



Plantengroeistimulerende bacteriën bij verlaagde kastemperatuur

Energieprogramma PT/LNV

Joeke Postma & Chula Hok-A-Hin





Plantengroeistimulerende bacteriën bij verlaagde kastemperatuur

Energieprogramma PT/LNV

Joeke Postma & Chula Hok-A-Hin

© 2008 Wageningen, Plant Research International B.V.

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

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld. Bij toezending wordt een factuur toegevoegd; de kosten (incl. verzend- en administratiekosten) bedragen € 50 per exemplaar.

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 – 48 01 00
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
1. Inleiding	3
1.1 Achtergrond	3
1.2 Micro-organismen op het wortelstelsel	3
1.3 Informatie over groeistimulerende bacteriën	4
1.4 Doelstelling van het project	5
1.5 Aanpak van het onderzoek	5
2. Verzamelen van isolaten	7
2.1 Inleiding	7
2.2 Materiaal en methode	7
2.3 Resultaten	8
2.4 Samengevat	9
3. Selectie in kiemplantentoets	11
3.1 Inleiding	11
3.2 Materiaal en methode	11
3.3 Resultaten	12
3.4 Samengevat	13
4. Plantentoets met de MIPS	15
4.1 Inleiding	15
4.2 Materiaal en methode	15
4.3 Resultaten	16
4.4 Samengevat	17
5. Identificatie van isolaten	19
5.1 Inleiding	19
5.2 Materiaal en methode	19
5.3 Resultaten	19
5.4 Samengevat	19
6. Plantentoets in de kas	21
6.1 Inleiding	21
6.2 Materiaal en methode	21
6.3 Resultaten	22
6.4 Samengevat	26

7.	Discussie	27
7.1	Conclusie t.a.v. selectieprocedure	27
7.2	Perspectieven - Is het isolaat goed genoeg?	27
7.3	Extra informatie over de geselecteerde isolaten	28
7.4	Hoe verder?	28
	Referenties	29
Bijlage I.	Overzicht data kiemplantentoets	4 pp.
Bijlage II.	Metingen met de MIPS	2 pp.

Samenvatting

Vanuit het energieprogramma wordt onderzoek gefinancierd door het Productschap Tuinbouw en het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit om energie in de glastuinbouw te besparen. Eén van de mogelijkheden is om in de winter gewassen bij verlaagde temperaturen te telen. Bij een gemiddelde verlaging van de kastemperatuur met 1 °C de in komkommer-, tomaten- en paprikateelt, wordt de energiebesparing geschat op 6,5 m³ brandstof/ m² (ca. 10 % besparing van verbruik). Dit levert echter stress en groeiachterstand op bij het gewas. Door toepassing van geschikte micro-organismen wordt verwacht dat planten beter onder dergelijke stressomstandigheden kunnen groeien. Dergelijke micro-organismen zijn echter niet zomaar beschikbaar voor de Nederlandse kasgewassen. In dit onderzoeksproject (PT nr. 12419) zal daarom gezocht worden naar micro-organismen die groeiverbeteringen geven bij onder verlaagde (suboptimale) temperaturen geteelde tomaat en komkommer.

Het oppervlak van plantenwortels bevat veel micro-organismen, ook in substraatteelt. Het gaat hierbij om zo'n 100.000.000 bacterie cellen per gram wortel. Ze vervullen vele belangrijke functies, zoals afbreken van organische stoffen tot voor de plant opneembare mineralen, concurrentie met schadelijke micro-organismen zoals ziekteverwekkers, maar ook productie van enzymen of plantenhormonen die plantengroei kunnen stimuleren. Vanwege de schone start in substraatteelten, bevatten de voedingsoplossing, het substraat en het plantgoed in het begin van een teelt slechts een geringe diversiteit aan micro-organismen. De kans dat nuttige en plantgeassocieerde micro-organismen aanwezig zijn, is daardoor klein. Het heeft daarom waarschijnlijk zin om dergelijke nuttige micro-organismen aan het begin van een teelt bewust in te brengen.

In het hier beschreven onderzoek zijn stapsgewijs bacteriën geselecteerd met het oog op bovenstaand doel. Uit een microbiële divers substraat, zijn ruim 200 bacteriën geïsoleerd die op wortels van tomaat en komkommer kunnen groeien, en die de belangrijkste wortel-exudaten (citraat en succinaat) als koolstofbron kunnen gebruiken. Vervolgens zijn deze 200 bacteriën in een kiemtoets met tomaat bij 20 °C gescreend op hun vermogen om blad- en wortellengte te vergroten direct na kieming. Van de 10 beste isolaten is het effect op plantengroei gedurende 25 dagen in een klimaatcel bij 20 °C vervolgd. Hieruit zijn de 2 meest belovende isolaten geselecteerd en in vier kasproeven met suboptimale temperatuur gevalideerd.

Één isolaat bleek herhaaldelijk plantengroei te stimuleren. Het betrof het isolaat T5.3, een *Rhizobium* soort. Bij kastemperaturen van 18 à 20 °C waren bladoppervlak, spruitgewicht en plantlengte ca 5 à 10 % hoger door toevoeging van deze bacterie. Dit positieve resultaat werd in 3 van de 4 experimenten gevonden; 2 maal bij komkommer, en 1 maal bij tomaat. Eén van de tomatenexperimenten vertoonde na 35 dagen een licht positief, maar na 42 dagen een negatief resultaat op de groei van tomaat.

Het isolaat 4.57 gaf in geen van de kasexperimenten groeiverbetering, terwijl in voorafgaande kleinschaliger proeven wel positieve effecten op groei aanwezig waren.

Isolaat 4.56 gaf zeer goede resultaten in de kleinschaliger proeven, maar is niet meegenomen in validatieproeven in de kas wegens ruimtegebrek.

Conclusie

Uit 200 bacteriën die van tomaten- en komkommerwortels afkomstig zijn, is uiteindelijk één bacterie geselecteerd waarvan verwacht wordt dat hij plantengroei kan stimuleren bij verlaagde kastemperaturen. Deze bacterie liet in 3 van de 4 kasproeven een groeistimulering van 5 à 10 % zien bij een suboptimale temperatuur. Het mechanisme hiervan is vooralsnog onbekend. Ook de omstandigheden waaronder de bacterie groeistimulering geeft zijn nog niet bekend (temperatuurrange, lichtconditie, cultivars). In de tot nu toe uitgevoerde proeven is slechts één manier van toedienen toegepast. Het betrof steeds een eenmalige toevoeging en een relatief lage dosis van de bacterie (2 x 10⁵ cellen/ml). Optimalisatie in de toedieningswijze lijkt daarom reëel.

1. Inleiding

1.1 Achtergrond

In de moderne kasteelten in Nederland zijn vooral de fysische en chemische teeltfactoren geoptimaliseerd. Biologische factoren, zoals de aanwezige micro-organismen in het wortelmilieu, zijn relatief onderbelicht. Toch is het bekend dat micro-organismen in het wortelmilieu van planten van groot belang zijn. Zij gebruiken wortellexudaten en dode plantencellen, en scheiden vervolgens allerlei stoffen uit die nuttig kunnen zijn voor de plant. Gunstige effecten voor de plant zijn:

1. de productie van enzymen of plantenhormonen zoals auxines en gibberalines,
2. concurrentie met schadelijke micro-organismen zoals plantenziekten,
3. afbraak van organische stoffen tot voor de plant opneembare mineralen, en
4. voedingsstoffen beschikbaar maken door bijvoorbeeld stikstof te binden of fosfaat te mobiliseren.

Kasteelten beginnen veelal met een weinig diverse microflora, omdat met schone substraten (steenwol, perliet, potgrond, gestoomde grond, etc.) gestart wordt. Dit heeft gevolgen voor de diversiteit van de aanwezige microflora in het wortelmilieu. De kans dat er specifieke plantgeassocieerde micro-organismen die nuttig zijn voor plantengroei vanaf de start van een teelt aanwezig zijn, is gering. Daarom kan het bewust toevoegen van geschikte micro-organismen juist in substraatteelten heel effectief zijn voor de verbetering van gewasgroei.

Vanuit het energieprogramma wordt onderzoek gefinancierd om energie in de glastuinbouw te besparen. Eén van de mogelijkheden is om in de winter gewassen bij suboptimale temperaturen te telen. Bij een gemiddelde verlaging van de kastemperatuur met 1 °C in komkommer-, tomaten- en paprikateelt, wordt de energiebesparing geschat op 6,5 m³ brandstof/ m² (ca. 10 % besparing van verbruik). Dit levert echter stress en groeiachterstand op bij het gewas. Door toepassing van geschikte micro-organismen wordt verwacht dat planten beter onder dergelijke stressomstandigheden kunnen groeien. Dergelijke micro-organismen zijn echter niet zomaar beschikbaar voor de Nederlandse kasgewassen. In dit onderzoeksproject zal daarom gezocht worden naar micro-organismen die groeiverbeteringen geven bij onder suboptimale temperaturen geteelde tomaat en komkommer.

In dit project, zal de focus liggen op micro-organismen die:

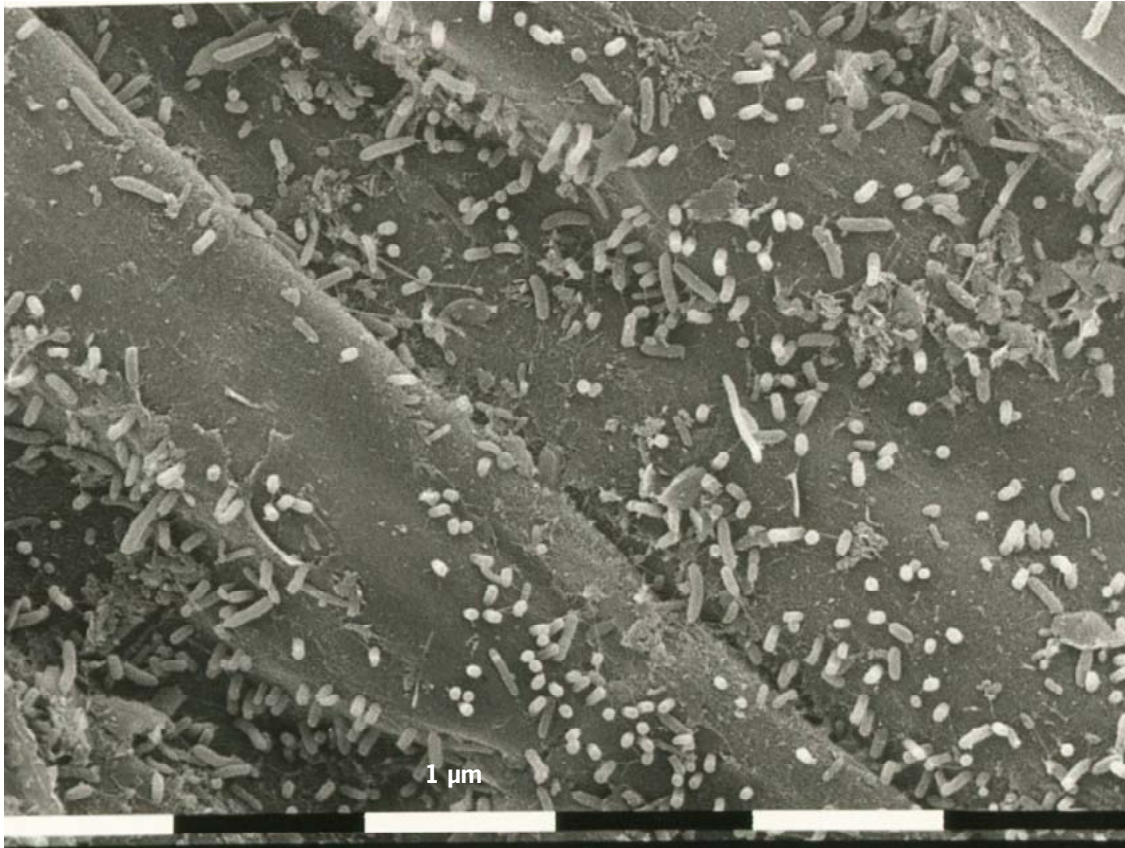
- plantengroei bevorderen of sturen via plantenhormonen,
- stresstolerantie van planten verhogen.

Nutriënten zijn in principe optimaal aanwezig in substraatteelten en micro-organismen die verantwoordelijk zijn voor ziektevermindering worden in gewasbeschermingsprojecten onderzocht. Deze beide onderwerpen komen daarom niet aan bod in het hier beschreven project.

1.2 Micro-organismen op het wortelstelsel

Het oppervlak van plantenwortels bevat veel micro-organismen, ook in substraatteelt. Het gaat hierbij om zo'n 100.000.000 cellen per gram wortel. Zoals in paragraaf 1.1 genoemd, vervullen ze vele belangrijke functies. Onderstaande figuur laat het grote aantal bacteriën op het oppervlak van een komkommerwortel die is gegroeid in steenwol zien. De bacteriën gebruiken de uitscheidingsproducten (exudaten) van de wortels om van te groeien.

In grond is het aantal verschillende soorten bacteriën immens. Dit wordt geschat op 10.000 verschillende soorten per gram grond. In substraatteelten die schoon starten, is de diversiteit veel geringer. Helemaal aan het begin van een teelt zijn er maar een paar soorten, en in de loop van de tijd neemt dit aantal toe doordat bacteriën van buitenaf in het systeem terecht komen.



Figuur 1. Bacteriën op het oppervlak van een komkommerwortel gegroeid in steenwol.

1.3 Informatie over groeistimulerende bacteriën

Er zijn diverse bacteriesoorten bekend die plantengroei beïnvloeden via plantenhormonen zoals auxines, cytokinines en gibberalines, de productie van enzymen of vitaminen. Stimulering van de plantengroei kan wel 50-70% bedragen (Lucy *et al.*, 2004). Probleem is echter dat de resultaten vaak inconsistent zijn. In een recent literatuuroverzicht van Lucy *et al.* (2004) staan zeer vele voorbeelden met een groot aantal isolaten van verschillende bacteriegeslachten, zoals *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*. Het gaat echter vaak om gewassen die in grond geteeld worden, en maar zeer sporadisch over groentegewassen op substraat. De effecten zijn over het algemeen vooral zichtbaar bij jonge planten.

Er zijn verschillende bacteriesoorten waarvan groeistimulering wordt geclaimd. Een greep uit de literatuur:

- *Azospirillum brasilense* FT326 produceert idoolazijnzuur (Ribaud *et al.*, 2006) en ook *A. brasilense* Cd en Az39 maken verschillende enzymen (Perrig *et al.*, 2007).
- *Azospirillum lipoferum* N7 bindt stikstof en produceert idoolazijnzuur (Mehnaz & Lazarovits, 2006).
- *Bacillus subtilis* FZB24 heeft een cytokinine- en auxineachtig effect: gezondere wortelgroei en groeistimulering (Kilian *et al.*, 2000).
- *Bacillus cereus* UW85 produceert zwittermycin en kan plantengroei sturen (Selvadurai *et al.*, 1991).
- *Bacillus pumilus* INR-7 produceert idoolazijnzuur en stimuleert wortelademhaling, wortelbiomassa, wortellengte, zijwortelvorming (Vonderwell *et al.*, 2001).
- *Paenibacillus polymyxa* produceert idoolazijnzuurachtige verbindingen (Lebuhn *et al.*, 1997).
- *Pseudomonas putida* CQ179C stimuleerde plantengroei van maïs (Mehnaz & Lazarovits, 2006).
- *Pseudomonas spp.* veroorzaakt groeiverbetering in tomaat en komkommer in hydroponics, mogelijk door onderdrukking van schadelijke micro-organismen in de endorhizosfeer (Van Peer & Schippers, 1989).

Bacteriën kunnen planten ook beschermen tegen stress, of juist plantengroei stimuleren onder bepaalde stress omstandigheden. Geclaimde effecten van *Methylobacterium* spp. zijn: betere kieming, verbeterde zaadzetting, bescherming tegen droogte stress, verbeterde groei en hogere opbrengsten. Deze effecten treden vooral op in aanwezigheid van stressfactoren. De mechanismen verantwoordelijk voor deze effecten zijn: productie van fytohormonen (het cytokinine zeatine, soms indoolazijnzuur), afbraak van methanol, stimulering plantresistentie (Holland & Polacco, 1994; Omer *et al.*, 2004; Madhaiyan *et al.*, 2005).

Een isolaat van *Achromobacter piechaudii* stimuleerde de groei van tomaten indien geteeld onder zoutstress (Mayak *et al.*, 2004). Het beschreven mechanisme hiervan is de productie van 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, waarmee ACC, een precursor voor ethyleen, gemetaboliseerd wordt. De bacterie reduceert hierdoor de ethyleenproductie die de tomatenzaailingen onder stress produceren. Ook *Burkholderia phytofirmans* heeft sterke activiteit van dit ACC deaminase enzym, waarmee het ethyleenniveau van gestreste planten verlaagt (Ait Barka *et al.*, 2006). Ook bij suboptimale belichting kunnen bacteriën helpen: *Pseudomonas fluorescens* isolaat 63-28 stimuleerde de groei van tomatenplanten bij lichtgebrek tijdens de herfst (Gagné *et al.*, 1993). De oogst nam 13-18 % toe.

Het lijkt daarom aannemelijk dat er bacteriën geselecteerd kunnen worden die in associatie met plantenwortels kunnen zorgen voor:

- verbeterde zaadkieming,
- stimulering van wortelhaarontwikkeling,
- stimulering van stengel en bladgroei,
- bloei-inductie,
- bloem en vruchtgroei,
- betere groei onder stress.

1.4 Doelstelling van het project

Het doel van dit project is om veilige micro-organismen te selecteren die kasgewassen helpen bij de groei onder verlaagde (suboptimale) temperaturen, zodat kasgewassen in het winterseizoen enkele graden koeler geteeld kunnen worden met gelijkblijvende opbrengst.

1.5 Aanpak van het onderzoek

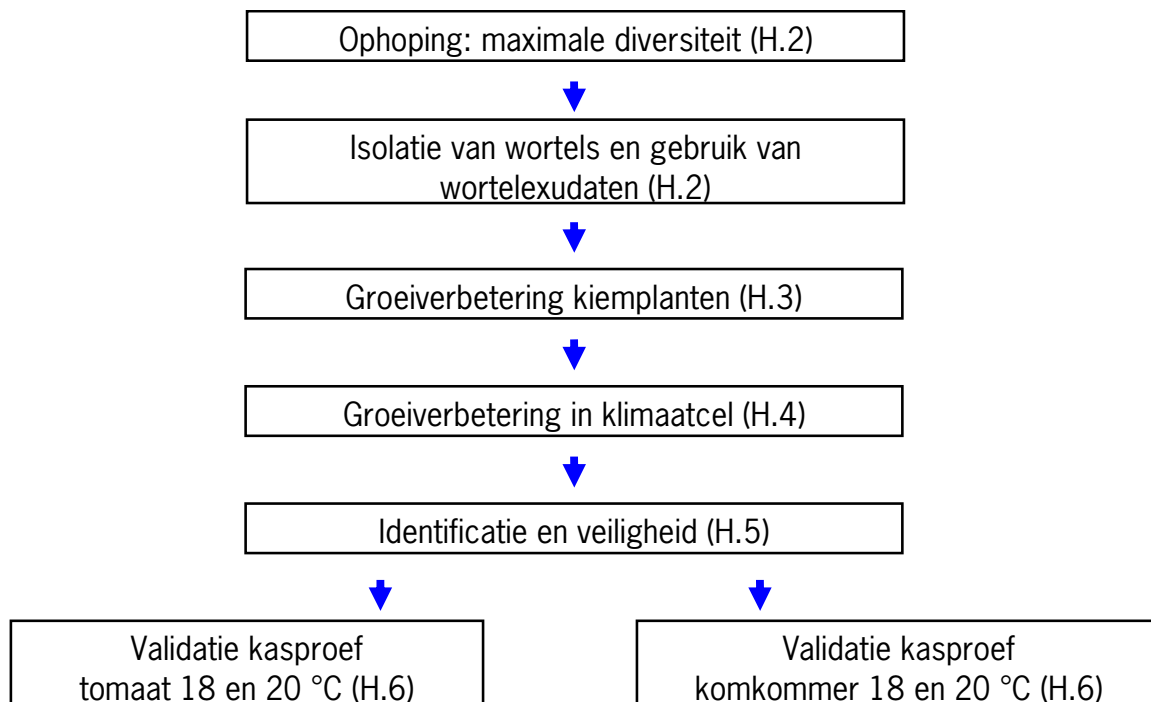
Het onderzoek is gestart met de screening van een groot aantal bacteriën in een kleinschalig toetsstelsel. Via een getrapte selectieprocedure (zie Figuur 2), zijn uiteindelijk 2 isolaten geselecteerd die in praktijkconforme kasproeven getoetst zijn.

In dit rapport zijn de volgende onderzoekstappen beschreven:

- Verzamelen van kansrijke isolaten uit bestaande collecties en isolatie van bacteriën die bij verlaagde temperatuur op tomaten- en komkommerwortels voorkomen (Hoofdstuk 2).
- Eerste selectiestap t.a.v. het effect van bacteriën op plantengroei bij suboptimale temperatuur. Hiervoor is een kiemtoets met tomaat uitgevoerd en zijn spruit- en wortellengte gemeten (Hoofdstuk 3).
- Effect van de beste bacteriën op plantengroei onder verlaagde omstandigheden (Hoofdstuk 4).
- Identificatie van de bacteriën (Hoofdstuk 5).
- Validatie van de twee meestbelovende bacteriën in kasproeven met verlaagde temperatuur (Hoofdstuk 6).

In Hoofdstuk 7 zullen de perspectieven van dit onderzoek worden aangegeven.

In dit onderzoek ligt de nadruk bij de opkweekperiode van de plant, omdat juist dan veel energie bespaard kan worden en omdat jonge planten het meest gebaat zijn bij het verlagen van stress. Bovendien is juist in het begin van de teelt de kans het grootst dat nuttige plantgeassocieerde micro-organismen niet aanwezig zijn, zodat het gewas juist dan het meest baat heeft van het toevoegen van nuttige micro-organismen.



Figuur 2. Schematische weergave van de selectiestappen met de bijbehorende hoofdstukken.

2. Verzamelen van isolaten

2.1 Inleiding

Voor het verzamelen van kansrijke isolaten zijn twee verschillende strategieën gevolgd: 1) isolaten uit bestaande collecties toetsen en 2) nieuwe isolaten selecteren.

Isolaten werden verzameld uit bestaande collecties, waarvan het vermoeden bestond dat ze plantengroei zouden kunnen stimuleren of stress verlagen. Omdat de isolaten zich uiteindelijk op tomaten- en komkommerwortels moeten kunnen vestigen, is getoetst of ze op de belangrijkste componenten in de wortel-exudaten kunnen groeien. Dit zijn citraat en succinaat (Kamilova *et al.*, 2006).

Nieuwe isolaten zijn verzameld door middel van een verrijkingsstap op tomaten- en komkommerwortels. Om de kans te vergroten dat bacteriën geselecteerd zouden worden die aan de betreffende gewassen zijn aangepast, is uitgegaan van drie gronden waar al 1 à 2 jaar tomaat of komkommer op geteeld was. Alleen biologisch geteelde gronden werden gebruikt, om uit te sluiten dat bestrijdingsmiddelen gebruikt waren. Van de 3 gronden kwamen er 2 uit een kas, en 1 van de open groenteteelt. De keuze van deze gronden was gericht op een zo groot mogelijke diversiteit van de micro-organismen, en tevens op het vergroten van de kans op plantgeassocieerde bacteriën die bij verlaagde temperatuur effectief zijn. Op deze 3 gronden zijn enkele weken tomaten en komkommers geteeld bij een verlaagde temperatuur. Vervolgens zijn bacteriën van de wortels geïsoleerd. Ook hier is citraat medium gebruikt, zodat alleen bacteriën werden geselecteerd die citraat kunnen gebruiken voor hun groei, omdat dit het meest voorkomende exudaat van tomaten- en komkommerwortels is.

2.2 Materiaal en methode

Bekende bacteriën

Uit bestaande collecties zijn 17 bacterie-isolaten geselecteerd die mogelijk stressonderdrukkende of plantengroei-stimulerende effecten kunnen hebben. Deze isolaten zijn getest op hun vermogen om te groeien op 0,2% citraat of een combinatie van 0,1 % citraat en 0,1 % succinaat als koolstofbron. Het gebruikte medium was SCA medium (Simmons citrate agar): 5 g NaCl, 0,2 g MgSO₄, 1 g NH₄H₂PO₄, 1 g K₂HPO₄, 15 g agar [tech. No.3], 1000 ml demiwater, met als koolstofbron 2 g natriumcitraat of 1 g natriumcitraat + 1 g natriumsuccinaat. De pH werd gesteld op 5,5 – 6. En de groei van de bacteriën is bepaald bij 18 °C en 25 °C.

Verrijkingsstap in komkommer en tomaat

Drie verschillende gronden zijn in maart 2006 verzameld:

- Verbeek 366-4 (Velden, nabij Venlo), biologische teler, zandgrond, ziektevering tegen nematoden, komkommer in 2005, rotatie met paprika en tomaat, niet gestoomd.
- Koning (Tinten, Oostvoorne), biologische teler, zavelgrond, veel nematoden, tomaat-paprika rotatie, 2 jaar niet gestoomd.
- Vollegrondsgroenteteelt (volkstuin, Wageningen), zandgrond, geen bestrijdingsmiddelen, paardenmest, tomaat in 2005.

Komkommerplanten cv. Accolade F1 en tomatenplanten cv. Pronto F1 (De Ruiters Seeds) zijn gezaaid in 450 ml bakken gevuld met perliet en grondextract van de drie bovengenoemde gronden. De grondextracten waren ontdaan van plantparasitaire nematoden door de suspensie te zeven over een set van zeven met een maaswijdte van 75, 45, 20 en 10 µm.

De planten stonden in een geconditioneerde kas bij 20 °C en kregen een standaard tomaten- of komkommer-voedingsoplossing.

Na 4 weken zijn jonge (1 cm worteltopjes) en oudere plantenwortels van de komkommer- en tomatenplanten geoogst, fijngemalen in de blender en verdund in Ringers. De bacteriën zijn vervolgens uitgeplaat op Simmons citrate agar (CSA) met 0.2 % natriumcitraat als koolstofbron en geïncubeerd bij 18 °C. De bacterie-isolaten zijn

reingestreven en als werkcollectie bewaard op R2A-medium bij 25 °C. Voor lange termijn bewaring zijn de isolaten ingevroren in glycerolstocks en opgeslagen bij -80 °C.

2.3 Resultaten

Bekende bacteriën

Van de 17 geteste isolaten waren er 15 in staat om te groeien op citraat of succinaat (zie Tabel 1).

Verrijkingstap in komkommer en tomaat

In totaal zijn 142 en 129 isolaten van respectievelijk komkommer en tomatenwortels geïsoleerd die bij 18 °C citraat als koolstofbron gebruiken (zie Tabel 2).

Tabel 1. Bekende bacterie-isolaten en hun vermogen om op citraat of citraat + succinaat te groeien.

Code	Geslacht	Citraat	Citraat + succinaat
AP281	Azospirillum	+	+
AP282	Azospirillum	+	+
DSM1530	Azospirillum	-	-
FZB24	Bacillus	+	+
PPFM-1	Methylobacterium	++	+
PPFM-2	Methylobacterium	+	+
PPFM-3	Methylobacterium	+	+
PPFM-4	Methylobacterium	+	+
PPFM-5	Methylobacterium	+	+
PPFM-6	Methylobacterium	+	+
PPFM-7	Methylobacterium	+	+
PPFM-8	Methylobacterium	-	-
4.4.1	Pseudomonas	++	++
4.4.2	Bacillus	+	+
G3-17	Burkholderia	++	++
RG20-5	Burkholderia	++	++
RA24-7	Burkholderia	++	+

Tabel 2. Geïsoleerde bacteriën van tomaat en komkommer.

Gewas	Grondextract	Isolaten van oudere wortels		Isolaten van jonge wortels	
		Code	Aantal	Code	Aantal
Komkommer	Volkstuin	1	30	T1	18
	Van Beek	2	21	T2	10
	Koning	3	33	T3	30
Tomaat	Volkstuin	4	60	T4	0 *)
	Van Beek	5	12	T5	11
	Koning	6	26	T6	20

*) onvoldoende gezonde wortels aanwezig.

2.4 Samengevat

Er zijn in totaal 286 isolaten beschikbaar voor de selectie van plantengroeistimulerende bacteriën. Deze isolaten groeien allen bij 18 °C en kunnen citraat of succinaat als koolstofbron gebruiken. Omdat dit de belangrijkste componenten in wortellexudaten van tomaat en komkommer zijn, wordt hiermee de kans vergroot dat deze bacteriën zich kunnen vestigen en vermeerderen op wortels van deze gewassen.

3. Selectie in kiemplantentoets

3.1 Inleiding

Gezien het grote aantal te toetsen bacterie-isolaten, was een snelle plantentoets van beperkte omvang wenselijk. Hiervoor werden tomatenkiemplanten in een voedingsoplossing gebruikt, die vlak na kieming met de verschillende bacteriën aangeënt werden. De toets werd geoptimaliseerd t.a.v. kieming, inoculatie, meetmethode, e.d. De toets werd wederom uitgevoerd bij een verlaagde temperatuur.

In dit hoofdstuk wordt de optimalisatie van de kiemplantentoets en de resultaten van de screening van 206 bacterie-isolaten beschreven.

3.2 Materiaal en methode

Toetsoptimalisatie

De tomatenzaden cv Pronto F1 (De Ruiters Seeds) werden gekiemd in gesteriliseerde tomatenvoedingsoplossing (pH 5,8 en EC 2 mS/cm) in 24-multiwellplaten op een schudincubator bij 25 °C in het donker en 55 rpm. Twee dagen na zaaien werden de zaden geïnoculeerd. De bacteriesuspensies werden gemaakt van maximaal 48 uur oude kolonies op R2A en met behulp van een OD-meter werd de inoculum dichtheid ingesteld zodat een suspensie met ca. 10^6 cellen/ml ontstond. Na inoculatie werden de multiwellplaten in een geconditioneerde kas bij 20 °C geplaatst gedurende 7 dagen. Na 7 dagen hadden alle kiemplanten hun eerste bladpaar en één enkele onvertakte hoofdwortel gevormd (zie Figuur 3). Hiervan zijn wortel- en bladlengten gemeten.



Figuur 3. Tomatenkiemplanten in een multiwellplaat.

Screening van de bacterie-isolaten

Voor de screening van de in totaal 206 isolaten zijn steeds 5 isolaten en een controle zonder bacteriën in viervoud per multiwellplaat getoetst. Per keer konden circa 5 platen, d.w.z. 25 isolaten, getoetst worden. In deze screenings-toetsen werden de tomatenplanten 1 dag langer geïncubeerd dan tijdens toetsoptimalisatie: de planten stonden na de bacterisatie gedurende 8 dagen in de kas i.p.v. 7 dagen.

In april en mei 2006 zijn alle 129 bacterie-isolaten van tomaat en de 15 bekende bacteriën getoetst. In augustus en september 2006 zijn 72 isolaten van komkommer, minimaal 10 van elke herkomst, getoetst. Ook zijn 13 isolaten van tomatenwortels, 12 isolaten van komkommerwortels en 5 bekende isolaten nogmaals getoetst. In september 2006 zijn 9 geselecteerde isolaten opnieuw getoetst, waarbij het aantal herhalingen verdrievoudigd was.

3.3 Resultaten

Toetsoptimalisatie

Vijf bacterie-isolaten zijn gebruikt om de kiemplanttoets te optimaliseren. Vier van de vijf isolaten gaven een zeer sterke toename in plantengroei te zien (Tabel 3). De variatie tussen de individuele planten was echter nogal groot. N.a.v. de resultaten werd beslist dat de incubatie beter 1 dag verlengd kon worden.

Screening van de bacterie-isolaten

Met behulp van de controles is de variatie van de metingen bepaald. Statistische analyse toonde aan dat de controles binnen 1 experiment niet significant verschilden. De variatie tussen de experimenten was echter wel aanzienlijk. Daarom zijn de resultaten van de isolaten berekend t.o.v. de gemiddelde controlewaardes per experiment. In Tabel 4 zijn de resultaten van de 10 isolaten die geselecteerd zijn voor verder onderzoek samengevat. De resultaten van alle isolaten uit deze kiemplantentoetsen zijn weergegeven in Bijlage I.

Tabel 3. *Blad- en wortellengte van tomatenkiemplanten geïnoculeerd met enkele bacterie-isolaten (n=4).*

Isolaat	Lengte blad (mm)			Lengte wortel (mm)		
	Gemiddelde	STD	% t.o.v. controle	Gemiddelde	STD	% t.o.v. controle
PPFM-1	5.8	2.8	115	43.5	11.1	212
PPFM-6	11.8	8.3	235	54.3	20.4	265
4.4.1	8.3	4.8	165	32.0	6.5	156
G3-17	7.3	5.7	145	33.8	14.8	165
RG20-5	3.0	2.0	60	35.5	14.2	173
Controle	5.0	2.6	100	20.5	13.7	100

Tabel 4. Resultaten van de geselecteerde bacterie-isolaten: blad- en wortellengte van tomatenkiemplanten na inoculatie met de geselecteerde bacterie-isolaten t.o.v. de controles zonder bacteriën.

Isolaat	1 ^{ste} screening (n=4)		2 ^{de} screening (n=4)		3 ^{de} screening (n=12)	
	blad	wortel	blad	wortel	blad	wortel
1.4	74	93	129	116		
4.56	139	144			121	107
4.57	133	122			105	89
6.15	133	112			124	102
T2.8	94	103	133	137		
T3.6	122	122			104	105
T5.3	108	122	105	123		
T5.4	134	126			104	98
T6.3	141	108			103	105
PPFM-1	115	212	116	112	106	85

3.4 Samengevat

Er zijn 206 isolaten getoetst op hun vermogen om de groei van tomatenkiemplanten bij 20 °C te stimuleren. Blad- en wortellengte waren soms meer dan 40 % toegenomen t.o.v. niet gebacteriseerde planten. Helaas waren de resultaten van herhaalde experimenten nogal variabel. Uiteindelijk zijn 10 isolaten gekozen om mee door te gaan.

4. Plantentoets met de MIPS

4.1 Inleiding

In het vorige hoofdstuk is de stimulering van groei bij tomatenkiemplanten tot 10 dagen beschreven. Om te testen of de geselecteerde bacterie-isolaten ook plantengroei van iets oudere planten kunnen stimuleren, zijn proeven met tomaat en komkommer uitgevoerd in een klimaatcel. Naast plantlengte en gewicht, zijn ook fotosynthese-efficiëntie en toename van bladoppervlak gemeten. De proeven zijn in een klimaatcel uitgevoerd, waarbij tijdens de proef niet-destructieve metingen zijn uitgevoerd met de MIPS-faciliteit van Plant Research International. De metingen met de MIPS zijn uitgevoerd door Jan Snel en Paul Dijkhuizen.

4.2 Materiaal en methode

De Mips heeft 110 meetplekken in zijn opstelling. De 10 beste isolaten (zie Tabel 4, paragraaf 3.3) en een controle zonder bacteriën zijn ieder in 10-voud getoetst.

De tomatenplanten cv Pronto F1 (De Ruiter Seeds) zijn gezaaid in 50 ml bluecapbuizen met perliet en tomaten-voedingsoplossing (pH 5,8 en EC 2 mS/cm). De zaden hebben 3 dagen bij 25 °C in het donker gestaan om te kiemen, daarna zijn de geselecteerde bacterie-isolaten toegevoegd (ca 10⁶ cellen/ml). De planten zijn in een klimaatcel gezet bij 18 °C, 70-85 % RLV, met 14 uur assimilatiebelichting. Ze kregen regelmatig voedingsoplossing.

Eenzelfde proef is uitgevoerd met komkommerplanten cv. Accolade F1 (De Ruiter Seeds) in perliet met komkommer-voedingsoplossing (pH 5,8 en EC 2,4 mS/cm). De zaden hebben 3 dagen bij 25 °C in het donker gestaan om te kiemen, daarna zijn dezelfde 10 isolaten toegevoegd. De planten zijn daarna in een klimaatcel gezet bij 20 °C, 70 % RLV, met 14 uur assimilatiebelichting en kregen regelmatig voedingsoplossing.

Van beide proeven is het geprojecteerd bladoppervlak en de fotosynthese tijdens de proef gemeten met de MIPS. Aan het einde van de proef, na ca 25 dagen, zijn de planten geoogst en zijn spruit- en wortelgewicht bepaald.



Figuur 4. Komkommerplant in perliet met voedingsoplossing en afgedekt met plastic korreltjes.

4.3 Resultaten

Tomaat

De planten hadden duidelijk stress. Dit was te zien aan de lage fotosynthese efficiëntie (PA) waarden van de planten en aan de roodpaarsige kleur (anthocyaan) van de bladeren.

Spruitgewicht van de tomatenplanten was iets hoger bij de isolaten 4.57, T5.4, T6.3, T5.3, 4.56, PPFM-1 (Figuur 5).

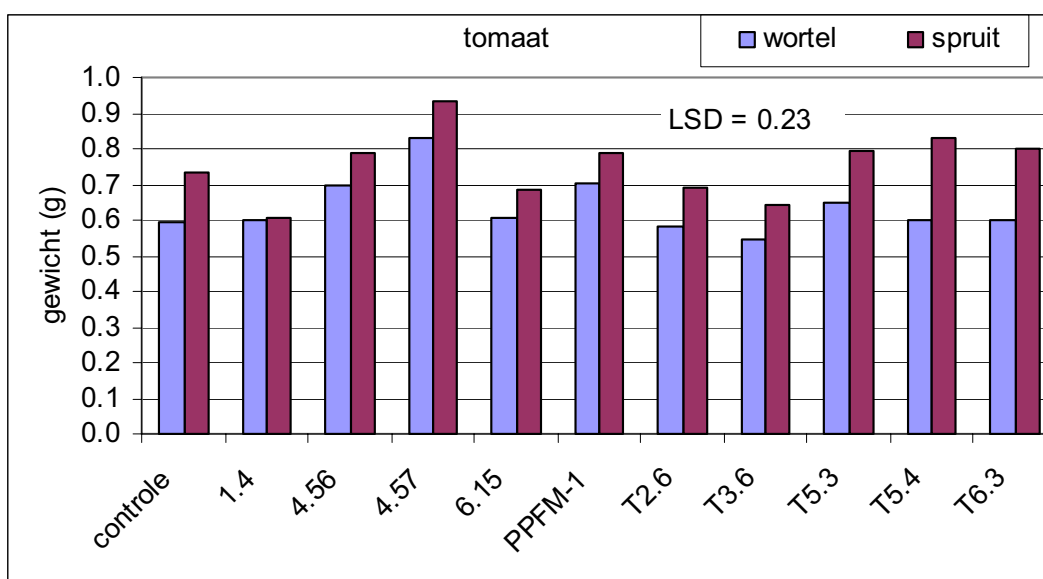
Wortelgewicht was iets hoger bij de isolaten 4.57, 4.56, PPFM-1 (alleen significant voor 4.57) (Figuur 5).

Tomatenplanten met de isolaten T2.6, T5.3, 4.57, PPFM-1 en 6.15 hadden het grootste bladoppervlak; de verschillen waren echter meestal niet significant (Bijlage II). De fotosynthese-efficiëntie was het hoogste bij de isolaten T2.6, 4.56 en 4.57. Hierbij zijn de gemiddelde waarden van T2.6 van dag 20 tot 26 significant hoger dan van de controle (Bijlage II).

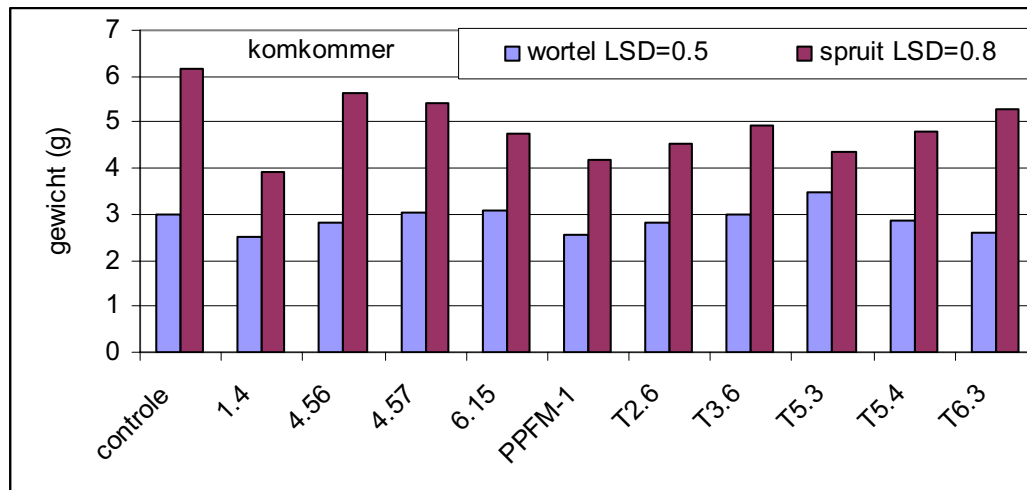
Komkommer

De resultaten uit dit experiment vielen tegen. De planten hadden duidelijk stress. Dit was te zien aan de veel te lage fotosynthese efficiëntie (PA) waarden van de planten, en aan het feit dat de komkommerbladeren opbolden en klein bleven.

Isolaten T5.3, 4.57 en 6.15 gaven de beste wortelgroei, hoewel alleen T5.3 iets beter was dan de controle (Figuur 6). Het spruitgewicht was het hoogste bij de controle, daarna volgden 4.56, 4.57 en T6.3. Ook bij het geprojecteerde bladoppervlak en de fotosynthese-efficiëntie deed de controle het beste (Bijlage II).



Figuur 5. Spruit- en wortelgewicht van tomatenplanten bij 18 °C na 25 dagen.



Figuur 6. Spruit- en wortelgewicht van komkommerplanten bij 20 °C na 25 dagen.

4.4 Samengevat

Er traden nogal wat problemen op tijdens de proeven in de klimaatcel. Ten eerste was de kunstmatige belichting onvoldoende voor goede groei van tomaten en komkommers. Waarschijnlijk was het spectrum onvolledig. Daarnaast waren er in het begin problemen met algengroei. Dit is later geminimaliseerd door de buizen niet alleen in aluminiumfolie te wikkelen, maar ook met plastic bolletjes af te dekken. De fotosynthese efficiëntie metingen zijn daarom niet gebruikt als selectie criterium. Voor de selectie van de beste bacteriën is vooral gekeken naar de effecten op wortel- en spruitgewicht door de verschillende bacteriën.

Bij tomaat zorgden de isolaten 4.56, 4.57, en soms ook T5.3 voor groeiverbetering in wortel, spruit of bladoppervlak.

Resultaten met komkommer vielen tegen, mogelijk door de diverse stress factoren. De isolaten 4.56, 4.57, en T6.3 waren het minst slecht.

5. Identificatie van isolaten

5.1 Inleiding

Het is belangrijk om van de geselecteerde isolaten de identiteit te bepalen. Hiermee kan specifieke informatie vanuit de literatuur opgezocht worden t.a.v. aanverwante soorten. Ook is het belangrijk om na te gaan of de isolaten veilig in kassystemen gebruikt kunnen worden. Isolaten die verwant zijn met soorten die pathogeen kunnen zijn voor planten, mensen of dieren, kunnen beter niet grootschalig worden toegevoegd in een kasteelt.

5.2 Materiaal en methode

Van de 10 geselecteerde bacterie-isolaten 1.4, 4.56, 4.57, 6.15, T2.6, T3.6, T5.3, T5.4, T6.3 en PPFM-1 is DNA geïsoleerd. Circa 350 basenparen van het 16S rRNA zijn gesequenced door Grenomics (PRI). Van het isolaat 4.57 is ook een groter deel (>1300 basenparen) van het 16S rRNA gesequenced door Macrogen (Korea), omdat de 350 basenparen onvoldoende informatie gaven over de soortindeling van dit isolaat. De sequenties zijn vergeleken met bekende isolaten in de databank (Ribosomal Database Project II release 9.56). Gelijkenis op soort- en geslachteniveau dienen respectievelijk > 97 % en >95 % te zijn.

De veiligheid van isolaten voor hun toepassing in kasteelten is opgezocht in een Duits handboek t.a.v. veiligheid van bacteriën (Anonymus, 2002).

5.3 Resultaten

Van de 10 bacteriën kon het geslacht (>95 % gelijkenis) meestal goed bepaald worden (Tabel 5). Het bleek met het beperkt aantal basenparen echter niet altijd mogelijk om een accurate identiteit op soortniveau van de bacteriën te bepalen. Voor de bepaling van het geslacht van isolaat 4.67 moest een groter deel gesequenced worden.

De isolaten T3.6 en T6.3 die verwant zijn aan *Flavobacterium johnsoniae* zijn ongeschikt voor grootschalige toepassing, omdat isolaten van deze soort mogelijk ziektes bij de mens kunnen veroorzaken. De isolaten die verwant zijn aan *Rhizobium radiobacter* moeten in meer detail geïdentificeerd worden, omdat deze soort plantpathogeen kan zijn (oude naam *Agrobacterium tumefaciens*).

Het isolaat 4.57 behoort tot het geslacht *Lysobacter*. Alle soorten binnen het geslacht *Lysobacter* behoren tot risicogroep 1, en zijn dus ongevaarlijk voor mens, dier en plant. *Lysobacter* isolaat C3 wordt in de literatuur beschreven als *L. enzymogenes* (Jochum *et al.*, 2006). *L. enzymogenes* is ook beschreven als een antagonist van verschillende wortelpathogenen (Folman *et al.*, 2003).

Isolaat T5.3 is een Rhizobium, maar niet verwant aan *Rhizobium radiobacter*. Verdere karakterisatie is nodig.

5.4 Samengevat

De geselecteerde isolaten kunnen veilig toegepast worden in kasteelten. Isolaat 4.57 is het meest verwant met *Lysobacter enzymogenes* en isolaat T5.3 met *Rhizobium* sp. Van beiden zijn geen risico's voor mens en dier bekend.

Tabel 5. Verwantschap van de geselecteerde bacterie-isolaten met reeds bekende bacteriesoorten of isolaten en de risicogroep waar deze soort toe behoort.

Isolaat	Geslacht	Meest verwante soort of isolaat uit de databank **)	Accessienr.	Gelijkenis %	Risico groep *)
1.4	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>	EF443163	98.7	1, +, p
4.56	<i>Variovorax</i>	<i>Variovorax</i> sp. HAB-29	AB051690	97.9	1
		<i>Variovorax paradoxus</i>	AB008000		1
4.57	<i>Lysobacter</i>	<i>Lysobacter</i> sp. IB-9374	AB083480	99.6	1
		<i>Lysobacter</i> sp. 2-0-7	AB272385	99.5	1
		<i>Lysobacter</i> sp. C3 = <i>L. enzymogenes</i>	AY074793	99.0	1
6.15	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>	AY043382	98.9	1, +, p
T2.6	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. J3-AN53	DQ454143	98.2	1 of 2
T3.6	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	ATCC 17061	93.2	2
T5.3	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobiales</i> bacterium D11-28.1	AM403228	98.6	1
		<i>Shinella zoogloeoides</i>	AB238789	98.6	1
T5.4	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>	AY626385	97.4	1, +, p
T6.3	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i> sp. CH 16-1	EU057845	97.7	1 of 2
		<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	DQ530073	97.5	2
PPMF-1	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacterium</i> sp. C3	AY436790	98.6	1

*) 1= laagste risicogroep, geen gevaar voor mensen;

2= kunnen ziekte veroorzaken;

+ = in zeldzame gevallen zijn ziektesymptomen gemeld, vooral bij mensen met verzwakt immuunsysteem;

p = mogelijk plantpathogeen.

**) alle isolaten op basis van ca 350 basenparen; isolaat 4.57 op basis van ca 1430 basenparen

6. Plantentoets in de kas

6.1 Inleiding

Voor verdere screening in kasexperimenten met tomaat en komkommer bij verlaagde temperatuur, zijn de twee meest belovende isolaten gebruikt. Isolaten T5.3 en 4.57 gaven in de voorafgaande experimenten de meeste groeiverbetering, en bleken na identificatie veilig voor toepassing in kassystemen. De isolaten zijn apart en als mengsel toegepast, omdat het bekend is dat combinaties van bacteriën soms een verbeterd effect kunnen hebben ten opzichte van de isolaten apart. Daarnaast had elk experiment een controle zonder toegevoegde bacteriën. Het tijdstip van uitvoering in een kas is erg belangrijk i.v.m. de hoeveelheid licht. Hoewel de proeven in een geconditioneerde kas werden uitgevoerd met verwarming en koeling, is de hoeveelheid licht in de zomer onrealistisch hoog. Daarom zijn de proeven die in eerste instantie in juni en augustus zijn uitgevoerd, in oktober-november herhaald.

6.2 Materiaal en methode

Kasexperiment met tomaat in juni 2007

Tomatenplanten, cv. Pronto F1, zijn gezaaid in met tomatenvoedingsoplossing (pH 5,8 en EC 2 mS/cm) verzadigde steenwolblokken (Vitagreen, Grodan) en afgedekt met een laagje vermiculiet. Na 8 dagen hadden de planten 2 kiembladeren en werden ze geïnoculeerd met de bacteriesuspensies. Bacteriën waren gekweekt op R2A, gesuspendeerd in een fysiologische zoutoplossing en toegediend op het steenwolblok rond de plant. Gebruikte concentratie was circa 5×10^7 cellen per plant, wat neerkomt op circa 2×10^5 cellen/ml. Er waren 4 behandelingen: bacterisatie met 4.57, T5.3, een mix van 4.57 en T5.3, en een controle zonder bacteriën. Elke behandeling bestond uit 15 planten verdeeld over 3 blokken. De planten stonden in een geconditioneerde kas bij 20 °C, 70 % RLV. Alle planten werden geoogst 35 dagen na zaai. Spruitgewicht, spruitlengte en totaal aantal bladeren per plant werden bepaald. Het bladoppervlak per plant werd gemeten door alle bladeren één voor één met de oppervlaktemeter te meten.

Kasexperiment met komkommer in augustus 2007

Komkommerplanten, cv. Accolade F1, zijn gezaaid in met komkommervoedingsoplossing (pH 5,8 en EC 2,4 mS/cm) verzadigde steenwolblokken (Vitagreen, Grodan) en afgedekt met een laagje vermiculiet. Na 7 dagen werden de plantjes geïnoculeerd met een bacteriesuspensie, zoals hierboven is beschreven. Elke behandeling bestond uit 15 planten verdeeld over 3 blokken. De planten stonden in een geconditioneerde kas bij 20 °C, 70 % RLV. De planten werden geoogst 27 dagen na zaai. Wederom werden spruitgewicht, bladoppervlak, spruitlengte en totaal aantal bladeren per plant bepaald.

Kasexperiment tomaat oktober-november 2007

Het tomatenexperiment uit juni werd op identieke wijze herhaald bij een lagere temperatuur. De zaden zijn eerst in een kas bij 20 °C gekiemd. Na bacterisatie zijn de planten bij een lagere kastemperatuur gezet; 18/17 °C dag/nacht temperatuur en 70 % RLV. Er werd beperkt bijbelicht zodat de daglengte 16 uur was. De planten werden 35 en 42 dagen na zaai geoogst.

Kasexperiment komkommer oktober-november 2007

Ook het komkommereperiment uit augustus werd op identieke wijze herhaald bij een 18/17 °C dag/nacht temperatuur. Er werd beperkt bijbelicht zodat de daglengte 16 uur was. De planten werden 28 en 35 dagen na zaai geoogst.



Figuur 7. Kasproef met gebacteriseerde tomaten- (links) en komkommerplanten (rechts) bij 17/18 °C.



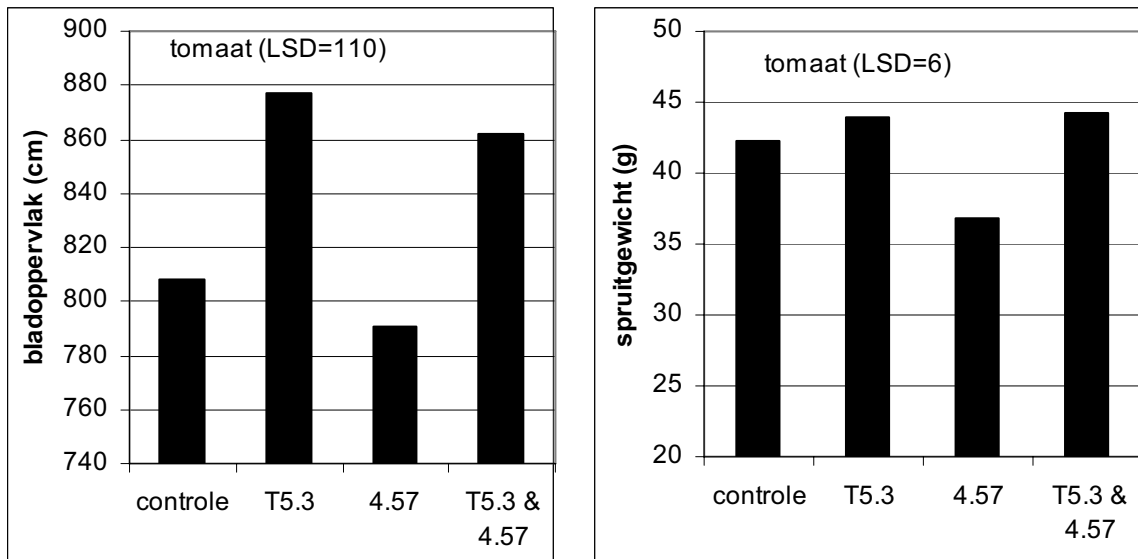
Figuur 8. Tomaat, cv. Pronto, met bacterie-isolaat T5.3 en 4.57.

6.3 Resultaten

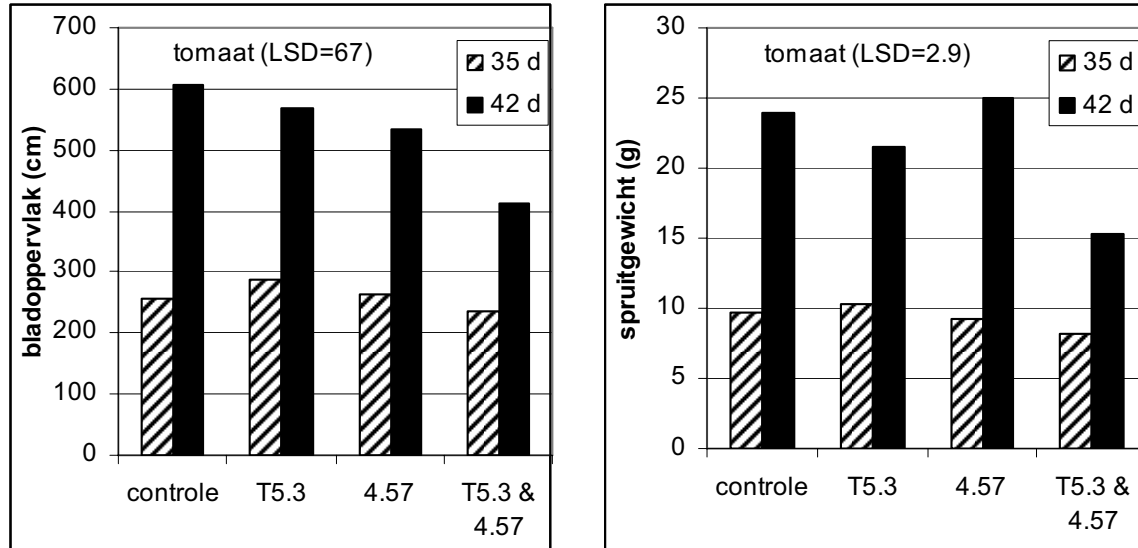
Tomaat

In het eerste experiment, waar tomaten met beperkte stress opgekweekt werden bij 20 °C en voldoende licht, gaf het isolaat T5.3 een duidelijke toename in bladoppervlak en een beperkte toename in spruitgewicht na 35 dagen (Figuur 9, Tabel 6). De toename in bladoppervlak door T5.3 was significant hoger dan de planten zonder T5.3 indien de gemiddelde waarden van behandelingen met en zonder isolaat 4.57 beschouwd werden. Isolaat 4.57 had geen groeibevorderend effect (Figuur 9).

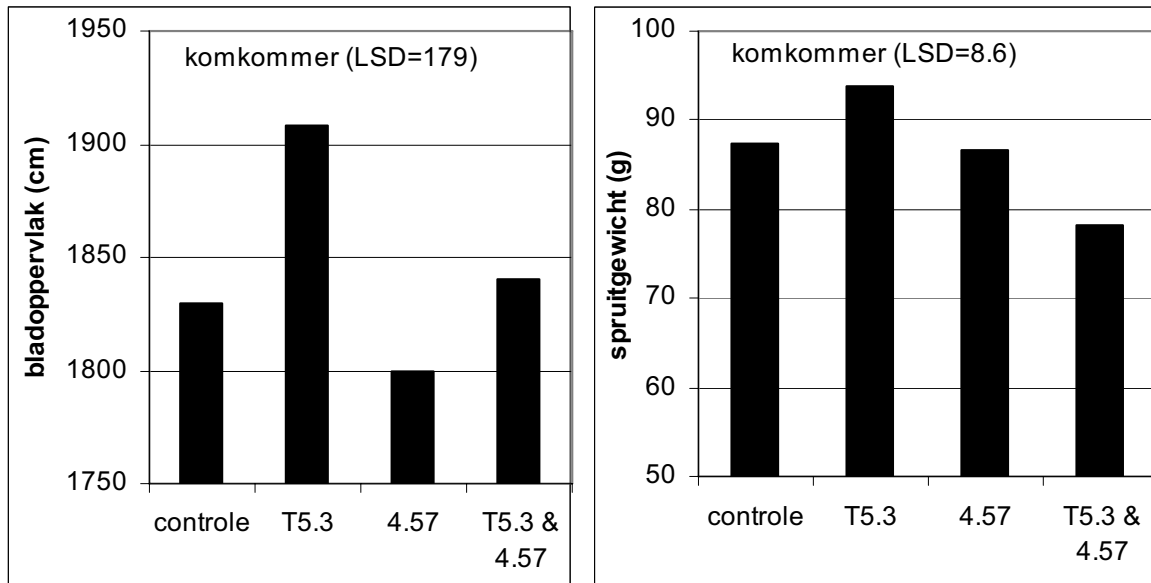
Het tweede experiment met een lagere temperatuur (18 °C) en veel minder licht (oktober-november), gaf een wisselend beeld; het effect van 4.57 was wederom niet positief, het effect van T5.3 was positief na 35 dagen maar negatief na 42 dagen (Figuur 10, Tabel 6).



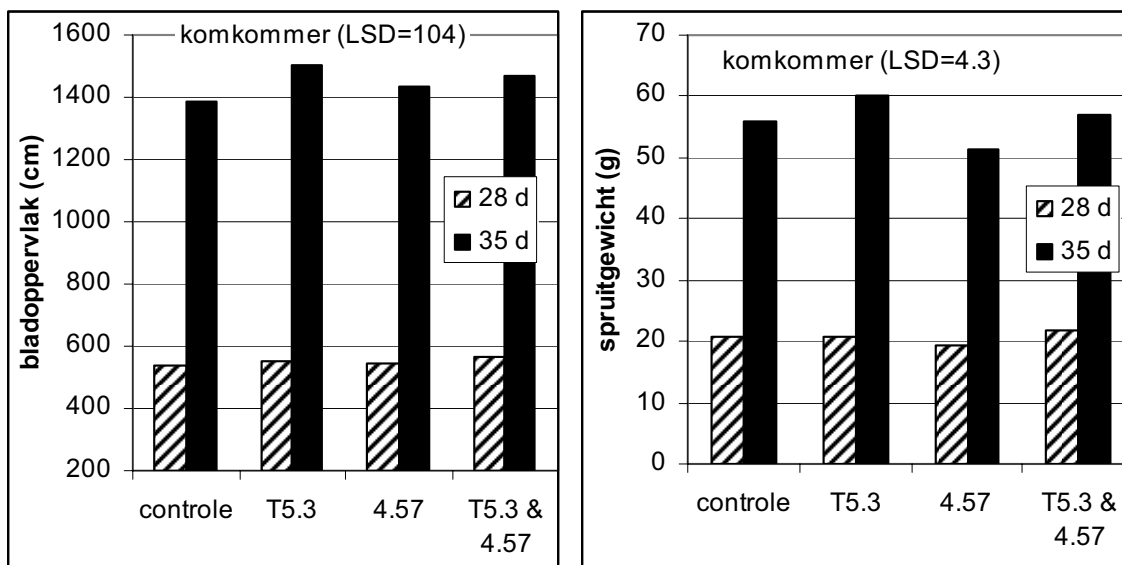
Figuur 9. Bladoppervlak en spruitgewicht van tomatenplanten met toegevoegde bacterie-isolaten 4.57 en T5.3 na 35 dagen (kasexperiment juni 2007, 20/18 °C dag/nacht temperatuur, n=15).



Figuur 10. Bladoppervlak en spruitgewicht van tomatenplanten met toegevoegde bacterie-isolaten 4.57 en T5.3; twee oogsttijdstippen (kasexperiment oktober-november 2007, 18/17 °C dag/nacht temperatuur, n=15).



Figuur 11. Bladoppervlak en spruitgewicht van komkommerplanten met toegevoegde bacterie-isolaten 4.57 en T5.3 na 27 dagen (kasexperiment augustus 2007, 20/18 °C dag/nacht temperatuur, n=15).



Figuur 12. Bladoppervlak en spruitgewicht van komkommerplanten met toegevoegde bacterie-isolaten 4.57 en T5.3 op twee oogsttijdstippen (kasexperiment oktober-november 2007, 18/17 °C dag/nacht temperatuur, n=15).

Komkommer

In het eerste experiment, waar komkommerplanten met beperkte stress opgekweekt werden bij 20 °C en voldoende licht, gaf het isolaat T5.3 een duidelijke toename in bladoppervlak en spruitgewicht na 27 dagen (Figuur 11, Tabel 7). Isolaat 4.57 had een licht negatief effect (Figuur 11).

In het tweede experiment met een lagere temperatuur (18 °C) en veel minder licht (oktober-november) hadden de planten zichtbaar stress; de bladeren hadden bleke niet meegroeïende bladranden (Figuur 7). In dit experiment gaf T5.3 wederom een toename in bladoppervlak en spruitgewicht, zowel na 28 als 35 dagen (Figuur 12, Tabel 7). De verhogingen in bladoppervlak, spruitgewicht, plantlengte, aantal bladeren en aantal zijspruiten door T5.3 was significant indien de gemiddelde waarden van behandelingen met en zonder isolaat 4.57 beschouwd werden. Isolaat 4.57 was gaf wederom geen groeiverbetering.

Tabel 6. Overzicht van de relatieve groeigegevens (in %) van de isolaten 4.57 en T5.3 t.o.v. de controle in tomaat.

Temperatuur (°C)	Licht	Meting	T5.3 35 dagen	T5.3 42 dagen	4.57 35 dagen	4.57 42 dagen
20	Kas - zomer	Spruitgewicht	104	-	87	-
		Bladoppervlak	108	-	98	-
		Spruitlengte	100	-	93	-
		Aantal bladeren	100	-	95	-
18	Kas - herfst	Spruitgewicht	105	90	95	105
		Bladoppervlak	112	93	103	88
		Spruitlengte	104	96	102	103
		Aantal bladeren	99	98	103	98

Tabel 7. Overzicht van de relatieve groeigegevens (in %) van de isolaten 4.57 en T5.3 t.o.v. de controle in komkommer.

Temperatuur (°C)	Licht	Meting	T5.3 27 dagen	T5.3 35 dagen	4.57 27 dagen	4.57 35 dagen
20	Kas - zomer	Spruitgewicht	107	-	99	-
		Bladoppervlak	104	-	98	-
		Spruitlengte	106	-	99	-
		Aantal bladeren	94	-	104	-
		Aantal groeitoppen	104	-	100	-
18	Kas - herfst	Spruitgewicht	101	110	94	94
		Bladoppervlak	102	108	100	103
		Spruitlengte	102	112	98	98
		Aantal bladeren	109	111	99	101
		Aantal groeitoppen	100	109	100	109

6.4 Samengevat

De twee beste isolaten zijn onder kasomstandigheden met een verlaagde, suboptimale temperatuur getest (18 of 20 °C dagtemperatuur). In alle gevallen zijn de bacteriën eenmalig toegediend tijdens kieming van de zaden.

Isolaat T5.3 gaf in 3 van de 4 proeven een groeiverbetering van 5 à 10 %. Er was een duidelijke toename in bladoppervlak en spuitgewicht bij komkommer en tomaat. Alleen het experiment met tomaat bij 18 °C en weinig licht (november) was afwijkend en vertoonde na 42 dagen negatieve resultaten voor T5.3. Het is niet duidelijk wat hiervan de oorzaak is.

Isolaat 4.57 gaf in geen van de gevallen groeiverbetering.

De combinatie van beide isolaten gaf geen verbetering van het effect ten opzichte van de beide individuele isolaten.

7. Discussie

7.1 Conclusie t.a.v. selectieprocedure

Dit is de eerste keer dat bacteriën geselecteerd werden om in substraatteelt, bij de teelt van tomaat en komkommer onder verlaagde temperaturen, plantenstress te verlagen. Bij aanvang van het onderzoek was de verwachting dat enkele geschikte micro-organismen geselecteerd zouden kunnen worden.

Er is een stapsgewijze selectieprocedure opgezet (zie Figuur 2 in Hoofdstuk 1): van kleinschalige toetsen met veel isolaten, naar steeds omvangrijker toetsen met minder isolaten. Het eerste selectiecriteria was dat de bacteriën op de wortels van tomaat en komkommer moesten kunnen groeien. Dit is getoetst door de groei van bacteriën bij 20 °C op citraat en succinaat, de belangrijkste wortellexudaten, te bepalen. Daarna is de stimulering van de groei van net gekiemde tomaten zaden bekeken bij 20 °C. Deze toets was zoveel mogelijk gestandaardiseerd, maar bleek desondanks een grotere variatie in resultaten te geven dan verwacht. Daarom is een extra herhaling van alle isolaten met positieve resultaten uitgevoerd. Vervolgens zijn van de 10 beste isolaten de ontwikkeling van bladoppervlak en fotosynthese efficiëntie gevolgd in de tijd. Er waren echter, behalve temperatuurstress, ook andere stressfactoren aanwezig, namelijk een onvolledig lichtspectrum en algengroei. Daardoor leverden de resultaten niet op wat verwacht was. Na identificatie van de bacterie-isolaten zijn een aantal isolaten wegens veiligheidsredenen niet verder meegenomen. Uiteindelijk zijn 2 meest belovende isolaten in de kas getoetst.

Deze procedure heeft uiteindelijk geleid tot één isolaat dat in kasproeven groeiverbetering gaf bij verlaagde temperaturen, en één isolaat dat interessant lijkt maar nog niet onder kasomstandigheden getoetst is. Isolaat T5.3 stimuleerde de groei van tomaat en komkommer bij kastemperaturen van 18 à 20 °C: bladoppervlak, spruitgewicht en plantlengte waren ca. 5 à 10 % hoger door toevoeging van deze bacterie. Dit positieve resultaat werd in 3 van de 4 experimenten gevonden.

De resultaten van de isolaten uit bestaande collecties vielen tegen. Een aantal isolaten viel af omdat ze niet konden groeien op citraat en succinaat bij 20 °C. De gekozen isolaten zijn bekend vanwege hun groeibevorderende eigenschappen, maar ecologisch niet aangepast aan de vereiste temperatuur en/of rhizosfeer omstandigheden van tomaat en komkommer.

7.2 Perspectieven - Is het isolaat goed genoeg?

Dit project was vooral gericht op de selectie van bacteriën die in substraatteelt plantenstress zouden kunnen verminderen bij de teelt van tomaat en komkommer onder verlaagde temperaturen. Er zijn daarom slechts vier proeven in de kas uitgevoerd. Als gevolg hiervan kunnen we wel concluderen dat we één interessant isolaat, namelijk T5.3, in handen hebben, maar weten we nog weinig over de robuustheid van het effect en de omstandigheden waaronder het isolaat effectief is. Tot nu toe gaf het isolaat T5.3 in 2 van de 2 experimenten bij komkommer en in 1 van de 2 experimenten bij tomaat een positief effect. Hierbij is onbekend waarom het laatste experiment met tomaat bij 18 °C en weinig licht negatieve resultaten gaf na 42 dagen.

T.a.v. mogelijke effecten bij verschillende omstandigheden is nog niets bekend. Bij welke temperatuurrange kan groeistimulering optreden? Wat is het effect van licht (lengte en intensiteit)? Treedt het effect bij andere cultivars en andere gewassen op? Welke andere omstandigheden spelen een rol?

In de tot nu toe uitgevoerde proeven is slechts één manier van toedienen toegepast. Het betrof steeds een eenmalige toevoeging van de bacterie enkele dagen na zaai. Bovendien is een relatief lage dosis van de bacterie (2×10^5 cellen/ml) gebruikt. Daarom valt te verwachten dat het effect van de bacterie geoptimaliseerd kan worden door de bacterie vaker of in hogere concentraties toe te voegen.

7.3 Extra informatie over de geselecteerde isolaten

Het meest belovende isolaat T5.3 is verwant aan:

- een niet plantpathogeen isolaat van *Rhizobium radiobacter*, dat groei in granen stimuleert, mogelijk door productie van gibberalinen (Humphry *et al.*, 2007).
- *Rhizobium* sp. isolaten die idoolazijnzuur produceren en groeiverbetering bij katoen geven (Hafeez *et al.*, 2004).
- *Shinella zoogloeooides* (oude naam is *Zoogloea ramigera*) (An *et al.*, 2006). Hierover is echter geen informatie t.a.v. plantengroei stimulering gevonden.

In de literatuur worden dus aan T5.3 verwante isolaten beschreven die groeihormonen produceren, zowel gibberalinen als idoolazijnzuur.

Het isolaat 4.57 is het meest verwant met *Lysobacter enzymogenes*. Hiervan is bekend dat het schimmel-pathogenen en nematoden kan bestrijden (Folman *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Jochum *et al.*, 2006). In eerder onderzoek is *L. enzymogenes* geïsoleerd van komkommerwortels geteeld op steenwol (Folman *et al.*, 2003). Dit isolaat kan goed op tomaten- en komkommerwortels in substraatsystemen overleven en groeien (niet gepubliceerde data).

In het huidige onderzoek gaf het isolaat 4.57 in geen van de kasexperimenten groeiverbetering, terwijl in voorafgaande kleinschaliger proeven wel positieve effecten op groei aanwezig waren. Eén van de oorzaken van de tegenvallende effecten in de kasexperimenten zou de lage inoculumconcentratie kunnen zijn.

Het isolaat 4.56 gaf goede resultaten in de kleinschaliger proeven, maar is niet meegenomen in validatieproeven in de kas wegens ruimtegebrek. Het isolaat is het meest verwant met *Variovorax paradoxus* (oude naam *Alcaligenes paradoxus*). Hiervan zijn diverse isolaten beschreven die de wortelgroei stimuleren en een betere groei geven bij stress door zware metalen (Belimov *et al.*, 2005). Deze isolaten vertonen ACC deaminase activiteit en veelal ook idoolazijnzuur productie. Het is ook aangetoond dat *V. paradoxus* op ACC als stikstofbron kan groeien. Bacteriën met ACC deaminase activiteit verlagen mogelijk de ethyleenproductie van planten onder stress. Deze literatuur-informatie maakt het isolaat 4.56 alsnog interessant voor verder onderzoek naar zijn effect op plantengroei onder stress.

7.4 Hoe verder?

Het is in eerste instantie belangrijk om na te gaan onder welke omstandigheden het bacterie-isolaat T5.3 groeiverbetering geeft en of dit effect inderdaad betrouwbaar is bij komkommer. Het is daarom belangrijk om de omstandigheden te kennen waaronder de bacterie groeistimulering geeft. Bij welke temperatuurrange kan groeistimulering optreden, wat is het effect van licht (lengte en intensiteit)? Treedt het effect bij alle cultivars op? Welke andere omstandigheden spelen een rol?

Zodra bekend is of isolaat T5.3 plantengroei stimuleert, kan de manier van toevoegen geoptimaliseerd worden. Wat is de meest effectieve manier van inoculum toevoegen: via gietwater, zaadcoating of substraat? Ook optimalisatie van de inoculumdosis of een herhaalde toediening van de bacterie kunnen het effect beïnvloeden.

Verdere vragen zijn:

Kan het effect bij tomaat geoptimaliseerd worden?

Treedt het effect op bij andere gewassen?

Heeft de bacterie effect bij andere vormen van stress zoals hitte, hoge zoutconcentraties, e.d.?

Wat is het effect in de verdere teelt tot en met de oogst?

Wat is het mechanisme van de groeiverbetering?

Inzicht in het mechanisme van de groeistimulering kan een bijdrage leveren aan de optimalisatie van de groeistimulering. Bijvoorbeeld als bekend is dat het isolaat T5.3 werkzaam is via bepaalde groeihormonen, of via de in de literatuur beschreven ACC deaminase activiteit, kan veel gericht naar andere effectieve isolaten gezocht worden.

Referenties

- Ait Barka, E., J. Nowak & C. Clément, 2006.
Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7246-7252.
- An, D.S., W.T. Im, H.C. Yang & S.T. Lee, 2006.
Shinella granuli gen. nov., sp. nov., and proposal of the reclassification of *Zoogloea ramigera* ATCC 19623 as *Shinella zoogloeoides* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 443-448.
- Anonymus, 2002.
Eistufung biologischer Arbeitsstoffe: Bakterien. Jedermann-Verlag, Heidelberg, 303 pp.
- Belimov, A.A., N. Hontzeas, V.I. Safronova, S.V. Demchinskaya, G. Piluzza, S. Bullitta & B.R. Glick, 2005.
Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry* 37, 241-250.
- Chen, J., W.H. Moore, G.Y. Yuen, D. Kobayashi & E.P. Caswell-Chen, 2006.
Influence of *Lysobacter enzymogenes* strain C3 on nematodes. *Journal of Nematology* 38, 233-239.
- Folman, L.B., J. Postma & J.A. van Veen, 2003.
Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber. *Microbiological Research* 158, 107-115.
- Gagné, S., L. Dehbi, D. Le Quere, F. Cayer, J.-L. Morin, R. Lemay & N. Fournier, 1993.
Increase of greenhouse tomato fruit yields by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) inoculated into the peat-based growing media. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 269-272.
- Hafeez, F.Y., M.E. Safdar, A.U. Chaudhry & K.A. Malik, 2004.
Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44, 617-622.
- Holland, M.A. & J.C. Polacco, 1994.
PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45, 197-209.
- Humphry, D.R., M. Andrews, S.R. Santos, E.K. James, L.V. Vinogradova, L. Perin, V.M. Reis, S.P. Cummings, 2007.
Phylogenetic assignment and mechanism of action of a crop growth promoting *Rhizobium radiobacter* strain used as a biofertiliser on graminaceous crops in Russia. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 91, 105-113.
- Jochum, C.C., L.E. Osborne & G.Y. Yuen, 2006.
Fusarium head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes* strain C3. *Biological Control* 39, 336-344.
- Kamilova, F., L.V. Kravchenko, A.I. Shaposhnikov, T. Azarova, N. Makarova & B. Lugtenberg, 2006.
Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 250-256.
- Kilian, M., U. Steiner, B. Krebs, H. Junge, G. Schmiedeknecht & R. Hain, 2000.
FZB24 *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-nachrichten Bayer* 1, 72-93.
- Koivunen, M.E., C. Morisseau, J.W. Newman, W.R. Horwath & B.D. Hammock, 2003.
Purification and characterization of a methylene urea-hydrolyzing enzyme from *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*). *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1433-1442.
- Lebuhn, M., T. Heulin & A. Hartmann, 1997.
Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology* 22, 325-334.
- Lucy, M., E. Reed & B.R. Glick, 2004.
Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 86, 1-25.

- Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, H. Lee, K. Hari, S. Sundaram & T. Sa, 2005.
Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). *Biol Fertil Soils* 41, 350-358.
- Mayak, S., T. Tirosh & B.R. Glick, 2004.
Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 565-572.
- Mehnaz, S. & G. Lazarovits, 2006.
Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology* 51, 326-335.
- Omer, Z.S., R. Tombolini, A. Broberg & B. Gerhardson, 2004.
Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. *Plant Growth Regulation* 43, 93-96.
- Perrig, D., M.L. Boiero, O.A. Masciarelli, C. Penna, O.A. Ruiz, F.D. Cassán & M.V. Luna, 2007.
Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 1143-1150.
- Ribaudó, C.M., E.M. Krumpholz, F.D. Cassán, R. Bottini, M.L. Cantore & J.A. Cura, 2006.
Azospirillum sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation* 25, 175-185.
- Selvadurai, E.L., A.E. Brown & J.T.G. Hamilton, 1991.
Production of indole-3-acetic acid analogues by strains of *Bacillus cereus* in relation to their influence on seedling development. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 401-403.
- Van Peer, R. & B. Schippers, 1989.
Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Can. J. Microbiol.* 35, 456-463.
- Vonderwell, J.D., S.A. Enebak & L.J. Samuelson, 2001.
Influence of two plant growth-promoting rhizobacteria on Loblolly pine root respiration and IAA activity. *Forest science* 47, 197-202.

Bijlage I.

Overzicht data kiemplantentoets

Tabel. Gegevens per isolaat: gemiddelde bladlengte (1^{ste} kolom) en wortellengte (2^{de} kolom) in mm of in % t.o.v. de controle (C), (n=4).

4-apr-06	PPFM-1		PPFM-6		4.4.1		G3-17		RG20-5		C	
gemiddelde	5.75	43.5	11.75	54.25	8.25	32	7.25	33.75	3	35.5	3.75	20.5
% tov C	153%	212%	313%	265%	220%	156%	193%	165%	80%	173%	100%	100%
1-mei-06	AP281		AP282		FSB24		PPFM-3		PPFM-2		C	
gemiddelde	14.75	35.5	13.5	40.75	15.25	47.25	19.75	47.5	17	49.75	15.25	48.75
% tov C	90%	79%	82%	91%	93%	105%	120%	106%	103%	111%	93%	109%
1-mei-06	RA24-7		4.4.2		PPFM-7		PPFM-5		PPFM-4		C	
gemiddelde	18	53	10	37.25	16.25	53	20	54.5	16.5	50	13.25	45.25
% tov C	109%	118%	61%	83%	99%	118%	122%	122%	100%	112%	81%	101%
1-mei-06	4.1		4.2		4.3		4.4		4.5		C	
gemiddelde	17.5	50.5	18.5	47.25	15.75	48.5	15.75	43	14.75	39.5	19.25	49.25
% tov C	106%	113%	112%	105%	96%	108%	96%	96%	90%	88%	117%	110%
1-mei-06	4.6		4.7		4.8		4.9		4.10		C	
gemiddelde	14.25	36.25	17	46	17.25	49	14.75	47.75	13.75	38	15.25	36.75
% tov C	87%	81%	103%	103%	105%	109%	90%	107%	84%	85%	93%	82%
1-mei-06	4.11		4.12		4.13		4.14		4.15		C	
gemiddelde	15.5	43.75	16.75	46.25	15.5	44	15	46.5	13.75	45.5	19.25	44
% tov C	94%	98%	102%	103%	94%	98%	91%	104%	84%	102%	117%	98%
2-mei-06	4.16		4.17		4.18		4.19		4.2		C	
gemiddelde	9.5	44.25	10.5	32	10.5	42.5	13.75	44.25	7.5	33.25	11	43.25
% tov C	80%	126%	88%	91%	88%	121%	116%	126%	63%	95%	92%	123%
2-mei-06	4.21		4.22		4.23		4.24		4.25		C	
gemiddelde	8	32.5	14.5	35.5	13.75	31	10.75	31.75	17.25	39.25	12	34.5
% tov C	67%	92%	122%	101%	116%	88%	90%	90%	145%	112%	101%	98%
2-mei-06	4.26		4.27		4.28		4.29		4.30		C	
gemiddelde	11.5	44.25	9	36.5	11.75	37.75	13	39.5	10.5	41	15.5	42.75
% tov C	97%	126%	76%	104%	99%	107%	109%	112%	88%	117%	130%	122%
2-mei-06	4.31		4.32		4.33		4.34		4.35		C	
gemiddelde	7.75	26	10.5	36.75	9	30.25	15.5	39.5	8.25	26.75	11.25	32.25
% tov C	65%	74%	88%	105%	76%	86%	130%	112%	69%	76%	95%	92%
2-mei-06	4.36		4.37		4.38		4.39		4.40		C	
gemiddelde	7.75	33.5	11	31.75	6.5	22	10.75	34.75	7.25	35	9.75	23
% tov C	65%	95%	92%	90%	55%	63%	90%	99%	61%	100%	82%	65%
6-mei-06	4.41		4.42		4.43		4.44		4.45		C	
gemiddelde	12.5	33.5	15	38	14.25	33.75	13	35.5	13.25	29	12.67	39
% tov C	102%	95%	123%	107%	117%	95%	106%	100%	109%	82%	104%	110%

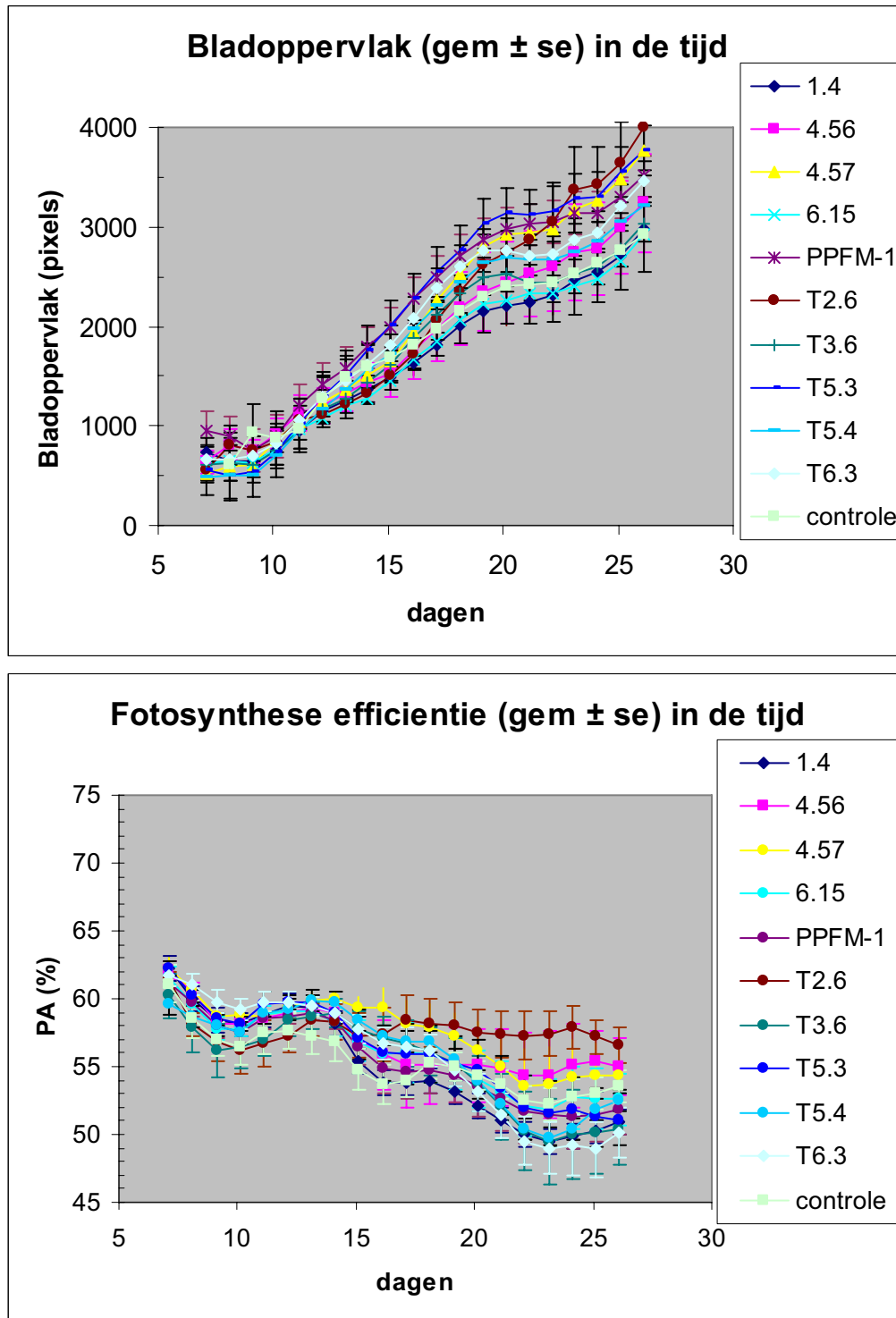
6-mei-06	4.46		4.47		4.48		4.50		4.51		C	
gemiddelde	11.5	24.75	10.75	28.25	11.75	36	13.75	38.75	14.25	37.75	11.5	37
% tov C	94%	70%	88%	80%	96%	102%	113%	110%	117%	107%	94%	105%
6-mei-06	4.52		4.53		4.54		4.55		4.56		C	
gemiddelde	13	38.25	10.75	33.5	10	30.25	8.5	28.25	17	51	14.25	41
% tov C	106%	108%	88%	95%	82%	86%	70%	80%	139%	144%	117%	116%
6-mei-06	4.57		4.58		4.59		4.60		5.1		C	
gemiddelde	16.25	43	14.5	40.25	12.5	25.75	9	28.75	7.5	20.75	15	42
% tov C	133%	122%	119%	114%	102%	73%	74%	81%	61%	59%	123%	119%
6-mei-06	5.2		5.3		5.4		5.5		5.6		C	
gemiddelde	14.5	38	11.5	32.5	9.75	26.5	11.5	29.5	12.25	28.75	7.75	18.75
% tov C	119%	107%	94%	92%	80%	75%	94%	83%	100%	81%	63%	53%
7-mei-06	5.7		5.8		5.9		5.10		5.11		C	
gemiddelde	8	24	4.5	25	10.5	32.5	7.75	26.25	15	41	12.25	35
% tov C	71%	68%	40%	71%	93%	92%	69%	75%	133%	116%	108%	99%
7-mei-06	5.12		6.1		6.2		6.3		6.4		C	
gemiddelde	7.5	32.25	8	20.75	11	37.5	9.75	27.5	5.5	24.5	8.25	32
% tov C	66%	92%	71%	59%	97%	107%	86%	78%	49%	70%	73%	91%
7-mei-06	6.5		6.6		6.7		6.8		6.9		C	
gemiddelde	7.25	29.75	9.25	30.75	13.75	36.25	12.5	35	7.25	32.5	8.75	31.5
% tov C	64%	85%	82%	87%	122%	103%	111%	99%	64%	92%	77%	89%
7-mei-06	6.10		6.11		6.12		6.13		6.14		C	
gemiddelde	9.5	29.25	11.5	32.75	6.25	21.25	6	28.25	7.25	29.25	11.5	34
% tov C	84%	83%	102%	93%	55%	60%	53%	80%	64%	83%	102%	97%
7-mei-06	6.15		6.16		6.17		6.18		6.19		C	
gemiddelde	15	39.5	10.75	36.75	14	37.75	10.5	34.25	8	26.25	15.75	43.5
% tov C	133%	112%	95%	104%	124%	107%	93%	97%	71%	75%	139%	124%
9-mei-06	6.20		6.24		6.21		6.22		6.23		C	
gemiddelde	12	34.25	10.5	37.75	11.75	31.5	9.5	28.5	11.5	33.5	9.5	28.25
% tov C	111%	112%	97%	123%	108%	103%	88%	93%	106%	109%	88%	92%
9-mei-06	6.25		6.26		T5.1		T5.2		T5.3		C	
gemiddelde	11.25	36.5	14	35.75	9.5	33.75	10.25	34.25	11.75	37.25	8.75	27.75
% tov C	104%	119%	129%	117%	88%	110%	94%	112%	108%	122%	81%	91%
9-mei-06	T5.4		T5.5		T5.6		T5.7		T5.8		C	
gemiddelde	14.5	38.5	10.25	34	11	31.25	8	24.25	10.75	31.25	11.25	36.25
% tov C	134%	126%	94%	111%	101%	102%	74%	79%	99%	102%	104%	118%
9-mei-06	T5.9		T5.10		T5.11		T6.1		T6.2		C	
gemiddelde	10.25	33.25	10	29.5	14.25	28.5	8.75	34.25	9.25	30.25	13.25	31.25
% tov C	94%	108%	92%	96%	131%	93%	81%	112%	85%	99%	122%	102%
9-mei-06	T6.3		T6.4		T6.5		T6.6		T6.7		C	
gemiddelde	15.25	33	10.5	34.25	9.5	33.25	10	32.25	8.25	28.75	11.5	29.75
% tov C	141%	108%	97%	112%	88%	108%	92%	105%	76%	94%	106%	97%

13-mei-06	T6.8		T6.9		T6.10		T6.11		T6.12		C	
gemiddelde	13.5	44	9	29.75	7.5	36.5	10.25	34	18.25	52	14.5	37.75
% tov C	100%	113%	67%	76%	56%	94%	76%	87%	136%	133%	108%	97%
13-mei-06	T6.13		T6.14		T6.15		T6.16		T6.17		C	
gemiddelde	7.25	34.75	10.75	38.25	8	29.75	12	37.25	10	28.75	14	37.25
% tov C	54%	89%	80%	98%	59%	76%	89%	96%	74%	74%	104%	96%
13-mei-06	T6.18		T6.19		T6.20		1.1		1.2		C	
gemiddelde	7.25	34	8	31.75	8.75	28.5	8.25	30.25	6.5	28.25	13.25	42.5
% tov C	54%	87%	59%	81%	65%	73%	61%	78%	48%	72%	99%	109%
13-mei-06	1.3		1.4		1.5		1.6		1.7		C	
gemiddelde	8.75	29	10	36.25	8.75	29.25	12.25	40	9.5	32	7.5	27.5
% tov C	65%	74%	74%	93%	65%	75%	91%	103%	71%	82%	56%	71%
13-mei-06	1.8		1.9		1.10		1.11		1.12		C	
gemiddelde	11.25	39.25	7	34.25	10.5	35	10	35.5	13.5	40.25	18	50
% tov C	84%	101%	52%	88%	78%	90%	74%	91%	100%	103%	134%	128%
31-jul-06	2.2		2.3		2.10		2.11		2.13		C	
gemiddelde	13.25	47.25	11.25	46.5	13.75	40.25	10.25	36.75	11.25	35.25	11.75	36.5
% tov C	117%	122%	99%	120%	121%	104%	90%	95%	99%	91%	104%	95%
31-jul-06	2.14		2.17		2.18		2.19		2.20		C	
gemiddelde	11.25	37.75	11.5	47.75	10	43	12.5	48.25	14.25	42	13	45.5
% tov C	99%	98%	101%	124%	88%	111%	110%	125%	126%	109%	115%	118%
31-jul-06	3.1		3.2		3.3		3.4		3.5		C	
gemiddelde	5.5	23.25	8.75	38	7	32.75	11	37.5	13	47	16.25	47.75
% tov C	48%	60%	77%	98%	62%	85%	97%	97%	115%	122%	143%	124%
31-jul-06	3.6		3.7		3.8		3.9		3.10		C	
gemiddelde	11.5	43	9.75	37.5	5	28	11.5	36	15.25	42	8.75	32
% tov C	101%	111%	86%	97%	44%	73%	101%	93%	134%	109%	77%	83%
31-jul-06	T1.1		T1.2		T1.3		T1.4		T1.5		C	
gemiddelde	13	40.5	10	34.5	10	36.5	8.25	25.25	8.5	30.75	7	31.25
% tov C	115%	105%	88%	89%	88%	95%	73%	65%	75%	80%	62%	81%
1-aug-06	T1.16		T1.6		T1.7		T1.8		T1.9		C	
gemiddelde	12.5	34.75	8.75	20.5	10.25	36	10.5	41.75	16.75	48	16.25	48
% tov C	89%	85%	62%	50%	73%	88%	74%	102%	119%	118%	115%	118%
1-aug-06	T2.1		T2.2		T2.3		T2.4		T2.5		C	
gemiddelde	16	45.25	12	34.25	10	35.75	10	34	12.75	40.5	11.75	40.75
% tov C	113%	111%	85%	84%	71%	88%	71%	83%	90%	99%	83%	100%
1-aug-06	T2.6		T2.7		T2.8		T2.9		T2.10		C	
gemiddelde	16.25	45.25	10.25	33.5	13.25	42.25	12.25	39	12.5	39.5	8.25	22
% tov C	115%	111%	73%	82%	94%	103%	87%	95%	89%	97%	59%	54%
1-aug-06	T3.1		T3.2		T3.3		T3.4		T3.5		C	
gemiddelde	15.75	39.75	9.25	34.25	15	51.25	12.25	40.5	9.25	24.25	17.75	50.75
% tov C	112%	97%	66%	84%	106%	125%	87%	99%	66%	59%	126%	124%

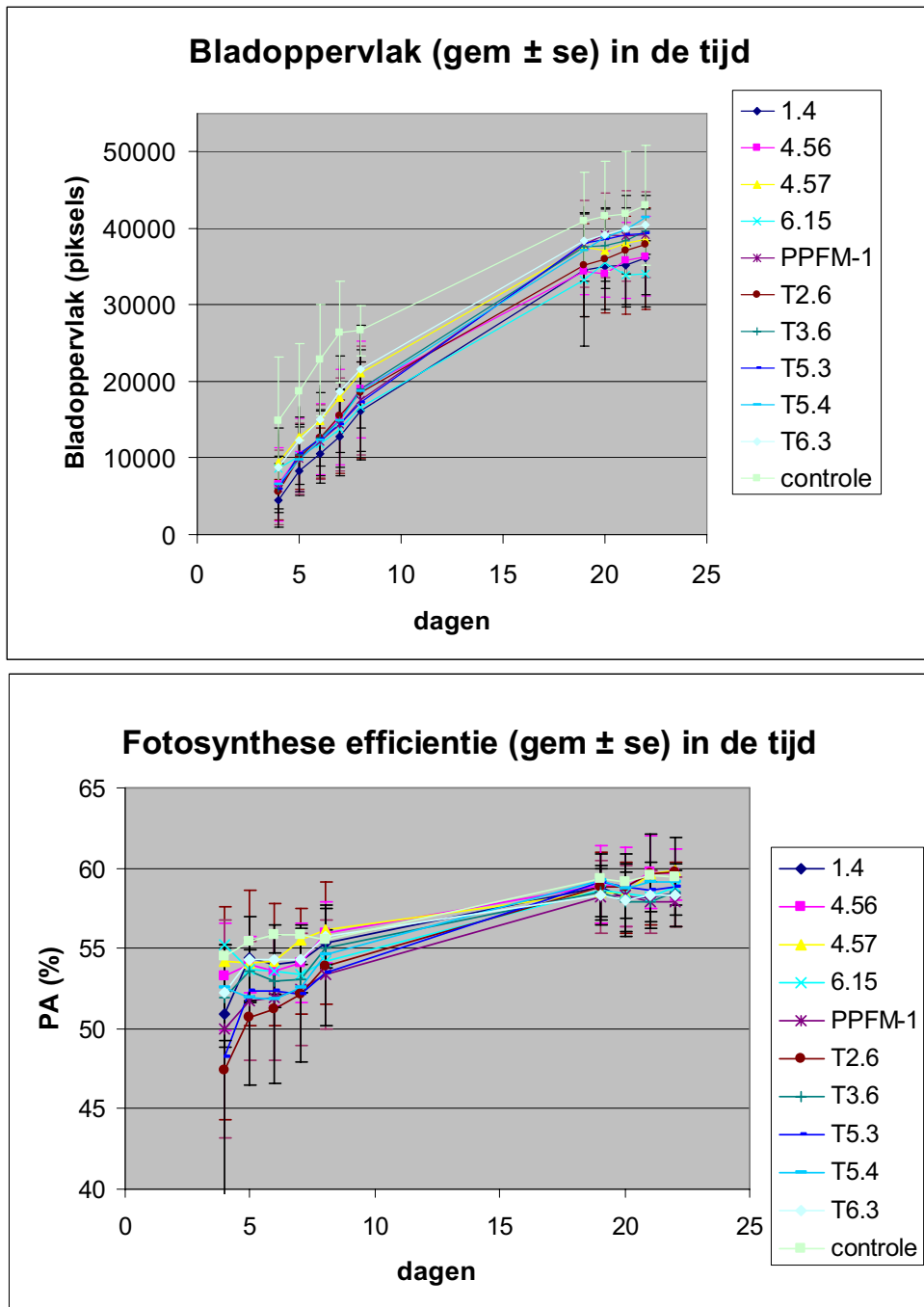
1-aug-06	T3.6		T3.7		T3.8		T3.9		T3.10		C	
gemiddelde	17.25	49.75	10.75	33.75	13.25	38.25	11.25	35.75	14.75	43.25	16.5	42.75
% tov C	122%	122%	76%	83%	94%	94%	80%	88%	105%	106%	117%	105%
sep-06	523		ARABID		441		G3-17		Methylobact. merophilicum		C	
gemiddelde	15.5	45.75	9.75	30	10.75	32.25	10.25	30	6	23	11	35.5
% tov C	120%	112%	76%	73%	83%	79%	80%	73%	47%	56%	85%	87%
sep-06	4.25		4.39		6.25		6.26		6.7		C	
gemiddelde	12.25	34.25	14.75	41.75	10	35.75	8.25	33	10.5	40.75	14	42.25
% tov C	95%	84%	115%	102%	78%	88%	64%	81%	82%	100%	109%	103%
sep-06	5.2		5.3		5.4		5.5		5.6		C	
gemiddelde	12.5	42.5	10	26	12	43.5	14.25	44.75	9	33.75	13.75	42.5
% tov C	97%	104%	78%	64%	93%	107%	111%	110%	70%	83%	107%	104%
sep-06	T5.3		T6.12		6.8		1.4		1.6		C	
gemiddelde	14	50.25	11.75	38.25	12	35	17.25	47.5	13	43.75	11	39.25
% tov C	109%	123%	91%	94%	93%	86%	134%	116%	101%	107%	85%	96%
sep-06	3.6		3.10		T1.1		T1.2		T1.3		C	
gemiddelde	5.75	18	13.25	38.25	15	42.25	12.25	33	13.75	40.75	12	37.5
% tov C	45%	44%	103%	94%	117%	103%	95%	81%	107%	100%	93%	92%
sep-06	T2.6		T2.7		T2.8		T2.9		T2.10		C	
gemiddelde	14.25	49.25	6.75	27.75	17.75	55.75	13	51	8	34	15.5	48
% tov C	111%	121%	52%	68%	138%	137%	101%	125%	62%	83%	120%	118%
okt-06	4.34		4.56		4.57		5.11		523		6.15	
gemiddelde	10	36.75	14.5	40.75	13.25	40.5	12.25	43	10.25	36.25	13.5	36.5
% tov C	72%	84%	105%	93%	96%	93%	89%	98%	74%	83%	98%	83%
okt-06	T5.4		T6.3		T3.6		C		4.34		4.56	
gemiddelde	12.5	38.75	15	49.75	15.5	43	18.75	56.25	14.5	35.25	14	41
% tov C	90%	89%	108%	114%	112%	98%	136%	129%	105%	81%	101%	94%
okt-06	4.57		5.11		523		6.15		T5.4		T6.3	
gemiddelde	14	33.25	7.75	28.75	11.25	35	16.75	46	14.5	39	12	38
% tov C	101%	76%	56%	66%	81%	80%	121%	105%	105%	89%	87%	87%
okt-06	T3.6		C		4.34		4.56		4.57		5.11	
gemiddelde	11.5	43	12.75	44.75	16.25	40.25	17.5	48	12.5	34.75	11.75	32.25
% tov C	83%	98%	92%	102%	117%	92%	127%	110%	90%	79%	85%	74%
okt-06	523		6.15		T5.4		T6.3		T3.6		C	
gemiddelde	19	32	13.5	32	12.5	41.75	12.33	41.67	12	39.5	10	33
% tov C	137%	73%	98%	73%	90%	95%	89%	95%	87%	90%	72%	75%

Bijlage II.

Metingen met de MIPS



Figuur. Geprojecteerd bladoppervlak en fotosynthese efficiëntie van tomatenplanten bij 18 °C.



Figuur. Geprojecteerd bladoppervlak en fotosynthese efficiëntie (PA) van komkommerplanten bij 20 °C.