

INVERTASE-ACTIVITEIT ALS KWALITEITSKENMERK?

Proefverslag 3103-5



G. Slootweg
augustus 1988

Inleiding

Invertase is het enzym dat sucrose splitst in glucose en fructose. De activiteit van dit enzym wordt in verband gebracht met de sink-werking van het orgaan waarin het voorkomt. Russel (1982) vindt in tomatenbloemen dat de activiteit stijgt tot de anthesis en daarna sterk daalt. Lichtomstandigheden waarbij de bloemen gaan verdrogen gaan gepaard met minder invertase-activiteit. Halaba (1983) meet bij anjer een sterke daling van de invertase-activiteit bij veroudering op de vaas. Een ABA-behandeling verlaagt de invertase-activiteit sterk. Een ethephon-behandeling geeft na een aanvankelijke verhoging van de invertase-activiteit een snellere daling te zien dan de controle. Deze en andere gegevens uit de literatuur geven aan dat een goede uitbloei met een hoge invertase-activiteit gepaard gaat. Kwaliteitsverlagende omstandigheden (weinig licht, ethyleen) geven een daling van de invertase-activiteit te zien. Omgekeerd zou een hoge invertase-activiteit wellicht een maat voor goede kwaliteit kunnen zijn.

Om de mogelijkheden van invertase-activiteitsmetingen als kwaliteitsbepaling te onderzoeken is de lelie als testgewas gekozen. Van lelies is bekend dat een ethyleenbegassing de knopopening volledig kan remmen (knijpers, verdroging). De koolhydraathuishouding heeft bij lelies een grote invloed op de kwaliteit van de bloem. Zo is in de winter belichting nodig om knopval te voorkomen en kan bij rauw gesneden takken knopval in de vaas door suikertoevoeging grotendeels worden voorkomen. Tevens is met een leliegewas eenvoudig te manipuleren: bijvoorbeeld het veroorzaken van stress door plaatsing in het donker. Wanneer bij lelies de relatie tussen invertase-activiteit en kwaliteit gelegd kan worden zal de bruikbaarheid van deze methode voor andere gewassen getoetst kunnen worden.

Materiaal en methoden (algemeen)

De proeven werden uitgevoerd met de cultivar 'Enchantment'. De takken zijn direct bij de kwekers gehaald. De takken waren niet voorbehandeld. Na aankomst op het PBN werd er een stukje van de steel afgeknipt, het onderste blad verwijderd en de takken werden \pm 2 uur bij 5°C voorgewaterd. Voor de diverse verdere behandelingen, zie het hoofdstuk lelieproeven.

Voor de invertase-activiteitsmetingen werd meestal een monster van drie juist kleur tonende knoppen voor verschillende takken gebruikt. Bij reeds verdrogen knoppen waren echter één of twee knoppen extra nodig om goed te kunnen malen. Van de knoppen werden de petalen bevroren met vloeibare stikstof en in 3×12 seconden tot poeder gemalen in een IKA-laboratoriummolen.

De methode voor de invertase-activiteitsmeting werd grotendeels ontleend aan Russel (1982) en Lukazewska (1986). Na optimalisering (zie hoofdstuk Optimalisering van de toets) werd de volgende methode gebruikt. In twee pyrex reageerbuisen werd elk 200 mg van het petalenpoeder afgewogen. Hieraan werd

22006/31

toegevoegd: 5 ml fosfaat-citraat buffer pH 5 (a. 2,1 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ in 100 ml; b. 2,84 g Na_2HPO_4 in 100 ml; 94 ml a. + 100 ml b. geeft pH 5) en 5 ml 0,4 M saccharose. Dit werd goed gemixed op een Vortex-mixer, waarna één buis direct 5 minuten in een waterbad van 100°C werd geplaatst om het enzym invertase onwerkzaam te maken (Blanco).

De andere buis werd 1 uur geïncubeerd in een waterbad van 37°C. Hierna werd ook hier door 5 minuten 100°C de reactie gestopt. Na afkoeling en bezinking van het poeder werd van een monster van 0,1 ml uit beide buizen met de Boehringer enzymtest (cat. no. 139 106) de hoeveelheid glucose en fructose bepaald. De waarden van de blanco (dit is de hoeveelheid glucose en fructose oorspronkelijk in het weefsel aanwezig, plus de hoeveelheid gevormd door hydrolyse bij 100°C) werden van de waarden van het monster aangetrokken. Als maat voor de invertase-activiteit (I-act) is de hoeveelheid gevormd glucose (in g/l) gekozen, de hoeveelheid fructose is nagenoeg gelijk hieraan.

Optimalering van de toets

Om een indruk te krijgen van de hoeveelheid benodigd materiaal en de benodigde hoeveelheid substraat (saccharose) zijn combinaties van 200 en 400 mg petalenpoeder en 0,4 en 1 M saccharose getoetst (tabel 1).

Tabel 1

Hoeveelheid poeder	Concentratie saccharose-oplossing	I-act
200 mg	0,4 M	0,40
400 mg	0,4 M	0,80
200 mg	1 M	0,43
400 mg	1 M	0,82

Uit tabel 1 blijkt dat verdubbeling van de hoeveelheid materiaal een verdubbeling van de invertase-activiteit geeft. Ook blijkt 0,4 M saccharose voldoende substraat te zijn.

Om de spreiding in de uitkomsten van de toets te bepalen zijn uit dezelfde partij bloemen drie monsters van drie knoppen genomen (A, B en C), welke in duplo (a en b) in de Boehringer test bepaald zijn (tabel 2).

Tabel 2

Monster	Geïncubeerd bij 37°C (I) of blanco (B)	hoeveelheid glucose	
		a	b
A	B	0,13	0,13
A	I	0,42	0,44
B	B	0,12	0,11
B	I	0,39	0,40
C	B	0,10	0,11
C	I	0,41	0,41

Uit tabel 2 blijkt dat zowel de spreiding tussen de monsters als de spreiding tussen de duplo's in de Boehringer test zeer klein is, zodat volstaan kan worden met één monster en één Boehringer bepaling.

Om de invloed van de incubatietijd bij 37°C en de hydrolyse die optreedt bij het stoppen van de reactie bij 100°C vast te stellen, zijn blanco's 5 en 15 minuten bij 100°C gebracht en is de incubatietijd gevarieerd (1, 2, 3 en 4 uur 37°C) (tabel 3).

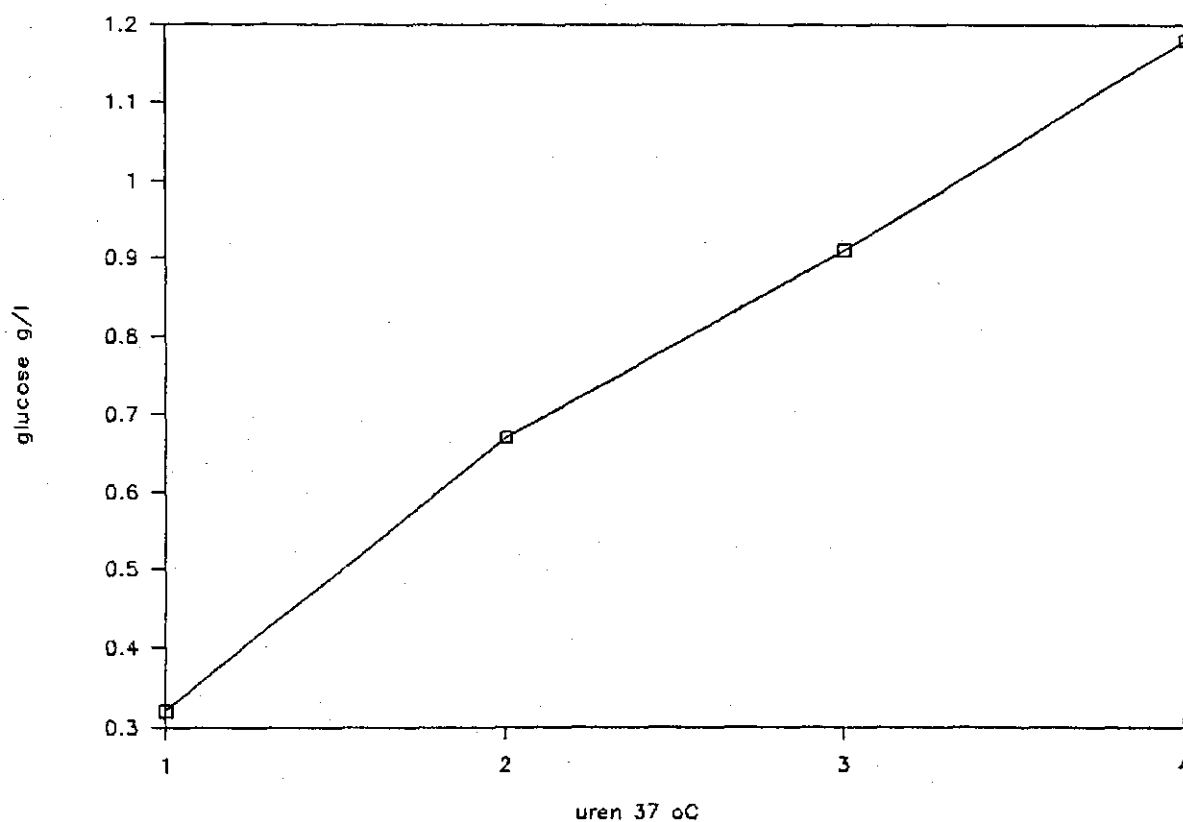
Tabel 3

Uren 37°C	min. 100°C	hoeveelheid glucose
0	5	0,07
0	15	0,15
1	5	0,32
2	5	0,67
3	5	0,91
4	5	1,18

Uit tabel 3 blijkt dat de behandeling bij 100°C een hydrolyse van de saccharose veroorzaakt. Omdat in de literatuur enkele minuten 85°C al als voldoende wordt beschreven (Russel, 1982), maar 85°C door technische bezwaren moeilijk haalbaar is, is verder een tijd van 5 minuten 100°C aangehouden. Deze tijd moet dan echter goed gestandaardiseerd worden. De hoeveelheid gevormd glucose uitgezet tegen de incubatietijd geeft een rechte lijn te zien (figuur 1). Om te bepalen of hydrolyse van saccharose ook bij 37°C plaatsvindt is buffer met saccharose zonder petalenpoeder geïncubeerd. De resultaten waren 0,03 g glucose/l voor 0 uur 37°C en 0,04 g/l voor 1 uur 37°C. Er blijkt dus bij 37°C vrijwel geen glucose (0,01 g/l) te worden gevormd door hydrolyse.

De recovery in de Boehringer test is onderzocht door gelijktijdig extract en een standaard glucose-oplossing toe te voegen. De recovery was 108%, zodat er geen remming van de toets door extract plaatsvindt.

Figuur 1.



Lelieproeven

1. Begassing met ethyleen

Na voorwateren werden 20 takken 48 uur bij 20°C begast met 1 ppm ethyleen en 20 stuks als controle met lucht. Tien takken per behandeling (twee vazen) werden na begassing in de uitbloeiruimte gezet ter beoordeling van de uitbloei. Invertase-activiteit werd direct na de begassing, na vijf en na tien dagen in de vaas gemeten (tabel 4).

Tabel 4

Beh.	I-act na begassing	I-act na 3 dagen	I-act na 6 dagen	Uitbloei		
				% open	% knijpers	% verdroogd
Lucht	0,36	0,24	0,42	63	3	35
Ethyleen	0,37	0,25	0,40	0	49	51

Uit tabel 4 blijkt dat geen verschil is aan te tonen in invertase-activiteit tussen wel of niet begaste takken, terwijl het verschil in uitbloei duidelijk is. De lagere waarden van beide behandelingen op dag 3 is niet te verklaren.

2. Plaatsing onder verschillende lichtcondities

Een andere manier om kwaliteitsverschillen te induceren is het plaatsen van de takken onder verschillende lichtomstandigheden. Gekozen is voor donker, 12 u/dag 1,5 W/m² TL, 24 u/dag 15 W/m² HPI, alles bij 20°C.

In het eerste experiment zijn rauwe takken gekozen, die nog ongeveer een week nodig hadden om snijrijp te worden. Deze takken zijn in water onder de verschillende lichtcondities geplaatst. Metingen zijn gedaan na zeven dagen (snijrijp) en na twaalf dagen. Tevens is van tien takken per behandeling de uitbloei gevolgd (tabel 5).

Tabel 5

Beh.	I-act d. 7	I-act d. 12	% goede bloemen
1. donker	0,24	0,21	9
2. 12 u 1,5 W/m ²	0,29	0,35	26
3. 24 u 15 W/m ²	0,33	0,48	67
4. donker tot d. 7 dan 1,5 W/m ²		0,34	5
5. 15 W tot d. 7 dan 1,5 W/m ²		0,47	51

Op dag 12 waren de knoppen van behandeling 1 en 4 reeds verdroogd, die van behandeling 2 tegen verdrogen aan en de knoppen van behandeling 3 en 5 hadden een volkomen gezond uiterlijk.

Uit tabel 5 (beh. 1 t/m 3) blijkt dat met oplopende lichtsom de invertase-activiteit ook oploopt, dit zowel op dag 7 als op dag 14. De uitbloei-kwaliteit volgt dezelfde tendens. Overzetten vanuit donker op dag 7 geeft een herstel van de invertase-activiteit te zien op dag 14. De uitbloei van deze

behandeling is slecht, waarschijnlijk omdat de verdroging reeds ingezet was op het moment van overzetten. De behandeling die van de hoogste lichtsom overgezet is naar 1,5 W/m² geeft geen daling van de invertase-activiteit te zien; kennelijk wordt het enzym sneller geactiveerd (of aangemaakt) dan geïnactiveerd.

Opvallend is dat een slechte uiterlijke kwaliteit van lelieknoppen niet gerelateerd is aan de invertase-activiteit. De waarden van de invertase-activiteit blijkt afhankelijk van de behandeling en niet van het uiterlijk.

De invloed van de lichtintensiteit is ook bekeken bij snijrijpe takken. Deze zijn alleen in het donker of bij 24 u 15 W/m² geplaatst en er is niet overgezet. Wel is buiten de petalen ook de rest van de bloem (meeldraden, stamper, vruchtbeginsel) op invertase-activiteit getoetst. Voor deze laatste meting waren acht knoppen per monster nodig (tabel 6).

Tabel 6

	I-act d. 0 petalen	I-act d. 0 rest	I-act d. 6 petalen	I-act d. 6 rest	% goede bloemen
Donker			0,29	1,40	63
15 W/m ²	0,32	1,50	0,41	1,53	100

De invertase-activiteit van de petalen geeft een zelfde beeld te zien als in de vorige proef. Ook de uitbloei volgt dezelfde tendens, zij het dat de percentages goede bloemen hoger zijn omdat de bloemen rijper waren. De invertase-activiteit van de rest van de bloem is vele malen hoger dan van de petalen. Merkwaardig is dat de verschillen tussen de behandelingen relatief gezien kleiner zijn, maar absoluut gezien gelijk.

3. De invloed van bewaring

Om de invloed van bewaring op de invertase-activiteit en de kwaliteit te bepalen zijn takken één week bewaard onder verschillende omstandigheden. Eén week droog, ingehoed, bij 17°C en bij 5°C in een doos en één week op water bij 5°C ingehoed. Hierna werd, na herstel bij 5°C op water de invertase-activiteit en de uitbloei bepaald. Ook zijn takken direct gemeten (d. 0) en op de vaas gezet (tabel 7).

Tabel 7

	I-act d.0	I-act d. 7	% goede bloemen
Direct	0,32	0,32	63
droog 17°C		0,31	49
droog 5°C		0,32	63
water 5°C		0,29	69

Bewaring blijkt geen invloed te hebben op de invertase-activiteit en slechts een geringe invloed op de kwaliteit (alleen 17°C droog).

Conclusies en discussie

Aan lelieknoppen kan op een eenvoudige wijze de invertase-activiteit gemeten worden. De invertase-activiteit blijkt niet zonder meer een maat voor de kwaliteit te zijn. Ethyleenbegassing blijkt de knopopening drastisch te verminderen, maar heeft geen invloed op de invertase-activiteit. Het is mogelijk dat een begassing dusdanig rigoureuus is, dat het de normale regulatie van de koolhydraathuishouding verstoort. In de literatuur beschreven effecten van ethyleen op de invertase-activiteit zijn verkregen na een ethephonbehandeling; hierbij komt de ethyleen geleidelijk over een lange tijd vrij. Een week bewaring heeft geen invloed op knopopening en/of invertase-activiteit.

Verschillende lichtcondities, die een grote invloed op de knopopening hebben, hebben ook invloed op de invertase-activiteit. Veel licht geeft een hoge invertase-activiteit en een goede uitbloei, donker geeft een lage invertase-activiteit en een slechte uitbloei.

Wellicht kan deze methodiek gebruikt worden om de 'lichtgeschiedenis' van lelies te bepalen. Bijvoorbeeld het al dan niet toepassen van belichting (dit geeft kwaliteitsverbetering) in voor- en najaar.

Literatuur

- Halaba, J., Rudnicki, R.M., 1983; An invertase inhibitor as affecting wilting of carnation petals (*Dianthus caryophyllus*). *Acta Horticulturae* 138: 261-267.
- Lukazewska, A.J., 1986; The effect of benzyladenine and ethephon on soluble protein content and invertase activity in wilting cut roses c.v. 'Carina'. *Acta Horticulturae* 181: 87-92.
- Russel, C.R., Morris, D.A., 1982; Invertase activity, soluble carbohydrates and inflorescence development in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Ann. Bot.* 49: 89-98.