PLANT RESEARCH INTERNATIONAL
WAGENINGEN UR

Plantengroeistimulerende bacteriën bij verlaagde kastemperatuur - komkommeropkweek 2008

Energieprogramma PT/LNV

Joeke Postma & Chula Hok-A-Hin



landbouw, natuur en voedselkwaliteit

Productschap Tuinbouw
Voor een bloeiende zaak

Kas als Energiebron

Rapport 260

PLANT RESEARCH INTERNATIONAL
WAGENINGEN UR

Plantengroeistimulerende bacteriën bij verlaagde kastemperatuur - komkommeropkweek 2008

Energieprogramma PT/LNV

Joeke Postma & Chula Hok-A-Hin

Plant Research International B.V., Wageningen
Juni 2009

Rapport 260

© 2009 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.

Gefinancierd door:

landbouw, natuur en voedselkwaliteit

Productschap Tuinbouw
Voor een bloeiende zaak

Kas als Energiebron

Plant Research International B.V.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 48 60 01
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	Doelstelling en aanpak van dit vervolgonderzoek	3
2.	Identificatie van isolaten	5
2.1	Inleiding	5
2.2	Materiaal en methode	5
2.3	Resultaten en discussie	5
2.4	Conclusie	5
3.	Plantentoets in de kas	7
3.1	Inleiding	7
3.2	Materiaal en methode	7
3.3	Resultaten en discussie	8
3.4	Conclusie	8
4.	Opkweek in de praktijk	9
4.1	Inleiding	9
4.2	Materiaal en methode	9
4.3	Resultaten en discussie	10
4.4	Conclusie	10
5.	Discussie	11
5.1	Perspectieven isolaat T5.3	11
5.2	Perspectieven isolaat 4.56	11
5.3	Hoe verder?	11
Referenties		13
Bijlage I.	Karakteristieken van isolaat T5.3 en 4.56	2 pp.
Bijlage II.	Gemeten kastemperatuur en luchtvochtigheid	1 p.

Samenvatting

Vanuit het programma 'Kas als Energiebron' 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 m^3 brandstof/m^2 (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.

Het huidige projectverslag (PT project nr. 13336) is een vervolg op het rapport van maart 2008, waar de selectie van micro-organismen met groeiverbeteringen van tomaat en komkommer bij verlaagde kastemperaturen werd beschreven. In het huidige rapport wordt vervolgonderzoek aan twee kansrijke bacteriën beschreven.

Het isolaat T5.3 is geïdentificeerd als *Shinella* sp. en is het meest verwant aan *Shinella granuli*. In het vorige verslag werd dit isolaat als een *Rhizobium* soort beschreven, vanwege sterke genetische verwantschap met deze soort. In het huidige onderzoek gaf dit isolaat na eenmalige toediening vlak na zaai, 12% meer spruitgewicht en bladoppervlak bij 28 dagen oude komkommerplanten van twee cultivars bij een kastemperatuur van 19/18 °C. Bij 42 dagen oude planten was deze groeistimulering grotendeels verdwenen. Toediening van dit isolaat bij een commerciële plantenteler, onder normale teeltomstandigheden, gaf geen significant effect op plantengroei. In voorgaand onderzoek bij kastemperaturen van 18 à 20 °C gaf toevoeging van deze bacterie 5 à 10% hoger bladoppervlak, spruitgewicht en plantlengte (in 3 van de 4 experimenten).

Isolaat 4.56 is geïdentificeerd als *Variovorax paradoxus.* In het huidige onderzoek is dit isolaat voor het eerst in een kasexperiment bij verlaagde kastemperatuur getest in komkommer. Groeistimulering was 7% na 28 dagen. Op een later tijdstip was groeistimulering geheel verdwenen. Deze resultaten tonen aan dat isolaat 4.56 minder effectief is dan T5.3.

Conclusie

Isolaat T5.3 (*Shinella* sp.) is het meest kansrijke isolaat om stress bij planten als gevolg van verlaagde temperaturen te verminderen; het gaf 5-12% groeiverbetering. Groeiverbetering is bij twee verschillende komkommercultivars en één tomatencultivar aangetoond. Er is geen positief of negatief effect gemeten bij teelt onder normale omstandigheden. Tot nu toe is het effect vooral meetbaar geweest bij jongere (28-35 dagen) en niet bij oudere planten (42 dagen). Mogelijk is herhaalde toediening nodig voor een effect gedurende een langere periode.

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 wortelexudaten en dode plantencellen, en scheiden vervolgens allerlei stoffen uit die nuttig kunnen zijn voor de plant.

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 de in komkommer-, tomaten- en paprikateelt, wordt de energiebesparing geschat op 6,5 m^3 brandstof/m^2 (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 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.

De focus ligt op micro-organismen die:
1. plantengroei bevorderen of sturen via plantenhormonen, of
2. stresstolerantie van planten verhogen.

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

1.2 Doelstelling en aanpak van dit vervolgonderzoek

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. Hiervoor zijn de 2 perspectiefvolste bacteriën opnieuw getoetst in een kasexperiment. Bovendien was verdere identificatie van deze isolaten nodig om risico's van grootschalige toepassing uit te sluiten.

In dit rapport zijn de volgende onderzoekstappen beschreven:
- Verdere identificatie van de geselecteerde bacteriën (Hoofdstuk 2).
- Validatie van de twee meestbelovende bacteriën in kasproeven met verlaagde temperatuur (Hoofdstuk 3).
- Toetsing van het effect van de beste bacterie bij een commercieel opkweekbedrijf (Hoofdstuk 4).

In Hoofdstuk 5 zullen de perspectieven van dit onderzoek worden aangegeven.

2. Identificatie van isolaten

2.1 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.

2.2 Materiaal en methode

De isolaten T5.3 en 4.56 zijn voor verdere identificatie opgestuurd naar een officieel bacteriologisch laboratorium, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ te Braunschweig). De morfologische, fysiologische, biochemische en moleculaire kenmerken van deze bacteriën zijn bepaald.

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

2.3 Resultaten en discussie

Van isolaat T5.3 was eerder aangegeven dat het verwant was met het geslacht *Rhizobium*. Nadere analyse door DSMZ gaf aan dat het een *Shinella* sp. is. De 16S rDNA sequentie vertoonde 99.1% similariteit met *Shinella granuli*, een soort die in 2006 voor het eerst beschreven is (An *et al.*, 2006).

Isolaat 4.56 behoort tot *Variovorax paradoxus*. De 16S rDNA sequentie vertoonde 99.1% tot 100% similariteit met verschillende isolaten binnen deze soort. Ook vetzuuranalyse en fysiologische data geven aan dat het isolaat tot deze soort behoort.

De kenmerken van beide isolaten, zoals geanalyseerd door DSMZ, zijn opgenomen in Bijlage I.

2.4 Conclusie

Op basis van hun identiteit en informatie over risicogroepen (Anonymus, 2002) kunnen de geselecteerde isolaten volgens de huidige kennis veilig toegepast worden in kasteelten. De isolaten behoren niet tot een soort waarvan bekend is dat het isolaten bevat die ziekteverwekkend zijn voor planten, mensen of dieren.

3. Plantentoets in de kas

3.1 Inleiding

Het vermogen van de bacterie-isolaten T5.3 en 4.56 om plantengroei te stimuleren is getest in een kasexperiment bij een verlaagde temperatuur. Isolaat T5.3 gaf eerder meermaals positieve resultaten in tomaat en komkommer. Het doel van de proef in 2008 was om deze resultaten te bevestigen. Isolaat 4.56 is in voorafgaande kasexperimenten niet mee-genomen, maar was wel kansrijk. Bovendien zijn er andere isolaten van dezelfde soort bekend die groeiverbetering onder stressomstandigheden geven (Belimov *et al.*, 2005). Daarom is dit isolaat in het kasexperiment van 2008 alsnog getoetst. Als controle diende een behandeling zonder toegevoegde bacteriën.
De kasproef is uitgevoerd met twee komkommercultivars en is op 2 tijdstippen geoogst. De proef is uitgevoerd in een geconditioneerde kas van oktober tot eind november met een verlaagde kastemeperatuur. De temperatuur was 19/18 °C, terwijl 20-22 °C aangehouden wordt als minimum temperatuur voor een goede groei tijdens opkweek van komkommer.

3.2 Materiaal en methode

Kasexperiment met komkommer in oktober-november 2008

Komkommerplanten, cv. Accolade F1 (Ruiter Seeds) en cv. Mystica F1 (Rijk Zwaan), 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 de bacteriesuspensies. Bacteriën waren gekweekt op R2A, gesuspendeerd in een fysiologische zoutoplossing en toegediend op het steenwolblok rond de plant. Gebruikte concentraties waren 1,2 en 1,3 x 10^8 cellen per plant voor respectievelijk 4.56 en T5.3, wat neerkomt op circa 0,5 x 10^6 cellen/ml. Er waren 3 behandelingen: bacterisatie met 4.56, T5.3, en een controle zonder bacteriën. Elke behandeling bestond uit 50 planten verdeeld over 5 blokken. De planten stonden in een geconditioneerde kas bij 19/18 °C dag/nacht, 70% RLV. De gemeten temperatuur en luchtvochtigheid is in Bijlage II samengevat. De helft de planten werd geoogst na 28 dagen en de rest 42 dagen na zaai. Spruitgewicht en bladoppervlak per plant werden gemeten. Bladoppervlak werd bepaald door alle bladeren één voor één met de oppervlaktemeter te meten.



Figuur 1. Kasproef met gebacteriseerde komkommerplanten bij 19/18 °C, 28 (links) en 42 dagen na zaai (rechts).

3.3 Resultaten en discussie

Spruitgewicht van de beide cultivars was 10 tot 16% hoger na inoculatie met T5.3 dan in de controle 28 dagen na zaai (Tabel 1). De met 4.56 geïnoculeerde planten waren 7% zwaarder dan de controle. Echter, 42 dagen na zaai was deze groeivoorsprong verdwenen.

Bladoppervlak van de beide cultivars was 12% hoger na inoculatie met T5.3 dan in de controle 28 dagen na zaai (Tabel 2). De met 4.56 geïnoculeerde planten hadden een 7-8% groter bladoppervlak dan de controle. Echter, 42 dagen na zaai was deze groeivoorsprong grotendeels verdwenen.

In eerste instantie was de laatste oogst van de planten 7 dagen later gepland. De planten waren echter na 42 dagen al zo groot, dat ze te weinig ruimte in de kas hadden en meermaals per dag water nodig hadden.

Tabel 1. Spruitgewicht van komkommerplanten in een kasproef bij 19/18 °C na inoculatie met 4.56 en T5.3, 28 en 42 dagen na zaai (in g/plant).

Tijd (dagen)	Cultivar	Controle	T5.3 [a) c)]	4.56 [a)]	$LSD_{0.05}$ [b)]	$LSD_{0.10}$ [b)]
28	Accolade	51.8	60.1 ** (116%)	55.3 (107%)	4.7	3.9
28	Mystica	41.0	45.1 (110%)	43.7 (107%)	5.5	4.6
42	Accolade	268.9	271.3 (101%)	255.3 (95%)	20.1	16.8
42	Mystica	259.0	260.6 (103%)	266.7 (101%)	23.0	19.3

[a)] Spruitgewicht gevolgd door relatief gewicht t.o.v. de controle.
[b)] Least significant difference bij P = 0.05 of 0.10.
*[c)] Waardes gevolgd door ** en * zijn significant verschillend van de controle met P = 0.05 en 0.10, respectievelijk.*

Tabel 2. Bladoppervlak van komkommerplanten in een kasproef bij 19/18 °C na inoculatie met 4.56 en T5.3, 28 en 42 dagen na zaai (in cm/plant).

Tijd (dagen)	Cultivar	Controle	T5.3 [a) c)]	4.56 [a) c)]	$LSD_{0.05}$ [b)]	$LSD_{0.10}$ [b)]
28	Accolade	1307	1470 ** (112%)	1404 * (107%)	105	88
28	Mystica	1060	1193 ** (112%)	1148 (108%)	128	107
42	Accolade	5273	5513 (105%)	5185 (98%)	393	329
42	Mystica	5196	5381 (104%)	5508 (106%)	356	331

[a)] Bladoppervlak gevolgd door relatief gewicht t.o.v. de controle.
[b)] Least significant difference bij P = 0.05 of 0.10.
*[c)] Waardes gevolgd door ** en * zijn significant verschillend van de controle met P = 0.05 en 0.10, respectievelijk.*

3.4 Conclusie

Isolaat T5.3 (*Shinella* sp.) gaf de beste resultaten: 28 dagen na zaai waren zowel spruitgewicht en bladoppervlak ca. 12% hoger dan de controle behandeling zonder bacteriën. Echter, 14 dagen later was de groeistimulans grotendeels verdwenen.

Isolaat 4.56 (*Variovorax paradoxus*.) gaf een 7% hoger spruitgewicht en bladoppervlak dan de controle 28 dagen na zaai. Ook hier was 14 dagen later de groeistimulans verdwenen.

De bacteriën waren eenmalig toegediend tijdens kieming van de zaden. Mogelijk dat extra toediening nodig is voor een langduriger effect.

4. Opkweek in de praktijk

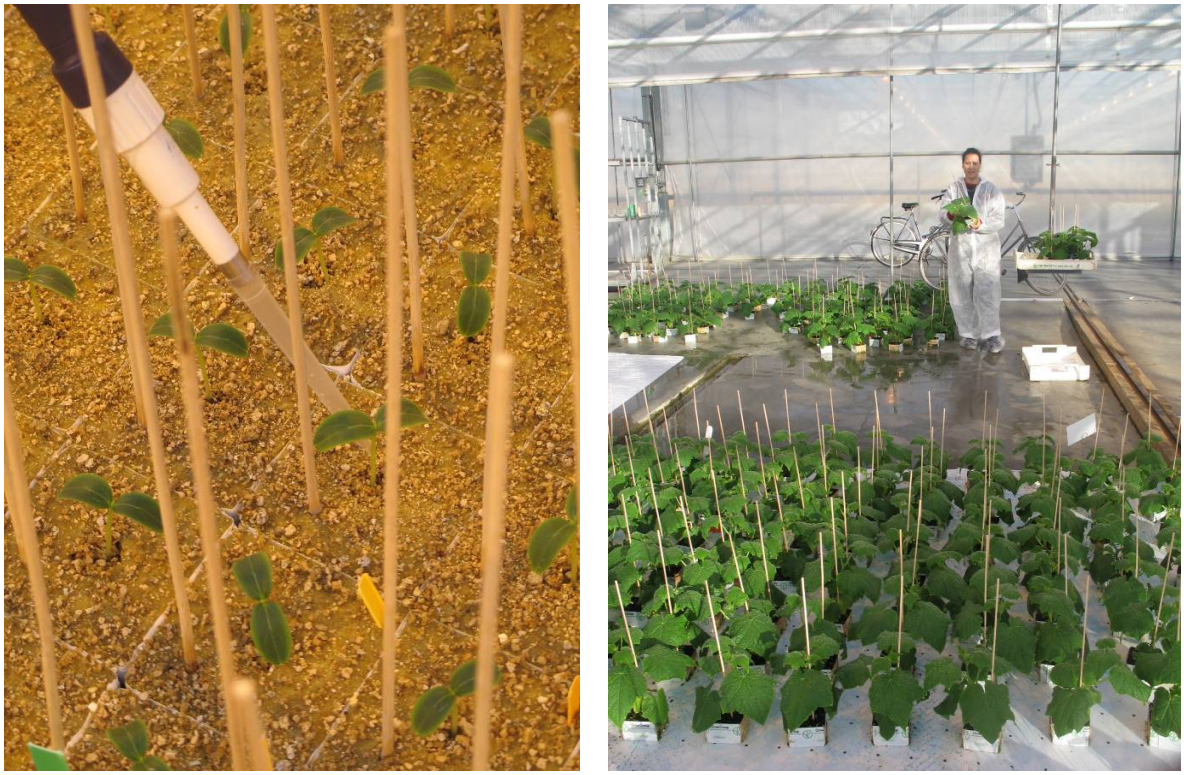
4.1 Inleiding

Het effect van het bacterie-isolaat T5.3 is onder praktijkomstandigheden getoetst. Alleen T5.3 is in dit experiment getoetst omdat deze bacterie tot nu toe de beste resultaten gaf t.a.v. groeistimulering bij verlaagde kastemperaturen. Hiervoor zijn komkommerplanten tijdens de opkweek op een plantenkweekbedrijf geïnoculeerd. Het betrof gangbare groeiomstandigheden bij het bedrijf Grow Group BV, dus geen verlaagde kastemperatuur. Contactpersoon was Lizet Coppoolse.

4.2 Materiaal en methode

Experiment met komkommer in december 2008 - januari 2009

Komkommerplanten, cv. Proloog F1 (Rijk Zwaan), zijn gezaaid op 10 december in steenwolblokken door Grow Group BV. Voeding en water werden gegeven via eb- en vloed, en via beregening. De planten werden 6 dagen na zaai gebacteriseerd met T5.3 zoals beschreven in paragraaf 3.2. De planten werden in 3 groepen van 24 planten tussen de rest van de partij weggezet, in totaal 72 planten per behandeling. Plantgroei werd bepaald 30 dagen na zaai door de spruitlengte en spruitgewicht per plant te meten.
Kastemperatuur tijdens de proef was 22 °C dag/nacht vanaf zaai en 22/20 °C dag/nacht vanaf het wijder uiteen zetten van de planten. Door belichting kan de temperatuur tijdens de dag nog 1-2 °C hoger geweest zijn.



Figuur 2. Bacterisatie van komkommerplanten tijdens opkweek in de praktijk (links) en bepaling van spruitgewicht en -lengte 30 dagen na zaai (rechts).

4.3 Resultaten en discussie

Spruitgewicht en -lengte van de komkommerplanten waren gelijk voor de gebacteriseerde en de controle planten. Er was dus geen groeiverbetering meetbaar door bacterisatie met isolaat T5.3.

Het uitblijven van groeiverbetering kan verschillende oorzaken hebben gehad:
- Planten zijn niet onder verlaagde temperaturen gekweekt; het betrof een gangbaar kasklimaat.
- Watergift was via eb- en vloed en planten hebben niet in aparte compartimenten gestaan, waardoor uitspoeling van de bacteriën kan hebben plaatsgevonden.

Tabel 3. *Spruitgewicht en –lengte van komkommerplanten tijdens opkweek bij Grow Group na inoculatie met 4.56 en T5.3, gemiddelde van 72 planten 30 dagen na zaai (in g/plant).*

Tijd (dagen)	Cultivar	Meting	Controle	T5.3 [a)]	LSD [b)]
30	Proloog	Spruitgewicht	32.9	33.4 (102%)	0.8
30	Proloog	Spruitlengte	20.8	20.8 (100%)	0.5

[a)] *Meting gevolgd door relatief resultaat t.o.v. de controle.*
[b)] *Least significant difference bij P = 0.05.*

4.4 Conclusie

Isolaat T5.3 (*Shinella* sp.) had geen effect (positief of negatief) op groei tijdens de opkweek van komkommerplanten onder de geteste omstandigheden bij Grow Group BV. Gebacteriseerde planten hadden hetzelfde gewicht en lengte als de niet gebacteriseerde planten.
Deze proef heeft laten zien dat er onder de uitgevoerde omstandigheden bij een gangbaar kasklimaat geen groeistimulering, maar óók geen groeiremming optrad.

5. Discussie

5.1 Perspectieven isolaat T5.3

Uit het onderzoek van de afgelopen 2,5 jaar is gebleken dat isolaat T5.3 (*Shinella* sp., in vorige verslag als *Rhizobium* benoemd) het meest kansrijk is t.a.v. het verminderen van plantenstress bij de teelt van tomaat en komkommer onder verlaagde temperaturen. Eerder was beschreven dat dit isolaat groeiverbetering gaf in de 2 experimenten met komkommer en in 1 van de 2 experimenten met tomaat tijdens teelt bij verlaagde temperaturen (Postma *et al.*, 2008). Het huidige rapport toont aan dat isolaat T5.3 (*Shinella* sp.) 12% groeiverbetering gaf bij 2 cultivars van komkommer wanneer de planten 28 dagen groeiden bij 19/18 °C. Bij langere kweek (42 dagen) nam de groeistimulering af. Dit kan het gevolg zijn van onvoldoende ruimte en water voor de planten, of de noodzaak om de bacterie te herintroduceren indien de overleving onvoldoende is. In alle uitgevoerde experimenten is T5.3 eenmalig net na kieming van de zaden toegevoegd.

Isolaat T5.3 is een *Shinella* sp., en vertoont sterkste verwantschap met *Shinella granuli*. Dit is een soort die in 2006 voor het eerst beschreven is (An *et al.*, 2006). Er is geen informatie dat soorten binnen het geslacht *Shinella* enig risico opleveren voor planten, dieren of mensen.

Op basis van deze resultaten biedt isolaat T5.3 (*Shinella* sp.) perspectieven voor verder onderzoek. Uiteindelijk zou dit isolaat verder ontwikkeld kunnen worden voor de praktijk om in substraatsystemen plantenstress te verminderen.

5.2 Perspectieven isolaat 4.56

Het isolaat 4.56 (*Variovorax paradoxus*) gaf voorheen goede resultaten in de kleinschaliger proeven, maar was niet meegenomen in validatieproeven in de kas wegens ruimtegebrek (Postma *et al.*, 2008). Op basis van gegevens uit de literatuur t.a.v. isolaten van dezelfde soort die wortelgroei stimuleren en een betere groei geven bij stress door zware metalen (Belimov *et al.*, 2005), is dit isolaat in het huidige onderzoek alsnog in de kas getoetst.
Het isolaat 4.56 gaf echter slechts 7% groeiverbetering bij 2 cultivars van komkommer wanneer de planten 28 dagen groeiden bij 19/18 °C. Deze groeiverbetering was niet statistisch significant t.o.v. de controle planten en was geheel verdwenen na langere kweek.

Op basis van deze resultaten biedt isolaat 4.56 (*Variovorax paradoxus*) onvoldoende perspectieven om verder ontwikkeld te worden voor de praktijk.

5.3 Hoe verder?

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. Het betrof een relatief lage dosis van de bacterie (0,2-0,5 x 10^6 cellen/ml). Daarom valt te verwachten dat het effect van de bacterie geoptimaliseerd kan worden door de bacterie vaker toe te voegen.

Verder is het belangrijk om na te gaan onder welke omstandigheden het bacterie-isolaat T5.3 groeiverbetering geeft. Bij welke temperatuurrange kan groeistimulering optreden, wat is het effect van licht (lengte en intensiteit) en andere groeifactoren? Kan groeistimulering ook bij oudere planten optreden of zijn vooral jonge planten gevoelig voor de groeistimulering?
In het huidige onderzoek hebben we aangetoond dat groeistimulering in ieder geval bij twee komkommer cultivars optreedt. Treedt het effect bij alle cultivars op?

Belangrijkste vragen op dit moment:

- Kan de manier van toevoegen van isolaat T5.3 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. Hierbij is een detectiemethode om de overleving en verspreiding van T5.3 in het teeltsysteem te onderzoeken belangrijk.

- Heeft T5.3 effect bij andere vormen van stress zoals hitte, hoge zoutconcentraties e.d. ? Hiervoor is kennis van het mechanisme van de groeiverbetering belangrijk. Kennis over de productie van groeihormonen, of ACC deaminase activiteit geeft meer inzicht in de mechanismen van plantengroei stimulering of reductie van planten-stress.

- Hoe kan het effect van T5.3 op plantengroeiverbetering ook in oudere teelten doorwerken? Moet de bacterie opnieuw toegevoegd worden, of zijn de plantomstandigheden belangrijk?

Referenties

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.
Einstufung 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.

Postma, J. & C.H. Hok-A-Hin, 2008.
Plantengroeistimulerende bacteriën bij verlaagde kastemperatuur. In: Energieprogramma PT/LNV. Plant Research International B.V., Rapport 175, pp. 30.

Bijlage I.

Karakteristieken van isolaat T5.3 en 4.56

DSMZ
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Identification of strain T5.3
(DSM ID 08-968)

21.11.2008

DSMZ GmbH
Inhoffenstraße 7 B
38124 Braunschweig
GERMANY

Shinella sp. (close related to *Shinella granuli*)

Properties of the strain

Shape of cells	rods
width µm	0.5-0.6
length µm	1.5-3.0
Gram reaction	-
Lysis by 3% KOH	-
Aminopeptidase (Cerny)	+
Oxidase	+
Catalase	+
Motility	+
Hydrolysis of	
gelatine	+
esculin	+
ADH	-
Urease	+
Nitratereduction	+
Malonat	-
Acid from mannitol	+
Acid from ethanol	-
Assimilation of	
glucose	+
arabinose	+
mannose	+
mannit	+
malat	+
adipat	-
citrat	-
caprat	-
gluconat	-
N-acetylglucosamin	+
alanin	+
fucose	+
rhamnose	+
sucrose	+
salicin	+
Growth with 2% NaCl	+
4% NaCl	-
Growth at 40°C	-

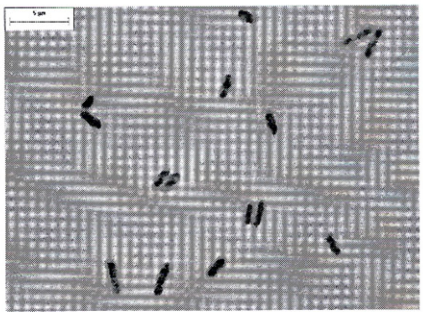
Result: strain T5.3
= *Shinella sp.*

The profile of the cellular fatty acids is typical for this taxonomic group.

The sequencing of the 16SrDNA shows the highest similarity with 99.1% to *Shinella granuli.*

Because of some differences the physiological tests do not allow to identify strain T5.3 clear with this species.

A DNA/DNA hybridisation of strain T5.3 with the typestrain of *Shinella granuli* might give more information.



DSMZ
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Identification of strain 4.56
(DSM ID 08-967)

13.11.2008

DSMZ GmbH
Inhoffenstraße 7 B
38124 Braunschweig
GERMANY

Variovorax paradoxus

Properties of the strain

Shape of cells	rods
width µm	0.7-0.8
length µm	1.2-2.5
Gram reaction	-
Lysis by 3% KOH	+
Aminopeptidase (Cerny)	+
Oxidase	+
Catalase	+
Motility	+
Hydrolysis of	
gelatine	-
esculin	-
ADH	+
Urease	-
Nitratereduction	-
Denitrification	-
Assimilation of	
glucose	+
arabinose	+
mannose	+
mannit	+
malat	+
adipat	+
citrat	-
caprat	+
gluconat	+
N-acetylglucosamin	-
malonat	-
trans-aconitat	-
D-tartrat	+
citraconat	+
p-hydroxybenzoat	-
L-histidin	-
xylose	-
fructose	+
acetat	+
sebacinat	+

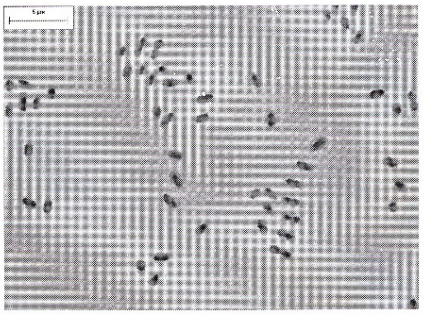
OF-test with xylose aerobic	-
anaerobic	-
Autotrophic growth	-

Result: strain 4.56 = *Variovorax paradoxus*.

The profile of the cellular fatty acids is typical for this taxon.

The partial sequencing of the 16SrDNA shows a similarity of 99.1% to the typestrain and up to 100% to other strains of this species.

The physiological data confirm this result.



Bijlage II.

Gemeten kastemperatuur en luchtvochtigheid

