

Wortelverdikking bij komkommer (*Cucumis sativus* L.): rol van zuurstof en gaswisseling

A.J.C. de Visser & A.G.M. Broekhuijsen

ab-dlo

DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek (AB-DLO)

AB-DLO doet onderzoek ter bevordering van de kwaliteit en duurzaamheid van plantaardige systemen. Het instituut ontwikkelt en levert expertise ten behoeve van land- en tuinbouw, inrichters van de groene ruimte, industrieën en overheden. Het onderzoek is onderverdeeld in drie productgroepen/thema's.

Plantaardige productie en productkwaliteit

- Geïntegreerde en biologische productiesystemen
- Onkruidbeheersingssystemen
- Precisielandbouw
- Groene grondstoffen en inhoudsstoffen
- Innovatie glastuinbouw
- Kwaliteit van plant, gewas en product

Bodem - plant - milieu

- Bodem- en luchtkwaliteit
- Klimaatverandering
- Biodiversiteit
- Milieuvreemde stoffen en bodem- en gewaskwaliteit

Multifunctioneel en duurzaam landgebruik

- Nutriëntenmanagement
- Rurale ontwikkeling en voedselzekerheid
- Agro-ecologische zonering
- Multifunctionele landbouw
- Agrarisch natuurbeheer

AB-DLO beschikt over unieke expertise op het gebied van plantenfysiologie, gewasecologie, vegetatiekunde, bodemchemie en -ecologie en systeemanalyse.

AB-DLO verricht onderzoek met behulp van geavanceerde onderzoeksfaciliteiten (laboratoria, klimaatruimten met mogelijkheden voor boven- en ondergrondse metingen, computer-beeldverwerking, mobiele apparatuur voor meting van de lichtbenutting van gewassen en vegetaties, proefbedrijven, enz.).

Adres : Bornsesteeg 65, Wageningen
: Postbus 14, 6700 AA Wageningen
Telefoon : 0317.475700
Telefax : 0317.423110
E-mail : postkamer@ab.dlo.nl
Internet : <http://www.ab.dlo.nl/>

Inhoudsopgave

	pagina
1. Introductie en doel	1
1.1. Kenmerken en symptomen van wortelverdikking	1
1.2. Mogelijke oorzaken van wortelverdikking	1
1.3. Wortels en gaswisseling: Achtergronden van de 'Zuurstof-hypothese'	3
1.4. Doel van het onderzoek	5
2. Materiaal en Methoden	7
2.1. Plantenmateriaal	7
2.2. Behandelingen, begassingsopstelling (N_2 /lucht) en proefopzet	8
2.3. Metingen en fotografie van wortelmorfologie	9
2.4. Beoordeling wortelmorfologie door expert-panel	10
2.5. Statistiek	10
2.6. Evaluatie oorzaak-gevolg relaties volgens Hill-criteria	10
3. Resultaten en Discussie	11
3.1. Experiment I (juni/juli 1997)	11
3.1.1. Effect van O_2 -concentratie en watergehalte van steenwol op de groei en morfologie van wortels, blad en stengel bij komkommer	11
3.1.2. Oordeel van enkele deskundigen op het gebied van wortelverdikking tijdens bezoeken aan AB-DLO	13
3.1.3. Discussie	14
3.2. Experiment II (nov/dec 1997)	15
3.2.1. Waarnemingen: bovengrondse plantendelen	17
3.2.2. Waarnemingen: Wortels	20
3.2.3. Overzicht statistische conclusies uit meetresultaten	23
3.2.4. Diagnose van wortelkringeling: beoordeling foto's wortelmorfologie door expert-panel	24
3.2.5. Overzicht statistische conclusies: beoordeling door expert-panel	27
3.2.6. Bulk-zuurstofgehalte van steenwolvocht en kritische zuurstof-concentratie	30
3.3. Algemene discussie	32
4. Een nieuwe werkhypothese op basis van gegevens uit de praktijk, literatuur en beschreven experimenten	37
5. Samenvatting en conclusies	43
6. Suggesties voor vervolgonderzoek	47
7. Suggesties voor teeltmaatregelen en hypoxie-detectie	49
Dankwoord	51
Literatuur	53
Bijlagen	

1. Introductie en doel

De afgelopen zes jaar komen in de tuinbouw geregeld problemen voor met de groei van plantenwortels op substraatteelt, de zogenaamde 'wortelverdikking', ook wel 'dikke wortels' genoemd (Van Gastel 1998). Daarbij ontstaan na verloop van enkele dagen of weken ongewoon sterk kringelende en verdikte wortels met een diameter tot ongeveer een cm, soms zodanig dat de substraatpotten openbarsten, gepaard met groeiachterstand, productieverlies en zelfs verlies van de planten. De schade wordt inmiddels geschat op ruim 100 miljoen gulden. Over de oorzaak van wortelverdikking tast men na enkele jaren onderzoek nog volledig in het duister (Anonymous 1998^{abc}). De kenmerken, symptomen en mate van wortelverdikking lopen sterk uiteen, onder andere afhankelijk van de plantensoort.

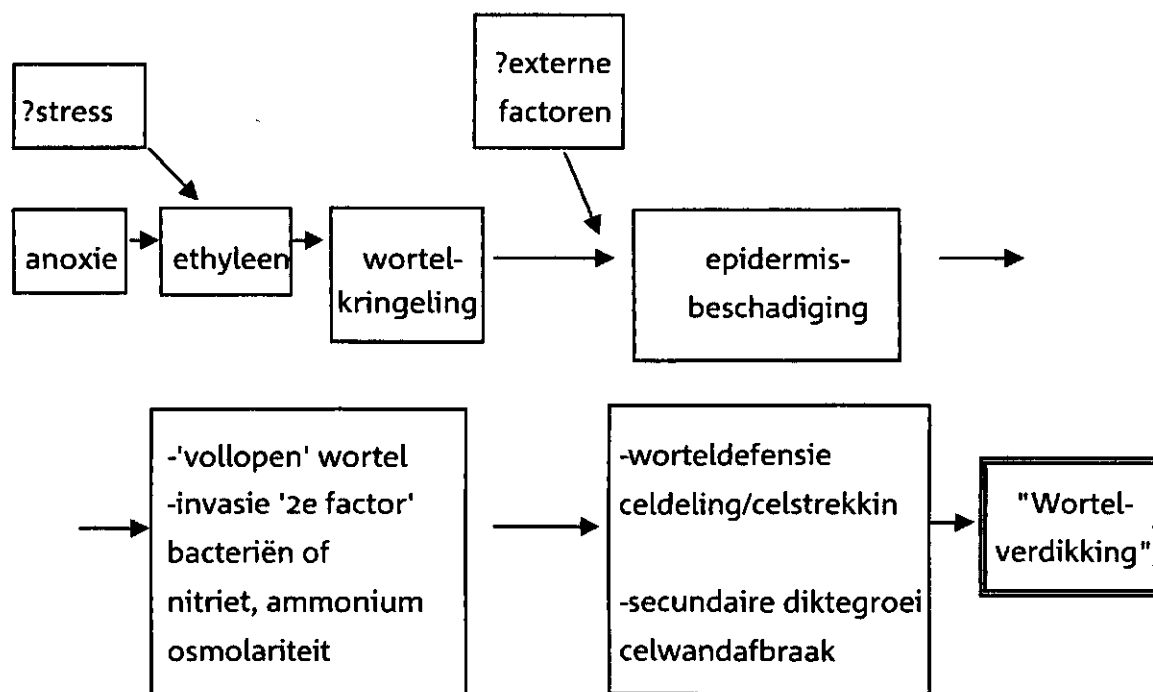
1.1. Kenmerken en symptomen van wortelverdikking

Naast de genoemde extreme verdikking, komen vaak ook kringelende -soms ook kurkentrekkerachtige- wortels voor, en wortels die (bovendien) verglaasd, opengebarsten en/of misvormd zijn, en een verhoogd volume bezitten van intercellulaire luchtholten (aerenchym). Boven- gronds zijn veel voorkomende symptomen donkergroen jong blad ('zwart staan'), en groeiachterstand (Verkerke en Kersten 1997, 1998). De ernst, aard en combinatie van de symptomen kan variëren met de plantensoort. Verlies van de planten kan het gevolg zijn, maar ook herstel is mogelijk.

1.2. Mogelijke oorzaken van wortelverdikking

Dit 'wortelverdikkings' probleem zou mogelijk (mede) veroorzaakt kunnen worden door een sub-optimale zuurstofvoorziening van de wortels, bijvoorbeeld door tijdelijk en lokaal optredende, sterk verlaagde zuurstofconcentraties (hypoxie) of afwezigheid van zuurstof (anoxie) in de rhizosfeer, d.i. de ruimte in het wortelmedium die direct in contact staat met het worteloppervlak; in het geval van lysigene-aerenchym vorming onder invloed van zuurstofgebrek, is de vergroting van intercellulaire luchtholten onvermijdelijk gekoppeld aan verdikking van de wortel (Veen 1996; De Visser 1997). Naast de factor zuurstof is een groot aantal mogelijke alternatieve oorzaken reeds onderzocht en/of nog steeds onderwerp van onderzoek (Heimovaara 1997; Hoogerbrugge 1997; Hoogerbrugge en Verkerke 1997, 1998; Verkerke en Kersten 1997, 1998; Warmenhoven & Baas 1997; Anonymous 1998^{abc}; De Visser 1998^{ab}; De Visser et al. 1998; Van Gastel 1998). Zo kunnen bepaalde vormen van wortelverdikking het gevolg zijn van verhoogde concentraties van aluminium in de rhizosfeer (hypothese; zie o.a. Verkerke 1996; De Visser 1998^a), zoals die bijvoorbeeld optreden bij lage pH waarden (e.g. Marschner 1991; Marschner et al. 1982; Hairiah 1992), die onder andere voorkomen bij N-voeding met ammonium (De Visser 1985; De Visser 1998^{ab}; De Visser et al. 1998; Warmenhoven & Baas 1997). Als mogelijke oorzaken van wortelverdikking werd medio 1997 door de betrokken onderzoeksgroepen gedacht aan een combinatie van stress-factoren (Figuur 1.1), waaronder anoxie en/of hypoxie, met als intermediair ethyleen (etheen) in geval van hypoxie, en diverse andere factoren waaronder mogelijk bacteriën. Deze werkhypothese wordt hier verder aangeduid als het 'Poly-Stress Model' (Fig. 1.1).

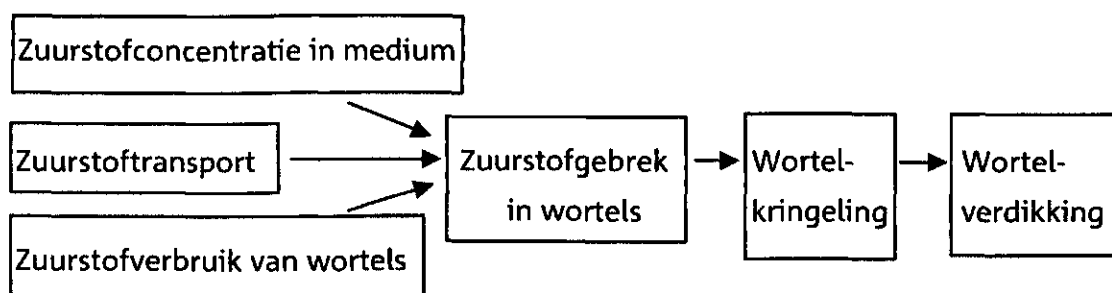
Wortelkringeling en -verdikking en aerenchymvorming zijn enkele van de vele bekende effecten van ethyleen op wortels (e.g. Armstrong et al. 1991; Konings & Lambers 1991; Drew 1991, 1997; Veen 1989). Afhankelijk van de plantensoort kunnen optreden: remming van wortellengtegroei, toename van diktegroei, diageotropisme (diagravotropisme; groeirichting wijkt af van normale neerwaartse patroon). Goeschl en Kays (1975) beschrijven reeds afwijkend golvende, en kurken-trekker-achtig kringelende groei van wortels van erwten en boon (en -in mindere mate- katoen) bij begassing met ethyleen (ca 300 nL/l, 0.3 ppm).



Figuur 1.1. Het 'Poly-Stress Model' voor het ontstaan van wortelverdikking (medio 1997; gewijzigd naar Heimovaara 1997).

Vormen van wortelverdikking, die sterk gelijken op de symptomen zoals beschreven voor komkommer (Verkerke & Kersten 1997) zijn in de literatuur ook beschreven als symptoom van andere ziekten, waaronder infectie door de bacterie *Streptomyces scabies* (Leiner et al. 1996; fytoxis: thaxtomine A), die ook leidt tot groeiremming, afsterven en cel-hypertrofie (extreme celexpansie) bij wortels van vele plantensoorten.

Er zijn diverse redenen om aan te nemen, dat het 'wortelverdikkings' probleem veroorzaakt zou kunnen worden door, wellicht tijdelijk en lokaal optredend, zuurstofgebrek, al wordt dit idee ook bestreden (Warmenhoven, 1997). Wortels lijden zuurstofgebrek wanneer het potentiële zuurstofverbruik in de ademhaling groter is dan de actuele zuurstofaanvoer. De snelheden van zowel verbruik als aanvoer van zuurstof kunnen sterk variëren. Zuurstofgebrek treedt eerder op bij een hoog potentieel zuurstofverbruik door de wortels, zoals bij hoge temperatuur (Drew 1997), in combinatie met een lage zuurstofaanvoersnelheid, zoals in stagnerend water. Het is zeer plausibel dat deze laatste conditie optreedt in steenwol met een hoog watergehalte en laag luchtholte volume (zie volgende sectie). Dit 'Zuurstofgebrek-Model' is getoetst in twee experimenten met komkommer, uitgevoerd in 1997 bij AB-DLO, in opdracht van de Stuurgroep 'Wortelverdikking'.



Figuur 1.2. Het 'Zuurstofgebrek Model' als werkhypothese voor een primaire oorzaak van wortel-verdikking.

1.3. Wortels en gaswisseling: Achtergronden van de 'Zuurstof-hypothese'

Wortels van veruit de meeste plantensoorten zijn voor hun functioneren afhankelijk van een voortdurende gaswisseling, vooral aanvoer van zuurstof en afvoer van koolzuurgas en ethyleen (e.g. Brouwer et al. 1981; Drew 1997; De Visser et al. 1986; Bouma & De Visser 1993; Bouma et al. 1997; Jackson et al. 1991; Laan en Blom 1990; Laan et al. 1989, 1990; Veen 1989). Belangrijke functies van wortels zoals opname van nutriënten en water kunnen conflicteren met deze gaswisseling, omdat het transport van gassen tussen water en plantenweefsel zeer beperkt is, en vrijwel verwaarloosbaar ten opzichte van gastransport tussen lucht en plantenweefsel, vooral bij afwezigheid van convectie/stroming in de waterfase (e.g. De Visser et al. 1990; Drew 1997; Laan et al. 1989, 1990; Nobel 1991). Gezien de fijn-poreuze structuur van steenwol, zijn grote problemen met gaswisseling tussen wortels en substraat te verwachten bij *waterverzadigde* steenwol (gemiddeld ca. 15% lucht in pot). Zelfs bij luchtgehalten tot 40% is het functioneren van wortels bij roos suboptimaal (Baas et al., 1996). Problemen met gaswisseling nemen bovendien toe bij stijgende temperatuur en toenemende worteldichtheid. De oorzaken van genoemde gaswisselingsproblemen worden hier nader toegelicht.

De gaswisseling tussen wortel en rhizosfeer hangt af van twee fysische processen, convectie en diffusie (zie bijv. Leffelaar 1987). Convectie (stroming) van gassen treedt op door plaatselijke drukverschillen (bijvoorbeeld na bevoeien of door atmosferische variaties in druk en temperatuur), of door vorming van gasvormige verbindingen uit niet-gasvormige substraten (bijvoorbeeld: CO₂ uit (bi-)carbonaten bij lage pH). Diffusie van gassen treedt op bij een ruimtelijk verschil in partiële druk van componenten in een gasmengsel (Leffelaar 1987).

Voor de gaswisseling in bewortelde substraten zijn nu de volgende aspecten van groot belang:

- a. De maximale hoeveelheid zuurstof per liter water is 1/30 van de hoeveelheid per liter atmosferische lucht (21% v/v; De Visser et al. 1990). Berekend kan worden, dat in een normaal bewortelde, waterverzadigde steenwolpot slechts voldoende zuurstof aanwezig is voor maximaal enkele uren onderhoud van de wortelademhaling van een 4-bladige komkommerplant

- b. In de waterfase is diffusie onvoldoende snel voor optimaal functioneren van wortels en zelfs 10.000 maal trager dan in de gasfase. Diffusie speelt vrijwel geen rol ten opzichte van convectie, over afstanden groter dan ca. 0.5 mm (e.g. Nobel 1991).
- c. Convectie (stroming) is noodzakelijk voor optimale gaswisseling (ademhaling, ethyleen-afvoer) van wortels in waterig milieu.
- d. De kans op zuurstofgebrek in wortels neemt toe met stijgende temperatuur, omdat de gaswisseling (bijv. zuurstofbehoefte) van wortels sterker toeneemt met stijgende temperatuur (+100-200% per 10°C; 'Q10' ca 2-3) dan diffusie en convectie (slechts +10% per 10°C; 'Q10' ca 1.1; De Visser et al. 1990; Nobel 1991).
- e. In fijn-poreuze media zoals steenwol reteren nauwelijks luchtholten bij waterverzadiging, zodat dan gaswisseling van de wortels voornamelijk plaats moet vinden via de waterfase.
- f. In deze media is diffusie bovendien trager dan voorspeld door de Wet van Fick, doordat de feitelijke diffusieweg langer is dan de geometrische afstand (tortuositeit), doordat substraatdeeltjes het voor diffusie beschikbare oppervlak verkleinen, en doordat de diffusie-fluxen van gassen in meervoudige mengsels niet onafhankelijk zijn (Leffelaar 1987).
- g. Het CO₂-concentratieverschil tussen wortel en wortelmedium bepaalt de richting en snelheid van de 'mass flow' van gassen (waaronder zuurstof) tussen de bovengrondse delen en de wortels; deze massastroom speelt een negatieve rol in de zuurstofvoorziening van de wortels bij een hoge CO₂ concentratie in het wortelmilieu (Armstrong et al. 1991).

Uit het voorgaande wordt duidelijk, dat een optimale gaswisseling van wortels in fijn-poreuze substraten zoals steenwol bij hoge watergehalten grotendeels afhankelijk is van stroming van water (convectie). Aangezien dezelfde fijn-poreuze structuur waterstroming tegengaat, valt te verwachten, dat onder deze condities de gaswisseling van wortels sub-optimaal is. De kwantitatieve aspecten hiervan vormen onderdeel van lopend onderzoek bij AB-DLO (zie voorstel De Visser & Rappoldt 1997), uitgevoerd in opdracht van de 'Stuurgroep Wortelverdikking'.

In de tuinbouw wordt veelvuldig gebruik gemaakt van wortelmedia in de vorm van kunstmatige substraten, in combinatie met gedefinieerde minerale voedingsoplossingen. Als start-materiaal gebruiken telers jonge planten (bij komkommer het 5-blad stadium), meestal afkomstig van gespecialiseerde kweekbedrijven, gekiemd in vermiculiet en (al/niet na verspenen) gekweekt op steenwolpotten en -matten. Steenwol is een algemeen toegepast substraat. Het is een fijn-vezelige, minerale 'wol', geperst in de vorm van blokken ('potten') en matten in diverse formaten. Eigenschappen van steenwol zoals stevigheid, dichtheid, structuur, en samenstelling zijn in het verleden geregeld gewijzigd en kunnen ook binnen partijen sterk variëren. Gedetailleerde informatie hierover is niet bekend en/of niet toegankelijk.

Bovenstaande gegevens vormen een aanwijzing, dat steenwol geen optimaal bewortelingssubstraat is, vanuit bodemkundig, fysisch en fysiologisch oogpunt gezien. Dit komt met name door het ontbreken van grove (continu gashoudende) poriën, die van belang zijn voor een optimale gaswisseling. Alleen doorlopende, grove poriën met een diameter van tenminste enkele mm blijven voldoende vrij van vocht om continu het transport van gassen van en naar de wortels te verzekeren met voldoende snelheid, ongeacht het watergehalte van de steenwol (zie ontwerp 'Porie-Pot', De Visser 1998^b). Het is deze *transportsnelheid* die bepalend is voor het optimaal functioneren van wortels, veel meer dan de beschikbare *hoeveelheid* of concentratie (van bijvoorbeeld zuurstof).

Zuurstofuitwisseling is hierbij van grotere invloed op het functioneren van wortels dan koolzuurgasuitwisseling (e.g. Bouma et al. 1997; Drew 1997). Ethyleenaccumulatie in en rond wortels kan eveneens een belangrijk proces zijn (Drew 1997), en wordt voornamelijk onderzocht

door (en in samenwerking met) andere onderzoekspartners (Heimovaara, TNO; Pierik & Visser, KUN) op het gebied van wortelverdikking.

Steenwol zal om genoemde redenen vooral bij hoge watergehalten, hoge temperaturen (Drew 1997), hoge worteldichtheid, en hoge 'tortuosity' de gasuitwisseling van wortels belemmeren. Over een aantal eigenschappen van deze steenwol, zoals bufferend vermogen en koolzuurgas en aluminium-afgifte is reeds eerder gerapporteerd (De Visser 1998^{ab}; De Visser et al. 1998). Deze en andere eigenschappen van steenwol zouden eveneens een rol kunnen spelen bij het ontstaan van wortelverdikking, maar moeten hier verder buiten beschouwing blijven (zie echter: De Visser et al. 1998).

1.4. Doel van het onderzoek

Experiment I:

- a. Vaststellen of en op welke wijze *zuurstof* een *specifieke* rol speelt bij het ontstaan, voortduren en herstel van het verschijnsel 'dikke wortels' (zie ook AB-voorstel Veen 1996); werkhypothese: lokaal of tijdelijk O₂-gebrek in de steenwolpot is de oorzaak van het verschijnsel.
- b. Vaststellen van de zuurstofbehoefte van komkommerwortels.
- c. Vaststellen van condities waaronder wortels over onvoldoende zuurstof beschikken.

Experiment II:

- a. Toetsen van de reproduceerbaarheid van het optreden van wortelkringeling (en wortelverdikking) bij zuurstofgebrek zoals in experiment I;
- b. Verbetering van de karakterisering van wortelmorfologie door fotografische vastlegging, en via beoordeling door een expert-panel;
- c. Nagaan of oproepen van wortelverdikking mogelijk is door blootstellen van wortels aan wisselende zuurstofconcentraties.

De specifieke rol van zuurstof is hier onderzocht door vrijwel uitsluitend de zuurstof-concentratie in de steenwol te verlagen (via verdunning met N₂-gas), zonder belangrijke verdunnings-effecten op de concentraties van CO₂ en ethyleen in de steenwol.

Daarnaast is een hoog watergehalte als behandeling toegepast, welke transport en concentraties van alle drie genoemde gassen beïnvloedt.

De resultaten van de genoemde experimenten zijn in de loop van 1997 en 1998 geregeld bekend gemaakt, o.a. via kwartaalrapportages door de 'Stuurgroep Wortelverdikking' (e.g. Anonymous 1998^{ab}) en besproken op bijeenkomsten met betrokken onderzoekers, vertegenwoordigers uit bedrijfsleven en leden van de genoemde stuurgroep.

2. Materiaal en Methoden

2.1. Plantenmateriaal

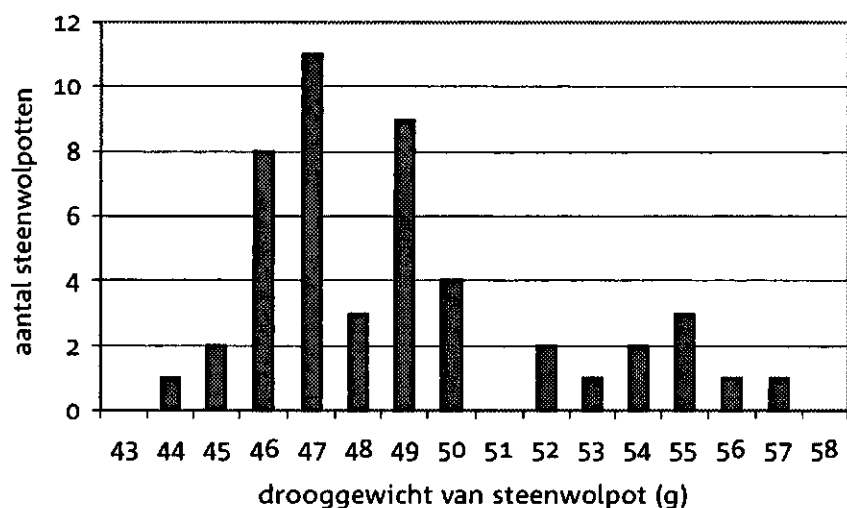
Jonge komkommerplanten in het 1-bladsstadium werden verkregen van een kweker (*Cucumis sativus* L., cv. Korinda; Herkomst kweker 'X'), op steenwolpotten met vermiculiet in het plantgat (Experiment I). Voor experiment II is zaad van cv. Farbio gezaaid in vermiculiet in het plantgat van steenwolpotten. De planten zijn opgekweekt in kas I van AB-DLO te Wageningen. Tijdstip: juni-juli 1997 (exp. I) en nov.-dec. 1997 (exp. II).

Substraat. Steenwolpotten (merk: Cultilène HR) van 10x10x7 cm, drooggewicht 48.4 ± 0.9 g per pot (95% betrouwbaarheidsinterval). De verdeling van de potdrooggewichten (Exp. II) was niet normaal: het histogram (Figuur 2.1) vertoonde twee populaties, met een gemiddelde rond 47 g (grootste groep, ca 75%), en 53 g (kleinste groep, ca 25%). De potten werden verloot over de behandelingen. De gemiddelde drooggewichten van de potten vertoonden een maximale afwijking tussen de behandelingen van het totaal-gemiddelde van 7%. Bij het hanteren van de potten is zoveel mogelijk mechanische beschadiging van de structuur voorkomen, om een versnelde verwerking te voorkomen (zie De Visser 1998^a) en mogelijke versterking van wortelverdikking te vermijden (Hoojerbrugge & Verkerke 1997, 1998).

Tabel 2.1. Drooggewichten van de steenwolpotten gebruikt in experiment II, per behandeling (gemiddelden, n=5, met SE tussen haken).

Behandeling Container/O ₂ -concentratie	Drooggewicht steenwolpotten (g)		
	Watergehalte		totaalgemiddelde
	Hoog	Laag	
Wisselend 5 en 21%	51.9 (4.3)	48.8 (3.7)	50.4 (4.1)
Continu 5%	47.9 (2.5)	48.7 (3.6)	48.3 (3.0)
Continu 21%, gesloten	48.7 (3.7)	45.6 (2.6)	47.1 (3.4)
Continu 21%, open	47.9 (3.1)	47.9 (1.1)	47.9 (2.2)
Totaalgemiddelde:	49.1 (3.6)	47.8 (3.0)	48.4 (3.4)

Groeicondities. Experiment I (juni-juli 1997) en II (nov.-dec. 1997) werden uitgevoerd in dezelfde kas, en daardoor onder sterk verschillende externe klimaatsomstandigheden, waarbij temperatuur, luchtvochtigheid en daglengte (lichtperiode) vergelijkbare waarden gehandhaafd konden worden, maar de lichtintensiteit niet (fotosynthetisch actieve straling 400-700nm: $0.5\text{--}1.2 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in Exp. I en : $0.1\text{--}0.2 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in Exp. II. Bijbelichting in de winter vond plaats met SON-Tx tot een lichtperiode van 14 uur. Overige condities: kas met klimaatregeling; kieming en eerste 10 dagen groei bij 23 °C/18 °C (D/N, 8-22 / 23-7 uur; 20 °C tijdens D/N-overgang van 1 uur) en daarna (ontwikkelingsstadium: 1e blad ca 1cm lang), bij 21 °C/18 °C (D/N, verder ongewijzigd). De relatieve vochtigheid bedroeg ca 75%. De gebruikte voedingsoplossingen waren van het type 'Steiner', pH 6 (Steiner 1966), EC 2 mS cm⁻¹. De pH werd bijgesteld met H₂SO₄. De planten werden bevloed (eb-vloed systeem), afhankelijk van het gewenste watergehalte eens in de drie dagen tot dagelijks (Exp. I) en eens in de week tot drie dagen (Exp. II).



Figuur 2.1. Histogram van de drooggewichten van de steenwolpotten gebruikt in experiment II.

2.2. Behandelingen, begassingsopstelling (N_2 /lucht) en proefopzet

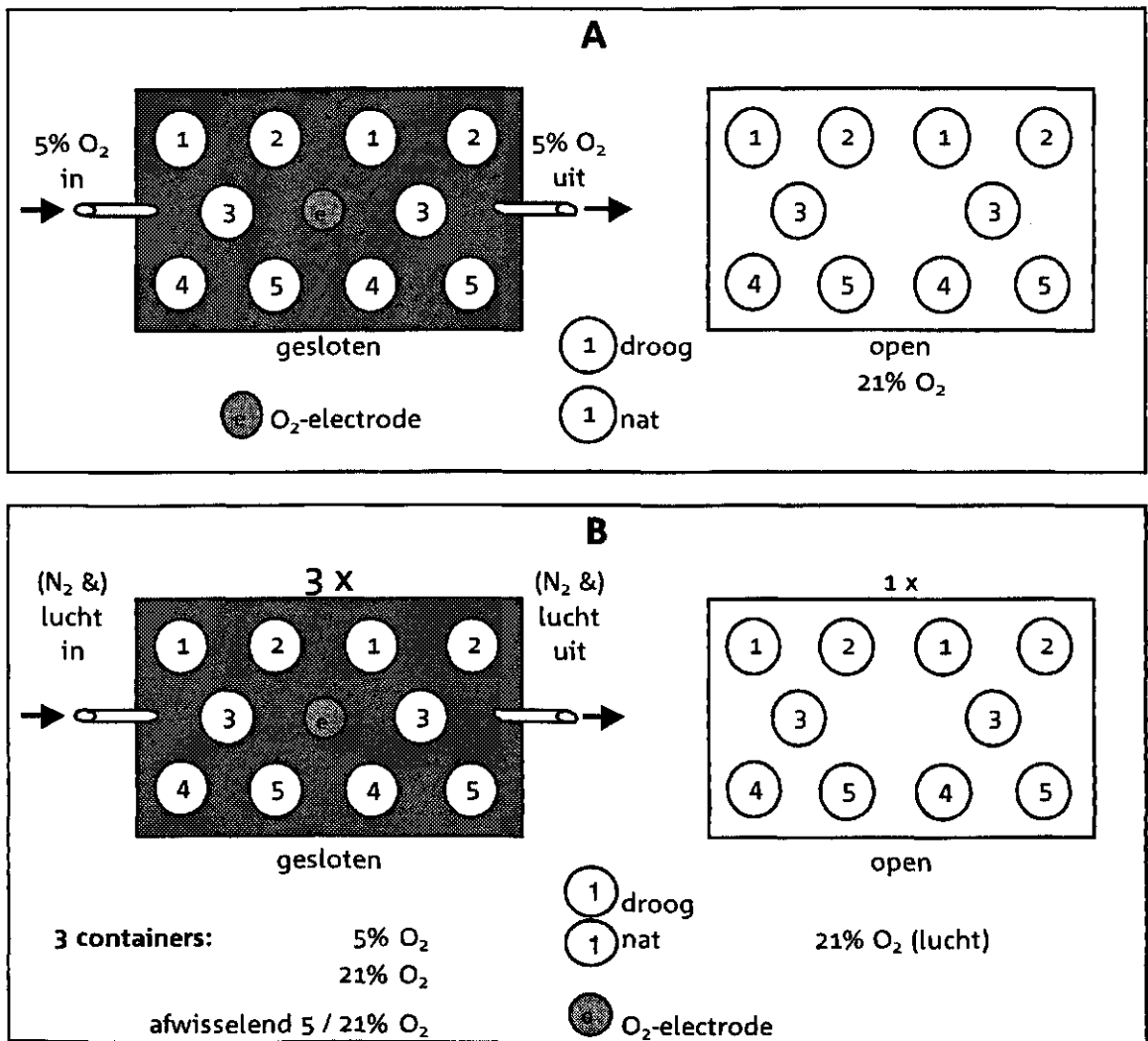
Van groot belang voor de interpretatie (en herhaling) van de behandelingen is het volgende. De verlaging van de zuurstofconcentratie rond de wortels is hier gerealiseerd door ventilatie van de atmosfeer rond de wortels via doorstroming met lucht die verdund was met stikstofgas (N_2). Essentieel is hierbij, dat deze behandeling *specifiek* de partiële zuurstofdruk heeft verlaagd, zonder een belangrijk direct effect op de concentraties van de gassen CO_2 en ethyleen, die door de wortels worden geproduceerd, en hier normaal met de N_2 -verdunde lucht zijn afgevoerd uit de doorstroom-container. Daarentegen leidt de behandeling met hoog watergehalte wel degelijk, naast de vertraagde zuurstofaanvoer naar de wortels, ook tot een vertraagde afvoer, en dus veelal ophoping, van CO_2 en ethyleen in het wortelmilieu.

De potten werden aangebracht in PVC containers afgesloten met platen van PVC (grijs; exp. I) of van transparant PVC (exp. II). De opstelling is weergegeven in Figuur 2.2.

Begassing van wortelstelsels. Begassingsopstelling: 10 steenwolpot-planten per PVC-container met inhoud van 97 l, bij de plant-stengel afgesloten met een gangbare plant-vriendelijke kit (Terostat); continue doorstroming van vers lucht/ N_2 -gasmengsel met ca 70 l/u.

Watergehalte. Er waren twee behandelingsniveaus: 'Hoog' (Nat; pot in glazen petrischaal) en 'Laag' (Droog; zonder petrischaal, direct op de PVC bodemplaat van de begassings-container); na bevloeien bleef de voedingsoplossing nog zeker ca 12 uur aanwezig in petrischaal, maar liep deze direct weg van de bodem van de begassingscontainer. In Exp. II varieerden de gewichten van de potten in de open PVC container tussen 400 en 550 g water/pot ('Nat') en 200 en 550 g water/pot ('Droog'); de gewichten (en watergehalten) van de potten in de gesloten begassingscontainers konden niet bepaald worden gedurende het experiment, maar alleen bij de eindoogst.

Zuurstofconcentratie in atmosfeer rond potten: Normaal (21% O_2) en Laag (5% O_2 in lucht); constante monitoring van O_2 concentratie met polarografische zuurstofelektrode (Yellow Springs Instruments, Ohio, model 51 en model 5300).



Figuur 2.2. Rangschikking van behandelingen in experiment I (A) en II (B), over de rol van zuurstofconcentratie (volume % O₂) in de lucht rond steenwolpotten en van het watergehalte daarvan ('droog' en 'nat'; voor details zie tekst) bij het ontstaan van wortelkringeling en -verdicking bij jonge komkommerplanten op steenwolpotten (n=5).

2.3. Metingen en fotografie van wortelmorfologie

Zuurstofconcentraties in lucht en watermonsters uit steenwolpotten werden polarografisch bepaald (e.g. De Visser et al. 1986, 1990). Enkele verkennende 'in situ' metingen in steenwolpotten zijn verricht met een Oxygen Diffusion Rate elektrode (mmv Rappoldt en Harmanny, ABDLO; Rappoldt 1992, 1995).

Chlorofylgehalte werd bepaald aan intact blad door een 4-tal metingen verspreid over een blad, van rood licht transmissie (640 nm) met een SPAD-502 chlorofyl meter (Minolta, Japan).

Nitrietgehalte van watermonsters is bepaald met indicator strips (Merck-oquant nr 10020).

Op de dag van de eind oogst (Exp. II; 33 dgn na zaaien; ca 6 echte bladeren per plant) zijn de kunststofwikkels van de potten verwijderd en zijn foto's gemaakt van enkele intacte planten (zie foto in sectie 3.2.1) en van aanwezige wortelstelsels op een willekeurige zij- en bovenkant van de steenwolpotten van alle planten (zie bijlage 1). Twee dagen later zijn opnamen gemaakt

van vrijgeprepareerde wortels in plantgat en steenwol (zie bijlage 2). Om diverse redenen was het slechts mogelijk van sommige van de steenwolpotten grote intacte delen van wortelstelsels vrij te prepareren (foto in sectie 3.2). De fotografie is uitgevoerd door de fotodienst van DLO te Wageningen.

2.4. Beoordeling wortelmorfologie door expert-panel

Een aantal foto's van bewortelde steenwolpotten en vrijgeprepareerde wortels (in totaal 13 planten uit 3 verschillende behandelingen) van experiment II is verzonden aan een 10-tal experts op het gebied van wortelverdikking (onderzoek, advisering en bedrijf), samen met een vragenlijst. Daarvan hebben er 8 de vragenlijst ingevuld geretourneerd. Van elk van de 13 monsters zijn 8 onafhankelijke kwalificaties verkregen ten aanzien van de mate van wortelkringeling, -verglazing en -verdikking.

2.5. Statistiek

Data zijn geanalyseerd met het statistisch pakket GENSTAT 5 (Payne 1987). Er waren 3 proef-factoren:

1. Zuurstofconcentratie rond de potten (2 niveaus);
2. Watergehalte van de potten (2 niveaus, 'droog' en 'nat');
3. Wortelmedium-atmosfeer rond de steenwolpotten (2 typen: afgesloten+ geventileerde containers met 5% (v/v) O₂ en/of 21% (v/v) O₂, en open containers).

Het aantal behandelingen (objecten) bedroeg vier (Exp. I) en acht (Exp. II; zie Fig. 2.1). Het aantal herhalingen bedroeg 4 of 5. De uitkomsten zijn geanalyseerd middels variantie-analyse (ANOVA). Als indicatie voor spreiding is in de tabellen en figuren de 'standard error' weergegeven, of het kleinste significante verschil (LSD, $P < 0.05$); waar gewenst wegens duidelijkheid zijn significante verschillen ($P < 0.05$) tevens aangeduid met letters.

2.6. Evaluatie oorzaak-gevolg relaties volgens Hill-criteria

Evaluatie van de uitkomsten vond verder plaats aan de hand van de criteria zoals deze sinds de jaren '60 worden toegepast in epidemiologisch onderzoek naar oorzaak-gevolg relaties, de zogenaamde '*Hill-criteria*' (e.g. Van Rongen & Koops 1997).

3. Resultaten en Discussie

De resultaten van twee experimenten worden hier weergegeven en besproken.

3.1. Experiment I (juni/juli 1997)

Doel van dit experiment was: nagaan of zuurstofgebrek leidt tot wortelverdikking.

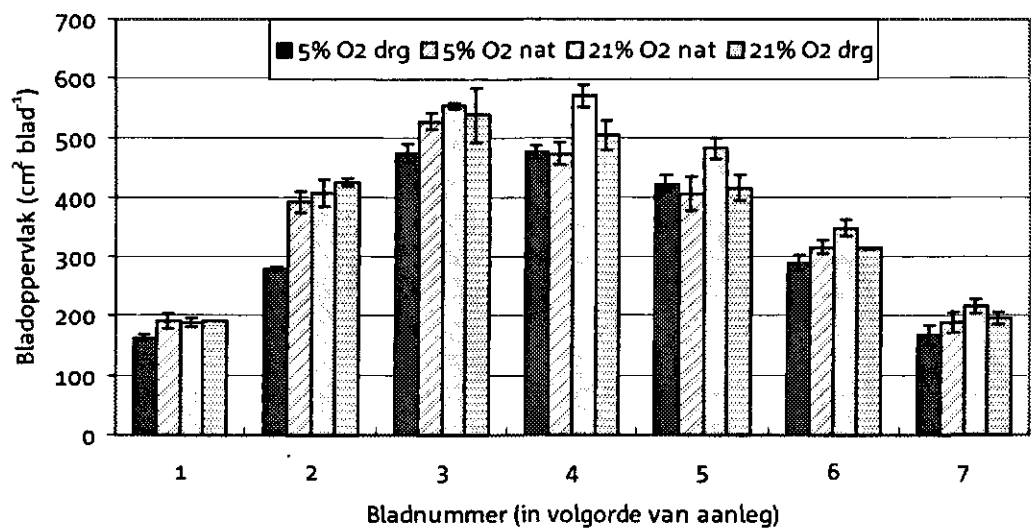
Gezonde planten van cv. Korinda werden overgebracht van een kweker naar een AB-DLO kas rond 10 dagen na zaaien, in het stadium van cotylen + eerste echte blad. Deze werden bevoeid met Steiner voedingsoplossing (eb-vloed systeem), ongeveer eens per 3 dagen, gedurende 10 minuten, en wel:

- 10 planten met wortels in 5% O₂-atmosfeer, waarvan 5 in petrischalen (verhoogd watergehalte).
- 10 planten met wortels in lucht (21% O₂), waarvan 5 in petrischalen.

3.1.1. Effect van O₂-concentratie en watergehalte van steenwol op de groei en morfologie van wortels, blad en stengel bij komkommer

Waarnemingen en behandelingen: Anderhalve dag na de start van de behandeling gingen alle 5% O₂-planten zeer slap, terwijl de natte en droge controle planten het blad in vrijwel horizontale stand hadden. Daarom is gedurende 20 uur perslucht gegeven bij ongewijzigde doorstroomsnelheid. Enig herstel van bladstand trad op. Daarna is nogmaals bevoeid.

Na nog eens 3 dagen bij 5% O₂ bleken het 2e en 3e echte blad achtergebleven in groei (Fig. 3.1.1; Tabel 3.1.1 en 3.1.2), en wel alleen in de behandeling met hoog watergehalte EN laag zuurstofgehalte. De bladstand bleef deels hersteld, de planthoogte bleef iets minder, zoals ook blijkt uit de geringere stengellengte (Fig. 3.1.2.)



Figuur 3.1.1. Effect van O₂-concentratie in de atmosfeer rondom en watergehalte van de steenwolpotten op de groei van blad (bladoppervlak; vergewicht van blad vertoonde overeenkomstige behandelingseffecten) bij komkommer cv. Korinda (gemiddelden van 5 waarnemingen, ±SE).

Tabel 3.1.1. Effect van een laag zuurstofgehalte (5 volume %) in het wortelmedium (als percentage van 21 % O₂-controle , gedurende 6 dagen, op de bladlengte van komkommerplanten cv. Korinda in het 3-blad stadium. Significante verschillen ten opzichte van de 21% controles zijn aangeduid met een asterisk (P<0.05).

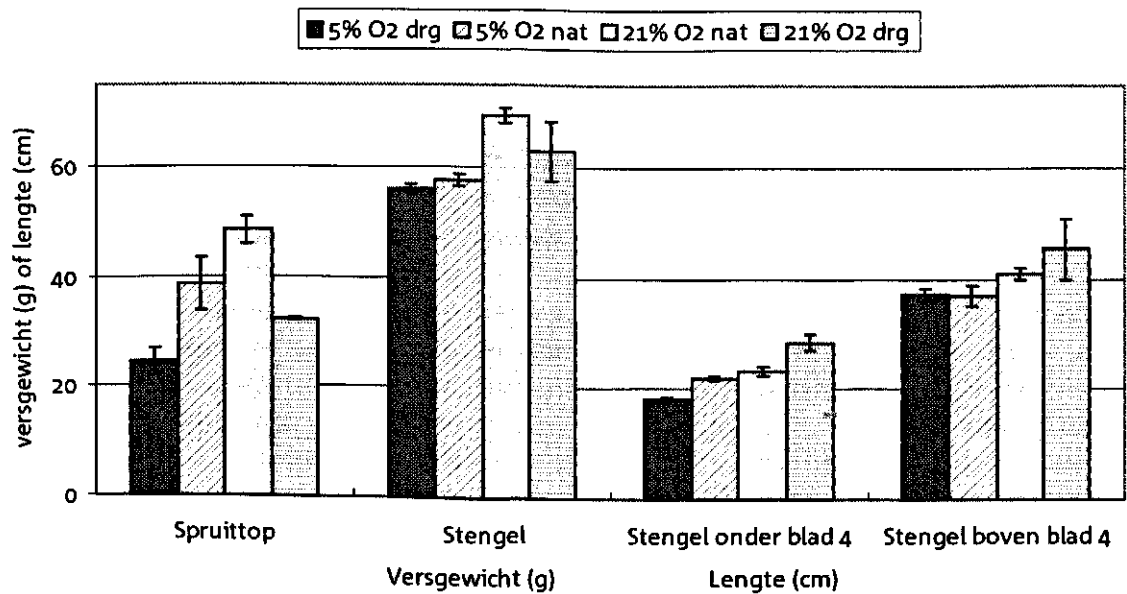
Steenwol-	Bladlengte van 5% O ₂ -planten (als percentage van de lucht-controle van 21% O ₂)	
	2e blad	3e blad
Watergehalte		
Hoog	83 *	92 *
Laag	100	100

Na in totaal 1 week groei bij laag zuurstofgehalte zijn de wortels bekeken. In de 5% O₂-wortel-container waren adventiefwortels gevormd aan het hypocotyl boven de steenwolpot, en wel het sterkst bij *hoog watergehalte* van de steenwol. Bij beide O₂-concentraties vertoonden de planten bij hoog watergehalte duidelijk minder wortels aan de onderzijde van de steenwolpot. Van alle behandelingen leek die met 5% O₂ + hoog watergehalte meer kringelige wortels (voorstadium van wortelverdikking) te op te leveren (Tabel 3.1.2), in vergelijking met de overige behandelingen; de behandelingen zijn voortgezet in de hoop op duidelijker verschillen na ca. 2 weken.

Tabel 3.1.2. Effecten van zuurstofconcentratie van de atmosfeer rond de steenwolpotten en van het watergehalte van de steenwol op blad- en worteleigenschappen van komkommerplanten van cv. Korinda na een behandeling van een week.

Zuurstof-concentratie	Steenwol-Watergehalte	Wortel-Kringeligheid	Slapgaan blad	Bladgroei- Remming
(% v/v)				
5	Hoog	ja	ja	ja ¹
5	Laag	geen	ja	ja ²
21	Hoog	geen	nee	ja ²
21	Laag	geen	nee	controle

Notes: 1: alle bladeren; 2: alleen 4e, 5e en 6e blad; zie ook Figuur 3.1.1.



Figuur 3.1.2. Effect van O₂-concentratie in de atmosfeer rondom en watergehalte van de steenwolpotten op de groei van blad (versgewicht top) en stengel (versgewicht en lengte) bij komkommer cv. Korinda (gemiddelden van 5 waarnemingen, ±SE).

3.1.2. Oordeel van enkele deskundigen op het gebied van wortelverdikking tijdens bezoeken aan AB-DLO

1e keer: 5-tal leden en gasten van de ‘Stuurgroep Wortelverdikking’; 1 week na de start van de begassing. Allen meenden in de natte potten bij lage zuurstofconcentratie kringeling te zien, een symptoom dat bij komkommer gezien wordt vlak voor en tijdens het optreden van wortelverdikking.

2e keer: W. Verkerke, PBG, enige dagen later bij de eind oogst; oordeel: mate van wortelkringeling: ‘1’ op schaal van 0 tot 3.

3.1.3. Discussie

Rol van O_2 -concentratie en watergehalte van steenwol bij het optreden van wortelkringeling en -verdikking

Wortels verbruiken zuurstof in de ademhaling, waarbij energie wordt vrijgemaakt voor talloze processen, veelal samengevat als groei, onderhoud en ionenopname (o.a. Veen, 1989; Bouma & De Visser 1993; Bouma et al. 1994, 1996). Plotselinge sterke verlaging van de zuurstof-beschikbaarheid leidt daardoor veelal tot remming van deze processen, dikwijls later gevolgd door aanpassing van de plant aan de nieuwe situatie, en (gedeeltelijk) herstel van de genoemde functies. Aangezien ionen- en wateropname deels gekoppeld zijn, zijn verwelking ('slap gaan') en bladgroeiremming eveneens een te verwachten reactie op (acuut) zuurstofgebrek. Deze symptomen zijn ook inderdaad waargenomen.

Echter, het waargenomen 'slap gaan' bleek deels te berusten op een omlaag krommen van de bladsteel, de zogenaamde 'epinastie', een bekende groeireactie op ethyleen. De ethyleen-vorming in het blad is verhoogd bij (licht) zuurstofgebrek in de wortels, doordat in de wortels (een deel van) de voorloperstof ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; directe precursor in de ethyleenbiosynthese) niet kan worden omgezet in ethyleen, maar na transport vervolgens wel in het blad, omdat bij de omzetting door het verantwoordelijke enzym ACC oxidase zuurstof verbruikt wordt (e.g. Kende 1993; Yang en Hoffman 1984).

Zuurstofgebrek kan optreden door verlaagde O_2 -concentratie in de atmosfeer (c.q. rhizosfeer), maar ook door een verlaagd O_2 -transport, zoals voorkomt bij een hoog watergehalte van het medium in combinatie met zeer geringe stroming daarvan langs het worteloppervlak. Met behulp van een ODR-elektrode (Rappoldt 1992, 1995) zijn verkennende metingen verricht aan steenwolpotten met en zonder planten, voor het vaststellen van zuurstoftransportsnelheden in steenwol. Inderdaad kon daarin zuurstoftransport worden gemeten, met bijdragen van zowel diffusie als convectie. Doordat meer tijd nodig bleek voor calibratie en ontwikkeling van kwantitatief betrouwbare procedures, moesten de activiteiten voortijdig worden gestaakt. In het onderzoek voor 1998 wordt de ODR-techniek verder ontwikkeld en toegepast (zie onderzoeksvoorstel aan de Stuurgroep wortelverdikking, De Visser en Rappoldt 1997)

Extreme wortelverdikking is in dit experiment niet waargenomen, maar wel de kringeling die ermee gepaard gaat. Aangezien wortelverdikking een groeiproces is, en wortelgroei bij komkommer alleen mogelijk is in aanwezigheid van zuurstof (en andere groeifactoren), is het goed mogelijk dat in dit experiment de mate, duur en/of lokaliteit van het zuurstofgebrek niet goed gekozen zijn. Het is waarschijnlijk, dat in de praktijk zuurstofgebrek in steenwolpotten lokaal is, en daarmee ook leidt tot *plaatselijke en tijdelijke* remming van wortelgroei (kringeligheid), remming van onderhoud (o.a. van membranen leidend tot lekkage; glazigheid) en remming van ionen- en wateropname (bladgroeiremming; slap gaan). Met name wisseling van de zuurstofconcentratie zou wortelverdikking kunnen veroorzaken (zie experiment II).

Duidelijk was, dat wortelkringeling verreweg het sterkst was bij combinatie van lage zuurstofconcentratie en hoog watergehalte. Dit zou kunnen betekenen dat naast zuurstof(tekort) ook ethyleen- en koolzuurgas-ophoping een rol spelen bij wortelverdikking.

3.2. Experiment II (nov/dec 1997)

Dit experiment is opgezet als herhaling van experiment I, met als voornaamste doel te toetsen of het effect van lage zuurstofconcentratie en hoog watergehalte op de kringeligheid van de wortels (exp. I) reproduceerbaar is. Daarnaast is het idee getoetst, dat wisselende zuurstofconcentratie rond de wortels kan leiden tot wortelverdikking.

Experiment II is doelbewust gewijzigd op de volgende punten ten opzichte van experiment I:

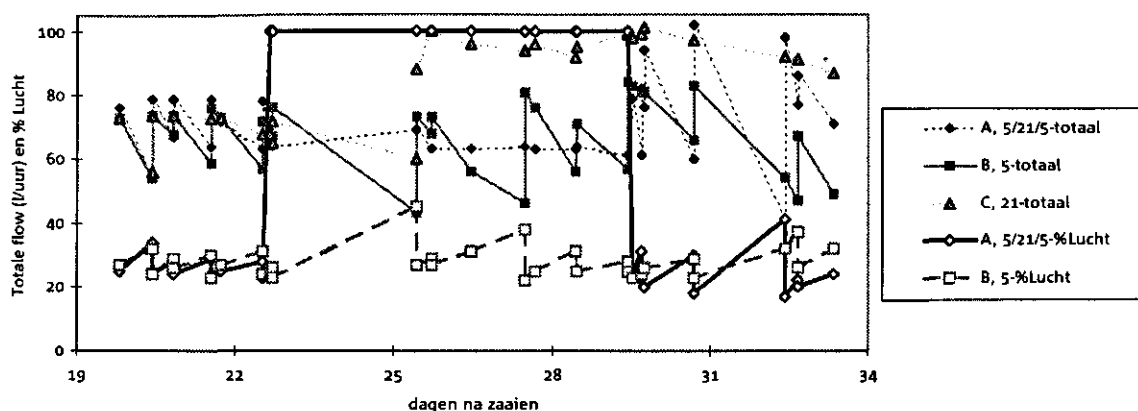
- de planten zijn opgekweekt uit zaad, en niet als kiemplanten verhuisd van een kweker naar de AB-DLO kas (meer controle over en bekendheid met geschiedenis van het plantmateriaal; geen verhuis-stress);
- een andere cultivar van komkommer is gebruikt, nl. cv Farbio;
- technische en methodologische verbeteringen zijn aangebracht.

De technische verbeteringen waren onder andere: 1) lichtdoorlatende bovenzijden van de wortelcontainers (perspex), 2) toevoeging van een behandeling met 21% O₂ (lucht) in een afgesloten container en bij eenzelfde ventilatie-voud zoals bij de 5% O₂ behandeling, en 3) fotografische vastlegging van de wortelmorfologie.

Tenslotte vond experiment II plaats onder wintercondities in november en december (met assimilatiebelichting), in tegenstelling tot experiment I (zomercondities; juni-juli).

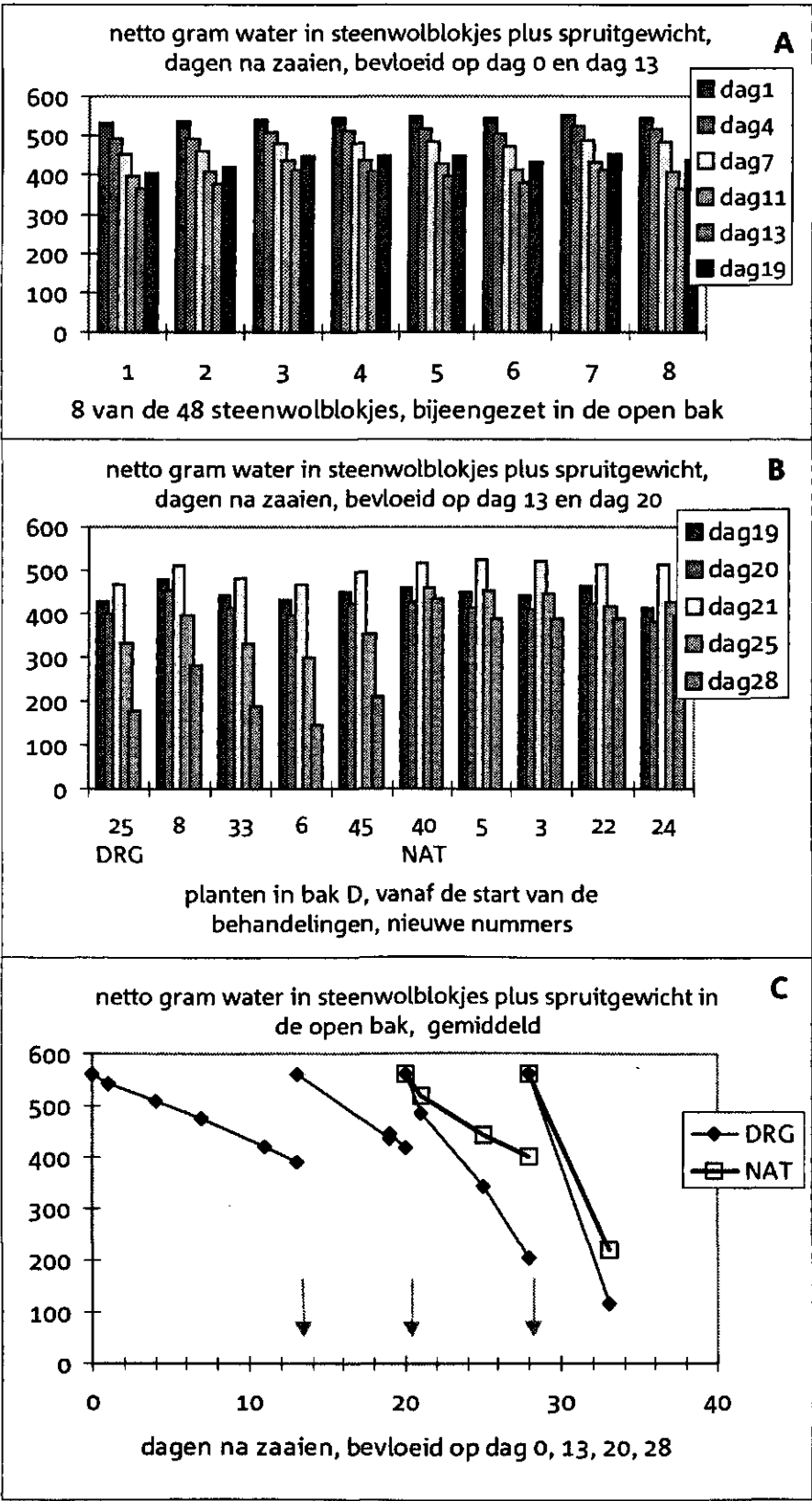
De behandelingen: zuurstofconcentratie, en watergehalte

Figuur 3.2.1. toont de feitelijk gerealiseerde verlaging van de zuurstofconcentratie in de atmosfeer rond de steenwolpotten, en de doorstroomsnelheid, bij zowel de 5% als de 21% O₂ behandeling.



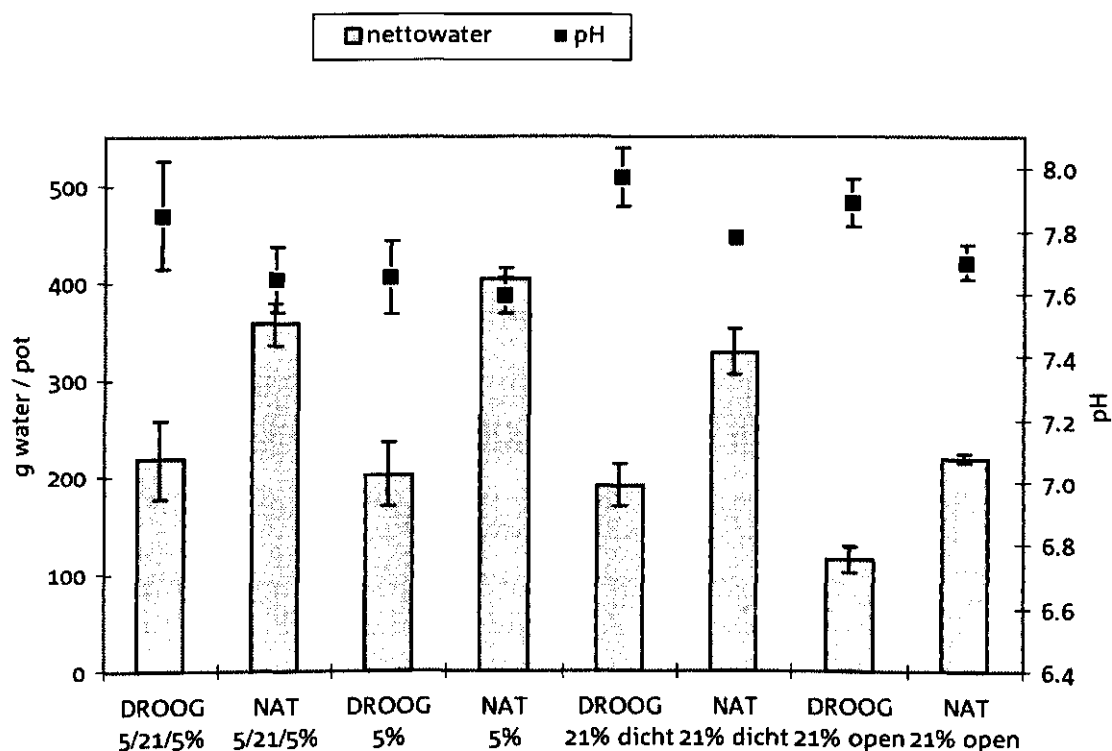
Figuur 3.2.1. Het tijdsverloop van de zuurstofconcentratie (% van atmosferisch) en de doorstroomsnelheid rondom de steenwolpotten bij de diverse behandelingen met gesloten containers (A, B en C). A, afwisselend 5 en 21% O₂; B, continu 5% O₂ (N₂-verdunde lucht), C, 21% O₂ (lucht).

Figuur 3.2.2. toont het verloop van het watergehalte van de steenwolpotten in de loop van het experiment. Een pot kon maximaal ongeveer 550 gram water vasthouden. De gegeven gewichten zijn inclusief de (groeïende) plant, waarvan het gewichtsaandeel echter gering is (<10%). Tot aan de start van de begassing, 19 dagen na zaaien, was 1 tussentijdse bevloeiing genoeg om het watergehalte hoog te houden (ca 400-500 g/pot; A en C). De gewichten vanaf dag 19 (B en C) zijn van de potten op de open bak, omdat alleen deze regelmatig gewogen konden worden. Het onderscheid in 'droge' en 'natte' behandeling begon vanaf de bevloeiing op dag 20. Er is een dag later al een duidelijk verschil tussen 'droge' en 'natte' potten. Dit verschil was op dag 28 opgelopen tot ca 200 g/pot.



Figuur 3.2.2. Het tijdsverloop van het watergewicht plus spruitgewicht van de komkommerplanten op steenwolpotten gedurende experiment II. Belangrijkste variabele is het gewicht van het water in de pot. A en C: Dag 1-19, kiemplant stadium, geen behandelingen; B en C: Dag 19-33, niet begaste planten (in de open bak), ‘droge’ & ‘natte’ behandeling vanaf de bevloeiing op dag 20.

Figuur 3.2.3. toont het (netto) watergewicht en de pH in de steenwolpotten in alle containers bij de eind oogst. In de gesloten containers bevatten de 'natte' potten gemiddeld bijna twee maal zoveel water als de 'droge' potten (140 tot 200 g meer). De potten in de open container waren iets 'droger' dan de overige. De pH liep uiteen van 7.5 tot 8.1 en was over het algemeen in de droge potten 0.2 eenheden hoger, behalve bij de lage zuurstofconcentratie.

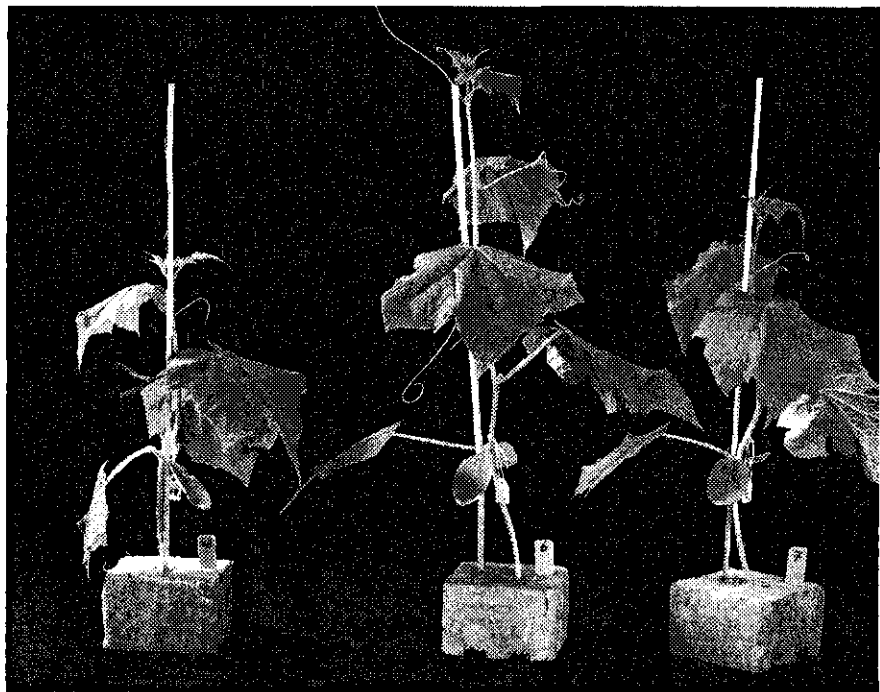


Figuur 3.2.3. Het tijdsverloop van het (water-) gewicht en de pH van de voedingsoplossing in de steenwolpotten bij de diverse behandelingen bij de eind oogst van experiment II. Gemiddelde met $2 \times \text{SE}$, $n=5$. A, afwisselend 5 en 21% O_2 ; B, continu 5% O_2 (N_2 -verdunde lucht); C, 21% O_2 (lucht); D, 21% O_2 (open container).

3.2.1. Waarnemingen: bovengrondse plantendelen

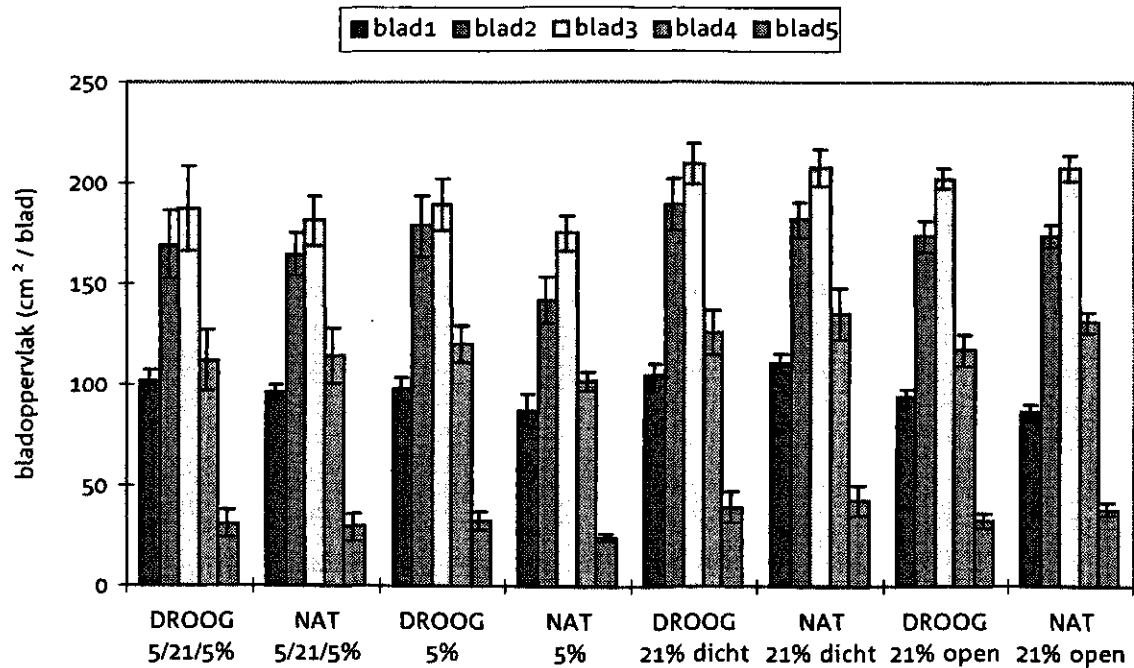
Effect van O_2 -concentratie en watergehalte van steenwol op de groei van blad en stengel bij komkommer

Evenals in experiment I vertoonden de planten, binnen enkele dagen na de start van de begassing met 5% O_2 , afhangend blad (epinastie; neergebogen bladstelen) sterk gelijkend op verwelking ('slap gaan'). De bladstand herstelde slechts gedeeltelijk, zodat twee weken na de start van de behandeling nog steeds neerwaartse kromming van de bladstelen zichtbaar was (zie onderstaande foto).



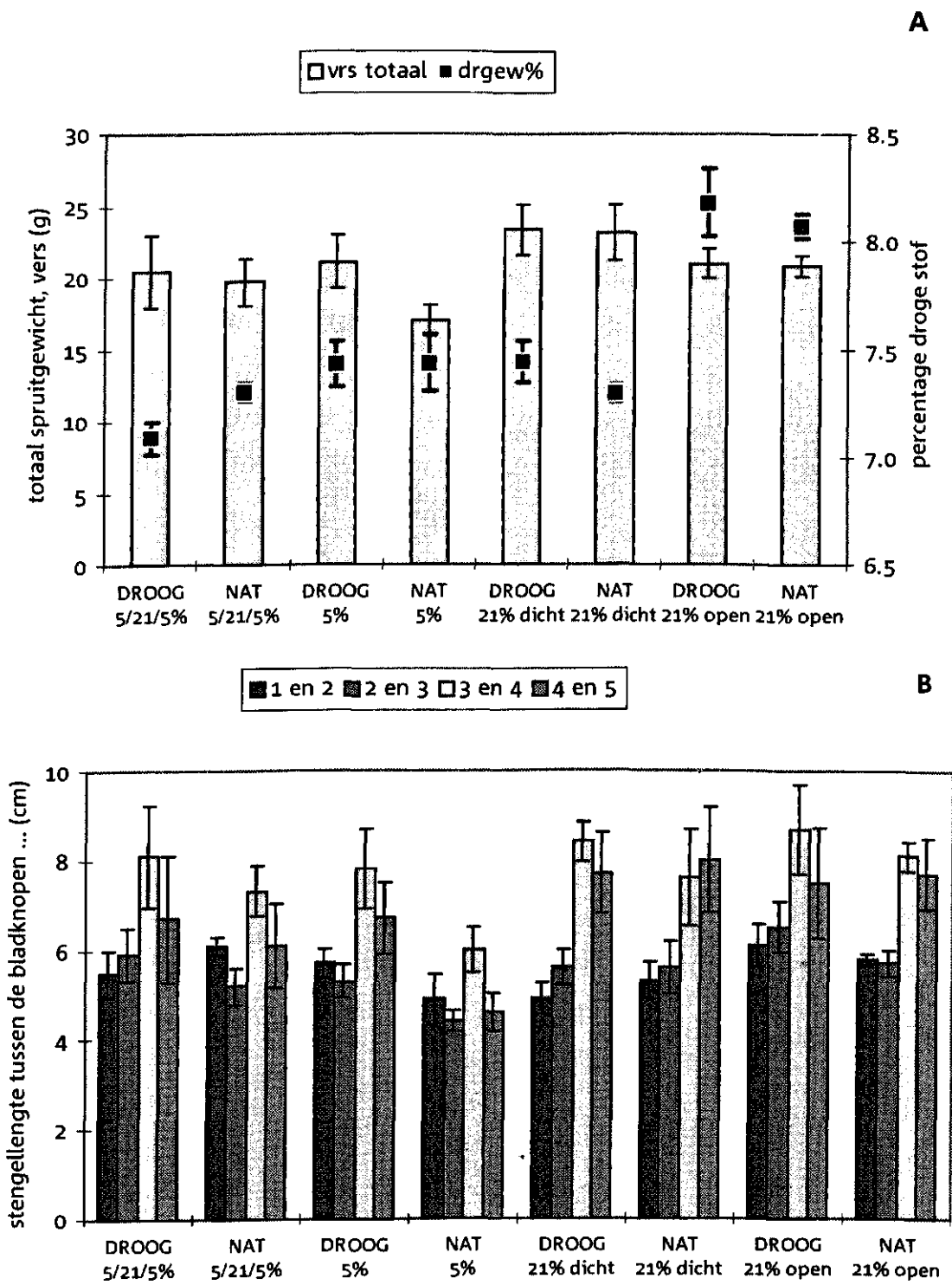
Komkommerplanten (cv. Farbio) na twee weken groei met de wortels bij 5% O₂ (links), 21% O₂ (midden) en wisselende zuurstofconcentratie (5/21/5%; rechts); experiment II.

In figuur 3.2.4. is te zien, dat de bladgroei geremd werd door een aantal van de behandelingen, op dezelfde wijze als in experiment I (Fig. 3.1.1). Vooral de 5% O₂ behandeling heeft een kleiner bladoppervlak bij alle bladeren tot gevolg.



Figuur 3.2.4. Effect van O₂-concentratie in de atmosfeer rondom en watergehalte van de steenwolpotten op de groei van blad (bladoppervlak; versgewicht van blad vertoonde overeenkomstige behandelingseffecten) bij komkommer cv. Farbio (gemiddelden van 5 waarnemingen, $\pm 5E$).

Ook de effecten op stengellengte (Fig. 3.2.5.) stemmen overeen met die in het eerste experiment. Duidelijk is ook, dat de totale droge stof productie geremd is bij de 5% O₂ behandeling.

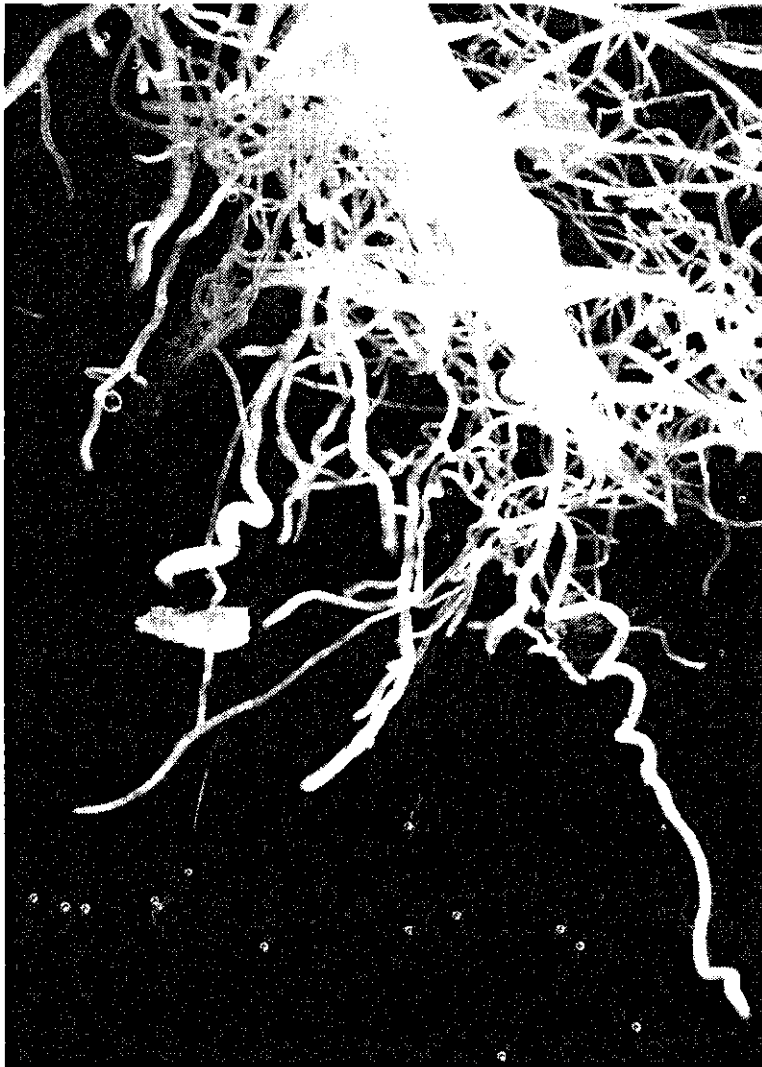


Figuur 3.2.5. Effect van O₂-concentratie in de atmosfeer rondom en watergehalte van de steenwolkpotten op de groei van blad (A, spuitvers- gewicht en droge stof gehalte) en stengel (B, lengte) bij komkommer cv. Farbio (gemiddelden van 5 waarnemingen, ±SE).

3.2.2. Waarnemingen: Wortels

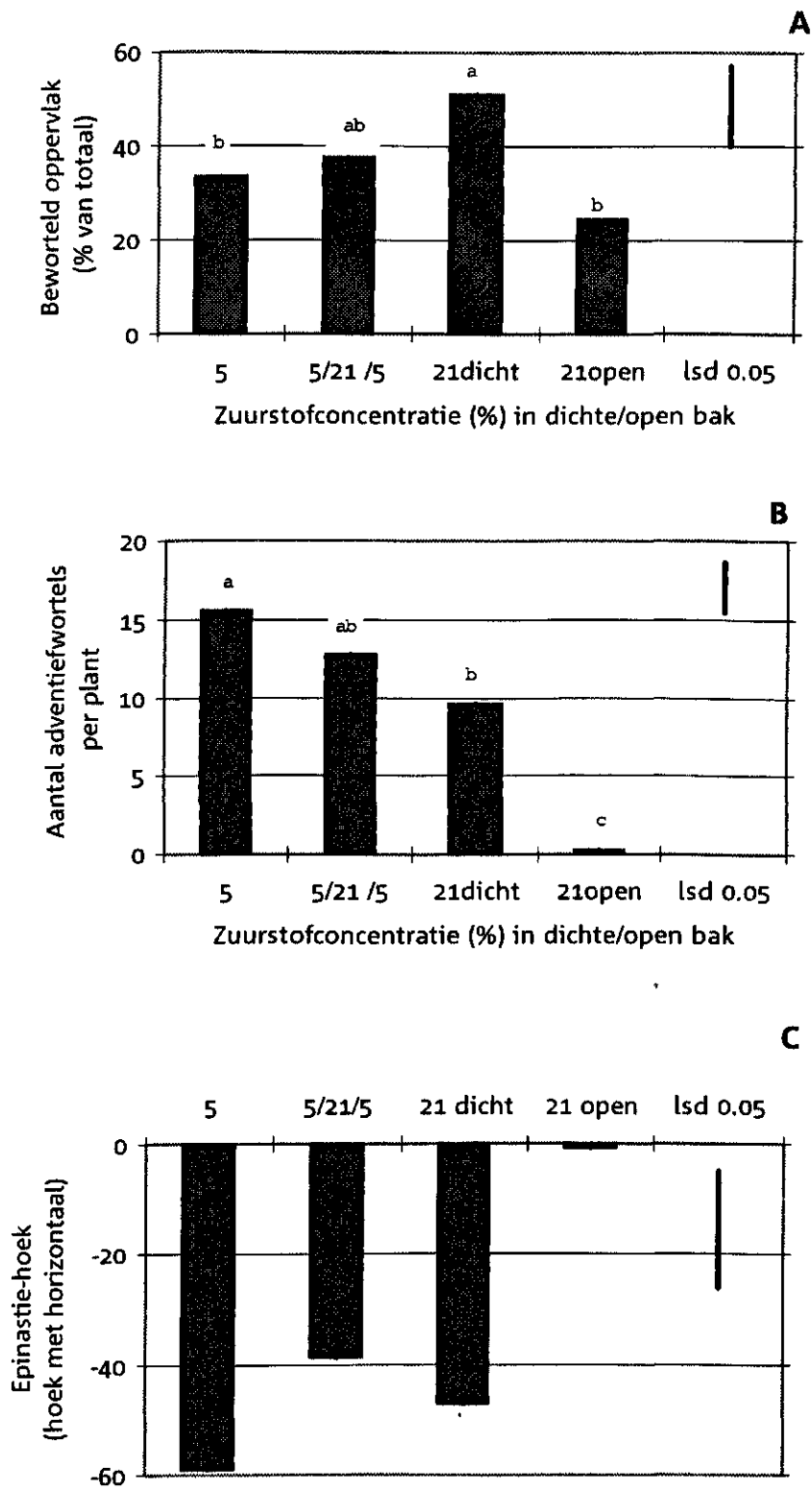
Invloed van O_2 -concentratie en watergehalte van steenwol op de wortels: vorm, en optreden van wortelkringeling en -verdikking

Voor een indruk van het uiterlijk van de steenwolpotten en wortels na verwijdering van de wikkels, zie bijlage 1, met een typisch voorbeeld van de behandeling '5% zuurstof en hoog watergehalte' (boven, nr 46) en een voorbeeld van 'normale zuurstofconcentratie en laag watergehalte' (onder, nr 17). Bijlage 2 toont twee opengewerkte steenwolpotten, waarbij goed te zien is dat wortelkringeling optreedt ook rond de overgang van vermiculiet-gat naar steenwol (vooral rechter pot, nr 48). Dit is beter te zien in onderstaande close-up van vrijgeprepareerde wortels.



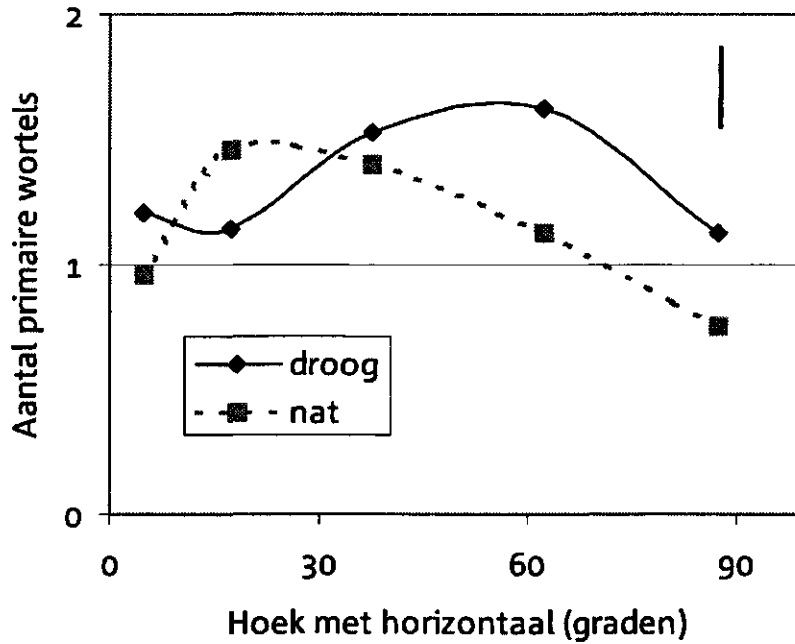
Wortelkringeling en -verdikking bij komkommer, zoals waargenomen na twee weken groei bij lage zuurstofconcentratie (5% v/v) en hoog watergehalte van het bewortelingssubstraat (steenwol).

De zuurstofconcentratie van 5% rond de steenwolpotten gaf een significante vermindering van het bewortelde oppervlak van een (willekeurige) zijkant (Fig. 3.2.6 A), en een vermeerdering van het aantal adventiefwortels (Fig. 3.2.6 B; zie ook bijlage 1).



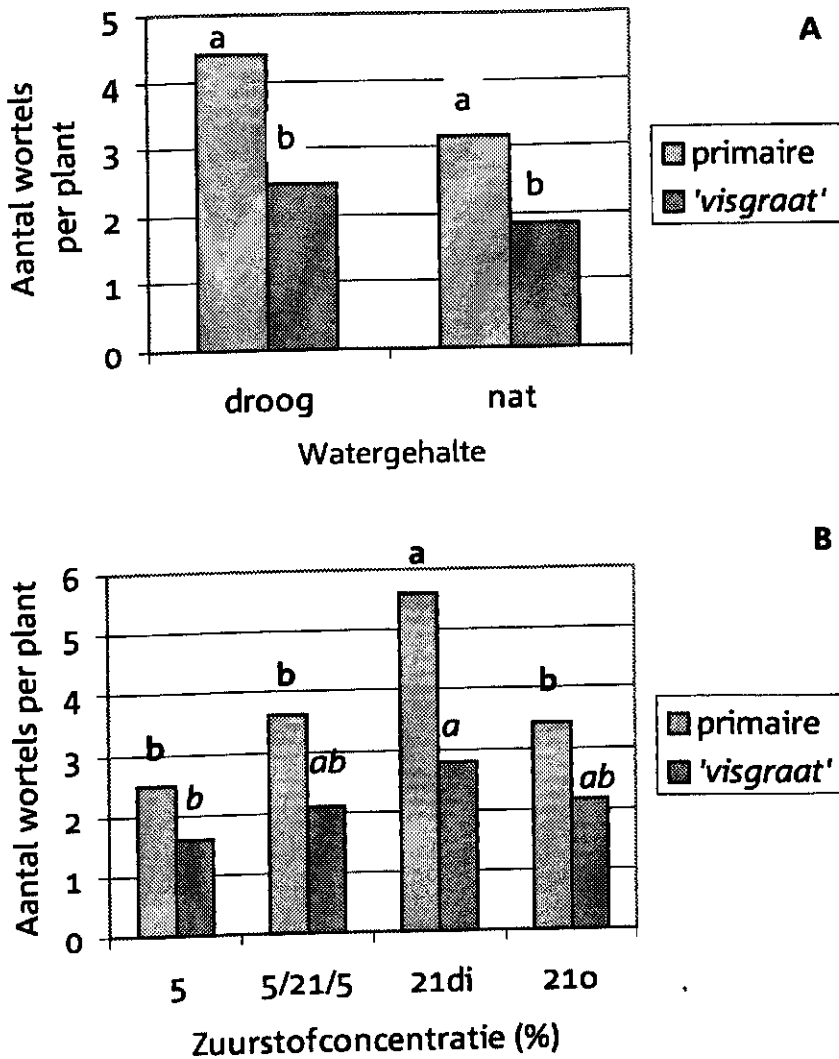
Figuur 3.2.6. Beworteld oppervlak van een willekeurige zijkant van een steenwulpot (A) en aantal adventiefwortels (B) van komkommer planten na twee weken groei bij verschillende zuurstofconcentraties rond de steenwulpotten. Gemiddelde waarden van 10 planten. De balk toont het kleinste significante verschil (LSD 0.05). Verschillende letters duiden significante effecten van behandelingen aan ($P < 0.05$).

Een hoog watergehalte van de steenwolpotten ('natte teelt') leidde tot een kleiner aantal hoofdzakelijk vertikaal groeiende wortels dan in de droge teelt (Fig. 3.2.7), een bekend symptoom van zuurstofgebrek (zgn. Diageotropie; Drew 1997).



Figuur 3.2.7. Aantal sterk vertikaal groeiende wortels op een willekeurige zijkant van een steenwolpot, van komkommer planten na twee weken groei bij verschillende watergehalten van de steenwolpotten; 'droog', laag watergehalte; 'nat', hoog watergehalte. Gemiddelde waarden van 4 planten. De balk toont het kleinste significante verschil (LSD 0.05).

Een lage zuurstofconcentratie rond de steenwolpotten leidde tot een kleiner aantal primaire wortels ('runners') en typische 'visgraat'-wortels per plant (Fig. 3.2.8).



Figuur 3.2.8. Aantal wortels per plant op een willekeurige zijkant van een steenwulpot, van 2 typen primaire wortels ('runners' en 'visgraat'-wortels) van komkommer planten na twee weken groei bij verschillende watergehalten van de steenwulpotten (A; 'droog' en 'nat'; gemiddelden van 20 planten) en zuurstofconcentraties (B; gemiddelden van 10 planten) rond de steenwulpotten. Verschillende letters duiden significante effecten van behandelingen aan ($P < 0.05$).

3.2.3. Overzicht statistische conclusies uit meetresultaten

De statistische analyse (ANOVA) toonde een aantal significante ($F < 0.05$) hoofdeffecten van de onderzochte factoren 'O₂-concentratie' en 'watergehalte' op diverse wortelkenmerken, naast significante interacties (Tabel 3.2.1); met name de behandeling 5% O₂ met hoog watergehalte (5%/nat) gaf aanleiding tot diverse wortelafwijkingen ten opzichte van de andere behandelingen en controles. Deze verschillen zijn tevens beoordeeld aan fotomateriaal door een panel van experts (zie sectie 3.2.4).

Tabel 3.2.1. Effecten van O₂ en H₂O op meetbare wortelmorfologie-kenmerken (2-way-ANOVA).
Afhankelijke variabelen: zie kenmerken. Onafhankelijke variabelen: O, de vier O₂-behandelingen, 5%, 5/21% wisselend (w), en 21% (dichte container, di), en 21% in open container (o); HO, het watergehalte van de steenwol (hoog, 'nat'; en laag, 'droog'); >, groter dan; <, kleiner dan; ns, niet significant (F>0.05); ?, 'trend', (0.10>F>0.05).

Variantie analyse	F-probability waarde			Conclusies		
Wortelmorfologie- kenmerk	Source of variation			Behandelings effecten		
	O ₂ -con- centratie	H ₂ O gehalte	O ₂ X H ₂ O	O ₂ -con- centratie	H ₂ O-gehalte Droog/nat	O ₂ X H ₂ O
aantal hoofdwortels	0.008	0.045	0.614	21%di > rest	Droog > nat	ns
aantal 'visgraat'wortels	0.071	0.050	0.191	5% < 21%	Droog > nat	ns
aantal 'U'-bochten	0.014	0.030	0.009			5%nat > rest
aantal verdikkingen (abrupt)	0.015	0.032	0.006			5%nat > rest
aantal adventiefwortels	0.001	0.618	0.076	5% > 21%	Ns	5%nat > 21%nat?
adventiefwortellengte	0.001	0.001	0.001			5%/w > rest droog
beworteld oppervlak	0.030	0.081	0.526	5% < 21%di	Droog > nat?	ns
aantal wortels met hoek < 25 graden	0.518	0.849	0.706	ns	Ns	ns
hoek > 25 graden	0.220	0.031	0.939	ns	Droog > nat	ns

3.2.4. Diagnose van wortelkringeling:
 beoordeling foto's wortelmorfologie door expert-panel

Omdat voor het kwantificeren van wortelkringeling geen meetmethode beschikbaar was, is gekozen voor een meting via een beoordeling door experts op het gebied van 'wortelverdiking'. Daarbij is gekozen is voor beoordeling van fotomateriaal van alle planten binnen enkele extreme behandelingen. De foto's waren willekeurig genummerd en gerangschikt, en aard en aantal van de behandelingen per object waren niet bekend bij de experts. Voordelen van deze opzet waren: a. geen wederzijdse beïnvloeding; b. 'blinde' beoordeling, zonder enige mogelijkheid behandelingen te achterhalen; c. evaluatie mogelijk van zowel effect van behandeling als van expert. Van minder belang geacht nadelen waren dat experts geen keus hadden van objecten en niet op eigen wijze wortels konden prepareren.

Allereerst is nagegaan hoeveel van de zeven respondenten op een of meer van de foto's wortelverdikking heeft gezien, en andere symptomen zoals kringeling en verglazing. De uitkomsten in tabel 3.2.2. laten zien, dat wortelkringeling vrijwel unaniem aanwezig werd geacht in het materiaal, de andere symptomen in mindere mate.

Tabel 3.2.2. Aantal van de respondenten dat symptomen van (voorstadia van) wortelverdikking heeft geconstateerd bij komkommerplanten op in totaal ca 15 foto's (ongemerkt) van de buitenzijden van steenwolkpotten en van vrijgeprepareerde wortels, onafhankelijk van de behandeling.

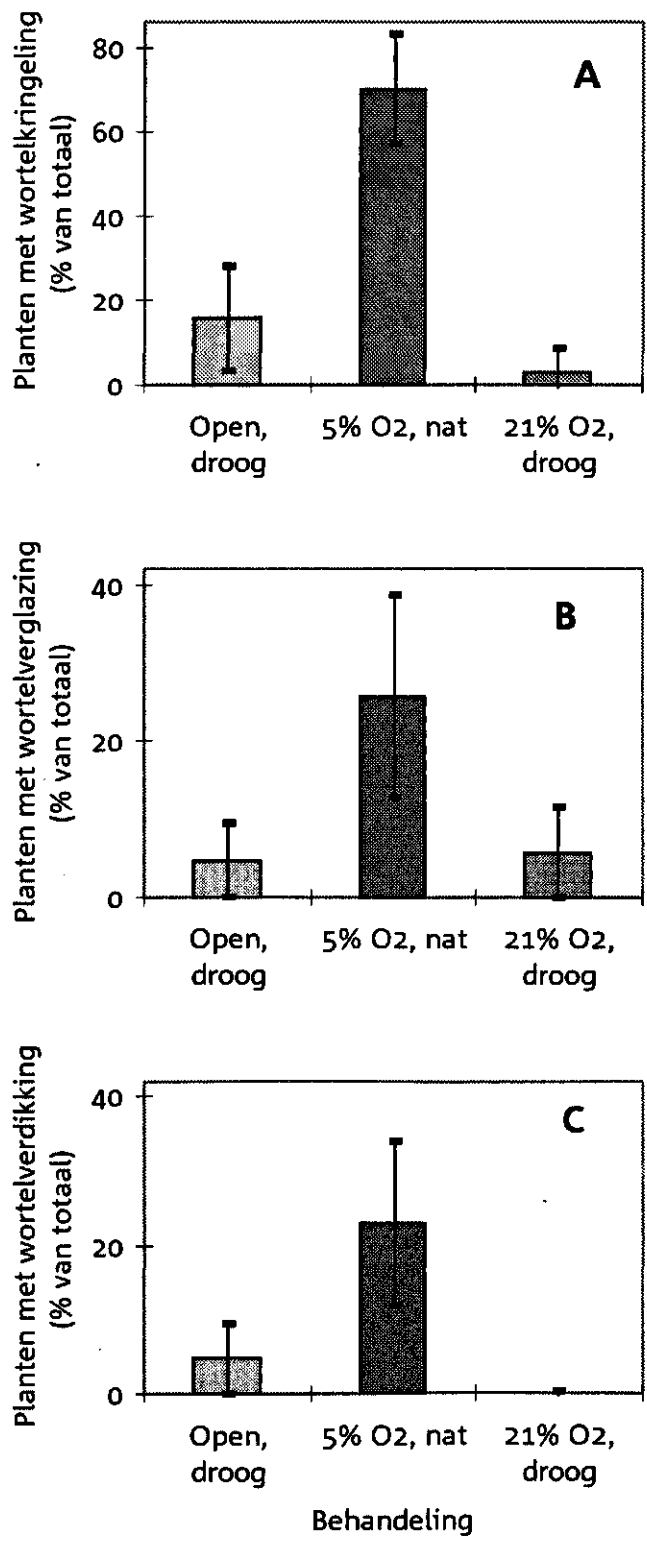
Symptoom	Aantal van totaal acht respondenten*
Wortel-	
kringeling	7
verglazing	3
verdikking	3

* inclusief een expert die schriftelijk meldde geen enkel symptoom van wortelverdikking te zien, en de enquête niet heeft geretourneerd.

De belangrijkste vraag is nu, of de behandelingen invloed hadden op de ernst van de symptomen van wortelverdikking, naar het oordeel van het expert-panel. Figuur 3.2.9 laat zien, dat er inderdaad grote verschillen tussen behandelingen waren, die ook significant waren ($P < 0,01$; zie Tabel 3.2.3). Veruit het grootste percentage planten met wortelkringeling werd waargenomen in de '5% O₂/Nat'-behandeling (Fig. 3.2.9 A; andere behandelingen niet of nauwelijks afwijkend van 0%), zoals ook gevonden in experiment I (sectie 3.1). Dit stemt overeen met de resultaten van metingen aan hetzelfde fotomateriaal, zoals het aantal 'U'-bochten en abrupte verdikkingen van (zichtbare) wortels en het aantal adventiefwortels per plant (Tabel 3.2.1).

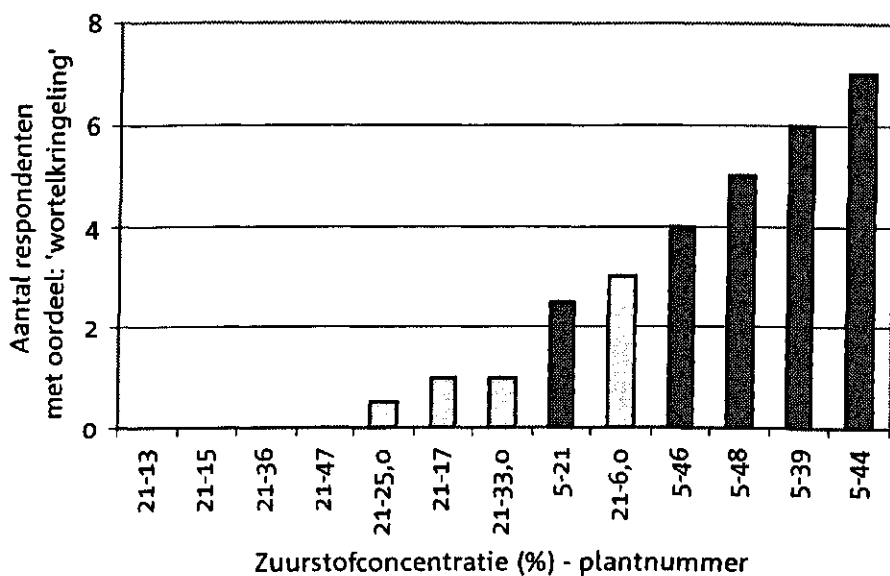
Ook wortelverglazing en wortelverdikking werden het meest waargenomen in de '5% O₂/Nat'-behandeling (Fig. 3.2.9 en Tabel 3.2.3). Hierbij waren de experts het echter niet onderling eens over de aanwezigheid op zich (significante interactie, zie Tabel 3.2.3). Dit kan voor wortelverglazing samenhangen met het feit dat diagnosticeren aan de hand van foto's moeilijk is. Echter, wortelverdikking is zeer goed waarneembaar en zelfs meetbaar op de betreffende foto's. Hier blijkt dus, dat verschillende experts 'meten met verschillende maat'. Dit zegt weinig over hun deskundigheid op dit terrein of over hun nauwkeurigheid van waarneming (oordeel over het symptoom 'kringeling' was vrijwel unaniem; zie verder bij Fig. 3.2.10 en Tabel 3.2.3), maar des te meer over de verschillende 'calibratie van hun wortelverdikkings-meetlat'.

Dit laatste is een zeer belangrijke constatering: een degelijk diagnostisch gereedschap ontbreekt. Wortels vertonen van nature, ook onder 'normale' groeiomstandigheden verschillen in diameter, bijvoorbeeld als gevolg van verschillen in mechanische weerstand (zie bijv. Brouwer et al. 1981; Veen, 1982). Het blijkt nu echter nog steeds zeer onduidelijk te zijn waar de grens ligt tussen 'normaal' verdikt en 'pathologisch' verdikt.



Figuur 3.2.9. Aantal planten met kringeling (A), verglazing (B) en verdikking (C), weergegeven als % van het totaal aantal planten binnen een behandeling (5; open, droog 3). Drie extreme behandelingen zijn beoordeeld, waarvan 1 met lage zuurstofconcentratie (5%) rond de steenwolpotten in een gesloten doorstroomcontainer en hoog watergehalte, en twee controles, een open en een gesloten container, elk met gewone lucht en laag watergehalte. De waarden zijn gemiddelden van 7 ($\pm$ SE) onafhankelijke scores door evenveel experts op het gebied van symptomen van "wortelverdikking" in de praktijk.

De experts bleken zeer consistent in hun oordeel over het optreden van wortelkringeling. Ze waren het niet alleen in hoge mate eens over het aantal planten binnen de behandelingen dat wortelkringeling vertoonde, maar ook over welke specifieke planten meer of minder wortelkringeling vertoonden. Figuur 3.2.10 illustreert dit punt. De score bleek niet willekeurig verdeeld over alle planten binnen eenzelfde behandeling. Deze conclusie wordt verder onderstreept door de gegevens in de Figuren 3.2.11 en 3.2.12 (zie sectie 3.2.5).



Figuur 3.2.10. Consistentie van de beoordeling door het expert-panel van wortelmorfologie per plant: Percentage van de respondenten dat kringeling waarnam op foto's van 13 wortelstelsels van komkommer uit 3 behandelingen, waaronder verlaagde zuurstofconcentratie (5% O₂, door bijmengen met N₂; hoog watergehalte) en normale lucht (21% O₂, laag watergehalte; open en gesloten container).

3.2.5. Overzicht statistische conclusies: beoordeling door expert-panel

De resultaten van de beoordeling door het (externe) expert-panel (Tabel 3.2.3) bevestigen in grote lijnen de eigen metingen en waarnemingen (Tabel 3.2.1) ten aanzien van behandelings-effecten en het optreden van wortelkringeling. Deze overeenkomsten in beoordeling van de wortelmorfologie ('normaal' of 'abnormaal'; behandelingsverschillen) worden nog eens benadrukt door de significante ($P < 0,05$) correlaties die gevonden werden tussen de genoemde metingen en de score van het expert-panel (Figuur 3.2.11).

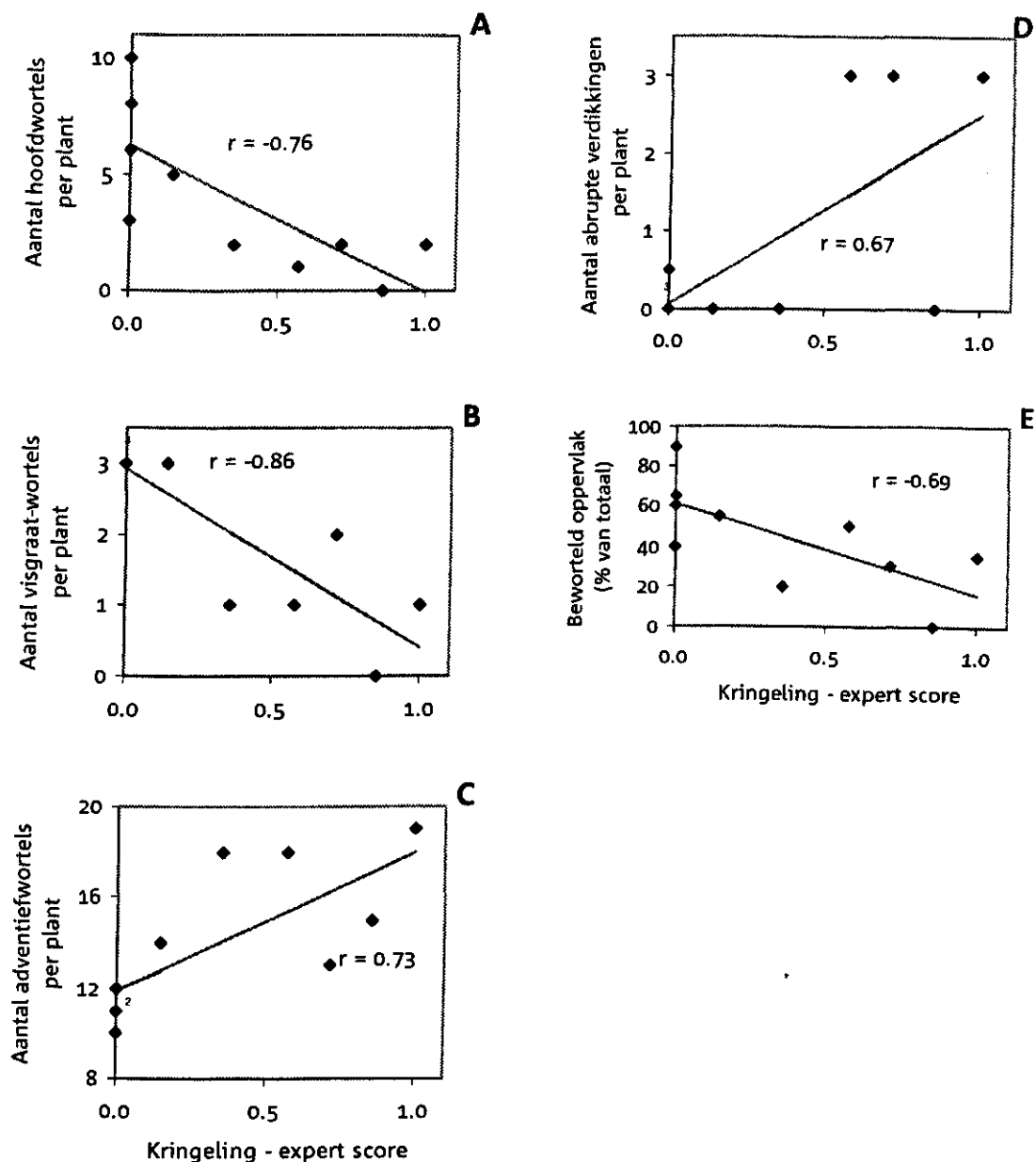
Vele in de literatuur beschreven responsen van wortels op zuurstofgebrek en ethyleen (bijv. Goeschl & Kays 1975; Drew 1991, 1997; zie introductie) zijn hier waargenomen, die significante correlaties vertonen met de mate van wortelkringeling volgens het oordeel van het expert-panel. Hoewel dit niet sluitend bewijst dat wortelkringeling veroorzaakt wordt door zuurstofgebrek en ethyleenophoping, is het wel zeer waarschijnlijk.

De normale wortelgroei werd sterker geremd naarmate de wortelkringeling sterker was (zie Fig. 3.2.11 A, B en Fig. 3.2.12 B). Het aantal adventiefwortels nam toe met de 'kringeling'-score (Fig. 3.2.11 C).

Wortelverdikking is hier gevonden in de vorm van lokale (nl. in de steenwol) abrupte verdikking van (veelal kringelende) jonge worteldelen (zie foto in deze sectie). Deze wortelverdikking van ca. 0.5 naar minstens 4 mm was eveneens nauw gecorreleerd met de mate van wortelkringeling volgens het expert panel (Fig. 3.2.11 D).

Tabel 3.2.3. Expert-panel score van mate van wortelkringeling, -verglazing en -verdikking: Effecten van 'expert' (7 respondenten op enquête) en 'O/HO-behandeling' ('5%n', 5%O₂/nat en '21%dr', 21%O₂/droog) op wortelmorfologie-kenmerk "kringeling" (2-way-ANOVA; n=5). Afhankelijke variabelen: 'kringeling'. Onafhankelijke variabelen: O/HO-behandeling (lage O₂-concentratie+hoog H₂O-gehalte, '5%n', tegenover normale O₂-concentratie+laag H₂O-gehalte, '21%dr'; dichte containers); 'expert' (7 respondenten op enquête; gecodeerd 'A' t/m 'H'); >, groter dan; ns, niet significant (F>0.05).

Variantie analyse	F-probability waarde			Conclusies		
Wortelmorfologie-kenmerk	Source of variation			Behandelings effecten		
	Expert	O ₂ /H ₂ O behand.	O ₂ /H ₂ O X Expert	Expert	O ₂ /H ₂ O behand.	O ₂ /H ₂ O X Expert
Kringeling	0.686	0.001	0.465	ns	5%n >21%dr	ns
Verglazing	0.001	0.004	0.002	–	–	5%n>21%dr (3 v. 7 experts)
Verdikking	0.005	0.001	0.005	–	–	5%n>21%dr (3 v. 7 experts)



Figuur 3.2.11. Relaties tussen het deel van de experts dat wortelkringeling constateert ('expert-score' op kringeling) en metingen van wortelmorfologie-kenmerken: het aantal hoofdwortels (A), gezonde 'visgraat'-wortels (B), adventiefwortels (C), het aantal abrupte wortelverdikkingen (D), en beworteld oppervlak van een steenwolpotzijkant (E) van komkommerplanten na ca 10 dagen begassing van de wortels. Data van twee extreme behandelingen zijn weergegeven: lage zuurstofconcentratie (5% v/v) en hoog watergehalte ('nat'), en een controle met lucht (21% O₂) en laag watergehalte ('droog'), beide in gesloten doorstroomcontainers. De correlatie-coëfficiënten zijn significant ($P < 0.05$).

3.2.6. Bulk-zuurstofgehalte van steenwolvocht en kritische zuurstofconcentratie

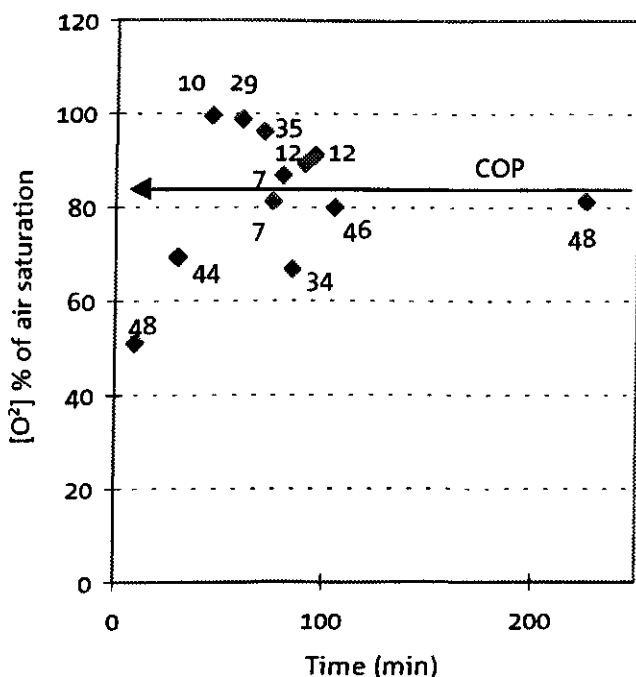
De kritische zuurstof-concentratie waarbeneden in het algemeen de wortelademhaling geremd is, wordt in de literatuur aangeduid als COP ('critical oxygen pressure'), de minimum partiële zuurstofdruk voor ongeremde wortelactiviteit (bijv. Saglio et al., 1984). Deze COP bedraagt ca. 0,1 atm. (0,1 kPa; 10% v/v) voor maïswortels in lucht, maar is veel hoger voor wortels in een (enigszins) stagnant waterig milieu, nl. ca. 0,3 atm., dus 1,5 maal zo hoog als bij normale luchtverzadiging (30% v/v; Saglio et al., 1984), evenals voor wortels in een geroerd waterig milieu, nl. ca. 0,16 atm. (16% v/v; De Visser & Blacqui re 1984).

De procedure van bemonstering met gasdichte injectiespuiten en de meting leverde slechts een geringe verhoging op van de zuurstofconcentratie door contaminatie met buitenlucht (maximaal + 1% O₂ v/v bij zuivere N₂). Echter, na het blootstellen van de planten van de 5% O₂-behandeling aan de lucht (onvermijdelijk gevolg van het openen van de begassingscontainers), steeg de zuurstofconcentratie in de steenwol na ongeveer 1,5 uur tot 16% v/v (rond de 80% van luchtverzadiging). Dit is nog steeds ver beneden de COP-waarde van 30% v/v voor stagnante waterige media, en ongeveer gelijk aan de COP-waarde van ca. 16% v/v voor geroerde waterige media (De Visser & Blacqui re, 1984).

Het zuurstofgehalte van vocht in het inwendige van bewortelde steenwolpotten was gemiddeld het laagst in de behandeling met 5% O₂, tussen 50 en 70% van luchtverzadiging (Fig. 3.2.12), ofwel 10 tot 14% O₂ v/v (inclusief de toename van de zuurstofconcentratie door de blootstelling aan lucht na het openen van de begassingscontainers). De waterfase van het centrale deel van lucht-controle potten vertoonde zuurstofgehalten tussen 80 en 100% van luchtverzadiging, dit is ca. 16-21% O₂ v/v.

Geconcludeerd kan worden, dat in alle steenwolpotten de zuurstofconcentratie lager was dan optimaal, maar dat dit het meest extreem was in de potten die ge ncubeerd waren bij 5% O₂ v/v. De behandelingen hebben dus het gewenste directe effect gehad op de zuurstofconcentratie in de potten, en zijn weinig of niet verstoord door zuurstoftransport van de bovengrondse delen naar de wortels zoals beschreven voor komkommerplanten door Yoshida & Eguchi (1994).

De COP voor komkommerwortels op steenwol is in dit experiment overigens niet bepaald. Dit is zeer moeilijk uitvoerbaar door de aard van steenwol en de heterogeniteit van de beworteling. De in Figuur 3.2.12 getoonde meetresultaten betreffen *maximale* zuurstofconcentraties van de *bulk*-oplossing in de steenwol; de feitelijk in de wortels aanwezige zuurstofconcentraties kunnen hiervan sterk afwijken, door het grote concentratieverval als gevolg van het hoge zuurstofverbruik van de wortels.

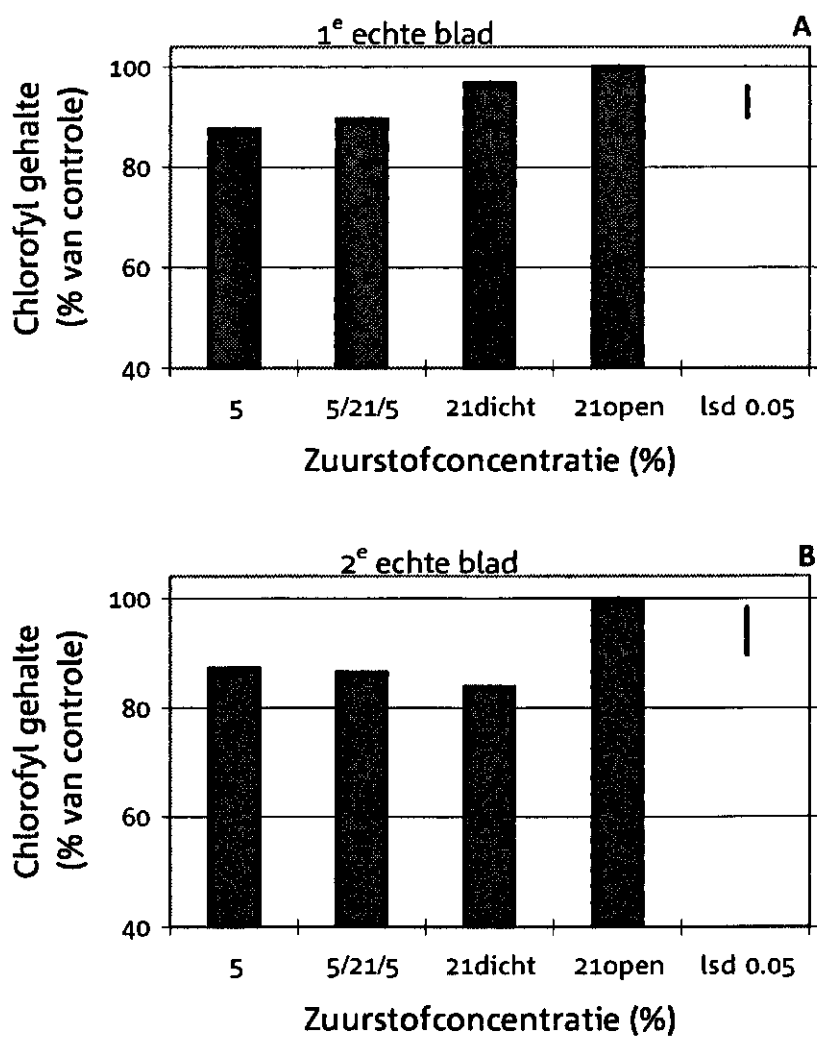


Figuur 3.2.12. Zuurstofgehalte van water uit het centrum van steenwolpotten met komkommerplanten, bemonsterd op verschillende tijdstippen na openen van de begassingscontainers. Behandeling: twee weken groei bij verschillende zuurstofconcentraties rond de steenwolpotten en bij een hoog watergehalte. Plant nummer/behandeling combinaties: 5% O₂ continu (N₂-verdunde lucht), nummers 44, 46, 48; wisselend 5 en 21% O₂, nummers 7, 12, 34; 21% O₂ (lucht; dichte container), nummers 10, 29, 35.

De pijl geeft de kritische zuurstofconcentratie ('COP') aan, die minimaal nodig is voor een ongeremde wortelademhaling in *geroerde* waterige media (80% van luchtverzadiging; dit is ca. 16% O₂ v/v). In ongeroerd waterig medium, zoals in waterverzadigde steenwol, bedraagt de COP ca. 150% van luchtverzadiging, ofwel 30% O₂ v/v.

Wortelverdikking gaat in de praktijk dikwijls gepaard met 'donkere stand' (ook wel 'zwarte stand' genoemd), waarbij het blad donkergroen is. Dit kan duiden op een relatief hoog chlorofylgehalte. In Figuur 3.2.14 AB zijn de chlorofylgehalten getoond van het eerste (A) en tweede (B) echte blad van de komkommerplanten ten tijde van de eind oogst. Bij lage zuurstofconcentratie (5%) vertoonden beide typen blad een verlaagd chlorofylgehalte ten opzichte van de controle planten in de open lucht (21o; $P < 0,05$). Dit laatste is een algemeen waargenomen reactie van planten op hypoxie en anoxie (zie bijv. Drew, 1991, 1997).

Een andere kenmerkende reactie van de bladeren was epinastie (reversibel neerbuigen van blad & bladsteel; 'slap gaan'; Fig. 3.2.14 C, moment van eind oogst), die binnen enkele dagen na de begassing met 5% zuurstof duidelijk zichtbaar was (op dat moment echter niet bij de 21% behandeling!). Dit duidt op verhoogde ethyleenconcentraties in het blad (waarschijnlijk gevolg van verhoogde ACC aanvoer vanuit de wortels, met de transpiratiestroom; Kende, 1993). Het is niet duidelijk, waarom neergebogen bladstelen ook in de 21% O₂ controle container (gesloten) voorkwamen 2 weken later, op het moment van de eind oogst.



Figuur 3.2.13. Chlorofylgehalte van het eerste echte blad (A) en het tweede blad (B) van komkommerplanten na twee weken groei bij verschillende zuurstofconcentraties rond de steenwolkpotten, met normale lucht (21% O₂) in een afgesloten en open container. Gemiddelde waarden van 10 planten (hoog en laag watergehalte; ns). De balk toont het kleinste significante verschil (LSD 0,05). Verschillende letters duiden significante effecten van behandelingen aan (P < 0,05).

3.3. Algemene discussie

Doel van de twee hier beschreven experimenten was het toetsen van de hypothese dat wortelkringeling en -verdicking kunnen worden opgeroepen door blootstelling van wortels op steenwol aan een verlaagde zuurstofconcentratie. Experiment I leverde de eerste aanwijzing voor een rol van zuurstof(gebrek). In experiment II constateerde een overgrote meerderheid van de respondenten wortelkringeling in meerdere van de objecten en dat niet willekeurig, maar veruit het meest in de behandeling met lage O₂-concentratie en hoog watergehalte, en nauwelijks bij de controle-objecten. Bovendien bleek het oordeel over een specifiek object (wortelstelsel) van de verschillende experts zeer consistent.

Dit betekent dat, naar de inzichten van begin 1998, tenminste één algemeen geaccepteerd symptoom van wortelverdikking ('*kringeling*') bij komkommer experimenteel is opgeroepen, op een reproduceerbare wijze, door de behandeling met **lage O_2 -concentratie** in combinatie met een **hoog watergehalte**. Het belangrijkste doel van experiment II is derhalve bereikt!

Verder correleerde de mate van wortelkringeling naar het oordeel van de experts zeer goed met andere wortelkenmerken, zoals het aantal hoofdwortels en aantal normale 'visgraat'-wortels op de buitenzijde van de pot (negatieve correlatie), en het aantal adventiefwortels per plant dat bekend is in de literatuur als symptoom van anaerobie/hypoxie in het wortelmilieu (positieve correlatie). De diagnostiek van wortelafwijkingen zoals 'wortelverdikking' is echter zeker voor verbetering vatbaar (zie onder 'suggesties voor vervolgonderzoek', punten 9, 10 en 13).

Geconcludeerd kan worden, dat in de herhaling van het eerste experiment van juli 1997, vervolgens gedurende het najaar de eerste resultaten volledig zijn gereproduceerd, onder enigszins andere groeicondities (licht rondom steenwolpotten), en met een andere cultivar. Duidelijk is gebleken, dat verlaging van de zuurstofconcentratie, naar 25% van de normale hoeveelheid in lucht rondom de wortels, inderdaad in ongeveer een week aanleiding geeft tot kringeling en verdikking van wortels, vooral in combinatie met een hoog watergehalte van de steenwolpotten. Dit suggereert, dat naast een specifiek gebrek aan zuurstof, ophoping van andere gassen ook een rol speelt bij wortelkringeling en -verdikking. Echter, het is ook mogelijk dat het hoge watergehalte het effect van de lage zuurstofconcentratie heeft versterkt. Deze hypothese wordt getoetst in vervolgonderzoek bij AB-DLO (zie onderzoeksvoorstel De Visser en Rappoldt 1997) in 1998.

Het is waarschijnlijk, dat de grotere hoeveelheid algen (en andere micro-organismen) in deze (door de open container wat meer belichte) potten binnen in de steenwol bijgedragen hebben aan zuurstofverbruik en koolzuurgasproductie in de steenwolpot, en mogelijk ook de mate van tortuositeit hebben vergroot. Dit zou een mogelijke verklaring kunnen zijn voor het plaatselijk voorkomen van wortelkringeling bij enkele planten in de open container.

Wisseling van zuurstofconcentratie rond de wortels gaf geen ernstiger symptomen van kringeling dan continu lage concentratie hoewel een werkingsmechanisme onlangs is beschreven (Biemelt et al. 1998).

Zuurstofbehoefte van wortels

Over de zuurstofbehoefte van komkommerwortels kan nog geen eenvoudige en zinvolle uitspraak worden gedaan; deze is nl slecht gedefinieerd, zeer variabel (o.a. door adaptatie) en een functie van meerdere plant- en omgevings-factoren (e.g. Challa 1976). Belangrijke plantfactoren zijn: relatieve groeisnelheid (plantleeftijd), massaverhouding en stikstofgehalte van spruit en wortel; belangrijke omgevingsfactoren zijn: temperatuur (-wisseling), zuurstofconcentratie in en -transport (diffusie, convectie) door het wortelmedium, en de beschikbaarheid van nutriënten (zie ook Drew 1991, 1997).

De zuurstofbehoefte (zuurstofopnamesnelheid) van (komkommer-) wortels zal in de praktijk kunnen variëren van 5 tot 20 mg O_2 g⁻¹ droge wortels uur⁻¹, of, in SI units, 40 tot 175 micromol O_2 g⁻¹ (droge wortels) s⁻¹ (zie bijv. Challa 1976). Het experimenteel vaststellen van de zuurstofvraag van wortels op steenwolpotten onder praktijkcondities, vergt aanzienlijk meer werk dan mogelijk was binnen het onderhavige project (zie echter '5. suggesties voor vervolgonderzoek').

Enkele belangrijk oorzaken van zuurstofgebrek van wortels

Zuurstofgebrek treedt, eventueel tijdelijk en plaatselijk, op wanneer de aanvoersnelheid van zuurstof naar het worteloppervlak geen gelijke tred houdt met de opnamesnelheid van zuurstof door de wortels, c.q. actuele zuurstof-behoefte of ademhalingssnelheid. Beide snelheden zijn beïnvloedbaar; die van de ademhaling is besproken in de vorige paragraaf, die van de zuurstof-aanvoer naar de wortel is afhankelijk van stroming en diffusie (zie introductie). Over het algemeen is diffusie niet beperkend is voor de zuurstofaanvoer, zolang het wortelmedium gasvormig is en tenminste enkele % O_2 bevat, of -bij een vloeibaar medium- een zekere kritische O_2 -concentratie of 'pressure' (COP; Saglio e.a. 1984) en minimum stroomsnelheid gehandhaafd worden. In waterig milieu zijn zuurstofconcentratie (gradiënt) en stroming daardoor aanmerkelijk belangrijker voor de snelheid van het zuurstoftransport dan in lucht. Vooral in fijn-poreuze, waterverzadigde media kan zuurstofaanvoer door afwezigheid van stroming ernstig bemoeilijkt zijn (cf. Armstrong 1991; De Visser et al. 1990).

Rol van zuurstoftransport vanuit de groene plantendelen.

Zuurstoftekort in wortels zou mogelijk verminderd worden door zuurstofaanvoer vanuit de bovengrondse plantendelen. Volgens Yoshida en Eguchi (1994) zou O_2 transport van spruit naar wortel mogelijk zijn bij komkommer. Zij toonden dit aan door labelling met het stabiele isotoop $^{18}O_2$, bij zeer lage O_2 concentratie in de rhizosfeer ($<1\%$ O_2 v/v). De kwantitatieve betekenis van dit transport is niet geheel duidelijk, maar in ieder geval lijkt dit transport onvoldoende om normale groei en metabolische activiteit van komkommerwortels te ondersteunen (cf. Veen 1989). Dit is zelfs het geval bij plantensoorten met een aanzienlijk hogere wortelporositeit dan komkommer, zoals 'flooding'-tolerante Rumex soorten (Laan et al. 1991). Opheffing van zuurstofgebrek in de wortels door zuurstofaanvoer vanuit de bovengrondse delen kan daarom als factor (in het onderzoek) worden uitgesloten.

Gevolgen en symptomen van zuurstofgebrek

Van nature treedt zuurstofgebrek van wortels hoofdzakelijk op bij waterverzadiging van de bodem (Drew 1997). Mogelijke schadelijke effecten van zuurstofgebrek op planten, zowel directe als indirecte, zijn in de literatuur dan ook vooral te vinden rond het thema 'overstroming' (Eng. flooding, inundation, waterlogging).

Hoewel in waterverzadigde bodems alle gassen zeer langzaam getransporteerd worden, blijken zuurstofgebrek en ethyleenophoping van grotere invloed op planten(wortels) dan CO_2 ophoping (Laan 1990; Drew 1997; Bouma et al. 1997). Zuurstofgebrek kan gedeeltelijk zijn (bij hypoxie) of totaal (bij anoxie).

Waterverzadiging leidt tot zuurstofgebrek in wortels, doordat het **zuurstofverbruik** vele malen groter is dan de **zuurstoftoevoer** naar de wortels. Beperking van zuurstoftoevoer berust op twee factoren: 1. Het transport van gassen door diffusie is in water slechts ca 1/10.000 van de diffusiesnelheid in lucht; 2. Het maximale gehalte van zuurstof (onder atmosferische condities) in water is ca 1/30 van dat in lucht.

Naast directe schade aan planten(wortels) door **remming van de ademhaling**, energie (ATP) -tekort (gevolg: groeiremming, verlaagde ionen opname), kan **indirecte schade** door zuurstofgebrek optreden doordat dit gepaard gaat met reductie van bodembestanddelen zoals Fe^{3+} , NO_3^- , Mn^{4+} en sulfaat (in volgorde, naar mate de redoxpotentiaal verder daalt) tot Fe^{2+} , nitriet, Mn^{2+} en sulfide, waarvan met name de laatste drie giftige niveaus kunnen bereiken (Gambrell & Patrick 1978; Gambrell et al. 1991). Inderdaad zijn in steenwolpotten met wortelverdikking dergelijke **potentieel giftige anorganische stoffen** gevonden (Heimovaara 1997), waaronder nitriet. Elementen die lagere concentraties bereiken in droge stof zijn K, P, en N, naast accu-

mulatie van micronutriënten, zoals Fe^{2+} , Mn^{2+} , S; gaat gepaard met groeiremming en bladveroudering (Laan 1988).

Andere indirecte effecten zijn: toxiciteit van eindproducten van (natuurlijke) **gisting**, zoals ethanol, lactaat, aldehyden; activiteiten van bepaalde enzymen nemen toe, bijv. Alcoholdehydrogenase (ADH). Hormonale veranderingen treden op: ethyleen, gibberellinen, cytokininen, abscissinen, leidend tot groeiremming, bladveroudering, epinastie, sluiting van huidmondjes, verlaagde fotosynthese, verlaagde transpiratie, verhoogde bladtemperatuur (e.g. Laan 1988; Drew 1997).

Evaluatie van de resultaten aan de hand van de 'Hill-criteria'

Met de Hill-criteria beschikken we over een algemeen geaccepteerde methode voor een inschatting van causale relaties. In Tabel 4.1 is per invloedsfactor weergegeven in welke mate aan de verschillende criteria is voldaan.

Geconcludeerd wordt, dat een rol van *zuurstofgebrek* als oorzaak van wortelverdikking waarschijnlijk is, maar dat dit evenzeer het geval kan zijn voor de factoren 'Aluminium' en 'Ethyleen' (op basis van literatuur, zie ook sectie 4).

Verder valt op, dat de *specificiteit* van de respons 'wortelverdikking' gering is. Wortelverdikking is bij veel plantensoorten onder veel verschillende condities waargenomen, als reactie op meerdere behandelingen. Dit wijst erop, dat een nauwkeuriger karakterisering en diagnostisering van (de mogelijk verschillende vormen van) wortelverdikking noodzakelijk is. Alleen dan kunnen in voorkomende gevallen specifieke oorzaken opgespoord worden en adequate therapieën toegepast, en andere maatregelen getroffen worden.

Tabel 4.1. Evaluatie van 'Hill criteria' voor vaststelling van waarschijnlijkheid van causaal verband tussen wortel-verdikking en -kringing (effect) en een aantal mogelijke factoren (op waarderingsschaal 0-5):

Hill-criterium	Factor			
	Zuurstofgebrek	Aluminium ¹	Ethyleen ¹	pH ²
1. Sterkte van associatie	5	5	5	2
2. Consistentie van effect	5	5	5	2
3. Specificiteit van effect	1	1	1	1
4. Tijdsverloop	5	5	5	2
5. Dosis-effect relatie	3	5	5	–
6. Verklaarbaarheid (mechanisme) ³	4	4	4	5
7. Experimenteel bewijs	3	5	5	2

Notes: ¹ literatuur; ² gegevens uit pilot studies, praktijk, en literatuur; ³ zie (discussie van) Figuur 4.1

4. Een nieuwe werkhypothese op basis van gegevens uit de praktijk, literatuur en beschreven experimenten

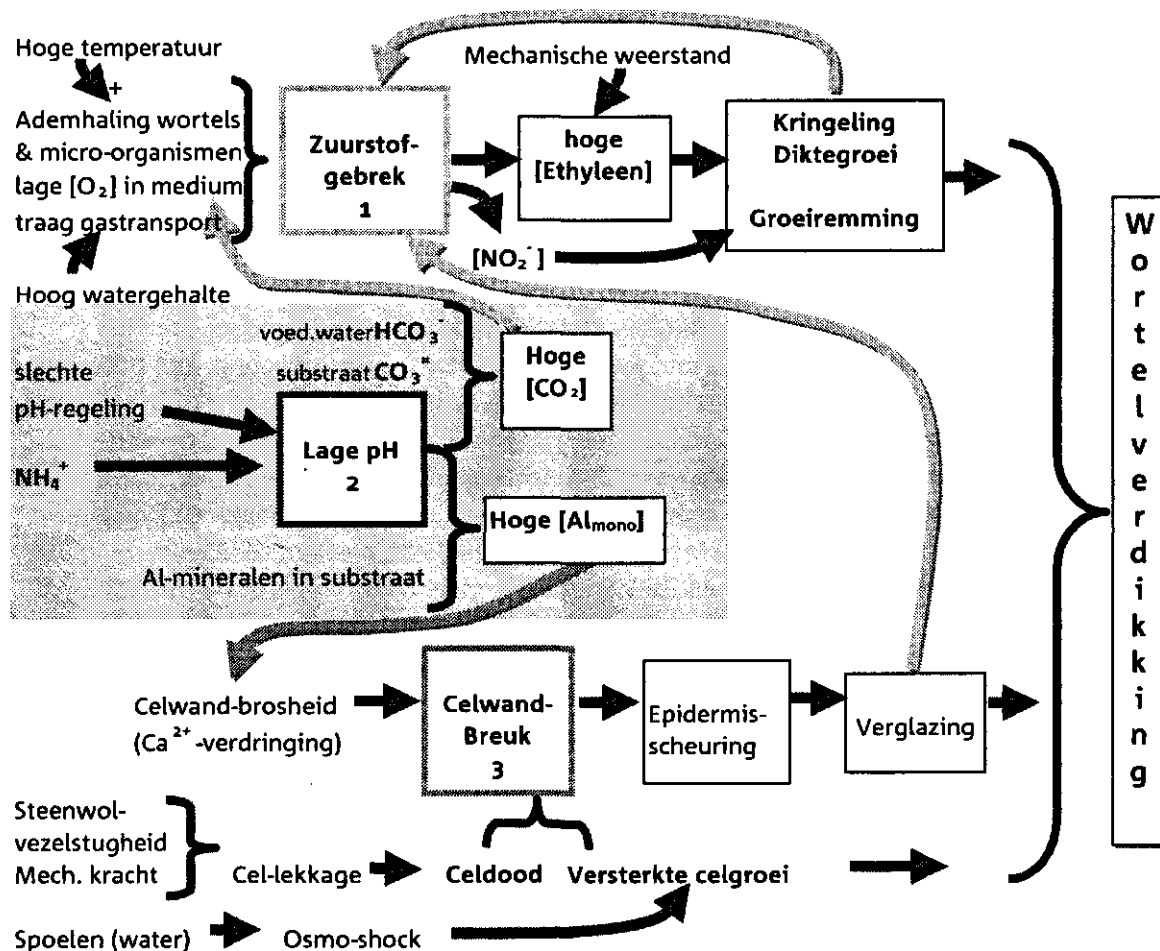
Op basis van de tot dusver verkregen resultaten kan de hypothese zoals weergegeven in Figuur 1.2. (het 'Zuurstofgebrek Model') niet worden verworpen. Zuurstofgebrek kan bovendien op meer manieren ontstaan dan aanvankelijk gedacht. Mede daarom, en op basis van informatie uit literatuur en praktijk, moet het 'Zuurstofgebrek Model' worden uitgebreid tot een nieuwe werkhypothese voor factoren die een rol spelen bij het ontstaan van zuurstofgebrek en wortelverdikking in de substraatteelt (Figuur 4.1), waarbij de belangrijkste factoren zijn: zuurstoftransport, het plantenhormoon ethyleen, wortelgroeisnelheid, mechanische weerstand van het substraat en, mogelijk, aluminium- en (bi-)carbonaatconcentratie en pH in de rhizosfeer. Het 'Poly Stress Model' voor het ontstaan van wortelverdikking (Fig. 1.1; Heimovaara 1997) ging reeds uit van de betrokkenheid van meerdere factoren, waaronder zuurstofgebrek en andere stress factoren (primair causaal) en ethyleen (als intermediair), met daarnaast nog een aantal onbekende factoren die met name leiden tot het (afwijkende) scheuren van de wortel epidermis, verglazing (vitrificatie/ lekkage) en de uiteindelijke extreme wortelverdikking (diktes tot ca 1 cm). Ook bij deze processen worden hier enkele nieuwe factoren genoemd en relaties aangegeven (Figuur 4.1).

Mogelijk mechanisme van wortelkringeling: groei en ethyleenproductie op de grens tussen lokale anoxie en hypoxie

Voor zover bekend, gaat wortelkringeling altijd vooraf aan wortelverdikking. Als dit zo is, kan wortelkringeling fungeren als 'early warning' signaal bij de bestrijding van wortelverdikking, en als object van onderzoek naar de oorzaken van wortelverdikking.

Wortelkringeling is in de plantenfysiologische literatuur reeds tientallen jaren bekend, met name als respons op ethyleen bij sommige plantensoorten (ref x). Een model voor het mechanisme van kringeling is echter niet bekend. Een eerste aanzet daarvoor volgt hier.

Wortelkringeling kan beschouwd worden als agravitropische groei van de worteltop, die bij normale planten groeit onder een bepaalde, vrij constante, hoek met de zwaartekracht (cf. Roberts & Gilbert 1992); hierbij spelen onder meer zetmeelkorrels ('starch-statoliths'), ethyleen en auxine een rol. Door het trage zuurstoftransport in waterverzadigde steenwol vertraagt de wortelgroei, mogelijk mede onder invloed van de ophoping van ethyleen (wortelgroeiremmer; Drew 1997), dat slecht uit het medium diffundeert. Hierdoor verblijft de worteltop langer op dezelfde plaats, daalt lokaal de zuurstofconcentratie nog sterker, en stijgen de concentraties van ethyleen en CO_2 . Zo daalt de lokale zuurstofconcentratie nog verder, en nemen de ethyleen- en CO_2 -concentraties verder toe. Hoge CO_2 concentraties kunnen de ethyleenproductie in de wortels stimuleren (Kende 1993). De hogere ethyleenconcentratie leidt tot (algemeen bekende) kromming van de worteltop (verstoring van de normale gravitropie / geotropie en lengtegroei remming). Asymmetrische verdeling van hormonen, w.o. auxine, en asymmetrische genexpressie zouden hierbij een rol spelen (Roberts & Gilbert 1992). Hierdoor ontstaat asymmetrie in de lokale concentratie van de verschillende gassen in de waterfase. Dit stimuleert mogelijk asymmetrische groei, doordat rond een zuurstofconcentratie van 2 % (v/v), de ethyleenproductie geremd wordt, waardoor de wortelgroei zich enigszins kan herstellen. Zo zou na



Figuur 4.1. *Werkhypothesen voor mechanisme van wortelverdikking en wortelkringeling.* Deze schematische weergave integreert informatie afkomstig uit zowel de kwekers- en telerspraktijk als uit de literatuur en het hier gepresenteerde en nog lopende onderzoek bij de diverse participanten in het landelijk onderzoeksprogramma gecoördineerd door de 'Stuurgroep Wortelverdikking'. Er worden drie deel-mechanismen onderscheiden:

1. Gaswisseling en zuurstofgebrek; 2. Fysisch-chemische evenwichten; en 3. Celwandbreuk en celgroei. Deze drie deelmechanismen kunnen gekoppeld zijn (lichte pijlen). De pijlen en accolades duiden causale relaties aan, zoals die aangetoond zijn en/of waarschijnlijk worden geacht naar de huidige stand van kennis. Verklaring van symbolen: [...], de concentratie van de betreffende stof; Al_{mono}, monomeer aluminium (oplosbaar; fyto-toxisch); NO₂⁻, nitriet (fyto-toxisch); HCO₃⁻, bicarbonaat ion; CO₃²⁻, carbonaat ion. Steenwol-specifieke factoren komen in elk van de drie deelmechanismen voor. Wortelverdikking zou het gevolg kunnen zijn van ruimtelijke heterogeniteit in celgroei, waardoor lokale weefsel schade, en vervolgens weefselwoekering optreden. Voor nadere toelichting, zie de tekst.

verloop van tijd een gekringelde wortel kunnen ontstaan. De lage zuurstofconcentratie geeft tevens, via verhoogde ethyleenproductie (Kende 1993; Voeselek & Blom 1996; Drew 1997), aanleiding tot de vorming van vergrootte intercellulaire luchtholten in de (jonge) worteldelen, in dit geval schizogene aerenchym, die leidt tot enige verdikking van de wortel.

Hiermee treedt echter nog geen glazigheid en extreme verdikking op. Daarvoor lijkt een extra factor noodzakelijk te zijn. Kandidaat hiervoor is mogelijk (monomeer) aluminium, dat tijdelijk en lokaal beschikbaar kan komen door verzuring (of alkalinisatie) van de rhizosfeer, calcium verdrijft uit de wortelcelwanden (en -plasmalemma) van vooral de epidermis, die daardoor een grote brosheid verkrijgt (minder buigzaam is; De Visser 1998^a). Dit maakt de wortel(epidermis) gevoeliger voor scheuring, bijvoorbeeld als gevolg van mechanische stress (Hoogerbrugge & Verkerke 1997, 1998) en/of osmotische stress, of van de normale (schizogene) aerenchymvorming, die gepaard gaat met enige wortelverdikking, doordat de wortel(schors)cellen minder lengtegroei vertonen, en meer radiaal strekken (cf. Bengough & MacKenzie 1994).

De CO₂ productie van de wortels (en het trage transport daarvan in natte steenwol) verlaagt verder de partiële O₂ druk rond en in de wortels. Wat het effect is van hoge CO₂ concentratie op de O₂-opname van de wortels is onduidelijk (cf. Bouma et al. 1997 en Laan & Blom 1990; Drew 1997). In het hier beschreven begassingssysteem is een sterkere hypoxie opgetreden, leidend tot hogere ethyleen productie en zo tot sterkere ethyleen-accumulatie in/rond de wortels. Dit bleek bij ons uit de mate van epinastie van het blad. Mogelijk speelt diffusie-weglengte een rol: 'tortuosity'.

In een poging om de resultaten van AB-DLO te reproduceren, konden R. Pierik en E. Visser (Kath. Univ. Nijmegen; mond. meded.) bij komkommerplanten op voedingsoplossing geen wortelkringeling oproepen door aeratie met 3% O₂. Echter, deze resultaten te verwachten, omdat ethyleen, dat als intermediaire signaalstof functioneert bij het ontstaan van kringeling (Goeschl & Kays, 1975), in dit geval gemakkelijk uit de (vrij in het stromende water hangende) wortels en het water wordt verdreven door de aeratie. In onze experimenten (I en II) met planten op steenwol, is dat laatste niet mogelijk; de waterfase in steenwol is vrijwel geheel stagnant, niet-stromend, en alleen aan de buitenzijden van de steenwol (zonder wikkel) in contact met de 5% O₂-gasfase. Daardoor kan ethyleen gemakkelijk ophopen in de steenwolpotten, en aanleiding geven tot wortelkringeling.

In een 'pilot' experiment met jonge en halfwas (0,8 m) tomatenplanten vonden we wel lengte-groeiremming, worteltop-verdikking, en wortel-aerenchymvorming, maar geen kringeling gedurende 0,5 tot 2 dagen stoppen van aeratie en/of begassen met CO₂ (door aanzuren van bicarbonaat-oplossing). Echter, naast de wijze van begassen is ook de aard van de plantensoort belangrijk: bij tabaksplanten vonden we laatst zeer fraaie wortelkringeling (en ook kurkentrekkers) na een tot twee dagen in stagnante voedingsoplossing zonder aeratie (enig restant steenwol was aanwezig, uit de kiemplant-fase).

Wisseling van zuurstofconcentratie rond de wortels gaf geen ernstiger symptomen dan een constant lage concentratie, maar intermediair tussen de controles en de lage zuurstofconcentratie. Mogelijk waren de 'timing' en/of de toegepaste concentraties niet adequaat gekozen. Echter, het idee van verhoogde stress door concentratie-wisselingen van zuurstof is zeer onlangs bevestigd (Biemelt et al., 1998), zodat vervolgonderzoek op dit gebied zeker perspectiefvol is (zie 'Suggesties voor vervolgonderzoek' pt 14).

De beschikbare gegevens suggereren dat wortelverdikking zoals die in de praktijk optreedt, niet eenvoudig ontstaat door een enkele oorzaak.

Waarschijnlijk kunnen/moeten meerdere factoren bijdragen aan het ontstaan van wortelverdikking. Aanvankelijk was de werkhypothese binnen de groep van betrokken onderzoeksinstanties (gecoördineerd door de 'Stuurgroep Wortelverdikking'), sterk georiënteerd op diverse groten-deels onbekende stress factoren, waaronder vooral zuurstofgebrek, die zouden leiden tot ver-

hoogde productie van ethyleen, dat zou moeten leiden tot wortelverdikking, wanneer bovendien epidermisscheuring optrad door nog andere onbekende oorzaken (zie introductie).

In de hier gepresenteerde nieuwe werkhypothese zijn een groot aantal nieuwe gegevens verwerkt. Deze zijn deels verkregen in onderzoek bij AB-DLO, en deels gebaseerd op resultaten van onderzoek door de overige partners binnen het wortelverdikkingsonderzoek (PBG, TNO, RUU en KUN). Ook de praktijk heeft een belangrijke rol gespeeld in het aanleveren van ideeën, die deels reeds in het genoemde onderzoek zijn getoetst.

In de nieuwe werkhypothese zijn diverse gegevens uit de literatuur, recent onderzoek, en suggesties uit de praktijk geïntegreerd. Daarbij kunnen we drie categorieën van factoren onderscheiden:

1. Gasfase (m.n. zuurstof, ethyleen en koolzuurgas; gaswisseling: opname, productie, transport en concentratie);
2. Fysisch-chemische evenwichten (pH effecten op koolzuur/ bicarbonaat/ carbonaat evenwicht en aluminiumvormen en -concentratie);
3. Celgroei (remming door lekkage van celwand tgv steenwol-vezel 'aanprikken'; stimulering door osmo-shock; weefselspanning en epidermisscheuring door niet-meegroeiende en/of afgestorven cellen).

Deze drie deel-mechanismen kunnen in veel gevallen onderling interacties vertonen, in het diagram (Figuur 4.1.) aangegeven met o.a. pijlen van groep 2 naar de groepen 1 en 3. 'Pijl 2->1': Zo zal CO₂ productie door blootstelling van carbonaten aan lage pH leiden tot verdringing van zuurstof uit de steenwol, en tevens de ethyleenbiosynthese stimuleren (e.g. Kende 1993; Voeselek & Blom 1996). Pijl '2->3': Oplosbaar aluminium, vrijgekomen uit steenwol bij pH <4.5 (De Visser 1998^a), verhoogt de brosheid van plantencelwanden (dus de breekbaarheid) en verstoort de werking van Ca²⁺-ionen in celwanden en plasmalemma (cf. De Visser 1998^a), en als 'second messenger' in signaaltransductie (Drew 1997).

Beperkingen

Experiment II had tot doel uitsluitel te geven omtrent de mogelijkheid van het reproduceren van wortelkringeling bij jonge komkommerplanten onder invloed van de factoren zuurstofconcentratie en watergehalte van de steenwolpotten. Dit doel is zeker bereikt (zie conclusies).

De volgende kanttekeningen worden geplaatst bij de verkregen resultaten:

1. Dat het praktijk-verschijnsel van excessieve 'wortelverdikking' wordt veroorzaakt door zuurstofgebrek is niet bewezen.
2. De zuurstofconcentratie binnen in het substraat varieerde in ruimte en tijd vermoedelijk sterker dan de externe concentratie. Van invloed zijn: het wisselend watergehalte, het verbruik door de wortels, en de beperkte transportsnelheden (diffusie; lokale barrières, 'tortuosity').
3. Ademhalings-CO₂ productie, bicarbonaatconcentratie en pH kunnen de zuurstofbeschikbaarheid voor de wortels beïnvloeden, via convectie en diffusie van CO₂ (e.g. Leffelaar 1987; Armstrong et al. 1991). Deze aspecten verdienen nadere aandacht in relatie tot het ontstaan van wortelverdikking.
4. Vaststellen van de feitelijke condities in en rond de wortels in onze proefopzet was moeilijk, omdat wij een externe concentratie van 5% O₂ aanlegden rondom de steenwolpotten (door verdunnen van lucht met N₂-gas).

5. Invloeden van *micro-organismen*, met name algen, maar ook bacteriën, en schimmels (mycorrhiza) zijn niet onderzocht, maar kunnen zeker van belang zijn voor het ontstaan van zuurstofgebrek in steenwol (e.g. Leiner et al. 1996).
6. Zuurstofgebrek kan indirect invloed hebben op de concentratie van *aluminium* verbindingen en belangrijke worteleigenschappen (o.a. brosheid, ethyleenproductie). Over het algemeen leidt anaërobie tot pH-verhoging in de rhizosfeer (tot ca pH 8), en daarmee tot een verlaging van de monomere-aluminium-oplosbaarheid, maar mogelijk tot verhoging van de concentratie van aluminaten). Onderzoek naar de mogelijke rol van de combinatie van deze factoren bij wortelverdikking lijkt perspectiefvol.
7. Methoden voor verlaging O_2 -spanning kunnen uitwisseling en concentraties van andere gassen verschillend beïnvloeden.

5. Samenvatting en conclusies

Wortelverdikking is een hardnekkig en ernstig probleem in de glastuinbouw, bij veel gewassen, waaronder komkommer, paprika, tomaat en gerbera. De zichtbare symptomen kunnen zijn: kringeling, scheuring, glazigheid, bruinverkleuring en/of (extreme) verdikking van de wortels en groeiremming en donkergroene kleur van het jonge blad. AB-DLO heeft sinds mei 1997 in totaal enkele maanden onderzoek verricht naar de rol van zuurstofgebrek bij het ontstaan van wortelverdikking in steenwol/vermiculiet substraten. Hier rapporteren wij over de uitkomsten, presenteren een mogelijk mechanisme van ontstaan van wortelverdikking, en doen enkele suggesties voor vervolgonderzoek, teeltmaatregelen en mogelijke oplossingen.

Doel bereikt

Het primaire doel van het onderzoek is bereikt.

- Het oproepen van wortel-kringeling en -verdikking (zij het niet extreem) met lage zuurstofconcentratie (5% ipv 21%), zoals voor het eerst gevonden in juli '97 (De Visser 1997), is gereproduceerd in een tweede experiment in dec. '97, onder enigszins andere groeicondities (kas, nov/dec), en met een andere cultivar van komkommer (cv. Farbio) dan in juni/juli (cv. Korinda; zie ook foto in sectie 3.2 en bijlagen 1 en 2; De Visser 1998^b, De Visser et al. 1998).
- Beoordeling van symptomen van wortelverdikking door een expert-panel bleek consistente en bevestigende resultaten op te leveren.
- Wisseling van zuurstofconcentratie rond de wortels gaf geen ernstiger symptomen, maar intermediair tussen de controles en de lage zuurstofconcentratie.

Overige conclusies

Succesvol vervolgonderzoek en het vinden van oplossingen staan of vallen met het reproduceerbaar oproepen van 'wortelverdikking' zoals dit in de praktijk kan optreden.

Na twee experimenten zijn er nu duidelijke aanwijzingen dat we (een deel van) het probleem 'in huis hebben gehaald':

1. Als gevolg van lage zuurstofconcentratie (5% ipv 21%) treedt op, vooral in natte substraten (uitslag enquête):
 - wortelkringeling (zeker: 90% van maximale score van expert-panel);
 - wortelverglazing (twijfelachtig: 40%, id.);
 - wortelverdikking (twijfelachtig: 40%, id.);
 - adventiefwortels: verhoogde aanwezigheid.

Nader onderzoek moet uitwijzen of de verglazing en verdikking sterker worden na verloop van tijd en/of onder praktijk-condities (die in deze experimenten niet volledig nagebootst konden worden).

2. Van de genoemde lage zuurstof-concentraties is in de literatuur aangetoond dat ze leiden tot ethyleenproductie en afwijkingen bij wortels van vele plantensoorten, waaronder lengtegroei-remming en misvormingen (w.o. kringeling, en worteltop-verdikking). Onze volgende waarnemingen stemmen hiermee overeen:
 - slap-gaan van het blad (binnen enkele dagen; epinastie, een ethyleen effect) en - vooral in combinatie met hoog watergehalte in de pot - tevens groei-achterstand, met name remming van de bladexpansie en stengelstrekking.
3. Wisseling van zuurstofconcentratie in de hier toegepaste frequentie (enkele dagen) heeft op zichzelf geen belangrijke invloed op de mate van wortelkringeling en verdikking; ook de

De ligging van het koolzuur/(bi-)carbonaat evenwicht hangt af van de pH, de (partiële) CO_2 -druk en aanwezigheid van vast carbonaat. Dit evenwicht is goed beschreven voor eenvoudige chemische systemen (Butler 1982) maar niet voor complexe chemisch-biologische systemen zoals bewortelde steenwol.

Ondanks dit gebrek aan kennis kan voorspeld worden, dat onder de gegeven condities bicarbonaten accumuleren (Fig. 5.1), en dat aanzuren door manipulatie van N-voeding en pH, zoals in de tuinbouw-praktijk gebruikelijk is, zeker zal leiden tot productie van CO_2 , waardoor de partiële zuurstofspanning plaatselijk afneemt, leidend tot afwijkende wortelgroei, zoals wortelkringeling (Fig. 4.1).

Onduidelijk is nog:

- a) of/hoe een slechte zuurstofvoorziening interacteert met pH(-wisselingen), een rol van het vrijkomen in de rhizosfeer van aluminium uit substraten (zie onderzoek door AB-DLO, De Visser 1998ab), en de rol van celdood (mechanische beschadiging) en celgroei.
- b) of een goede gaswisseling in (steenwol)substraten wortelkringeling en -verdikking kan voorkomen, en wat de rol van zuurstof is bij het optreden van de eindstadia van excessieve wortelverdikking, en
- c) welke veranderingen in de substraten en kweekcondities zijn opgetreden juist vóór het eerste optreden van wortelverdikking begin jaren '90.

6. Suggesties voor vervolgonderzoek

'Wortelverdikking is een groeiproces!'

Veel van de onderstaande suggesties zijn gebaseerd op deze constatering. Verdikte wortels kunnen alleen ontstaan zolang de betreffende wortelcellen intact zijn, en de wortelcelwanden plastisch zijn, zodat de waargenomen celexpansie plaats kan vinden. 'Wortelverdikking' kan gezien worden als een (pathologische) ontregelde vorm van een overigens normaal fysiologisch groeiproces, waarbij niet zozeer de celdeling (zoals bij tumoren) maar de celstrekking ontregeld is.

1. In vervolgonderzoek willen we o.a. kijken naar de **zuurstof dosis-respons** relatie voor het ontstaan van wortelkringeling en -verdikking, de zuurstof-transport-eigenschappen van relevante substraten, identificatie van een 'early warning' factor, en definitie van een optimaal substraat, o.a. mbv diffusie-modellen (zie ook het AB-DLO voorstel van De Visser en Rappoldt d.d. oktober 1997).
Overige suggesties: Wortelverdikking is een groeiproces!
2. Simultane metingen van **wortel(top)gedrag** (groeisnelheid, -richting, in lengte en dikte, kromming, ethyleen-productie, en ademhaling) en van de rhizosfeer-zuurstofconcentratie, door gebruik van zeer recente, nieuwe methoden (o.a. 'Acoustic Emission' en NMR).
3. **'Maximalisatie van plantengroei'**, de richtlijn van plantenkwekers, krijgt in onderzoek naar de oorzaak van wortelverdikking te weinig aandacht. Het is nog steeds een probleem de extreme "wortelverdikking van de praktijk" onder experimentele condities reproduceerbaar op te roepen. 'Kwekers-kweek'-condities toepassen in onderzoek is een mogelijke oplossingsrichting.
4. **Wortelverdikking** is een zeer snel **groeiproces**, zo blijkt uit waarnemingen in de kwekers-praktijk, en wordt gekenmerkt door extreme expansie van oudere, bestaande wortel-(schors)cellen (onderzoek Verkerke et al., PBG), die in gezonde planten niet meer kunnen groeien doordat de celwandplasticiteit daarvoor ontbreekt (celdeling/ celwoekering als in tumoren speelt waarschijnlijk geen rol). Daarom is meer celfysiologisch onderzoek noodzakelijk naar mechanismen en invloedsfactoren van celexpansie.
5. Nagaan in hoeverre **O₂- en ethyleen-effecten** (on)afhankelijk zijn (interne O₂- en ethyleenconcentratie van de wortel) in relatie tot wortelverdikking.
6. Mede betrekken van mogelijk **andere factoren** die meespelen bij het ontstaan van de typische extreme wortelverdikking en -kringeling, waaronder mechanische weerstand en -verstoring/celbeschadiging, tortuositeit en (porie-) heterogeniteit in het substraat, en chemische samenstelling van de rhizosfeer.
7. Gebruiken van de **'Hill-criteria'** (e.g. Van Rongen & Koops 1997) bij de planning en evaluatie van onderzoek naar de mogelijke oorzaak van wortelverdikking; dit kan een stap zijn naar verminderde subjectiviteit bij evaluatie van symptomen.
8. **'Besmet water'** of zieke planten, in gebruik voor onderzoek naar de rol van (opportunistische) micro-organismen in het proces naar wortelverdikking, dienen met grote voorzichtigheid geïntroduceerd te worden op laboratoria. Zolang de aard van de 'besmetting' onbekend is, zijn nauwelijks afdoende maatregelen te treffen voor het handhaven van blanco's en controles.
9. Ontwikkeling van **betere diagnostiek** van afwijkingen in wortelgroei op substraat: wat is precies de relatie tussen symptomen als bijvoorbeeld kringeling, verglazing, verbruining, openbarsten en verdikking van wortels?

10. In samenhang met 'g': ontwikkeling van **kwantitatieve meetmethoden** voor het bepalen van de mate van verglazing en verbruining (spectroscopie?), kringeling en verdikking (image analysis; zie 13).
11. **Vergelijkend onderzoek**, ook op praktijkschaal, aan kweektechnieken en eigenschappen van oude en nieuwe steenwol, zoals toegepast begin jaren '90 (recycling van gebruikte steenwol sinds begin jaren '90) en de laatste paar jaar tot nu (1998).
12. Herkomst van CO₂ uit steenwolwortelstelsels [nl. ademhaling of (bi-) carbonaat] en oorzaak-gevolg relaties tussen groeicondities en wortelgroei (activiteit van wortelgroeizones; De Visser et al. 1997) kan worden onderzocht door toepassing van (stabiele isotopen-) **labelingstechnieken**.
13. Ontwikkeling van **kwantitatieve meetmethoden** voor het bepalen van de mate van wortelkringeling en -verdikking: Als kringeling inderdaad meestal voorafgaat aan en voorkomt bij wortelverdikking, zal het voor het vergelijken van behandelingen en voor het vaststellen van dosis-respons relaties noodzakelijk zijn om de mate van aantasting nauwkeuriger te bepalen dan momenteel mogelijk. Dan kunnen meer experimenten verricht worden met minder planten en zonder de noodzaak van deelname door een expert-panel. Op het AB-DLO is expertise aanwezig op het gebied van geautomatiseerde **beeldanalyse** van wortelmorfologie (o.a. Dr. ir. A.L. Smit).
14. Onderzoek naar de invloed van **variatie in zuurstof- en/of wateraanbod** aan wortels op het ontstaan van wortelverdikking (cf. Biemelt et al. 1998), mogelijk in samenhang met variatie in andere groeifactoren (temperatuur, RV, lichtintensiteit, pH, etc.).
15. Testen van verschillen in (wortel)groei op 'natte steenwol' tussen bekende '**flooding**'-tolerante plantensoorten (rijst, riet, maïs, rumex soorten) en -intolerante soorten (leguminosen, rumex soorten) waterverzadigde steenwol. Als kringeling alleen optreedt bij de intolerante soorten, zijn is 'flooding' een factor bij het optreden van wortelverdikking. Veredeling op 'flooding'-tolerantie is mogelijk, gezien de genetische variatie binnen soorten, zoals tarwe (cf. Huang et al. 1994).
16. Remming van wortelgroei (zoals bij wortelverdikking) leidt tot verminderde **cytokinine**-gehalten in de plant. Herstel van planten met wortelverdikking kan mogelijk bespoedigd worden door cytokinine toediening aan de bladeren.

7. Suggesties voor teeltmaatregelen en hypoxie-detectie

Gezonde wortelgroei vereist een gebalanceerde, stabiele aan- en/of afvoer van drie soorten verbindingen: nutriënten, water en gassen (met name zuurstof, koolzuurgas, ethyleen). Een vlot transport van zowel water als gassen is in homogeen-fijn-poreuze substraten zoals steenwol slechts optimaal voor wortels in een beperkt deel van het substraat en bij een klein gebied van vochtgehalten; grove poriën bevorderen de gaswisseling in natte substraten. In de gebruikelijke steenwolpotten kunnen de condities voor de wortels niet overal optimaal gehouden worden.

Bovendien is de momenteel gebruikelijke steenwol zeer gevoelig voor CO₂ afgifte beneden pH 7 (versterkt zuurstofgebrek; verhoogt ethyleenproductie) en afgifte van oplosbaar aluminium vooral beneden pH 5 (De Visser 1998^a). Daarnaast is mechanische beschadiging van wortels door de steenwolvezels een risico bij hantering en verplaatsing van steenwolpotten (o.a. Hoogerbrugge & Verkerke 1997).

Teeltmaatregelen dienen gericht te zijn op het vermijden van bovengenoemde risico's en op het optimaliseren van het wortelmilieu. Enkele suggesties zijn daarom:

1. Gebruik, indien beschikbaar, grof+fijn -poreuze substraten (optimaal is waarschijnlijk: 'porie-pot' met permanente luchtporiën met diameters rond 4 mm op onderlinge afstand van ca 3 cm), eventueel door combinatie met bijvoorbeeld kokos.
2. Vermijd abrupte veranderingen in groeicondities, zoals doorspoelen met water en te grote of te snelle pH bijstelling.
3. Optimaliseer (uitgangs-) condities, zoals goed doorluchte voedings-oplossing met stabiele pH rond 6, en watergeven van bovenaf in plaats van door eb-vloed.
4. Voorkom sub- of supra-optimale condities, zoals: hoge worteltemperaturen; langdurig hoge watergehalten; beschadiging/ mechanische stress van wortels.

Teelttips om gevolgen van wortelverdikking te beperken zijn gepubliceerd in Groenten en Fruit (Anonymous, 1998b).

Detectie van zuurstofgebrek (hypoxie) en zuurstofloosheid (anaërobie, anoxie):

- In een anaëroob milieu (volledige zuurstofloosheid) rondom wortels, kan nitriet ophopen (een indicator voor lokaal zuurstofgebrek; eenvoudig te meten, zie *Materiaal en methoden*) en kan, door het proces ROL ('radiaal O₂-verlies), een dun geoxideerd laagje gehandhaafd blijven, waarin **roestkleurige ijzer-neerslagen** van Fe(OH)₃ en -in mindere mate- Fe₂O₃ worden aangetroffen (Laan, 1988; Laan et al. 1989), zoals inderdaad ook dikwijls zichtbaar bij planten met wortelverdikking (e.g. bij paprika, Verkerke en Kersten 1998).

Dankwoord

Dr. ir. W. Keltjens (LUW), voor zijn adviezen en beoordeling van wortel-morfologie in relatie tot aluminiumeffecten op planten; Diverse bedrijven die hebben meegewerkt door het aanleveren van ideeën, en het toeleveren van diverse materialen waaronder feiten- en plantenmateriaal; speciaal: C. Hartman, N. Jongerius, J. van der Lugt, J. Groot-Scholten; K. Harmanny voor hulp bij ODR metingen (AB-Haren); Adrie Kooijman en medewerkers PTD, voor technische ondersteuning; Dr. Bob Veen en Dr. Kees Rappoldt voor discussies en suggesties, Dr. Siebe van de Geijn voor algemene ondersteuning (AB-Wageningen); Wouter Verkerke (PBG), voor toezenden van relevante literatuur en voor anatomische analyses van wortelmateriaal; Leden van de 'Stuurgroep wortelverdikking', met name: Dr. ir. Gerard Weststeijn, voor diens zeer enthousiaste suggesties en leggen van contacten met bedrijven; Dr. ir. Marcel Stallen voor het stimuleren van een vlotte en plezierige communicatie tussen alle betrokkenen; De diverse respondenten van de enquête voor de medewerking aan de beoordeling van de wortelmorfologie aan de hand van foto's.

Literatuur

- Alejar, A.A., De Visser, R., Spencer, M.S. (1988). Ethylene production by attached leaves or intact shoots of tobacco cultivars differing in their speed of yellowing during curing. *Plant Physiology* 88: 329-332.
- Anonymous, (1998a) Stuurgroep 'Wortelverdikking', Voortgangsrapportage nr 4, okt. 97-half jan. '98, Productschap Tuinbouw, pp 6.
- Anonymous, (1998b) Teelttips om gevolgen van dikke wortels te beperken (Stuurgroep 'Wortelverdikking'). *Groenten en Fruit* 16 jan. 1998, glasgroenten, p 14.
- Anonymous, (1998c) Voortgangsrapportage nr 5, 15 jan.- 15 april 1998, Stuurgroep 'Wortelverdikking', Productschap Tuinbouw, pp 6.
- Armstrong, W, Beckett PM, Justin SHFW, Lythe S (1991). Modelling, and other aspects of root aeration by diffusion. In: Jackson MB, Davies DD and Lambers H, eds, pp 267-282.
- Baas, R., Van den Berg, D., Gislerod, H.R., Roeber, R.U. (1997) Do roots of rose cuttings suffer from oxygen deficiency during propagation in rockwool? *Acta Horticulturae* 450: 123-131.
- Bengough, AG, MacKenzie CJ (1994) Simultaneous measurement of root force and elongation for seedling pea roots. *J Exp Bot* 45: 95-102.
- Biemelt, S., Keetman U., Albrecht G. (1998) Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiol.* 116: 651-658
- Bouma, T.J. & R. De Visser (1993). Energy requirements for maintenance of ion concentrations in roots. *Physiologia Plantarum* 89: 133-142.
- Bouma, T.J., R. De Visser R, J.H.J.A. Janssen, M.J. De Kock, P.H. Van Leeuwen, H. Lambers (1994). Respiratory energy requirements and rate of protein turnover in vivo determined by the use of an inhibitor of protein synthesis and a probe to assess its effect. *Physiologia Plantarum* 92: 585-594.
- Bouma, T.J., Broekhuijsen AGM, & BW Veen (1996) Analysis of root respiration of *Solanum tuberosum* as related to growth, ion uptake and maintenance of biomass. *Plant Physiology Biochemistry* 34: 795-806.
- Bouma, T.J., Nielsen KL, Eissenstat DM, Lynch JP (1997) Estimating respiration of roots in soil: interactions with soil CO₂, soil temperature and soil water content. *Plant and Soil* 195: 221-232.
- Brouwer, R et al. (1981) Structure and function of plant roots. Martinus Nijhoff/ Dr W Junk, pp 415.
- Butler, JN (1982) Carbon dioxide equilibria and their applications. Addison-Wesley Publ. Comp., Reading, Massachusetts, etc., pp 259.
- Challa, H. (1976) An analysis of the diurnal course of growth, carbon dioxide exchange and carbohydrate reserve content of cucumber. PhD thesis. Wageningen, ISBN 90 220 0623 9.
- De Visser, R. (1985) Efficiency of respiration and energy requirements of N assimilation in *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum* 65: 209-218.
- De Visser, R., Spreen Brouwer, K. and Posthumus, F. (1986). Alternative path mediated ATP synthesis in roots of *Pisum sativum* upon nitrogen supply. *Plant Physiology* 80: 295-300.
- De Visser, R., Dekhuijzen, H.M., Verkerke, D.R. (1990). Control of seed respiration and growth in *Vicia faba* by oxygen and temperature: No evidence for an oxygen diffusion barrier. *Plant Physiology* 93: 668-672.
- De Visser, R. (1997) Rol van zuurstof bij het ontstaan van wortelverdikking. Rapportage AB-DLO voor de Stuurgroep 'Wortelverdikking', 8 sept., pp 7.

- De Visser, R & C Rappoldt (1997). Onderzoeksvoorstel over rol van zuurstofgaswisseling bij wortelverdikking, Stuurgroep Wortelverdikking, pp. 6.
- De Visser, R, Vianden H, & Schnyder H (1997). Kinetics and relative significance of remobilized and current C and N incorporation in leaf and root growth zones of *Lolium perenne* after defoliation: assessment by ^{13}C and ^{15}N steady-state labelling. *Plant Cell and Environment* 20, 37-46.
- De Visser, A.J.C. (1998^a) Verkenning van de effecten van pH en organische zuren op de beschikbaarheid van aluminium rond wortels I. Gedrag van enkele substraten zonder planten. AB-DLO nota 112, pp 26.
- De Visser, R. (1998^b) Mogelijke oorzaken van wortelverdikking. Voordracht voor de studiegroep 'wortelverdikking' van de NVP, Rotterdam Airport Hotel, 7 april.
- De Visser, R., Broekhuijsen G., Blom G., Veen B. (1998) Mechanisme van wortelverdikking bij komkommer. Poster, abstract en hand-out, Workshop te PBG, Naaldwijk, 23 april.
- Drew, MC (1991) Oxygen deficiency in the root environment and plant mineral nutrition. In: Jackson MB, Davies DD and Lambers H, eds, pp 303-316
- Drew, M.C. (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 223-250.
- Gambrell, RP & Patrick WH (1978) In: Hook DD & RMM Crawford, Plant life in anaerobic environments. Ann Arbor Publishers, Michigan. pp 375-423.
- Gambrell, RP, DeLaune RD, Patrick WH jr. (1991) Redox processes in soils following oxygen depletion. In: Plant life under oxygen deprivation; MB Jackson, DD Davies, H Lambers, eds. SPB Acad. Publishing bv. The Hague, pp 101-117.
- Goeschl, JD, Kays SJ (1975) Concentration dependencies of some effects of ethylene on etiolated pea, peanut, bean, and cotton seedlings. *Plant Physiology* 55: 670-677.
- Hairiah, K (1992). Aluminium tolerance of *Mucuna*, a tropical leguminous cover crop. PhD Thesis, Groningen University.
- Heimovaara, S (1997) Onderzoek dikke wortel vorming: meetcampagne bij diverse bedrijven. TNO-rapport V97.950. pp 61.
- Hoogerbrugge, W (1997) Afwijkende pH gaf geen dikke wortels. *Groenten en Fruit* 14 nov. 1997, p. 16-17.
- Hoogerbrugge, W, & Verkerke W (1997) Epidemiologie van wortelverdikking bij komkommer. Rapport 122 Proefstn. Bloemisterij en Glasgroente. pp. 31.
- Hoogerbrugge, W, & Verkerke W (1998) Wortelverdikking bij komkommer. Rapport 133 Proefstn. Bloemisterij en Glasgroente. pp. 36.
- Huang, B, Johnson JW, Nesmith S, Bridges DC (1994) Growth, physiological and anatomical responses of two wheat genotypes to waterlogging and nutrient supply. *J. Exp. Bot.* 45: 193-202.
- Jackson, MB, Davies DD, Lambers H (1991) Plant life under oxygen deprivation. SPB Acad. Publ., pp 326.
- Kende, H. (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 283-307.
- Laan, PEJ (1988) Metabole en morfologische aanpassingen aan stressomstandigheden. Colleges Oecofysiologie, KU Nijmegen. Pp 72.
- Laan, PEJ & Blom CWPM (1990) Growth and survival responses of *Rumex* species to flooded and submerged conditions: the importance of shoot elongation, underwater photosynthesis and reserve carbohydrates. *J. Exp. Bot.* 41: 775-783.
- Laan, PEJ, Smolders A, Blom CWPM, Armstrong W (1989). The relative roles of internal aeration, radial oxygen losses, iron exclusion and nutrient balances in flood-tolerance of *Rumex* species. *Acta Bot Neerl* 38: 131-145.

- Laan, P, Tosserams M, CWPM Blom, Veen BW (1990). Internal oxygen transport in *Rumex* species and its significance for respiration under hypoxic conditions. *Plant and Soil* 122: 39-46.
- Leffelaar, P.A. (1987) Dynamic simulation of multinary diffusion problems related to soil. *Soil Science* 143: 79-91.
- Leiner, RH, Fry BA, Carling DE, Loria R (1996) Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. *Phytopathology* 86: 709-713.
- Marschner, H et al. (1982) Rapid method for measuring changes in pH and reducing processes along roots of intact plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 105: 407-417.
- Marschner, H (1991) Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant and Soil* 134: 1-20.
- Nobel, P.S. 1991. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Acad Press inc., San Diego, etc., pp 635, ISBN 0-12-520021-8 (20-x).
- Rappoldt, C (1992) Diffusion in aggregated soil PhD Thesis, Wageningen Agricultural University.
- Rappoldt, C (1995) *Eur. J. Soil Sci.* 46: 169-177.
- Roberts, JA, Gilbert I (1992) Gravitropism research – will mutants prevent us from going around the bend? In: *Progress in Plant Growth Regulation*, CM Karssen, LC Van Loon & D Vreugdenhil, eds. Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, pp 913-920.
- Saglio, PH, Rancillac M, Bruzan F, Pradet A (1984) Critical oxygen pressure for growth and respiration of excised and intact roots. *Plant Physiology* 76: 151-154.
- Sasaki, M, Yamamoto Y, and Matsumoto H (1996) Lignin deposition induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiologia Plantarum* 96: 193-198.
- Steiner, AA (1966) The influence of the chemical composition of a nutrient solution on the production of tomato plants. *Plant and Soil* 24: 454-466.
- Van Gastel, T (1998) Oplossing voor dikke wortelprobleem dichterbij. *Groenten en Fruit* 30 jan. 1998, p. 16-17.
- Van Rongen, E & Koops FBJ (1997) Ziek van m'n zaktelefoon? *Natuur en Techniek* 65 (10): 76-85.
- Veen, BW (1982) The influence of mechanical impedance on the growth of maize roots. *Plant and Soil* 66: 101-109.
- Veen, BW (1989) Influence of oxygen deficiency on growth and function of plant roots. In: BC Loughman et al, eds, *Structural and functional aspects of transport in roots*, Kluwer Acad. Publ. pp 223-230.
- Veen, BW (1996) Onderzoeksvoorstel AB-DLO, 'Stuurgroep wortelverdikking'.
- Verkerke, W & Kersten M (1997) Anatomie van wortelverdikking bij komkommer. Rapport 110 Proefstn. Bloemisterij en Glasgroente. pp. 23.
- Verkerke, W & Kersten M (1998) Wortelverdikking bij Paprika. Rapport 131, PBG Naaldwijk. pp. 31.
- Voesenek, LACJ & Blom CWPM (1996) Plants and hormones: an ecophysiological view on timing and plasticity. *J Ecol* 84: 111-119
- Warmenhoven, M (1997) Zuurstofgebrek heeft niets te maken met dikke wortels. *Groenten en Fruit / Glasgroenten*, 18 juli 1997, p 11.
- Warmenhoven, MG & Baas R (1997) De invloed van substraat, zuurstofvoorziening en pH op het optreden van wortelverdikking bij komkommer. Rapport 96 Proefstn Bloemisterij en Glasgroente. pp. 28.
- Yang, SF & Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiology* 35: 155-189.
- Yoshida, S & Eguchi H (1994) Environmental analysis of aerial O₂ transport through leaves for root respiration in relation to water uptake in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) in O₂-deficient nutrient solution. *J Exp Bot* 45: 187-192.