

ISSN 0921-710X H

Proefstation voor de Bloemisterij
Linnaeuslaan 2a
1431 JV Aalsmeer
tel. 02977-52525

ISSN 0921-710X

Alcohol Dehydrogenase (ADH) als
indicator van zuurstofgebrek
in de wortels van snijbloemen.

Proefverslag 6306.04

Rapport nr. 171 prijs f 10,-

M. Warmenhoven
Aalsmeer, juni 1993

Rapport 171 wordt u toegestuurd na storting van f 10,- op girorekening
174855 ter name van Proefstation voor de Bloemisterij te Aalsmeer, onder
vermelding van; 'Rapport 171 ADH als indicator van zuurstofgebrek'.



INHOUD

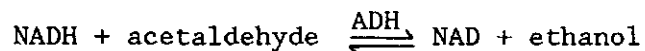
1. Inleiding	3
2. Methode	
2.1 Teeltomstandigheden	5
2.2 Waarnemingen	5
3. Resultaten	
3.1 Voedingsanalyse	7
3.2 Ademhaling van de wortel	8
3.3 Alcohol Dehydrogenase in de wortel	8
3.4 Groei en ontwikkeling van de spruit	10
4. Discussie	12
5. Samenvatting en conclusie	14
6. Literatuur	15
Bijlage 1	16
Bijlage 2	17
Bijlage 3	18

Alcohol Dehydrogenase als indicator van zuurstofgebrek in de wortels van snijbloemen

1. INLEIDING

Eerdere proeven toonden aan dat bloemisterijgewassen reageren op de zuurstofbeschikbaarheid in het wortelmilieu (Baas, 1991 en Warmenhoven, 1990). Door een geremde groei bij zuurstofarme (anaërobe) omstandigheden kunnen planten zich in verschillende mate aanpassen aan zuurstofarme omstandigheden door de vorming van aërenchym, waardoor de wortelporositeit verhoogd wordt (Noordwijk, Brouwer, 1988). De porositeitsmeting (Brouwer, 1988), maat voor de mate waarin aërenchym aanwezig is, is niet bruikbaar als maat om zuurstofarme omstandigheden aan te tonen in het wortelmilieu voor gewassen die niet of nauwelijks in staat zijn aërenchym te vormen (b.v. anjer). Bovendien kan de spreiding binnen een wortelstelsel aanzienlijk zijn, en kan het absolute verschil in porositeit als gevolg van zuurstofgebrek gering zijn (Warmenhoven, 1990).

De enzymactiviteit van Alcohol Dehydrogenase (ADH) zou een betere maat kunnen zijn. ADH is het enzym dat betrokken is bij de volgende reactie:



Deze reactie treedt op wanneer onvoldoende reductie equivalenten (NADH dit is, nicotynamide adenine dinucleotide) via de normale ademhalingsketen afgezet kunnen worden (figuur 1). Dit is het geval bij zuurstoftekort. De omzetting van pyruvaat naar uiteindelijk ethanol zorgt ervoor dat onder deze omstandigheden toch ATP gevormd wordt, nodig voor de groei, ontwikkeling, onderhoud en/of opslag. Bij een anaërobe ademhaling zijn hoge ADH-activiteiten gevonden (Laan, 1990). Veel energie komt vrij bij een aërobe ademhaling (uit 1 mol glucose ontstaat 38 mol Adeninetrifosfaat (ATP), terwijl bij een anaërobe ademhaling er een geringe hoeveelheid energie vrij komt (uit 1 mol glucose ontstaat 2 mol ATP). Het uit glucose gevormde pyruvaat gaat bij een anaërobe ademhaling niet of nauwelijks de citroenzuurcyclus (waarin/na veel ATP vrij komt) in. Het pyruvaat wordt dan omgezet in lactaat en acetaldehyde. De omzetting van pyruvaat in lactaat is bij planten nauwelijks van belang (Laan, 1990). ADH is verantwoordelijk voor de omzetting van acetaldehyde naar het voor de plant schadelijke en niet bruikbare ethanol. De ADH-activiteit in de wortel kan dus een maat zijn voor de zuurstofbeschikbaarheid in het wortelmilieu.

Het doel is om tot een indicatie te komen van zuurstofgebrek bij snijbloemen. Om een indruk te krijgen van de ADH-activiteit in wortel van sierteeltgewassen bij anaërobe en aërobe omstandigheden zijn twee proeven opgezet met anjer als toetsgewas. Daarnaast is ook bij een aantal andere gewassen gekeken naar de ADH-activiteit.

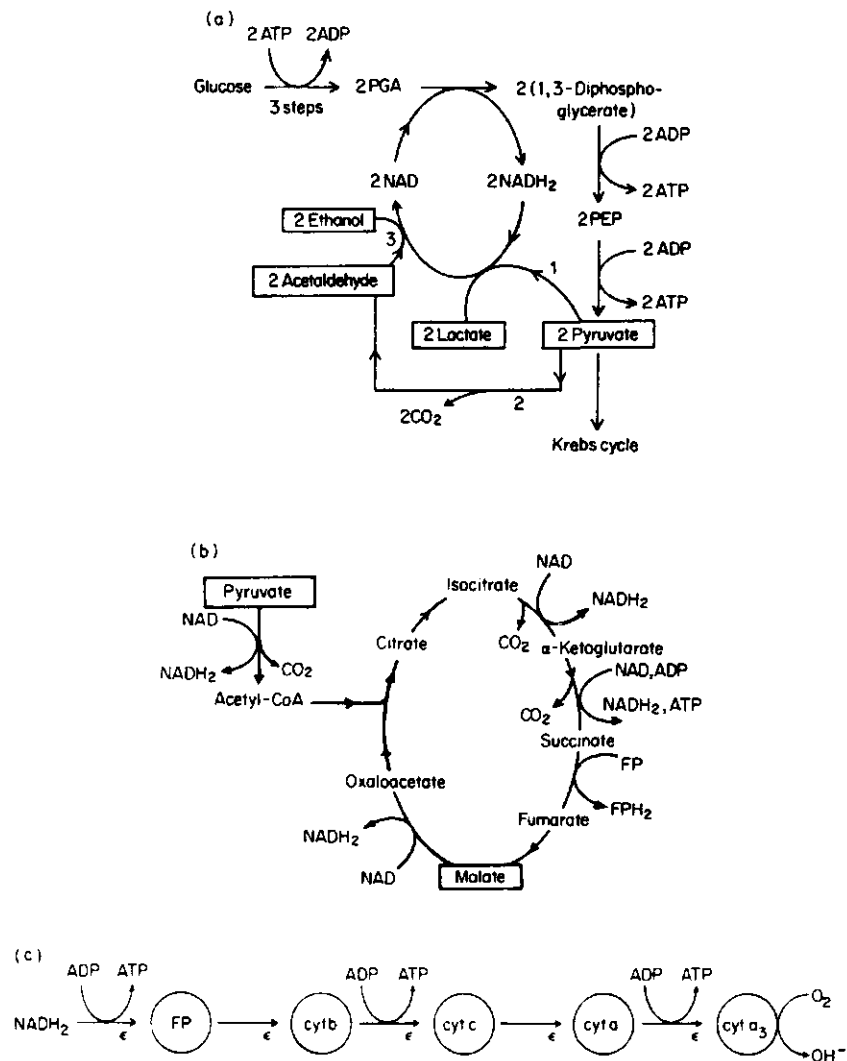


FIG. 7.1. The oxidation of glucose by plant cells. (a) The Embden-Meyerhof-Parnas Pathway. Under anaerobic conditions, reaction 1 is catalysed by lactic dehydrogenase, reaction 2 by pyruvic decarboxylase and reaction 3 by alcohol dehydrogenase. (b) The Krebs Cycle, and (c) The Respiratory (Cytochrome) Chain, showing the transport of electrons (e⁻) from NADH₂ to molecular oxygen. Boxed compounds are discussed at length in the text. (Where ATP and ADP are adenosine tri- and diphosphate respectively; NAD and NADH₂ are the oxidized and reduced forms of nicotinamide adenine dinucleotide; PGA is phosphoglyceric aldehyde; PEP, phosphoenol pyruvate; Acetyl-CoA, acetyl coenzyme A; FP, flavoprotein; and cyt, cytochrome.)

Fig. 1 De oxidatie van glucose door plantcellen (Fitter en Hay, 1987).

2. METHODE

2.1 Teeltomstandigheden

Proef 1:

In deze proef werden twee zuurstofniveaus aangelegd in het wortelmilieu door het wel en niet beluchten van de voedingsoplossing. De behandelingen werden in twaalf herhalingen uitgevoerd. Er werd geteeld in bakken met een inhoud van 23 liter, afgedekt met een deksel waarin gaten waren geboord voor planten en luchtvoorziening. De plantgaten, met een diameter van 7,6 cm, werden afgedekt met tempex schrijven. Deze waren voorzien van gaten waarin de anjerstekken pasten. Door te beluchten werd een luchtverzadiging van 100% gerealiseerd. Met behulp van een luchtpomp werd de lucht naar de bak gebracht. In de bak werd de lucht verdeeld door de uitstroom via twee aquariumsteentjes (elk met een lengte van 12,5 cm) te laten lopen. De aquariumsteentjes werden door middel van geplastificeerd koperdraad op de plaats gehouden. Door niet te beluchten zou in de loop van de tijd de zuurstofconcentratie in deze bakken dalen.

De anjerstekken, ras 'Adelfie', opgekweekt in perlite, werden in de voeding gehangen (samenstelling zie bijlage 1) op 7 oktober 1991 ($t=0$). Overdag werd belicht met hogedruk kwiklampen (HPIT, 400 W), één lamp per 6 m². De daglengte was 16 uur. Vanaf de start waren de zuurstofniveaus aangelegd, de kas werd op 18°C gehouden. Overdag kon de temperatuur in de kas oplopen tot 26°C. Afhankelijk van de EC werden de bakken aangevuld met water of voedingsoplossing. Bij pH-daling werd kaliumbicarbonaat (1 mol/l) gebruikt om de pH te verhogen.

Getopt werden de planten op 14 oktober 1991. Op 29 oktober werden op twaalf bakken de planten verwisseld. Zo gingen planten van beluchte bakken naar onbeluchte bakken en omgekeerd. Dit werd nog een keer herhaald op 19 november met dezelfde bakken.

Proef 2:

In deze proef werd hetzelfde teeltsysteem gebruikt als in proef 1. De anjerstekken, opgekweekt in perlite, werden in de voeding gehangen (samenstelling zie bijlage 1) op 8 januari 1992 ($t=0$). Er was gekozen voor vier rassen: twee standaardanjers ('Tanga' en 'Roma') en twee trosanjers ('Elsy' en 'Salmony'). Overdag werd belicht met hogedruk kwiklampen (HPIT, 400 W), één lamp per 6 m². De daglengte was 16 uur. Vanaf de start waren de zuurstofniveaus aangelegd, de kas werd op 20 °C gehouden. Op 14 januari werd deze verlaagd naar 18°C. Overdag kon de temperatuur in de kas oplopen tot 26°C. Afhankelijk van de EC werden de bakken aangevuld met water of voedingsoplossing. Bij pH-daling werd kaliumbicarbonaat (1 mol/l) gebruikt om de pH te verhogen.

Getopt werden de planten op 14 januari 1992. Op 31 maart werden nieuwe anjerstekken geplaatst op open gevallen plaatsen die ontstonden door het doen van waarnemingen. Op 2 april is de temperatuur overdag verhoogd naar 26°C.

2.2 Waarnemingen

In beide proeven zijn regelmatig waarnemingen verricht gedurende de teelt. Per oogsttijdstip werden aan het gewas de volgende waarnemingen

gedaan:

aan de spruit - het gewicht in g (vers/droog)

aan de wortel - Alcohol Dehydrogenase (Laan, 1991, bijlage 2)

- de ademhaling alleen in de tweede proef in mg O_2 /(g wortel (droog) * uur) met behulp van een biologische zuurstofmonitor (YSI 5300) bij 18°C

in de voeding - EC, pH en samenstelling tijdens de teelt

- zuurstofgehalte in %

Met behulp van bovenstaande waarnemingen is het drogestofgehalte (%) berekend. De resultaten werden met behulp van variantie-analyse per oogsttijdstip verwerkt.

3. RESULTATEN

3.1 Voedingsanalyse

Proef 1:

De resultaten van de voedingsanalyse uit proef 1 staan in tabel 1. De grote verschillen in concentratie aan chloride en natrium tussen wel en niet beluchten zijn waarschijnlijk te verklaren door de tijdelijk hogere chloride/natrium-concentratie van het bassinwater. Door de grotere verdamping van de beluchte behandeling werd deze vaker bijgevuld dan de onbeluchte behandeling. Bij zuurstofgebrek is echter ook vaak een grotere (passieve) Na-opname mogelijk.

In proef 1 werd de zuurstofconcentratie niet gemeten tijdens de teelt.

Tabel 1. Voedingscijfers op 22 oktober 1991

		onbelucht	belucht
EC	mS/cm	1,72	2,43
pH		6,08	5,75
Cl	mmol/l	0,55	5,77
NO ₃	"	12,2	13,9
P	"	0,88	0,86
K	"	4,5	4,7
Mg	"	0,79	0,77
Ca	"	4,2	4,5
NH ₄	"	0,11	0,16
Na	"	0,37	6,20
SO ₄	"	1,24	1,33

Proef 2:

De voedingsresultaten uit proef 2 staan in tabel 2. Alleen de beluchte behandeling van 'Elsy' (El+) had een wat lagere voedingsconcentratie dan de de onbeluchte behandeling van 'Elsy' (El-). Tussen de rassen 'Roma' (Ro-/ +), 'Salmony' (Sa-/ +), 'Tanga' (Ta-/ +) waren geen verschillen waarneembaar.

Tabel 2. Voedingscijfers op 25 maart 1992. Belucht (+) en onbelucht (-) bij de rassen 'Elsy', 'Roma', 'Salmony' en 'Tanga'

		El-	El+	Ro-	Ro+	Sa-	Sa+	Ta-	Ta+
EC	mS/cm	1,86	1,68	1,79	1,87	1,83	1,82	1,84	1,85
pH		4,97	6,35	5,93	6,09	5,72	5,94	5,62	6,05
Cl	mmol/l	1,28	1,46	1,20	1,30	1,18	1,41	1,24	1,39
NO ₃	"	10,5	8,5	10,1	10,4	10,3	10,5	10,5	10,2
P	"	0,99	0,70	1,00	0,97	0,99	0,94	1,00	0,97
K	"	6,1	5,0	6,1	6,3	6,1	5,9	6,1	6,3
Mg	"	1,42	1,35	1,40	1,45	1,42	1,38	1,42	1,44
Ca	"	2,8	2,7	2,5	2,7	2,7	2,7	2,7	2,6
NH ₄	"	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Na	"	1,30	1,51	1,20	1,38	1,20	1,51	1,23	1,39
SO ₄	"	1,46	1,44	1,40	1,46	1,42	1,53	1,47	1,46

De zuurstofconcentratie in de voeding werd gemeten op 3 maart 1992. Tabel 3 geeft een overzicht.

Tabel 3. Zuurstofconcentratie (%) in de voeding op 3 maart 1992 gemeten bij de verschillende rassen. Belucht (+) en onbelucht (-). Verschillende letters geven significante verschillen aan ($p < 0,05$).

	Ta-	Ta+	Ro-	Ro+	El-	El+	Sa-	Sa+
zuurstof	93 b	27 a	95 b	29 a	93 b	33 a	93 b	26 a

Er waren significante verschillen tussen de beluchte en de onbeluchte behandelingen. Tussen de rassen waren geen significante verschillen waarneembaar.

3.2 Ademhaling van de wortel

De wortelademhaling is alleen bepaald in proef 2 op 3 maart 1992 bij 18 °C. Er waren geen significante verschillen. Tabel 4 geeft een overzicht.

Tabel 4. Wortelademhaling bij 18 °C in mg O₂/(per gram wortel(droog) * uur).

	Ta-	Ta+	Ro-	Ro+	El-	El+	Sa-	Sa+
ademhaling	3,61	4,23	4,46	3,62	3,80	3,49	3,49	3,53

3.3 Alcohol Dehydrogenase in de wortel

Proef 1:

De activiteit van Alcohol Dehydrogenase (ADH) in de wortel is regelmatig gemeten in de tijd. Na 22 dagen ($t=22$) zijn de helft van de planten die belucht werden omgezet naar de onbeluchte bakken en omgekeerd. Dit is op $t=43$ nog een keer herhaald, de beluchte/onbeluchte planten werden weer belucht en omgekeerd. Figuur 2 geeft de ADH-activiteit gedurende de proef.

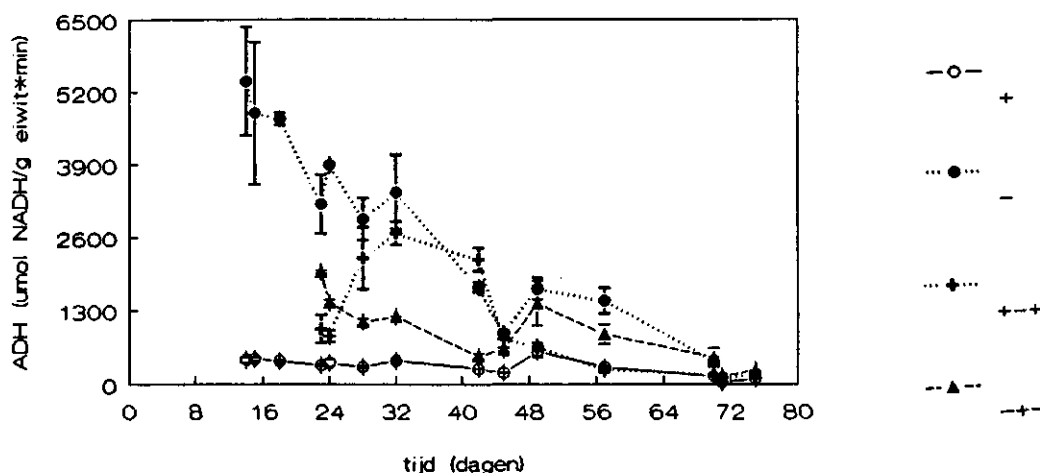


Fig. 2 ADH-activiteit in micromol NADH/g eiwit * min. bij anjer.

Continu beluchten van de voedingsoplossing (—○—) gaf lage ADH-activiteit. Het niet beluchten (...●...) van de voedingsoplossing resulteerde in een hoge ADH-activiteit die in de tijd afneemt. Vanaf tijdstip t=22 stijgt de ADH-activiteit, van de planten die van beluchte voeding (--▲--) naar onbeluchte voeding (...+...) zijn gegaan. Het omgekeerde gebeurde met de planten die van onbeluchte voeding naar beluchte voeding gingen. Deze reactie is echter minder hevig dan aan het begin van de proef. De wisseling op t=43 gaf hetzelfde beeld te zien. De ADH-activiteit bleef echter voor alle behandelingen afnemen.

Proef 2:

Ook hier is de ADH-activiteit regelmatig gemeten in de tijd. Op t=76 is de dagtemperatuur verhoogd naar 26°C. Figuur 3 geeft de ADH-activiteit van trosanjers 'Salmony' en 'Elsy' gedurende de proef.

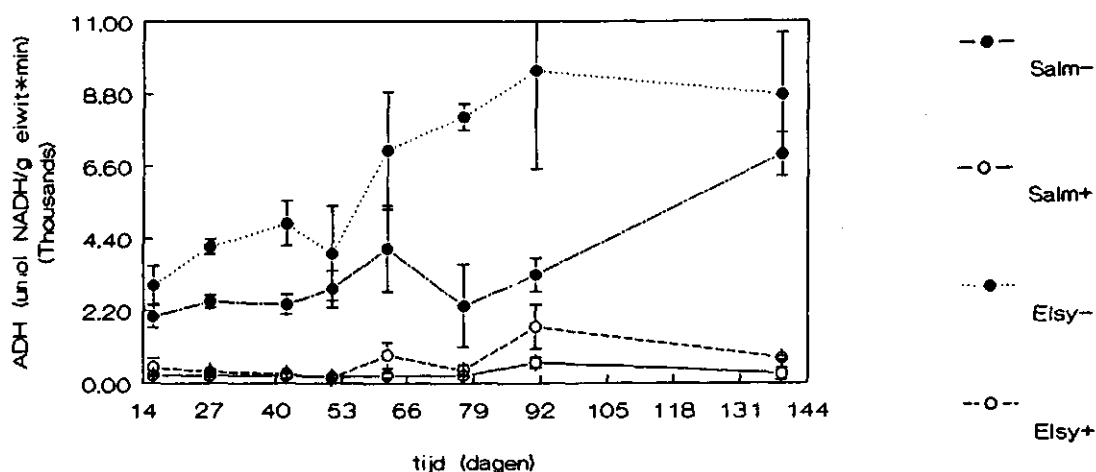


Fig. 3 ADH-activiteit in micromol NADH/g eiwit * min. bij trosanjers. Er waren significante verschillen, tussen wel en niet beluchten van de voedingsoplossing, in ADH-activiteit gedurende de gehele proefperiode. Tabel 5 geeft een algemeen overzicht van de ADH-activiteit tijdens de teelt. Opvallend was dat na het verhogen van de kasttemperatuur naar 26°C (t=76) de ADH-activiteit weer omhoog ging. 'Elsy' had een significant hogere ADH-activiteit ten opzichte van de andere rassen.

Tabel 5. ADH-activiteit in micromol NADH/g eiwit * min. bij de anjer rassen Tanga, Roma, Elsy en Salmony (belucht=+, onbelucht=-). Verschillende letters geven significante verschillen aan (P < 0.05).

	Ta+	Ta-	Ro+	Ro-	El+	El-	Sa+	Sa-
ADH t=16	308 a	1111 b	300 a	1865 b	493 a	2968 b	246 a	2019 b
ADH t=27	213 a	2631 b	298 a	2977 b	355 a	4150 b	235 a	2574 b
ADH t=42	180 a	2634 b	321 a	2526 b	293 a	4854 b	235 a	2342 b
ADH t=51	165 a	2517 b	269 a	2768 b	491 a	3933 b	205 a	2850 b
ADH t=62 20°C	163 a	3980 b	262 a	5294 b	847 a	7074 b	233 a	3294 b
ADH t=77 26°C	345 a	5363 bc	427 a	5119 bc	405 a	8092 c	240 a	1522 b
ADH t=91	420 a	4210 b	520 a	5285 b	1714 a	9503 b	620 a	3277 b
ADH t=139	316 a	6006 b	364 a	6422 b	760 a	8769 b	290 a	6994 b

Figuur 4 geeft de ADH-activiteit van standaardanjers 'Roma' en 'Tanga' gedurende de proef. Ook hier ging de ADH-activiteit omhoog na het verhogen van de dagtemperatuur. Er waren significante verschillen tussen wel en niet beluchten van de voedingsoplossing, in ADH-activiteit. De ADH-activiteit is in deze periode ook in andere proeven en aan andere gewassen gedaan. Een overzicht is gegeven in bijlage 3.

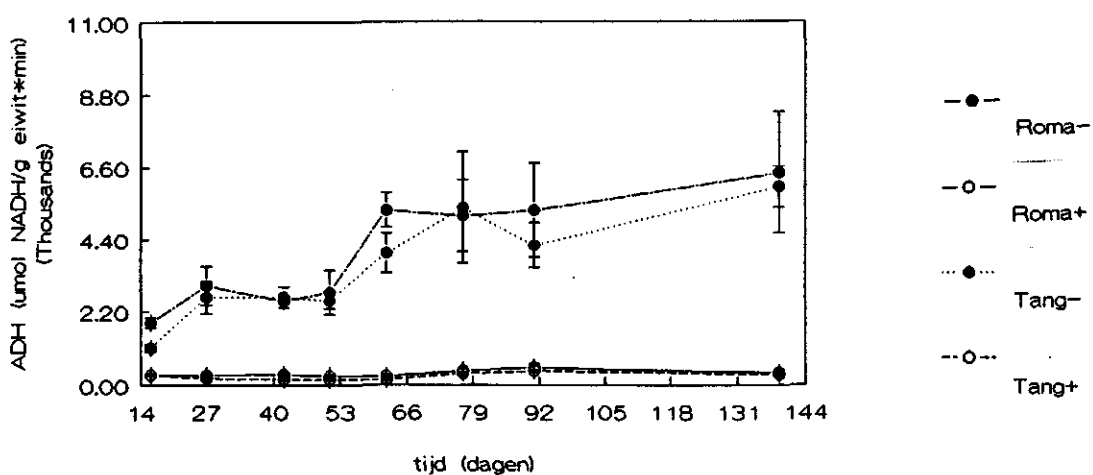


Fig. 4 ADH-activiteit in micromol NADH/g eiwit * min. bij standaardanjers.

3.4 Groei en ontwikkeling van de spruit

Proef 2:

De groei en ontwikkeling van de spruit is alleen in proef 2 bijgehouden. Tabel 6 geeft een overzicht van spruitgewicht vers/droog en het percentage drogestof op t=27, t=71 en t=139.

Tabel 6. Spruitgewicht (g vers/droog) en drogestof (%) bij verschillende anjerrassen ('Tanga', 'Roma', 'Elsy', 'Salmony') en behandelingen (belucht = +, onbelucht = -) op t=27, t=71 en t=139. Verschillende letters geven significante verschillen aan (p < 0.05).

	Ta+	Ta-	Ro+	Ro-	El+	El-	Sa+	Sa-
t=27								
spruitvers	4,96	5,13	3,33	3,32	6,93	7,46	7,49	5,95
spruitdroog	0,51	0,60	0,40	0,42	0,73	0,87	0,83	0,81
% drogestof	10,4	11,9	11,9	12,6	10,5	11,8	11,4	13,8
t=71								
spruitvers	23,2 a	17,3 a	17,6 a	13,3 a	36,0 b	17,6 a	23,2 a	18,0 a
spruitdroog	2,55	2,28	1,90	1,78	4,15	2,65	2,85	2,68
% drogestof	11,1	13,1	10,8	13,5	11,5	15,0	12,2	14,8
t=139								
spruitvers	81,1 b	81,1 b	69,6 b	36,6 a	84,8 b	38,0 a	88,9 b	55,0 a
spruitdroog	12,1	14,4	10,4	6,7	13,6	8,9	16,0	10,2
% drogestof	14,8 a	17,9 a	14,9 a	18,1 ab	16,1 a	24,1 b	17,9 ab	18,4 ab

Het spruitversgewicht op t=71 en t=139 geeft significante verschillen

tussen wel en niet beluchten van de voedingsoplossing. Beluchten van de voedingsoplossing gaf bij alle rassen een betere ontwikkeling van de spruit. De behandeling 'Elsy' onbelucht (El-) had een significant hoger percentage drogestof. In de kas zag deze behandeling er ook slechter uit ten opzichte van de andere onbeluchte behandelingen.

4. Discussie

In de proeven is onderzocht in hoeverre ADH-activiteit van de wortels een mogelijke indicator voor zuurstofgebrek in het wortelmilieu kan zijn. Dit onderzoek is in eerste instantie uitgevoerd bij anjer op watercultuur. Het bleek dat de ADH-activiteit bij onbeluchte watercultuur een factor 3 tot 30 hoger was dan in de beluchte watercultuur (tabel 5, fig. 2-4). De gemeten activiteiten liggen in dezelfde orde van grootte als bij Rumex soorten (Laan, 1990), en mais (Wignarajah en Greenway, 1976).

Overgangen van belucht naar onbelucht en omgekeerd waren in twee dagen zichtbaar. Alleen bij proef 1 waren de verschillen aan het einde van de teelt niet meer betrouwbaar verschillend. Mogelijk dat de afname van de ADH-activiteit in de onbeluchte behandeling samenhangt met de afname in licht gedurende deze proef. Een hierbij optredende geringere groeisnelheid onder deze omstandigheden zou gepaard kunnen gaan met een geringere zuurstof- behoefte van de wortels, en geringer zuurstofgebrek. De resultaten van proef 2 - met toenemende lichtperiode - waarbij de ADH-activiteit juist toenam gedurende de proef, zou deze bewering kunnen onderschrijven. Daarnaast zou de hogere kastemperatuur in proef 2 (aan het einde van de teelt) ook een oorzaak hiervan kunnen zijn.

De grote verschillen in ADH-activiteit bij anjer lijken de meting geschikt te maken als indicator voor zuurstofgebrek in waterig substraat-loze teeltsystemen zoals voedingsfilm en eb/vloed. Toch moeten hierbij enkele kanttekeningen/vragen gezet worden.

1. De ADH-meting kan alleen als een relatieve meting gebruikt worden, bijvoorbeeld een verloop van de activiteit in een voedingsfilmgoot. Absolute waarden bleken in de proeven onder relatief uniforme omstandigheden een grote variatie te kunnen vertonen (fig. 2-4), waardoor een meting onder praktijkomstandigheden moeilijk interpreteerbaar is zonder controle omstandigheden (zuurstofrijke omstandigheden).
2. Er zijn verschillen tussen gewassen/rassen. Proef 2 gaf al aan dat ras 'Elsy' een hogere activiteit te zien gaf dan de andere rassen. Dit bevestigt bovenstaand punt, dat de meting alleen als relatieve meting gebruikt kan worden. De suggesties dat de verhoging van de ADH-activiteit onder zuurstofarme teeltomstandigheden een discriminatie tussen tolerante en intolerante soorten wat betreft zuurstofgebrek zou zijn (Crawford, 1978), blijkt ook niet altijd op te gaan.
3. Betekent een verhoging van de ADH-activiteit produktieverlies? De energieproduktie bij anaërobe ademhaling is slechts een fractie van die onder aërobe omstandigheden. Produktieverlies werd inderdaad gevonden in proef 2 in de onbeluchte behandelingen (tabel 6) en in andere proeven bij onder andere chrysant en Gerbera (Warmenhoven, 1990, Baas, 1992). Bij roos echter kon ondanks de verhoogde ADH-activiteit (Bijlage 3) (nog) geen produktieverschil geconstateerd worden.

De toepasbaarheid van de methode voor wortelsystemen in substraat moet betwijfeld worden. In een substraatproef bij anjer, werden duidelijke produktieverschillen gevonden, welke in overeenstemming met het luchtgevulde poriënvolume van de substraten waren. De ADH-activiteit van wortels uit de natte substraten veen en steenwol was echter niet hoger dan die van de andere substraten (Bijlage 3). Oorzaken hiervoor kunnen liggen in de moeilijkheid van het verkrijgen van een geschikt wortelmonster. Hierbij lijken met name de kleine wortels achter te blijven in het

substraat. Daarnaast is het niet uit te sluiten dat de ADH-activiteit afneemt met de leeftijd van de plant (c.q. wortels (Wignarajah en Greenway, 1976)), hoewel dit in proef 2 niet gevonden is.

Gezien het feit dat monstername moeilijk (en destructief) is komt de vraag naar voren of ADH-activiteit in bovengrondse delen mogelijk ook een indicatie van zuurstofgebrek zou kunnen zijn. Bij populier werd echter nauwelijks een verhoging van de ADH-activiteit in blad gevonden onder tijdelijk anaërobe omstandigheden, terwijl de activiteit in de wortels wel met maximaal een factor 4 steeg (Kimmerer, 1987).

5. SAMENVATTING EN CONCLUSIE

In oktober 1991 werd een proef opgezet met anjer om ADH-activiteit in de wortel te volgen in aërobe en anaërobe omstandigheden. Twee behandelingen werden aangelegd, te weten het wel en niet beluchten van de voedingsoplossing. Halverwege de proef werd de helft van de planten van behandeling gewisseld. Aansluitend werd een tweede proef aangelegd in januari 1992. Hier waren twee behandelingen aangelegd, te weten wel en niet beluchten van de voedingsoplossing in combinatie met twee trosanjer- en twee standaardanjerrassen. Halverwege de proef is de dagtemperatuur verhoogd naar 26°C.

In proef 1 werden significante verschillen gevonden in ADH-activiteit als gevolg van de beluchting van de voedingsoplossing. De niet beluchte voedingsoplossing liet aan het begin van de teelt (figuur 2) een 5 tot 10 maal hogere ADH-activiteit zien. Wanneer de planten van een beluchte voeding naar een onbeluchte voeding gingen steeg de ADH-activiteit en omgekeerd daalde de ADH-activiteit (figuur 2). Naar het einde van de teelt daalde voor alle behandelingen de ADH-activiteit.

Ook in proef 2 werden significante verschillen gevonden in ADH-activiteit. Het ras 'Elsy' (trosanjer, figuur 3 en tabel 5) had een significant hogere ADH-activiteit ten opzichte van de andere rassen. Ook hier een 10 maal hogere ADH-activiteit als er niet belucht werd. De ADH-activiteit bleef gedurende de teelt bij de niet beluchte behandeling hoog. Dit is mogelijk toe te schrijven aan de hoge dagtemperatuur die werd ingesteld op t=76.

In waterculture lijkt de ADH-activiteit een goede maat om inzicht te krijgen over de zuurstofbeschikbaarheid in het wortelmilieu. In substraatteelt bleek het echter moeilijk om een representatief monster te nemen, en lijkt de methode minder geschikt.

6. LITERATUUR

- Baas, R., (1991). - Effect van zuurstofbeschikbaarheid in het wortelmilieu op trosanjer 'Adelfie'. PBN, Rapport nr. 109
- Bergmeyer, H.U. (1974). Methods of enzymatic analysis (Ed. H.U. Bergmeyer). Academic Press, London.
- Brouwer, G., (1988). - Methode voor het meten van luchtgevulde wortelporositeit met de pyknometer, Voorschrift Instituut voor Bodemvruchtbaarheid. Afdeling Bodem Fisica en Wortelecologie.
- Crawford, R.M.M., (1978). Metabolic adaptations to anoxia. In "plant life in anaërobic environments" (Eds. D.D. Hook and R.M.M. Crawford), pp. 119-136. Am. Arbor. Science Publishers Inc., Michigan.
- Fitter, A.H. and R.K.M. Hay (1989). Environmental physiology of plants. Academic Press, London
- Kimmerer, T.W., (1987). - Alcohol Dehydrogenase and Pyruvate Decarboxylase activity in leaves and roots of Eastern Cottonwood (*Populus deltoides* Bartr.) and Soybean (*Glycine max* L.). Plant Physiol 84, 1210-1213
- Laan, P., (1990). - Mechanisms of flood-tolerance in *Rumex* species. p 159
- Noordwijk van, M., G. Brouwer (1988). - Luchtkanalen in wortels: Verschillen gewassen verklaren aanpassingsproblemen op substraat. Vakblad voor de Bloemisterij 26, 38-41
- Thomson, C.J., B.T. Atwell and H. Greenway (1989). - Response of Wheat seedlings to low O₂ concentrations in nutrient solutions. Journal of Experimental Botany. Vol. 40, 218, pp. 985-991
- Warmenhoven, M., R. Baas, (1990). - Effect van beschikbaarheid van zuurstof in het wortelmilieu bij snijbloemen. PBN, Rapport nr. 96
- Wignarajah, K. and H. Greenway, (1976). - Effect of anaërobiosis on activities of alcohol dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase in roots of *Zea Mays*. New Phytol. 77, 575-584.

BIJLAGE 1

De voedingsoplossing voor anjer

Bron: Voedingsoplossingen voor groenten en bloemen, geteeld in water of substraten. Sonneveld, C en N. Straver. Serie: Voedingsoplossingen glastuinbouw No. 8.

NO ₃	mmol/l	13,0
H ₂ PO ₄		1,25
SO ₄		1,25
NH ₄		1,0
K		6,25
Ca		3,75
Mg		1,0
Fe	umol/l	25
Mn		10
Zn		4
B		30
Cu		0,75
Mo		0,5
Ec		1,7

BIJLAGE 2

Bepaling ADH-activiteit volgens Laan 1990 (gemodificeerd)

De ADH-activiteit is bepaald volgens Bergmeyer (1974) door de afname (gedurende 85 sec (5-90 sec)) van NADH-concentratie in extinctie (340 nm) met een spectofotometer (PU 8720 UV/VIS, Philips) in een 1 cm cuvet (inh. ca. 4 ml) te meten.

De jonge wortels werden, nadat het meeste water voorzichtig was opgenomen door tissues, ingevroren in vloeibare stikstof.

Op het laboratorium werd in een ijskoude mortier 0,5-1,0 g wortel (in bevroren toestand) fijn gemaakt met 2 ml extraxtiebuffer (50 mM Hepes-buffer (pH 7,5) + 5 mM DTT), 5% (w:w) PVPP en 100 mg fijn zand (0,1-0,3 mm). Dit mengsel werd met behulp van 2 ml Hepes-buffer overgespoeld in centrifugebuizen, waarna gedurende 20 minuten werd gecentrifugeerd (Sigma 202 MK) bij 13500 rpm en een temperatuur tussen de 0-4°C.

In een 1 cm cuvet 2 ml 50 mM Mes buffer (pH 6,5), 300 microl BSA (0,5 mg (ml 0,1% (w:v) NaCl)), 150 microl 2,2 mM NADH en 20-200 microl wortelextract, en voorzichtig mengen. De reactie werd gestart met 200 microl 50 mM acetaldehyde. Het eiwitgehalte werd bepaald met behulp van de Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad). De ADH-activiteit werd uitgedrukt in microM NADH/g eiwit per minuut.

Afkortingen: BSA - bovine serum albumine
PVPP - polyvinyl polypyrrolidone
Hepes - N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2 ethane sulfonic acid
DTT - dithiotreitol
Mes - 2-N-morpholino ethane sulfonic acid
NADH - nicotianamide adenine dinucleotide

BIJLAGE 3

ADH-activiteit bij andere proeven en aan andere gewassen

1. Anjer

Voor alle anjermonsters uit substraat geldt dat het zeer moeilijk was een goed representatief monster te nemen. Veel fijne wortels gaan verloren tijdens de monstername. Uit de literatuur (Wignarajah, e.a. 1976) is bekend dat de ADH-activiteit in de wortelpunten hoger is. Grote monsternamefouten kunnen het gevolg zijn.

Bij een anjerproef op de proeftuin in Vleuten (7401.15) werden twee anjerrassen ('Adelfie' en 'Elsy') geteeld op de volgende substraten: perlite fijn (Pf), perlite grof (Pg), perlite fijn/veen (Pfv), perlite fijn/kleikorrel (Pfk), steenwol (st), steenwol/veen (stv), steenwol/kleikorrel (stk), oxygrow/veen (oxv) en oxygrow/kleikorrel (oxk). Het verschil in water/lucht-verhouding bij de verschillende substraten zou leiden tot een verschil in zuurstofbeschikbaarheid in het wortelmilieu. In het voorjaar van 1992 werd gekeken naar de ADH-activiteit. Tabel 3.1 geeft een overzicht.

Tabel 3.1 De gemiddelde ADH-activiteit in micromol NADH/g eiwit * min. bij anjer in substraat n=3.

substraat		ADH	substraat		ADH
'Adelfie'	Pf	1277	'Elsy'		
	Pg	1669			
	Pfv	1772		Pfv	557
	Pfk	1150		Pfk	1517
	oxv	747			
	oxk	1575		oxk	3276
	st	1202			
	stv	1080		stv	1260
	stk	814		stk	1229

2. Codiaem

In een proef met Codiaem 'Excellent' is ook gekeken naar de ADH-activiteit. De proef werd uitgevoerd op eb/vloed met twee opvoerhoogten (3 en 6 cm). Monsters zijn genomen van de behandelingen met 100% turfstrooisel (nat) en 60% turfstrooisel/40% perlite (droog) bij de verschillende opvoerhoogten. Ook hier geldt dat de kans op het maken van een monsternamefout groot is. Tabel 3.2 geeft een overzicht.

Tabel 3.2 De gemiddelde ADH-activiteit in micromol NADH/g eiwit * min. bij Codiaem op substraat n=2.

substraat	opvoerhoogten	ADH
turfstrooisel	3 cm	2448
turfstrooisel/perlite	3 cm	1970
turfstrooisel	6 cm	1692
turfstrooisel/perlite	6 cm	1570

3. Roos

Proef 1:

In een oriënterende proef, om ADH-activiteit bij rozen te bekijken, zijn in oktober 1991 stekken van Sonia 'Sweet Promise' opgeplant op waterculturen. De helft van de bakken werd belucht. In de beluchte bakken werd een 100% zuurstofbeschikbaarheid gerealiseerd. Bij de onbeluchte behandeling was dit ca. 30%. Na één maand werd de helft van de beluchte planten omgezet op onbeluchte bakken en omgekeerd. Tabel 3.3 geeft een overzicht.

Tabel 3.3 De gemiddelde ADH-activiteit in micromol NADH/g eiwit * min. bij roos op waterculture n=2.

<u>datum</u>	<u>belucht</u>	<u>onbelucht</u>	<u>belucht/onbel.</u>	<u>onbelucht/bel.</u>
15/10	45	666		
13/11		3745	1727	2495
18/11	981	1996	2049	1470

Proef 2:

Uit de proef, effect zuurstofbeschikbaarheid bij roos op substraat in een recirculerend systeem, zijn in begin van 1992 ook monsters genomen. Het ging om gestekte rozen van het ras 'Europa' en de behandelingen: eb/vloed, constant vloed en constant vloed met beluchting. De ADH-activiteit is op verschillende data bepaald. Tabel 3.4 geeft een overzicht.

Tabel 3.4 De gemiddelde ADH-activiteit in micromol NADH/g eiwit * min. bij roos op eb/vloed, vloed en vloed met beluchting.

<u>datum</u>		<u>vloed belucht</u>	<u>vloed onbelucht</u>	<u>eb/vloed</u>
27/2	n=4	419	4510	
31/3	n=2	756	4440	
27/5	n=3	1732	6812	
26/6	n=3	770	4308	2452

4. Chrysant

Bij de proef 'Beworteling van chrysant in substraat' (6304-6) te Naaldwijk werd ook de ADH-activiteit bepaald. Het gewas werd geteeld in zand, kleikorrels, perlite, flugzand en voedingsoplossing belucht met perslucht. Tabel 3.5 geeft een overzicht. Telen in zand gaf een significant hogere ADH-activiteit te zien ten opzichte van de andere behandelingen.

Tabel 3.5 De gemiddelde ADH-activiteit in micromol NADH/g eiwit * min. bij chrysant op substraat.

datum		substraat	ADH	datum		substraat	ADH
24-11-92	n=2	zand	88	12-01-93	n=2	zand	53
		kleikorrel	32			kleikorrel	35
		perlite	20			perlite	33
		flugzand	22			flugzand	18
		perslucht	27			perslucht	28

5. Aster

Een soortgelijke proef als boven omschreven is ook bij aster gedaan, eveneens in Naaldwijk. Het gewas werd geteeld in eb/vloed, vloed, voedingsoplossing belucht met perslucht, kleikorrels en wortelberegening. Tabel 3.6 geeft een overzicht.

Tabel 3.6 De gemiddelde ADH-activiteit in micromol NADH/g eiwit * min. bij aster op substraat.

		substraat	ADH
1992	n=3	eb/vloed	82
		vloed	163
		perslucht	223
		kleikorrels	332
		wortelberegening	63