaten om groei en ontwikkeling van de fungale tarwepathogeen te monitoren (zie 3.9.2).

3.5.2 *Zymoseptoria tritici*

Voor *Z. tritici* werden drie verschillende methoden opgezet. De eerste methode was gelijkaardig aan de hierboven besproken opzet van *F. graminearum* met het verschil dat eerst de sporensuspensies werden gespot, waarna de platen voor 2 weken werden geïncubeerd in de incubator bij 25°C en vervolgens pas de vier bacteriële spots werden geënt. De tweede methode is gelijkaardig aan de eerste methode, maar nu met het verschil dat de bacteriële spots niet op 3,2 cm maar op 1,5 cm van het midden werden geënt en dat er gebruik werd gemaakt van PDA platen i.p.v. TSA platen. Bij de derde methode werd op een PDA plaat 50 µL sporensuspensie gebracht, opgestreken met een drigalskispatel om dan vervolgens direct in het midden 10 µL bacteriële suspensie te brengen. De platen van alle drie de methodes werden, na enting met de potentiële

biocontrole stammen, gedurende 2 weken geïncubeerd bij 25°C omwille van de traag groeiende eigenschap van de schimmel. Om de week werden er foto's getrokken van de platen (zie 3.9.2).

Van de tweede methode werd de sporenconcentratie van elke plaat bepaald. Hierbij werd er van elke plaat met een kurkboor een ponsje afgenomen met een diameter van 0,7 cm. Het ponsje werd telkens genomen in het midden van de plaat waar de fungale tarwepathogeen groeide. Vervolgens werd het ponsje gecrusht met een scalpel, geresuspendeerd in 5 mL PBS en gevortext. Met een Bürker telkamer kon dan de concentratie aan sporen per mL PBS bepaald worden onder de microscoop. Bij de derde methode werd het aantal kolonie vormende eenheden (KVE), gevormd door *Z. tritici*, per plaat geteld alsook de sporenconcentratie bepaald. Een rechthoek van 1 cm op 4 cm agar werd uitgesneden vanaf het centrum van de plaat tot het uiteinde van de plaat en werd ook gecrusht met een scalpel, opgelost in 10 mL PBS, gevortext en met behulp van de Bürker telkamer werd ook hiervan onder de microscoop de sporenconcentratie bepaald.

3.6 Deteached leaf assay

Bij beide detached leaf assays werden er verschillende behandelingen opgezet, namelijk :

- Geïnfecteerde controle bladstukken: hierbij werd enkel de fungale tarwepathogeen op de bladeren geënt/gesproeid.
- Geïnfecteerde bladstukken: hierbij werd de fungale tarwepathogeen samen met één van de bacteriën op de bladeren geënt/gesproeid.
- Negatieve controle bladstukken: hierbij werd er enkel bacterie op de bladeren geënt/gesproeid.
- Blanco controle bladrukken : hierbij werd er enkel PBS geënt/gesproeid.

3.6.1 *Fusarium graminearum*

Van de opgegroeide tarwe planten werden bladstukken van 6 cm afgeknipt en met hun abaxiale zijde op een one well plate gelegd, die gevuld was met 0,5% wateragar(v%) + 40 mg/L benzimidazole. Met behulp van een scalpel werd een verwonding gemaakt van de epidermis in het midden van een blad waarop 5 µL van de sporensuspensie werd gespot. Hierna werd ook 5 µL van de bacteriële suspensies gespot op diezelfde plaats. De platen werden voor vijf dagen bewaard op kamertemperatuur en elke dag werden de parameters: ChlI dx, Fv/Fm en cGFP opgevolgd door foto te nemen met een multispectraalcamera (zie 3.9).

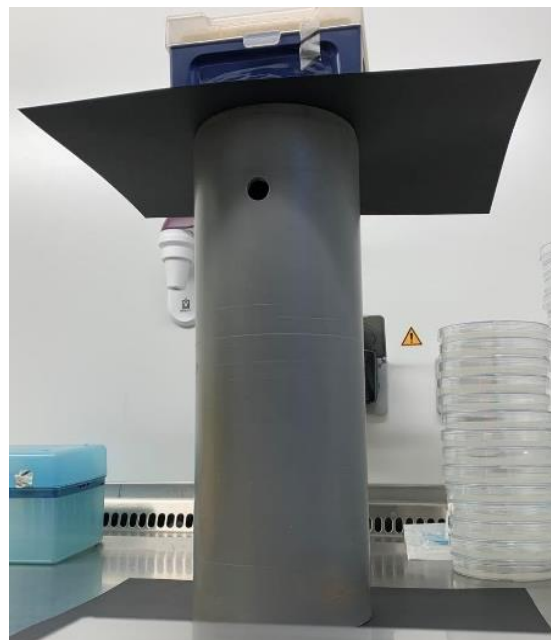
3.6.2 *Blumeria graminis*

Bij de detached leaf assay met *B. graminis* werden tarwe planten besproeid met bacteriële suspensie. Per bacterie werden er twee potten tarwe voorzien. Om dit te doen werd er een spraykamer gebouwd. Dit werd gedaan door "bench protective"-papier zo te positioneren dat er een soort van kamer werd gevormd zoals weergegeven op Figuur 5. De tarwe planten werden hier één voor één ingeplaatst en besproeid met 2,5 mL bacteriële suspensie. De blanco planten werden besproeid met PBS zonder bacteriën. De planten hebben hierna meer dan een uur gedroogd zodat zeker was dat de bacteriële suspensies voldoende gedroogd waren.



Figuur 5. Zelf gebouwd spraykamer met bench protective paper

Van de twee potten tarwe per bacterie werden elk drie bladstukken van 6 cm afgeknippt en samen werden deze zes bladstukken op een ronde petriplaat gelegd die gevuld was met 0,5% wateragar (v%) + 40 mg/L benzimidazole. Dus per behandeling werd er één petriplaat voorzien waarop er zes bladstukken lagen, afkomstig van twee verschillende planten. Deze petriplaten werden dan één voor één in een inoculatioren gelegd zoals weergegeven in Figuur 6. Dit is een pvc-buis met een hoogte van 30 cm en een diameter van 9,5 cm, waarin één ronde petriplaat past. In deze buis is er op 24,5 cm hoogte een gat gemaakt met een diameter van 1 cm. Van al reeds eerder geïnfecteerde tarwebladeren werden sporen van *B. graminis* op een zwart papier uitgeklopt, dit zwart papier werd dan opgerold en in het gat in de pvc-buis gestoken. Voor elke behandeling werd er gewerkt met een zelfde concentratie sporen. Met behulp van een lege spuitfles werden de sporen van het zwarte papier geblazen, waarna ze door de inoculatioren dwarrelden en terecht kwamen op de petriplaat met de bladstukken. De petriplaten werden bewaard in een incubator bij 18°C en gedurende drie weken opgevolgd door foto's te trekken met de multispectraalcamera. Volgende parameters werden opgevolgd: Fv/Fm en ChlI dx (zie 3.9).



Figuur 6. Inoculatioren gebruikt bij detached leaf assay met *B. graminis*

3.7 Whole leaf assay : *Zymoseptoria tritici*

Gedurende heel deze assay werd gewerkt met intacte planten waarop de bacteriën en de fungale tarwepathogeen werden geënt, in tegenstelling tot de detached leaf assay waarbij afgeknipte bladstukken werden gebruikt. Volgende behandelingen werden opgesteld :

- Geïnfecteerde controle planten: hierbij werd enkel fungale tarwepathogeen op de bladeren gesprayd.
- Geïnfecteerde planten: hierbij werd de fungale tarwepathogeen samen met één van de bacteriën op de bladeren gesprayd.
- Negatieve controle planten: hierbij werd er enkel bacterie op de bladeren gesprayd.
- Blanco controle planten: hierbij werd er enkel PBS gesprayd op de planten.

Voor elke bacterie werden er drie potten tarwe voorzien; twee potten voor de geïnfecteerde behandeling en één pot voor de negatieve controle. Er werden ook twee potten voorbehouden als geïnfecteerde controle met enkel fungale tarwepathogeen en twee als blanco controle. De opgegroeide planten werden besproeid met 5 mL sporensuspensie in een zelfgebouwde spraykamer, zoals gebruikt bij de detached leaf assay met *B. graminis* (Figuur 5). De besproeiende potten werden achteraf in een infectiekamer geplaatst die voorzien was van een bodem water en was afgesloten met parafilm, zoals te zien is op Figuur 7. Na 3 dagen werden ze uit de infectiekamer gehaald en besproeid met 5 mL bacteriële suspensies in de spraykamer. De bacteriële suspensies hier gebruikt werden niet terug gebracht naar een OD van 0,6. Er werd echter voor gezorgd dat er zoveel mogelijk bacteriële cellen aanwezig waren in de suspensies en er toch voldoende volume was om alle planten mee te besproeien. De OD was wel gelijk bij alle bacteriële suspensies.



Figuur 7 Infectiekamer afgesloten met parafilm waarin de tarwe planten gedurende 3 dagen werden bewaard., gebruikt bij de in planta assay met *Z. tritici*

De planten werden gedurende 37 dagen verder opgegroeid onder de LED-lampen (Phenovation, Wageningen). Op dag 7, 14, 21, 30 en 37 werden er foto's getrokken met de multispectraalcamera om volgende parameters op te volgen: Fv/Fm en ChlIdx, zie 3.9. Op dag 37 na infectie werd een lactofenolblauwkleuring uitgevoerd op 4 bladeren per behandeling, voor de microscopische visualisatie van schimmelstructuren. Enkel de geïnfecteerde controle, blanco controle en geïnfecteerde behandelingen werden beoordeeld via kleuring. Lactofenolblauw bestaat uit drie hoofdbestanddelen: fenol, dat als ontsmettingsmiddel werkt en levende organismen doodt; melkzuur, dat de schimmelstructuren intact houdt; en lactofenolblauw, dat chitine aanwezig op de schimmelcelwand en andere schimmelstructuren kleurt (De Maeyer, 2021). Eerst werd 10 mL lactofenolblauw gepipetteerd in falcontubes, waarna vier afgeknipte bladstukken van 6 cm van de te onderzoeken behandeling in werden gebracht. Deze tubes werden vervolgens 30 minuten lang geroteerd op een roterende schudder. Hierna werden de bladeren overgebracht naar nieuwe falcontubes met 10 mL absolute ethanol om het bladgroen te verwijderen en het blad dus te

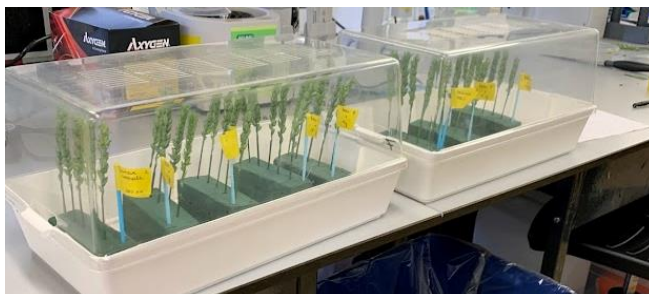
ontkleuren. Hierna werden de tubes in een warmwaterbad bij 80°C gebracht voor 1 uur zodat de bladeren compleet doorzichtig werden. Vervolgens werden de bladstukken met hun abaxiale zijde naar boven op een draagglaasje gelegd waaraan 10 µL absolute ethanol werd toegevoegd en bekeken onder een inverte microscoop (Olympus IX-81).

3.8 Detached ear assay : *Fusarium graminearum*

De assay bestond uit volgende behandeling:

- Geïnfecteerde controle aren : hierbij werd enkel de fungale tarwepathogeen in de aren geënt.
- Geïnfecteerde aren : hierbij werd de fungale tarwepathogeen samen met één van de bacteriën in de aren geënt.
- Blanco controle aren : hierbij wordt er enkel PBS geënt in de aren.

Van de opgegroeide tarwe planten die in anthesis waren (zie 3.2), werden de aren afgeknipt op een totale lengte van 15 cm. Deze aren werden per vijf op de smalle zijde van een uitgesneden rechthoekig stuk oasis blok geplaatst. Een spikelet onderaan werd gemarkeerd door hierop een streep te trekken. Twee spikelets boven de gemarkeerde werd 10 µL van een bacteriële suspensie geïnoculeerd. De suspensie werd tussen twee "florets" van de spikelet geïnoculeerd. De oasis blokken met de daarop geïnfecteerde aren werden in een infectie kamer geplaatst waarbij de bodem gevuld was met water, op deze manier werd een vochtige omgeving gecreëerd (Figuur 8). De boxen werden bewaard in de fytotron (Weisstechnik) volgens een protocol waarbij er 16 uren "dag" was met een temperatuur van 24°C en een relatieve vochtigheid ("relative humidity", RH) van 70% en 8 uren "nacht" met een temperatuur van 16°C en een RH van 70%. De volgende dag werden de spikelets op net dezelfde manier en op net dezelfde plaats geïnoculeerd met de sporensuspensie. Opnieuw werden de oasis blokken in de infectie kamers geplaatst en bewaard in de fytotron volgens hetzelfde protocol. Vijf dagen na de infectie van de fungale tarwepathogeen werden de deksels van de infectieboxen verwijderd en werd het water ververs.



Figuur 8. Infectiekamers waarin de oasis blokken met hierop de aren werden bewaard, gebruikt bij de detached ear assay met *F. graminearum*

Vooraleer de aren werden geïnfecteerd, werden er met de multispectraalcamera al foto's getrokken. Aangezien de aren al even gestockeerd waren in de koelkast en op deze manier kon worden gecontroleerd of ze nog in gezonde staat verkeerde. Ook na vijf, zeven, tien, veertien en negentien dagen na infectie werden er foto's getrokken met de multispectraalcamera (zie 3.9).

3.9 Ziekteopvolging

3.9.1 Multispectrale beeldanalyse : PathoViewer

Voor de ziekteopvolging werden bij de detached leaf, whole leaf assay en detached ear assay steeds foto's getrokken met de PathoViewer. Dit is een gerobotiseerde multispectraalcamera gemonteerd op cartesiaanse robotarm die gebruikt wordt om abiotische en biotische stress te detecteren bij planten onder gecontroleerde omstandigheden. De PathoViewer bestaat uit een 6 MP – 16 bit camera die verschillende

optische filters bevat, die toegepast kunnen worden om talloze parameters in beeld te brengen (Savat, 2019). De belangrijkste parameters die in deze masterproef onderzocht werden met de PathoViewer zijn : Fv/Fm, Chlorofyl Index (Chlldx) en het gecorrigeerd green fluorescent protein signaal (cGFP). De gebruikte spectrale parameters en hun afgeleiden worden weergegeven in Tabel 3.

Fv/Fm is een chlorofylfluorescentieparameter die de verhouding tussen variabele (Fv) en maximale fluorescentie (Fm) na donkeraanpassing weergeeft en de maximale kwantumopbrengst van fotosysteem II vertegenwoordigt (Ibaraki & Murakami, 2007). Chlorofylmoleculen absorberen zonlicht, raken geëxciteerd en dragen de geabsorbeerde energie over naar fotosysteem II en fotosysteem I. Deze energie wordt gebruikt voor fotosynthese en wordt deels uitgestraald als chlorofylfluorescentie (ChIF) of warmte. Analyse van ChIF-verandering is een krachtige techniek voor het bestuderen van stress-effecten op fotosynthese. Donkeraanpassing opent alle fotosysteem II-reactiecentra, waarna minimale fluorescentie kan worden gemeten. Maximale fluorescentie wordt berekend na excitatie van de reactiecentra met continu licht, waarbij alle reactiecentra gesloten zijn (Xia et al., 2023). Het Fv/Fm-verdelingspatroon verandert afhankelijk van de opgelegde stressfactor, waardoor deze index kan worden gebruikt voor het detecteren van stress bij planten (Ibaraki & Murakami, 2007). Een hogere Fv/Fm-index duidt op een gezondere plant.

De chlorofylindex (Chlldx) geeft weer hoeveel chlorofyl aanwezig is in het blad. Aan de hand van deze parameter kan de algemene gezondheid van een plant gekwantificeerd worden. Onder stressomstandigheden (bv. door infectie) zal de chlorofylindex lager zijn. Stress induceert namelijk de afbraak van chlorofyl en remt de fotosynthese, waardoor de waarde van de Chlldx lager zal liggen (Zhang et al., 2011).

Bepaalde assays in deze masterproef maakte gebruik van een het GFP-gelabelde *F. graminearum*. Het meten van het GFP-signaal maakte monitoring van de schimmel mogelijk, waarbij het signaal gecorrigeerd werd voor autofluorescentie om het cGFP-signaal te verkrijgen. Een verhoogd cGFP-gehalte correleert met een verhoogde groei van *F. graminearum* (Deroo et al., 2022).

De foto's verkregen met de PathoViewer werden steeds verwerkt met het programma CropReporter - PathoScreen versie 5.4.6-64b.

Tabel 3. Overzicht van gebruikte de spectrale parameters en hun afgeleiden.

Parameter	Formule	Fysiologisch belang	Bron
F_0	-	Minimaal level van fluorescentie gemeten bij 730nm onder lage lichtomstandigheden.	Baker (2008) Xia et al. (2023) De Zutter, N. (2023)
F_m	-	Maximum level van fluorescentie gemeten bij 730nm onder verzadigde lichtomstandigheden.	Baker (2008) Xia et al. (2023) De Zutter, N. (2023)
F_v/F_m	$\frac{F_m - F_0}{F_m}$	Efficiëntie van fotosysteem II in een donker aangepaste toestand	Baker (2008) Ibaraki & Murakami, (2007) De Zutter, N. (2023)
Chlldx	$\frac{\rho_{770}}{\rho_{710}} - 1$	Vegetatie-index voor de schatting van het chlorofylgehalte in bladeren.	Zhang et al. (2011) De Zutter, N. (2023)
cGFP	-	Signaal dat de monitoring van een GFP-gelabeld organisme mogelijk maakt	Deroo et al. (2022) De Zutter, N. (2023)

3.9.2 Canon camera

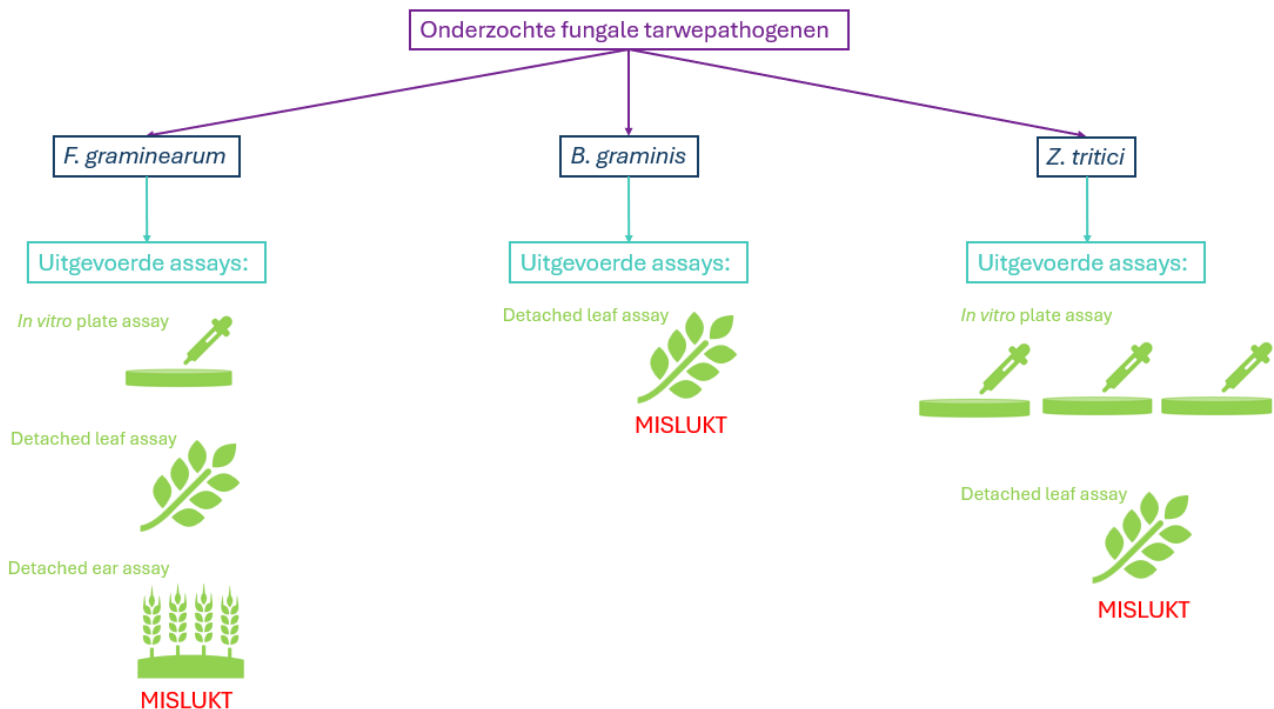
Voor de *in vitro* plate assays werd de ziekteprogressie geëvalueerd door middel van foto's getrokken met een Canon-camera. Een cruciaal aspect was het plaatsen van de petriplaten op een donkere achtergrond en het zorgvuldig bepalen van de lichtinval. Deze foto's werden vervolgens geanalyseerd met behulp van het programma Fiji-win64, waarbij de groeioppervlakte van de fungale tarwepathogeen werden gemeten.

3.10 Dataverwerking

Alle verkregen data van bovenstaande assays werd statistisch verwerkt met behulp van R studio versie 2022.12.0+353. Eerst en vooral werd nagegaan of de variabelen een normale verdeling volgden met behulp van de Shapiro-Wilk test. Indien niet normaal verdeeld, werd er een Kruskal-Wallis test uitgevoerd. Indien normaal verdeeld werd er ook nog gecontroleerd of de datasets gelijke varianties hadden of niet met behulp van de Levene's test. Indien zowel normaal verdeeld als homoskedastisch, werd er per dag een one-way ANOVA toets met Tukey HSD als post hoc toets toegepast om de gemiddelden te vergelijken. Indien normaal verdeeld maar heteroskedastisch werd gebruik gemaakt van een one way ANOVA met een Games Howell post hoc toets. Alle opgestelde hypothesen werden onderzocht op een significantieniveau van 5%.

3.11 Overzicht

In Figuur 9 wordt er een overzicht gegeven van de uitgevoerde assays bij elke onderzochte fungale tarwepathogeen tijdens deze masterproef. De assays waarbij "MISLUKT" staat, vertonen resultaten die niet in lijn zijn met resultaten die verwacht worden bij goed verlopen infecties. Dit wordt verder besproken in het volgende puntje "Resultaten". Deze mislukte assays kunnen dus niet gebruikt worden om een antwoord te formuleren op de onderzoeksvragen.



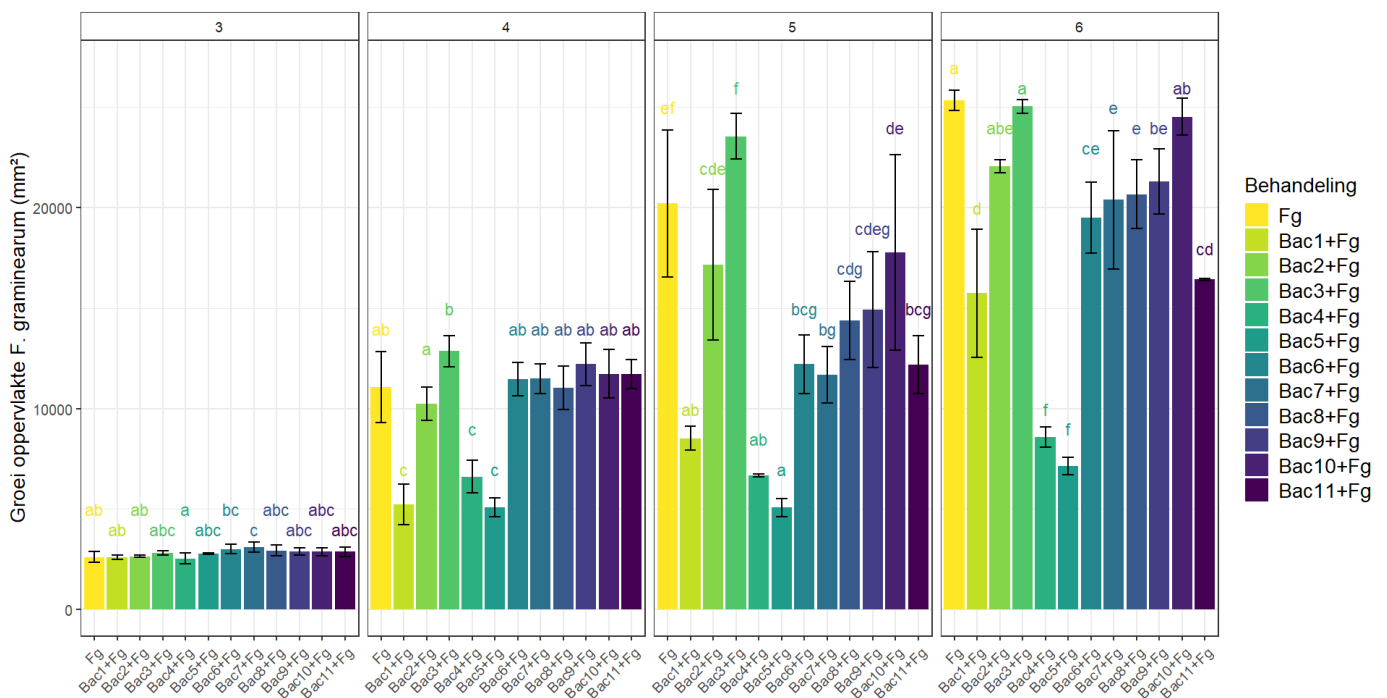
Figuur 9. Overzicht van de opgestelde proeven bij de bijhorende onderzochte fungale tarwepathogenen.

4 RESULTATEN

4.1 Assays *Fusarium graminearum*

4.1.1 *In vitro* plate assay

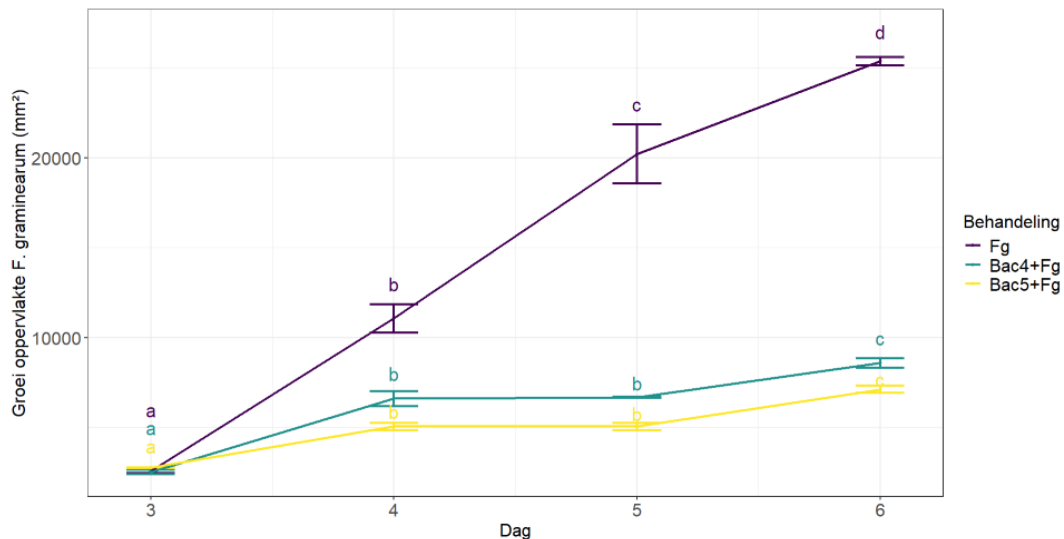
In deze paragraaf worden de resultaten besproken verkregen bij het uitvoeren van een *in vitro* plate assay met *F. graminearum*. In deze assay werd de groei van *F. graminearum* opgevolgd en dit liet toe om na te gaan welke bacteriestammen een direct antagonisme vertoonden tegen *F. graminearum*. De data, bekeken per dag, was normaal verdeeld en homoskedastisch. In Figuur 10 kunnen de barplots van de groei van *F. graminearum* onder behandeling met de verschillende Actinobacteriën (BacX) worden waargenomen, alsook de barplots van de geïnfecteerde controle met enkel *F. graminearum* (Fg).



Figuur 10. Barplots van de groei van *F. graminearum* (Fg), op dag 3, 4, 5 en 6, onder de behandeling met de verschillende Actinobacteriën (BacX) bij de *in vitro* plate assay met *F. graminearum*

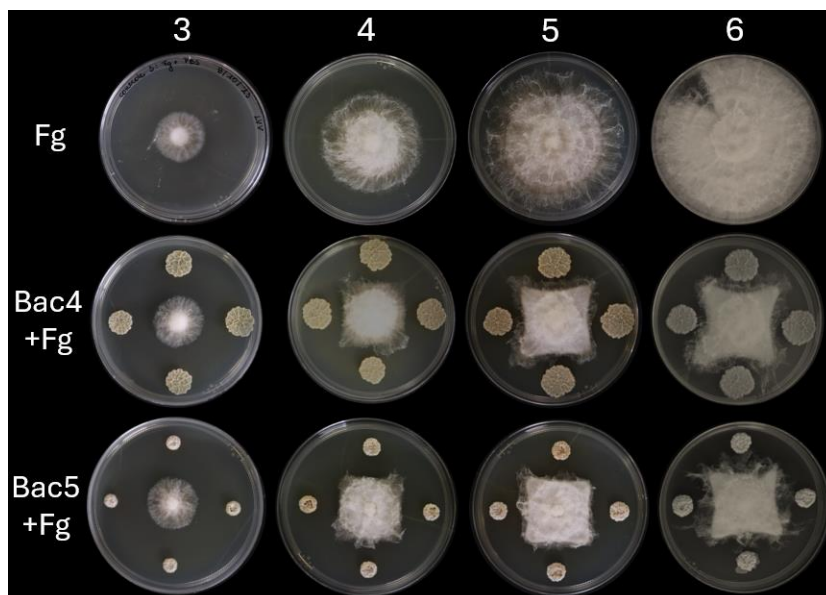
Om een antwoord te bieden op de onderzoeksvraag of de aanwezigheid van een potentieel biocontrolle organisme de groei van *F. graminearum* beïnvloedt, zal de groeioppervlakte van de schimmel in aanwezigheid van het potentieel biocontrolle organisme significant moeten verschillen van de geïnfecteerde controle Fg. Op dag 3 werden er nog geen significante verschillen t.o.v. de waarde van Fg waargenomen. Op dag 4 verschilden de waarden van Bac1+Fg, Bac4+Fg en Bac5+Fg significant van deze van de geïnfecteerde controle Fg (p-waarden = $3,17 \cdot 10^{-10}$; $1,99 \cdot 10^{-6}$ en $1,42 \cdot 10^{-10}$ respectievelijk). Op dag 5 bleven deze significante verschillen gelden en verschilden ook de waarden van Bac6+Fg, Bac7+Fg, Bac8+Fg en Bac11+Fg significant van de controle waarde (p-waarden = $3,25 \cdot 10^{-4}$; $1,07 \cdot 10^{-4}$; $0,0231$ en $3,08 \cdot 10^{-4}$ respectievelijk). Op de laatste dag, dag 6, verschilde ook de waarde van Bac9 significant van de waarde van de controle Fg. Hierdoor verschilden op dag 6 alle behandelingen significant van de waarde van de controle Fg, buiten Bac2+Fg, Bac3+Fg en Bac10+Fg (p-waarden = $0,114$; $1,0$ en $1,0$ respectievelijk). Deze acht Actinobacteriën vertonen dus een antifungale werking tegen *F. graminearum*, met Bac4 en Bac5 als beste kandidaten aangezien de groeioppervlaktes bij deze behandelingen significant lager lagen dan de groeioppervlaktes van alle andere behandelingen.

In Figuur 11 wordt de groeicurve van de geïnfecteerde controle Fg en de behandelingen met Bac4 en Bac5, als beste kandidaten met de grootste directe antifungale werking, weergegeven. Er werd hiermee onderzocht of de dagelijkse waarden van elke behandeling afzonderlijk significant van elkaar verschilden. Op deze manier kon er worden onderzocht of de groei van *F. graminearum* volledig werd geremd of enkel werd vertraagd. De data was gepaard en normaal verdeeld bij de behandelingen Bac4+Fg en Bac5+Fg, maar niet normaal bij de geïnfecteerde controle Fg.



Figuur 11. Groeicurves van de groei van *F. graminearum* (Fg), op dag 3, 4, 5 en 6, onder de behandeling Bac4 en Bac5 bij de *in vitro* plate assay met *F. graminearum*

Bij de behandeling met Bac4 kon worden waargenomen dat op dag 5 de groeioppervlakte van *F. graminearum* niet significant was toegenomen tegenover dag 4, ook bij Bac5+Fg kon deze trend worden waargenomen. Op dag 6 was bij beide behandeling de oppervlakte wel significant toegenomen. Er kan geconcludeerd worden dat Bac4 en Bac5 de groei van *F. graminearum* beïnvloeden door de groei te remmen maar niet helemaal tegen te houden. De agarplaten van beide behandelingen en de geïnfecteerde controle Fg op dag 3, 4, 5 en 6 worden weergegeven in Figuur 12.



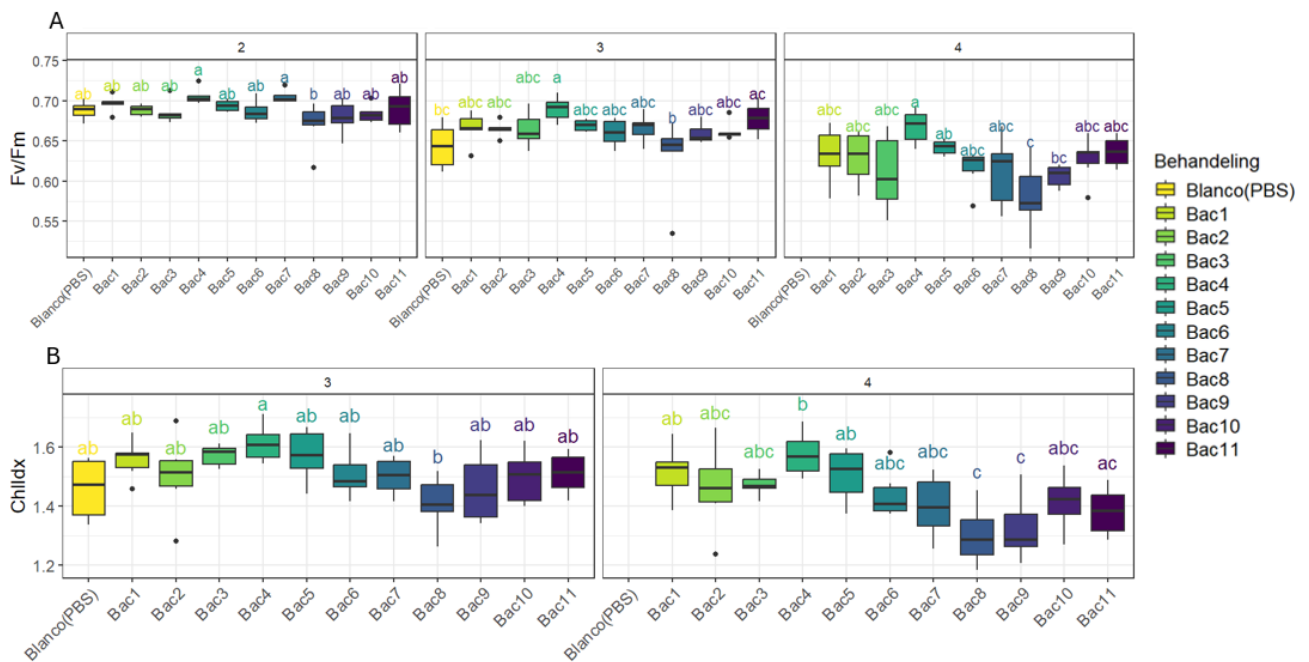
Figuur 12. Foto's van de agarplaten van de behandelingen: Fg (geïnfecteerde controle), Bac4+Fg en Bac5+Fg dag 3, 4, 5 en 6 opgezet bij de *in vitro* plate assay met *F. graminearum*

4.1.2 Detached leaf assay

De detached leaf assay met *F. graminearum* had als doel om in eerste instantie te verifiëren of één of meerdere isolaten fytoxisch/fytopathogeen waren en in tweede instantie om na te gaan welke bacteriën *in planta* biocontrole activiteit vertoonden tegen *F. graminearum*. Bij deze assay was er iets mis gelopen bij het nemen van een foto van de blanco controle op dag 4. Bij elke parameter kon er dus niet vergeleken worden t.o.v. de blanco controle op de vierde dag na infectie.

4.1.2.1 Effect Actinobacteriën op de gezondheid van tarwe

De fytoxiciteit werd geëvalueerd door de spectrale parameters Fv/Fm en ChlDx op te volgen, dit zijn parameters die een goede maatstaf zijn voor de gezondheidstatus van de planten. De data van de parameters van de negatieve controles (behandelingen met enkel Actinobacteriën) en van de blanco controle waren normaal verdeeld en homoskedastisch, de resultaten worden weergegeven in Figuur 13. Enkel dagen waarop er significante verschillen werden waargenomen, worden weergegeven. De cGFP parameter was hier niet interessant om op te volgen omdat er nog geen infectie was met het cGFP-gelabelde *F. graminearum*, echter wordt voor de volledigheid de boxplots wel weergegeven onder Bijlage 1. Om te antwoorden op de onderzoeksvraag of de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van het tarwe blad beïnvloedt, werd een vergelijking gemaakt tussen de blanco controle en de behandelingen met de Actinobacteriën.



Figuur 13. Boxplots van de resultaten van de parameters Fv/Fm (A) en ChlDx (B) van de blanco en negatieve controles op de dagen waar significante verschillen optreden

Op dag 3 kon worden waargenomen dat de Fv/Fm-waarde van Bac4, als enigste behandeling, significant hoger lag dan de waarde van blanco (p-waarde = 0,0202). Op dag 4 kon worden waargenomen dat de Fv/Fm-waarden van Bac4 en Bac5 significant verschilden van de waarde van Bac8 (p-waarden = $4,98 \cdot 10^{-4}$ en 0,0205 respectievelijk). Bac8 was namelijk de behandeling met de laagste gemiddelde Fv/Fm-waarde en dit kan er eventueel wel op wijzen, ookal is er geen blanco om mee te vergelijken, dat Bac4 en Bac5 een positieve invloed hebben op de parameter Fv/Fm en Bac8 een negatieve invloed. Op dag 4 bij de parameter ChlDx lag de waarde van Bac8 significant lager dan de waarden van Bac1, Bac4 en Bac5 (p-waarden = $9,48 \cdot 10^{-3}$; $2,62 \cdot 10^{-4}$ en 0,0161 respectievelijk). De waarde van Bac9 vertoonde op dag 4 ook een significant verschil met de ChlDx van Bac1, Bac4 en Bac5 (p-waarden = 0,0311; $1,07 \cdot 10^{-3}$ en 0,0499 respectievelijk). Op dag 4 lagen dus de waarden van Bac1, Bac4 en Bac5 significant hoger t.o.v. de behandelingen met de laagste gemiddelde

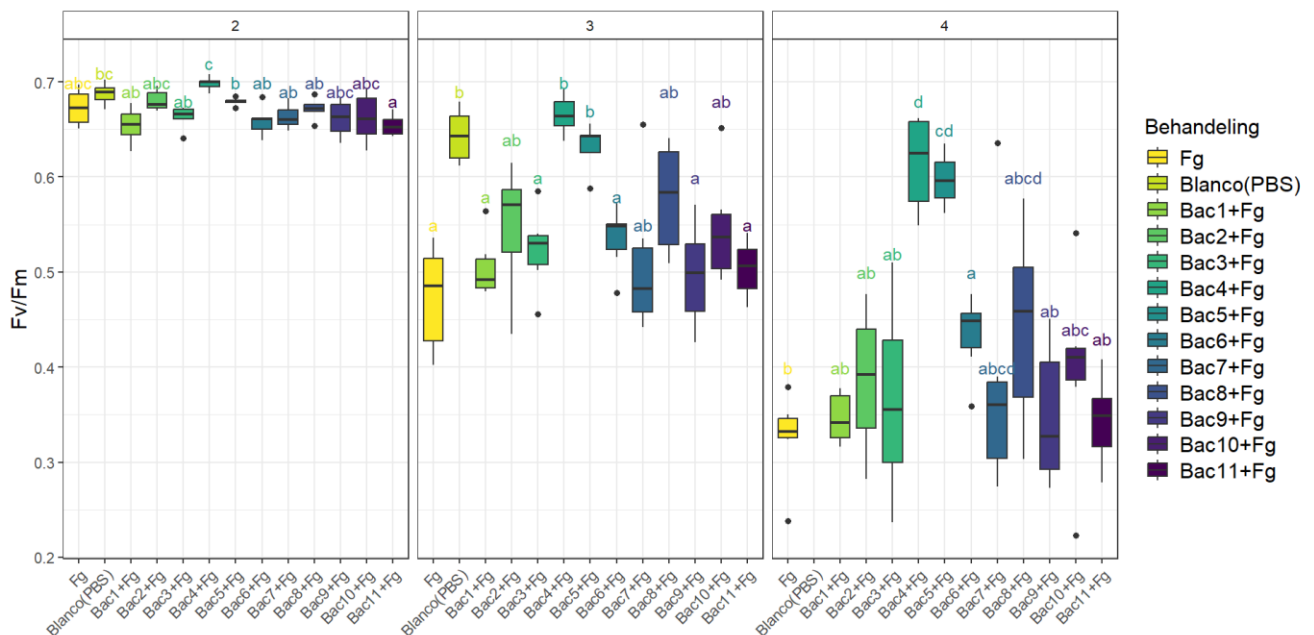
waarden, namelijk Bac8 en Bac9. Hierdoor kan worden gesuggereerd dat Bac1, Bac4 en Bac5 een positieve invloed kunnen uitoefenen op de ChlI dx en Bac8 en Bac9 een negatieve invloed.

Bac4 en Bac5 lijken een positieve invloed te hebben op de parameters Fv/Fm als ChlI dx, terwijl Bac8 op beide parameters een negatieve invloed lijkt te hebben. Bac1 lijkt een positieve invloed te hebben op de ChlI dx en Bac9 een negatieve invloed. De resultaten dienen met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden omwille van het ontbreken van een blanco controle op dag 4. Voorzichtig zou er gesteld kunnen worden dat Bac4 en Bac5 planten groeibevorderend zijn, terwijl Bac8 mogelijks fytoxische eigenschappen bezit.

4.1.2.2 Effect Actinobacteriën op infectie met *F. graminearum*

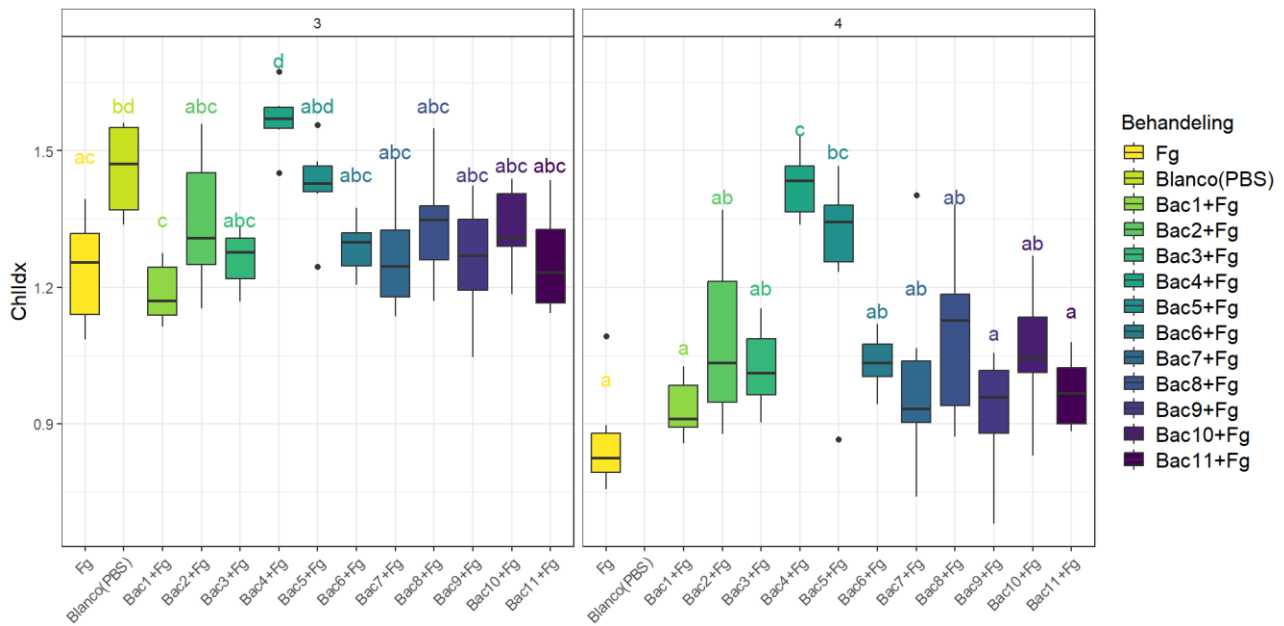
Bij de behandelingen van *F. graminearum* met de subset Actinobacterie (BacX+Fg), bij de geïnfecteerde controle Fg en bij de blanco controle werden de parameters Fv/Fm, ChlI dx en cGFP opgevolgd. Opnieuw wordt enkel de data weergegeven van de dagen waarbij er significante verschillen werden waargenomen. Om te onderzoeken of de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van een met *F. graminearum* geïnfecteerd blad beïnvloedt, werd er telkens gekeken of de behandeling significant verschilde van de geïnfecteerde controle. Idealiter verschil de behandeling niet significant van de blanco controle.

De dataset van de parameter Fv/Fm en cGFP waren normaal verdeeld en heteroskedastisch terwijl de dataset van de ChlI dx normaal verdeeld maar heteroskedastisch was. De boxplots van de Fv/Fm, ChlI dx en cGFP parameters worden respectievelijk weergegeven in Figuur 14, Figuur 15 en Figuur 16.



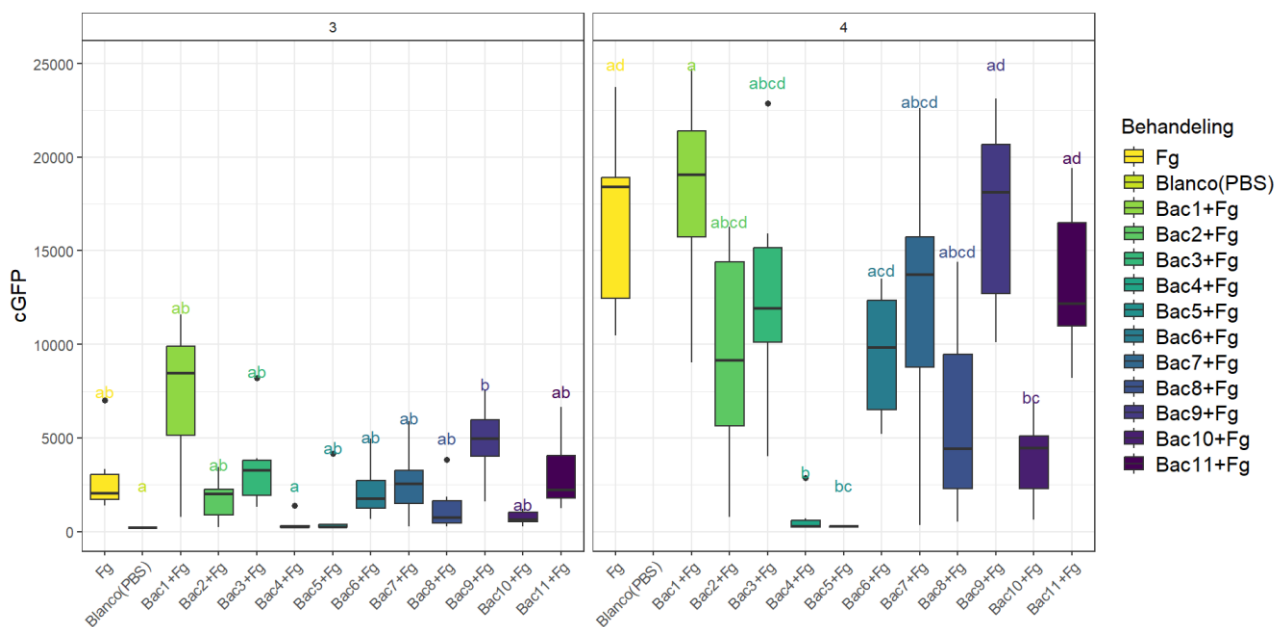
Figuur 14. Boxplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm bij de behandeling van *F. graminearum* met de verschillende Actinobacteriën (BacX+Fg), de blanco controle en de geïnfecteerde controle (Fg) op dag 2, 3 en 4 bij de detached leaf assay met *F. graminearum*

Als er gekeken werd naar de Fv/Fm-dataset (Figuur 14) kan er opgemerkt worden dat op dag 3 de waarde van de geïnfecteerde controle Fg significant verschilde van de waarden van de blanco controle, Bac4+Fg en Bac5+Fg (p-waarden : 0,006; 0,004 en 0,009 respectievelijk). De verschillen in Fv/Fm-waarden tussen de geïnfecteerde controle Fg met Bac4+Fg en Bac5+Fg werden alleen nog maar groter op dag 4 (p-waarden = $4,37 \cdot 10^{-5}$ en $1,30 \cdot 10^{-4}$ respectievelijk). Significat verschillend van de Fv/Fm-waarde van de controle Fg op dag 4 was ook nog de Fv/Fm-waarde van Bac6+Fg (p-waarde = 0,049). Dit wijst erop dat Bac4 en Bac5 een positieve invloed hebben op de Fv/Fm-waarde, maar ook Bac6 hier een potentieel vertoont.



Figuur 15. Boxplots van de resultaten van de parameter ChlDx bij de behandeling van *F. graminearum* met de verschillende Actinobacteriën (BacX+Fg), de blanco controle en de geïnfecteerde controle (Fg) op dag 3 en 4 bij de detached leaf assay met *F. graminearum*

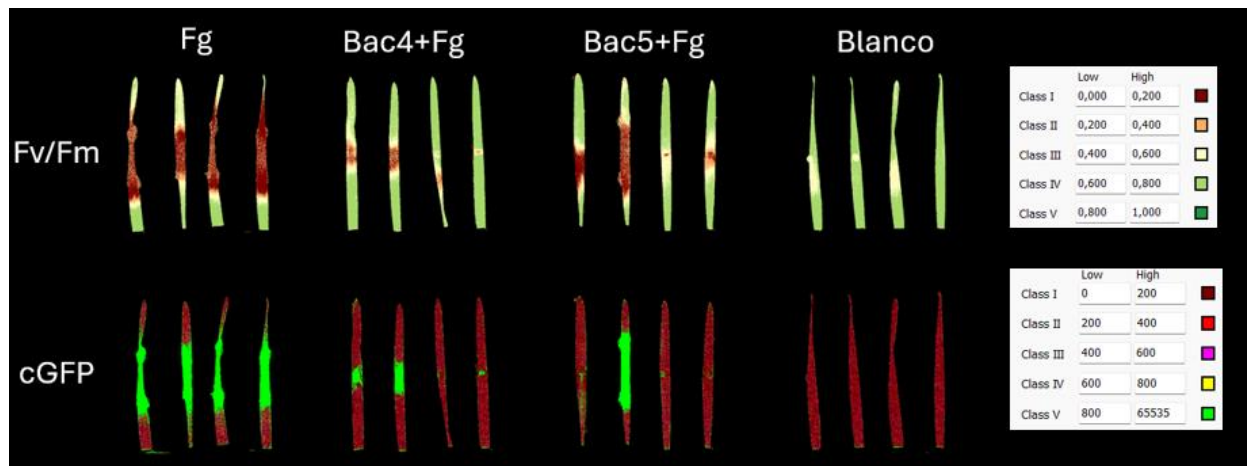
De ChlDx-waarde van Bac4+Fg verschilde op dag 3 significant van alle andere waarden buiten de waarden van Bac5+Fg en de blanco (p-waarden = 0,514 en 0,869 respectievelijk). Op dag 4 verschilden de ChlDx-waarden van Bac4+Fg en Bac5+Fg als enigste significant van de Fg-waarde (p-waarden = $6,00 \cdot 10^{-7}$ en $5,35 \cdot 10^{-4}$ respectievelijk) (Figuur 15). Bac4 en Bac5 lijken dus een positieve invloed op de ChlDx-waarde te hebben.



Figuur 16. Boxplots van de resultaten van de parameter cGFP bij de behandeling van *F. graminearum* met de verschillende Actinobacteriën (BacX+Fg), de blanco controle en de geïnfecteerde controle (Fg) op dag 2, 3 en 4 bij de detached leaf assay met *F. graminearum* Detached ear assay

Indien er gekeken werd naar de parameter cGFP (Figuur 16), kon men waarnemen dat op dag 4 de cGFP-waarden van Bac4+Fg, Bac5+Fg en Bac10+Fg significant verschilden van de waarde van de geïnfecteerde controle Fg (p-waarden = 0,009; 0,009 en 0,020 respectievelijk). Bac4, Bac5 en Bac10 lijken dus in staat om de groei van *F. graminearum* te remmen.

Algemeen kan men er dus vanuit gaan dat vooral Bac4 en Bac5 een potentieel vertonen als biocontrole organisme doordat ze zowel de Fv/Fm als ChlDx van geïnfecteerde bladeren positief beïnvloeden. Alsook besluit men, door naar de cGFP-waarden te kijken, dat beide bacteriën de groei van *F. graminearum* kunnen remmen. Indien gekeken naar de multispectrale foto's getrokken op dag 4 (Figuur 17), zag men dat de behandelingen van Bac4+Fg en Bac5+Fg in vergelijking met de geïnfecteerde controle Fg minder pixels aan cGFP hadden behorend tot klasse 5 (hoogste waarden waargenomen van het GFP signaal) en minder pixels hadden aan Fv/Fm-waarden behorend tot klasse 1 (laagste Fv/Fm-waarden). Voor de volledigheid wordt ook de blanco controle weergegeven op Figuur 17, echter zijn de foto's van deze behandeling wel van dag 3 i.p.v. dag 4.



Figuur 17. Multispectrale foto's van de parameters Fv/Fm en cGFP op dag 4, buiten de foto's van de blanco op dag 3, opgezet bij de behandelingen : Fg, Bac4+Fg, Bac5+Fg, Blanco bij de detached leaf assay met *F. graminearum*. De bijhorende klassen van elke parameter worden weergegeven aan de rechter kant van elke parameter

4.1.3 Detached ear assay

In deze paragraaf zullen de resultaten besproken worden, bekomen bij het uitvoeren van een detached ear assay met *F. graminearum*. Deze assay onderzoekt het potentieel van Actinobacteriën om een invloed uit te oefenen op de gezondheid van een met *F. graminearum* geïnfecteerde aar. Bij deze assay werd er gewerkt met een subset van Actinobacteriën, namelijk met bacterie 1, 4, 5, 8, 10 en 11.

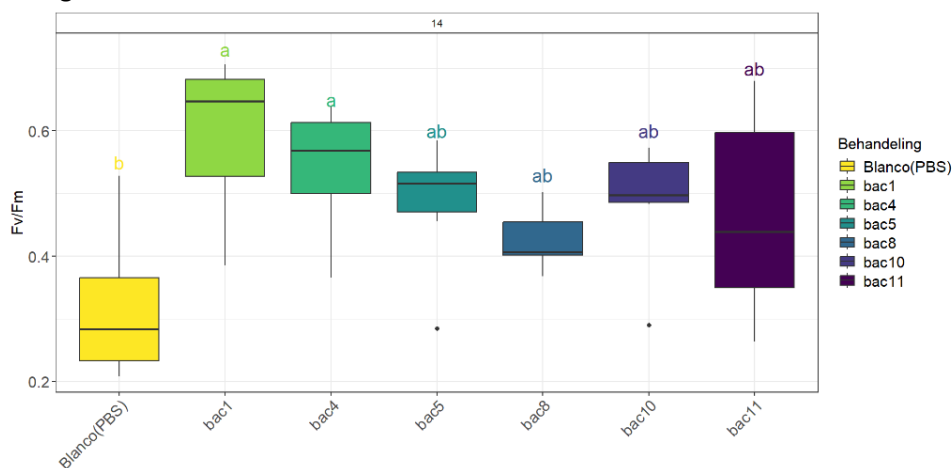
Er werden bij alle drie de parameters (Fv/Fm, ChlDx en cGFP) geen significante verschillen waargenomen tussen de geïnfecteerde controle en de blanco controle. Er werd verwacht dat de geïnfecteerde controle, vanwege de infectie met *F. graminearum*, een lagere Fv/Fm- en ChlDx- waarde zou hebben in vergelijking met de blanco, terwijl de sterke groei van *F. graminearum* zou worden weerspiegeld door een hogere cGFP-waarde. Het kan dus zijn dat het infectie proces fout is verlopen. Hierdoor kon er vanuit worden gegaan dat het experiment niet verlopen is zoals gepland en zijn verdere conclusies die uit het experiment zouden worden afgeleid, onbetrouwbaar. Een antwoord op de onderzoeksvraag of de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van een geïnfecteerde aar beïnvloedt, kon dus niet worden beantwoord. De boxplots van de parameters op de dagen waarbij significante verschillen werden waargenomen, worden weergegeven onder Bijlage 2.

4.2 Detached leaf assay *Blumeria graminis*

In deze paragraaf worden de resultaten besproken verkregen door het uitvoeren van een detached leaf assay met *B. graminis* met een subset van Actinobacteriën, namelijk met bacterie 1, 4, 5, 8, 10 en 11. De detached leaf assay had als doel om na te gaan welke bacteriën *in planta* biocontrole activiteit vertoonden tegen *B. graminis*.

4.2.1 Effect Actinobacteriën op de gezondheid van tarwe

Om te antwoorden op de onderzoeksvraag of de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van het tarwe blad beïnvloedt, werd de fytoxiciteit geëvalueerd door de spectrale parameters Fv/Fm en Chlldx op te volgen, dit zijn parameters die een goede maatstaf zijn voor de gezondheidsstatus van de planten. De datasets van de parameters van de negatieve controle (behandelingen met de subset Actinobacteriën (BacX)) en de blanco controle waren normaal verdeeld en homoskedastisch. Aangezien er enkel significante verschillen werden waargenomen bij de parameter Fv/Fm op dag 14, wordt enkel deze data weergegeven in Figuur 18.

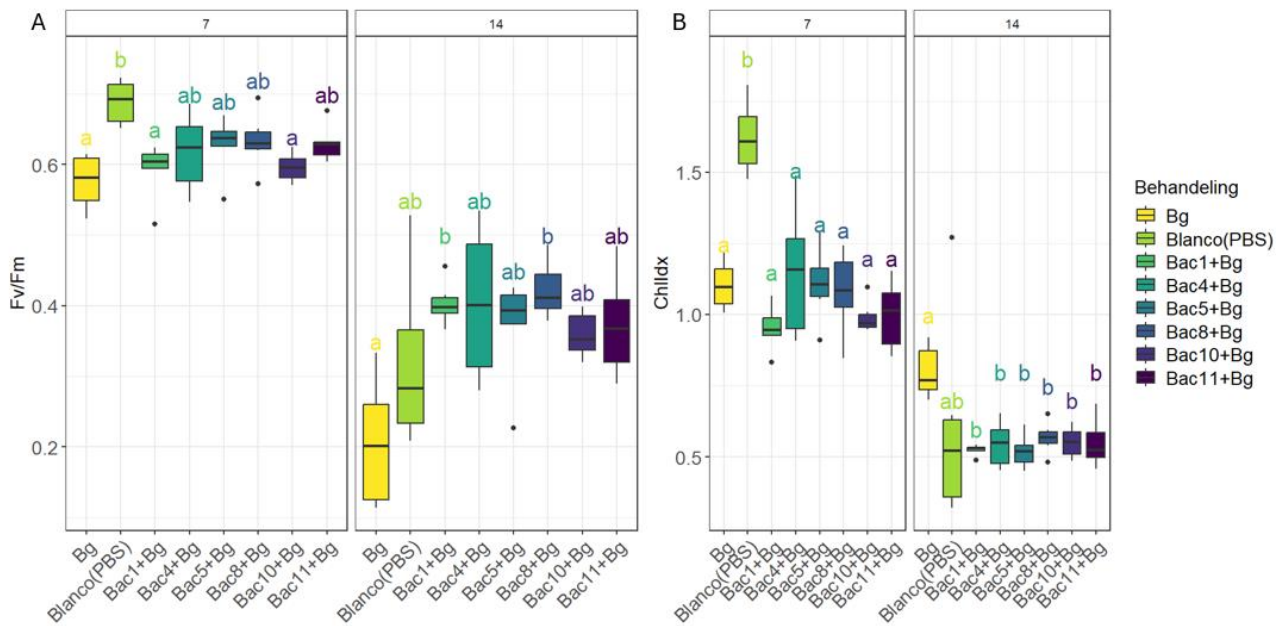


Figuur 18. Boxplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm op dag 14 uit de fytoxiciteit dataset van de detached leaf assay met *B. graminis*

Op dag 14 verschilde de Fv/Fm-waarde van de blanco significant van deze van Bac1 en Bac4 (p-waarde = 0,00357 en 0,030 respectievelijk). Dit kan er op wijzen dat Bac1 en Bac4 een positieve invloed kunnen uitoefenen op de Fv/Fm-waarde en dus op de gezondheid van het tarwe blad. De waarden van de andere behandelingen verschilden niet significant van de blanco, wat er dus op wijst dat ze geen fytoxisch effect hebben op de tarwebladeren.

4.2.2 Effect Actinobacteriën op infectie met *B. graminis*

Naast het uitvoeren van een fytoxiciteit experiment, werden er ook behandelingen opgezet van *B. graminis* met de subset Actinobacteriën (BacX+Bg). Dit werd gedaan om een antwoord te verkrijgen op de onderzoeksvraag: "Beïnvloedt de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van een geïnfecteerde blad?". In Figuur 19 worden de Fv/Fm- en Chlldx-resultaten van de behandelingen van *B. graminis* met de subset Actinobacteriën (BacX+Bg), de geïnfecteerde controle (Bg) en de blanco controle weergegeven. Beide parameters hadden een dataset die normaal verdeeld en heteroskedastisch was.



Figuur 19. Boxplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm (A) en Chlldx(B) bij de behandeling van *B. graminis* met de subset Actinobacteriën (BacX+Bg), de blanco controle en de geïnfecteerde controle (Bg) op de dagen met significante verschillen bij de detached leaf assay met *B. graminis*

Indien er gekeken werd naar de parameter Fv/Fm, kon worden waargenomen dat op dag 7 de waarde van de geïnfecteerde controle significant verschilde van de blanco controle. Maar dit verschil verdween terug op dag 14. Dit fenomeen werd ook waargenomen bij de Chlldx. Ook had de controle Bg de hoogste Chlldx-waarde op dag 14, wat tegenstrijdig is aan wat verwacht werd. Hierdoor kon men niet zeker zijn dat de infectie volledig gelukt is en zijn conclusies uit dit experiment bijgevolg niet volledig betrouwbaar

4.3 Assays *Zymoseptoria tritici*

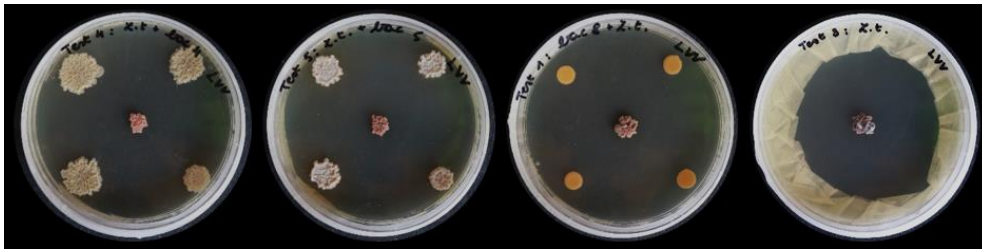
Bij de assays met *Z. tritici* werd er gewerkt met een subset Actinobacteriën, namelijk bacterie 1, 4, 5, 8, 10 en 11. Er werden twee verschillende assays opgezet met deze pathoog, namelijk een *in vitro* plate assay en een *in planta* assay op intacte tarwebladeren.

4.3.1 *In vitro* plate assay

In deze paragraaf worden de resultaten besproken verkregen bij het uitvoeren van een *in vitro* plate assay via 3 verschillende methoden met *Z. tritici* en de subset Actinobacteriën. Deze assays werd opgesteld om al een eerste indicatie te krijgen over welke bacteriestammen een direct antagonisme vertonen tegen *Z. tritici* en dus een antwoord te krijgen op de onderzoeksvraag of de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de groei van *Z. tritici* beïnvloedt.

Methode 1

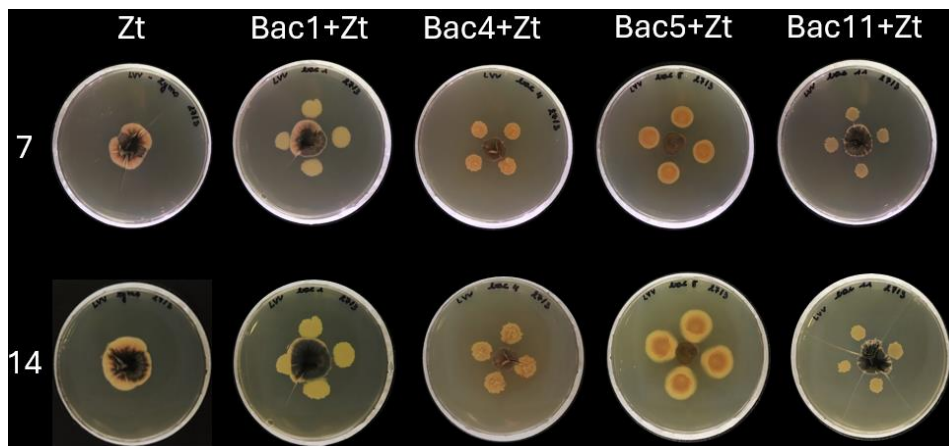
In Figuur 20 worden vier agarplaten weergegeven met respectievelijk volgende behandelingen: Bac4+Zt, Bac5+Zt, Bac8+Zt en Zt. De platen waren geïnoculeerd volgens methode 1 en genomen 7 dagen na infectie. Op 14 dagen na de infectie zagen de platen er nog net hetzelfde uit, zowel de fungale plantpathoog als de Actinobacteriën waren niet verder gegroeid. Deze methode kan dus niet gebruikt worden om de antifungale werking van de Actinobacteriën te bepalen.



Figuur 20. Foto's van de agarplaten van de behandeling van Bac4+Zt, Bac5+Zt, Bac8+Zt en de geïnfecteerde controle Zt, genomen op dag 7 opgezet bij de in vitro plate assay met *Z. tritici* methode 1

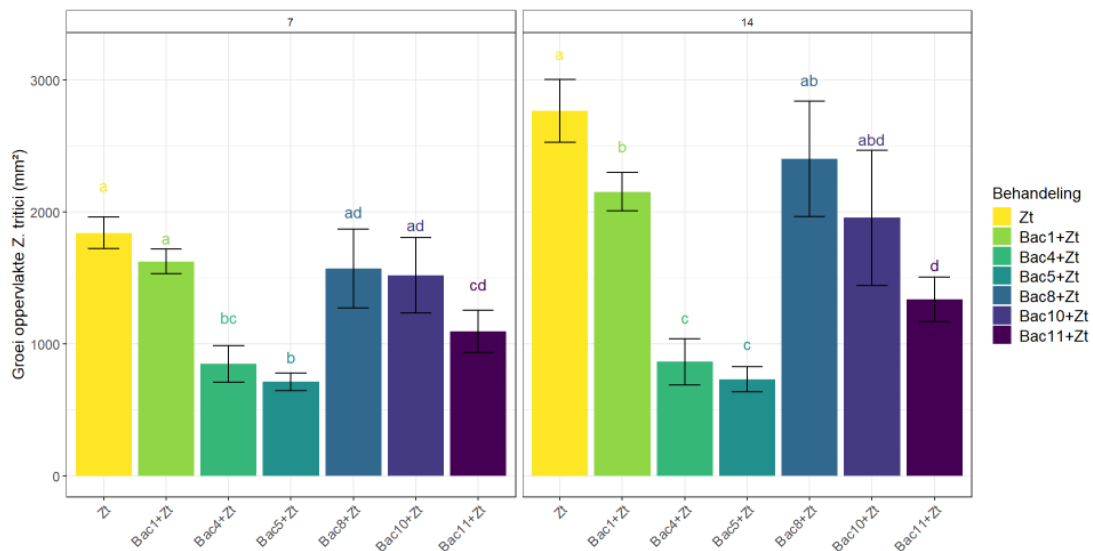
Methode 2

In Figuur 21 worden de agarplaten weergegeven bijhorend bij de behandelingen Zt, Bac1+Zt, Bac4+Zt, Bac5+Zt en Bac11+Zt respectievelijk. Bij deze methode waren de bacteriële spots dichter bij de schimmel gespot dan bij methode 1. Door de visuele beoordeling en het verder analyseren van de resultaten, kon worden besloten dat methode 2 een goede methode was om de Actinobacteriën te beoordelen op hun antifungale werking.



Figuur 21. Foto's van de agarplaten van de behandelingen geïnfecteerde controle Zt, Bac1+Zt, Bac4+Zt, Bac5+Zt en Bac11+Zt, genomen op dag 7 en 14 opgezet bij de in vitro plate assay met *Z. tritici* methode 2

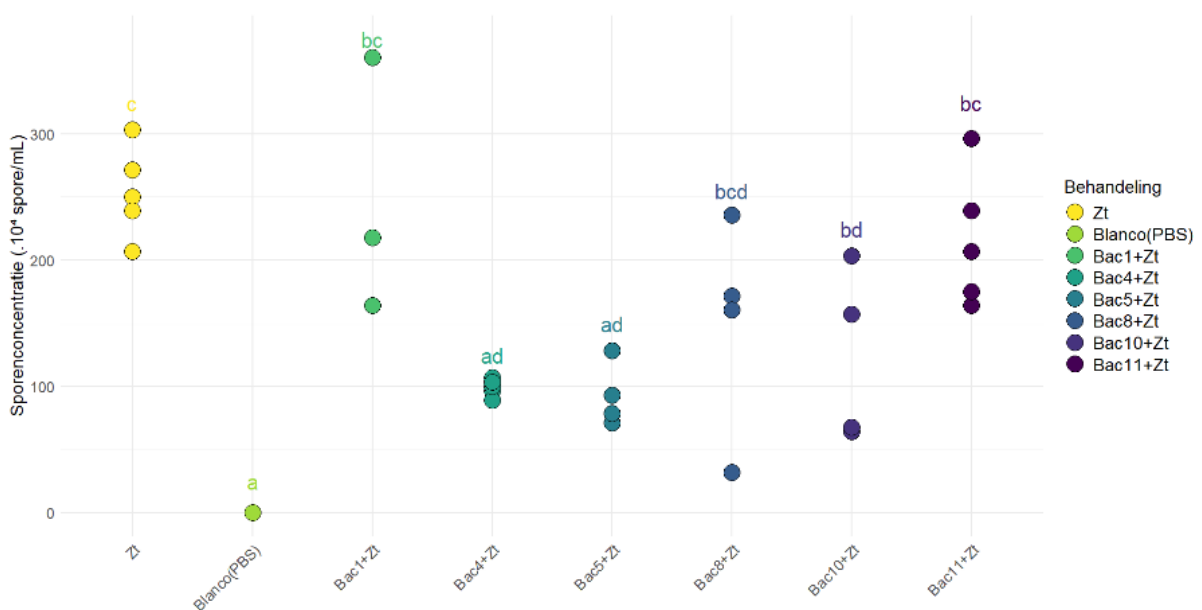
Gedurende deze assay werd ook de groeioppervlakte van *Z. tritici* opgevolgd. In Figuur 22 worden de barplots van de groeioppervlakte van *Z. tritici* (Zt) weergegeven wanneer behandeld met de verschillende Actinobacteriën uit de subset en ook wordt de groeioppervlakte van de geïnfecteerde controle Zt weergegeven. Om een antwoord te bieden op de onderzoeksvraag werd er telkens vergeleken t.o.v. de geïnfecteerde controle Zt. Indien de groeioppervlakte van *Z. tritici* significant kleiner was bij de behandeling met een Actinobacterie, dan kan dit duiden op het potentieel van de bacterie om gebruikt te worden als biocontrole organisme.



Figuur 22. Barplots van de groei oppervlakte van *Z. tritici* (Zt) op dag 7 en 14 onder behandeling met de verschillende Actinobacteriën (BacX) opgezet bij methode 2 van de *in vitro* plate assay met *Z. tritici*

De data was normaal verdeeld en heteroskedastisch. Op de zevende dag na infectie kon worden waargenomen dat de groeioppervlakten van Bac4+Zt, Bac5+Zt en Bac11+Zt significant verschilden van de groeioppervlakte van de controle Zt (p -waarden = $1,96 \cdot 10^{-6}$; $5,08 \cdot 10^{-7}$ en $8,19 \cdot 10^{-5}$ respectievelijk). Op dag 14 bleven deze verschillen gelden (p -waarden = $8,10 \cdot 10^{-8}$; $2,73 \cdot 10^{-7}$ en $1,39 \cdot 10^{-6}$), alsook werden de groeioppervlakten van Bac1+Zt en Zt significant verschillend van elkaar (p -waarde = 0,02). Dankzij deze waarneming kan er vanuit gegaan worden dat zowel Bac1, Bac4, Bac5 en Bac11 de groei van *Z. tritici* op een significant niveau kunnen remmen.

Naast het bepalen van de groeioppervlakte van *Z. tritici* onder elke behandeling, werden ook de sporenconcentraties berekend van elke behandeling. De sporenconcentratie kan ook een indicatie geven over de remming van de groei van *Z. tritici*. Dit omdat de productie van een minder aantal sporen door *Z. tritici*, een verre/verdere verspreiding van de schimmel belemmerd. De sporenconcentraties per behandeling werden uitgetzet in een scatterplot (Figuur 23). De data was normaal verdeeld en homoskedastisch.



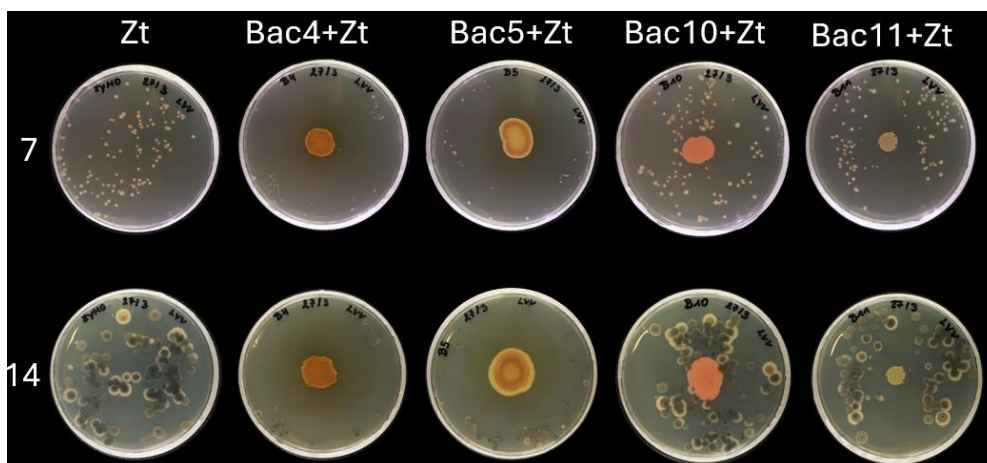
Figuur 23. Scatterplots van de bepaalde sporenconcentraties per behandeling van *Z. tritici* (Zt) met de subset van Actinobacteriën (BacX) opgezet bij de *in vitro* plate assay methode 2

Uit de resultaten kon worden afgeleid dat Bac4+Zt en Bac5+Zt als enigste behandelingen niet significant verschillend waren van de 0-waarde bijhorend bij de blanco (p-waarden = 0,104 en 0,194 respectievelijk). De sporenconcentraties van deze behandelingen lagen ook significant lager dan de sporenconcentratie van de geïnfecteerde controle Zt (p-waarden = $1,84 \cdot 10^{-3}$ en $7,81 \cdot 10^{-4}$ respectievelijk), alsook verschilden de concentraties van Bac10+Zt en de geïnfecteerde controle Zt significant van elkaar (p-waarde = 0,037). Door te kijken naar de sporenconcentraties als indicator voor antifungale werking van de Actinobacteriën, kan geconcludeerd worden dat Bac4 en Bac5 ervoor zorgen dat er een mindere sporenproductie is, maar ook Bac10 toont een potentieel door het significant verlagen van de concentratie t.o.v. de geïnfecteerde controle.

Indien dus gekeken werd naar beide parameters, valt op dat zowel Bac4 als Bac5 op beide parameters een positieve invloed hebben en dus een sterk potentieel vertonen voor gebruik als biocontrole organisme tegen *Z. tritici*.

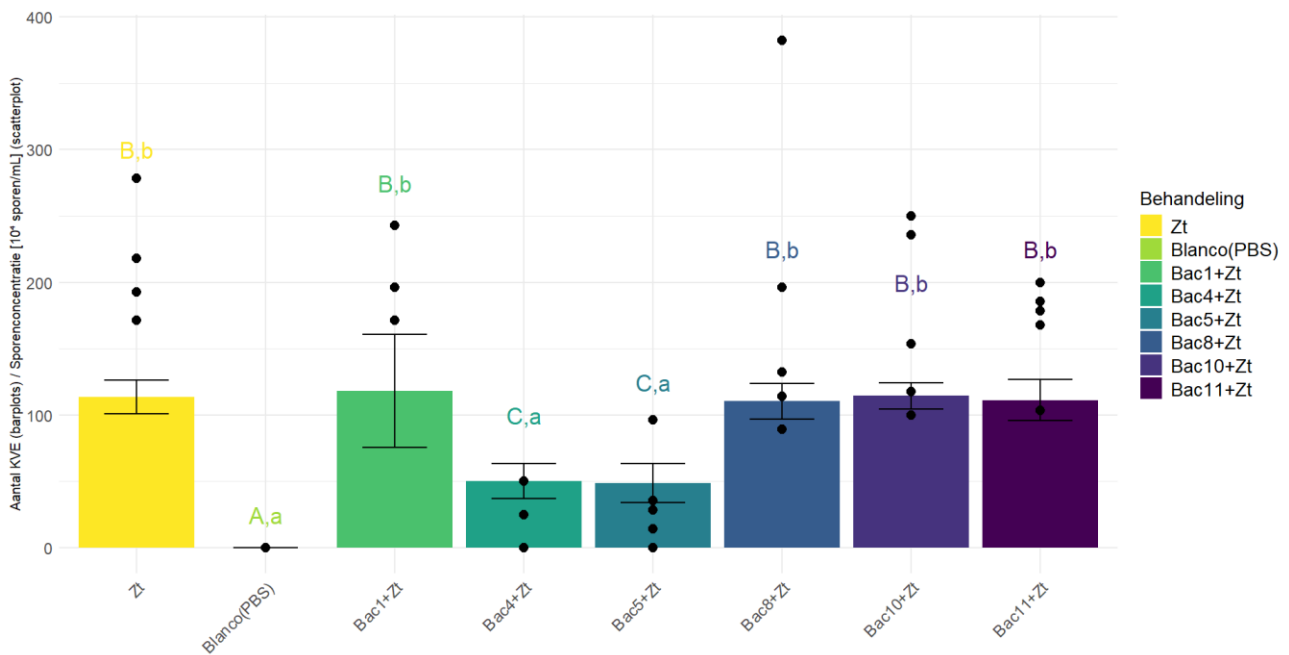
Methode 3

Bij methode 3 werd de sporensuspensie van *Z. tritici* uitgestreken over de agarplaat en de bacteriële suspensie in het midden geënt. De agarplaten opgezet bij deze assay van de behandelingen Zt, Bac4+Zt, Bac5+Zt, Bac10+Zt en Bac11+Zt worden respectievelijk weergegeven in Figuur 24. Door de visuele beoordeling en het verder analyseren van de resultaten, werd besloten dat methode 3 een geschikte methode was om de Actinobacteriën te beoordelen op hun antifungale werking. Visueel kon gezien worden dat Bac4 en Bac5 zeer sterk de groei remden van *Z. tritici* in hun buurt.



Figuur 24. Foto's van de agarplaten van de behandelingen Zt (geïnfecteerde controle), Bac4+Zt, Bac5+Zt, Bac10+Zt en Bac11+Zt, genomen op dag 7 en 14 opgezet bij de in vitro plate assay met *Z. tritici* methode 3

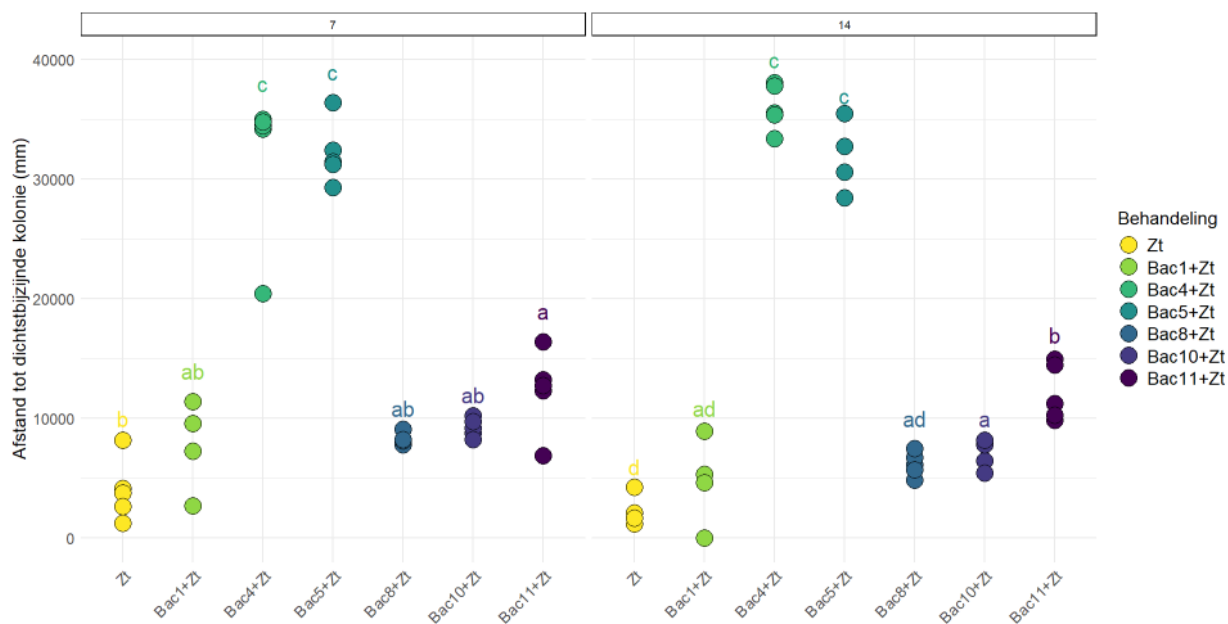
Op dag 14 werd per plaat het aantal KVE en sporenconcentratie bepaald. Beide parameters werden gebruikt om de antifungale werking van de Actinobacteriën te beoordelen. Allereerst werd onderzocht of beide parameters afhankelijk waren van elkaar door de correlatie te onderzoeken. De correlatiecoëfficiënt tussen beide variabelen is 0,73. Deze waarde is groter dan 0,5 wat kan duiden op een positief lineair verband tussen het aantal KVE en de sporenconcentratie. Het bijhorend significantieniveau bevestigde dit, waarbij men op een significantieniveau van $1,8 \cdot 10^{-7}$ zeker kan zijn dat beide parameters gecorreleerd zijn en uit beide parameters dezelfde conclusies kunnen worden getrokken. De correlatiegrafiek wordt weergegeven in Bijlage 3. In Figuur 25 worden de barplots weergegeven die het aantal KVE per behandeling voorstellen, alsook worden op dezelfde figuur de sporenconcentraties per behandeling weergegeven door een scatterplot.



Figuur 25 Barplots die het aantal KVE per petriplaat weergeven per behandeling van *Z. tritici* (Zt) met een subset van Actinobacteriën (BacX) met significante letters in hoofdletters, scatterplots die de sporenconcentratie ($\cdot 10^4$ sporen per mL) weergeven per behandeling met significante letters in kleine letters opgezet bij de *in vitro* plate assay methode 3

Indien naar beide parameters werd gekeken, kan worden besloten dat Bac4 en Bac5 hun antifungale werking bewezen. Het aantal KVE bij de behandeling van *Z. tritici* met deze bacteriën lag significant lager dan het aantal KVE van de geïnfecteerde controle Zt (p -waarden = $2,20 \cdot 10^{-5}$ en $1,51 \cdot 10^{-5}$ respectievelijk). Wel lagen het aantal KVE van deze behandelingen nog significant hoger dan de nul kolonies die werden aangetroffen bij de blanco (p -waarden = $7,25 \cdot 10^{-4}$ en $1,05 \cdot 10^{-3}$ respectievelijk). De sporenconcentraties van Bac4+Zt en Bac5+Zt verschilden als enigste significant van de concentratie van de geïnfecteerde controle Zt (p -waarden = $3,65 \cdot 10^{-4}$ en $7,82 \cdot 10^{-4}$ respectievelijk) en verschilden niet significant van de 0-concentratie die werd waargenomen bij de blanco (p -waarden = 0,996 en 0,975 respectievelijk).

Naast het bepalen van het aantal kolonies en de sporenconcentratie per behandeling, werd ook de afstand van het midden (waar de bacterie was geënt) tot de dichtstbijzijnde kolonie bepaald (Figuur 26). Hieruit kon opnieuw worden bepaald of de groei van *Z. tritici* beïnvloedt werd door de aanwezigheid van een potentieel biocontrolle organisme.



Figuur 26. Scatterplots van de afstanden tot de dichtstbijzijnde kolonie per behandeling van *Z. tritici* (Zt) met de subset van Actinobacteriën (BacX) opgezet bij de *in vitro* plate assay methode 3

Op dag 7 verschilden de afstanden bij Bac4+Zt en Bac5+Zt al significant van de afstanden van de geïnfecteerde controle Zt (p -waarden = $7,97 \cdot 10^{-12}$ en $5,72 \cdot 10^{-12}$ respectievelijk). Dit verschil bleef gelden op dag 14 (p -waarden = $4,22 \cdot 10^{-12}$ en $4,22 \cdot 10^{-12}$ respectievelijk), alsook verschilden de afstanden van Bac10+Zt en Bac11+Zt significant van de afstanden van de geïnfecteerde controle Zt (p -waarden = 0,012 en $9,77 \cdot 10^{-7}$ respectievelijk). Er kan dus geconcludeerd worden Bac4, Bac5, Bac10 en Bac11 het vermogen bezitten om de groei van *Z. tritici* in hun omgeving te remmen. Ondanks het significante verschil tussen Bac10 en de geïnfecteerde controle Zt, lijkt dit fenomeen visueel minder sterk aanwezig te zijn bij Bac10 (Figuur 24).

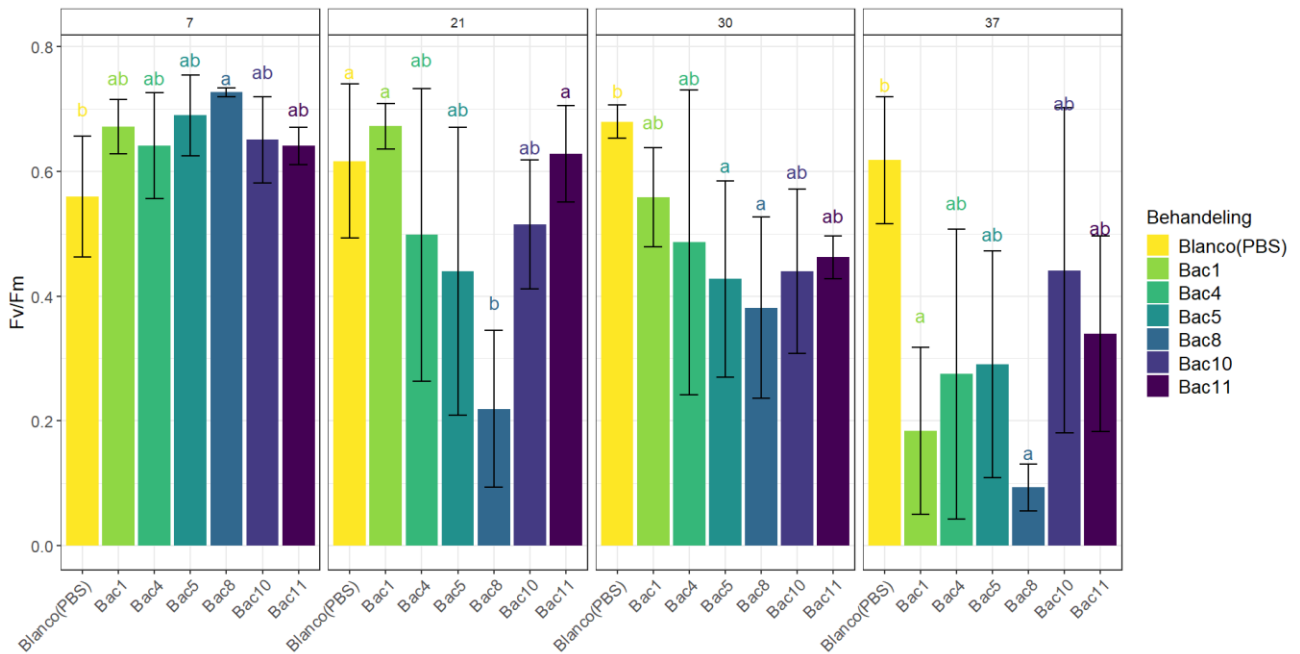
Indien gekeken werd naar alle parameters gezamenlijk (aantal KVE, sporenconcentratie en afstand tot eerste KVE), komen Bac4 en Bac5 bij alle 3 de parameters naar voor als Actinobacteriën die een invloed uitoefenen op de groei van *Z. tritici*.

4.3.2 Whole leaf assay

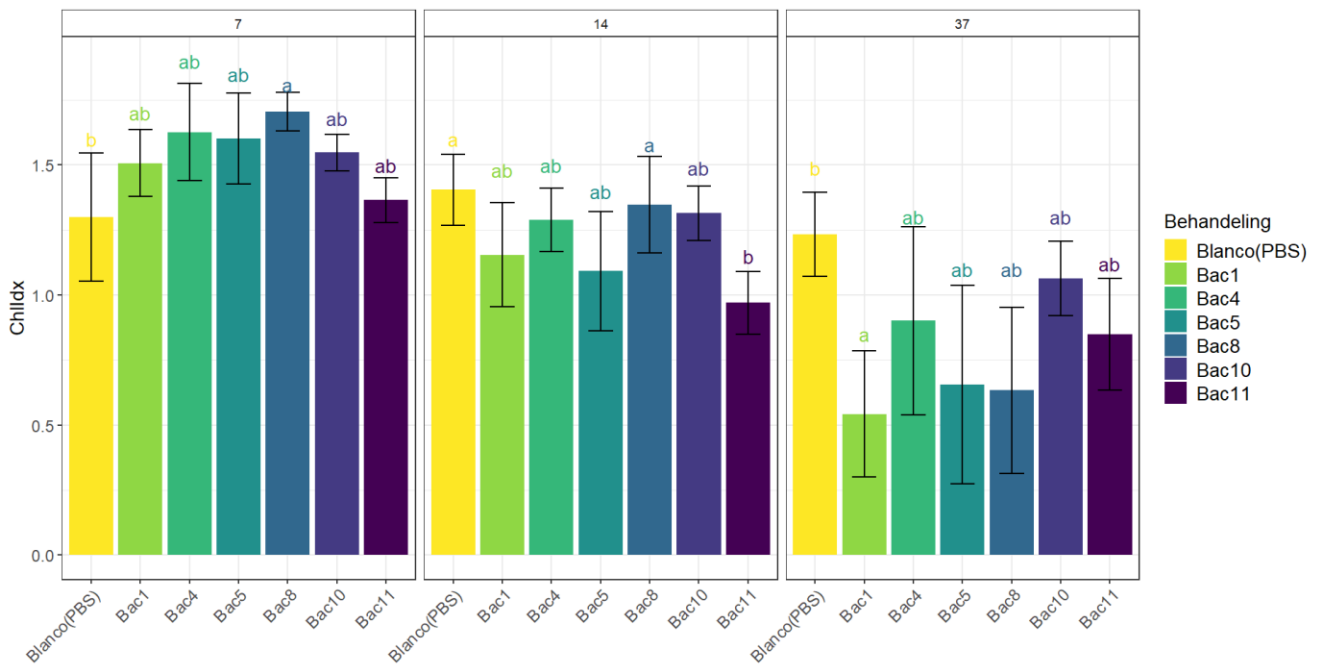
In deze paragraaf worden de resultaten besproken verkregen door het uitvoeren van een whole leaf assay met *Z. tritici* met de subset van Actinobacteriën. De whole leaf assay had als doel om na te gaan welke bacteriën *in planta* biocontrole activiteit vertoonden tegen *Z. tritici*.

4.3.2.1 Effect Actinobacteriën op de gezondheid van tarwe

De fytoxiciteit werd in kaart gebracht door de spectrale parameters Fv/Fm en ChlIdx op te volgen, dit zijn parameters die een goede proxy zijn voor de gezondheidsstatus van de planten. De data van de parameters van de negatieve controles en blanco controle waren normaal verdeeld en homoskedastisch. De resultaten worden respectievelijk weergegeven in Figuur 27 en Figuur 28. Enkel dagen waarop er significante verschillen werden waargenomen, worden weergegeven. Om te antwoorden op de onderzoeksvraag of de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van het tarwe blad beïnvloedt, werd er een vergelijking gemaakt tussen de blanco controle en de behandelingen met de subset Actinobacteriën.



Figuur 27 Barplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm bij de negatieve controles (BacX) en de blanco controle behandeling op dag 7,21,30 en 37 bij de whole leaf assay met *Z. tritici*



Figuur 28 Barplots van de resultaten van de parameter Chlldx bij de negatieve controles (BacX) en de blanco controle behandeling op dag 7, 14 en 37 bij de whole leaf assay met *Z. tritici*

Op basis van de Fv/Fm-waarden kon men besluiten dat op dag 7, Bac8 een significant hogere Fv/Fm-waarde had dan de waarde van de blanco controle (p-waarde = 0,0101). Op dag 21 lag deze Fv/Fm-waarde dan weer significant lager dan de waarde van de blanco en dit bleef gelden op dag 30 en 37. Op dag 37 lag ook de Fv/Fm-waarde van Bac1 significant lager van de waarde van de blanco controle (p-waarde = 0,0267). Doordat de Fv/Fm-waarde van Bac8 op drie van de vijf dagen significant lager lag dan de waarde van de blanco controle, kan men er vanuit gaan Bac8 een negatieve invloed uitoefent op de Fv/Fm-waarde en dus de gezondheid van het tarwe blad, desondanks het feit dat de Fv/Fm-waarde van Bac8 op dag 7 wel boven de blanco lag. Indien gekeken werd naar de Chlldx-waarde, zag men op dag 7 dat de waarde van Bac8 significant boven de waarde van de blanco controle lag (p-waarde = 0,0104). Op dag 14 lag de Chlldx-waarde van Bac11 significant lager dan de waarde van de blanco controle (p-waarde = 0,0168). Op dag 21 en 30 waren er geen

significante verschillen waar te nemen, maar op dag 37 verschilde de waarde van Bac1 significant van de waarde van de blanco controle (p-waarde =0,0263).

Op basis van de Fv/Fm-waarden kan besloten worden dat Bac8 een negatieve invloed heeft op de gezondheid van het blad. Uit de Chldx-waarden wordt afgeleid dat Bac1 een negatieve invloed heeft.

4.3.2.2 Effect Actinobacteriën op infectie van *Z. tritici*

Naast het uitvoeren van een fytotoxiciteit experiment, werden er ook behandelingen opgezet van *Z. tritici* met de subset Actinobacteriën (BacX+Zt). Dit werd gedaan om een antwoord te verkrijgen op de onderzoeksvraag: "Beïnvloedt de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van een geïnfecteerde blad?". De resultaten van de dagen waarop significante verschillen werden waargenomen bij de niet normaal verdeelde parameter Fv/Fm en de resultaten van de normaal verdeelde, hetroskedastische parameter Chldx worden weergegeven in Bijlage 4.

Uit de resultaten werd besloten dat de infectie hoogst waarschijnlijk niet was gelukt. De blanco controle en geïnfecteerde controle verschilden bij geen van beide parameters op geen enkele dag significant van elkaar, wat bij een gelukke infectieproef wel het geval zou zijn. Er kan dus geen besluit getrokken worden over de *in planta* antifungale werking van de Actinobacteriën.

De lactofenolblauw kleuring van de schimmelstructuren op de tarwebladeren gaf ook geen verdere inzichten, omwille van het mislukken van de infectie.

5 DISCUSSIE

In het gepresenteerde werk werd er onderzoek gevoerd naar de potentiële effectiviteit van (een subset) van Actinobacteriën als biocontrole organismen tegen drie belangrijke fungale tarwepathogenen: *Fusarium graminearum*, *Blumeria graminis* en *Zymoseptoria tritici*.

5.1 Fytotoxisch effect van Actinobacteriën op tarwe

Bij de assays uitgevoerd met de drie fungale tarwepathogenen werd aanvankelijk onderzocht of de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme invloed had op de gezondheid van het tarweblad. Dit is van belang omdat, als het biocontrole organisme de gezondheid van de plant negatief beïnvloedt, het niet geschikt is als biocontrole tool. Bovendien kan dit experiment waardevol zijn om te beoordelen welke Actinobacteriën de gezondheid positief beïnvloeden en eventueel ook dienst kunnen doen als biostimulant (Das et al., 2021). Uit de gezamenlijke analyse van de fytotoxiciteit experimenten met de verschillende fungale tarwepathogenen blijkt dat bepaalde bacteriën een significante invloed hebben op de gezondheid van de tarwebladeren.

Streptomyces rimosus subsp. *rimosus* LMG5984 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 (respectievelijk bacterie 4 en 5) tonen een positieve invloed op de Fv/Fm- en Chlldx-parameters, wat suggereert dat ze de gezondheid van het blad bevorderen. Dit werd besloten op basis van de hogere Fv/Fm- en Chlldx-waarden bij het fytotoxiciteit experiment uitgevoerd voor de detached leaf met *F. graminearum*, maar ook door de verhoogde Fv/Fm-waarde van *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 bij het fytotoxiciteit experiment uitgevoerd voor de detached leaf met *B. graminis*. Uit beide experiment kwam dat *Rhodococcus* sp. R25614 (bacterie 1) een positieve invloed heeft op respectievelijk de Fv/Fm-parameter en Chlldx-parameter, waardoor ook besloten kan worden dat *Rhodococcus* sp. R25614 een positieve invloed heeft op de gezondheid van het tarweblad. Wel moet nog worden opgemerkt dat *Rhodococcus* sp. R25614 op dag 37 bij het fytotoxiciteit experiment uitgevoerd voor de whole leaf assay met *Z. tritici* een negatieve invloed vertoonde op de Fv/Fm- en Chlldx-parameter. Echter kan deze negatieve invloed ook door andere zaken worden beïnvloedt, zo kan het zijn dat op het einde van de assay de plant met de behandeling van *Rhodococcus* sp. R25614, niet voldoende water had gekregen of er juist op dag 37 bladstukken werden afgeknippt die in een slechtere gezondheid verkeerde dan de rest van de plant.

Verschiedende onderzoeken toonde al eerder aan dat de bacteriesoort *Streptomyces rimosus* een plantengroei bevorderende eigenschap heeft. Poojarani et al. (2023) konden aantonen dat *S. rimosus* AUDT502 zowel de kieming bevorderde als het vers en droog gewicht van tarwe zaden liet toenemen. Akbari et al. (2020) beschreven dat *S. rimosus* C-2012 de groei van tarwe planten onder normale en abiotische stressomstandigheden bevorderde. Dit komt onder andere door het feit dat de bacteriesoort in staat is om IAA te produceren, een plantaardige groeiregulator en fytohormoon. IAA speelt een belangrijke rol bij onder andere de celgroei, celuitrekking en wortelontwikkeling (Sathya et al., 2017).

R. fascians LMG3612t1 (bacterie 8) heeft daarentegen een negatieve invloed op de gezondheid van het blad, wat wordt ondersteund door de lage Fv/Fm- en Chlldx-waarde bij het fytotoxiciteit experiment uitgevoerd voor de detached leaf met *F. graminearum*, maar ook door de lagere Fv/Fm-waarde bij het fytotoxiciteit experiment uitgevoerd voor de whole leaf assay met *Z. tritici*. Echter was er bij het fytotoxiciteit experiment uitgevoerd voor de detached leaf met *F. graminearum* geen blanco controle om mee te vergelijken en vertoonde de Chlldx-waarde bij het fytotoxiciteit experiment uitgevoerd voor de whole leaf assay met *Z. tritici* geen significant verschil met de blanco controle. *S. sp.* LMG16995 (bacterie 9) vertoonde bij het fytotoxiciteit experiment uitgevoerd voor de detached leaf met *F. graminearum* ook een lagere Chlldx-waarde, wat ook zou betekenen dat deze bacterie een negatieve invloed uitoefent op de gezondheid van het

blad, maar opnieuw was hier geen blanco controle om mee te vergelijken. Het herhalen van de experimenten is dus nodig om de conclusies te verifiëren.

Bacterie 8 behoort tot de bacteriesoort "*Rhodococcus fascians*", een gekende fytopathogeen die gedifferentieerde galvorming induceert op een breed scala aan planten. De gedifferentieerde gallen komen tot uiting als misvormde, gebladerte-achtige uitroeiingen op de plant (Stes et al., 2011). Dit verklaart waarom *R. fascians* LMG3612t1 een negatieve invloed heeft op de gezondheid van het tarweblad.

5.2 Biocontrole effect van Actinobacteriën tegen *Fusarium graminearum*

Door het uitvoeren van een *in vitro* plate assay, detached leaf assay en detached ear assay met *F. graminearum* werd er getracht een antwoord te formuleren op de vraag of de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de groei van *F. graminearum* beïnvloedt en of de aanwezigheid ook de gezondheid van een *F. graminearum* geïnfecteerd blad/aar kan beïnvloeden. Een *in vitro* plate assay kan al een eerste indicatie geven over welke Actinobacteriën de groei van *F. graminearum* remmen onder ideaal, gecontroleerde labo omstandigheden. Daarnaast werd een *in planta* assay uitgevoerd op afgeknipte bladstukjes ter validatie van de microbiële kandidaten uit de *in vitro* test. Het is namelijk niet zo dat Actinobacteriën die een antifungale werking vertonen bij een *in vitro* test, dit ook vertonen bij een *in planta* test. Tot slot werd er ook nog een detached ear assay uitgevoerd, aangezien *F. graminearum* mee de ziekte FHB kan veroorzaken dewelke voornamelijk de aren van tarwe aantast. De detached ear assay wordt echter niet meegenomen om een antwoord op de onderzoeksvragen te formuleren omwille van het feit dat er geen significante verschillen werden waargenomen tussen de blanco controle en geïnfecteerde controle. Dit duidt er op dat de infectie mislukt was en conclusies uit het experiment onbetrouwbaar zijn.

Bij de *in vitro* plate assay werd er een sterke remming van de groei van *F. graminearum* door *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 (bacterie 4 en 5 respectievelijk) waargenomen, alhoewel de groei van *F. graminearum* niet volledig gestopt leek te zijn. Het feit dat *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 dus niet in staat is om de groei van *F. graminearum* te inhiberen, maar wel tot op een significant niveau kan reduceren, werd al bevestigd door De Mets et. al (2018). Indien gekeken wordt naar de resultaten van de detached leaf assay met *F. graminearum*, werd bevestigd dat *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 veelbelovende biocontrole kandidaten zijn. Er kan dus besloten worden dat beide stammen, zowel door de remming van de groei van *F. graminearum* als het verbeteren van de gezondheid van het blad, beloftevolle kandidaten zijn als biocontrole organisme tegen *F. graminearum* op tarwe. Zowel Tan et. al (2021) als De Mets et. al (2018) toonde eerder al aan dat *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 een veelbelovende kandidaat als biocontrole organisme is tegen *F. graminearum*. Tan et al. vermeldde dat *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 een direct antagonisme vertoonde tegen *F. graminearum*.

5.3 Biocontrole effect van Actinobacteriën tegen *Blumeria graminis*

Aan de hand van een detached leaf assay met *B. graminis* werd getracht te onderzoeken of de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van een met *B. graminis* geïnfecteerde blad beïnvloedt. Aangezien de waarden van Fv/Fm en Chl_ldx tussen de blanco controle en de geïnfecteerde controle niet significant van elkaar verschilden 14 dagen na infectie, kon er besloten worden dat de infectie met *B. graminis* wellicht mislukt was en dat er bijgevolg geen uitspraken gedaan konden worden over het potentieel van de Actinobacteriën als biocontrole organisme tegen deze tarwepathogeen. Wel voldeden de controle groepen aan de verwachtingen op dag 7, maar verder werden er op deze dag geen merkwaardige significante verschillen bij de behandelingen van *B. graminis* met een Actinobacterie opgemerkt.

Het wellicht mislukken van de infectie kan aan verschillende factoren liggen. Allereerst was het gebruik van de inoculatievoren niet evident. Het was moeilijk om een consistente hoeveelheid *B. graminis* sporen te verkrijgen op het papiertje en deze uniform te verspreiden over de tarwebladeren op de petriplaat. Belangrijk is dus om eerst het gebruik van de inoculatievoren op punt te stellen zodat uniforme infecties worden verkregen en dan in de toekomst, bij het herhaaldelijk uitvoeren van de assay, ook een positieve controle mee te nemen. Niet enkel de manier waarop geïnfecteerd werd, maar ook welke tarwe cultivar gebruikt werd in deze masterthesis had een invloed op de infectie van *B. graminis*. Het is namelijk zo dat de Tybalt cultivar een volledige resistentie vertoont tegen echte meeldauw, de ziekte veroorzaakt door *B. graminis* (Saaten Union). Het zal dus nodig zijn om de assay nogmaals uit te voeren met uniforme hoeveelheden sporen per petriplaat, een positieve controle en een tarwe soort die geen volledige resistentie vertoont tegen echte meeldauw, zoals bijvoorbeeld Faustus (Saaten Union), enkel op deze manier zal besloten kunnen worden welke Actinobacteriën effectief zijn als biocontrole organisme tegen *B. graminis*.

Wang et al. (2018) heeft uit 183 Actinobacteriën, geïsoleerd uit Binnen-Mongoli, twee Streptomyces isolaten gevonden die in een kastexperiment een antifungale werking vertoonden tegen echte meeldauw, van meer dan 70%, indien geïnoculeerd voor infectie met *B. graminis*. Wel werd er in de paper niet vermeld met welke cultivar van tarwe er gewerkt werd. Zelf wordt er ook in de paper de opmerking gemaakt dat hoewel er veelbelovende resultaten werden behaald *in vitro* en *in vivo*, de resultaten van indoor-experimenten niet volledig het controle-effect in veldtoepassingen aangeven. Het is dus noodzakelijk om de werkzaamheid onder veldomstandigheden te evalueren op verschillende locaties met de ziekten. De veldexperimenten moeten statistisch worden uitgevoerd gedurende drie tot vijf opeenvolgende jaren (Wang et al., 2018).

5.4 Biocontrole effect van Actinobacteriën tegen *Zymoseptoria tritici*

Om een antwoord te formuleren op de vraag of de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de groei van *Z. tritici* beïnvloedt, werden 3 verschillende *in vitro* plate assays uitgevoerd. De eerste methode werd niet gebruikt om de antifungale werking van de Actinobacteriën te onderzoeken. De voedingsbodems bij deze methode waren al uitgeput en omwille van de traag groeiende eigenschappen van *Z. tritici*, gebeurde dit al voordat de Actinobacteriële spots en de fungale spot voldoende dicht naar elkaar waren gegroeid om een effect te merken. De tweede en derde methode waren beide geschikt om wel een antwoord te formuleren op de onderzoeksvraag. Beide gaven dezelfde conclusie, namelijk dat *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 (bacterie 4 en 5 respectievelijk) in staat zijn om de groei van *Z. tritici* op een significant niveau te remmen. Bij methode 3 kon ook worden waargenomen dat de groeiafstand van *Z. tritici* ook geremd werd door *R. sp.* R43120 en *S. sp.* ST03 (bacterie 10 en 11 respectievelijk). Het fenomeen dat *S. sp.* ST03 de groei van *Z. tritici* zou remmen, werd niet waargenomen bij methode 2 alsook niet bij de parameter sporenconcentratie en omwille van deze reden wordt er niet vanuit gegaan dat *S. sp.* ST03 een invloed zal hebben op de groei van *Z. tritici*. *R. sp.* R43120 zorgde bij methode 2 echter wel voor een significante reductie van de sporenconcentratie, waardoor het eventueel wel kan zijn dat *R. sp.* R43120 een invloed heeft op de groei van de fungale tarwepathogeen. Echter was er hiervoor wel minder duidelijk bewijs dan voor de antifungale werking van *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 en zullen verdere experimenten dus duidelijkheid moeten geven.

Om een antwoord te formuleren op de onderzoeksvraag of de aanwezigheid van een potentieel biocontrole organisme de gezondheid van een met *Z. tritici* geïnfecteerde blad beïnvloedt, werd een whole leaf assay opgesteld. Echter werd er bij deze assay vastgesteld dat de blanco controle niet significant verschilde van de geïnfecteerde controle. Conclusies doen op basis van deze assay zou dus niet correct zijn, hierdoor kan er geen antwoord geformuleerd worden op de onderzoeksvraag.

Er werd al eerder aangetoond door De Maeyer (2021) dat *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 een *in vitro* antagonistische activiteit vertoont tegen *Z. tritici* en dit op alle onderzochte media in zijn masterthesis terwijl *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 enkel een antagonistische activiteit vertoont tegen *Z. tritici* op de voedingsbodem PDA. Er werd besloten in De Maeyer zijn masterthesis dat *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 een veelbelovend organisme is om verder in een *in planta* assay te bestuderen als biocontrole organisme. De whole leaf assay in het gepresenteerde werk is mislukt en het opnieuw uitvoeren van het experiment zal dus tot inzichten kunnen leiden. Er werd door De Maeyer al onderzoek gevoerd naar de antifungale werking van *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 bij een *in planta* assay met *Z. tritici*. Echter werd er hierbij waargenomen dat *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 geen invloed leek te hebben op de symptomen van *Z. tritici*. Dit toont aan dat Actinobacteriën die een antifungale werking vertonen bij een *in vitro* test, dit niet noodzakelijkerwijs ook vertonen bij een *in planta* test. Het herhalen van een whole leaf assay met *Z. tritici* zou deze bevinding kunnen bevestigen.

5.5 Algemeen en verder onderzoek

Bij zowel het fytoxiciteit experiment als bij de assays uitgevoerd met de fungale tarwepathogenen *F. graminearum* en *Z. tritici* kwamen *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 (bacterie 4 en 5 respectievelijk) positief naar voor. Beide Actinobacteriën behoren tot de bacteriesoort "*Streptomyces rimosus*". *S. rimosus* is gekend voor de productie van de antibiotica oxytetracycline en rimocidine, dit verklaart de antagonistische activiteit van beide bacteriën (Qi et al, 2017). De resultaten van het onderzoek van Qi et al. (2017) toonde echter ook aan dat de aanwezigheid van andere micro-organisme de activiteit van een van *S. rimosus* kan stimuleren of remmen. Dit is belangrijk om te begrijpen bij het verder ontwikkelen van van *S. rimosus* tot een biocontrole organisme bij veldtoepassingen.

Ook kan bij het onderzoek van de antifungale werking van de Actinobacteriën tegen *F. graminearum* nog worden opgemerkt dat FHB niet enkel door *F. graminearum* wordt veroorzaakt, maar dat deze ziekte veroorzaakt wordt door een complex van meerdere *Fusarium*-schimmels. Het kan dus zijn dat bepaalde Actinobacteriën efficiënt zijn in het onderdrukken van *F. graminearum*, maar geen antifungale werking vertonen tegen het *Fusarium*-complex dat FHB veroorzaakt. Zo onderzocht Tan et al. (2021) de biocontrole capaciteit van *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 tegen *F. graminearum* geënt samen met een andere veroorzaker van FHB, namelijk *F. poae*. Hun onderzoek toonde aan dat stam LMG19352 een aanzienlijk verminderde biocontrolecapaciteit vertoonde, indien beide schimmel gelijktijdig werden geënt in vergelijking met een infectie met enkel *F. graminearum*.

Toekomstig onderzoek kan zich richten op het herhalen van specifieke *in planta* proeven, het onderzoeken van de "*mode-of-action*" van *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352, het verkennen van interacties tussen andere micro-organismes aanwezig op landbouwgronden, alsmede het onderzoeken van externe factoren op de activiteit van de Actinobacteriën. Bovendien is het van belang om te onderzoeken hoe Actinobacteriën op grote schaal kunnen worden ingezet als biocontrole-organismen. Daarnaast zal ook het evalueren van de langetermijneffecten op bodem- en plantengezondheid belangrijk zijn bij de implementatie van Actinobacteriën als biocontrole organisme.

6 CONCLUSIE

Het voorgestelde werk trachtte een antwoord te bieden op de vraag of bepaalde Actinobacteriën een potentieel vertonen als biocontrole organisme tegen de belangrijkste fungale tarwepathogenen. Het onderzoek draagt bij aan het vergroten van kennis over duurzame landbouwpraktijken en het verminderen van de afhankelijkheid van chemische bestrijdingsmiddelen. Actinobacteriën zijn een diverse groep van bodembacteriën die bekend staan om hun vermogen om bioactieve verbindingen te produceren die antimicrobiële eigenschappen hebben. Door de activiteit van bepaalde Actinobacteriën tegen de tarwepathogenen: *Fusarium graminearum*, *Blumeria graminis* en *Zymoseptoria tritici* te onderzoeken, kon een antwoord geformuleerd worden op de onderzoeksvragen.

Algemeen tonen de resultaten aan dat dat *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG5984 en *S. rimosus* subsp. *rimosus* LMG19352 potentieel hebben als biocontrole organismen tegen *F. graminearum* en *Z. tritici*. Ook kwam uit de fytoxiciteit experimenten dat deze twee Actinobacteriën op zichzelf al een positieve invloed uitoefende op de gezondheid van het tarweblad. De assay die onderzocht of de Actinobacteriën ook een invloed hadden op de ontwikkeling van *B. graminis* op tarwe, was mislukt en kan dus geen inzichten bieden.

Wel moet er nog extra onderzoek verricht worden naar het gebruik van Actinobacteriën als biocontrole organisme. Toekomstig onderzoek zou zich moeten richten op het herhalen van *in planta* proeven, het onderzoeken van de werkingsmechanismen van deze bacteriën, het verkennen van interacties met andere micro-organismen en het evalueren van de langetermijneffecten op bodem- en plantengezondheid. Dit alles is essentieel voor de ontwikkeling van effectieve biocontrole strategieën in de landbouw.

7 REFERENTIES

- Abbasi, S., Safaie, N., Sadeghi, A., & Shamsbakhsh, M. (2019). Streptomyces strains induce resistance to Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici race 3 in tomato through different molecular mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 10, 451446.
- Akbari, A., Gharanjik, S., Koobaz, P., & Sadeghi, A. (2020). Plant growth promoting Streptomyces strains are selectively interacting with the wheat cultivars especially in saline conditions. *Heliyon*, 6(2).
- Audenaert, K., Vanheule, A., Höfte, M., & Haesaert, G. (2013). Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of Fusarium to its environment. *Toxins*, 6(1), 1–19.
- Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual review of plant biology*, 59, 89.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & Wezel, G. P. v. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Basandrai, A. K., Mehta, A., & Basandrai, D. (2023). Virulence structure of wheat powdery mildew pathogen, Blumeria graminis tritici: a review. *Indian Phytopathology*, 76(1), 21-45.
- Brauer, E. K., Subramaniam, R., & Harris, L. J. (2020). Regulation and Dynamics of Gene Expression During the Life Cycle of Fusarium graminearum. *Phytopathology*[®], 110(8), 1368-1374.
- Bellincampi, D., Cervone, F., & Lionetti, V. (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 5, p. 228. Retrieved from
- Carisse, O. (2010). *Fungicides*. InTech
- Chen, X. (2020). Pathogens which threaten food security: Puccinia striiformis, the wheat stripe rust pathogen. *Food Security*, 12(2), 239-251.
- Chen, X. M. (2005). Epidemiology and control of stripe rust [Puccinia striiformis f. sp. tritici] on wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27(3), 314-337.
- Cole G.T & Hoch H.C. (1991). Adhesion of Fungi to the Plant Surface. The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals, pp. 3-13. New York : Springer Science+Business Media.
- Corrêa, B. O., Moura, A. B., Denardin, N. d. Á., Soares, V. N., Schäfer, J. T., & Ludwig, J. (2008). Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de Colletrichum Lindemuthianum (Saac e Magn). *Revista Brasileira de Sementes*, 30, 156-163.
- Das, P., Singh, S. K., Singh, P., Zeyad, M. T., Aamir, M., & Upadhyay, R. S. (2021). Chapter 15 - Actinomycetes as biostimulants and their application in agricultural practices. In J. White, A. Kumar, & S. Droby (Eds.), *Microbiome Stimulants for Crops* (pp. 267-282). Woodhead Publishing.

- De Maeyer, T. (2021). Optimalisatie en gebruik van het Zymoseptoria-tarwe pathosysteem voor het testen van nieuwe biocontrole organismen.
- De Mets, L., Audenaert, K., & De Gelder, L. (2018). Actinobacteria vs. Fusarium: Battle of the toxins. 17th International symposium on Microbial Ecology (ISME-17)
- Deroo, W., De Troyer, L., Dumoulin, F., De Saeger, S., De Boevre, M., Vandenabeele, S., De Gelder, L., & Audenaert, K. (2022). A Novel In Planta Enrichment Method Employing Fusarium graminearum-Infected Wheat Spikes to Select for Competitive Biocontrol Bacteria. *Toxins*, 14(3), 222.
- Dimkpa, C., Svatoš, A., Merten, D., Büchel, G., & Kothe, E. (2008). Hydroxamate siderophores produced by Streptomyces acidiscabies E13 bind nickel and promote growth in cowpea (Vigna unguiculata L.) under nickel stress. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(3), 163-172.
- Dweba, C. C., Figlan, S., Shimelis, H. A., Motaung, T. E., Sydenham, S., Mwadzingeni, L., & Tsilo, T. J. (2017). Fusarium head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*, 91, 114-122.
- Ebrahimi-Zarandi, M., Saberi Riseh, R., & Tarkka, M. T. (2022). Actinobacteria as Effective Biocontrol Agents against Plant Pathogens, an Overview on Their Role in Eliciting Plant Defense. *Microorganisms*, 10(9), 1739. MDPI AG. Retrieved from
- European Commission. (2020). *The European Green Deal*.
- Endgen, K., & Deising, H. (1993). Infection structures of fungal plant pathogens – a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist*, 124(2), 193-213.
- Fantke, P., Charles, R., Alencastro, L. F. d., Friedrich, R., & Jolliet, O. (2011). Plant uptake of pesticides and human health: Dynamic modeling of residues in wheat and ingestion intake. *Chemosphere*, 85(10), 1639-1647.
- Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 3-7.
- Gaber, Y., Mekasha, S., Vaaje-Kolstad, G., Eijsink, V. G. H., & Fraaije, M. W. (2016). Characterization of a chitinase from the cellulolytic actinomycete Thermobifida fusca. *Biochimica et Biophysica Acta BBA) - Proteins and Proteomics*, 1864(9), 1253-1259.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 205–227.
- Goswami, R. S., & Kistler, H. C. (2004). Heading for disaster: Fusarium graminearum on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5(6), 515-525.
- Gould, K. S. (2004). Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2004(5), 314-320.
- Gurr, G. M., Wratten, S. D., & Snyder, W. E. (2017). *Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems*. Annual Review of Entomology, 63, 125-146.

- Hong, C. E., Jeong, H., Jo, S. H., Jeong, J. C., Kwon, S. Y., An, D., & Park, J. M. (2016). A leaf-inhabiting endophytic bacterium, *Rhodococcus* sp. KB6, enhances sweet potato resistance to black rot disease caused by *Ceratocystis fimbriata*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(3), 488-492.
- Hovmøller, M. S., Sørensen, C. K., Walter, S., & Justesen, A. F. (2011). Diversity of *Puccinia striiformis* on Cereals and Grasses. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 197-217.
- Ibaraki, Y., & Murakami, J. (2007). Determination of chlorophyll fluorescence parameter Fv/Fm within individual plants under various stress conditions.
- Jacquet, F., Jeuffroy, M.-H., Jouan, J., Le Cadre, E., Litrico, I., Malausa, T., Reboud, X., & Huyghe, C. (2022). Pesticide-free agriculture as a new paradigm for research. *Agronomy for Sustainable Development*, 42(1), 8.
- Jansen, C., Von Wettstein, D., Schäfer, W., Kogel, K.-H., Felk, A., & Maier, F. J. (2005). Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(46), 16892-16897.
- Jørgensen, L. N., Matzen, N., Heick, T. M., O'Driscoll, A., Clark, B., Waite, K., Blake, J., Glazek, M., Maumene, C., & Couleaud, G. (2022). Shifting sensitivity of septoria tritici blotch compromises field performance and yield of main fungicides in Europe. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1060428.
- Kaur, S., Samota, M. K., Choudhary, M., Choudhary, M., Pandey, A. K., Sharma, A., & Thakur, J. (2022). How do plants defend themselves against pathogens-Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and molecular biology of plants : an international journal of functional plant biology*, 28(2), 485-504.
- Kaur, T., Khanna, K., Sharma, S., & Manhas, R. K. Mechanistic insights into the role of actinobacteria as potential biocontrol candidates against fungal phytopathogens. *Journal of Basic Microbiology*, n/a(n/a).
- Keller, M. D., Bergstrom, G. C., & Shields, E. J. (2014). The aerobiology of *Fusarium graminearum*. *Aerobiologia*, 30(2), 123-136.
- Khanfri, S., Boulif, M., & Lahlali, R. (2018). Yellow rust (*Puccinia striiformis*): a serious threat to wheat production worldwide. *Notulae Scientia Biologicae*, 10(3), 410-423.
- Kirikyali, N., Diez, P., Luo, J., Hawkins, N., & Fraaije, B. (2017). Azole and SDHI sensitivity status of *Zymoseptoria tritici* field populations sampled in France, Germany and the UK during 2015. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VIII*, 153-158.
- Kleczewski, N. M., Butts-Willmsmeyer, C., & Scanlan, C. (2020). Assessing the curative and protective impacts of select fungicides for control of powdery mildew of wheat. *Plant disease*, 104(4), 1195-1200.
- Kubicek, C. P., Starr, T. L., & Glass, N. L. (2014). Plant Cell Wall-Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 427-451.

- Leplat, J., Friberg, H., Abid, M., & Steinberg, C. (2013). Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 33(1), 97-111.
- LyngkjÆR, M. F., & Carver, T. L. W. (1999). Induced accessibility and inaccessibility to *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* in barley epidermal cells attacked by a compatible isolate. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(3), 151-162.
- Mariutto, M., Duby, F., Adam, A., Bureau, C., Fauconnier, M.-L., Ongena, M., Thonart, P., & Dommes, J. (2011). The elicitation of a systemic resistance by *Pseudomonas putida*BTP1 in tomato involves the stimulation of two lipoxygenase isoforms. *BMC Plant Biology*, 11(1), 29.
- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J., & Křen, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35(1), 162-177.
- Matsumura, F. (2012). *Biodegradation of pesticides*. Springer Science & Business Media.
- Meng, L., Mestdagh, H., Ameye, M., Audenaert, K., Höfte, M., & Van Labeke, M.-C. (2020). Phenotypic variation of *Botrytis cinerea* isolates is influenced by spectral light quality. *Frontiers in Plant Science*, 11, 557728.
- Mentges, M., Glasenapp, A., Boenisch, M., Malz, S., Henrissat, B., Frandsen, R. J., Güldener, U. Münsterkötter, M., Bormann, J., & Lebrun, M. H. (2020). Infection cushions of *Fusarium graminearum* are fungal arsenals for wheat infection. *Molecular Plant Pathology*, 21(8), 1070-1087.
- Palaniyandi, S. A., Yang, S. H., Zhang, L., & Suh, J.-W. (2013). Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22), 9621-9636.
- Perfect, S. E., & Green, J. R. (2001). Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 2(2), 101-108.
- Poojarani, S., Krishnaraj, P., Patil, C., Biradar, S., & Kumar, A. (2023). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria
- Rana, V., Batheja, A., Sharma, R., Rana, A., & Priyanka. (2022). Powdery Mildew of Wheat: Research Progress, Opportunities, and Challenges. In P. L. Kashyap, V. Gupta, O. Prakash Gupta, R. Sendhil, K. Gopalareddy, P. Jasrotia, & G. P. Singh (Eds.), *New Horizons in Wheat and Barley Research : Crop Protection and Resource Management* (pp. 133-178). Springer Nature Singapore.
- Ranjani, A., Dhanasekaran, D., & Gopinath Ponnusamy, M. (2016). An Introduction to Actinobacteria. In D. Dharumadurai & J. Yi (Eds.), *Actinobacteria* (pp. Ch. 1). IntechOpen.
- Ruparathna, U., Sirisena, D. N., Hettiarachchi, G. M., & Bandara, J. M. R. S. (2018). Pesticide residues in fruits and vegetables: Characteristics and health risk assessment. *Chemosphere*, 202, 214-221.
- *Saaten Union*. (n.d.). www.benelux.saaten-union.com.
- Sabaou, N., Bounaga, N., & Bounaga, D. (1983). Actions antibiotique, mycolytique et parasitaire de deux actinomycètes envers *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et autres formae speciales. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(2), 194-199.

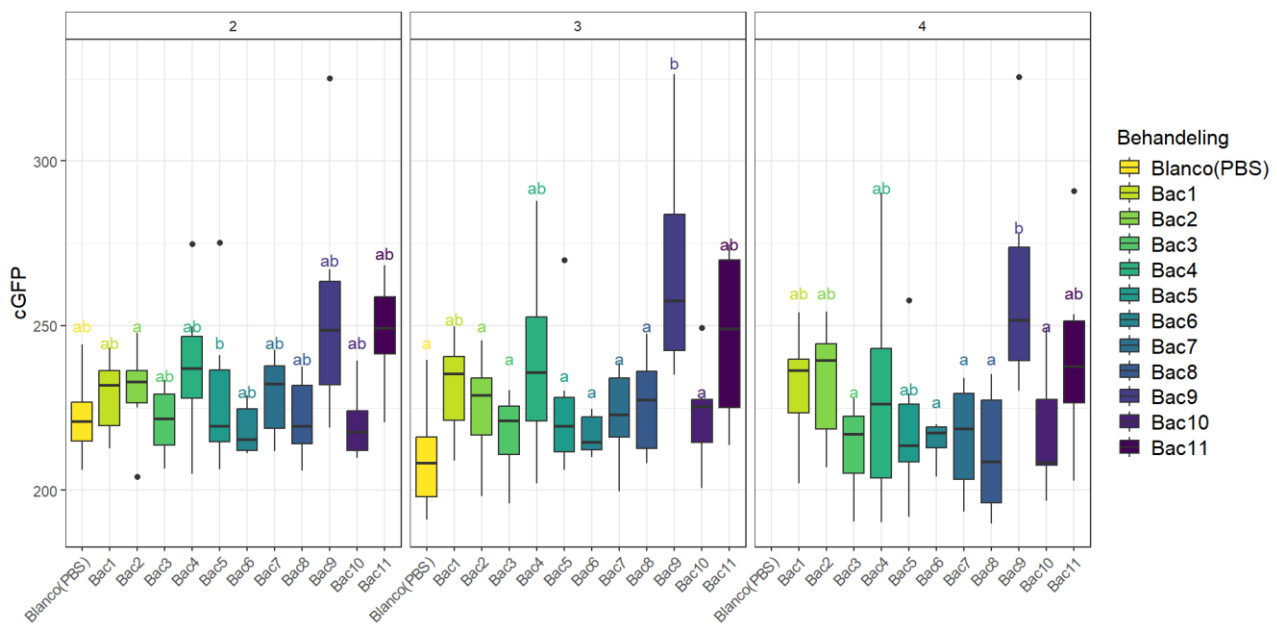
- Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., & Casas-Flores, S. (2011). Colonization of Arabidopsis roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology*, *131*, 15-26.
- Sathya, A., Vijayabharathi, R., & Gopalakrishnan, S. (2017). Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *3 Biotech*, *7*, 1-10.
- Savat, J. (2019). Beeldverwerking voor high-throughput beeldanalyse van multi-well platen.
- Seong, K.-Y., Zhao, X., Xu, J.-R., Güldener, U., & Kistler, H. C. (2008). Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, *45*(4), 389-399.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*, *189*(23), 8746-8749.
- Shah, L., Ali, A., Yahya, M., Zhu, Y., Wang, S., Si, H., Rahman, H., & Ma, C. (2018). Integrated control of fusarium head blight and deoxynivalenol mycotoxin in wheat. *Plant Pathology*, *67*(3), 532-548.
- Sharma, V., & Salwan, R. (2018). Chapter 6 - Biocontrol Potential and Applications of Actinobacteria in Agriculture. In B. P. Singh, V. K. Gupta, & A. K. Passari (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 93-108). Elsevier.
- Shrivastava, P., & Kumar, R. (2018). Chapter 5 - Actinobacteria: Eco-Friendly Candidates for Control of Plant Diseases in a Sustainable Manner. In B. P. Singh, V. K. Gupta, & A. K. Passari (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 79-91). Elsevier.
- Steinberg, G. (2015). Cell biology of *Zygomycota tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genetics and Biology*, *79*, 17-23.
- Stes, E., Vandeputte, O. M., El Jaziri, M., Holsters, M., & Vereecke, D. (2011). A successful bacterial coup d'état: how *Rhodococcus fascians* redirects plant development. *Annual Review of Phytopathology*, *49*, 69-86.
- Tan, J., De Zutter, N., De Saeger, S., De Boevre, M., van der Lee, T., Waalwijk, C., Willems, A., Vandamme, P., Ameye, M., & Audenaert, K. (2021). Presence of the weakly pathogenic *Fusarium poae* in the *Fusarium* Head Blight disease complex hampers biocontrol and chemical control of the virulent *Fusarium graminearum* pathogen. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 641890.
- Talbot, N. (2004), *Plant-Pathogen Interactions*, Blackwell publishing
- Trejo-Estrada, S. R., Paszczynski, A., & Crawford, D. L. (1998). Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *21*(1-2), 81-90.
- Tucker, S. L., & Talbot, N. J. (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, *39*(1), 385-417.
- Turkington, T., Petran, A., Yonow, T., & Kriticos, D. (2017). *Fusarium graminearum* Pest Geography.

- Wang, Z., Wang, C., Li, F., Li, Z., Chen, M., Wang, Y., Qiao, X., & Zhang, H. (2013). Fumigant activity of volatiles from *Streptomyces alboflavus* TD-1 against *Fusarium moniliforme* Sheldon. *Journal of Microbiology*, 51(4), 477-483.
- Wang, X., Zhang, M., Gao, J., Pu, T., Bilal, M., Wang, Y., & Zhang, X. (2018). Antifungal activity screening of soil actinobacteria isolated from Inner Mongolia, China. *Biological Control*, 127, 78-84.
- Xia, Q., Tang, H., Fu, L., Tan, J., Govindjee, G., & Guo, Y. (2023). Determination of Fv/Fm from Chlorophyll Fluorescence without Dark Adaptation by an LSSVM Model. *Plant Phenomics*, 5, 0034.
- Yadav, A. N., Verma, P., Kumar, S., Kumar, V., Kumar, M., Sugitha, T. C. K., Singh, B. P., Saxena, A. K., & Dhaliwal, H. S. (2018). Actinobacteria from rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications. In *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering* (pp. 13-41). Elsevier.
- Yu, J., Liu, Q., Chen, C., & Qi, X. (2017). Antifungal activity change of *Streptomyces rimosus* MY02 mediated by confront culture with other microorganism. *Journal of Basic Microbiology*, 57(3), 276-282.
- Zhang, Y. J., Xie, Z. K., Wang, Y. J., Su, P. X., An, L. P., & Gao, H. (2011). Effect of water stress on leaf photosynthesis, chlorophyll content, and growth of oriental lily. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(5), 844-850.
- Zhu, M. (2020). Germination and differentiation of *Blumeria graminis* ascospores and effects of UV-C and white light irradiation on *B. graminis* conidial prepenetration
- Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C. A., Imfeld, G., Knäbel, A., Payraudeau, S., Rasmussen, J. J., Rohr, J., Scharmüller, A., Smalling, K., Stehle, S., Schulz, R., & Schäfer, R. B. (2019). Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? *Environmental Science & Technology*, 53(7), 3347-3365.

BIJLAGES

Bijlage 1

cGFP-parameter bij de fytoxiciteit resultaten van de detached leaf assay met *F. graminearum*

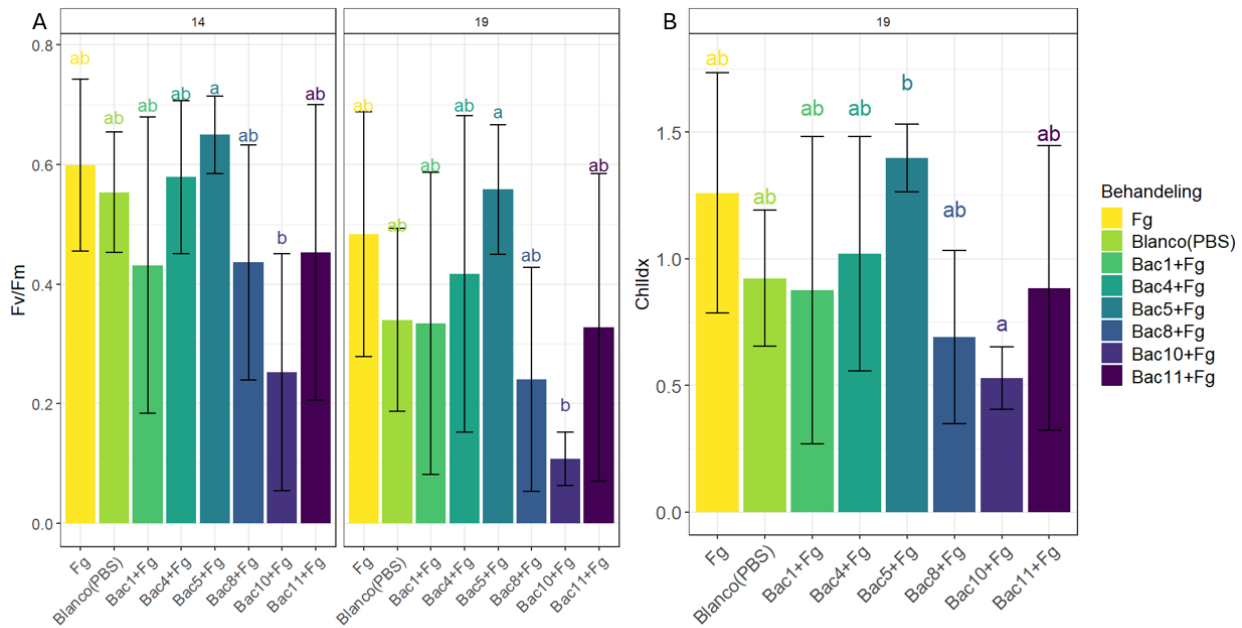


Figuur 29. Boxplots van de resultaten van de parameter cGFP van de blanco en negatieve controles op dag 2, 3 en 4 bij de detached leaf assay met *F. graminearum*

De cGFP-parameter is heel belangrijk bij de geïnfecteerde behandelingen, maar minder bij de negatieve controles en blanco controle. Dit omdat cGFP niet voorkomt in gebruikte Actinobacteriën en enkel zou mogen voorkomen in het cGFP-gelabeld *F. graminearum* waarmee we werken bij de infectie. Wel is er achtergrondruis die kan zorgen voor significant verschillen, maar telkens met kleine p-waarden.

Bijlage 2

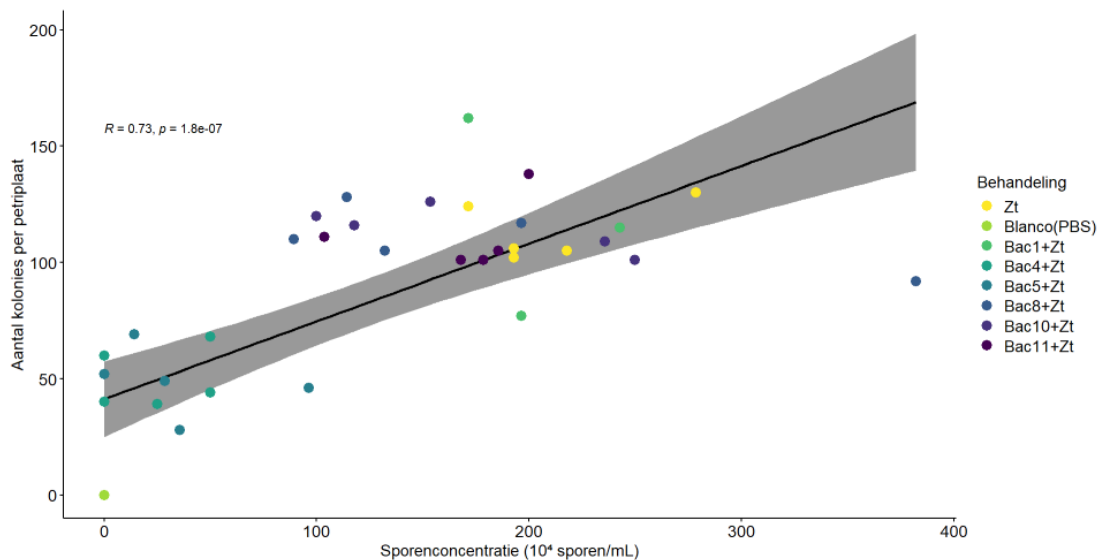
Boxplots van de parameters op dagen waarbij significante verschillen werden waargenomen van de parameters Fv/Fm en ChlDx bij de detached aer assay met *F. graminearum*



Figuur 30. Barplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm (A) en ChlDx (B) bij de behandeling van *F. graminearum* met de subset Actinobacteriën (BacX+Fg), de blanco controle behandeling en de positieve geïnfecteerde behandeling (Fg) op dag 14 en 19 bij de detached aer assay met *F. graminearum*

Bijlage 3

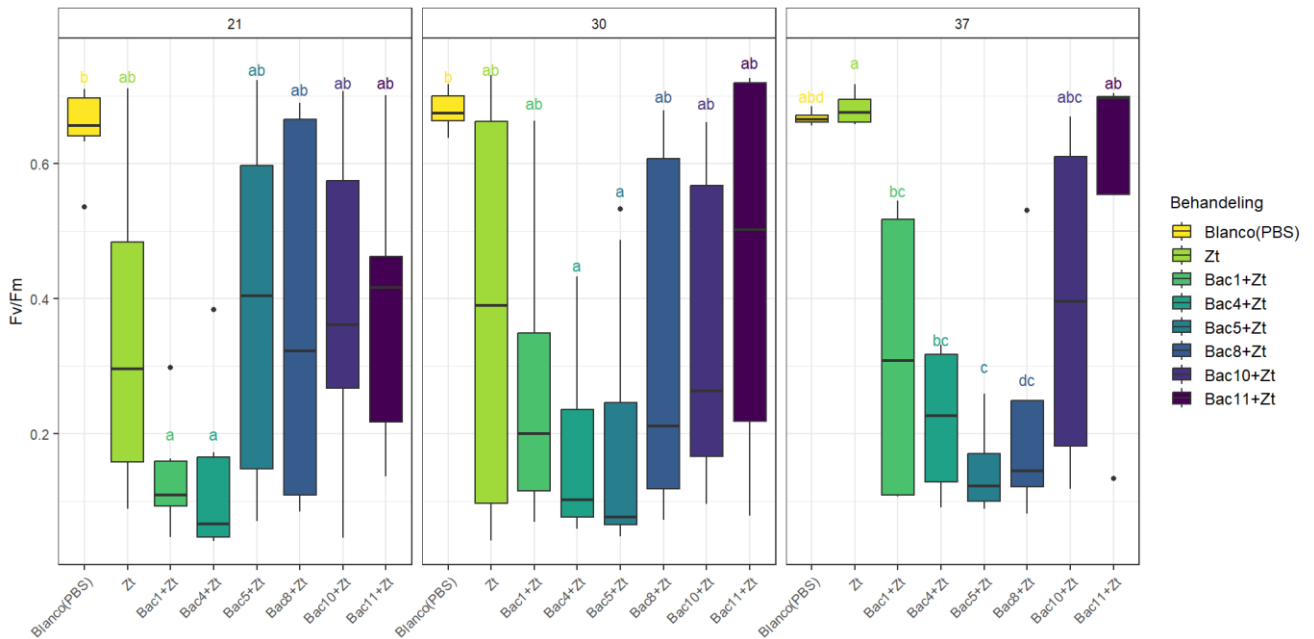
Correlatiegrafiek tussen aantal KVE en sporenconcentratie per behandeling bij de *in vitro* plate assay met *Z. tritici* methode 3



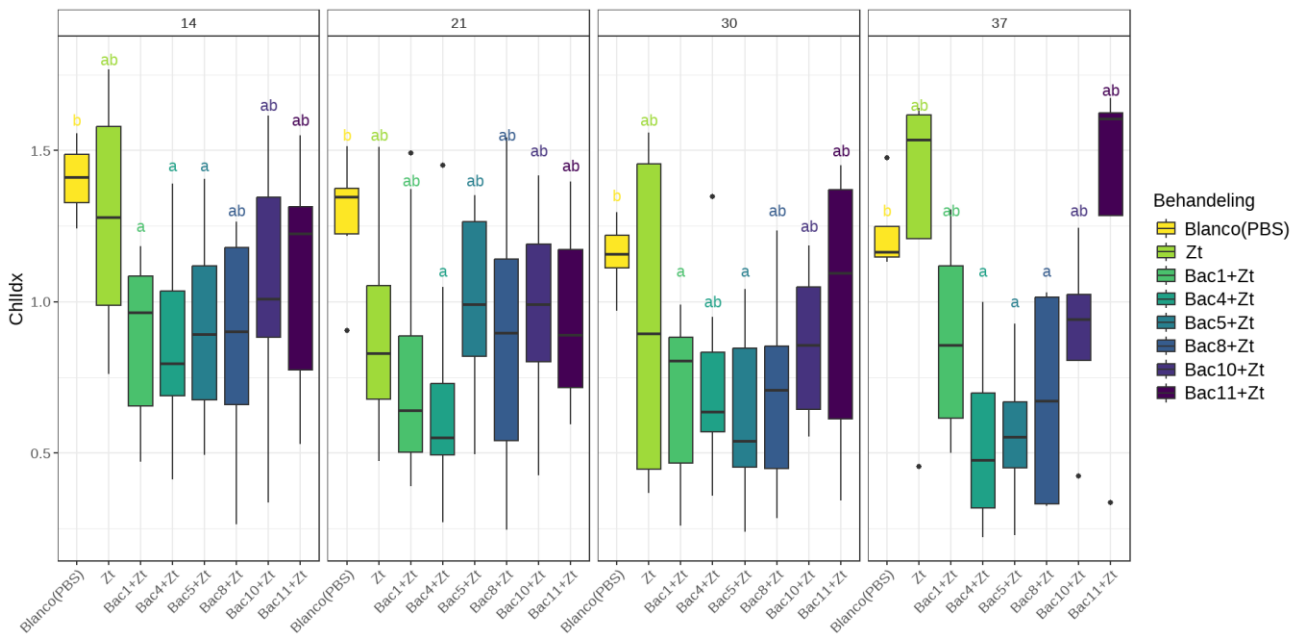
Figuur 31. Correlatieplot tussen het aantal kolonies per petriplaat en de sporenconcentratie bij de *in vitro* plate assay methode 3. R = correlatiecoëfficiënt en p is het significantieniveau

Bijlage 4

Boxplots van de parameters op dagen waarbij significante verschillen werden waargenomen van de parameters Fv/Fm en Chldx bij de whole leaf assay met *Z. tritici*



Figuur 32. Boxplots van de resultaten van de parameter Fv/Fm bij de behandeling van *Z. tritici* met de verschillende Actinobacteriën (BacX+Zt), de blanco controle en de positieve geïnfecteerde controle (Zt) op dag 21, 30 en 37 bij de whole leaf assay met *Z. tritici*



Figuur 33. Boxplots van de resultaten van de parameter Chldx bij de behandeling van *Z. tritici* met de verschillende Actinobacteriën (BacX+Zt), de blanco controle en de positieve geïnfecteerde controle (Zt) op dag 14, 21, 30 en 37 bij de whole leaf assay met *Z. tritici*