

# Bruine wortels in tulp

Onderzoek naar het mechanisme achter de bruinverkleuring van tulpenwortels in de teelt op water

ing. M.F.N. van Dam, Dr. H Gude, Prof. Dr L.H.W. van der Plas

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.  
Bloembollen en bolbloemen  
november 2005  
PPO nr. 330952

© 2005 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, 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 Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



Projectnummer: PPO - 330952

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.**

sector Bloembollen

Adres : Prof. van Slogterenweg 2, Lisse

: Postbus 85, 2160 AB Lisse

Tel. : 0252 - 462121

Fax : 0252 - 462100

E-mail : [infobollen.ppo@wur.nl](mailto:infobollen.ppo@wur.nl)

Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING .....	7
2 MATERIAAL EN METHODE .....	9
2.1 Experimenten PPO bloembollen Lisse.....	9
2.2 Experimenten WUR .....	10
2.3 Tweede serie experimenten PPO bloembollen Lisse.....	10
3 RESULTATEN .....	11
3.1 Experimenten PPO bloembollen Lisse.....	11
3.2 Resultaten experimenten WU-Plantenfysiologie .....	13
3.2.1 Bepalen van de mate van bruinverkleuring van de bollen in deze experimenten .....	13
3.2.2 Test op polyfenoloxidase-activiteit in tulpenwortels .....	14
3.2.3 Fenolbepalingen in bolhuiden en bolwortels .....	15
3.2.4 Kruisproef bruinverkleuring .....	17
3.2.5 Effect van fenolvangers op verbruining. ....	18
3.2.6 Toevoeging van extern fenol (fenol van andere bron dan bollen).....	19
3.2.7 Effect van laag zuurstof op de activiteit van het enzym polyfenoloxidase. ....	20
3.2.8 Remstoffen, een eerste aanzet. ....	22
3.3 Resultaat tweede serie experimenten PPO bloembollen Lisse .....	23
4 SAMENVATTING VAN DE RESULTATEN EN CONCLUSIE .....	25
5 DISCUSSIE .....	27
BIJLAGEN.....	29



# Samenvatting

Bij de broei van tulpen op water ontstaan tijdens het uitlopen van de wortels soms bruine verkorte wortels. Dit kan leiden tot verminderde wateropname en slechte opname van voedingszouten uit het water. Voor de bloementeler betekent dit vervolgens financiële schade doordat er bloemen van mindere kwaliteit worden geoogst en er uitval kan optreden.

In dit onderzoek is uitgegaan van de veronderstelling dat het proces van fenoloxidatie de oorzaak is van het probleem. Uit de bolhuid komen fenolen vrij. Onder invloed van het enzym polyphenoloxidase uit de wortels oxideren de fenolen via di-fenolen tot polyfenolen en chinonen. De laatste twee zijn de giftige stoffen waardoor de wortels verkleuren en waardoor er groeiremming optreedt.

Binnen dit onderzoek zijn experimenten uitgevoerd om het veronderstelde bestaan van het polyfenoloxidase proces aan te tonen. Daarnaast is ook geacht naar manieren van beïnvloeding van het proces, door het toevoegen van stoffen die de reactie remmen of stoppen.

De hoeveelheid fenol in de bolhuid bleek de belangrijkste factor voor het optreden van de reacties waardoor bruinverkleuring wordt veroorzaakt. Het betrokken enzym (polyfenoloxidase) bleek voornamelijk in de wortels aanwezig. Per cultivar of partij kon de activiteit daarvan verschillen, maar dat beïnvloedde de verbruiningsreactie niet. Een lage hoeveelheid enzymen kan net zo goed bruine wortels veroorzaken als een hoge hoeveelheid, mits er maar fenolen aanwezig zijn.

Het polyfenoloxidase-proces bij tulpen was te beïnvloeden: door binding van fenolen, door onttrekking van zuurstof, door toepassing van anti-oxidanten en door het verlagen van de pH trad minder of geen bruinverkleuring op.

De invloed van ijzer op de bruinverkleuring kon niet worden aangetoond.

Het onderzoek leidde tot de conclusie dat oxidatie van uit de huid vrijkomende fenolen door polyfenoloxidase in de wortels inderdaad de oorzaak is van de bruinverkleuring en de groeiremming van de wortels van tulp.

In een vervolg op dit onderzoek worden de gevonden oplossingsrichtingen naar praktijktoepassingen vertaald.



# 1 Inleiding

Bij de broei van tulpen op water worden bollen in speciale trays geplaatst, zodat het onderste deel van de bol in water wortels kan vormen. Nadat de bol minimaal ca. 2 tot 3 weken onder gekoelde omstandigheden wortels heeft gevormd kunnen de bakken in de kas worden gebracht en vormt zich uit de bol een tulpenplant.

Een probleem dat zich tijdens de beworteling veelvuldig voordoet is dat de wortels tijdens de uitgroei bruin verkleuren. De bruinverkleuring kan in ernstige gevallen zorgen voor zeer donkerbruine wortels die bovendien niet verder uitgroeien. De bruinverkleuring en de gestoorde groei van de wortels kunnen leiden tot verminderde wateropname en slechte opname van voedingszouten uit het water. Voor de bloementeler betekent dit soms financiële schade doordat bloemen van mindere kwaliteit worden geoogst en uitval kan optreden.

Algemeen wordt aangenomen dat het bruine wortelprobleem wordt veroorzaakt doordat stoffen uit de bolhuid in het water oplossen en dat een neerslag op of irritatie van de wortels voor de bruinverkleuring en de groeiremming zorgen. In proeven van PPO bloembollen uitgevoerd in Lisse en bij Proeftuin Zwaagdijk is aangetoond dat als kaal gemaakte bollen worden gebruikt er geen bruine wortels ontstaan. Zodra huiden van bollen of extract ervan werden toegevoegd trad bruinverkleuring wel weer op. Door water uit de bakken te vervangen door vers water is het probleem redelijk te omzeilen. In de praktijk wordt dit daarom veel toegepast. Een bezwaar hiervan is dat dit veel arbeid kost en dat water met meststoffen hierbij veelvuldig wordt geloosd. De wet schrijft bij substraatteelt echter voor dat water wordt hergebruikt. Bij lozing van water met meststoffen kan bovendien een conflict ontstaan met de wet verontreiniging oppervlaktewater. Een oplossing voor het bruine wortelprobleem, waarbij het water niet hoeft te worden verversd en kan worden hergebruikt, is daarom gewenst.

Om gericht te kunnen ingrijpen in het verbruiningsproces is het noodzakelijk het fysiologische proces achter de verbruining op te helderen. In het hier beschreven onderzoek is uitgegaan van de veronderstelling dat het proces van fenoloxidatie de oorzaak is van het probleem.

Fenoloxidatie verloopt als volgt: Uit de bolhuid komen fenolen vrij. Deze zijn van zichzelf kleurloos en van nature in de bruine huid en in cellen van de bol aanwezig. Onder invloed van het enzym polyphenoloxidase uit de wortels oxideren de fenolen via di-fenolen tot polyfenolen en chinonen. De laatste twee zijn de giftige stoffen waardoor de wortels verkleuren en waardoor er groeiremming optreedt. Er kan vervolgens een verdere reactie optreden waarbij zuurstof en radicalen worden gevormd. Hierdoor beschadigen weer celmembranen en zodoende komt er steeds weer celvocht met fenolen vrij.

Binnen dit onderzoek zijn experimenten uitgevoerd om het veronderstelde bestaan van bovengenoemd proces aan te tonen. Daarbij is ook al rekening gehouden met beïnvloeding van het proces, door het toevoegen van stoffen die de reactie remmen of stoppen.





## 2 Materiaal en methode

Er zijn zowel bij PPO als op Wageningen Universiteit (leerstoelgroep plantenfysiologie) proeven gedaan. Hierbij werd verondersteld dat de bruinverkleuring een gevolg was van fenoloxidatie. In Lisse is begonnen met een bewortelingsproef (zie 2.1), met als doel aan te tonen of er voldoende aanwijzingen waren voor deze veronderstelling.

In Wageningen is een serie experimenten uitgevoerd met het doel uit te zoeken welke componenten (fenol en enzym) van de oxidatiereactie essentieel zijn voor het optreden ervan en voor de mate waarin bruinverkleuring daarmee samenhangt. (zie 2.2.)

In Lisse is in een tweede serie proeven gedaan om aanvullend nog effecten van ijzer en zuurstof op het proces te bepalen. (zie 2.3)

### 2.1 Experimenten PPO bloembollen Lisse

In experimenten werd de aanname onderzocht dat fenoloxidatie de oorzaak van de bruinverkleuring is. Een aantal stellingen hierover leverde ideeën voor behandelingen op, die zijn uitgevoerd in een bewortelingsproef met tulpenbollen.

Stelling 1: Zonder fenolen ontstaan geen bruine wortels.

Een manier om deze aanname te toetsen is door gebruik te maken van stoffen die fenol vastleggen. Geschikte stoffen daarvoor zijn PVP (polyvinylpyrrolidone) en PVPP (polyvinylpolypyrrolidone). In de proeven is gekozen voor toevoeging van PVPP aan water voor de beworteling van tulpen.

Stelling 2: Zonder fenoloxidatie ontstaan geen polyfenolen en dus ook geen bruine wortels.

In de voedingsindustrie wordt veelvuldig gebruik gemaakt van anti-oxidanten om verkleuring van voedsel door fenoloxidatie tegen te gaan. In de bewortelingsproef werd gekozen voor citroenzuur en ascorbinezuur (vitamine C).

Een andere manier om fenoloxidatie tegen te gaan is door het inactiveren van de betrokken polyfenoloxidase-enzymen met een warmtestoot. Om de enzymen te inactiveren werden de bollen gedurende 10 minuten in water van 50 °C gedompeld.

Stelling 3: Fenoloxidatie kan worden geremd door verandering van de pH van het water. De achterliggende gedachte is dat in een zuur milieu de oxidatiereacties minder goed verlopen.

Er was in de praktijk wel eens geconstateerd dat bollen bruinere wortels kregen op leidingwater dan op regenwater. Van deze soorten water is de pH verschillend; leidingwater is licht basisch. Op basis van deze stelling werd in de proef kraanwater vergeleken met regenwater. Daarnaast werd in de proef aan regenwater een zuur of een base toegevoegd.

Stelling 4: Als er geen radicalen worden gevormd treedt er geen verbruining. De reacties die volgen op de oxidatie van fenolen en waarbij radicalen gevormd worden laten zich mogelijk beïnvloeden door een veranderde redoxpotential. Door toevoeging van Anolyte aan het water werd een dergelijk milieu gecreëerd. Ook is de restvloeistof van Anolyte, Catholyte, toegevoegd.

Uitvoering

Voor deze proef werd de cultivar 'Passionale' gebruikt. Bollen werden op bakjes van 25 x 25 cm geplant op prikkers.

Met uitzondering van behandeling 1 werden alle behandelingen uitgevoerd met regenwater.

De behandelingen waren:

1. Controle leidingwater
2. Controle regenwater
3. Fenol-vanger (PVPP 0,25 gram per 100 ml water)
4. Antioxydant-1 (citroenzuur 0.1 M)
5. Antioxydant-2 (vitamine C, experimentele hoeveelheid)
6. water + zuur (1 mmol  $\text{HNO}_3$  per liter water + 5% leidingwater als pH buffer)
7. water + base (1 mmol KOH per liter water)
8. Anolyte (10% aan water toegevoegd)
9. Catholyte (10%)
10. Bolbehandeling met warm water (10 minuten bij 50 °C)

De behandelingen werden beoordeeld op hun effect op de kleur van het water en kleur en lengte van de wortels. De resultaten hiervan staan vermeld in hfdst. 3.1.

## 2.2 Experimenten WUR

In Wageningen is een serie experimenten uitgevoerd door Hans Dassen en Prof. Linus van der Plas. Het doel was uit te zoeken welke componenten van de polyfenoloxidase-reactie essentieel zijn voor het optreden ervan en voor de mate waarin bruinverkleuring daarmee samenhangt.

Allereerst werd de gevoeligheid voor bruinverkleuring vastgesteld in de gebruikte tulpencultivars: 'Ad Rem', 'White Dream' en 'Coquette'. Daarna werd bepaald hoeveel fenol en enzym aanwezig waren per cultivar en of er een relatie bestond tussen de bruinverkleuring van de verschillende cultivars en de aanwezigheid van de verschillende componenten van de polyfenoloxidase-reactie. Op deze manier kon worden aangetoond of de polyfenoloxidase-reactie inderdaad aan de basis ligt van de bruinverkleuringsreactie. Ook werden verschillende toevoegingen en condities getest die de bruinverkleuringsreactie kunnen remmen, zowel gericht op het ophelderen van de achtergronden van deze reactie als op het vinden van condities die deze reactie kunnen blokkeren.

Hierbij werden verschillende methoden gebruikt. Omwille van de overzichtelijkheid worden deze beschreven bij de resultaten. (hfdst. 3.2)

## 2.3 Tweede serie experimenten PPO bloembollen Lisse

Bollen werden op kleine doorzichtige bakjes geprikt en met bemest water bij 7 °C in de koelcel tot wortelvorming gebracht. De helft van de bollen werd kaal gemaakt de andere helft werd met bolhuid geplant.

Aan het regenwater waren meststoffen toegevoegd ( $\text{CaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$  en  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) tot een EC van 1,5. Behandelingen waren: 1) controle, 2) water afgegoten met een laagje paraffine en 3) EDTA aan het water toegevoegd (1 gram per liter).

Door paraffine op het water te gieten (behandeling 2) werd voorkomen dat zuurstofdiffusie aan het wateroppervlak plaatsvond. Hiermee moest worden aangetoond of de oxidatiereactie kan worden gestopt door gebrek aan zuurstof in het water. Tevens werd hiermee onderzocht of het zuurstofgebrek nadelig was voor de wortelvorming

De EDTA-behandeling (3) richtte zich op de mogelijk stimulerende rol van ijzer bij de vervolgreacties na de fenoloxidatie (cyclische vorming van zuurstofradicalen). EDTA bindt kationen en dus ook ijzer aan zich, waardoor het gehalte aan vrij ijzer aanwezig in het water wordt geminimaliseerd. Hierdoor kan mogelijk de vervolgreactie minder snel plaatsvinden.

Waarnemingen aan spruit- en wortellengte en kleur van de wortels zijn na 10 dagen en na 19 dagen gedaan. De tulpen werden beworteld bij 7 °C. De paraffine is na het planten op het water gegoten, zodat de wortelkrans er niet mee in aanraking kwam. De resultaten van de waarnemingen staan vermeld in hoofdstuk 3.3.

## 3 Resultaten

### 3.1 Experimenten PPO bloembollen Lisse

De resultaten van de waarnemingen zijn samengevat in tabel 1.

Leidingwater en regenwater (behandeling 1 en 2)

De pH van het leidingwater was bij de aanvang van de beworteling de 6 en de EC was 0,7. Het regenwater had een pH van 5,2 en een EC van 0,2. Direct na de beworteling in de cel was het regenwater iets minder bruin dan het leidingwater. De aanslag op de wortels was bij regenwater ook iets lichter dan van leidingwater. De tulpen die op leidingwater hadden gestaan hadden aan het eind van de proef de donkerste wortels van alle behandelingen.

Fenolvanger (behandeling 3)

Door toevoeging van PVPP ontstond een beige (later lichtbruine) neerslag op de bodem van de bakken. De wortels bleven mooi wit. PVPP had geen effecten op de EC en de pH.

Deze proef liet al direct zien dat het wegvangen van fenolen bruine wortels kan voorkomen.

PVPP wordt in laboratoria gebruikt maar kent daarnaast vele toepassingen in o.a. tandpasta, haarlak en verf en heeft een E-nummer (E1202) als stabilisator, gebruikt bij de bereiding van bier en wijn.

Tabel 1. Kleur van water en wortels van een serie experimenten. De kleur van het water is met een cijfer van aangeduid; 1 = ongekleurd, 5 = donkerbruin)

Behandeling	Kleur v.h. water	Kleur wortels
1. Leidingwater	3	Bruin
2. Regenwater	2	Lichtbruin
3. Fenolvanger PVPP	2	Wit
4. Anti-oxidant citroenzuur	5	-
5. Anti-oxidant Vit. C	1	-
6. Aangezuurd water	2	Licht bruin
7. Basisch water	4	Licht bruin
8. Anolyte	2	Licht bruin
9. Catholyte	5	Licht bruin
10. Bollen verhitten	1	-

Anti-oxidanten (behandeling 4 en 5)

Er was nauwelijks wortelgroei in beide behandelingen. Dit werd waarschijnlijk veroorzaakt door de zeer lage pH-waarden (pH 3,5). De wortelkransen braken wel open, maar de wortels raakten daarna sterk geïrriteerd. Bij vitamine C was er geen verkleuring van het water terwijl dit bij citroenzuur juist weer erg sterk verkleurde.

Conclusie: Anti-oxidant kan effect te hebben, maar de juiste dosering moet worden gevonden waarbij fenoloxidatie niet optreedt en waarbij de pH zodanig is dat er normale wortels ontwikkelen.

Zuur en basisch water (behandeling 6 en 7)

Hoewel de oplossingen aanvankelijk zuur en basisch waren, bleek na enkele dagen in de bewortelingscel dat de pH van beide behandelingen zuur was. Behandeling 6 had een pH van 5 en behandeling 7 een pH van 5,5. Veranderingen in pH in deze mate zijn in de praktijk niet ongebruikelijk. Door opname van anionen wisselt de wortel OH<sup>-</sup>-ionen uit waardoor de pH stijgt. Door opname van kationen daalt de pH als gevolg van uitwisseling van H<sup>+</sup>-ionen.

Bij deze behandelingen (6 en 7) traden geen verschillen op in de kleur de wortels. Het water van

behandeling 6 (zuur) was gemiddeld iets lichter van kleur dan van behandeling 7 (basisch).

Anolyte en Catholyte (behandeling 8 en 9)

Het water van behandeling 9 (Catholyte) kleurde bruin, bij behandeling 8 (Anolyte) was een lichte verkleuring te zien. De wortelkleur was in beide behandelingen lichtbruin.

Van Anolyte is bekend dat het zeer vers gebruikt moet worden en dat het snel bindt aan organische stof. Het middel is daardoor maar kort werkzaam en veroorzaakt daardoor geen blijvende verandering in het wortelmilieu.

Verhitting (behandeling 10): EWr zijn geen conclusies te trekken, daar er geen beworteling meer optrad.

### **Conclusies**

Uit deze serie proeven kan geconcludeerd worden dat:

- stoffen uit de huid nodig zijn voor bruinverkleuring van water en wortels;
- fenol waarschijnlijk de veroorzaker is, hetgeen bleek uit het feit dat PVPP, dat bekend staat als een fenolvanger, de verbruining kon remmen;
- de aanwezigheid van anti-oxidanten en verschillen in pH en redoxpotentiaal het proces licht beïnvloeden.

## 3.2 Resultaten experimenten WU-Plantenfysiologie

### 3.2.1 Bepalen van de mate van bruinverkleuring van de bollen in deze experimenten

#### Methode:

De bollen werden al dan niet kaal gemaakt op water beworteld. Visueel werd de verkleuring beoordeeld. De gebruikte cultivars waren White Dream, 'Ad Rem' en 'Coquette'.

#### Resultaat:

- Zie foto 1: bollen opgeplant met bolhuid. Bij 'White Dream' (WD) en 'Ad Rem' (AR) kleurden het water en de wortels bruin, bij 'Coquette' (CQ) niet. Bij 'White Dream' was slechts sprake van minimale wortelgroei.
- 'Ad Rem' en 'Coquette' hebben beide witte wortels als ze werden opgezet als kale bol (foto 2).

#### Conclusie:

Voor de bruinverkleuring zijn stoffen (fenolen?) uit de bolhuid nodig. Er zijn cultivar- of partijverschillen.

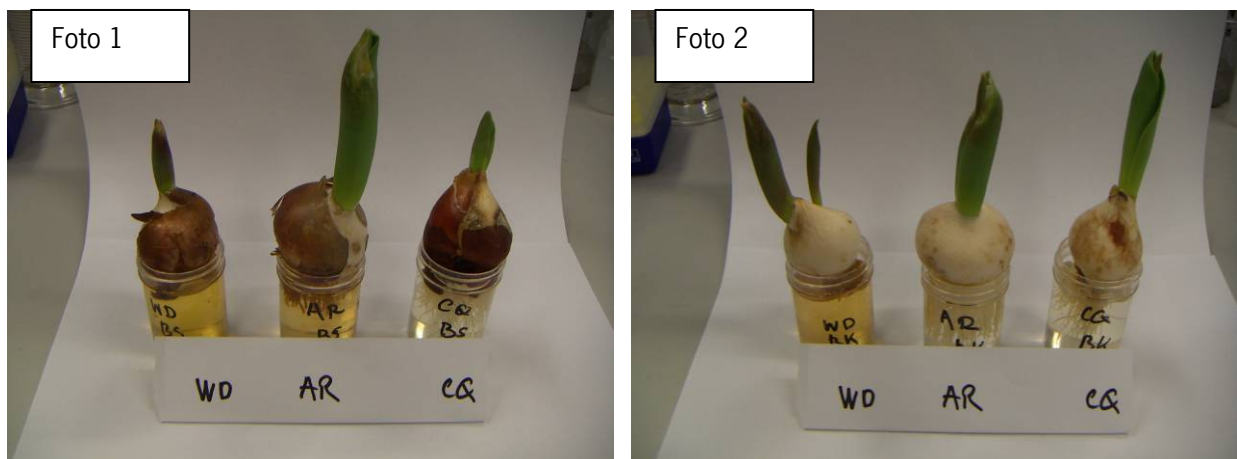


Foto 1 en 2: Opzet in het eerste experiment, waarbij de verschillen in bruinverkleuring van het gebruikte bolmateriaal werd vastgesteld. WD = White Dream, AD = Ad Rem, CQ = Coquette

### 3.2.2 Test op polyfenoloxidase-activiteit in tulpenwortels

#### Methode:

Het enzym polyfenoloxidase geeft met catechol (een fenol) als substraat een omzetting naar difenolen en vervolgens naar chinonen waardoor een bruine kleur ontstaat. De snelheid van deze enzymatische reactie kan vervolgens worden gemeten en geldt als maat voor de enzymactiviteit.

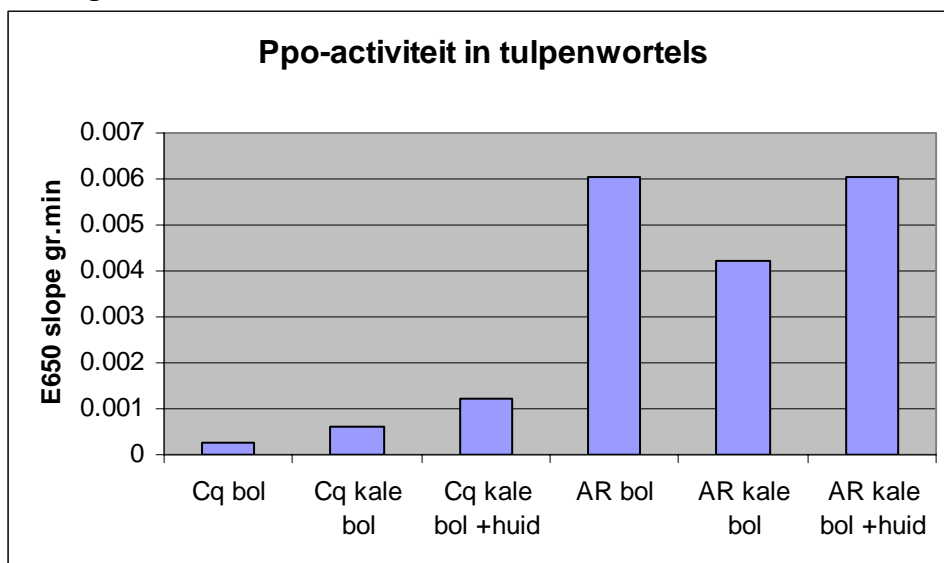
De volledige werkwijze staat vermeld in bijlage 1.

De metingen in de wortels werden verricht aan wortels van bollen met huid, zonder huid en aan wortels gegroeid in water waar huiden aan waren toegevoegd van zowel Ad Rem als Coquette.

#### Resultaten: (figuur 1)

- De tulpenwortels vertoonden duidelijk polyfenoloxidase-activiteit.
- 'Coquette' vertoonde minder polyfenoloxidase-activiteit in de wortels dan 'Ad Rem'. (Vergelijk de 3 waarden links met de 3 waarden rechts in het histogram)
- De polyfenoloxidase-activiteit met catechol als substraat was niet gerelateerd aan de aanwezigheid van de bolhuid. Er was zowel activiteit bij kale bollen als bij bollen met (los toegevoegde) huid. De lagere waarde bij kale bollen was alleen aantoonbaar bij Ad Rem, niet bij Coquette.
- Polyfenoloxidase-activiteit werd ook getest in het water, maar daar werd geen of maar heel weinig activiteit gemeten. (niet in de figuur)

Figuur 1. Polyfenoloxidase-activiteit in tulpenwortels. Invloed van cultivar (Coquette CQ en Ad Rem AR) en de aanwezigheid van bolhuid om de bol (bol) of los in het water (kale bol + huid).



### 3.2.3 Fenolbepalingen in bolhuiden en bolwortels

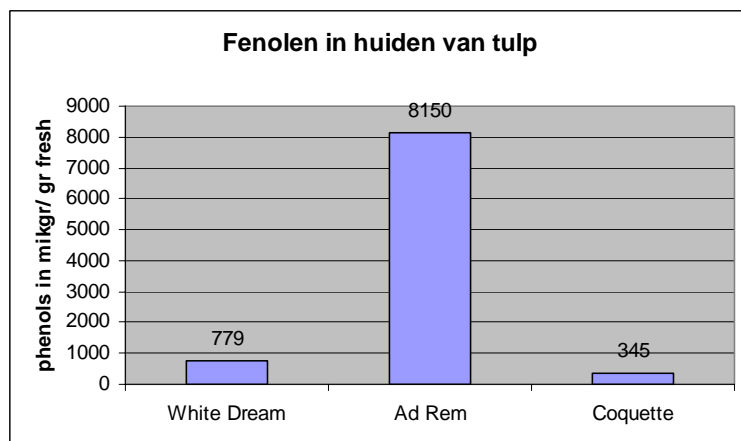
#### Methode:

Fenolen geven met Folin-Ciocalteus reagens een kleuring die met de spectrofotometer bij 650 nm kan worden gemeten. Zie voor de volledige beschrijving van de methode bijlage 2.

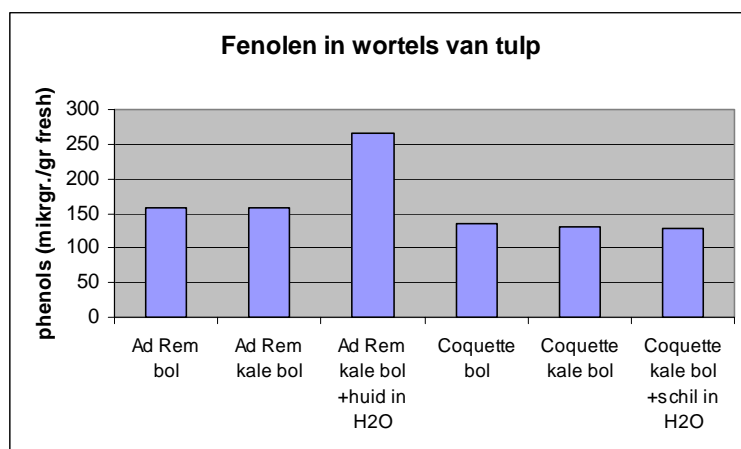
De fenolgehaltes werden gemeten in de huiden van de 3 cultivars en in de wortels van 'Ad Rem' en 'Coquette'. De metingen in de wortels werden verricht aan wortels van bollen met huid, zonder huid en aan wortels gegroeid in water waar huiden aan waren toegevoegd. Ook werden fenolgehaltes bepaald in witte en bruine wortels, droge huiden en in huiden die in water hadden gelegen.

#### Resultaten:

- 'Ad Rem' had duidelijk meer fenol in de huid dan 'Coquette' en 'White Dream' (figuur 2)
- In wortels was nauwelijks fenol aanwezig. Dit gehalte was minder dan de helft van wat in de huid van 'Coquette' werd gevonden. (figuur 3, let daarbij op de schaal van de y-assen in figuur 2 en 3).
- In witte en bruine wortels bleek het fenolgehalte ook zeer laag en maar licht verschillend van elkaar (figuur 4).
- De in de huid aanwezige fenolen werden bij onderdompeling afgegeven aan het water. Na drie dagen was ca. 2/3 deel uit de huid aan het water afgegeven (figuur 4).

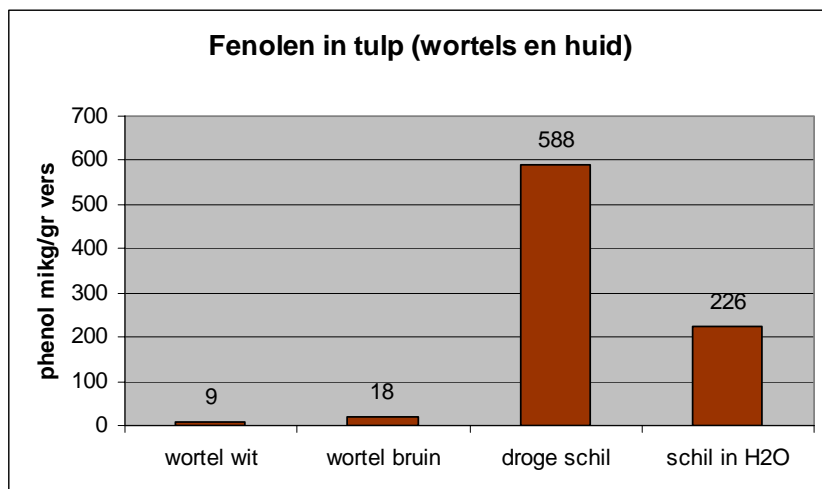


Figuur 2. Fenolgehaltes in huid van de tulpencultivars White Dream, 'Ad Rem' en 'Coquette'.



Figuur 3. Fenolgehaltes in wortels van de tulpencultivars 'Ad Rem' en 'Coquette'. Invloed van cultivar (Coquette en Ad Rem) en de aanwezigheid van bolhuid ("schil") om de bol (bol) of los in het water (kale bol + huid).

Figuur 4. Fenolgehaltes in tulpenwortels (wit en bruin), droge huiden en huiden ("schil"), die in water hebben



gelegen. Wortels bevatten in verhouding tot de bolhuiden zeer weinig fenolen.



### 3.2.4 Kruisproef bruinverkleuring

#### Methode:

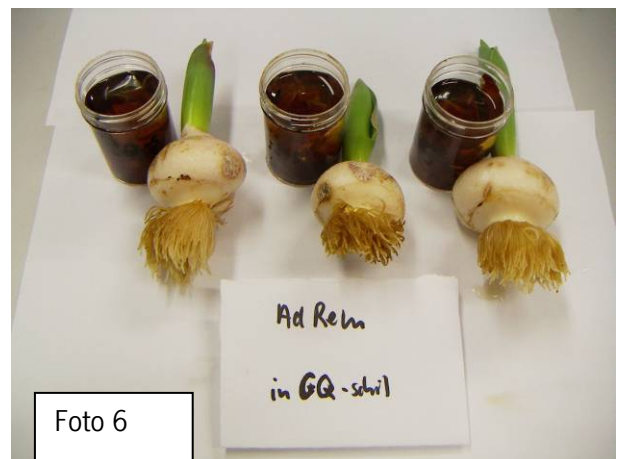
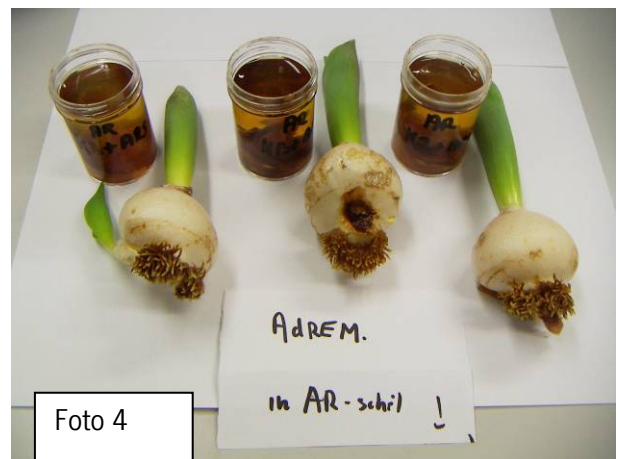
In een kruisproef werd de bruinverkleuring van kale bollen met de huid van een andere cultivar bepaald. De proef werd uitgevoerd met 'Coquette' en 'Ad Rem' die in bruinverkleuring het meest van elkaar verschilden. Kaal gemaakte bollen werden op water beworteld, waarbij of de eigen huid of de huid van de andere cultivar aan het water was toegevoegd.

#### Resultaat:

- Bij toevoeging van de eigen bruine huid werden de wortels van 'Coquette' wisselend wit tot (licht)bruin. Bij 'Ad Rem' werd de wortelgroei sterk geremd en waren de wortels donker gekleurd. (Foto 3 en 4).
- 'Coquette' kreeg extreem korte bruine wortels in aanwezigheid van de bolhuid van 'Ad Rem' (foto 5)
- 'Ad Rem' kreeg lichtbruine tot witte wortels in aanwezigheid van de bolhuid van 'Coquette' (foto 6)

#### Conclusie:

- Voor de bruinverkleuring zijn in hoofdzaak de stoffen (fenolen) uit de bolhuid verantwoordelijk. Deze stoffen waren meer aanwezig in huid van 'Ad Rem' dan in huid van 'Coquette'.
- Fenolen blijken de beperkende factor voor de bruinverkleuring. 'Coquette' met (fenolen uit) de huiden van 'Ad Rem' gaf extreme bruinverkleuring ondanks het feit dat in Coquette sprake is van minder polyfenoloxidase-activiteit (proef 2).



### 3.2.5 Effect van fenolvangers op verbruining.

#### Methode:

Bollen van de cultivar 'Ad Rem' werden beworteld op water met en zonder toevoeging van PVP.

De bollen waren: 1. met huid; 2. kaal gemaakt en 3. kaal gemaakt + aan het water toegevoegde bolhuiden.

#### Resultaat:

- De behandelingen met huid (los in het water of aan de bol) en zonder PVP gaven bruine, korte wortels.
- In de behandelingen met huid waaraan ook PVP was toegevoegd ontstond een grauwwitte neerslag in het water. Er werden witte wortels onder de bol gevormd. Deze hadden dezelfde kleur als de wortels van bollen zonder huid en zonder PVP.

#### Conclusie:

Dit experiment bevestigt de aanname dat zonder fenol de verbruining wordt voorkomen of verminderd.

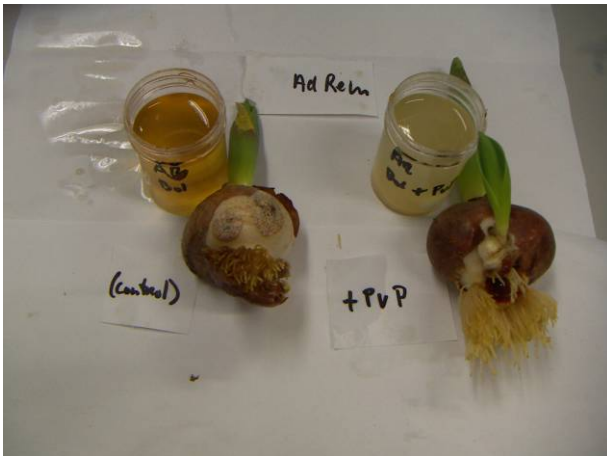


Foto 7. 'Ad Rem' met huid in water, zonder PVP (controle) en met PVP. In het laatste geval blijven de wortels wit.

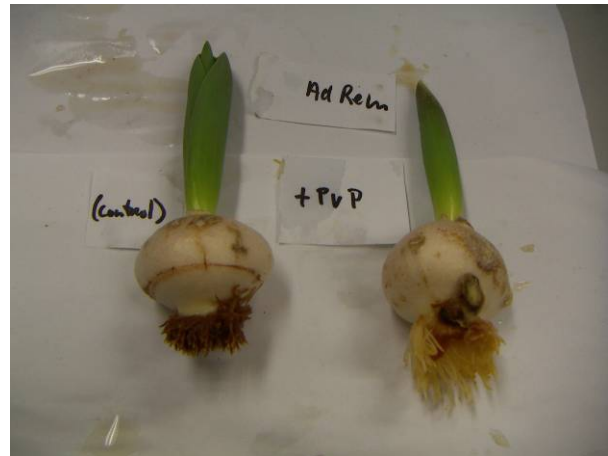


Foto 8. 'Ad Rem' geworteld op water met losse huiden. Zonder PVP (controle) werden ook hier de wortels bruin, met PVP bleven de wortels wit.

### 3.2.6 Toevoeging van extern fenol (fenol van andere bron dan bollen).

#### Methode:

Bollen werden 2 dagen van tevoren beworteld, waarna extern fenol werd toegediend (catechol) in een concentratiereeks; 0 - 0,25 - 2,5 - 25 en 100 mM catechol. Hiermee kon worden vastgesteld of verbruining afhankelijk is van de concentratie van fenolen in het water.

De kleur van wortels en water werd na 5 uur visueel beoordeeld.

Het fenolgehalte in het water is bepaald met de methode die ook in 3.2.3. werd gebruikt (zie bijlage 2).

Resultaat van de waarnemingen na 5 uur (zie foto 9):

- De eerste verkleuring was al na 2 uur zichtbaar.
- Het water vertoonde een kleuring vanaf 2,5 mM catechol.
- De wortels verkleuren door catechol donkerder, bijna zwart, dan bij fenolen uit de bolhuid.
- Wortelpunten werden donker vanaf 25 mM catechol, bij 100 mM catechol verkleurden de wortels geheel grijszwart.

#### Conclusie:

Extern fenol geeft verbruining van de wortels bij Coquette, afhankelijk van de concentratie.

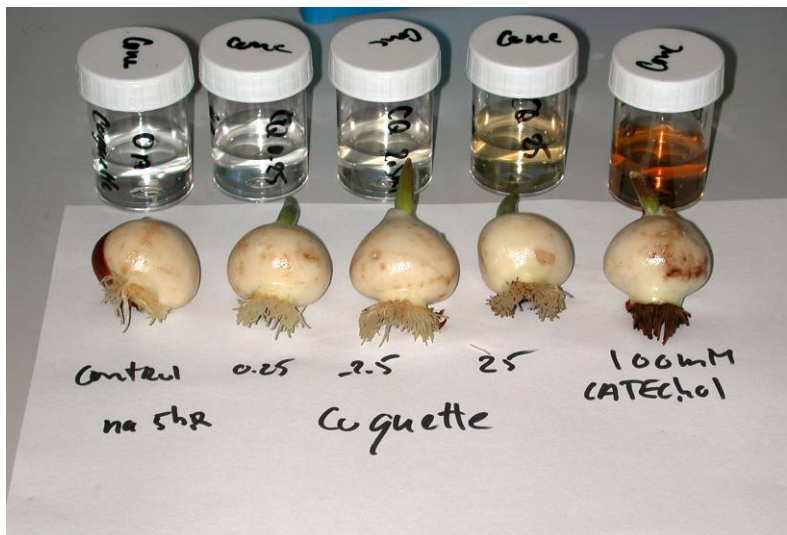


Foto 9 en detail. Bollen van de cultivar Coquette, die eerst zijn beworteld zonder huid en waaraan catechol is toegevoegd in een concentratiereeks van 0 - 0,25 - 2,5 - 25 en 100 mM catechol. *Rechts:* een uitvergroting van de wortels bij 25 en 100 mM. Bij 25 mM catechol werden de punten van de wortels donker (hier op de foto enigszins waarneembaar).

### 3.2.7 Effect van laag zuurstof op de activiteit van het enzym polyfenoloxidase.

Een eerste serie proeven waarbij tulpenwortels werden geïncubeerd in water met verminderd zuurstof, toonde aan dat er hierdoor minder verbruining optrad, overeenkomend met de rol van zuurstof in de polyfenoloxidase-reactie.

Deze proeven werden uitgebreid met een serie proeven waarin tulpen gedurende enige tijd in exsiccatoren werden gevolgd, waarbij lucht met 20 % zuurstof, lucht met 1 % zuurstof of lucht met 0% zuurstof (100% N) werd doorgevoerd. Bij 1% zuurstof zou er voldoende zuurstof moeten zijn voor de ademhaling, terwijl deze 1 % zuurstof niet voldoende zou moeten zijn om de polyfenoloxidase-activiteit te onderhouden. De bollen werden zonder eigen bolhuid op water met extern fenol (5 mM catechol) beworteld in de exsiccatoren (foto 10).

Voor deze proeven werden de cultivars 'Strong Gold' (SG) en 'Rococo' (ROC) gebruikt.

Na 2 dagen werden de wortels en het water op hun verkleuring beoordeeld.

Resultaat: De wortels werden donkerbruin als normale lucht werd toegevoerd en er dus voldoende zuurstof aanwezig was voor de polyfenoloxidase-reactie (foto 11). In het geval dat 1 % zuurstof aanwezig was in de lucht bleven de wortels wit. Ook bij 0% zuurstof (=volledig stikstof) trad geen bruinverkleuring op.

Conclusie: Incubatie in 1 % zuurstof remt inderdaad de verbruiningsreactie. Incubatie in stikstof had hetzelfde effect, maar hierin is geen verdere groei van de tulpenwortels mogelijk.

De groeimogelijkheden in 1 % zuurstof zijn niet uitgebreid onderzocht, omdat de proef na 2 dagen is afgebroken.



Foto 10. Opstelling: bewortelde bollen op water (met en zonder catechol) in exsiccatoren, waardoor standaardlucht (20% zuurstof), lucht met 1 % zuurstof en lucht met 0% zuurstof (100% stikstof) werd geleid.

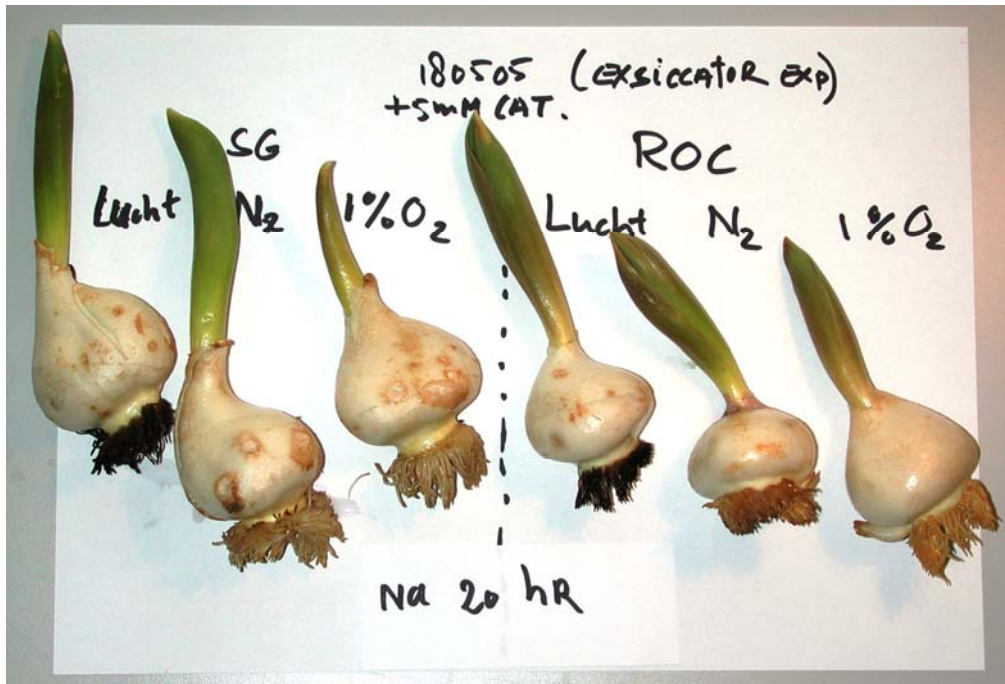


Foto 11 Bollen na 20 uur (in water met 5 mM catechol): zwarte wortels in lucht, witte wortels in stikstof en 1 % zuurstof. SG = 'Strong Gold' ; ROC = 'Rococo'



Foto 12. Water waarin de bollen gestaan hebben (na 48 uur; SG = 'Strong Gold', ROC = 'Rococo'), in respectievelijk lucht (20 % zuurstof), stikstof en 1 % zuurstof: verbruining incubatiewater met 1 % zuurstof was gering.

### 3.2.8 Remstoffen, een eerste aanzet.

De omstandigheden waarbij polyfenoloxidase en de vervolgreacties optreden kunnen zodanig worden beïnvloed dat de verbruining wordt afgeremd. Remstoffen kunnen worden gekozen uit de groep anti-oxidanten. Vaak hebben deze stoffen naast een rechtstreekse invloed op de oxidatie ook een indirect effect op de polyfenoloxidase doordat ze pH-verlagend zijn of omdat ze zuurstof binden.

Er zijn slechts enkele oriënterende proeven met remstoffen bij tulpen uitgevoerd. Deze geven geen volledig beeld, maar laten wel de mogelijkheden zien van deze stoffen. De resultaten van deze proeven zijn in het kort:

- NaF en cysteïne; Dit zijn stoffen waarvan bekend is dat ze ingrijpen in de polyfenoloxidase-reactie. Experimenten hiermee lieten zien dat ze ook in staat waren om polyfenoloxidase geïsoleerd uit tulpenwortels te remmen. Hierbij moet worden opgemerkt, dat cysteïne ook effect kan hebben gehad doordat het zuurstof wegvangt. Bij NaF trad remming van de wortelgroei op bij hoge concentraties. (foto 13)
- Ferulinezuur en hexylresorcinol; in de onderzochte concentraties hadden deze stoffen nog weinig effect. Hexylresorcinol (een polyfenoloxidase-remstof uit de voedingsindustrie) bleek op tulpenwortels de wortelverbruining niet goed te blokkeren. Daarnaast leek deze stof in een aantal proeven neveneffecten te hebben, waarbij juist extra verbruining ontstond (katalyserende werking).
- Verlaagde pH; Bij een pH tussen 3 en 4 werd de polyfenoloxidase-activiteit geremd.

Verder onderzoek is nodig over deze en andere remstoffen en remmende omstandigheden, vooral bij intacte, bewortelde tulpen. Daarbij moet vooral aandacht worden gegeven aan het vinden van de juiste concentraties. Er moet wel effect zijn op het tegengaan van verbruining maar geen geremde groei van de wortels of de spruit. Bovendien mogen de stoffen bij gebruik in de praktijk niet giftig zijn.

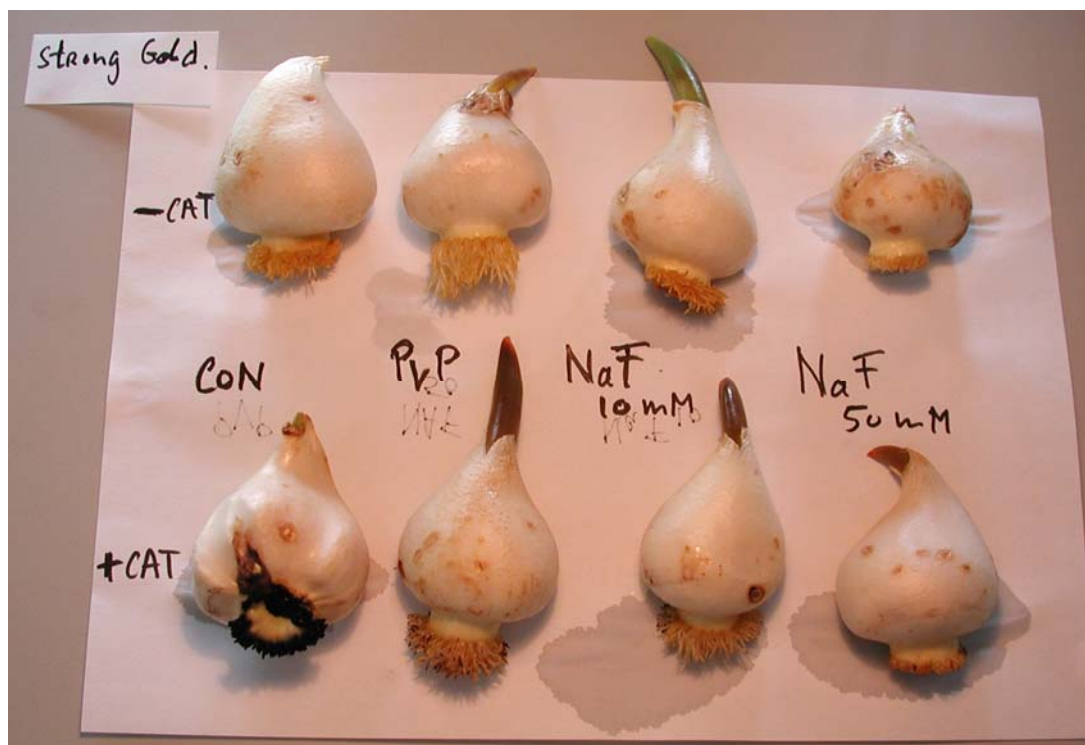


Foto 13. Effect van verschillende incubatie-omstandigheden op de verbruining van wortels van de cultivar 'Strong Gold': in aanwezigheid van fenol (catechol, onderste rij bollen) gaf de controle (CON) een sterke verbruining, die voorkomen werd door toevoeging van PVP (zie paragraaf 3.2.5) en NaF. Hogere concentraties NaF (50 mM) remden de wortelgroei, lagere concentraties (10 mM) niet of minder.

### 3.3 Resultaat tweede serie experimenten PPO bloembollen Lisse

Bollen met en zonder huid werden beworteld op water met toegevoegd EDTA of water waar na het planten een laagje paraffine was aangebracht. Na 10 en 19 dagen werden wortels en spruiten beoordeeld. De resultaten daarvan zijn in tabel 2 samengevat.

Tabel 2. Resultaten van de waarnemingen aan de wortels en het water, van bollen beworteld op water met een laagje paraffine en water met EDTA.

<b>kale bollen</b>	wortellengte		spruitlengte		kleur	
	05-Apr	14-Apr	05-Apr	14-Apr	05-Apr	14-Apr
controle	2.5	5	9.4	18.8	wit	wit
paraffine	0.5	0.5	5.1	8.1	wit	wit
EDTA	1.5	2.9	9.5	19.7	wit	wit
<b>bol met huid</b>	wortellengte		spruitlengte		kleur	
	05-Apr	14-Apr	05-Apr	14-Apr	05-Apr	14-Apr
controle	1.5	3.3	9.6	20.3	licht bruin	licht bruin
paraffine	0.2	0.2	2.9	4.4	licht bruin	licht bruin
EDTA	1	1	9.1	17.8	licht bruin	licht bruin

- De wortels van kale bollen waren wit, die van bollen met huid lichtbruin.
- De wortels van kale bollen werden langer dan de wortels van bollen met huid. Dit is in overeenstemming met andere waarnemingen dat bruine wortels in de groei werden geremd.
- In de bakjes waarvan het water met paraffine was afgedekt was de wortelgroei geremd. De wortelgroei was ook geremd (maar minder dan bij paraffine) in de bakjes met EDTA in het water.
- De spruitgroei was geremd in de behandeling met paraffine. De spruiten waren nog iets korter bij de bollen met huid en bruine wortels.
- De wortels van bollen met huid, in de bakjes met paraffine, werden net zo bruin als in de controle. Het zuurstofgebrek had dus geen effect op de bruiningsreactie, maar wel op de groei van wortel en spruit.

#### Conclusies:

- De aanwezigheid van de bolhuid bleek essentieel voor de bruinverkleuring en de groeiremming van de wortels. Bollen werden ook geremd in de behandelingen paraffine en EDTA, maar met bruine huid was de groeiremming sterker.
- Door de zuurstofdiffusie te remmen met paraffine werd de wortelontwikkeling sterk geremd. Het gebrek aan zuurstof (bakjes met paraffine) had geen effect op de bruinverkleuring. In het experiment in paragraaf 3.2.7. werd met 1% zuurstof in de lucht gewerkt. Bij dit percentage is er nog net voldoende zuurstofdiffusie mogelijk om de wortels in het water van zuurstof te voorzien voor de ademhaling. In dit paraffine-experiment is geen enkel zuurstoftransport via het water naar de wortels mogelijk. In reactie daarop blijven de wortels in groei achter. Dat de wortels daarbij in dit geval bruin verkleurden kan niet worden verklaard.
- EDTA had geen effect op de bruinverkleuring. De rol van ijzer bij de vervolgreacties kon in deze proef niet worden aangetoond.

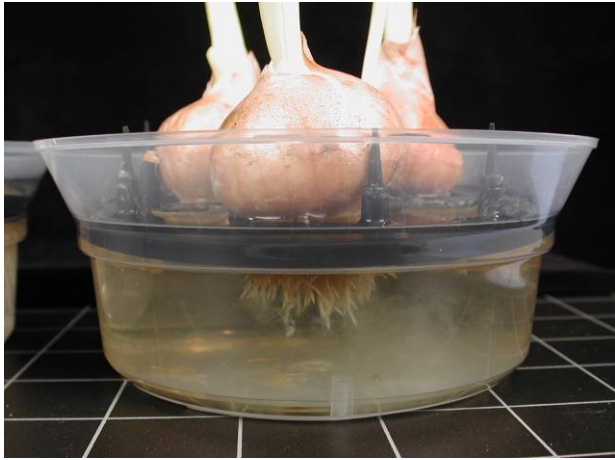


Foto 3.13 en 3.14 Bollen met huid (links) en bruine wortels en zonder huid met witte wortels; proefeenheden in doorkijkbakjes.



Foto 3.15 Kale bollen in water met paraffinelaagje vertoonden een sterk geremde wortelgroei.



## 4 Samenvatting van de resultaten en conclusie

De hoeveelheid fenol in de bolhuid bleek de belangrijkste factor voor het optreden van de reacties waardoor bruinverkleuring wordt veroorzaakt (§ 3.2.3. en § 3.2.4). Dit bleek ook zo te zijn bij toegevoegd fenol 'uit een potje' of afkomstig uit huiden van andere bollen. Daardoor konden bruine wortels ontstaan bij bollen die zelf geen fenol bevatten. De hoeveelheid fenol is bepalend voor de mate van verkleuring.

Wortels die eerst wit waren en waaraan fenolen werden toegevoegd kleurden daarna bruin (§ 3.2.6.).

Fenolen lossen uit de bruine huid op in het water. In de proeven bleek dat na 3 dagen reeds ca 2/3 van de fenolen in het water was opgelost (§ 3.2.3).

Het betrokken enzym (polyfenoloxidase) bleek voornamelijk in de wortels aanwezig (§ 3.2.2). Per cultivar of partij kon de activiteit daarvan verschillen, maar dat beïnvloedde de verbruiningsreactie niet. Een lage hoeveelheid enzymen kan net zo goed bruine wortels veroorzaken als een hoge hoeveelheid, mits er maar fenolen aanwezig zijn.

Fenolen werden gebonden door PVPP, daarna trad geen wortelverkleuring of verkleuring van het water meer op (§3.1 en §3.2.5.).

Het polyfenoloxidase-proces bij tulpen was te beïnvloeden. Er trad geen bruinverkleuring op als de voor de oxidatie benodigde zuurstof werd onttrokken. Dit werd aangetoond in proeven waarbij slechts geringe hoeveelheden zuurstof uit de lucht tot het water kon toetreden (3.2.7). In een proef waarbij de wortels moesten groeien onder zuurstofloze omstandigheden werd de wortelgroei geremd (§ 3.3).

Ook anti-oxidanten hadden invloed, zij het dat niet met alle anti-oxidanten bruinverkleuring werd voorkomen; de reactie kon zelfs worden versterkt. Een deel van de werking van anti-oxidanten berust op de pH-verlagende eigenschappen. Tulpenwortels zijn echter bij lage pH niet goed in staat te groeien. Bij het zoeken naar een oplossing voor de praktijk moet hier ook aandacht aan worden geschonken.

De invloed van ijzer op de bruinverkleuring kon niet worden aangetoond in de proef waarbij EDTA werd gebruikt om eventueel aanwezig ijzer te binden.

Het geheel aan proeven en experimenten leidde tot de conclusie dat polyfenoloxidase inderdaad de oorzaak is van de bruinverkleuring en de groeiremming van de wortels van tulp.



## 5 Discussie

Fenolen uit de bolhuid lossen vrij snel op in water. Dit verklaart waarom het verversen van het bewortelingswater, in de praktijk, redelijk effectief is ter voorkoming van bruine wortels. Bij bollen met hoge gehalten fenolen in de huiden kan eenmalig verversen echter onvoldoende blijken te zijn. Om problemen met de lozing van water met daarin meststoffen te voorkomen heeft een oplossing waarbij het water kan worden hergebruikt de voorkeur.

Anti-oxidanten toedienen lijkt de meest praktische oplossing om het probleem met bruine wortels te voorkomen. Nagegaan moet worden of deze stoffen voor dit doel zonder bezwaar kunnen worden toegepast.

Uit de verschillende proeven bleek de werking van een anti-oxidant nog niet altijd voorspelbaar en kon de wortelgroei soms worden gehinderd. Dit laatste kan te maken hebben met de pH van het water. Het is waarschijnlijk dat de toe te dienen concentratie anti-oxidant afhankelijk is van de hoeveelheid fenolen in het water. Een en ander zal in concentratiereeksen moeten worden uitgetest.

Om een sterke pH-daling bij het gebruik van sommige anti-oxidanten te voorkomen zouden gebufferde anti-oxidanten kunnen worden gebruikt. Dit moet eerst op goede werking worden getest omdat de werking ervan ook deels juist op de pH-daling berust. Daarnaast is bekend dat de plant door ionenopname zelf ook de pH beïnvloedt. Met name aan het einde van de teelt ziet men de pH vaak stijgen. Het is nu de vraag of hierdoor de wortels (lang genoeg) wit blijven om een gezonde plant te maken.

De in dit onderzoek gebruikte stoffen waren in de eerste plaats ingezet om het mechanisme achter bruinverkleuring aan te tonen. Niet al deze stoffen zijn direct toepasbaar in de praktijk om uiteenlopende redenen.

Het toepassen van PVPP bleek fenolen voldoende weg te vangen om bruinverkleuring te voorkomen. De stof kent vele toepassingen in het dagelijks gebruik (als stabilisator in o.a. tandpasta, haarspray, verf). Deze stof wordt in laboratoria gebruikt om stoffen uit oplossingen te filteren. Het is echter niet algemeen verkrijgbaar. De toepasbaarheid in de broei, zowel chemisch als prijstechnisch, moet verder worden onderzocht. NaF is werkzaam tegen bruine wortels, maar door zijn giftigheid zal in vervolgonderzoek verder geen aandacht worden gegeven.

Vervolgonderzoek naar het voorkómen van bruine wortels zal zich vooral moeten zijn gericht op de toepassing van anti-oxidanten of PVPP in de praktijk. Aspecten daarbij van belang zijn: De te gebruiken concentraties in samenhang met het fenolgehalte van de bollen, toelating (wettelijk) van de stoffen, bruikbaarheid bij hergebruik van proceswater.



# Bijlage 1. Polyfenoloxidase activiteitsbepaling voor plantmateriaal op microtiterplaat

## **Principe**

Polyfenoloxidase geeft met catechol als substraat een omzetting naar difenolen en vervolgens naar chinonen (bruine kleur). De snelheid van deze enzymatische reactie kan vervolgens worden gemeten bij 500nm

## **Chemicaliën**

- Catechol , 50 mM
- Kpi buffer, 0.1M , pH=5

## **Procedure**

### *a) Extractie*

- 0.1 tot 0.2 gr plantenmateriaal met ijs fijnmalen en op ijs bewaren
- Opnemen in 1.8 ml Kpi buffer
- Epje afdraaien gedurende 15 min bij 14000g
- Supernatant gebruiken voor de PPO-bepaling (mag niet troebel zijn, indien dit het geval is extra centrifugestap draaien)

### *b) Assay*

- Pipeteer de volgende hoeveelheden in microtiterplaat. (totaal volume 275 mikL)
  - o 150 mikL supernatant
  - o 75 mikL catechol, 50 mM
  - o 50 mikL mikL Kpi buffer

Meet de extinctie meteen bij 15 gr C en bij 500 nM gedurende 30 min

Let op :

De stabiliteit van het PPO (buiten de cel) in een buis is niet erg groot, dus altijd op ijs werken en na het maken van het extract meteen de activiteit meten.

## Bijlage 2. Fenol bepaling voor plantmateriaal op microtiterplaat

### **Principe**

Fenolen geven met Folin-Ciocalteus reagens een kleuring die met de spectrofotometer bij 650 nm kan worden gemeten.

### **Chemicaliën**

- TCA TriChloric acetic Acid 10%
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.4M (MM=106)
- Tyrosine (ijkstof) reeks van 0-1mM (MM=181.2)

### **Procedure**

#### *a) Extractie*

- 0.1 tot 0.2 gr plantenmateriaal met vloeibare stikstof fijnmalen
- Opnemen in 1.8 ml  $\text{H}_2\text{O}$
- Epje afdraaien gedurende 15 min bij 14000g
- 0.75ml ruw extract en 0.75 ml TCA op ijs (10 min). Eiwitten slaan neer.
- Opnieuw centrifugeren 15 min bij 14000g
- Supernatant gebruiken voor de fenolbepaling (mag niet troebel zijn, indien dit wel het geval is nogmaals centrifugeren)

#### *b) Assay*

- Pipetteer de volgende hoeveelheden in microtiterplaat. (total volume 2000mikL)
- 560 mikL supernatant
- 1110 mikL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- 330 mikL Folin reagens
- Meet de extinctie na 30 min bij 650 nm

#### *c) Kalibratie*

- Maak m.b.v. Tyrosine een concentratiereeks van 6 punten (0 - 1mM) en maak een ijklijn.