

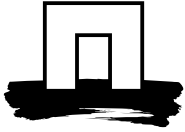


De invloed van ozon op de alternatieve ademhaling en carbon use efficiency

Evaluatie van de bevindingen van Crops Advance

Adrie van der Werf, Tom Dueck & Jan Snel





De invloed van ozon op de alternatieve ademhaling en carbon use efficiency

Evaluatie van de bevindingen van Crops Advance

Adrie van der Werf¹, Tom Dueck² & Jan Snel²

¹ Plant Research International
² Wageningen UR Glastuinbouw

© 2011 Wageningen, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO) onderzoeksinstituut Plant Research International. 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 DLO.

Voor nadere informatie gelieve contact op te nemen met: DLO in het bijzonder onderzoeksinstituut Plant Research International.

DLO is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



Ministerie van Economische Zaken,
Landbouw en Innovatie

Plant Research International, onderdeel van Wageningen UR

Adres : Postbus 616, 6700 AP Wageningen
: Wageningen Campus, Droevendaalsesteeg 1, Wageningen
Tel. : 0317 - 48 05 18
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : info.pri@wur.nl
Internet : www.pri.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
1. Inleiding	3
2. Evaluatie van de claims van Crops Advance	5
2.1 Theorie	5
2.1.1 Korte termijn stress-effecten	5
2.1.2 Lange termijn geheugeneffecten	5
2.1.3 Ademhaling en geheugeneffecten	7
2.2 Veldwaarnemingen	8
2.3 Begassingsexperiment	8
2.3.1 Methodiek	8
2.3.2 AOX in relatie tot ozon	9
3. Effecten van ozon op de groei van verschillende plantensoorten	13
3.1 Effecten van ozon op CUE en productie van roos: model simulaties	13
3.2 Veldwaarnemingen en evaluaties van ozon effecten op natuurlijke populaties	14
3.3 Conclusies	15
4. Referenties	17

Samenvatting

Conclusies

Uit de door Crops Advance aangeleverde data van veldproeven in Brazilië in combinatie met ademhalingsmetingen aan plantensoorten opgekweekt in klimaatkamers kunnen o.a. de volgende conclusies getrokken worden:

1. Door Crops Advance zijn waarnemingen gedaan en is onderzoek uitgevoerd waaruit blijkt dat de aanwezigheid van ozon, met name in de kritische vroeg-vegetatieve groeifase van gewassen veel grotere schade tot gevolg heeft dan tot dusver bekend is of aangenomen werd.
2. Stekken van moerplanten van roos die gesneden waren in het Braziliaanse voorjaar vertoonden zelfs na 5 jaar een aanzienlijk lagere opbrengst dan de stekken die in het najaar waren gesneden. Een zelfde effect werd waargenomen voor anjer. Crops Advance heeft aannemelijk gemaakt dat dit naar alle waarschijnlijkheid terug te voeren is op een memory-effect van ozon op de alternatieve ademhaling (AOX).
3. Bij plantensoorten opgekweekt in klimaatkamers leidde een verhoogde ozonconcentratie (± 60 ppbv) tot een hogere totale bladademhalingssnelheid van suikerriet (+24%) en katoen (+29%). Dit zal, aannemende dat andere groeibepalende processen constant blijven, onherroepelijk leiden tot een lagere carbon use efficiency (CUE) en productiviteit.
4. SHAM is gebruikt als remmer van de alternatieve oxidase. Uit de SHAM-metingen kan worden afgeleid dat ozon de alternatieve ademhaling stimuleert. De hiermee gegenereerde AOX waarden betreffen minimumwaarden, aangezien electronen kunnen 'overlopen' via de cytochromketen.
5. De resultaten van de SHAM-metingen zijn sterke aanwijzingen voor het bestaan van een memory-effect van ozon op de alternatieve ademhaling. Met andere woorden, planten die in hun jeugd een verhoogde concentratie ozon hebben ervaren en die vervolgens teruggezet worden naar de omgevingsconcentratie blijven een verhoogde alternatieve ademhaling en totale ademhalingssnelheid houden. Deze planten behouden daarmee een lagere CUE en dus een lagere productiviteit. Hierbij wordt aangenomen dat 'overloop-effecten' van electronen naar de cytochromketen relatief hetzelfde zijn voor controle en behandeling.
6. Dit memory-effect van ozon op de AOX, en de AOX waarden zoals gemeten aan plantensoorten opgekweekt in klimaatkamers, kunnen de lagere productie in de veldwaarnemingen mede verklaren. Zo laten de simulatiestudies (zie hoofdstuk 3) zien dat een verhoging van de ademhalingssnelheid van $\pm 30\%$ leidt tot een productieverlaging variërend van ca. 25-50%.
7. Ter bescherming van planten voor ozon wordt de AOT40 als maat gehanteerd. Deze is onvolledig omdat een AOT40 niet aangeeft hoeveel ozon de plant daadwerkelijk opneemt en tot ongewenste effecten kan leiden, maar geeft alleen aan hoeveel de plant 'ziet'.

Aanbevelingen m.b.t. beleid

- Door Crops Advance zijn waarnemingen gedaan en is onderzoek uitgevoerd waaruit blijkt dat de aanwezigheid van ozon, met name in de kritische vroeg-vegetatieve groeifase van gewassen veel grotere schade tot gevolg heeft dan tot dusver bekend is of aangenomen werd. De integratie van deze effecten van ozon in de interacties tussen NO_x, ozon en productiederving verdient daarom extra aandacht, enerzijds vanwege het belang voor de landbouw, anderzijds vanwege het mogelijke remmende effect op koolstofvastlegging door natuurlijke vegetaties en de mogelijke effecten op verandering in soortensamenstelling van ecosystemen.

Aanbevelingen m.b.t. vervolgonderzoek

- De literatuur over ozon-effecten op groei laat zien dat naast een verhoogde ademhalingsnelheid ook andere processen beïnvloed worden die de groei kunnen remmen. Het verdient aanbeveling dat in toekomstige studies deze processen (o.a. fotosynthesesnelheid, specifieke bladoppervlak, biomassa verdeling over organen) ook worden geanalyseerd.
- Aanbevolen wordt dat in toekomstige studies zowel productie als productiebepalende processen simultaan gemeten worden in één experiment, en dat naast deze parameters, ook kwaliteitsaspecten van de teelt worden bestudeerd in relatie tot ozon.
- De te bestuderen plantensoorten zouden van stek en van zaad afkomstig moeten zijn, om daarmee memory effecten te analyseren zowel binnen als tussen generaties.
- In deze studies zouden zowel tuinbouwgewassen als soorten uit natuurlijke ecosystemen bestudeerd moeten worden. Geschikte voorbeelden van tuinbouwgewassen zijn paprika, roos, anjer en radijs, en voorbeelden uit natuurlijke ecosystemen zijn klaver (*Trifolium* spp.), weegbree (*Plantago* spp.), raaigras (*Lolium* spp.), populier (*Populus* spp.) en fijnspar (*Picea abies*).

1. Inleiding

Door Crops Advance zijn waarnemingen gedaan en is onderzoek uitgevoerd waaruit blijkt dat de aanwezigheid van ozon, met name in de kritische vroeg vegetatieve groeifase van gewassen, veel grotere schade tot gevolg heeft dan tot dusver bekend is of aangenomen wordt. Een verband werd gelegd tussen het tijdstip waarop rozen worden gestekt en de groei en productie gedurende een aantal jaren. Planten die gestekt en opgekweekt werden op een tijdstip met verhoogde stress (met hogere ozonconcentraties), groeiden minder in de latere teelt(en). Verondersteld werd dat het effect van stress tijdens deze vroeg vegetatieve fase door planten 'onthouden' wordt (memory effect). Er werd verondersteld dat deze stress leidt tot een verhoogde ademhaling, en met name de alternative oxidase (AOX) zou hierdoor opgeschakeld zijn. Als gevolg hiervan leggen de planten permanent minder koolstof vast, ook als er geen ozonschade aan de planten zichtbaar is. Afhankelijk van gewas en omstandigheden, werd bij productie-gewassen in Brazilië een variatie van een factor 3-4 in productie-opbrengst vastgesteld.

Voor Nederland is door het RIVM een jaarlijkse toename (2%) in ozon voorspeld, waardoor de mogelijke consequenties voor de tuinbouw alsmar groter kunnen worden.

Daarom is Wageningen UR door het ministerie van EL&I gevraagd om de door Crops Advance aangereikte informatie te evalueren en in te schatten of vergelijkbare problemen zich voor Nederland reeds voordoen, danwel in het verschiet liggen. Met deze evaluatie wordt enerzijds een uitspraak verwacht over de betrouwbaarheid van de studie van Crops Advance. Anderzijds wordt een inventarisatie gevraagd van de bestaande kennis over carbon use efficiency (CUE) in tuinbouwgewassen, de rol van stress in de regulatie van de AOX, en of er een mechanisme bekend is die voor de permanente aanschakeling van de AOX verantwoordelijk is. Met deze informatie zou er ook een eerste schatting van de productieverliezen t.g.v. huidige en toekomstige ozonconcentraties in Nederland gemaakt kunnen worden.

2. Evaluatie van de claims van Crops Advance

Om de consequenties van verhoogde ozonconcentraties in Nederland goed in te kunnen schatten, is het van belang een aantal aspecten van de claims gemaakt door Crops Advance te evalueren. Deze evaluatie kan onderverdeeld worden in drie vragen die door Crops Advance zijn gesteld:

1. *Theorie*
Is het theoretisch mogelijk dat er door ozon een permanente opschakeling van AOX veroorzaakt kan worden?
2. *Veldwaarnemingen aan roos en anjer in Brazilië*
Zijn de productiviteitwaarnemingen aan roos en anjer voldoende aanleiding om te veronderstellen dat de vroeg generatieve fase (tijdstip waarop gestekt wordt) gecorreleerd is aan de groei en productie?
3. *Begassingsexperiment*
Zijn de waarnemingen aan het achttal plantensoorten dat blootgesteld is aan ozon in klimaatkamers voldoende aanleiding om te veronderstellen dat ozon de AOX kan opschakelen en vervolgens leidt tot groei reductie, ook als de planten geen ozon stress meer ervaren (=memory-effect van ozon op AOX)?

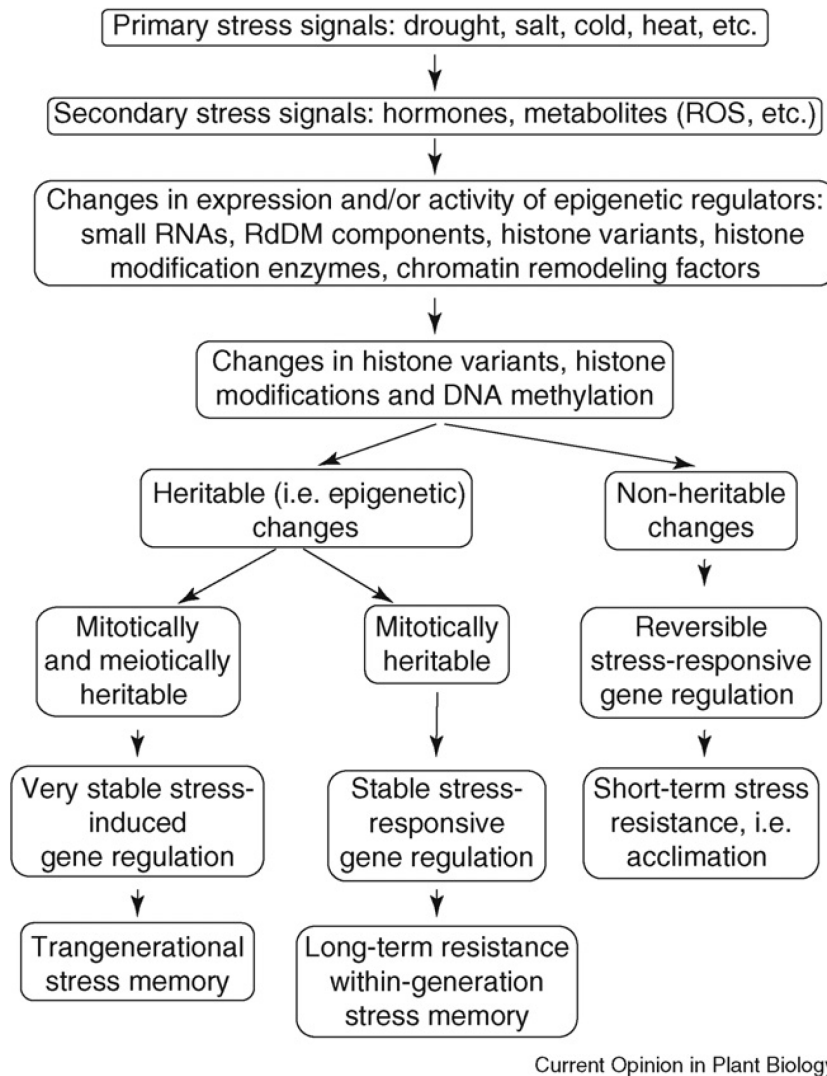
2.1 Theorie

2.1.1 Korte termijn stress-effecten

Stress reacties in planten en dieren kunnen zich op verschillende manieren manifesteren en vinden plaats op zowel het morfologische, fysiologische als het moleculaire niveau. In veel gevallen leidt deze stress respons tot een lagere groeisnelheid en verminderde jaarlijkse productiviteit. Zo zullen planten die nutriëntenstress krijgen opgelegd relatief meer van de dagelijks gefixeerde koolstof via de fotosynthese naar de wortels alloceren en minder naar de bladeren. Rationale hierachter is dat planten op deze wijze een grotere kans hebben de spaarzaam beschikbare nutriënten te bemachtigen. Consequentie is dan wel dat planten een lagere 'leaf area ratio' krijgen (bladoppervlak per eenheid plantgewicht) en daarmee een lager lichtonderscheppend vermogen en dus een lagere groeisnelheid (bijv. Van der Werf et al., 1993). Bij een verlaging van lichtintensiteit zal de fotosynthesesnelheid per eenheid bladoppervlak omlaag gaan. Planten weten dit gedeeltelijk te compenseren door het bladoppervlak op niveau te houden met een geringere bladbiomassa (Poorter & Van der Werf, 1998). Naast licht en nutriëntenbeschikbaarheid zijn er nog vele andere omgevingsfactoren waaraan planten niet kunnen ontsnappen. Zo reageren planten zowel fysiologisch, biochemisch als via genetische expressie op bijvoorbeeld extreme koude, hitte en droogte. Zo produceert radijs antivraat stoffen als zij aangevreten worden door rupsen (Agrawal et al., 1999). Dieren zijn minder statisch en kunnen stressvolle omgevingen veelal ontsnappen. Toch reageren dieren ook op stress met allerlei fysiologische en biochemische reacties.

2.1.2 Lange termijn geheugeneffecten

Minder bekend en toch al veel beschreven zijn de zogenaamde geheugeneffecten, waarbij de aanpassingen aan stress van de ouders overgedragen worden op de nakomelingen of binnen 1 generatie gehandhaafd blijven zelfs nadat de stressfactor is opgeheven (Figuur 1). Zo alloceren nakomelingen van Perzikkruid (*Polygonum persicaria*) waarvan de ouders zijn opgegroeid bij laag licht omstandigheden, meer biomassa naar de spruit onder hoog licht omstandigheden dan nakomelingen van ouders die opgegroeid zijn bij hoog licht (Sultan, 1996). Nakomelingen van nutriënten gelimiteerde ouders vertonen dezelfde planteigenschappen (meer allocatie naar wortels) ondanks het feit dat deze nakomelingen geen nutriëntenstress hebben ervaren (Sultan, 1996).

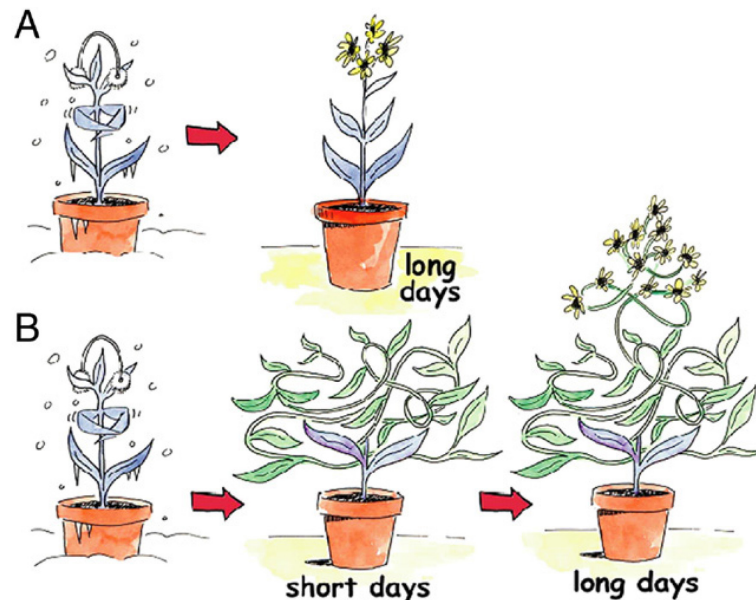


Figuur 1. Epigenetic regulation of stress tolerance. Primary and secondary stress signals induce changes in the expression and/or activity of epigenetic regulators namely, small RNAs, RdDM components, histone variants, histone modification enzymes, and chromatin remodeling factors. These epigenetic regulators modify histone variants, histone modifications, and DNA methylation. Some of these are heritable epigenetic modifications, while others are transient changes. Transient chromatin modifications mediate acclimation response. Heritable epigenetic modifications provide within-generation and transgenerational stress memory.
From: Chinnusamy¹ and Jian-Kang Zhu². Current Opinion in Plant Biology 2009, 12:133-139.

In de afwezigheid van rupsen produceren de nakomelingen van radijs, waarvan de ouders aangevreten zijn door rupsen, toch een anti-vraat stof (Agrawal et al., 2002), dit in tegenstelling tot de nakomelingen van ouders die niet aangevreten zijn door rupsen. Ook muizen vertonen dit soort reacties waarbij de nakomelingen dezelfde stress respons vertoonden als de ouders, ondanks dat deze nakomelingen geen stress hebben ervaren (Weaver et al., 2007). Stresseffecten binnen 1 generatie kunnen ook van epigenetische aard zijn (Rohde & Junttila, 2008). Volgende figuur toont een dergelijk epigenetisch geheugeneffect op vernalisatieprocessen (het blootstellen van zaden aan lage temperaturen om te kunnen kiemen) (Figuur 2). Oksanen & Saleem (1999) hebben aangetoond dat de groei van Ruwe berk (*Betula pendula*) achter bleef, 2 jaar nadat de planten uit verhoogd ozon waren teruggezet in ambient ozon. De bladeren die de 2 daarop volgende seizoenen zijn gevormd vertoonden o.a. een verlaagde Rubisco concentratie en verlaagde chlorofylgehaltenes. Deze eigenschappen kunnen de vertraagde groei verklaren, dit ondanks

het feit dat de nieuw gevormde bladeren geen ozon stress meer hebben ervaren. Min of meer gelijke reactie vonden Lippert et al. (1997) voor Fijnspar (*Picea abies*).

De laatste 10 jaar is er sprake van een groeiende aandacht voor dit soort epigenetische reacties. Rapp & Wendel (2005) verwoorden dit als 'een verandering van het fenotype, morfologisch of moleculair zonder een verandering in de coderingsvolgorde van het DNA'. Alhoewel de mechanismen nog niet ontrafeld zijn, kan op basis van de vele publicaties op dit gebied geconcludeerd worden dat epigenetische effecten meer 'common good' zijn dan tot nu toe gedacht (bijv. Bond & Finnegan, 2009; Grant-Downton & Dickinson, 2005).



Figuur 2. (A) Hyoscyamus niger (henbane) is a plant with an obligate requirement for both vernalization and long days to flower. (B) Melchers and Lang demonstrated that vernalization causes a mitotically stable change in meristem competence. Vernalized henbane will grow vegetatively under non-inductive photoperiods. If these same plants are shifted at some later time to long days they will rapidly flower. Thus, these plants 'remember' a prior exposure to a vernalizing cold treatment. From: R Amasino - The Plant Cell Online, 2004.

2.1.3 Ademhaling en geheueffecten

In de literatuur zijn geen aanwijzingen gevonden voor epigenetische stress-effecten op de ademhaling dan wel de alternatieve oxidase (AOX) in de mitochondriale ademhalingsketen. Crops Advance heeft dit proces als eerste beschreven. Echter in diverse publicaties worden wel geheueffecten op fysiologie, biochemie en morfologie beschreven (Lippert et al., 1997, Soja et al., 2007). De mechanismen zijn nog niet opgehelderd, maar gezien de vele publicaties op het gebied van de epigenetica kan niet uitgesloten worden dat na een stress (hoge ozonconcentratie) de AOX permanent opgeschakeld is. De alternatieve ademhaling (AOX) in de ademhalingsketen heeft diverse functies, waaronder waarschijnlijk het reduceren van ROS (reactive oxygen species) formatie. Ozon kan in de plant leiden tot het vrijkomen van vrije zuurstof radicalen en waterstof peroxide (H_2O_2). Deze ROS kunnen desastreuze effecten hebben op onder andere fysiologie, celwandintegriteit en kunnen leiden tot 'programmed cell death' (o.a. Sing Gill & Tuteja, 2010). Door een verhoogde AOX activiteit wordt de stroom van electronen uit de ubiquinone pool deels weggesluisd. Hiermee kan ROS formatie worden voorkomen danwel verminderd. Zo vonden Ederli et al., (2006) inderdaad dat directe blootstelling aan 150 ppbv O_3 leidde tot een verhoging van de AOX activiteit en haar expressie niveau. Biswas et al. (2008) vonden dat de ademhaling voor 20 cultivars van wintertarwe bij blootstelling aan verhoogde ozonconcentraties aanzienlijk was verhoogd (+28%). Ook Crops Advance vond in hun groeikamerexperimenten onder ± 60 ppbv ozon, verhoging van de ademhaling in dezelfde orde van grootte voor katoen ($\pm 29\%$) en voor suikerriet ($\pm 24\%$).

2.2 Veldwaarnemingen

De bevindingen van Crops Advance op het gebied van productiviteitsverschillen berusten op het principe memory effecten binnen 1 generatie (zie 2.1.2). Zo vonden zij dat rozenstekken die geplant waren in het Braziliaanse voorjaar zelfs na 5 jaar een aanzienlijk lagere opbrengst hadden dan de stekken die in het najaar waren geplant. Een min of meer zelfde effect werd waargenomen voor anjer. Hun verklaring (claim) is dat dit te maken heeft met het brandseizoen voor suikerriet in het Braziliaanse voorjaar. Bij deze massale bladverbranding van suikerriet als cultuurmaatregel voor de oogst ontstaan abrupt relatief hoge ozon concentraties. Gedachtengang was vervolgens dat ozon de Carbon Use Efficiency (CUE; verademde koolstof per eenheid gefixeerde koolstof) zou verlagen en daarmee de productie over de jaren heen. Vraag hierbij was welke fysiologische/morfologische processen hiervoor verantwoordelijk zouden kunnen zijn.

Crops Advance veronderstelde nu dat de grote verschillen in rozen- en anjerproductie tussen stekken geplant in het voorjaar en het najaar het gevolg zijn van O₃ effecten op de AOX activiteit en dat deze AOX activiteit een memory-effect heeft. M.a.w. de condities waaronder de stekken zijn geplant (normaal en verhoogde O₃) zijn bepalend voor de CUE over de jaren heen. Een verhoogde AOX zou leiden tot een hogere respiratiesnelheid en daarmee een verlaagde CUE.

Om deze hypothese te testen heeft Crops Advance een aantal experimenten uitgevoerd, met name met suikerriet (C4-gewas) en katoen (C3-gewas). Naast deze gewassen zijn nog een vijftal andere gewassen geanalyseerd. Echter door gebrek aan tijd/capaciteit kon slechts aan bovengenoemde 2 gewassen de ademhaling (AOX) gemeten worden. De resultaten zijn door Crop Advance ter beschikking gesteld. In paragraaf 2.3 wordt ingegaan op de blootstellingen aan ozon, de meettechnieken en metingen van de ademhaling in deze experimenten.

2.3 Begassingsexperiment

Deze evaluatie is gebaseerd op de beschrijving van het begassingsexperiment waarin planten werden blootgesteld aan ozon. Hierbij worden de gebruikte technieken bij de begassing, apparatuur, meetprotocollen en data (verwerking) bekeken. Daarnaast is gekeken naar de meetresultaten van de AOX en hoe zij zich verhoudt tot blootstelling aan ozon.

2.3.1 Methodiek

Het aangeleverde hoofdstuk 'Materials & Methods' werd na terugkoppeling met Crops Advance opgehelderd en een aantal technische aspecten daaruit worden hierna besproken. De gebruikte apparatuur voldoet aan de eisen gesteld voor een dergelijk begassingsexperiment. Echter de waarnemingen binnen een compartiment zijn afhankelijke waarnemingen, waardoor de resultaten alleen met een eenvoudige toets geanalyseerd kunnen worden. Vanwege de hoge kosten van deze experimenten kon niet altijd de juiste controleproef worden uitgevoerd. Ondanks deze punten biedt de proefopzet voldoende aanleiding om de resultaten serieus te nemen.

Technische aspecten

De gebruikte apparatuur voldoet aan de geldende eisen voor een goede gasuitwisseling in de compartimenten. Voor wat betreft de technische aspecten van de begassing is het helder dat de planten in de 3 klimaatkamers zijn blootgesteld aan verschillende concentraties van ozon (ca. 0, 30 en 60 ppbv). Dat verschillende plantensoorten in dezelfde klimaatkamer exact dezelfde blootstelling hebben ondergaan is niet waarschijnlijk doordat de weerstanden van de soorten verschillen. Deze mogelijke verschillen vallen echter in het niet bij de aangebrachte verschillen in ozonconcentratie tussen de klimaatkamers en kunnen dus als onbelangrijk beschouwd worden. Dat dezelfde plantensoorten in de drie klimaatkamers dezelfde hoeveelheid luchtstroom, al dan niet aangevuld met ozon, hebben gehad is zeer aannemelijk. Het ligt daarom in de lijn der verwachtingen dat de aangelegde verschillen in concentraties tussen behandelingen de gemeten effecten op ademhaling sterk zullen beïnvloeden.

Hieronder enkele specifieke opmerkingen over de techniek:

- De luchtsnelheden binnen de compartimenten in één klimaatkamer zijn niet afzonderlijk gemeten, maar, binnen de klimaatkamer wel. Verondersteld wordt (door Crops Advance) dat bij overdruk en gelijke weerstand (gaten in plantcompartimenten, planten in de compartimenten) een gelijke luchtsnelheid aanwezig was, maar dat is niet zeker. Grote afwijkingen kunnen echter niet verwacht worden.
- De luchtverdeling over de compartimenten is niet gemeten, en een laminaire luchtstroming, dat een homogene blootstelling aan ozon waarborgt, is niet waarschijnlijk gezien het aantal gaten waardoor de lucht gaat. Dus al weten we niet goed of de condities tussen compartimenten binnen 1 klimaatkamer gelijk zijn, wordt verondersteld dat dit wel het geval was bij dezelfde plantensoorten in de drie klimaatkamers.
- De ingaande lucht met ozon wordt aangeboden aan 6 compartimenten tegelijk, met een lichte mate van overdruk in de klimaatkamer. De luchtstroom gaat vervolgens door 2 openingen elke compartiment in, en ook door 2 openingen elk compartiment uit. Verondersteld wordt dat de lucht exact dezelfde weerstand ondervindt als het door ieder compartiment gaat (openingen en luchtflow door de compartiment moeten gelijk zijn), maar dat is niet zeker. De ideale verdeling is bijvoorbeeld met drukkamer en geperforeerde plaat aan de ingang. Het oppervlak van het front van een compartiment is $90 \times 140 \text{ cm} = 1,26 \text{ m}^2$, waarin de 2 gaten zijn voor lucht toevoer. Een berekening van de mogelijke verversingslucht laat zien dat er een luchtsnelheid van ongeveer 0,2 m/s heeft gehoeft, terwijl in het algemeen een luchtsnelheid van 0.5 m/s wordt nagestreefd.
- Regeling van de luchtvochtigheid lijkt voldoende goed te werken, al is het handhaven van een RV van 75-85% moeilijk bij deze windsnelheden. De gebruikte drainwaterfilter is een vijver UV filter tegen algen maar niet voor sterilisatie. Bij navraag blijkt dat het met succes werd ingezet om bacteriëngroei in condenswater tegen te gaan.
- Ozon werd gemonitord voordat het de compartimenten inging, maar niet in de afzonderlijke compartimenten. Net zoals hierboven is de vraag hoe vergelijkbaar de luchtsnelheden, ozon concentraties en verder condities binnen elke compartiment zijn. De O_3 analyzers zijn van 2B-Tech USA en zijn geijkt en met certificaat. Om adsorptie van ozon te voorkomen zijn speciale leidingen vereist; bij navraag blijkt dat de gebruikte leidingen voldoen (Nafion leidingen van 2B-Tech USA). Ze zouden ook condensvorming tegen moeten gaan maar doen dat niet. Wel elimineren ze de invloed van wisselingen in RV wat voor de proef afdoende was.

2.3.2 AOX in relatie tot ozon

Crops Advance heeft aan 2 plantensoorten begassingsexperimenten uitgevoerd. Hieronder treft u in samenvatting de opzet, de resultaten en de daaruit te trekken conclusies.

Resultaten katoen

Opzet

1. 70 dagen opgegroeid bij 0, 30 of 60 ppbv

Resultaat

Tabel 1. Waarden in $\text{nmol O}_2/\text{gdw/s}$ voor totale ademhalingssnelheid (TR), cytochroom oxidase activiteit (COX) en alternatieve oxidase activiteit (AOX) bij verschillende ozonconcentraties.

	Ozonconcentratie		
	0 ppbv	30 ppbv	60 ppbv
TR	10.4	12.1	13.4
COX	7.7	8.5	8.6
AOX	2.7	3.6	4.8

Conclusie

Bij een toenemende ozon concentratie neemt de totale ademhaling toe, o.a. door een toename van de AOX activiteit. Dit past bij de gangbare theorie (voorkomen van radicaalvorming). Verhoogde TR is een aanwijzing voor een lagere CUE.

2. 70 dagen bij 60 ppbv en vervolgens teruggezet naar 0 ppbv voor 8 dagen

Resultaat

Tabel 2. Waarden in nmol O₂/gdw/s voor totale ademhalingsnelheid (TR), cytochroom oxidase activiteit (COX) en alternatieve oxidase activiteit (AOX) bij verschillende ozonconcentraties.

	Ozonconcentratie		
	0 ppbv	60 ppbv	70 dagen 60 ppbv → 8 dagen 0 ppbv
TR	10.4	13.4	15.8
COX	7.7	8.6	10.2
AOX	2.7	4.8	5.6

Conclusie

Na 8 dagen terug bij 0 ppbv ozon blijft de AOX op een hoog niveau (= memory effect volgens Crops Advance). TR blijft op een hoog niveau, en zou daarmee de Carbon Use efficiency en daarmee productiviteit kunnen verlagen (zie hoofdstuk 3).

Onderstaande data zijn gecompileerd uit de gegevens die Crops Advance ter beschikking heeft gesteld (Tabel 4).

Tabel 3. Waarden in nmol O₂/gdw/s voor totale ademhalingsnelheid (TR), cytochroom oxidase activiteit (COX) en alternatieve oxidase activiteit (AOX) bij verschillende ozonconcentraties.

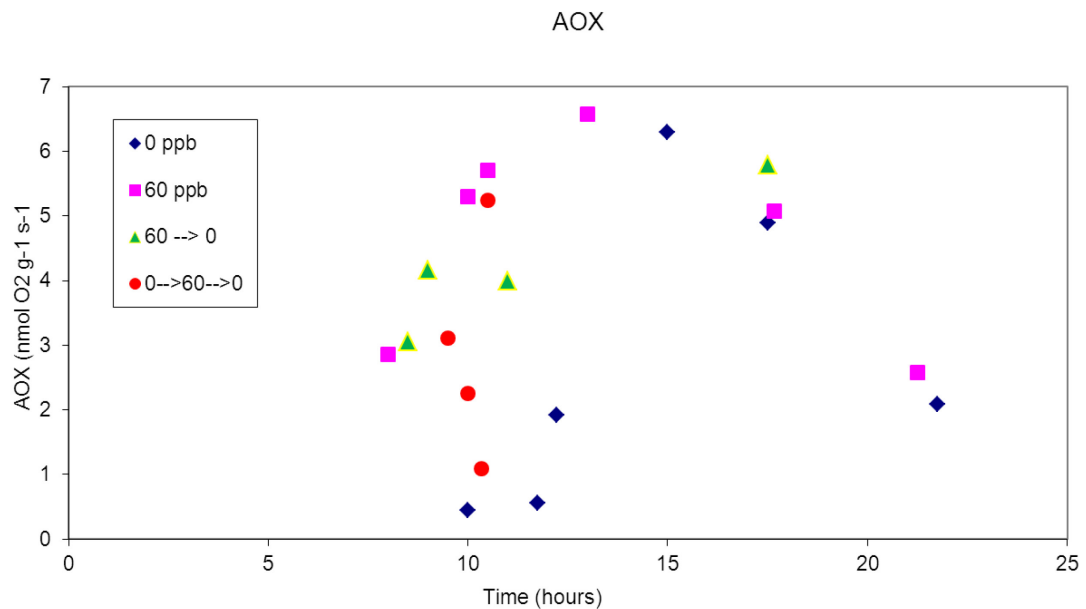
ppbv	COX	TR	AOX	AOX
	with SHAM	without SHAM		% TDR
0	7.7	10.4	2.7	26%
0 → 30	9.0	12.9	3.9	30%
0→60	6.9	11.4	4.5	40%
0→60→0	10.6	14.2	3.5	25%
30	8.5	12.1	3.6	30%
60	8.6	13.4	4.8	36%
60 → 0	10.2	15.8	5.7	36%

Suikerriet

Opzet

Planten zijn 70 dagen opgekweekt bij 0 & 60 ppbv. Vervolgens zijn er 2 extra behandelingen toegepast: van 60 ppbv op dag 70 naar 0 ppbv en van 0 ppbv op dag 70 naar 60 ppbv gedurende 33 dagen en vervolgens weer terug naar 0 ppbv (Tabel 5 en Figuren 1-3).

Resultaten



Figuur 3. Verloop van de AOX over de dag.

Conclusie

Geïntegreerd over de dag verademen de 60 ppbv planten aanzienlijk meer dan de 0 ppbv planten: katoen \pm 29% meer en suikerriet \pm 24% meer. Dit zal naar alle waarschijnlijkheid leiden tot een lagere CUE. Planten die in de vroeg vegetatieve fase 60 ppbv hebben ervaren en na 70 dagen worden geplaatst in 0 ppbv ozon vertonen zelfs na 33 dagen in 0 ppbv ozon nog steeds dezelfde karakteristieken als de 60 ppbv planten. De planten die in de vroeg-vegetatieve fase 0 ppbv ozon hebben ervaren en na 70 dagen worden geplaatst in 60 ppbv ozon vertonen daar dezelfde karakteristieken als de 60 ppbv planten. Na 33 dagen in 60 ppbv ozon, bij terugzetten in 0 ppbv ozon, treedt een lineair herstel op en zijn op dag 5 na terugzetten, terug op hun oude, relatief lage ademhalingsniveau. Dit duidt op een memory effect.

Algemene conclusies ademhalingsmetingen

1. Een verhoogde ozonconcentratie leidde tot een hogere totale bladademhalingsnelheid van suikerriet en katoen. Dit zal, aannemende dat andere groei bepalende processen constant blijven, onherroepelijk leiden tot een lagere carbon use efficiency (CUE) en productiviteit.
2. SHAM is gebruikt als remmer van de alternatieve oxidase. Uit de SHAM-metingen kan worden afgeleid dat ozon de alternatieve ademhaling stimuleert. De gevonden waarden betreffen een minimumwaarde, aangezien elektronen zouden kunnen 'overlopen' via de cytochroomketen (o.a. Day et al., 1996, H. Lambers, pers. communicatie).

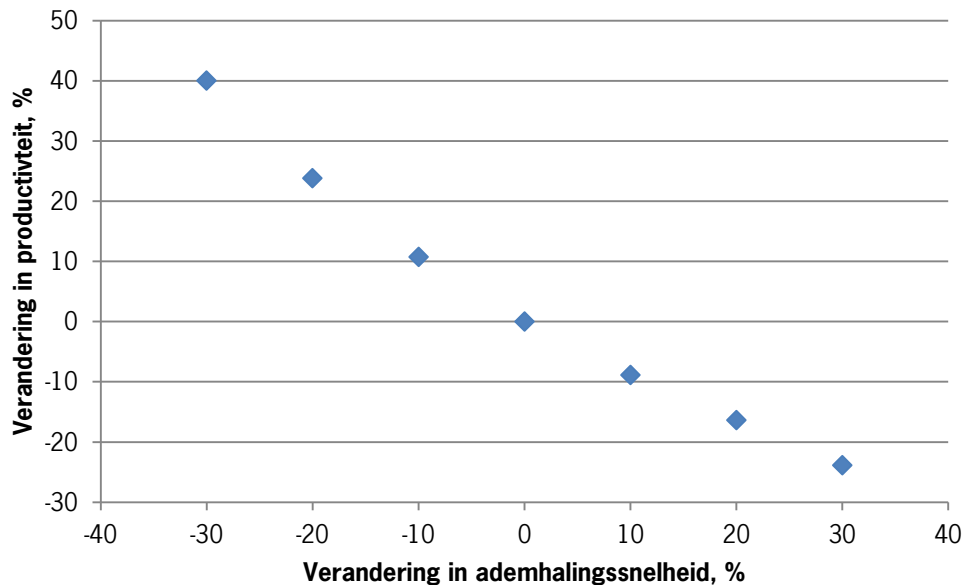
3. De resultaten van de SHAM-metingen zijn sterke aanwijzingen voor een memory-effect van ozon op de alternatieve ademhaling. Met andere woorden, planten die in hun jeugd een verhoogde concentratie ozon hebben ervaren en die vervolgens teruggezet worden naar de omgevingsconcentratie blijven een verhoogde alternatieve ademhaling en totale ademhalingsnelheid houden. De planten die geen stress meer ervaren behouden daarmee een lagere CUE en dus een lagere productiviteit. Hierbij wordt aangenomen dat 'overloop-effecten' van electronen naar de cytochroomketen relatief hetzelfde zijn voor de controle en behandeling.

3. Effecten van ozon op de groei van verschillende plantensoorten

Een van de doelstellingen van deze evaluatie opgedragen door het ministerie van EL&I is de schatting van de effecten van ozon (30 en 60 ppbv) op carbon use efficiency en productie in een landbouwkundig systeem.

3.1 Effecten van ozon op CUE en productie van roos: model simulaties

In de land- en tuinbouwgewassen zijn verschillende manieren van het berekenen van de CUE in omloop. In de volgende berekeningen wordt uitgegaan van de hoeveelheid geproduceerde biomassa gedeeld door de integraal van fotosynthese (in mol C) over het seizoen. Hiermee wordt de CUE en productie van een meerjarig (roos) tuinbouwgewas gedurende één teelt bepaald. Voor roos werd er gerekend over 2 jaren, omdat er in het eerste jaar in een rozengewas nog stabilisatie optreedt. Er werd berekend vanaf dag 75 (16 maart). Met behulp van het INTKAM-model (Gijzen, 1994, Marcelis et al., 2000) werd het effect van een verhoging van de ademhaling (groei- plus onderhoudsademhaling van de bovengrondse biomassa) van 10%, 20% en 30%, zowel positief als negatief, op de CUE en productie gesimuleerd. Een verhoging van de ademhalings met 30% laat een opbrengstderving van ca. 25% zien (Figuur 4). De procentuele verandering in CUE correspondeert met de procentuele verandering in productiviteit.



Figuur 4. Effect van een verandering van de ademhalingsnelheid van de bovengrondse biomassa op de productiviteit van roos. Voor de controle werd een productie gesimuleerd van 11082 g m² en een CUE van 0.389.

Voor graslandsoorten in het juveniele stadium zijn de effecten van een verhoogde ademhalingsnelheid groter. Uitgaande van een drooggewicht van 1 mg en een verhoging van de spruitademhalingsnelheid van 30%, treedt er een productieverlies op tussen de 25 en 43 % na 30 dagen groei (data afkomstig uit Van der Werf et al., 1993a,b).

Tabel 4. Gesimuleerde drogestofproductie in mg na 30 dagen groei in een klimaatkamer, uitgaande van een startgewicht van 1 mg DW.

Soort	Contr	+30% SR	Reductie %
Briza media	332	197	41
Brachypodium pinnatum	490	265	46
Dactylis glomerata	6995	5261	25
Holcus lanatus	5224	2963	43
Gemiddeld	3260	2172	39

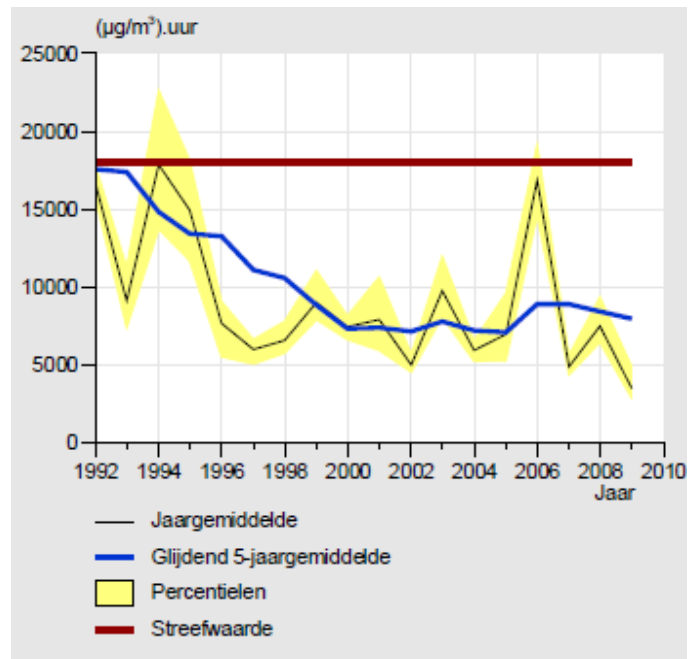
Conclusies

Een verhoogde permanente ademhaling als gevolg van een opschakeling van de AOX kan leiden tot productie-verliezen variërend tussen ca. 25-46%. Voor roos onder Nederlandse omstandigheden werden geringere effecten gesimuleerd dan de gemeten aan rozen in Brazilië. Naast de door Crops Advance aangetoonde effecten van ozon op de ademhaling geeft de literatuur ook lange termijn geheugeneffecten op andere groeibepalende processen. Aanbevolen wordt bij eventuele toekomstige experimenten deze processen ook in de analyses mee te nemen. Wel is duidelijk dat de memory-effecten van ozon op ademhaling de productie van bijv. roos op de langere termijn aanzienlijk negatief kunnen beïnvloeden.

3.2 Veldwaarnemingen en evaluaties van ozon effecten op natuurlijke populaties

De concentraties aan ozon in Nederland en in Brazilië zijn goed vergelijkbaar en de blootstelling van gewassen en vegetaties aan ozon ligt op een vergelijkbare niveau. De twee belangrijkste luchtcomponenten verantwoordelijk voor de vorming van ozon zijn VOC's en NOx. De uitstoot van VOC's lijkt in de meeste Europese landen onder het afgesproken emissieplafond te zullen vallen. In een aantal Europese landen, waaronder Nederland, is de uitstoot van NOx echter een potentieel probleem, en onbekend is of het afgesproken emissieplafond voor NOx gehaald zal worden. Een reductie in de NOx uitstoot in Nederland is een belangrijke voorwaarde om de ozonconcentraties in Nederland binnen de streefwaarde te kunnen houden.

De luchtkwaliteit in Nederland wordt gemeten door het Landelijk Meetnet Lucht. Die laten zien dat er aanzienlijke fluctuaties kunnen optreden in de ozonconcentraties in Nederland (Figuur 5). Met name 1994 en 2006, de jaren met pieken in ozonconcentraties, zijn ook jaren met een hittegolf in Nederland. In de periode 1995 - 2000 is een afname te zien, maar na 2000 lijkt het gestabiliseerd te zijn. Al zijn de ozonconcentraties veel lager dan de streefwaarde voor 2010, het blijft nog steeds boven de langetermijndoelstelling voor Nederland (6.000 $\mu\text{g m}^{-3} \text{h}$). Deze normen zijn geformuleerd met het oog op de bescherming van vegetatie.



Figuur 5. Ontwikkeling van ozonconcentraties in Nederland (uit: Mooibroek et al., 2010).

In een overzicht van het RIVM in Bilthoven (Sterkenberg, 2011) wordt de huidige kennis over de effecten van ozon in Nederland samengevat. Daarin worden effecten op natuurlijke vegetaties, bossen en landbouwgewassen besproken en wordt hieronder samengevat:

Onderzoek naar de effecten van ozon op semi-natuurlijke vegetaties in Nederland (Dueck et al., 2002) is uitgevoerd met behulp van vegetatieopnames van het provinciale florameetnet van de provincie Zuid-Holland over de jaren 1987 - 2000. Door het verloop van de flora meetgegevens te relateren aan het verloop van de blootstelling aan ozon in het voorafgaande jaar, vonden zij een correlatie tussen blootstelling en ozon effecten. Het voorkomen van sommige soorten werd door ozon negatief beïnvloed, terwijl andere soorten juist in hogere mate voorkwamen bij toenemende ozonblootstelling. Dit komt waarschijnlijk doordat deze soorten relatief ongevoelig zijn voor ozon, en zich kunnen uitbreiden door afnemend voorkomen van concurrerende gevoelige plantensoorten.

Vanwege de interactie met pathogenen en herbivoren zijn de effecten van ozon op bossen moeilijk vast te stellen, maar ook voor bossen is het zo dat blootstelling aan ozon kan leiden tot negatieve effecten. Voor wat betreft andere gewassen (graslanden, granen) blijkt ozon tot opbrengstreducties te leiden voor de Nederlandse situatie.

Aangegeven wordt in het overzicht van het RIVM (Sterkenburg, 2011) dat op basis van de AOT40, de langetermijn-doelstelling in delen van Nederland wordt overschreden.

3.3 Conclusies

- Gezien de steeds stijgende ozonconcentraties sinds de industriële revolutie en de geheugeneffecten van ozon op de ademhaling, mag verwacht worden dat de productie van natuurlijke ecosystemen onder hun potentieel zit. Een verdere verhoging van de ozonconcentratie als gevolg van een hogere NO_x uitstoot zou dus mogelijkwijs kunnen leiden tot een lagere jaarlijkse koolstofvastlegging. Deze interactie en de kwantitatieve rol die vegetaties hierbij spelen dient verder onderzocht te worden.
- Dat de tot nu toe gebruikte benaderingen voor ozoneffecten op vegetaties in Nederland onvolledig zijn is helder. Er wordt gemeten met 'blootstelling aan ozon' als maatgevend, terwijl men bij voorkeur 'opgenomen hoeveelheid ozon' zou willen gebruiken. Dat laatste is echter niet nauwkeurig te meten in het veld. Vooralsnog lijken landbouwgewassen en graslanden het meeste risico te lopen met vermindering van de productie, en weilanden en andere ecosystemen met verlies aan natuurwaarde en een mogelijke reductie in koolstofvastlegging.

4. Referenties

- Agrawal, A.A., J.K. Conner, M.T.J. Johnson & R. Wallsgrove, 2002.
Ecological genetics of an induced plant defense against herbivores: additive genetic variance and costs of phenotypic plasticity. *Evolution* 56, 2206-2213.
- Amasino, R., 2004.
Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter 2004. *The Plant Cell* 16, 2553-2559.
- Biswas, D.K., H. Xu, Y.G. Li, Z. Wang, G. Han & G.M. Jiang, 2008.
Genotypic differences in leaf biochemical, physiological and growth response to ozone in 20 winter wheat cultivars released over the past 60 years. *Global Change Biology*, 14, 46-59.
- Bond, D.M. & E.J. Finnegan, 2007.
Passing the message on: inheritance of epigenetic traits. *Trends in Plant Science*, 5, 211-216.
- Chinnusamy, V. & J.K. Zhu, 2009.
Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 133-139.
- Day, D.A., K. Krab, H. Lambers, A.L. Moore, J.N. Siedow, A.M. Wagner & J.T. Wiskisch, 1996.
The cyanide-resistant oxidase: To inhibit or not to inhibit, that is the question. *Plant Physiology* 100, 1-2.
- Dizengremel, P., 2001.
Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant Physiological Biochemistry* 39, 729-742.
- Dueck, Th.A., C.J. van Dijk, W. de Visser, A.E.G. Tonneijck & A. van der Werf, 2002.
Ozon en semi-natuurlijke vegetaties in de provincie Zuid-Holland. Nota 209. *Plant Research International, Wageningen*.
- Ederli, L., R. Moretti, A. Borgogni, C. Wasternack, O. Miersch, L. Reale, F. Ferrantini, N. Tosti & S. Pasqualini, 2006.
Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant Physiology* 142, 595-608.
- Gijzen, H., 1994.
Development of a simulation model for transpiration and water uptake and an integral growth model. AB-DLO Report 18. AB-DLO, Wageningen.
- Grant-Downton, R.T. & H.G. Dickinson, 2005.
Epigenetics and its implication for Plant Biology. 1. The epigenetic network in plants. *Annals of Botany* 96, 1143-1164.
- Langebartels, C., W. Heller, G. Fuhrer, M. Lippert, S. Simons & H. Sandermann, 1998.
Memory effects in the action of ozone on conifers. *Ecotoxicology & Environmental Safety* 41, 62-72.

- Lippert, M., K. Steiner, T. Pfirrmann & H.D. Payer, 1997.
Assessing the impact of elevated O₃ and CO₂ on gas exchange characteristics of differently K supplied clonal Norway spruce trees during exposure and the following season. *Trees* 11, 306-315.
- Marcelis, L.F.M., H.A.G.M. van den Boogaard, & E. Meinen, 2000.
Control of crop growth and nutrient supply by the combined use of crop models and plant sensors.
In: Van Straten, G., Keesman, K.J., Bontsema, J. (Eds.), *Modelling and Control in Agriculture, Horticulture and Post-Harvest Processing*. Pergamon, London. pp. 351-356.
- Molinier, J., G. Ries, C. Zipfel & B. Hohn, 2006.
Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* 442, 1046-1049.
- Moller, I.M., A. Berczi, L.H.W. van der Plas & H. Lambers, 1988.
Measurements of the activity and capacity of the alternative pathway in intact plant tissues: identification of problems and possible solutions. *Physiologia Plantarum* 72, 642-649.
- Mooibroek, D., R. Beijk & R. Hoogerbrugge, 2010.
Jaaroverzicht luchtkwaliteit 2009. RIVM-rapport 680704011.
- Oksanen, E. & A. Saleem, 1999.
Ozone exposure results in various carry-over effects and prolonged reduction in biomass in birch (*Betula pendula* Roth). *Plant Cell and Environment* 22, 1401-1411.
- Poorter, H. & A. van der Werf, 1998.
Is inherent Variation in RGR determined by LAR at low irradiance and by NAR at high irradiance? A review of herbaceous species. In: H. Lambers, H. Poorter & M.M.I. Van Vuuren (eds), *Inherent Variation in Plant Growth. Physiological mechanisms and Ecological Consequences*. Backhuys Publishers, Leiden, pp. 309-336.
- Rapp, R.A. & J.F. Wendl, 2005.
Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist* 168, 81-91.
- Rohde, A. & O. Junttila, 2007.
Remembrances of an embryo: long-term effects on phenology traits in spruce. *New Phytologist* 177, 2-5.
- Sing Gill, S. & N. Tuteja, 2010.
Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1-22.
- Sterkenberg, A., 2011.
Ozon: effecten op vegetatie. RIVM, 17 blz. (in druk).
- Sultan, S.E., 1996.
Phenotypic plasticity for offspring traits in *Polygonum persicaria*. *Ecology* 77, 1791-1807.
- Van Aken, O., E. Giraud, R. Clifton & J. Whelan, 2009.
Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. *Physiologia Plantarum* 137, 354-361.

Van der Werf, A., M. van Nuenen, A.J. Visser & H. Lambers, 1993.

Contribution of physiological and morphological plant traits to a species' competitive ability at high and low nitrogen supply: a hypothesis for inherently fast- and slow-growing monocotyledonous species. *Oecologia* 94: 434-440.

Van der Werf, A., M. van Nuenen, A.J. Visser & H. Lambers, 1993.

Effects of N-supply on the rates of photosynthesis and shoot and root respiration of inherently fast- and slow-growing monocotyledonous species. *Physiologia Plantarum* 89: 563-569.

Weaver, I.C., A.C. D'Allesio, S.E. Brown, I.C. Hellstrom & S. Dymov et al., 2007.

The transcription factor nerve growth factor inducible protein mediates epigenetic programming: Altering epigenetic marks by immediate early genes. *Journal of Neuroscience* 27, 1756-1768.

