



Groen of rood gewas: Anthocyaanvorming en chlorofylafbraak onder LED

Mark van Hoogdalem en Nieves García

Rapport WPR-1204

Referaat

Een van de hobbels op de weg naar grootschalige implementatie van LED in de glastuinbouw is het ongewenst paars verkleuren van blad en stelen. Met als doel oplossingsrichtingen hiervoor te vinden is met financiering door Kas als Energiebron (KaE) een onderzoek uitgevoerd bestaande uit: 1- een praktijkinventarisatie, 2- een literatuurstudie, en 3- een kennisbijeenkomst. Het blijkt dat ongewenste paarsverkleuring algemeen voorkomt bij sier-, voedings- en medicinale gewassen bij telen onder LED, met als gevolg verminderde sierwaarde, productieverlies of kortere houdbaarheid. Anthocyanen zijn de natuurlijke pigmenten verantwoordelijk voor deze verkleuringen van het blad, waar ze een rol spelen in het voorkomen van fotoinhibitie ('zonnebrand functie'). Ook kunnen ze schadelijke verbindingen opruimen en de plant beschermen tegen stress door plagen, ziektes, droogte en kou. Aanmaak en regulatie zijn zeer complex en door veel factoren (indirect) beïnvloed. Hoge lichtintensiteiten, UV, veel blauw licht in het LED spectrum, lage temperaturen, hoog CO₂ en N of P gebrek evenals beperkte sinks in het gewas werken stimulerend; FR in het LED spectrum werkt onderdrukkend. Er zijn veel interacties tussen omgevingsfactoren. Op basis van de opgedane inzichten worden acties en tests aanbevolen die mogelijk anthocyaanvorming voorkomen bij telen onder LED.

Abstract

Among the hurdles on the road to large-scale implementation of LED in greenhouse horticulture is the unwanted purple coloration of leaves and stems. With the aim to find solutions for it, a study was conducted with funding from Greenhouse as Source of Energy (KaE), consisting of: 1- an inventory, 2- a literature study, and 3- a workshop. Undesirable purple coloration is common in ornamental, food and medicinal crops and can result in reduced ornamental value, loss of production or shorter shelf life. Anthocyanins are the natural pigments responsible for these colorations of the leaf, where they play a role in preventing photoinhibition ('sunburn function'). They can also clean up harmful compounds and protect plants against stress from pests, diseases, drought and cold. Synthesis and regulation are very complex and influenced (indirectly) by many factors. High light intensities, UV, high blue (LED) light, low temperatures, high CO₂ and N or P deficiency as well as too few sinks in the crop have a stimulating effect; FR in the LED spectrum has a suppressive effect. There are many interactions between environmental factors. Based on the insights gained, actions and tests are recommended that may prevent anthocyanin formation when growing under LED.

Rapportgegevens

Rapport WPR-1204

Projectnummer: 3742323400

DOI: <https://doi.org/10.18174/640072>

Disclaimer

© 2023 Wageningen, Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw, Postbus 20, 2665 MV Bleiswijk T 0317 48 56 06, www.wur.nl/plant-research.

Kamer van Koophandel nr.: 09098104

BTW nr.: NL 8113.83.696.B07

Stichting Wageningen Research. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Stichting Wageningen Research.

Stichting Wageningen Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Adresgegevens

Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw

Postbus 20, 2665 ZG Bleiswijk

Violierenweg 1, 2665 MV Bleiswijk

T +31 (0)317 - 48 56 06

F +31 (0)10 - 522 51 93

glastuinbouw@wur.nl

wur.nl/glastuinbouw

Inhoud

Samenvatting	5
1 Inleiding	7
2 Anthocyanen: wat zijn het en wat is hun functie?	8
2.1 Anthocyanen: plantpigmenten	8
2.2 De productie van anthocyanen in het blad	10
2.3 De functies van anthocyanen in het blad	11
2.3.1 Fotoprotectie: het voorkomen of verminderen van fotoinhibitie	12
2.3.2 Osmoregulator?	14
2.3.3 Verdediging	14
2.4 Groen of rood gewas: de link tussen anthocyaanvorming en fotosynthese	14
2.4.1 Groen, rood (of geel) gewas: Anthocyaanvorming en chlorofylafbraak	15
2.4.2 Chloroplastbeweging	16
3 Anthocyanen meten	18
3.1 Non-destructief meten van anthocyanen in plantmateriaal	18
3.2 Destructief meten van anthocyanen in plantmateriaal	19
4 Regulatie van anthocyaanvorming in het blad door omgevingsfactoren	20
4.1 Licht: een voorwaarde voor anthocyaanvorming in het blad	20
4.1.1 Lichtintensiteit	20
4.1.2 Lichtspectrum	20
4.1.3 Daglengte?	23
4.2 Temperatuur	24
4.3 CO ₂	25
4.4 Water en nutriënten	25
4.5 Biotische factoren	27
4.6 Interne factoren: hormonen, reguleiwitten en suikers	28
4.7 Interactie tussen omgevingsfactoren en de invloed op anthocyaanvorming	28
4.8 Conclusies literatuurstudie	29
5 Anthocyaanvorming onder LED – een inventarisatie	31
5.1 Voorbeelden anthocyaanvorming in gewassen onder LED	31
5.1.1 Samenvatting inventarisatie - per gewas	31
5.1.2 Samenvatting inventarisatie - algemeen	33
6 Conceptueel raamwerk voor regulatie anthocyaanvorming	34
7 Workshop anthocyaanvorming onder LED	36
8 Conclusies en aanbevelingen	38
Literatuur	41
Bijlage 1 Inventarisatie van voorbeelden anthocyaanvorming	48
Bijlage 2 Input voor de workshop	59

Samenvatting

Het onderzoek "Groen of Rood gewas: Anthocyaanvorming en Chlorofyl afbraak onder LED" waar dit rapport verslag van doet is uitgevoerd door Wageningen UR Glastuinbouw met financiering vanuit het programma Kas als Energiebron (KaE). Aanleiding hiervoor was het herhaaldelijk waarnemen van ongewenste paarsverkleuring van blad en stengels tijdens (praktijk)proeven met LED belichting. Dit fenomeen zou een belemmering kunnen vormen voor de grootschalige implementatie van LED in de glastuinbouw. Aangezien deze implementatie noodzakelijk is om het energieverbruik van de glastuinbouwsector terug te dringen moet er gewerkt worden aan oplossingen. Het doel van dit onderzoek is om oplossingsrichtingen te vinden die later in tests kunnen worden gevalideerd. Hiertoe is 1- geïnterviewd bij welke proeven en onder welke condities het probleem plaats heeft gevonden; 2- een literatuuronderzoek uitgevoerd over het fenomeen anthocyaanvorming in het blad (bij het telen onder LED), de regulatie hiervan en hoe dit wordt beïnvloed door omgevingsfactoren. Tot slot, is 3- in een bijeenkomst deze informatie gedeeld en ervaringen van adviseurs, telers en andere experts opgehaald.

Uit zowel de inventarisatie als uit de kennisbijeenkomst blijkt ongewenste anthocyaanvorming vrij algemeen voor te komen bij zowel sier als voedings- en medicinale gewassen, onder meer aardbei, alstroemeria, anthurium, aster, braam, bromelia, (medicinale) cannabis, freesia, gerbera, lelie, perkplanten, petunia, phalaenopsis, roos, tomaat, soja en viool, in de meeste situaties bij telen onder LED belichting in najaar, winter en vroege voorjaar. Negatieve gevolgen van ongewenste anthocyaanvorming zijn bijvoorbeeld productieverlies door verminderde fotosynthesecapaciteit van het blad, kleiner blad en minder lichtonderschepping of kortere houdbaarheid door bladverdroging en bladval (siergewassen) of andere bladafwijkingen (zoals weefsel verdikking en zelfs necrose) op de plekken waar eerder ophoping van anthocyanen wordt waargenomen. Naast paarsverkleuring door anthocyaanvorming gaven meerdere onderzoekers en aanwezigen bij de workshop aan dat ze vaker vergeeld, oranje of bleek blad waarnemen. Dit is niet per se een voorstadium van de vorming van anthocyaan. Mogelijke andere oorzaken hiervoor zijn de afbraak van chlorofyl en de veranderingen in verhoudingen tussen verschillende bladpigmenten die dit tot gevolg heeft of het verplaatsen van het chlorofyl.

De beschikbare literatuur laat zien dat er veel onderzoek is gedaan naar de functie en synthese van anthocyanen. Het zijn natuurlijke pigmenten die de kleur aan bloemen en vruchten geven, en in bijna alle (tuinbouw)gewassen verantwoordelijk zijn voor de rode, paarse en blauwe verkleuringen van het blad. Ze kunnen fotoinhibitie voorkomen of verminderen door het absorberen van een deel van de instraling ('zonnebrand functie') en/of door het opruimen van schadelijke verbindingen (Reactive Oxygen Species; ROS). Daarnaast kunnen ze de plant beschermen tegen biotische stress (plagen en ziektes), droogte en kou.

De aanmaak en regulatie van anthocyaan is zeer complex, en wordt door veel factoren beïnvloed. Zo wordt anthocyaanvorming onder andere gestimuleerd door hoge lichtintensiteiten, een lichtspectrum met veel blauw licht, lage temperaturen, hoog CO₂ en een tekort aan stikstof of fosfaat. Hoge temperaturen en een lichtspectrum met veel verrood licht zijn dan weer voorbeelden van omstandigheden waaronder anthocyaanvorming wordt onderdrukt. Het exacte effect en de drempelwaarden van deze omgevingsfactoren op de regulatie van anthocyanen (bijvoorbeeld bij welke temperatuur anthocyaanvorming wordt gestimuleerd) hangt onder andere af van het gewas, de cultivar en het ontwikkelingsstadium. Daarnaast bestaat er interactie tussen omgevingsfactoren. Dat betekent dat het effect van de ene omgevingsfactor op anthocyaanvorming afhankelijk is van andere omgevingsfactoren. Aangezien suikers anthocyaanvorming stimuleren kan het veranderen van de plantbelasting door blad of vruchtsnoei ook een effect hebben op anthocyaanvorming: het aanhouden van meer sinks (zoals vruchten of bloemen) en/of wegsnoeien van bladeren kan anthocyaanvorming onderdrukken doordat het zal resulteren in een lagere concentratie suikers in het blad.

De omgevingsfactoren beïnvloeden meestal niet direct anthocyaanvorming maar ze beïnvloeden de aanmaak van interne factoren zoals hormonen, reguleiwitten en suikers. Deze reguleren op hun beurt de activiteit van het MBW eiwit complex, dat anthocyaan biosynthese (AB) genen activeert. Activatie van deze AB genen zorgt ervoor dat er enzymen worden aangemaakt in de plant die anthocyanen produceren. Het reguleiwit HY5 stimuleert anthocyaanvorming. Dit eiwit wordt vooral aangemaakt in de eerste uren voor en na de start van de lichtperiode en blauw licht stimuleert de aanmaak en activiteit van dit eiwit dan sterk.

Met de informatie die in de literatuur beschreven is een raamwerk gemaakt die de regulatie van anthocyaanvorming op een schematische en versimpelde wijze beschrijft, en zijn in dimensieloze grafieken de trends weergegeven hoe omgevingsfactoren de aanmaak van anthocyanen stimuleren of remmen. Dit kan een hulpmiddel voor telers en onderzoekers bieden om oplossingen te vinden als dit fenomeen optreedt. Men heeft meerdere “knoppen om aan te draaien”. Aan welke knoppen precies moet worden gedraaid en hoe hard daar is nog onvoldoende over bekend en vraagt om meer onderzoek naar dit fenomeen met (tuinbouw)gewassen.

Willen we in de toekomst anthocyaanvorming sturen, zal er beter moeten worden geregistreerd binnen onderzoeksprojecten waar en wanneer dit optreedt en in welke mate, en met welke maatregelen het is opgelost of verergerd. Dit advies geldt overigens ook voor de andere bladpigmentatie afwijkingen.

Op basis van de huidige inzichten zijn er verschillende acties aan te bevelen die mogelijk bijdragen aan het tegengaan of voorkomen van ongewenste anthocyaanvorming bij het telen onder LED. Het is echter niet exact te zeggen hoe deze acties precies moeten worden uitgevoerd en of ze in alle situaties (in alle gewassen) werken. Om daar achter te komen zouden deze teeltstrategieën/behandelingen getest moeten worden waarmee anthocyaanvorming onder LED wordt gestuurd. Wat in veel gevallen anthocyaanvorming onderdrukt is het verhogen van de teelttemperatuur. Echter, gezien het doel van de sector om het energieverbruik te verlagen, dient vervolgonderzoek gericht te zijn op energiezuinige teeltstrategieën voor het voorkomen van ongewenste anthocyaanvorming. Op basis van de bevindingen in dit rapport lijken de drie meest veelbelovende strategieën om ongewenste anthocyaanvorming te voorkomen:

- Het aanpassen (verlagen) van de CO₂ dosering.
- Het aanpassen (verhogen) van de gift van bepaalde nutriënten.
- Het toepassen van dynamische belichtingsstrategieën.

1 Inleiding

Bij (praktijk)proeven waarbij belicht wordt met LED met intensiteiten waarbij het aandeel lamplicht veel hoger is dan het aandeel daglicht (winter condities) wordt met regelmaat paarsverkleuring van het blad waargenomen. Dit is niet gewas-specifiek maar lijkt vrij algemeen voor te komen zowel bij groente- en kleinfruit als blad gewassen zoals tomaat, aubergine, bramen, sla, als bij sierteelt-gewassen (roos, alstroemeria, freesia en gerbera). In sommige gewassen is de resulterende rood/paars verkleuring gewenst (zoals bij verschillende types sla), maar in de meeste siergewassen is dit een ongewenst effect. Uit Dualex metingen (niet destructieve pigmenten bepaling-) en uit microscopisch onderzoek (García Victoria *et al.*, 2022a) wordt geconcludeerd dat dit komt door chlorofyl afbraak in de chloroplasten en vorming van anthocyanen in de vacuole. Anthocyaanvorming en afbraak van chlorofyl kan leiden tot een terugval in de fotosynthese, verlaagt in sommige gevallen de sierwaarde van het product en geeft bladverdroging op de vaas op de aangetaste delen bij siergewassen (García Victoria *et al.*, 2022a; 2022b). Anthocyaanvorming wordt vaak waargenomen maar incidenteel geregistreerd en nauwelijks kwantitatief of kwalitatief gemeten. Daardoor is er nauwelijks data beschikbaar op dit gebied die kan worden geanalyseerd om er zo achter te komen wat de anthocyaanvorming veroorzaakte.

Fosfaatgebrek (Hannegraaf & Van Alebeek, 2013) en lichtstress (Smillie & Hetherington, 1999; Steyn *et al.*, 2002) zijn factoren waarvan het bekend is dat ze anthocyaanvorming in het blad kunnen veroorzaken. Anthocyanen absorberen licht en worden gezien als “de melanine van planten”, die de plant beschermt tegen schade van teveel licht en tegen schadelijke vrije zuurstof radicalen (ROS, Wang *et al.*, 1997; Trojak & Skowron, 2017). Maar wat is de functie van anthocyanen in de relatief lage intensiteiten waarmee we in de winter belichten met LED? En waarom zien we dit niet bij belichting met SON-T? Van het lichtspectrum is ook bekend dat het effect kan hebben op anthocyaanvorming. Vooral van het aandeel blauw licht is het bekend dat het de vorming van anthocyaan stimuleert, hiermee veroorzakend rood/paarse verkleuringen van blad en vruchten (Zhang *et al.*, 2018). Echter, zelfs bij het telen onder een spectrum met een laag aandeel (8%) blauw licht werd tijdens recent onderzoek met Alstroemeria bladverkleuring waargenomen (Garcia Victoria *et al.*, 2022). Het is daarom aannemelijk dat naast het spectrum van het licht, andere factoren betrokken zijn bij anthocyaanvorming. Zo is vanuit de literatuur bekend dat onder andere suikers, temperatuur, fosforgebrek en licht anthocyaanvorming beïnvloeden (LaFountain & Yuan, 2021).

Door de negatieve effecten van anthocyaanvorming in het blad op kwaliteit (in het geval van sommige siergewassen) en de fotosynthese kan dit fenomeen een belemmering vormen voor de grootschalige implementatie van LED in de glastuinbouw. Aangezien deze implementatie noodzakelijk is om het energieverbruik van de glastuinbouwsector terug te dringen moet er gewerkt worden aan oplossingen: teeltstrategieën om ongewenste anthocyaanvorming in het blad onder LED te voorkomen.

Om te komen tot oplossingen is informatie verzameld over de regulatie van anthocyaanvorming en hoe dit wordt beïnvloed door teeltfactoren als licht, temperatuur en voeding. Hiervoor is literatuuronderzoek uitgevoerd maar zijn ook voorbeelden uit (praktijk)onderzoek en ervaringen van adviseurs, telers en andere experts verzameld. De bevindingen zijn gebruikt voor het opstellen van een raamwerk voor de regulatie van anthocyaanvorming en hypothesen voor het voorkomen hiervan bij het telen onder LEDs.

Zowel de inventarisatie als dit raamwerk zijn gebruikt als input voor een workshop met belangstellenden tijdens het Licht Event 2023 (een kennisbijeenkomst georganiseerd door Kas als Energiebron, Glastuinbouw Nederland, Delphy, PlantLighting en Wageningen University en Research, Business Unit Glastuinbouw op 1 februari 2023; Medema, 2023).

2 Anthocyanen: wat zijn het en wat is hun functie?

Anthocyanen zijn wateroplosbare pigmenten die zorgen voor niet-groene kleuren in planten. Ze variëren in kleur van paars-blauw tot oranje-rood en komen voor in nagenoeg alle delen van planten: in bloemen, vruchten, zaden, schutblad, bladeren, stengels, wortels en knollen (Boldt *et al.*, 2014). Naast anthocyanen zijn er nog twee andere groepen pigmenten die samen met anthocyanen hoofdzakelijk zorgen voor alle niet-groene kleuren in planten: betalainen en carotenoiden (meer informatie in kader 1). Echter, in de meeste gewassen zijn het anthocyanen die verantwoordelijk zijn voor de niet-groene kleuren **in het blad**. Om deze reden is er in dit rapport gefocust op anthocyanen.

2.1 Anthocyanen: plantpigmenten

Anthocyanen behoren tot de flavonoiden. Dit is een groep van secundaire plantenmetabolieten die verantwoordelijk zijn voor kleur en aroma van bloemen en vruchten en daarmee van groot belang voor het aantrekken van bestuivers en verspreiding van zaden (Panche *et al.*, 2016). Daarnaast beschermen flavonoiden in het blad de plant tegen verschillende soorten stress, zowel abiotisch (e.g. kou, droogte, licht) als biotisch (e.g. ziekteverwekkers en plaaginsecten). Naast de diverse belangrijke biologische functies van flavonoiden in de plant kunnen ze gunstige effecten hebben op de gezondheid van mens en dier en zijn er aanwijzingen dat ze kunnen worden gebruikt bij het bestrijden van ziekten (Panche *et al.*, 2016).

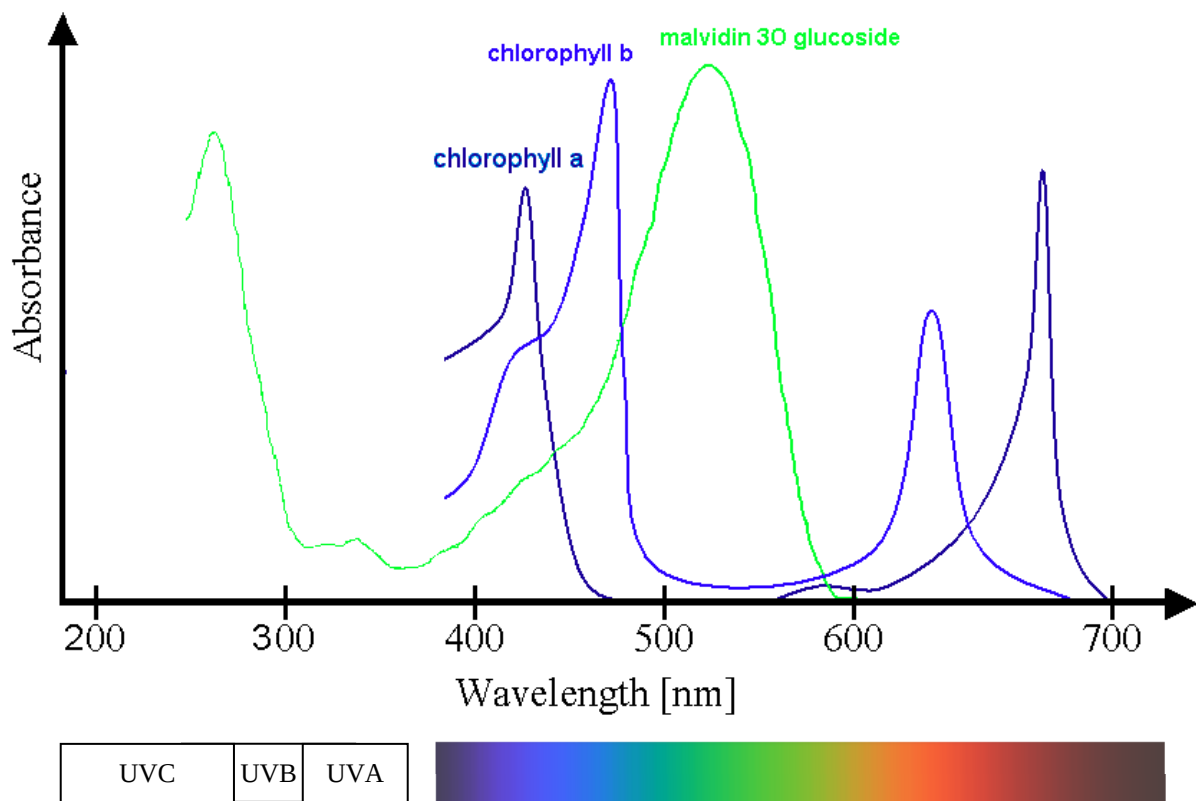
De aanmaak van anthocyanen verloopt grotendeels via de flavonoïde biosyntheseroute maar ze verschillen van andere flavonoiden in hun chemische structuur. Er zijn meer dan 600 verschillende anthocyanen geïdentificeerd in de natuur (Saigo *et al.*, 2020). Anthocyanen zijn glycosiden: moleculen die bestaan uit een glycon (suiker) en een aglycon (niet-suiker). De aglycons van anthocyanen zijn anthocyanidolen. Deze vormen de zogenaamde kernstructuur van de anthocyanen en absorberen licht in zowel het ultra-violet (UV) deel als in het zichtbare deel van het lichtspectrum (zie bijvoorbeeld figuur 2.1). Anthocyanen worden opgedeeld in 6 subcategorieën, gebaseerd op de namen van de anthocyanidolen die de kernstructuur vormen: pelargonidine, cyanidine, delphinidine, peonidine, petunidine en malvidine (Saigo *et al.*, 2020).

Kader 1: Betalainen en carotenoiden

Deze twee groepen pigmenten zijn naast anthocyanen verantwoordelijk voor de niet-groene kleuren in planten.

Betalainen zijn stoffen die in een kleine groep planten voorkomen en zorgen voor rode of gele verkleuring. Een plant kan niet zowel betalainen als anthocyanen bevatten. Met andere woorden: planten met betalainen bevatten geen anthocyanen en andersom (Mabry *et al.*, 1963; Stafford, 1994). Enkele voorbeelden van gewassen die betalainen bevatten zijn Amarant, Hanekam (*Celosia caracas*), Spinazie en Quinoa (Boldt *et al.*, 2014).

Carotenoiden zijn vaak verantwoordelijk voor geel en oranje kleuring in planten, maar soms ook rood (lycopeen in tomaat en capsanthine en capsorubine in paprika). Carotenoiden komen heel veel voor in de natuur (in bacteriën, algen, schimmels en planten) en er zijn meer dan 600 verschillende soorten bekend (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). In vruchten van planten hebben carotenoiden dezelfde functies als anthocyanen. In bladeren spelen ze vooral een rol in fotosynthese, niet zozeer in kleuring van het blad. Het zijn belangrijke componenten van de antennecomplexen van de light harvesting complexen en absorberen vooral licht in het blauwe deel van het zichtbare spectrum. Daarnaast functioneren ze als antioxidanten en helpen ze met het afvoeren van overmatig lichtenergie in de vorm van warmte via de xanthofyl cyclus (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Aangenomen wordt dat carotenoiden, net als anthocyanen, een gunstig effect hebben op de gezondheid (Johnson, 2002). Ze zouden het risico op kanker verlagen en zijn belangrijk voor de aanmaak van vitamine A (Tanaka *et al.*, 2002).

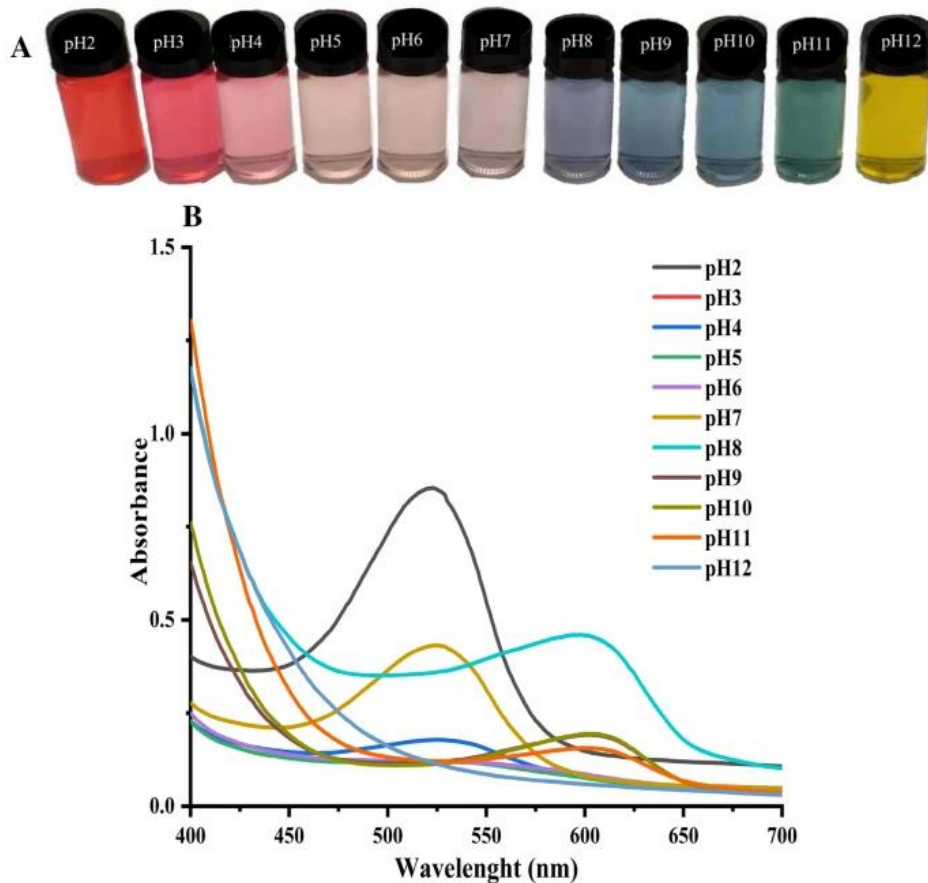


Figuur 2.1 Absorptiespectra van chlorofyl a, chlorofyl b en malvidine (een anthocyaan verantwoordelijk voor de rode kleur van wijn).

(Bron: [https://en.wikipedia.org/wiki/Anthocyanin#/media/File:Spectra_Chlorophyll_ab_oenin_\(1\).PNG](https://en.wikipedia.org/wiki/Anthocyanin#/media/File:Spectra_Chlorophyll_ab_oenin_(1).PNG))

De kleur van anthocyanen hangt niet alleen af van het type anthocyaan dat wordt aangemaakt en hoeveel, maar ook van pH, co-pigmentatie en chemische aanpassingen. Figuur 2.2 laat zien hoe de kleur van een anthocyanenextract uit bloemkool afhankelijk is van de pH van de oplossing. Onderzoek met hortensia (*Hydrangea macrophylla*) laat zien dat de pH in de vacuole, het deel van de plantencel waarin anthocyanen worden opgeslagen, bepalend is voor de kleur van de kelkbladeren (Yoshida *et al.*, 2003). Uit dit onderzoek bleek dat de gemiddelde pH in de vacuole van blauwe bloemen 4.1 was en in rode bloemen 3.3. Een relatief klein verschil in pH kan in de plant dus al een opvallend sterk effect hebben op de kleur van de anthocyanen en daarmee de plant. De pH in de vacuole ligt in de meeste planten doorgaans tussen de 4 en 6, een pH waarbij veel anthocyanen in principe kleurloos zijn (Cooper-Driver 2001). Echter, de pH in de vacuole wordt gereguleerd door (actieve) transporter eiwitten en kan bijvoorbeeld in reactie op stress of tijdens een bepaalde ontwikkelingsfase sterk veranderen (Martinoia *et al.*, 2007). Daarnaast kunnen co-pigmentatie of bepaalde chemische aanpassingen ervoor zorgen dat zelfs bij neutrale pH waarden anthocyanen toch zorgen voor felle kleuren van het blad (Zhang *et al.*, 2014).

Bij co-pigmentatie vormen anthocyanen complexen met andere stoffen zoals andere flavonoïden maar ook stoffen als, carotenoïden, organische zuren of metalen (Grotewold 2006). Voorbeelden van chemische aanpassingen die invloed hebben op de kleur van anthocyanen zijn de toevoeging van hydrocylgroepen aan de B-ring van anthocyanen of acetylatie, welke zorgen voor een meer blauwe kleur, en methylering en glycolysatie, welke zorgen voor een meer rode kleur (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).



Figuur 2.2 Kleuren en absorptiespectra van anthocyanenextract uit bloemkool (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) bij verschillende pH waarden. (Bron: Hashim *et al.*, 2022)

2.2 De productie van anthocyanen in het blad

Anthocyanen worden in nagenoeg alle delen van de plant gemaakt in het cytosol van plantencellen en worden opgeslagen in de vacuole (zie kader 2). De productie en ophoping van anthocyanen in het blad kan heel lokaal plaatsvinden en van tijdelijke aard zijn. Zo kunnen anthocyanen in alle cellagen van het blad voorkomen, maar waar precies hangt mogelijk af van de functie en verschilt per soort en ontwikkelingsstadium. Vaak worden de meeste anthocyanen aangetroffen in het sponsparenchym, maar in schaduwplanten worden ze vooral in de abaxiale (onderste) epidermis gevonden (Gould *et al.*, 1995; Cooper-Driver, 2001). Uit een studie met meer dan 400 soorten tropische planten bleek dat in jonge bladeren anthocyanen voorkwamen in het palissaden- en sponsparenchym, alleen in het palissadenparenchym of alleen in de epidermis (Lee & Collins, 2001). In volgroeide bladeren kwamen ze vooral voor in de abaxiale (onderste) epidermis en het sponsparenchym. De lokalisatie van anthocyanen in het blad is mogelijk gerelateerd aan de functie: Anthocyanen in de adaxiale (bovenste) epidermis spelen mogelijk een belangrijkere rol bij het opvangen van overmatig licht dan anthocyanen in het sponsparenchym, die mogelijk een belangrijkere rol spelen bij het opruimen van vrije zuurstof radicalen (Reactive Oxygen Species; ROS) (Neill & Gould, 2003).

De productie en ophoping van anthocyanen kan tijdelijk zijn en bijvoorbeeld alleen tijdens een bepaald ontwikkelingsstadium voorkomen of een reactie zijn op stress. Anthocyanen kunnen bijvoorbeeld worden geproduceerd in jonge ontwikkelende bladeren maar verdwijnen als ze volgroeid zijn (Dodd *et al.* 1998; Manetas *et al.* 2003; LaFountain & Yuan, 2021). Zowel biotische als abiotische stress kan tijdelijke ophoping van anthocyanen in het blad veroorzaken omdat ze de plant in staat stellen weerbaarder te zijn tegen de stressoren (Chalker-Scott 1999; Steyn *et al.* 2002; Lev-Yadun *et al.* 2004). In sommige planten is de ophoping van anthocyanen niet van tijdelijke aard. De vraag is wat het evolutionaire voordeel daarvan is in die gevallen.

De lokale en tijdelijke productie en ophoping van anthocyanen in het blad, bijvoorbeeld tijdens een bepaalde ontwikkelingsfase of een periode van stress, is het resultaat van een complexe regulatie van aanmaak en afbraak van anthocyanen (LaFountain & Yuan, 2021).

Anthocyanen worden aangemaakt via een biosyntheseroute waar verschillende enzymen bij zijn betrokken (Zhang *et al.*, 2014). De activiteit van deze enzymen is onder andere afhankelijk van de temperatuur. Echter, vooral de aanmaak van deze enzymen als gevolg van activatie van anthocyaan biosynthese (AB) genen blijkt bepalend voor de productie van anthocyanen (Meng *et al.*, 2004). De afgelopen decennia is er veel onderzoek gedaan naar hoe de activiteit van AB genen wordt gereguleerd (LaFountain & Yuan, 2021). Uit onderzoek blijkt dat een specifiek eiwitcomplex verantwoordelijk is voor het activeren van de AB genen en daarmee de productie van anthocyanen in planten. Dit complex wordt het MBW complex genoemd en bestaat uit een drietal transcriptiefactoren (ook wel regeleiwitten genoemd): een R2R3-MYB transcriptiefactor, een basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptiefactor en een WD40 repeat (WDR) eiwit (LaFountain & Yuan, 2021). Er zijn veel verschillende moleculaire componenten, zoals MYB eiwitten en microRNAs, die het MBW complex kunnen blokkeren of destabiliseren en daarmee anthocyaanproductie kunnen onderdrukken. Dergelijke mechanismen worden beïnvloed door omgevingsfactoren (e.g. licht en temperatuur) of door interne factoren (e.g. hormonen en suikers).

De ophoping van anthocyanen is niet alleen het resultaat van biosynthese maar ook van afbraak. De afbraak is het resultaat van destabilisering naarmate de tijd vordert en actieve afbraak door enzymen (Oren-Shamir, 2009). De afbraak van anthocyanen wordt beïnvloed door licht en temperatuur. Met cranberry sap is bijvoorbeeld aangetoond dat bij 40°C na 50 uur in het licht de helft van de anthocyanen waren afgebroken en in het donker na 250 uur, terwijl dit respectievelijk 30 en 40 uur duurde bij 50°C (Attoe & von Elbe 1981). Uit onderzoek met sap van zure kersen blijkt ook bij gematigde temperaturen een positief effect van temperatuurverhogingen op de afbraaksnelheid van anthocyanen: bij 5°C, 20°C of 37°C duurde het 356, 38 of 11 dagen voordat de helft van de anthocyanen in het sap waren afgebroken (Cemeroglu *et al.*, 1994). Over de regulatie van de productie van enzymen verantwoordelijk voor de afbraak van anthocyanen is geen informatie in de literatuur gevonden.

In hoofdstuk 4 van dit rapport zal uitgebreider in worden gegaan op de invloed van zowel externe factoren (de aanwezigheid van plagen en ziekteverwekkers, licht, temperatuur en de beschikbaarheid van water en voedingsstoffen) als interne factoren (hormonen en suikers) op de ophoping van anthocyanen in het blad.

2.3 De functies van anthocyanen in het blad

Waarschijnlijk zijn anthocyanen het meest bekend als pigmenten die (mede)verantwoordelijk zijn voor kleuren van bloemen en vruchten waarmee ze een belangrijke rol in het aantrekken van bestuivers en vruchteneters die helpen zaden te verspreiden (zie kader 3 voor meer informatie). Echter, anthocyanen worden ook in bladeren geproduceerd en opgeslagen. Er worden verschillende functies toegeschreven aan anthocyanen in het blad: ze kunnen op verschillende manieren bijdragen aan het verhogen van de weerbaarheid van planten tegen biotische en abiotische stress (Chalker-Scott 1999; Steyn *et al.* 2002; Close & Beadle 2003; Lev-Yadun *et al.* 2004). Door onder bepaalde omstandigheden een beperkte hoeveelheid assimilaten te investeren in de aanmaak anthocyanen voorkomt een plant mogelijk dat er in de toekomst nog veel meer assimilaten verloren gaan door aantasting door herbivoren of ziektes, of door een verminderde fotosynthesecapaciteit door fotoinhibitie (Boldt *et al.*, 2014).

2.3.1 Fotoprotectie: het voorkomen of verminderen van fotoinhibitie

Abiotische stress, bijvoorbeeld veroorzaakt door hoge (UV) straling, lage temperaturen, een tekort aan voedingsstoffen of droogte kan een negatief effect hebben op de fotosynthese. Dit proces, waarbij licht, water en CO₂ worden gebruikt voor de aanmaak van assimilaten wordt verder toegelicht in Kader 2. Bij fotoinhibitie vindt er een afname van de fotosynthese plaats doordat er meer fotonen worden geabsorbeerd door het blad dan er kunnen worden verwerkt door het fotosynthese apparaat van de plant (Krause 1988). Fotoinhibitie kan van tijdelijke aard zijn maar ook iets wat altijd plaatsvindt. Fotoinhibitie kan het gevolg zijn van schade aan fotosysteem II, in dat geval is het onomkeerbaar. Echter, fotoinhibitie kan ook omkeerbaar zijn, wanneer het een gevolg is van verlies van thermische energie (Demmig-Adams & Adams 1992). Dit laatste is een beschermingsmechanisme van de plant om overvloedige energie als gevolg van te hoge instraling af te voeren en niet het resultaat van schade aan het fotosyntheseapparaat (Demmig-Adams & Adams 1992). Daarom gaat het wanneer gesproken wordt over fotoinhibitie het vaak (ook in dit rapport) over fotoinhibitie als gevolg van schade aan fotosysteem II (Demmig-Adams & Adams 1992).

Fotoinhibitie als gevolg van schade aan fotosysteem II kan het gevolg zijn van teveel instraling, een beperking in de snelheid waarmee koolstof uit de lucht wordt vastgelegd in de vorm van suikers (koolstoffixatie) of schade aan thylakoïdemembranen (Krause 1988). Bij te hoge instralingsniveaus worden er meer fotonen geabsorbeerd door het blad dan er kunnen worden verwerkt door het fotosyntheseapparaat van de plant door een beperking van de koolstoffixatie. Daarnaast kan de UV straling DNA, eiwitten en andere belangrijke componenten van cellen beschadigen (Jansen *et al.*, 1998). Beperking van koolstoffixatie kan onder andere worden veroorzaakt door lage temperaturen, doordat de aanmaak en activiteit van enzymen die betrokken zijn bij dit proces worden afgeremd (Berry & Björkman 1980; Huner *et al.* 1993). Een tekort aan voedingsstoffen kan de koolstoffixatie ook beperken en daarmee fotoinhibitie veroorzaken. Een tekort aan fosfaat (P) bijvoorbeeld kan leiden tot een tekort aan ATP (adenosinetriofosfaat), een belangrijke energiedrager die energie levert voor koolstoffixatie (Manetas 2006).

Tijdens fotoinhibitie worden er schadelijke verbindingen gevormd: vrije zuurstof radicalen (Reactive Oxygen Species; ROS). Deze stoffen worden ook geproduceerd wanneer er schade aan structuren of componenten van cellen ontstaat, bijvoorbeeld door UV straling. Hoewel ROS als belangrijke stress-signalen voor de plant fungeren, veroorzaken ze in hogere concentraties schade aan belangrijke cellulaire componenten zoals het DNA, membranen, eiwitten en eiwitcomplexen zoals fotosysteem II (Meinen *et al.*, 2022).

Om fotoinhibitie te voorkomen of te beperken moet het teveel aan instraling wat niet kan worden verwerkt door het fotosynthese apparaat weggeleid worden van fotosysteem II, totdat de hoeveelheid opgevangen instraling en de koolstoffixatie snelheid weer in balans zijn. Planten hebben verschillende tolerantie-, reparatie- en ontwikkelingsmechanismen ontwikkeld om fotoinhibitie tot een minimum te beperken (Boldt *et al.*, 2014). Enkele voorbeelden zijn:

- Het afgeven van het overschot aan energie als gevolg door hoge instraling in de vorm van warmte via de Xanthofylcyclus (Eskling *et al.*, 1997).
- Fotorespiratie (Timm & Hagemann 2020).
- Een grotere voorraad koolstoffixatie enzymen aanleggen (Boldt *et al.*, 2014).
- Een grotere voorraad antioxidanten aanleggen die ROS kunnen opruimen (Meinen *et al.*, 2022).
- Veranderen van de bladstand en/of chloroplastverdeling in de cel om minder licht te absorberen (Kasahara *et al.*, 2002; DeBlasio *et al.*, 2005; Kume 2017).
- Verminderen van de hoeveelheid chloroplasten om minder licht op te vangen (Christ & Hörtensteiner 2014).
- De chlorofyl a/b ratio veranderen. Het verlagen van de hoeveelheid chlorofyl b zorgt voor minder aanmaak van fotosysteem II waardoor er minder fotonen worden opgevangen en schade aan fotosysteem II kan ontstaan (Sato *et al.*, 2015).
- De vorming van anthocyanen. De hypothese is dat anthocyanen in het blad fotoinhibitie voorkomen of beperken door als een soort zonnescermen te fungeren (ze verlagen de lichttoegst door chlorofyl) en/of als antioxidanten (Neill & Gould 2003; Manetas 2006).

2.3.1.1 Anthocyanen als zonneschermen

Anthocyanen in het blad, vooral wanneer ze in de epidermis zitten, kunnen als een soort zonneschermen die zowel zichtbaar als UV licht kunnen wegschermen (Stapleton 1992). Bladeren met meer anthocyanen absorberen meer licht van 450-600nm dan groene bladeren (Merzlyak *et al.* 2008). De interceptie van groen en een deel van het blauwe licht door anthocyanen in de vacuolen van dergelijke bladeren kan bijdragen aan het verlichten van stress veroorzaakt door overtollig opvangen van fotonen door fotosystemen in chloroplasten (Smillie & Hetherington 1999). Zo is aangetoond dat anthocyanen stress kunnen verlichten van jonge bladeren tijdens de aanmaak van chlorofyl (Karageorgou & Manetas 2006) en tijdens de afbraak van chlorofyl in verouderende bladeren (Feild *et al.* 2001; Hoch *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003; Archetti 2009). Het afschermen van chloroplasten in herfst zorgt ervoor dat voedingsstoffen beter kunnen worden geresorbeerd (Lee *et al.* 2003). Anthocyaanvorming gaat ook buiten de herfstperiode soms samen met chlorofylafbraak (Kannangara & Hansson 1998). Door het wegschermen van licht kunnen anthocyanen de frequentie en de intensiteit van fotoinhibitie gebeurtenissen in het blad verminderen en daarmee stellen ze planten in staat sneller hun fotosynthesesnelheid op oude niveau terug te krijgen na een periode van fotoinhibitie door (licht)stress (Gould 2004, Gould *et al.*, 2010; Boldt 2013). Zo kan anthocyaanvorming dus over de loop van een periode juist zorgen voor een hogere fotosynthese. In veel planten is de ophoping van anthocyanen in het blad tijdelijk van aard. Dit is waarschijnlijk omdat dit het meest efficiënt is: anthocyanen kunnen de plant zo beschermen tegen fotoinhibitie gedurende periodes van (licht)stress maar nemen geen licht weg in periodes wanneer licht limiterend is voor de fotosynthese. Sommige gewassen hebben constant hoge concentraties anthocyanen in het blad. Dit is wellicht omdat ze uit gebieden komen waar vaak stress is en een constante voorraad anthocyanen in het blad de plant in staat stelt om daarmee sneller op de stress te reageren. Een andere mogelijkheid is dat er tijdens de veredeling van gewassen is geselecteerd op de productie van anthocyanen zoals in sommige siergewassen.

Anthocyanen absorberen niet alleen licht in het zichtbare spectrum maar absorberen ook licht in het UVB-UVC deel van het spectrum (zie bijvoorbeeld figuur 2.1). UVB straling (280-320nm) kan DNA, eiwitten en membranen beschadigen (Teramura & Sullivan 1994; Jansen *et al.* 1998) en de ophoping van anthocyanen als gevolg van toenemende UVB straling kan deze schade verkleinen.

2.3.1.2 Planttemperatuur verhogen door absorptie groen licht?

Veel onderzoekers stellen dat anthocyanen helpen tegen fotoinhibitie door het wegvangen van een teveel aan instraling. Echter, het is ook mogelijk dat anthocyanen juist dienen om groen licht te absorberen om zo de planttemperatuur te verhogen, daarmee de koolstoffixatie snelheid te verhogen en op die manier fotoinhibitie te beperken (Kume 2017). Op de momenten van de dag dat de instraling het hoogst is in de natuur (rond het middaguur, onbewolkt) is het aandeel groen licht (450-650nm) het hoogst (Kume, 2017) en de absorptiepiek van anthocyanen ligt doorgaans precies binnen deze golflengtes (zie figuur 2.1). Planten zijn doorgaans aangepast om groen licht te reflecteren. Door anthocyanen te produceren zal het blad verkleuren en een deel van het groene licht absorberen en zo de planttemperatuur verhogen.

2.3.1.3 Anthocyanen als antioxidanten

Veel vormen van stress zorgen ervoor dat vrije zuurstof radicalen (Reactive Oxygen Species; ROS) worden geproduceerd. Zo ook bij lichtstress bij een te hoge instraling (Meinen *et al.*, 2022). Een deel van het teveel aan door de plant geabsorbeerde straling wordt afgevoerd in de vorm van warmte via de xanthophyll cyclus, maar de rest van de energie wordt overgedragen aan zuurstofmoleculen waardoor ROS worden gevormd (Boldt *et al.*, 2014). Daarnaast zorgt de schade veroorzaakt door (UV) straling aan DNA, eiwitten en membranen voor het vrijkomen van ROS. ROS zelf veroorzaken ook schade aan deze structuren en dienen daarom opgeruimd te worden door de cel (Meinen *et al.*, 2022). Anthocyanen kunnen helpen ROS moleculen op te ruimen. Zo bleek uit onderzoek met sla bijvoorbeeld dat er 37% minder chlorofylafbraak en 33% minder superoxide (O_2^- ; een type ROS) werd aangemaakt in rode bladeren in vergelijking met groene bladeren van dezelfde leeftijd (Neill & Gould, 2003). Dus anthocyanen lijken gelijktijdig ROS op te kunnen ruimen en fotoinhibitie te voorkomen. In een studie naar de antioxidant werking van anthocyanen bleek inderdaad dat alle 14 onderzochte typen prima functioneren als anti-oxidanten (Wang *et al.*, 1997). Wel bleken flavonen, een andere klasse flavonoiden, nog sterkere antioxidanten dan anthocyanen.

2.3.2 Osmoregulator?

Een mechanisme van planten om zichzelf te beschermen tegen kou en/of droogte is het verhogen van de concentratie oplosbare stoffen in het cytosol (en zo het osmotische potentiaal te verlagen) waardoor bevriezing en uitdroging kan worden voorkomen. Van proline, glycine en verschillende suikers is onder andere bekend dat ze kunnen fungeren als dergelijke osmolyten in planten. Het is mogelijk dat anthocyanen die rol ook kunnen vervullen (Chalker-Scott 2002). Anthocyanen hopen inderdaad vaak op in reactie op droogte of kou stress (Chalker-Scott 2002). Echter uit verschillende onderzoeken (onder andere met klimop, citroen en *Arabidopsis*) blijkt geen directe correlatie tussen ophoping van anthocyanen in bladeren en tolerantie voor lagere temperaturen (Steponkus & Lanphear 1969; Tignor *et al.* 1997; Leyva *et al.* 1995). Manetas (2006) stelde dat anthocyanen niet sterk genoeg ophopen in cellen om daadwerkelijk de concentratie oplosbare stoffen zodanig te verhogen om cellen te beschermen tegen (extreem) lage temperaturen. Echter, het is mogelijk dat anthocyaanophoping bijdraagt aan het verhogen van de concentratie samen met andere stoffen en dat dit als het ware een secundaire functie is van anthocyanen naast de andere hierboven genoemde functies. Uit onderzoek is eveneens geen bewijs gevonden voor door droogte geïnduceerde anthocyaanvorming, hoewel er waarnemingen zijn van blauwverkleuring in planten leidend aan droogtestress. Meestal gaat het hier ook om een response op hoge bladtemperatuur door droogte of op fotooxidatieve schade (Steyn *et al.*, 2002).

2.3.3 Verdediging

Anthocyanen hopen op als response op verwonding en infecties door pathogenen (Steyn *et al.*, 2002). Het gebruik van schimmel elicitors (zoals het afweerhormoon Jasmonzuur) leidt ook tot anthocyaan ophoping. In sommige plant-pathogeen interacties, is het de Jasmonzuur afweerroute die de aanmaak van anthocyaan stimuleert. Anthocyaanvorming is een teken van resistentie, die minder gezien wordt in gevoelige plant-pathogeen combinaties (Steyn *et al.*, 2002). Echter, anthocyanen spelen geen directe rol in de interactie tussen de plant en de pathogeen, maar hoopt eerder op in het gezonde weefsel rondom de wond, om de negatieve effecten van pathogeen infectie op fotosynthese tegen te gaan (Steyn *et al.*, 2002).

Voor de afweer tegen herbivoren ligt dat mogelijk anders. In bladeren kunnen anthocyanen een directe rol spelen in de afweer tegen herbivoren doordat deze het blad onaantrekkelijk ('vies') of zelfs giftig kunnen maken voor de aanvallers. Indirect kunnen anthocyanen een rol spelen doordat de kleurpatronen als waarschuwingssignaal dienen voor potentiële aanvallers en deze zo moet afschrikken (Lev-Yadun & Gould 2008). Gedacht wordt dat de afweer tegen herbivoren via anthocyanen vooral een belangrijke rol speelt in jonge bladeren om te compenseren voor de mindere mechanische afweer ten opzichte van volgroeide bladeren die vaak over een dikkere epidermis of een waslaag beschikken (Manetas 2006). Aan de andere kant zou anthocyaanvorming in jonge bladeren deze juist aantrekkelijker kunnen maken voor herbivoren en zo de aandacht van de meer kostbare volgroeide bladeren afleiden (Lev-Yadun & Gould 2008). Het is ook mogelijk dat anthocyanen zorgen voor betere camouflage van bladeren en de aanwezigheid van groene herbivore insecten makkelijker kan laten zien zodat deze beter zichtbaar zijn voor hun natuurlijke vijanden (Lev-Yadun & Gould 2008).

2.4 Groen of rood gewas: de link tussen anthocyaanvorming en fotosynthese

Voor de aanmaak van anthocyaan zijn hoge licht intensiteiten vereist (Steyn *et al.*, 2002). De maximale absorptie van anthocyanen in het zichtbare deel van het spectrum ligt zo rond de 530 nm (het groene deel van het spectrum), maar ze absorberen ook blauw licht. Zoals te zien is in figuur 2.1 is er daardoor enige overlap tussen het absorptiespectrum van anthocyanen en chlorofyl b. Hierdoor zal fotosysteem II (voor een groot deel bestaande uit chlorofyl b) minder fotonen absorberen wanneer anthocyanen boven de chloroplast zijn gelokaliseerd omdat deze een deel van het licht wegvangen (Manetas 2006). Blauw en rood licht zijn de meest efficiënte lichtkleuren voor de fotosynthese (Dieleman *et al.*, 2020), maar in de diepere cellagen (zoals het sponsparenchym) onderin het blad kan groen licht belangrijk zijn voor de fotosynthese (Sun *et al.*, 1998). De invloed van anthocyanen op de fotosynthesecapaciteit zal dus afhangen van de locatie van de anthocyanen in het blad.

Anthocyanen in de bovenste epidermis van het blad zullen licht wegschermen en daarmee mogelijk de fotosynthesecapaciteit van een blad onder limiterende lichtcondities (lage intensiteiten) verlagen. Echter, bij zeer hoge lichtintensiteiten die lichtstress veroorzaken kunnen anthocyanen een deel van de fotonen wegvangen en zo fotoinhibitie tegengaan, wat er voor kan zorgen dat een blad met anthocyanen een hogere fotosynthesecapaciteit heeft onder dergelijke condities. Zo blijkt uit onderzoek dat de lichtverzadigingspunt van groene en rode bladeren van *Petunia* vergelijkbaar was bij lage lichtintensiteit (80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) maar 46% hoger in rode bladeren bij hoge lichtintensiteit (600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) (Albert *et al.*, 2009). Jonge rode bladeren van de hulsteik (*Quercus coccifera*) vertoonden minder fotoinhibitie dan jonge groene bladeren wanneer deze werden blootgesteld aan licht met een intensiteit van 1600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (Manetas *et al.*, 2003).

Wanneer anthocyanen zich ophopen in de diepere cellen van het blad, het palissade- of sponsparenchym, dan zal de hoeveelheid licht die de anthocyanen weg kunnen schermen afhangen van de positie ten opzichte van de fotosynthetisch actieve cellen. Wanneer de anthocyanen zich aan de onderzijde (abaxiale zijde) van het blad bevinden is het dus mogelijk dat de fotosynthese in bladeren met anthocyanen vergelijkbaar is met de fotosynthese in groene bladeren of zelfs hoger wanneer er sprake is van stress en de anthocyanen dienen als anti-oxidanten en zorgen voor het opruimen van schadelijke ROS.

Uit onderzoek blijkt het effect van ophoping van anthocyanen in het blad op de fotosynthese afhankelijk van het gewas (of het ras), het chlorofylgehalte, de locatie van de anthocyanen in het blad dat gemeten werd, de lichtkleur, en de mate van stress waaraan planten werden blootgesteld voor de fotosynthesemetingen werden uitgevoerd. Zo bleek uit onderzoek met *Begonia pavonina* en *Triolena hirsuta* dat de rode bladeren van deze planten (indicatie van hoog anthocyaangehalte) een **hogere fotosynthesecapaciteit** hadden dan groene bladeren, maar ook hogere concentraties chlorofyl (Gould *et al.* 1995). Dit werd ook gevonden in paprika voor paarse bladeren ten opzichte van groene bladeren (Bahler *et al.*, 1991). De fotosynthese in jonge paarse en groene bladeren van koffieplanten was **vergelijkbaar** (Júnior *et al.*, 2012). Hetzelfde was het geval in bladeren van perzik (*Prunus persica* L.) (Marini 1986). Rode en groene bladeren van siernetel (*Coleus blumei*) hadden een vergelijkbare fotosynthese onder rood en wit licht, maar **lagere** fotosynthese onder groen licht (Burger & Edwards 1996). Vergelijkbare resultaten werden gevonden in onderzoek met 9 verschillende siernetel cultivars (Boldt 2013). Uit onderzoek met roos bleek ook dat roodgroen jong blad (veroorzaakt door anthocyanen) ten opzichte van groen blad alleen een lagere kwantumefficiëntie van de bladfotosynthese vertoonde in het groene deel van het spectrum (Snel *et al.*, 2011). In onder andere vingergras (*Panicum virgatum*) en *Quercus serrata* (een Japanse eikensoort) bleek de fotosynthesecapaciteit van rood en paars blad bij verzadigende lichtintensiteiten lager dan van groen blad (Boldt 2013; Gould *et al.*, 2002).

2.4.1 Groen, rood (of geel) gewas: Anthocyaanvorming en chlorofylafbraak

Regelmatig treedt er in bladeren waarin anthocyanen ophopen ook bladvergeling op. Dit wordt onder andere veroorzaakt door de afbraak van chlorofyl en heeft dan ook direct een negatief effect op de fotosynthesecapaciteit van een gewas. Chlorofylafbraak kan plaatsvinden door natuurlijke veroudering van het blad maar wordt ook, net als anthocyaanvorming, getriggerd door verschillende soorten stress en kan bijdragen aan het verminderen van fotoinhibitie (Khanna-Chopra, 2012; als toegelicht in paragraaf 2.3.1). De vorming van anthocyanen kan gelijktijdig gebeuren met de afbraak van chlorofyl om de recycling van het chlorofyl beter te laten verlopen (zie paragraaf 2.3.1.1). Chlorofylafbraak kan echter ook plaatsvinden na ophoping van anthocyanen. Het kan zijn dat de plant in eerste instantie tijdens een lichte vorm van stress anthocyanen ophoopt, maar wanneer dit niet toereikend is om de plant te beschermen er toch oxidatieve stress optreedt door het vrijkomen van vrije zuurstofradicalen (ROS) die schade toebrengen aan structuren in de cel en zo uiteindelijk chlorofylafbraak en vergeling veroorzaakt (Herbstová *et al.*, 2012).

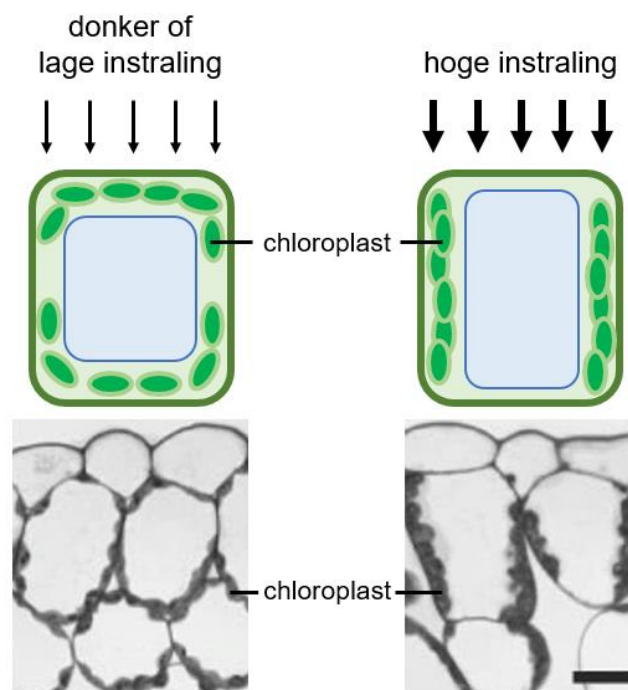
Hoewel anthocyaanvorming en chlorofylafbraak vaak samen voorkomen in een blad, blijkt uit onderzoek met *Arabidopsis* planten met een stikstoftekort dat deze processen genetisch niet aan elkaar gekoppeld zijn (Diaz *et al.*, 2006). Dat duidt erop dat de twee processen onafhankelijk van elkaar kunnen worden gereguleerd en dus ook los van elkaar kunnen plaatsvinden. Dat verklaart waarom anthocyaanvorming en bladvergeling niet altijd samen in een blad worden gezien.

Bladvergelting is niet alleen het gevolg van de afbraak van chlorofyl, maar ook door veranderingen in concentraties van andere bladpigmenten zoals andere typen flavonoïden of carotenoïden (Toscano *et al.*, 2018; Dhami & Cazzonelli, 2020; Yang *et al.*, 2023). Verder kan de verhouding tussen verschillende bladpigmenten ook van invloed zijn op de uiteindelijke (gele) bladkleur (Yang *et al.*, 2023).

2.4.2 Chloroplastbeweging

Beperkt verbleken van bladeren kan het gevolg zijn van chlorofylafbraak maar ook van het verplaatsen van chloroplasten in de cellen van bladeren. Dit is een tactiek van planten om fotoïnhibitie te verminderen bij lichtstress en blijvende schade aan het blad te voorkomen (Kasahara *et al.*, 2002; Maai *et al.*, 2020).

Figuur 2.3 geeft schematisch weer hoe hoge instraling effect heeft op de positie van de chloroplasten in de cel. Dit wordt ook wel de lichtontwikjingsreactie van chloroplasten genoemd. Uit onderzoek met *Sorghum* bleek een lagere fotosynthese bij lichtstress tijdens hoge instraling van natuurlijk zonlicht in de middag (1500-2000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) samen te gaan met verplaatsing van de chloroplasten (Maai *et al.*, 2020). De meest voor de hand liggende methode om erachter te komen of er sprake is van chloroplastbewegingen is bladmonsters nemen en met microscopie de positie van de chloroplasten in de cel te bepalen. Echter, er zijn ook andere methoden die gebruikt kunnen worden om dit fenomeen te bestuderen (meer details in Wada, 2013).

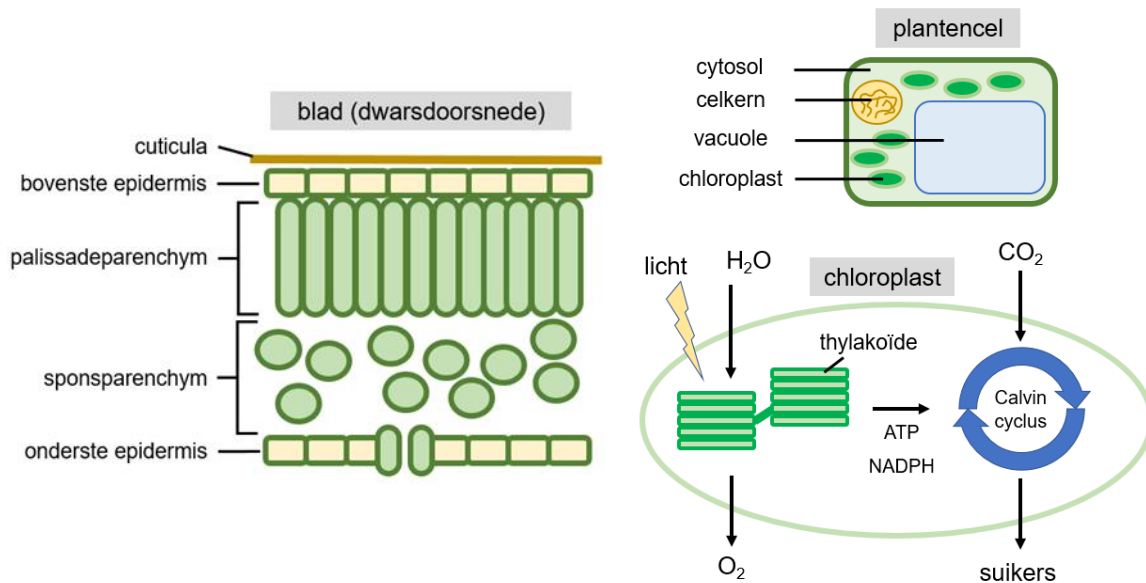


Figuur 2.3 Effect instraling op chloroplastpositie in cellen van bladeren. Boven: schematische weergave cel van een blad. Onder: microscopische foto van dwarsdoorsnede blad *Arabidopsis* (Kasahara *et al.*, 2002).

Kader 2: Fotosynthese – processen en locatie

Bladeren zijn opgebouwd uit verschillende lagen plantencellen. Anthocyanen bevinden zich in de **vacuoles** van plantencellen. Dit zijn met vocht gevulde blaasjes die een zeer groot deel van de ruimte innemen in een cel en gevuld zijn met water met daarin voedingsstoffen, afvalstoffen en secundaire metabolieten zoals anthocyanen. Dit komt in alle weefsellagen voor. De fotosynthese vindt plaats in de **chloroplasten** (bladgroenkorrels), die zich hoofdzakelijk bevinden in de cellen van het palissadeparenchym en het sponsparenchym. In de chloroplasten bevinden zich **thylakoïden**.

In de thylakoïden worden licht en water gebruikt voor de aanmaak van het energie dragende molecuul ATP en het co-enzym NADPH. Dit wordt ook wel de **lichtreactie** genoemd. Hierbij wordt zuurstof geproduceerd. Het licht wordt geabsorbeerd door het chlorofyl (groene pigment) in de fotosystemen II en I (niet afgebeeld in onderstaande figuren) die ingebouwd zitten in de membranen van de thylakoïden. De energie die de ATP levert wordt gebruikt voor het omzetten van CO₂ uit de lucht in suikers via de **Calvin cyclus**, ook wel donkerreactie genoemd. Het vastleggen van CO₂ uit de lucht in suikers via de Calvin cyclus wordt **koolstoffixatie** genoemd.



Kader 3: Anthocyanen in bloemen en vruchten

Anthocyanen zijn in veel gewassen (mede)verantwoordelijk voor de kleuren van bloemen (zoals chrysanten en rozen) en vruchten (zoals appels, aardbei en bramen). Daarmee spelen ze een belangrijke rol in het aantrekken van bestuivers en vruchteneters die helpen zaden te verspreiden. Daarnaast kunnen ze de weerbaarheid van vruchten tegen ziekteverwekkers verhogen (Lev-Yadun & Gould, 2008).

Anthocyanen worden verschillende gezondheidsvoordelen toegedicht, voornamelijk gebaseerd op het feit dat velen als anti-oxidant kunnen werken. Er zijn aanwijzingen dat ze een gunstig effect hebben op de gezondheid van het cardiovasculaire systeem en het zicht en op diabetes. Daarnaast zijn er aanwijzingen dat anthocyanen anti-allergene, anti-carcinogene, ontstekingsremmende, anti-microbiële, anti-mutagene en anti-virale eigenschappen hebben (Hannum 2004; Stintzing & Carle 2004; Ghosh & Konishi 2007; Neto *et al.* 2008; Basu *et al.* 2010; De Pascual-Teresa *et al.* 2010). Op basis hiervan wordt de consumptie van producten met hoge anthocyanen en het veredelen richting verhoogde anthocyaanproductie aangeraden (Wargovich *et al.* 2012). Anthocyanen komen in sommige vruchten alleen voor in de schil, maar in andere soorten in zowel de schil als het vruchtvlees.

3 Anthocyanen meten

In veel gevallen is anthocyaanvorming in het blad van een gewas goed zichtbaar met het oog. Eventueel kan er met behulp van een microscoop worden bekeken in welke cellagen van het blad de anthocyanen zich bevinden. Echter, voor beter begrip van het proces onder bepaalde teeltomstandigheden is het nodig om de hoeveelheid anthocyanen te kunnen meten en/of te achterhalen welke soorten anthocyanen er gevormd worden. Om dit te kunnen doen zijn er verschillende (non-)destructieve methoden ontwikkeld.

3.1 Non-destructief meten van anthocyanen in plantmateriaal

Beschikbare non-destructieve methoden voor het meten van anthocyanen zijn gebaseerd op het feit dat het absorptie spectrum van anthocyanen afwijkt van dat van andere plantpigmenten als chlorofyl en carotenoiden (zie bijvoorbeeld figuur 2.1). Hierdoor is het mogelijk om bijvoorbeeld met behulp van de Dualex Scientific+ polyfenol en chlorofyl meter (FORCE-A, Orsay Cedex, France) de hoeveelheid anthocyanen in een intact blad te meten. Dit 'hand-held' apparaat werkt met een optische sensor die op basis van de absorptie van licht door het blad de hoeveelheid anthocyanen bepaald. Echter, een nadeel van de Dualex is dat er een meting wordt gedaan aan een zeer klein oppervlak. Aangezien productie van anthocyanen in het blad soms zeer lokaal is kan een Dualex meting daarom een onjuist beeld geven van de totale anthocyaanproductie in een blad. Een mogelijk alternatief is gebruik te maken van een hyperspectrale camera waarmee een heel blad in beeld genomen kan worden. Bij deze methode wordt door middel van het bepalen van de reflectie van licht met specifieke golflengtes door het blad de hoeveelheid anthocyaan berekend. Uit verschillende onderzoeken blijkt dat met deze techniek een goede schatting kan worden gemaakt van de hoeveelheid anthocyanen in een blad (zie bijvoorbeeld Gitelson *et al.*, 2001 en Matsuda *et al.*, 2012).

Het grote voordeel van het gebruik van bovenstaande non-destructieve methoden voor het meten van anthocyanen in het blad is uiteraard dat het gewas niet beschadigd hoeft te worden en er minimale invloed is op de teelt. Daarbij moet overigens wel worden vermeld dat metingen met hyperspectrale camera's doorgaans worden gedaan aan verwijderde losse bladeren, opdat de beelden in een donkere ruimte gemaakt kunnen worden. Een ander voordeel is dat deze metingen relatief snel en in veel gevallen makkelijker uit te voeren zijn vergeleken met sommige bepalingen in het lab (zie volgende paragraaf). Nadelen zijn echter dat deze metingen een minder nauwkeurig beeld geven van de hoeveelheid anthocyanen in een blad en dat het op dit moment niet mogelijk is om optisch te bepalen welke anthocyanen precies aanwezig zijn in het blad. Daarnaast kunnen veranderingen in bladstructuur of interne veranderingen (zoals de pH in de vacuole), bijvoorbeeld onder invloed van teeltcondities zorgen voor veranderingen in de reflecterende eigenschappen van het blad waardoor die de metingen kunnen verstoren.

3.2 Destructief meten van anthocyanen in plantmateriaal

Voor het destructief meten moeten anthocyanen eerst uit het plantmateriaal worden geïsoleerd, gescheiden van andere stoffen en vervolgens worden gemeten. Hierbij kunnen kwantitatieve methoden worden gebruikt om de hoeveelheid anthocyanen in plantmateriaal te meten of kwalitatieve methoden om te bepalen welke anthocyanen precies in het materiaal aanwezig zijn. In het review artikel van Teng *et al.* (2020) wordt een uitgebreid overzicht gegeven van welke methoden er zijn voor de extractie en scheiding van anthocyanen en het uitvoeren van kwantitatieve en kwalitatieve metingen. Doorgaans worden anthocyanen geïsoleerd doormiddel van 'solvent extraction' waarbij het plantmateriaal in een oplosmiddel wordt geïncubeerd. Als oplosmiddel (extractiebuffer) kan bijvoorbeeld een mengsel van aceton en water worden gebruikt (Manninen *et al.*, 2020). Vervolgens moeten de anthocyanen worden gescheiden van de rest van het plantmateriaal. Hoe secuur dit moet gebeuren, en dus met welke techniek, hangt af van de analyses die er vervolgens aan worden gedaan. Door centrifugeren of met behulp van filterpapier kunnen anthocyanen worden gescheiden van de rest van het plantmateriaal om vervolgens met een fotospectrometer de absorptie van de gefilterde vloeistof bij 530 nm te bepalen (Xu *et al.*, 2014; Manninen *et al.*, 2020). Met behulp van de absorptie kan vervolgens de concentratie anthocyanen in het plantmateriaal worden berekend (zie Shin *et al.*, 2007 en Manninen *et al.*, 2020). Om te bepalen welke anthocyanen zich precies in het plantmateriaal bevinden kunnen technieken zoals High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC–MS) worden gebruikt (Teng *et al.*, 2020).

Bestuderen regulatie anthocyaanproductie

Om meer inzicht te krijgen in de onderliggende mechanismen voor de regulatie van anthocyaanproductie, bijvoorbeeld onder een bepaald lichtspectrum, kan men ook de activiteit van genen of eiwitten bestuderen die betrokken zijn bij de anthocyaanproductie (zie paragraaf 2.2). Dit is bijvoorbeeld gedaan in proeven binnen het Kas als Energiebron project "Komkommer integraal naar een optimaal licht-spectrum" (2020-2023). Uit deze proeven bleek een effect van lichtspectrum op expressie van het gen *HY5*, een belangrijke regulator van anthocyaanvorming (zie paragraaf 4.1.2.2). Hogere *HY5* expressie bleek samen te gaan met een verhoogde concentratie flavonoiden in het blad. Het meten van genexpressie of eiwitten kan op dit moment alleen nog destructief omdat het mRNA (product van genactiviteit) of eiwit eerst dient te worden geïsoleerd uit het plantmateriaal. In het review artikel van Naing en Kim (2018) staat voor verschillende grote tuinbouwgewassen informatie over de genen en regeleiwitten die betrokken zijn bij anthocyaanproductie in deze specifieke gewassen en hoe de activiteit hiervan kan worden onderzocht (Naing & Kim, 2018).

4 Regulatie van anthocyaanvorming in het blad door omgevingsfactoren

Om inzicht te krijgen in het fenomeen anthocyaanvorming in blad bij het telen onder LED belichting is het van belang te begrijpen hoe omgevingsfactoren, met name die veranderen door de toepassing van LED belichting, anthocyaanvorming kunnen beïnvloeden.

Van veel omgevingsfactoren zoals licht en temperatuur is bekend dat ze de productie van anthocyanen in blad beïnvloeden. Dat kan soms direct, zoals in het geval van temperatuur, deze heeft invloed op activiteit van enzymen betrokken bij de aanmaak of afbraak van anthocyanen. In de meeste gevallen zullen deze factoren echter indirect de activiteit van anthocyaan biosynthese (AB) genen remmen of stimuleren door interne factoren als hormonen, regeleiwitten of de hoeveelheid suikers in het blad te beïnvloeden.

4.1 Licht: een voorwaarde voor anthocyaanvorming in het blad

Anthocyaanvorming in het blad vindt alleen plaats in het licht. In het donker worden de AB genen niet geactiveerd omdat het MBW complex wat hiervoor moet zorgen dan wordt onderdrukt (LaFountain & Yuan, 2021; paragraaf 2.2). Hoewel licht nodig is voor de vorming van anthocyanen in het blad hangt de mate waarin anthocyanen worden gevormd af van de intensiteit, de lichtkleur en mogelijk de daglengte. Het effect van lichtkleur is met name van belang wanneer we kijken naar mogelijke oorzaken van anthocyaanvorming bij het telen onder LED belichting, aangezien het spectrum van LED lampen waaronder wordt geteeld in de glastuinbouw vaak zeer sterk afwijkt van dat van zonlicht of SON-T lampen.

4.1.1 Lichtintensiteit

Toename in lichtintensiteit zorgt voor anthocyaan ophoping in het blad, met name in mesofylcellen in de adaxiale zijde (bovenkant) van het blad. Zo bleek uit onderzoek met *Arabidopsis*, waarbij 20 dagen oude plantjes bij 22°C onder 50, 200 of 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ wit LED licht werden gekweekt, dat de bladeren van de plantjes meer anthocyanen bevatten bij een hogere lichtintensiteit (Shi *et al.*, 2010). In rode sla (*Lactuca sativa* L. var. Capitata), een soort die zeer snel en veel anthocyanen aanmaakt, werden er geen anthocyanen aangemaakt wanneer geteeld werd onder 40 micromol wit LED licht, maar wel onder 100 micromol bij dezelfde temperatuur van 20°C/22°C (Zhang *et al.*, 2018). Uit verschillende onderzoeken blijkt dat een toename in lichtintensiteit zorgt voor een toename in activiteit van AB genen en ze zorgen voor een toename van anthocyanen in het blad (zie bijvoorbeeld Lightbourn *et al.*, 2007 en Gong *et al.*, 1997). Echter, binnen welke range een toename in lichtintensiteit zorgt voor (meer) anthocyaanvorming in het blad hangt onder andere af van het gewas (de cultivar) en het lightspectrum.

4.1.2 Lightspectrum

Van UV licht (UVA 320-400nm en UVB 290-320nm), blauw (400-480nm), en verrood (710-760nm) is bekend dat ze betrokken zijn bij de aansturing van anthocyaanproductie door licht (Mancinelli, 1983). De effecten van groen (480-600nm) en rood licht (600-690nm) zijn minder duidelijk.

4.1.2.1 UV

UVB en UVA licht stimuleren anthocyaanvorming in het blad van de meeste planten (Steyn *et al.*, 2002; figuur 4.2A), hoewel er ook uitzonderingen zijn te vinden in de literatuur. Uit onderzoek in *Arabidopsis* blijkt dat UVB licht zorgt voor de activatie van verschillende anthocyaan biosynthese (AB) genen (Kubasek *et al.* 1992). In sla zorgt toevoeging van UVB aan wit licht ook voor accumulatie van anthocyanen in het blad en verhoogde activiteit van AB genen (Park *et al.*, 2007). Een verlaging van anthocyaangehaltes in sla kan juist worden bereikt door UVB straling weg te filteren (Tsormpatsides *et al.*, 2008). Andere voorbeelden van gewassen waarvan is aangetoond dat een toename in UVB zorgt voor meer anthocyanen in blad zijn rijst, erwten, tomaat, tarwe en mais (Brandt *et al.*, 1995; Alexieva *et al.*, 2001; Maekawa *et al.*, 2001; Pintér *et al.*, 2007). Uit onderzoek met sla bleek dat toevoeging van UVA aan wit LED licht ook zorgt voor een toename in anthocyaangehalte in het blad (zie tabel 4.1; Li & Kubota, 2009).

Tabel 4.1 Effect van lichtspectra op anthocyaanvorming in het blad van sla (*Lactuca sativa* L. cv. Red Cross).

Spectrum	UVA (350– 400 nm)	Blauw (400– 500 nm)	Groen (500– 600 nm)	Rood (600– 700 nm)	Verrood (700– 800 nm)	PAR (400– 700 nm)	Anthocyaangehalte experiment 1 (mg/g droge stof)	Anthocyaangehalte experiment 2 (mg/g droge stof)
Wit							3,31 b	3,20 b
μmol/m ² /s	4,6	70,5	159,1	75,9	6,6	305,4		
% van PAR		23,2%	52,3%	24,5%		100,0%		
Wit +UVA							3,68 a	
μmol/m ² /s	20,9	70,3	157,5	76,8	6,7	304,6		
% van PAR		23,1%	51,9%	24,9%		100,0%		
Wit Blauw								4,18 a
μmol/m ² /s	2,5	166,9	95,2	41,5	4,1	303,5		
% van PAR		55,1%	31,4%	13,5%		100,0%		
Wit Groen								2,95 b
μmol/m ² /s	2,1	48,6	211,1	41,5	3,9	301,1		
% van PAR		16,3%	70,1%	13,6%		100,0%		
Wit Rood							3,47 ab	
μmol/m ² /s	2,2	38,5	89,5	177,2	4,6	305,2		
% van PAR		12,6%	29,5%	57,9%		100,0%		
Wit +Verrood							1,97 c	
μmol/m ² /s	4,4	69,5	156,5	79,7	160,4	305,7		
% van PAR		22,8%	51,4%	25,8%		100,0%		

Verschillende letters=statistisch significant verschil in anthocyaangehalte. Data afkomstig uit (Li & Kubota, 2009).

4.1.2.2 blauw

Net als UV licht stimuleert blauw licht in de meeste gevallen de aanmaak van anthocyanen in bladeren (figuur 4.2A). Zo zorgt zowel 6 als 60 μmol/m²/s blauw licht voor een toename in anthocyanen in *Arabidopsis* zaailingen die in het donker opgekweekt zijn (Chen *et al.*, 2006) en stimuleert blauw licht met een intensiteit van 200 μmol/m²/s de aanmaak van anthocyanen in blad van tomaat bij 25°C (Liu *et al.*, 2018). Het verhogen van het aandeel blauw licht, ten koste van groen en rood, in het lichtspectrum zorgt ook voor een toename van anthocyanen zoals blijkt uit onderzoek met sla (zie tabel 4.1; Li & Kubota, 2009). De Keyser *et al.* (2019) hebben in een onderzoek naar anthocyaanvorming in verschillende soorten potplanten gekeken naar het effect van lichtspectra met verschillende verhoudingen rood en blauw licht (De Keyser *et al.*, 2019). In de soort *Guzmania lingulata* 'Theresa' bleek 20% blauw toevoegen aan het spectrum, ten koste van rood licht, te zorgen voor een sterke toename van anthocyanen in het blad vergeleken met uitsluitend rood licht. Echter, het aandeel blauw verder verhogen ten koste van rood had geen effect. In de soort *Cryptanthus carnosus* 'Tricolor' resulteerde een aandeel van 14% blauw licht al in een sterke toename van anthocyanen in het blad ten opzichte van uitsluitend rood licht. Verassend genoeg had het toevoegen van blauw licht aan rood LED licht nauwelijks effect op de anthocyaanvorming in de soort *Hypoestes phyllostachya* (cultivars 'decor pink' en 'decor red'). Dat blauw licht net als UV licht anthocyaanvorming stimuleert in de meeste gevallen komt doordat beide lichtkleuren het regeleiwit HY5 kunnen stimuleren, wat op zijn beurt de activiteit van AB genen stimuleert en daarmee de aanmaak van anthocyanen. Van de UV- en blauw-lichtreceptor cryptochroom 1 is bekend dat deze een cruciale rol speelt in dit mechanisme in *Arabidopsis* en tomaat (Chen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2018).

4.1.2.3 groen

Vaak is het effect van groen licht (500-565nm) op plantprocessen tegenovergesteld aan dat van blauw licht (Zhang & Folta, 2012). Dit kan ook het geval zijn voor anthocyaanvorming in blad. Zo blijkt uit onderzoek met *Arabidopsis* en sla dat het toevoegen van groen licht aan blauw en/of rood licht leidt tot minder anthocyaanvorming in bladeren (Zhang & Folta, 2012). Echter, de effecten van groen licht zijn niet altijd even sterk. Uit ander onderzoek met sla bleek het verhogen van het aandeel groen licht ten koste van blauw en rood geen significant effect te hebben op anthocyaanvorming in sla (zie tabel 4.1; Li & Kubota, 2009). In een onderzoek waarin groen, blauw en verrood licht werden gecombineerd in de kiemfase van microgreens had het toevoegen van 1 tot 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ groen licht (piek op 525nm) aan 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ verrood of 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ blauw licht nauwelijks effect op anthocyaanvorming in zaailingen van Russische bladkool (*Brassica napus pabularia*), broccoli en biet (Carvalho & Folta, 2016). Wanneer dezelfde hoeveelheden groen licht werden toegevoegd aan zeer lage intensiteiten verrood of blauw licht (1 en 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, respectievelijk) zorgde dit echter wel voor hogere gehalten van anthocyanen in het blad. Het lijkt er dus op dat groen licht blauw-of rood licht-geïnduceerde anthocyaanvorming kan tegengaan, maar dat het zelf ook anthocyaanvorming kan stimuleren (figuur 4.2B). Groen licht is hierin wel veel minder effectief dan UV en blauw licht. Een mogelijke verklaring voor de zeer beperkte invloed van groen licht op anthocyaanvorming in blad is dat groen licht in veel mindere mate wordt opgenomen door de plant dan bijvoorbeeld UV en blauw licht. Daarom zal een toename in groen licht ook minder snel leiden tot het optreden van fotoinhibitie.

4.1.2.4 rood

Er blijkt uit de beschikbare literatuur geen duidelijk effect van rood licht op anthocyaanvorming. Wel kan anthocyaanvorming getriggerd worden door uitsluitend rood licht te geven aan een plant, zoals blijkt uit onderzoek met mais en sorghum (Shichijo *et al.* 1993; Singh *et al.*, 1999). Echter, het aandeel rood licht verhogen ten koste van groen en blauw had geen effect op anthocyaanvorming in sla (zie tabel 4.1; Li & Kubota, 2009). Daarnaast blijkt uit het eerder aangehaalde onderzoek van De Keyser *et al.* (2019) met verschillende soorten potplanten dat telen onder uitsluitend rood licht in de meeste gevallen resulteerde in minder anthocyaanvorming dan wanneer er werd geteeld onder een spectrum waarin een deel vervangen was door blauw licht (De Keyser *et al.*, 2019). Net als voor groen licht lijkt het erop dat ook rood licht anthocyaanvorming kan stimuleren, maar veel minder sterk dan UV en blauw licht (figuur 4.2B).

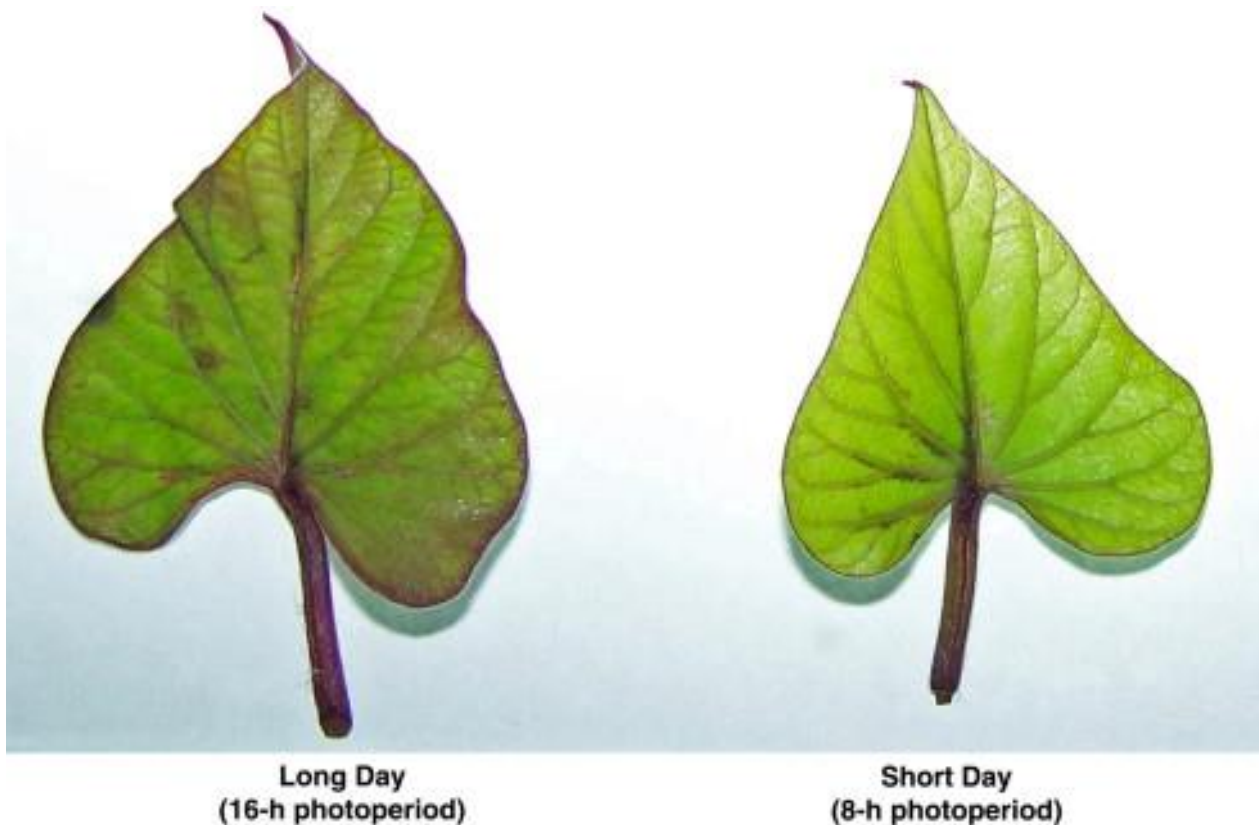
4.1.2.5 verrood

Verrood licht onderdrukt over het algemeen anthocyaanvorming. Zo zorgt het toevoegen van verrood licht voor een afname van anthocyanen in sla (zie tabel 4.1; Li & Kubota, 2009) en zorgde het toevoegen van 7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ verrood licht aan 42 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ rood licht voor een afname van anthocyanen in de potplant *Cryptanthus carnosus* 'Tricolor' (De Keyser *et al.*, 2019). De onderdrukking van anthocyaanvorming door verrood licht is het gevolg van de veranderende rood:verrood verhouding in het spectrum (figuur 4.2C). Dit zorgt er via diverse signaleringsroutes, waarbij ook de fytochroom fotoreceptoren zijn betrokken, uiteindelijk voor dat de aanmaak van de plantenhormonen gibberellinezuur (GA) en auxine worden gestimuleerd, welke anthocyaanvorming kunnen onderdrukken (van Hoogdale *et al.*, 2021; LaFountain & Yuan, 2021). Opvallend is dat wanneer alleen verrood licht wordt gegeven, toenemende intensiteiten (tussen 0 en 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) zorgen voor toenemende anthocyaangehalten in zaailingen van Russische bladkool (*Brassica napus pabularia*), broccoli en biet (Carvalho & Folta, 2016; figuur 4.2B). Het lijkt er dus op dat een toename van anthocyanen door het verhogen van het aandeel verrood licht in het spectrum veroorzaakt wordt door de resulterende verandering in de verhouding rood:verrood, en niet door de toename in verrood licht op zichzelf.

4.1.3 Daglengte?

Een toename in daglengte zorgt veelal voor hogere anthocyaangehaltes in planten (Yang *et al.*, 2018). Zo bleek uit onderzoek bijvoorbeeld dat zaailingen van de draaiden (*Pinus contorta*) meer anthocyanen bevatten wanneer deze groeiden in gebieden met lange natuurlijke daglengtes dan in gebieden waar de dagen korter zijn (Camm *et al.*, 1993). Uit onderzoek met jonge zoete aardappel planten (*Ipomoea batatas* L. Lam) bleek dat na 30 dagen telen onder korte (8 uur) of lange dagen (16 uur) de anthocyaangehaltes in het blad van de planten die onder lange daglengtes waren geteeld veel hoger waren. Dit was ook duidelijk zichtbaar aan de paarsverkleuring van het blad (zie figuur 4.1) (Carvalho *et al.*, 2010). Tijdens dit experiment werd er in beide behandelingen belicht met 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR licht en er werd een constante temperatuur aangehouden van 22°C. De vraag is of het daadwerkelijk de daglengte (of nachtlengte) is die anthocyaanvorming beïnvloed, of dat de daglichtsom (Daily Light Integral; DLI) met name van belang is. In de publicaties die hierboven geciteerd zijn ging de toename in daglengte altijd samen met een hogere DLI. Een hogere DLI heeft dus een duidelijk effect te hebben op anthocyaanvorming (figuur 4.2D). Of dat ook geldt voor daglengte is niet met zekerheid te zeggen.

Mogelijk zijn hogere anthocyaangehaltes in het blad onder lange-dag condities het gevolg van hogere concentraties van oplosbare suikers in het blad, met name sucrose. Uit onderzoek blijkt dat in veel gewassen, waaronder komkommer, tomaat en paprika, langere daglengtes (bij gelijke lichtintensiteit) leiden tot hogere concentraties suikers in het blad (Robbins & Pharr, 1987; Dorais *et al.*, 1996) en van met name sucrose is bekend dat het de aanmaak van anthocyanen in het blad kan stimuleren (zie paragraaf 4.6).



Figuur 4.1 Effect van daglengte (16 versus 8 uur) op anthocyaanvorming in het blad van zoete aardappel. (Bron: Carvalho *et al.*, 2010)

4.2 Temperatuur

Door de lage afgifte van stralingswarmte door LED lampen zal de planttemperatuur bij het telen onder LEDs lager liggen dan wanneer er onder eenzelfde intensiteit SON-T belichting en/of zonlicht wordt geteeld (van Hoogdalem *et al.*, 2022). Ophoping van anthocyanen in planten wordt gestimuleerd bij lagere (plant)temperaturen (Boldt *et al.*, 2014). Echter, hoe en in welke mate is afhankelijk van het gewas, de cultivar, het ontwikkelingsstadium en of het om de dag- of nachttemperatuur gaat.

Uit onderzoek met *Arabidopsis* zaailingen onder continu 65 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ wit licht blijkt dat zaailingen bij 10°C meer dan 10 maal hogere anthocyaangehaltes bevatten dan bij 23°C (Zhang *et al.*, 2011). Dit gaat samen met verhoogde activiteit van verschillende AB genen bij lage temperaturen (Zhang *et al.*, 2011). In mais is ook aangetoond dat lage temperaturen (10-15°C) de activiteit van AB genen stimuleren (Christie *et al.*, 1994). Echter, omdat bij lagere temperaturen de enzymen voor de aanmaak van anthocyanen minder actief worden bleek uit dit onderzoek ook dat bij 5°C anthocyaanvorming in mais volledig wordt onderdrukt. In sorghum graan werd dit al gezien bij 8°C en werd de maximale ophoping van anthocyanen gezien bij 16-20°C (Shichijo *et al.* 1993). Het is dus niet altijd zo dat hoe lager de temperatuur, des te meer anthocyanen zich ophopen in het blad. Er is een bepaalde optimale temperatuur-range waarbij maximale ophoping van anthocyanen in het blad plaatsvindt (figuur 4.2E).

Hogere temperaturen onderdrukken de vorming van anthocyanen in het blad. Zo werden er in bladeren van zoete aardappel (*Ipomoea batatas*) veel minder anthocyanen aangetroffen bij 30°C dan bij 20°C en werd er in mais tot 35 maal zoveel anthocyanen in blad aangetroffen bij 18°C dan bij 23°C (Islam *et al.*, 2005; Pietrini & Massacci 1998). Dus een temperatuurverschil van 5°C kan al een groot effect hebben op de ophoping van anthocyanen in blad.

Zoals eerder aangegeven is temperatuur bepalend voor anthocyaanvorming in bladeren omdat het de activiteit van enzymen die anthocyanen aanmaken kan beïnvloeden, maar ook door de AB genen te activeren of juist te onderdrukken. Het activeren van AB genen door lage temperaturen en het onderdrukken van AB genen door hoge temperaturen verloopt voornamelijk via de groeihormonen auxine en gibberellinezuur (GA) (LaFountain & Yuan, 2021). De productie en activiteit van deze hormonen wordt gestimuleerd bij hogere temperaturen en zorgen er via verschillende mechanismen voor dat AB genen niet kunnen worden geactiveerd. Bij lagere temperaturen zal de productie en activiteit van auxine en GA afnemen waardoor AB genen kunnen worden geactiveerd en er anthocyaanproductie kan plaatsvinden.

Anthocyaanvorming in het blad kan alleen plaatsvinden in het licht. Daarom is het hoofdzakelijk de dagtemperatuur die van invloed zal zijn op anthocyaanvorming. Zo blijkt uit onderzoek waarbij gekeken is naar de effecten van verschillende dag-/nachttemperatuur combinaties op anthocyaanvorming in blad van *Tagetes patula* L. dat een dagtemperatuur van 10°C zorgt voor de hoogste anthocyaangehaltes (Armitage & Carlson 1981). Echter, de nachttemperatuur kan ook invloed hebben op anthocyaanvorming. Dit is vooral als de nachttemperatuur richting de 30°C gaat (Armitage & Carlson 1981; Mori *et al.*, 2005). Dergelijke hoge nachttemperaturen onderdrukken de aanmaak van anthocyanen in sommige gevallen. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat deze temperaturen de donkerademhaling, en daarmee het verbruik van assimilaten gedurende de nacht stimuleren. Dit kan vervolgens resulteren in lagere suikergehaltes in het blad in de ochtend. Aangezien suikers anthocyaanvorming stimuleren kunnen de lagere suikergehaltes als gevolg van hogere nachttemperaturen zorgen voor minder anthocyaanvorming. Omgekeerd zouden lagere nachttemperaturen leiden tot minder gebruik van assimilaten voor de donkerademhaling, waardoor er meer suikers overblijven aan het einde van de nacht, wat anthocyaanvorming zou kunnen stimuleren.

De invloed van temperatuur op anthocyaanvorming is in sommige gevallen ook afhankelijk van de leeftijd van het blad. Zo werd er alleen ophoping van anthocyanen waargenomen in jonge bladeren van *Cotinus coggygria* (pruikenboom) maar niet in volwassen bladeren wanneer men de temperatuur verlaagde van 29/21°C naar 17/9°C (dag-/nachttemperatuur) (Oren-Shamir & Levi-Nissim 1997). In *Arabidopsis* is ook aangetoond dat de ontwikkelingsfase waarin een plant zich bevindt van invloed kan zijn op de temperatuurregulatie van anthocyaanvorming in blad. Zo lieten Hasdai *et al.* (2006) zien dat de *Arabidopsis* ecotypen die zij bestudeerden geen anthocyanen ophoopten in blad bij 6 of 14°C tijdens de vegetatieve fase, terwijl dit wel het geval was bij een aantal ecotypen wanneer de planten zich in de reproductieve (bloei) fase bevonden (Hasdai *et al.* 2006).

4.3 CO₂

De meeste onderzoeken die gepubliceerd zijn over de effect van CO₂ concentraties op anthocyaanvorming richten zich op anthocyaanvorming in fruit. Zo kan telen bij hogere CO₂ concentraties zorgen voor hogere anthocyaangehaltes in aardbeien en druiven (Balasooriya *et al.*, 2019). Echter, hogere concentraties CO₂ tijdens de opslag van geoogste aardbeien zorgt ervoor dat anthocyaan biosynthese (AB) genen in de vruchten worden onderdrukt, resulterend in lagere anthocyaangehaltes (Li *et al.*, 2019).

Onderzoeken onder gecontroleerde condities in klimaatcellen met sla laten een effect zien van CO₂ op anthocyanen in bladeren. Vaak worden er hogere anthocyaangehaltes aangetroffen in het blad wanneer geteeld wordt bij hogere CO₂ concentraties (figuur 4.2F). Dit hangt wel af van de lichtcondities en de cultivars. In een onderzoek van Park *et al.* (2012) werd sla geteeld in klimaatcellen bij een daglengte van 12 uur, lichtintensiteit van 140 ±20 µmol/m²/s en een constante temperatuur van 21 ±2°C (Park *et al.*, 2012). Het licht was afkomstig van fluorescentielampen, witte LEDs of een combinatie van rode, blauwe en witte LEDs (verhouding 8:1:1) en er werd geteeld bij drie verschillende CO₂ concentraties: 350, 700 of 1000 ppm. Uit de experimenten bleek dat een hogere CO₂ concentratie leidde tot een iets hoger anthocyaangehalte. Echter, dit was niet het geval onder wit LED licht (Park *et al.*, 2012). Ook uit onderzoek van Becker & Kläring (2016) bleek een hogere concentratie CO₂ (200 versus 1000 ppm) anthocyaanvorming in het blad van sla te stimuleren (Becker & Kläring, 2016). Hoe sterk dit effect was verschilde per cultivar. Dit onderzoek werd ook uitgevoerd in klimaatcellen, maar in dit geval werd er gedurende 13 uur per dag belicht met 260 µmol/m²/s afkomstig van halogeenvlampen en gloeilampen. De hogere anthocyaangehaltes in sla geteeld bij hogere CO₂ concentraties is mogelijk het gevolg van hogere suikersconcentraties in het blad die werden waargenomen, aangezien suikers in het blad anthocyaanvorming kunnen stimuleren (Park *et al.*, 2012; Becker & Kläring, 2016).

4.4 Water en nutriënten

Een tekort aan voedingstoffen, met name van fosfaat (P) en stikstof (N), kan de productie van anthocyanen in het blad stimuleren (figuur 4.2G). Een lage concentratie, of tekort, aan fosfaat zorgt in veel plantensoorten voor ophoping van anthocyanen. Soorten waarbij het aanbieden van lage concentraties P duidelijk effect heeft op anthocyaanvorming zijn vaak planten die normaal gesproken nauwelijks anthocyanen produceren zoals *Arabidopsis* en tomaat. In *Arabidopsis* bijvoorbeeld zorgde verlaging van de fosfaatgift met 95% (van 10 naar 0.5 mM KH₂PO₄) voor steeds hogere gehalten aan anthocyanen in het blad naarmate de proef voortduurde (Peng *et al.*, 2008). Deze toename ging samen met verhoogde activiteit van anthocyaan biosynthese (AB) genen. Een verlaging in de fosfaatgift van 25 of 35% (van 1 naar 0.75 of 0.65 mM KH₂PO₄) zorgde in tomaat ook voor een toename van anthocyanen in bladeren en stengels (Khavari-Nejad *et al.*, 2009). De toename van anthocyanen in het blad was sterker bij de verlaging met 35% dan met 25%.

Anthocyaanvorming als gevolg van een tekort aan fosfaat begint meestal in de oudere bladeren. Dit komt omdat P een mobiel element is en daardoor de symptomen van een P tekort (zoals anthocyaanvorming) het eerst te zien zijn in de oudere bladeren. Naarmate het tekort erger wordt, of langer aanhoudt, komt het steeds meer tot uiting in jongere plantdelen (Boldt *et al.*, 2014).

In sommige plantensoorten met constitutief hoge concentraties anthocyanen heeft de hoeveelheid P nauwelijks effect op anthocyaanvorming. Voorbeelden hiervan zijn rode kool (Piccaglia *et al.* 2002). Echter, zelfs zaailingen van deze soort gaan meer anthocyanen vormen als er helemaal geen P wordt gegeven (Yuan *et al.*, 2009). Anthocyaanvorming in *Solenostemon scutellarioides* (siernetel; ook een soort met constitutief hoge concentraties anthocyanen) bleek niet gerelateerd aan de hoeveelheid P in het blad of de hoeveelheid aangeboden P (Henry *et al.*, 2012; Boldt, 2013).

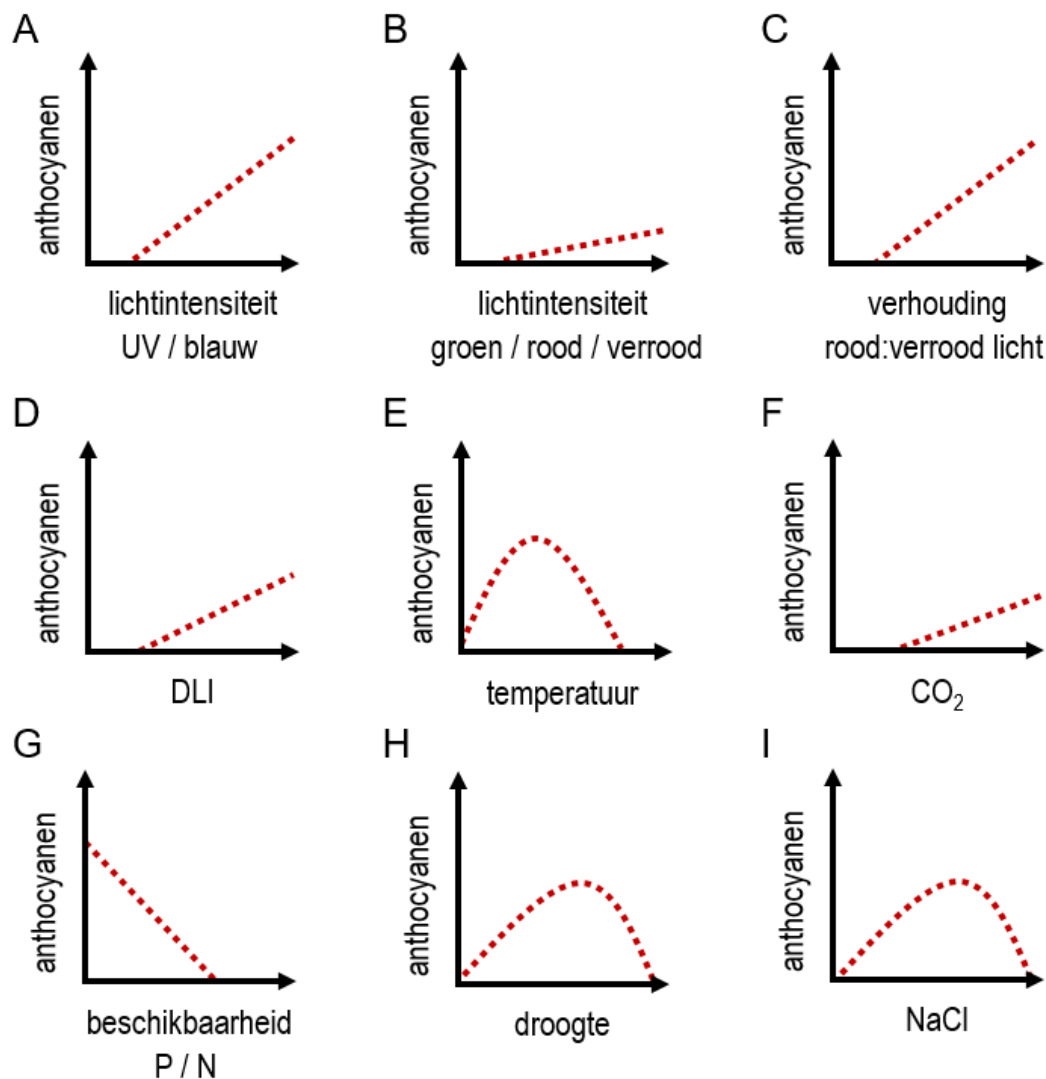
Net als een tekort aan fosfaat kan ook een tekort aan stikstof (N) zorgen voor anthocyaanvorming in bladeren van *Arabidopsis* en tomaat. In de eerder aangehaalde onderzoeken naar de effecten van P op deze soorten is ook gekeken naar effecten van het verlagen van de hoeveelheid stikstof op anthocyaanvorming. In *Arabidopsis* zorgde een verlaging van stikstof in het groeimedium met 70% (van 10 naar 3 mM KH_2PO_4) voor toenemende gehalten anthocyanen in het blad naarmate de proef voortduurde (Peng *et al.*, 2008). Ook het verlagen van de stikstofgift zorgde voor verhoogde activiteit van anthocyaan biosynthese genen. Echter, uit dit onderzoek bleek wel dat dit (deels) via een ander mechanisme plaatsvindt dan bij een P tekort (Peng *et al.*, 2008). In tomaat zorgde het geven van 25 of 35% minder stikstof in het groeimedium (3.75 of 3.25 in plaats van 5 mM KNO_3) ook voor meer anthocyaanvorming in bladeren en stengels (Khavari-Nejad *et al.*, 2009). Echter, verlagen van de fosfaatgift met dezelfde percentages had een sterker effect.

Droogte en zoutstress

Anthocyaanvorming in bladeren wordt vaak gestimuleerd bij stress door droogte of hoge zoutgehalten in het groeimedium (Naing & Kim, 2021). Echter, er zijn voorbeelden in de literatuur waaruit blijkt dat extreme droogte en zoutstress anthocyaanvorming uiteindelijk remt. Net als voor temperatuur zou men kunnen stellen dat er een optimaal niveau van droogte- of zoutstress is voor de maximale productie van anthocyanen (figuur 4.2H+I). In *Arabidopsis* werd aangetoond dat droogte zorgt voor een hoger gehalte van verschillende flavonoiden, waaronder een aantal anthocyanen, in het blad (Nakabayashi *et al.*, 2014). Ook in volgroeide bladeren van Maqui (*Aristotelia chilensis*) planten nam de hoeveelheid anthocyanen toe bij droogtestress (González-Villagra *et al.*, 2019). De droogtestress in dit laatste onderzoek werd geïnduceerd door de planten 20 dagen geen water te geven. Opvallend was dat de hoeveelheid anthocyanen in het blad afnam naarmate de droogtestress langer aanhield (González-Villagra *et al.*, 2019). In kelkbladeren van Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) nam de hoeveelheid anthocyanen sterk toe wanneer er beperkt werd geïrrigeerd (Hinojosa-Gómez *et al.*, 2020). Echter, wanneer er niet meer geïrrigeerd werd nam de hoeveelheid anthocyanen af, en bleek in sommige cultivars zelfs lager dan wanneer er normale irrigatie plaatsvond.

In veel planten is de reactie op droogtestress en zoutstress vergelijkbaar. Een hogere zoutconcentratie in het groeimedium van een plant kan net als droogte leiden tot hogere anthocyaangehaltes in het blad. Dit is bijvoorbeeld aangetoond in *Carthamus tinctorius* (Saffloer) planten (Dehghan *et al.*, 2014). De toename van anthocyaanvorming in het blad van deze plant door de verhoogde zoutconcentratie in het groeimedium komt waarschijnlijk door verhoogde activiteit van een aantal anthocyaan biosynthese (AB) genen. Ook in zaailingen van tomaat en rode kool is aangetoond dat toedienen van 50 of 100 mM NaCl aan het groeimedium zorgt voor hogere concentraties anthocyanen (Eryilmaz, 2006). Tegelijkertijd zorgde de hogere zoutconcentratie voor lagere concentraties chlorofyl (Eryilmaz, 2006). Wanneer Madeliefjes werden gekweekt in medium waaraan 15 of 25 Mm NaCl werd toegevoegd stimuleerde dit ook anthocyaanophoping in de bladeren. Echter, bij het toedienen van hogere concentraties NaCl daalde het anthocyaangehalte in het blad weer (Khavari-Nejad *et al.*, 2008).

De stimulatie van anthocyaanvorming als gevolg van droogte en zoutstress verloopt waarschijnlijk via het plantenhormoon abscisinezuur (ABA), die onder andere betrokken is bij de huidmondjes regulatie. De productie van dit hormoon wordt gestimuleerd door verschillende soorten omgevingsstress, waaronder droogte en zoutstress (van Hoogdalem *et al.*, 2021). Uit het eerder aangehaalde onderzoek naar de effecten van droogte op anthocyaangehaltes in Maqui (*Aristotelia chilensis*) planten bleek dat het blokkeren van de ABA productie ervoor zorgde dat de anthocyaanvorming werd onderdrukt onder droogte, terwijl dit normaal juist wordt gestimuleerd. Dit duidt er dus op dat ABA anthocyaanvorming in het blad stimuleert onder droogtestress. Over de onderliggende mechanismen is nog weinig bekend (LaFountain & Yuan, 2021).



Figuur 4.2 Effect van verschillende omgevingsfactoren op anthocyaanvorming. De grafieken geven een algemene indicatie van de effecten van UV/blauw licht (**A**), groen/rood/verrood licht (**B**), de verhouding rood:verrood licht (**C**), daglengte (**D**), temperatuur (**E**), CO₂ (**F**), beschikbaarheid fosfaat of stikstof (**G**), droogte (**H**) en zout (**I**) op anthocyaanvorming in het blad. De figuren zijn gebaseerd op informatie uit de literatuur die beschreven staat in de hoofdstuk 4 van dit rapport. Omdat de exacte effecten van de omgevingsfactoren op anthocyaanvorming sterk afhankelijk kunnen zijn van het gewas, het ras en de condities worden er geen waarden op de assen getoond.

4.5 Biotische factoren

In dit rapport ligt de focus voornamelijk op anthocyaanvorming in het blad onder invloed van abiotische factoren zoals licht en temperatuur. Echter, wanneer een plant wordt aangevallen door een insect kan dit ook anthocyaanvorming stimuleren (Wang *et al.*, 2019). Dit verloopt via het afweer hormoon jasmonzuur (JA), waarvan de productie wordt gestimuleerd door schade aan het blad die bijvoorbeeld ontstaat door vraat (van Hoogdalem *et al.*, 2021). Van dit hormoon is bekend dat dit de activiteit van anthocyaan biosynthese (AB) genen stimuleert en daarmee zorgt voor een toename van anthocyaanvorming in het blad wat de weerbaarheid van de plant kan verhogen (LaFountain & Yuan, 2021; zie paragraaf 2.3.3).

4.6 Interne factoren: hormonen, regeleiwitten en suikers

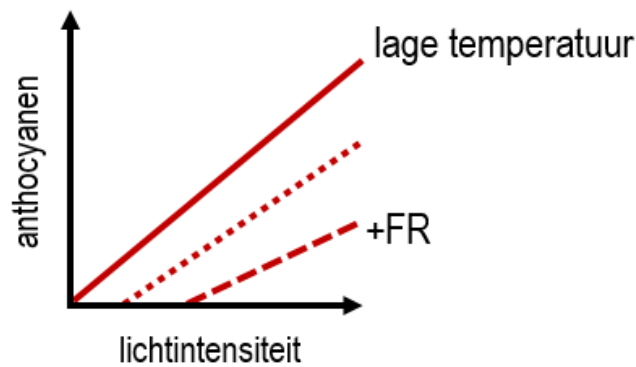
De regulatie van anthocyaanproductie (in bladeren) door omgevingsfactoren verloopt via mechanismen waarbij verschillende interne factoren een rol spelen. Verschillende voorbeelden van dergelijke factoren zijn in dit hoofdstuk aan bod gekomen zoals plantenhormonen, het regeleiwit HY5 en suikers. Omgevingsfactoren zoals het lichtspectrum en temperatuur hebben invloed op de productie van hormonen, de activiteit van een regeleiwit of de hoeveelheid suikers. Deze interne factoren hebben op hun beurt weer invloed op de activiteit van anthocyaan biosynthese (AB) genen doordat ze de activiteit van het MBW complex, wat deze genen activeert, kunnen beïnvloeden (LaFountain & Yuan, 2021). Indien het MBW complex niet wordt onderdrukt, kunnen de AB genen zorgen voor de aanmaak van AB enzymen die zorgen voor de anthocyaanproductie.

Een rol voor de biologische klok in anthocyaanvorming?

Van de interne factoren die een rol spelen in de regulatie van anthocyaanvorming is bekend dat deze beïnvloed worden door de biologische klok. Dat betekent bijvoorbeeld in het geval van hormonen dat de productie en de potentiële activiteit van de hormonen varieert over de dag en nacht. Ook van het regeleiwit HY5 is bekend dat deze gereguleerd wordt door de klok en dat deze voornamelijk aanwezig is in de ochtend (van Hoogdalem *et al.*, 2021). Dit heeft tot gevolg dat het effect van omgevingsfactoren op anthocyaanvorming ook afhankelijk kan zijn van het moment van de dag waarop bepaalde signalen worden waargenomen door de plant. Bijvoorbeeld: aangezien HY5 voornamelijk geproduceerd wordt in de ochtend is het goed mogelijk dat specifieke lichtkleuren als UV, blauw of verrood vooral tijdens de eerste uren van de dag invloed hebben op anthocyaanvorming. Dit zou betekenen dat anthocyaanvorming in het blad is te **'sturen' met een dynamisch lichtspectrum** waarbij de spectrale samenstelling van het licht anders is in de ochtend dan tijdens de rest van de dag. Dit is echter slechts een hypothese die nog niet getoetst is. Over de invloed van de biologische klok op de regulatie van anthocyaanvorming is op dit moment nog zeer weinig bekend.

4.7 Interactie tussen omgevingsfactoren en de invloed op anthocyaanvorming

Anthocyaanvorming wordt voornamelijk gereguleerd op het niveau van genexpressie: de activiteit van anthocyaan biosynthese (AB) genen is sterk bepalend voor de anthocyaanvorming. De verschillende omgevingsfactoren die in dit hoofdstuk naar voren zijn gekomen als factoren die anthocyaanvorming kunnen beïnvloeden doen dit uiteindelijk allemaal voornamelijk door de activiteit van het MBW complex te reguleren en zo de activiteit van AB genen te beïnvloeden. Doordat al deze factoren anthocyaanvorming reguleren via hetzelfde complex bestaat er een duidelijke interactie tussen de verschillende omgevingsfactoren en hun invloed op anthocyaanvorming. **Dit heeft tot gevolg dat het effect van de ene omgevingsfactor op anthocyaanvorming afhankelijk is van andere omgevingsfactoren.** Een voorbeeld om dit te illustreren wordt gegeven in figuur 4.3. Bij een toenemende lichtintensiteit zal de anthocyaanvorming in het blad toenemen. Als de temperatuur daarbij ook nog eens laag is (<15°C), dan zal de toename in lichtintensiteit een sterker effect hebben op de anthocyaanvorming omdat beide factoren (temperatuur en lichtintensiteit) de activiteit van het MBW complex stimuleren. Extra verrood licht (FR) toevoegen aan het lichtspectrum zal juist zorgen dat een toename in lichtintensiteit een minder sterk stimulerend effect zal hebben op de anthocyaanproductie aangezien dit een onderdrukkende werking zal hebben op het MBW complex. Een ander voorbeeld waaruit blijkt dat de invloed van de ene omgevingsfactor op anthocyaanvorming afhankelijk is van andere factoren is het onderzoek van Camm *et al.* (1993) waaruit bleek dat alleen bij lage temperaturen daglengte invloed had op anthocyaanvorming in zaailingen van de draaiden (*Pinus contorta*) (Camm *et al.*, 1993).



Figuur 4.3 Interactie tussen verschillende omgevingsfactoren en hun effect op anthocyaanvorming in het blad. Een toenemende lichtintensiteit zorgt voor toename van anthocyanen in het blad (stippellijn). Bij een lage temperatuur neemt de hoeveelheid anthocyanen sterker toe bij een toenemende lichtintensiteit (doorlopende lijn). Extra verrood licht zal ervoor zorgen dat anthocyanen juist minder sterk toenemen bij een toename in lichtintensiteit (onderbroken lijn).

4.8 Conclusies literatuurstudie

Uit dit hoofdstuk blijkt dat verschillende omgevingsfactoren invloed hebben op anthocyaanvorming in blad. In figuur 4.2 wordt hier een overzicht van gegeven. Hoewel de invloed van deze factoren afhankelijk is van het gewas, de cultivar, het ontwikkelingsstadium en de omgevingscondities kunnen we de volgende algemene conclusies trekken op basis van de beschikbare informatie in de literatuur:

- Het verhogen van de lichtintensiteit zorgt voor een toename van anthocyaanproductie in het blad.
- Dit geldt voor natuurlijk licht, en voor kunstlicht met name voor UV en blauw licht, maar in mindere mate ook voor groen, rood en verrood.
- Het verlagen van de rood:verrood verhouding (toevoegen van FR) zorgt voor een afname van anthocyaanproductie in het blad.
- De daglengte vergroten kan voor een toename van anthocyanen in het blad zorgen.
- Lagere temperaturen stimuleren de anthocyaanproductie in het blad.
- Maar hier zit wel een grens aan: bij te lage temperaturen wordt de anthocyaanproductie weer geremd.
- De CO₂ concentratie verhogen kan voor een toename van anthocyanen in het blad zorgen (maar minder in combinatie met wit licht).
- Stikstof- en fosfaattekort zorgen voor anthocyaanvorming in het blad.
- Droogte- en zoutstress stimuleren anthocyaanvorming in het blad.

Wanneer de stress te lang aanhoudt, of te extreem is, dan kan anthocyaanvorming juist geremd worden.

Algemeen wordt aangenomen dat anthocyanen in het blad de functie hebben om fotoinhibitie te voorkomen of te verlichten. Bij fotoinhibitie wordt er meer straling geabsorbeerd door de chloroplasten dan de plant kan verwerken via de fotosynthese wat schade aan cellen kan veroorzaken. Anthocyanen kunnen fotoinhibitie voorkomen of verlichten door als zonneschermen te fungeren en zo te voorkomen dat er teveel of schadelijke straling wordt opgevangen door de chloroplasten en/of door het opruimen van schadelijke vrije zuurstofradicalen (ROS) (zie paragraaf 2.3.1). Deze functie van anthocyanen vormt in veel gevallen een plausibele verklaring voor de invloed die omgevingsfactoren hebben op anthocyaanvorming in het blad. Over het algemeen zal er onder de bovengenoemde condities die anthocyaanvorming in het blad stimuleren namelijk een grotere kans zijn op fotoinhibitie. Zo zal een toename in lichtintensiteit de kans vergroten dat er teveel straling door chloroplasten wordt opgevangen. Dat met name UV en blauw licht effectief is in het stimuleren van anthocyaanvorming kan verklaard worden door de hogere energie inhoud van de fotonen met lagere golflengtes (zie tabel 2 van Dieleman *et al.*, 2020). Een tekort aan fosfaat (P), stikstof (N) of water en lagere temperaturen kunnen allemaal de stikstoffixatie beperken waardoor de kans op fotoinhibitie toeneemt.

Dat condities die resulteren in ophoping van suikers in het blad anthocyaanvorming stimuleren komt mogelijk omdat suikers een remmend effect kunnen hebben op de koolstoffixatie (feedback inhibitie) (Percival, 1996).

Dat er zoveel factoren van invloed zijn op anthocyaanvorming in blad biedt mogelijkheden voor een teler om anthocyaanvorming te sturen doormiddel van het aanpassen van bijvoorbeeld de belichting, het klimaat of voeding. Echter, bij het ongewenst optreden van anthocyaanvorming kan het door de complexe regulatie van dit proces ook lastig zijn om de juiste maatregel te nemen om het terug te dringen. Daarnaast is het mogelijk niet voldoende om slechts één teeltfactor aan te passen om anthocyaanvorming te voorkomen of verminderen, maar is het van belang naar de verhouding tussen verschillende factoren als licht en temperatuur te kijken. Daarnaast kan het sturen van anthocyaanvorming in een gewas een uitdaging vormen omdat de invloed van verschillende omgevingsfactoren op anthocyaanvorming kan verschillen tussen gewassen en cultivars. Hierdoor kan het bijvoorbeeld zijn dat in het ene gewas anthocyaanvorming wordt onderdrukt bij een lagere temperatuur dan in het andere gewas. Ook is het waarschijnlijk dat het effect van teeltfactoren op anthocyaanvorming afhankelijk is van het moment op de dag. Verder komt uit de literatuur naar voren dat het ontwikkelingsstadium van invloed kan zijn op het effect van omgevingsfactoren op anthocyaanvorming. Ditzelfde geldt mogelijk voor de plantbelasting, aangezien dit invloed kan hebben op hoeveel suikers vanuit het blad naar sink organen als bloemen of vruchten kunnen worden getransporteerd en daarmee op de suikergehaltes in het blad.

5 Anthocyaanvorming onder LED – een inventarisatie

Uit de informatie in de hoofdstukken 2,3 en 4 blijkt dat er veel onderzoek gedaan is naar anthocyaanvorming in planten en dat er dus een hoop bekend is over dit proces en de regulatie ervan. Echter, veel van de onderzoeken die gedaan zijn op dit gebied zijn gedaan met gewassen die niet direct van belang zijn voor de Nederlandse glastuinbouw. Daarbij zijn de experimenten die gedaan zijn vaak onder zeer gecontroleerde condities (soms in klimaatcellen) die niet direct te vergelijken zijn met praktijkcondities in een kas. Tijdens (praktijk)proeven waarbij dergelijke gewassen onder LED belichting worden geteeld is anthocyaanvorming in het blad meerdere malen waargenomen.

5.1 Voorbeelden anthocyaanvorming in gewassen onder LED

Om meer inzicht te krijgen in anthocyaanvorming in glastuinbouwgewassen onder LED, en de oorzaak hiervan, zijn voorbeelden verzameld van teelten/situaties waar anthocyaanvorming in het blad werd waargenomen. De resultaten van deze inventarisatie zijn te vinden in Bijlage 1 van dit rapport (Inventarisatie van voorbeelden anthocyaanvorming). Hierbij moet worden vermeld dat in veel gevallen de anthocyanen niet zijn gemeten, maar dat de aanwezigheid van anthocyanen in het blad werd vastgesteld op basis van visuele waarnemingen (rood-/blauw-/paarsverkleuring). De voorbeelden zijn zo volledig mogelijk beschreven, maar niet in alle gevallen zijn alle condities bekend waaronder anthocyaanvorming (of verkleuring) optrad.

5.1.1 Samenvatting inventarisatie - per gewas

Alstroemeria:

Tijdens onderzoeksproeven waarbij verschillende rassen tijdens de winterperiode geteeld werden onder LED werd er bij de rassen Forza en Noize anthocyaanvorming in blad waargenomen. Een laag percentage blauw en/of een hoog percentage FR in het lichtspectrum lijkt anthocyaanvorming in de steel volledig te onderdrukken (dat was zeer duidelijk bij het effect op de steel pigmentatie door anthocyaan) maar kan het niet volledig voorkomen in het blad. Anthocyaanvorming in Alstroemeria werd ook waargenomen in de praktijk onder hybride belichting (LED+SON-T) bij andere rassen. Extra stralingswarmte alleen kan anthocyaanvorming in Alstroemeria dus niet volledig onderdrukken. Mogelijk speelden, naast het spectrum, de teelttemperatuur, de concentratie CO₂ of de daglengte hier een rol (belicht werd vanaf 16 uur voor zononder), of de bemesting.

Potanthurium:

Telen onder LED belichting met een hoog aandeel rood en zonder toegevoegd FR resulteerde tijdens de wintermaanden in anthocyaanvorming in bloemstelen van potanthurium, en op de onderkant van de spathe (het schutblad wat we als "bloem" beschouwen).

Gerbera:

In een aantal rassen, maar niet allemaal, wordt soms paarsverkleuring waargenomen in de bladeren. Met name in de wintermaanden tot en met het voorjaar (april). Uit de verschillende observaties blijkt dat lagere temperaturen bij een gelijke lichtsom anthocyaanvorming in het blad van gerbera kan stimuleren. Daarnaast lijkt een tekort aan sporenelementen ditzelfde effect te kunnen hebben. Echter, het is onduidelijk welk element hier precies voor verantwoordelijk is. Het kan ook zijn dat het tekort aan sporenelementen zorgt voor beperkte opname van P of N en daarmee anthocyaanvorming veroorzaakt. Van Molybdeen bij voorbeeld is het bekend dat hij betrokken is bij de omzetting van Nitraat naar opneembare vormen van stikstof.

Roos:

Bij het telen van rozen onder LED belichting kan tijdens de wintermaanden bij lagere temperaturen anthocyaanvorming in blad, stelen, en bloemen optreden. De vorming van anthocyanen bij rozen kan worden gestuurd met het spectrum: uit praktijkonderzoek is gebleken dat groen en verrood toevoegen aan het spectrum anthocyaanvorming sterk kan terugdringen, maar niet helemaal voorkomen. Andere factoren die een rol spelen hierbij zijn mogelijk de hoge CO₂ concentratie, de lichtsom en de daglengte, die bij roos 20 tot 24 uur kan bedragen.

Violen:

In zaailingen (trayplanten) van Viola kan bladverkleuring, waarschijnlijk door anthocyaanvorming, in bladeren voorkomen wanneer deze onder LED worden geteeld. Lage dagtemperaturen en blauw licht lijken dit te versterken.

Freesia:

Tijdens spectrumproeven met Freesia werd anthocyaanvorming in bladeren van het ras Corvette waargenomen maar nauwelijks in het ras Soleil. De anthocyaanvorming ging gepaard met chlorofylafname en vergeling in hetzelfde blad. Anthocyaanvorming kon worden onderdrukt door de temperatuur 2-4°C te verhogen. Naast temperatuur lijkt ook het spectrum van invloed op anthocyaanvorming in Freesia: spectra met een hoog percentage FR of een laag percentage blauw resulteerde in meer planten met anthocyaanvorming. Dit is opvallend aangezien uit de literatuur en praktijk(onderzoek) voorbeelden naar voren komt dat dergelijke spectra meestal anthocyaanvorming kunnen onderdrukken. Een mogelijke verklaring is dat deze spectra zorgen voor een toename in GA (van Hoogdalem *et al.*, 2021). De toename in GA zou vervolgens in dit specifieke geval, bij dit ras, anthocyaanvorming kunnen stimuleren. Telen onder een lagere lichtintensiteit of kortere daglengte kan anthocyaanvorming in Freesia ook onderdrukken.

Tomaat:

Bij het telen van tomaat worden geregeld 'paarse koppen' waargenomen, waarbij vooral de stengels en bladstelen in de top van het gewas paars kleuren. Dit werd ook tijdens een onbelichte teelt onder glas in Spanje waargenomen (2012). Paarse koppen worden geassocieerd met een assimilatenoverschot. Door het plukken van blad (waardoor de aanmaak van assimilaten afneemt) en de temperatuur te verhogen (waardoor het verbruik van assimilaten toeneemt) is het probleem van paarse koppen opgelost in de situatie in Spanje. Paarse kop in Nederlandse tomaat wordt soms ook waargenomen maar niet als echt nadelig gezien als het in de middag ontstaat, maar moet in de morgen weer weg zijn. Er is een duidelijk ritme in de dag.

Aardbei:

Het hormoon gibberellinezuur (GA) stimuleert anthocyaanvorming in aardbei, maar alleen in blad en bloemstelen. Een hoger percentage verrood licht (FR) in het lichtspectrum onderdrukt anthocyaanvorming veroorzaakt door GA.

Dat FR de vorming van anthocyaan onderdrukt werd ook in de literatuur gevonden. In paragraaf 4.2 wordt beschreven dat een toename van GA bij hoge temperaturen anthocyaanvorming onderdrukt. Echter, er zijn ook voorbeelden in de literatuur bekend waarbij GA, net als in dit geval, anthocyaanvorming stimuleert. Het is bijvoorbeeld aangetoond dat anthocyaanvorming als gevolg van suikeroophoping of fosfaattekort komt door een toename in GA in de plant (LaFountain & Yuan, 2021). Of GA anthocyaanvorming stimuleert of juist onderdrukt hangt af van verschillende factoren zoals het klimaat, de aanwezigheid van ziektes en plagen, het groeistadium waarin het gewas zich bevindt, de plantensoort of cultivar en het weefsel of plantorgaan.

Braam:

Bij het telen van braam onder LED kan tijdens de wintermaanden en het voorjaar anthocyaanvorming optreden. De anthocyaanvorming in het blad van braam gaat samen met een afname in chlorofyl en vermindering van fotosynthesecapaciteit. Telen onder helder glas (niet diffuus) en belichten met een spectrum met FR en beperkt blauw onderdrukt anthocyaanvorming enigszins. Mogelijk resulteert telen onder helder glas in minder anthocyaanvorming doordat de planttemperatuur op zonnige dagen onder helder glas wat hoger kan liggen dan onder diffuus glas (zie bijvoorbeeld Hemming *et al.*, 2007).

Soja:

In 2021 is een proef gedaan bij WUR Glastuinbouw waarbij soja is geteeld onder LED belichting in een daglicht-loos teeltsysteem (Vertical Farm). Hieruit bleek dat er onder bepaalde temperatuur en licht(spectrum)behandelingen paarsverkleuring optrad in stengels, peulen en bladranden van de planten van beide geteste cultivars. Paarsverkleuring was het sterkst zichtbaar in planten geteeld bij lagere temperaturen. Telen onder een spectrum met hoger aandeel blauw licht (40% in plaats van 20%) resulteerde ook in iets meer paarsverkleuring, maar het effect van temperatuur was sterker. De totale opbrengst van het gewas geteeld bij lagere temperaturen was lager dan van het gewas geteeld bij hogere temperaturen, maar of dit samenhangt met de paarsverkleuring is niet onderzocht.

Medicinale Cannabis:

Paarsverkleuring in bladstelen van Medicinale Cannabis werd waargenomen bij een teelt onder glas waarbij belicht werd met een intensiteit van 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ met lampen met een breed spectrum of een spectrum met hoog aandeel rood licht (beide zonder verrood licht). Opdrachtgevers hebben de indruk dat planten met meer paarsverkleuring (anthocyaan) minder vitaal zijn.

5.1.2 Samenvatting inventarisatie - algemeen

- Anthocyaanvorming in het blad wordt in verschillende met LED belichte teelten waargenomen, maar het komt soms ook voor wanneer belicht wordt met SON-T of in onbelichte teelten.
- Anthocyaanvorming in het blad komt vooral voor wanneer er wordt geteeld onder LED in periodes waarin dit de voornaamste lichtbron vormt (de wintermaanden).
- Anthocyaanvorming komt vaak voor in blad-/bloemstelen. Onduidelijk is of anthocyaanvorming in deze structuren dezelfde functie heeft als in het blad en of de regulatie hetzelfde verloopt. In meerdere gevallen worden niet-groene verkleuringen uitsluitend in stengeldelen waargenomen. Het valt echter niet uit te sluiten dat in deze situaties ook anthocyaanvorming in het blad toeneemt, maar dat deze minder goed zichtbaar is door de hogere chlorofylgehaltes in het blad in vergelijking met blad-/bloemstelen waardoor niet-groene verkleuring minder snel zichtbaar is.
- Sommige cultivars lijken onder bepaalde omstandigheden sneller anthocyanen op te hopen in het blad dan andere.
- Het kan zijn dat anthocyaanvorming in het blad alleen in een specifiek ontwikkelingsstadium optreedt.
- Anthocyaanvorming in het blad gaat in veel van de voorbeelden uit de inventarisatie samen met chlorofylafbraak. In braam ging het daarmee ook samen met een verlaging van de fotosynthesecapaciteit. Of dit in de andere gewassen ook zo is dat zal uit onderzoek moeten blijken.
- Anthocyaanvorming kan een nadelig effect hebben op het vaasleven (zoals waargenomen voor Alstroemeria en roos) omdat het blad sneller necrotisch wordt op de plekken met anthocyaan.
- De verhouding licht en temperatuur speelt een belangrijke rol in de regulatie van anthocyaanvorming in het blad van gewassen: het treedt vaak op wanneer de dagtemperatuur daalt terwijl de hoeveelheid licht gelijk blijft of beperkt afneemt. Verandering van de teelttemperatuur of de lichtsom kunnen de anthocyaanvorming sturen. Daarnaast komt het vooral voor wanneer er wordt geteeld onder LED, welke, bij gelijke lichtintensiteiten, veel minder (stralings)warmte afgeeft dan de traditionele SON-T lampen.
- Verhogen van het aandeel verrood en/of het verlagen van het aandeel blauw licht in het spectrum kan anthocyaanvorming onderdrukken maar in veel gevallen niet volledig voorkomen. In Freesia hadden deze aanpassingen aan het spectrum overigens een stimulerend effect op anthocyaanvorming. Dit illustreert dat de regulatie van anthocyaanvorming kan verschillen tussen gewassen.
- Een tekort aan voedingsstoffen (vooral fosfaat en Stikstof) tijdens de teelt kan tot anthocyaanvorming leiden, ook wanneer er niet wordt belicht.
- Een kortere daglengte, lagere lichtintensiteit en het plukken van blad kunnen anthocyaanvorming onderdrukken. Mogelijk omdat deze maatregelen de aanmaak van assimilaten beperken en zo een assimilatenoverschot kunnen voorkomen.

6 Conceptueel raamwerk voor regulatie anthocyaanvorming

Uit de inventarisatie in hoofdstuk 5 blijkt dat er zeer beperkt verdiepend onderzoek is gedaan naar het optreden van anthocyaanvorming in het blad tijdens verschillende belichte teelten met LED. Echter, onze waarnemingen tijdens teeltproeven blijken overeen te komen met de inzichten uit wetenschappelijk onderzoek met betrekking tot de regulatie van anthocyaanvorming (beschreven in hoofdstuk 4). Op basis van de informatie beschreven in de hoofdstukken 4 en 5 kunnen we een raamwerk opstellen voor de regulatie van anthocyaanvorming in het blad (figuur 6.1).

De verschillende externe factoren die beschreven staan in de groene kaders kunnen direct resulteren in fotoinhibitie en daarmee de plant beschadigen, of ze vormen een 'waarschuwingssignaal' voor de plant omdat de kans op het optreden van fotoinhibitie in de (nabije) toekomst zal toenemen. Het lijkt erop dat de plant dit signaal (naderende fotoinhibitie) al bij lage lichtintensiteiten onder LED kan waarnemen.

Naast abiotische factoren kunnen biotische factoren (ziektes en plagen) de aanmaak van anthocyanen stimuleren (zie paragraaf 4.5).

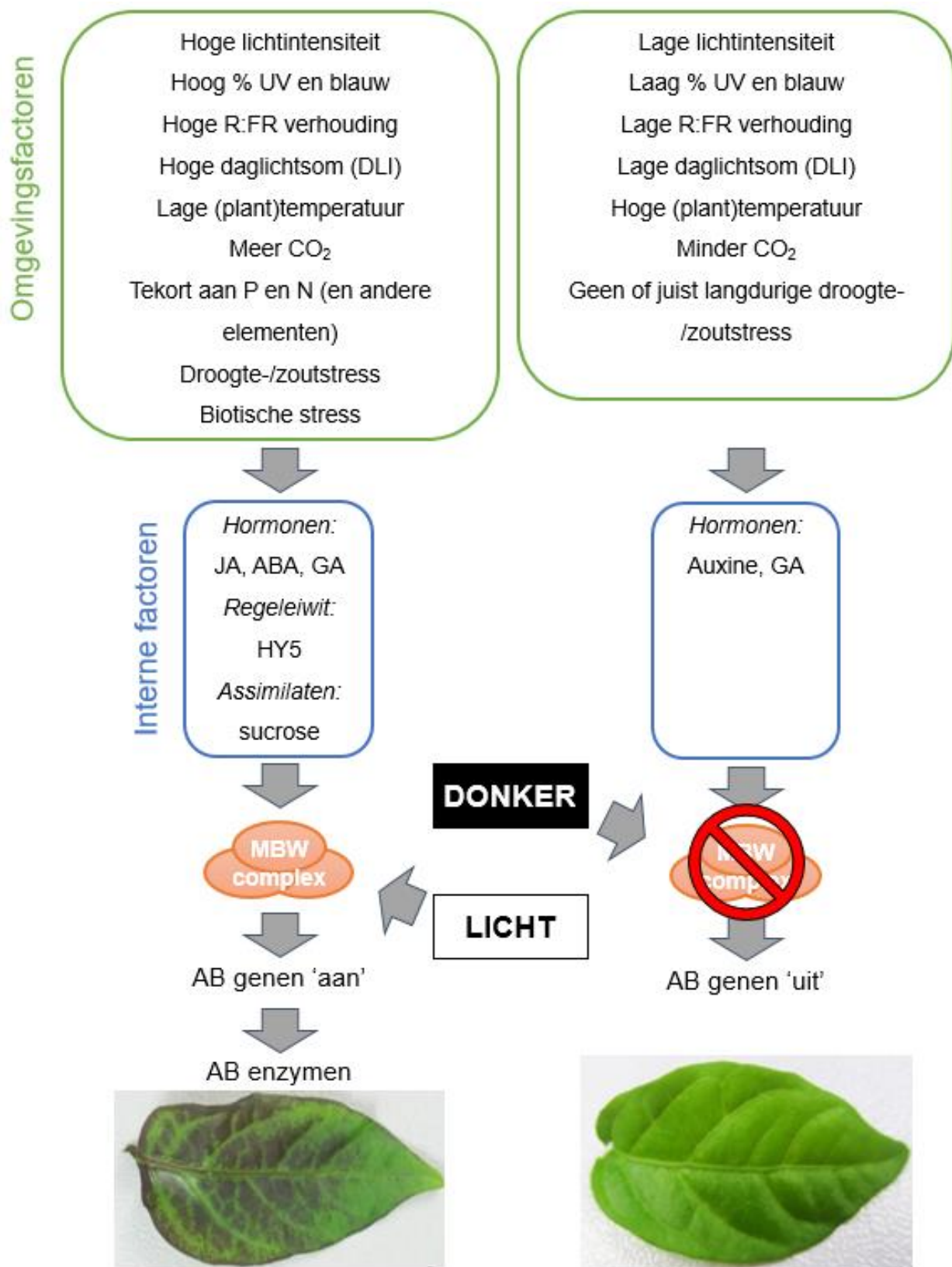
De externe factoren beïnvloeden meestal niet direct anthocyaanvorming maar ze beïnvloeden de aanmaak van interne factoren zoals hormonen en suikers. Deze reguleren op hun beurt de activiteit van het MBW complex, dat anthocyaan biosynthese (AB) genen activeert. Activatie van deze AB genen zorgt ervoor dat er enzymen worden aangemaakt in de plant die anthocyanen produceren waardoor uiteindelijk het blad zal verkleuren.

Anthocyaanproductie kan alleen maar in het licht plaatsvinden. Wanneer het donker is zal bijvoorbeeld een lage temperatuur of tekort aan stikstof (N) niet resulteren in een toename in anthocyanen.

Dit conceptueel raamwerk is een versimpelde algemene weergave van de regulatie van anthocyaanvorming in bladeren. Zoals blijkt uit de informatie in hoofdstukken 4 en 5 zijn er situaties, soorten of cultivars waarvoor geldt dat de ophoping van anthocyanen (deels) op een andere manier wordt gereguleerd.

In de figuur worden geen getallen vermeld, maar worden de woorden 'hoog' of 'laag' gebruikt. Wat precies hoog of laag genoeg is om anthocyaanvorming te beïnvloeden hangt af van verschillende zaken als het gewas (soort en cultivar) en het ontwikkelingsstadium. Daarnaast hangt het af van de achtergrondcondities door de interacties tussen verschillende omgevingsfactoren (zie paragraaf 4.7). Een voorbeeld: bij een temperatuur van 10°C zal een lichtintensiteit van 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ al hoog genoeg kunnen zijn om anthocyaanvorming te stimuleren, maar bij 20°C is dat wellicht pas vanaf 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ het geval.

Zoals naar voren kwam uit de inventarisatie in hoofdstuk 5 gaat anthocyaanvorming vaak samen met chlorofylafbraak. Echter, omdat dit niet altijd het geval is en onderzoek laat zien dat de regulatie hiervan (deels) apart verloopt is dit niet opgenomen in de figuur.



Figuur 6.1 Conceptueel raamwerk voor de regulatie van anthocyaanvorming in blad door omgevingsfactoren en interne factoren. Alleen de interne factoren die in de hoofdtypekst aan bod zijn gekomen zijn meegenomen in de figuur. Voor uitgebreidere informatie zie (LaFountain & Yuan, 2021).

7 Workshop anthocyaanvorming onder LED

De informatie uit de hoofdstukken hiervoor is gebruikt als input voor een workshop met belangstellenden tijdens het Licht Event 2023 (een kennisbijeenkomst georganiseerd door Kas als Energiebron, Glastuinbouw Nederland, Delphy, PlantLighting en Wageningen University en Research, Business Unit Glastuinbouw).

De workshop heeft plaatsgevonden op 1 februari 2023. Hieraan hebben 22 personen deelgenomen. Dat overtrof onze verwachtingen, en gaf aan hoe breed dit verschijnsel voorkomt in de praktijk. De deelnemersgroep bestond uit een goede mix van onderzoekers, voorlichters en vertegenwoordigers uit de industrie: veredelingsbedrijven, leveranciers van LED lampen en van systemen voor “indoorfarms”.

In Bijlage 2 is de Powerpoint presentatie te vinden die als leidraad voor de discussie is gebruikt.

De deelnemers gaven aan anthocyaanvorming te zien bij belichten onder LED bij een zeer groot scala aan gewassen. Gewassen die buiten onze inventarisatie zijn gebleven maar waar de praktijk problemen mee ervaart aldus de deelnemers zijn:

- Perkplanten
- Petunia (in de opkweekfase)
- Tomaten (opkweekfase, opvallend genoeg vooral aan de onderkant van het blad)
- Phalaenopsis (meerdere veredelingsbedrijven)
- Lelie
- Aster (naar de herfst toe)
- Boomkwekerij gewassen (bij de beworteling)
- Bromelia (enkele rassen)

De deelnemers ervaren anthocyaanvorming wel degelijk als een probleem. Gevraagd naar het concreet maken van het soort problemen wat ze ervaren noemden ze de volgende:

- Chlorose van het blad in de buurt van de paarse plekken. Is dat het stadium vooraf waarbij chlorofyl wordt afgebroken?
- Verminderde fotosynthese
- Verharding van de bladzones met anthocyaan en bladvervorming
- Necrose op de aangetaste delen en bij jonge planten bladrand necrose
- Kleinere blad, waardoor minder licht onderscheppend vermogen, waardoor blad steeds kleiner wordt
- Kortere houdbaarheid
- Bladranden en “tipburn-achtige” verschijnselen

Het was een levendige discussie waarbij de deelnemers meerdere inhoudelijke vragen hebben gesteld, die soms op basis van het conceptueel kader en de hiertoe bestudeerde literatuur konden worden beantwoord. Men erkende (was een gedeelde ervaring) dat het toevoegen van FR aan het spectrum veelal een positief effect had op het voorkomen van het schadebeeld.

Er waren ook vragen ten aanzien van de invloed van spectra op de bladtemperatuur en hieraan gerelateerd op de verdamping. Dit is iets waar we in de literatuur geen informatie over hebben gevonden in relatie tot anthocyaanvorming.

Deelnemers haalden ook aan het spel daglengte / lichtintensiteit, en hoe deze factoren samen interacteren om de totale daglichtsom of DLI te geven. Hier ontbreekt informatie in de proef inventarisatie en in de literatuur, zoals eerder besproken onder 4.1.3.

Gevraagd werd naar de omkeerbaarheid van de anthocyaanvorming; dit kan inderdaad fluctueren, zie bijvoorbeeld de dagfluctuatie bij tomaat (paarse koppen zie 5.1.1).

En of de vorming van anthocyaan een autokatalytisch proces is zoals bijvoorbeeld het geval is met ethyleen. Dit is iets wat we in de literatuur niet hebben kunnen vinden, en gelet op de synthese routes lijkt het er niet op dat dit het geval is.

De deelnemers noemen ook andere pigment gerelateerde problemen in blad als gevolg van LED belichting. Zoals gele vlekken, gele strepen etc. in blad. Naar aanleiding van deze aanvullingen hebben wij de paragrafen 2.4.1 en 2.4.2 aan dit rapport toegevoegd.

8 Conclusies en aanbevelingen

Voor dit onderzoek is informatie verzameld over het fenomeen anthocyaanvorming in het blad (bij het telen onder LED), de regulatie hiervan en hoe dit wordt beïnvloed door teeltfactoren als licht, temperatuur en voeding. Hiervoor is literatuuronderzoek uitgevoerd maar zijn ook voorbeelden uit (praktijk)onderzoek en ervaringen van adviseurs, telers en andere experts verzameld.

Anthocyanen: plantpigmenten voor bescherming tegen (licht)stress

Uit het literatuuronderzoek blijkt dat er veel onderzoek is gedaan naar anthocyanen en wat hun functie is (zie hoofdstuk 2). Anthocyanen zijn natuurlijke pigmenten die in bijna alle (tuinbouw)gewassen verantwoordelijk zijn voor de rode, paarse en blauwe verkleuringen van het blad. Ze kunnen verschillende functies hebben:

- Het voorkomen of verminderen van fotoinhibitie: de afname in fotosynthese doordat er meer licht wordt geabsorbeerd door het blad dan kan worden verwerkt via de fotosynthese. Anthocyaanvorming kan hier aan bijdragen door:
 - Het absorberen van een deel van de instraling ('zonnebrand functie')
 - Het opruimen van schadelijke verbindingen (Reactive Oxygen Species; ROS)
- Bescherming tegen biotische stress (plagen en ziektes) of de gevolgen hiervan.
- Bescherming tegen droogte en kou.

Het probleem van ongewenste anthocyaanvorming in het blad bij telen onder LED

Uit de inventarisatie van voorbeelden (hoofdstuk 5) en bijdragen van deelnemers van de workshop tijdens het Licht Event 2023 (hoofdstuk 7) blijkt dat de rood/paars/blauw verkleuringen van het blad die gelinkt kunnen worden aan anthocyaanvorming zeer regelmatig worden waargenomen tijdens onderzoek en in de praktijk. Niet alleen in siergewassen maar ook in bijvoorbeeld tomaat en medicinale Cannabis. Hoewel het soms ook wordt gezien bij telen onder SON-T of zelfs zonder belichting, gaat het in de meeste situaties om telen onder LED belichting, vaak in de periode dat de buitentemperatuur nog vrij laag is en er weinig natuurlijk licht is (najaar, winter en vroege voorjaar). Anthocyaanvorming beschermt de plant tegen verschillende soorten stress. Het fenomeen kan dus als waarschuwingssignaal dienen voor telers dat laat zien dat teeltomstandigheden niet optimaal zijn voor het gewas en dat er ingegrepen moet worden, bijvoorbeeld door het aanpassen van het teeltklimaat. Anthocyaanvorming kan namelijk verschillende negatieve gevolgen hebben voor het gewas of eindproduct, zoals:

- Verminderde sierwaarde
- Verminderde fotosynthesecapaciteit van het blad
- Kleinere blad, met als gevolg minder lichtonderschepping en uiteindelijk minder groei
- Kortere houdbaarheid (siergewassen)
- Afwijkingen op de plek/in de buurt van ophoping van anthocyanen, zoals verharding, necrose, bladranden en 'tip-burn-achtige' verschijnselen.

Daarnaast is anthocyaanvorming een indicatie van een overschot aan assimilaten in het blad, met name sucrose, wat er op duidt dat het gewas niet in balans is.

Regulatie van anthocyaanvorming door omgevingsfactoren

Op basis van alle informatie beschreven in dit rapport is in hoofdstuk 6 een conceptueel raamwerk opgesteld waaruit blijkt dat anthocyaanvorming in het blad door zeer veel verschillende factoren kan worden beïnvloed (Figuur 6.1). Zo wordt anthocyaanvorming onder andere gestimuleerd door hoge lichtintensiteiten, een lichtspectrum met veel blauw licht, lage temperaturen en een tekort aan stikstof of fosfaat. Hoge temperaturen en een lichtspectrum met veel verrood licht zijn dan weer voorbeelden van omstandigheden waaronder anthocyaanvorming wordt onderdrukt.

Echter, het exacte effect van deze omgevingsfactoren op de regulatie van anthocyanen (bijvoorbeeld bij welke temperatuur anthocyaanvorming wordt gestimuleerd) hangt onder andere af van het gewas, de cultivar en het ontwikkelingsstadium. Daarnaast bestaat er interactie tussen omgevingsfactoren. Dat betekent dat het effect van de ene omgevingsfactor op anthocyaanvorming afhankelijk is van andere omgevingsfactoren.

De omgevingsfactoren beïnvloeden meestal niet direct anthocyaanvorming maar ze beïnvloeden de aanmaak van interne factoren zoals hormonen, reguleiwitten en suikers. Deze reguleren op hun beurt de activiteit van het MBW eiwit complex, dat anthocyaan biosynthese (AB) genen activeert. Activatie van deze AB genen zorgt ervoor dat er enzymen worden aangemaakt in de plant die anthocyanen produceren.

Aangezien suikers anthocyaanvorming stimuleren kan het veranderen van de plantbelasting door blad of vruchtsnoei ook een effect hebben op anthocyaanvorming: het aanhouden van meer sinks (zoals vruchten of bloemen) en/of wegsnoeien van bladeren kan anthocyaanvorming onderdrukken doordat het zal resulteren in een lagere concentratie suikers in het blad.

Anthocyaanvorming onder LED: oorzaken en mogelijke oplossingen

De regulatie van anthocyaanvorming is zeer complex, en wordt door veel factoren beïnvloed. Dit maakt het enerzijds lastig om te bepalen wat de oorzaak of oorzaken zijn van anthocyaanvorming in blad, maar anderzijds geeft het meerdere mogelijkheden om het te voorkomen of te verhelpen door de teeltstrategie aan te passen. Met andere woorden: men heeft meerdere “knoppen om aan te draaien”. Aan welke knoppen precies moet worden gedraaid en hoe hard daar is nog weinig over bekend en vraagt om meer onderzoek naar dit fenomeen met (tuinbouw)gewassen.

Het belichten met LED heeft een aantal gevolgen voor het gewas. Door de beperkte afgifte van stralingswarmte door LEDs (ten opzichte van SON-T lampen en de zon) is de gewastemperatuur bij dezelfde lichtintensiteit onder LED lager (van Hoogdalem *et al.*, 2022). Daarnaast wijkt het spectrum van de meeste gangbare LEDs voor de glastuinbouw sterk af het spectrum van SON-T of zonlicht. Het aandeel verrood licht in het spectrum van LEDs is bijvoorbeeld vaak veel lager (van Hoogdalem *et al.*, 2022). Zowel de lagere gewastemperatuur als het veranderende spectrum kunnen mogelijke oorzaken zijn voor het optreden van anthocyaanvorming. Een hogere teelttemperatuur of aanpassingen aan het spectrum (minder blauw, meer verrood) bleek in sommige situaties beschreven in Hoofdstuk 5 inderdaad te leiden tot minder anthocyaanvorming. Maar vaak verdween het niet helemaal. Het telen onder LEDs zal ook invloed hebben op de verdamping en daarmee de opname van water en nutriënten (van Hoogdalem *et al.*, 2022). Het is mogelijk dat dit in sommige gevallen leidt tot een beperking in de beschikbaarheid van bepaalde voedingsstoffen voor de plant, en zo tot de ophoping van anthocyanen.

Zelfs al zouden de bovengenoemde factoren inderdaad anthocyaanvorming tijdens het telen onder LED veroorzaken, dan hoeft dat niet te betekenen dat de oplossing voor dit probleem ook moet worden gezocht in het aanpassen van (alleen) deze factoren. Op basis van de informatie in het conceptuele raamwerk zijn er ook andere aanpassingen aan de teeltomstandigheden mogelijk die de kans op anthocyaanvorming verminderen en daarnaast minder energie zouden verbruiken dan bijvoorbeeld de temperatuur verhogen.

Aanbevelingen

Op basis van de bevindingen in dit rapport lijken de drie meest veelbelovende energiezuinige teeltstrategieën om ongewenste anthocyaanvorming te voorkomen:

- *Het aanpassen (verlagen) van de CO₂ dosering.* Hiervoor is het ook noodzakelijk beter inzicht te krijgen in de daadwerkelijke CO₂ behoefte van het gewas.
- *Het aanpassen van de voeding.* Van verschillende voedingselementen is bekend dat een tekort daarvan in de plant zorgt voor anthocyaanvorming in het blad. Het is goed mogelijk dat het telen onder LED vraagt om een aanpassing van de voedingsrecepten (e.g. verhogen van gift van bepaalde elementen) doordat onder LED de opname en transport van elementen minder efficiënt verloopt dan onder natuurlijk licht of SON-T.
- *Het toepassen van dynamische belichtingsstrategieën.* Dit kan bijvoorbeeld door:
 - op andere momenten te starten met belichten (bijvoorbeeld pas na zonsopkomst);
 - de intensiteit waarmee belicht wordt zeer langzaam laten toenemen in de ochtend;
 - door een dynamisch lichtspectrum toe te passen (in de ochtenduren belichten met minder of geen blauw licht, maar met meer verrood licht).

Kennisleemtes en vervolgonderzoek

Hoewel er binnen dit project veel informatie is verzameld blijkt dat er toch maar zeer beperkt data beschikbaar is over anthocyaanvorming bij het telen onder LEDs. Dit komt in de eerste plaats omdat het nauwelijks gemeten wordt en daardoor ook niet goed geregistreerd. Willen we in de toekomst anthocyaanvorming voorkomen, zal er beter moeten worden geregistreerd binnen onderzoeksprojecten waar en wanneer dit optreedt.

Op basis van de huidige inzichten zijn er verschillende acties te adviseren die kunnen bijdragen aan het tegengaan of voorkomen van anthocyaanvorming bij het telen onder LED. Hierboven zijn daarvan de meest veelbelovende energiezuinige strategieën genoemd. Het is echter met de huidige kennis niet mogelijk om aan te geven hoe deze acties precies moeten worden uitgevoerd en of ze in alle situaties (in alle gewassen) werken. Om daar achter te komen zal meer onderzoek nodig zijn naar de effecten van deze teeltstrategieën/behandelingen op anthocyaanvorming.

Andere bladafwijkingen (onder LED)

Tijdens dit project bleek dat paarsverkleuring door anthocyaanvorming niet de enige blad(kleur)afwijkingen zijn die vaker worden waargenomen bij het telen onder LEDs. Zo gaven meerdere onderzoekers en aanwezigen bij de workshop aan dat ze vaker vergeeld of bleek blad waarnemen. Mogelijke oorzaken hiervoor zijn de afbraak van chlorofyl en de veranderingen in verhoudingen tussen verschillende bladpigmenten die dit tot gevolg heeft of het verplaatsen van het chlorofyl (zie paragrafen 2.4.1 en 2.4.2). Net als voor anthocyaanvorming geldt voor deze fenomenen dat ze vaak niet goed gemeten en geregistreerd worden, waardoor het moeilijk is om teeltstrategieën of behandelingen te adviseren om dit te voorkomen of verminderen. Aanbevolen wordt dit beter bij te houden in (praktijk)proeven en daar waar de (financiële) ruimte ervoor is, verdiepend onderzoek naar te verrichten: wat is het precies (afbraak van chlorofyl, aanmaak van andere, beschermende pigmenten, of chloroplasten verplaatsingen), en hoe kun je dit voorkomen.

Literatuur

- Albert, N. W., Lewis, D. H., Zhang, H., Irving, L. J., Jameson, P. E., & Davies, K. M. (2009). Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. *Journal of experimental botany*, 60(7), 2191-2202.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12), 1337-1344.
- Archetti, M. (2009). Classification of hypotheses on the evolution of autumn colours. *Oikos*, 118(3), 328-333.
- Attoe, E. L., & Von Elbe, J. H. (1981). Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. *Journal of Food Science*, 46(6), 1934-1937.
- Armitage, A. M., & Carlson, W. H. (1981). The Effect of Quantum Flux Density, Day and Night Temperature and Phosphorus and Potassium Status on Anthocyanin and Chlorophyll Content in Marigold Leaves¹. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106(5), 639-642.
- Bahler, B. D., Steffen, K. L., & Orzolek, M. D. (1991). Morphological and biochemical comparison of a purple-leafed and a green-leafed pepper cultivar. *HortScience*, 26(6), 736.
- Balasooriya, H. N., Dassanayake, K. B., & Ajlouni, S. (2019). The impact of elevated CO₂ and high temperature on the nutritional quality of fruits-A short review. *American Journal of Agricultural Research*, 4(26), 1-9.
- Banaś, A. K., Aggarwal, C., Łabuz, J., Sztatelman, O., & Gabryś, H. (2012). Blue light signalling in chloroplast movements. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1559-1574.
- Basu, A., Rhone, M., & Lyons, T. J. (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition reviews*, 68(3), 168-177.
- Becker, C., & Kläring, H. P. (2016). CO₂ enrichment can produce high red leaf lettuce yield while increasing most flavonoid glycoside and some caffeic acid derivative concentrations. *Food chemistry*, 199, 736-745.
- Berry, J., & Bjorkman, O. (1980). Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annual Review of plant physiology*, 31(1), 491-543.
- Boldt, J. K. (2013). Foliar anthocyanins in coleus and ornamental grasses: Accumulation, localization, and function.
- Boldt, J. K., Meyer, M. H., & Erwin, J. E. (2014). Foliar anthocyanins: A horticultural review. *Horticultural Reviews: Volume 42*, 209-252.
- Brandt, K., Giannini, A., & Lercari, B. (1995). Photomorphogenic responses to UV radiation III: A comparative study of UVB effects on anthocyanin and flavonoid accumulation in wild-type and aurea mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Photochemistry and Photobiology*, 62(6), 1081-1087.
- Burger, J., & Edwards, G. E. (1996). Photosynthetic efficiency, and photodamage by UV and visible radiation, in red versus green leaf coleus varieties. *Plant and Cell Physiology*, 37(3), 395-399.
- Camm, E. L., McCallum, J., Leaf, E., & Koupai-Abyazani, M. R. (1993). Cold-induced purpling of *Pinus contorta* seedlings depends on previous daylength treatment. *Plant, Cell & Environment*, 16(6), 761-764.
- Carstensen, A., Herdean, A., Schmidt, S. B., Sharma, A., Spetea, C., Pribil, M., & Husted, S. (2018). The impacts of phosphorus deficiency on the photosynthetic electron transport chain. *Plant physiology*, 177(1), 271-284.
- Carvalho, I. S., Cavaco, T., Carvalho, L. M., & Duque, P. (2010). Effect of photoperiod on flavonoid pathway activity in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) leaves. *Food chemistry*, 118(2), 384-390.
- Carvalho, S. D., & Folta, K. M. (2016, May). Green light control of anthocyanin production in microgreens. In *VIII International Symposium on Light in Horticulture* 1134 (pp. 13-18).
- Cemeroglu, B., Velioglu, S., & Isik, S. (1994). Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *Journal of Food Science*, 59(6), 1216-1218.
- Chalker-Scott, L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and photobiology*, 70(1), 1-9.
- Close, D. C., & Beadle, C. L. (2003). The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review*, 69(2), 149-161.
- Cooper-Driver, G. A. (2001). Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry*, 56(3), 229-236.
- Chalker-Scott, L. (2002). Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues?.

- Chen, D. Q., Li, Z. Y., Pan, R. C., & Wang, X. J. (2006). Anthocyanin accumulation mediated by blue light and cytokinin in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(4), 420-425.
- Shichijo, C., Hamada, T., Hiraoka, M., Johnson, C. B., & Hashimoto, T. (1993). Enhancement of red-light-induced anthocyanin synthesis in sorghum first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period. *Planta*, 191, 238-245.
- Christ, B., & Hörtensteiner, S. (2014). Mechanism and significance of chlorophyll breakdown. *Journal of plant growth regulation*, 33(1), 4-20.
- Christie, P. J., Alfenito, M. R., & Walbot, V. (1994). Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 194(4), 541-549.
- de Gelder, A., & van der Burg, R. (2017). LED en energiezuinigheid en kwaliteit bij Red Naomi! (No. WPR-708). Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw.
- de Gelder, A., van der Burg, R., & Hartog, B. (2018). LED in rozen het moet beter! (No. WPR-819). Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw.
- de Pascual-Teresa, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International journal of molecular sciences*, 11(4), 1679-1703.
- De Keyser, E., Dhooghe, E., Christiaens, A., Van Labeke, M. C., & Van Huylenbroeck, J. (2019). LED light quality intensifies leaf pigmentation in ornamental pot plants. *Scientia horticultrae*, 253, 270-275.
- DeBlasio, S. L., Luesse, D. L., & Hangarter, R. P. (2005). A plant-specific protein essential for blue-light-induced chloroplast movements. *Plant Physiology*, 139(1), 101-114.
- Dehghan, S., Sadeghi, M., Pöppel, A., Fischer, R., Lakes-Harlan, R., Kavousi, H. R., ... & Rahnamaeian, M. (2014). Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius*. *Bioscience reports*, 34(3).
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(3), 173-289.
- Demmig-Adams, B., & Adams Iii, W. W. (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual review of plant biology*, 43(1), 599-626.
- Dhami, N., & Cazzonelli, C. I. (2020). Environmental impacts on carotenoid metabolism in leaves. *Plant Growth Regulation*, 92(3), 455-477.
- Diaz, C., Saliba-Colombani, V., Loudet, O., Belluomo, P., Moreau, L., Daniel-Vedele, F., ... & Masclaux-Daubresse, C. (2006). Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 47(1), 74-83.
- Dodd, I. C., Critchley, C., Woodall, G. S., & Stewart, G. R. (1998). Photoinhibition in differently coloured juvenile leaves of *Syzygium* species. *Journal of Experimental Botany*, 49(325), 1437-1445.
- Dorais, M., Yelle, S., & Gosselin, A. (1996). Influence of extended photoperiod on photosynthate partitioning and export in tomato and pepper plants. *New Zealand journal of crop and horticultural science*, 24(1), 29-37.
- Dieleman, A., Polder, G., Meinen, E., van Arkel, J., & Weerheim, K. (2018). Klimaat sturen op de inhoud van het blad (No. WPR-770). Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw.
- Dieleman, A., de Gelder, A., Weerheim, K., Kruidhof, M., Verkerke, W., Garcia, N., Kromwijk, A., Elings, A., de Visser, P., & Janse, J. (2020). Denkkader licht. Naar een effectief gebruik van LED belichting in de glastuinbouw. Wageningen University & Research. Rapport WPR-774
- Eryilmaz, F. (2006). The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20(1), 47-52.
- Eskling, M., Arvidsson, P. O., & Åkerlund, H. E. (1997). The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum*, 100(4), 806-816.
- Feild, T. S., Lee, D. W., & Holbrook, N. M. (2001). Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant physiology*, 127(2), 566-574.
- Ghosh, D., & Konishi, T. (2007). Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 16(2).
- Gitelson, A. A., Merzlyak, M. N., & Chivkunova, O. B. (2001). Optical properties and nondestructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochemistry and photobiology*, 74(1), 38-45.

-
- Grotenwold, E. (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual review of plant biology*, 57(1), 761-780.
- García Victoria, N. de Gelder, A., Kempkes, F., & Dings, E. (2017). Teelt Gerbera in Balans: de invloed van lichtsom, etmaaltemperatuur en daglengte op productie, energiegebruik en plantbalans (No. 1417). Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw.
- García Victoria, N. (2022a). Alstroemeria en haar lichtcriteria: een onderzoek ter ondersteuning van de keuze van een geschikt spectrum van de LED-belichting (No. WPR-1083). Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw.
- García Victoria, N., Weerheim, K., de Zwart, F., Bloemhard, C., van Winkel, A., de Wei, J., ... & van Twist, T. (2022b). Alstroemeria: teelt van de toekomst, dichtbij: ontwerp en beproeving fossielvrije en emissievrije teeltconcept voor Alstroemeria (No. WPR-1082). Stichting Wageningen Research, Wageningen Plant Research, Business unit Glastuinbouw.
- Gong, Z., Yamazaki, M., Sugiyama, M., Tanaka, Y., & Saito, K. (1997). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in *Perilla frutescens*. *Plant molecular biology*, 35, 915-927.
- González-Villagra, J., Cohen, J. D., & Reyes-Díaz, M. M. (2019). Absciscic acid is involved in phenolic compounds biosynthesis, mainly anthocyanins, in leaves of *Aristotelia chilensis* plants (Mol.) subjected to drought stress. *Physiologia plantarum*, 165(4), 855-866.
- Gould, K. S., Kuhn, D. N., Lee, D. W., & Oberbauer, S. F. (1995). Why leaves are sometimes red. *Nature*, 378(6554), 241-242.
- Gould, K. S., Vogelmann, T. C., Han, T., & Clearwater, M. J. (2002). Profiles of photosynthesis within red and green leaves of *Quintinia serrata*. *Physiologia Plantarum*, 116(1), 127-133.
- Gould, K. S. (2004). Nature's Swiss army knife: the diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5), 314.
- Gould, K. S., Dudle, D. A., & Neufeld, H. S. (2010). Why some stems are red: cauline anthocyanins shield photosystem II against high light stress. *Journal of Experimental Botany*, 61(10), 2707-2717.
- Hanegraaf, M., en van Alebeek, F., (2013). Herkenningskaart nutriëntenbeschikbaarheid Marjoleine. NMI/PPO-AGV, Wageningen University and Research publicatie, edepot wur.nl/292716
- Hannum, S. M. (2004). Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(1), 1-17.
- Hasdai, M., Weiss, B., Levi, A., Samach, A., & Porat, R. (2006). Differential responses of *Arabidopsis* ecotypes to cold, chilling and freezing temperatures. *Annals of Applied Biology*, 148(2), 113-120.
- Hashim, S. B., Tahir, H. E., Mahdi, A. A., Liu, L., Zhang, J., Zhai, X., ... & Jiyong, S. (2022). Development of Smart Colorimetric Sensing Films Carbohydrate-Based with Soybean Wax and Purple Cauliflower Anthocyanins for Visual Monitoring of Shrimp Freshness. *Journal of Polymers and the Environment*, 1-15.
- Hemming, S., R. Jongschaap, T. Dueck (2007). Effecten van diffuus licht op komkommer. Resultaten van een teelt experiment. Rapport Wageningen University & Research, BU Glastuinbouw, nota 446.
- Henry, A., Chopra, S., Clark, D. G., & Lynch, J. P. (2012). Responses to low phosphorus in high and low foliar anthocyanin *coleus* (*Solenostemon scutellarioides*) and maize (*Zea mays*). *Functional Plant Biology*, 39(3), 255-265.
- Herbstová, M., Tietz, S., Kinzel, C., Turkina, M. V., & Kirchhoff, H. (2012). Architectural switch in plant photosynthetic membranes induced by light stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(49), 20130-20135.
- Hinojosa-Gómez, J., San Martín-Hernández, C., Heredia, J. B., León-Félix, J., Osuna-Enciso, T., & Muy-Rangel, M. D. (2020). Anthocyanin induction by drought stress in the calyx of roselle cultivars. *Molecules*, 25(7), 1555.
- Hoch, W. A., Singsaas, E. L., & McCown, B. H. (2003). Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant physiology*, 133(3), 1296-1305.
- Huner, N., Öquist, G., Hurry, V. M., Krol, M., Falk, S., & Griffith, M. (1993). Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants. *Photosynthesis research*, 37(1), 19-39.
- Islam, M. S., Jalaluddin, M., Garner, J. O., Yoshimoto, M., & Yamakawa, O. (2005). Artificial shading and temperature influence on anthocyanin compositions in sweetpotato leaves. *HortScience*, 40(1), 176-180.
- Jansen, M. A., Gaba, V., & Greenberg, B. M. (1998). Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in plant science*, 3(4), 131-135.
- Johnson, E. J. (2002). The role of carotenoids in human health. *Nutrition in clinical care*, 5(2), 56-65.

- Júnior, A. P. D., Shimizu, M. M., Moura, J. C. M. S., Catharino, R. R., Ramos, R. A., Ribeiro, R. V., & Mazzafera, P. (2012). Looking for the physiological role of anthocyanins in the leaves of *coffea arabica*. *Photochemistry and Photobiology*, 88(4), 928-937.
- Kannangara, C. G., & Hansson, M. (1998). Arrest of chlorophyll accumulation prior to anthocyanin formation in *Euphorbia pulcherrima*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(12), 843-848.
- Karageorgou, P., & Manetas, Y. (2006). The importance of being red when young: anthocyanins and the protection of young leaves of *Quercus coccifera* from insect herbivory and excess light. *Tree Physiology*, 26(5), 613-621.
- Kasahara, M., Kagawa, T., Oikawa, K., Suetsugu, N., Miyao, M., & Wada, M. (2002). Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature*, 420(6917), 829-832.
- Khanna-Chopra, R. (2012). Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. *Protoplasma*, 249, 469-481.
- Khavari-Nejad, R. A., Bujar, M., & Attaran, E. (2008). Evaluation Of Anthocyanin Contents Under Salinity (NaCl) Stress In *Bellis Perennis* L. In *Ecophysiology of high salinity tolerant plants* (pp. 127-134). Springer, Dordrecht.
- Khavari-Nejad, R. A., Najafi, F., & Tofighi, C. (2009). Diverse responses of tomato to N and P deficiency. *International Journal of Agriculture and biology*, 11(2), 209-213.
- Krause, G. H. (1988). Photoinhibition of photosynthesis: An evaluation of damaging and protective mechanisms [photosystem, fluorescence quenching, thylakoid, thermal de-excitation, review]. *Physiologia Plantarum* (Denmark).
- Kubasek, W. L., Shirley, B. W., McKillop, A., Goodman, H. M., Briggs, W., & Ausubel, F. M. (1992). Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell*, 4(10), 1229-1236.
- Kume, A. (2017). Importance of the green color, absorption gradient, and spectral absorption of chloroplasts for the radiative energy balance of leaves. *Journal of plant research*, 130(3), 501-514.
- LaFountain, A. M., & Yuan, Y. W. (2021). Repressors of anthocyanin biosynthesis. *New Phytologist*, 231(3), 933-949.
- Lee, D. W., & Collins, T. M. (2001). Phylogenetic and ontogenetic influences on the distribution of anthocyanins and betacyanins in leaves of tropical plants. *International Journal of Plant Sciences*, 162(5), 1141-1153.
- Lee, D. W., O'Keefe, J., Holbrook, N. M., & Feild, T. S. (2003). Pigment dynamics and autumn leaf senescence in a New England deciduous forest, eastern USA. *Ecological Research*, 18(6), 677-694.
- Lev-Yadun, S., Dafni, A., Flaishman, M. A., Inbar, M., Izhaki, I., Katzir, G., & Ne'eman, G. (2004). Plant coloration undermines herbivorous insect camouflage. *BioEssays*, 26(10), 1126-1130.
- Lev-Yadun, S., & Gould, K. S. (2008). Role of anthocyanins in plant defence. In *Anthocyanins* (pp. 22-28). Springer, New York, NY.
- Levizou, E., Drilias, P., Psaras, G. K., & Manetas, Y. (2005). Nondestructive assessment of leaf chemistry and physiology through spectral reflectance measurements may be misleading when changes in trichome density co-occur. *New Phytologist*, 165(2), 463-472.
- Leyva, A., Jarillo, J. A., Salinas, J., & Martinez-Zapater, J. M. (1995). Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant physiology*, 108(1), 39-46.
- Li, Q., & Kubota, C. (2009). Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 59-64.
- Li, D., Zhang, X., Li, L., Aghdam, M. S., Wei, X., Liu, J., ... & Luo, Z. (2019). Elevated CO₂ delayed the chlorophyll degradation and anthocyanin accumulation in postharvest strawberry fruit. *Food Chemistry*, 285, 163-170.
- Lightbourn, G. J., Stommel, J. R., & Griesbach, R. J. (2007). Epistatic interactions influencing anthocyanin gene expression in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(6), 824-829.
- Liu, C. C., Chi, C., Jin, L. J., Zhu, J., Yu, J. Q., & Zhou, Y. H. (2018). The bZip transcription factor HY5 mediates CRY1a-induced anthocyanin biosynthesis in tomato. *Plant, cell & environment*, 41(8), 1762-1775.
- Maai, E., Nishimura, K., Takisawa, R., & Nakazaki, T. (2020). Light stress-induced chloroplast movement and midday depression of photosynthesis in sorghum leaves. *Plant Production Science*, 23(2), 172-181.

- Mabry, T. J., Taylor, A., & Turner, B. L. (1963). The betacyanins and their distribution. *Phytochemistry*, 2(1), 61-64.
- Maekawa, M., Sato, T., Kumagai, T., & Noda, K. (2001). Differential responses to UV-B irradiation of three near isogenic lines carrying different purple leaf genes for anthocyanin accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science*, 51(1), 27-32.
- Mancinelli, A. L. (1983). The photoregulation of anthocyanin synthesis. *Photomorphogenesis*, 640-661.
- Manetas, Y., Petropoulou, Y., Psaras, G. K., & Drinia, A. (2003). Exposed red (anthocyanic) leaves of *Quercus coccifera* display shade characteristics. *Functional Plant Biology*, 30(3), 265-270.
- Manetas, Y. (2006). Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red?. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 201(3), 163-177.
- Manninen, M., Vesterinen, V. M., & Salminen, J. P. (2020). Chemistry of Autumn Colors: Quantitative Spectrophotometric Analysis of Anthocyanins and Carotenoids and Qualitative Analysis of Anthocyanins by Ultra-performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of chemical education*, 97(3), 772-777.
- Marini, R. P. (1986). Do net gas exchange rates of green and red peach leaves differ?. *HortScience*, 21(1), 118-120.
- Martinoia, E., Maeshima, M., & Neuhaus, H. E. (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of experimental botany*, 58(1), 83-102.
- Matsuda, O., Tanaka, A., Fujita, T., & Iba, K. (2012). Hyperspectral imaging techniques for rapid identification of *Arabidopsis* mutants with altered leaf pigment status. *Plant and Cell Physiology*, 53(6), 1154-1170.
- Medema, D. (2023, 17 januari). LichtEvent op 1 februari behandelt actuele ontwikkelingen op gebied van licht en belichting. Kas als Energiebron. Geraadpleegd op 16 oktober 2023 van: <https://www.kasalsenergiebron.nl/nieuws/lichtevent-op-1-februari-behandelt-actuele-ontwikkelingen-op-gebied-van-licht-en-belichting/>
- Meinen, E., van Hoogdalem, M., Geurts, J., & Dieleman, A. (2022). Sturen op stress: wanneer is het (nog) nuttig? Wageningen University & Research. Rapport WPR-1102
- Meng, X., & Wang, X. (2004). Regulation of flower development and anthocyanin accumulation in *Gerbera hybrida*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79(1), 131-137.
- Merzlyak, M. N., Chivkunova, O. B., Solovchenko, A. E., & Naqvi, K. R. (2008). Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed, and senescing leaves. *Journal of Experimental Botany*, 59(14), 3903-3911.
- Mori, K., Sugaya, S., & Gemma, H. (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia horticulturae*, 105(3), 319-330.
- Naing, A. H., & Kim, C. K. (2018). Roles of R2R3-MYB transcription factors in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural plants. *Plant molecular biology*, 98(1), 1-18.
- Naing, A. H., & Kim, C. K. (2021). Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, 172(3), 1711-1723.
- Nakabayashi, R., Mori, T., & Saito, K. (2014). Alternation of flavonoid accumulation under drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & behavior*, 9(8), e29518.
- Neill, S. O., & Gould, K. S. (2003). Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants?. *Functional Plant Biology*, 30(8), 865-873.
- Neto, C. C., Amoroso, J. W., & Liberty, A. M. (2008). Anticancer activities of cranberry phytochemicals: an update. *Molecular nutrition & food research*, 52(S1), S18-S27.
- Oren-Shamir, M., & Levi-Nissim, A. (1997). Temperature effects on the leaf pigmentation of *Cotinus coggygria* 'Royal Purple'. *Journal of Horticultural Science*, 72(3), 425-432.
- Oren-Shamir, M. (2009). Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants?. *Plant Science*, 177(4), 310-316.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
- Park, J. S., Choung, M. G., Kim, J. B., Hahn, B. S., Kim, J. B., Bae, S. C., ... & Cho, K. J. (2007). Genes up-regulated during red coloration in UV-B irradiated lettuce leaves. *Plant cell reports*, 26(4), 507-516.
- Park, Y. G., Park, J. E., Hwang, S. J., & Jeong, B. R. (2012). Light source and CO₂ concentration affect growth and anthocyanin content of lettuce under controlled environment. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 53(6), 460-466.

- Peng, M., Hudson, D., Schofield, A., Tsao, R., Yang, R., Gu, H., ... & Rothstein, S. J. (2008). Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the *NLA* gene. *Journal of experimental botany*, 59(11), 2933-2944.
- Percival, D. C., Proctor, J. T. A., & Tsujita, M. J. (1996). Whole-plant net CO₂ exchange of raspberry as influenced by air and root-zone temperature, CO₂ concentration, irradiation, and humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(5), 838-845.
- Piccaglia, R., Marotti, M., & Baldoni, G. (2002). Factors influencing anthocyanin content in red cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata* L f *rubra* (L) Thell). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(13), 1504-1509.
- Pietrini, F., & Massacci, A. (1998). Leaf anthocyanin content changes in *Zea mays* L. grown at low temperature: significance for the relationship between the quantum yield of PS II and the apparent quantum yield of CO₂ assimilation. *Photosynthesis Research*, 58(3), 213-219.
- Pinter, J., Kosa, E., Hadi, G., Hegyi, Z., Spitkó, T., Tóth, Z., ... & Marton, L. (2007). Effect of increased UV-B radiation on the anthocyanin content of maize (*Zea mays* L.) leaves. *Acta Agronomica Hungarica*, 55(1), 7-17.
- Robbins, N. S., & Pharr, D. M. (1987). Regulation of photosynthetic carbon metabolism in cucumber by light intensity and photosynthetic period. *Plant physiology*, 85(2), 592-597.
- Saigo, T., Wang, T., Watanabe, M., & Tohge, T. (2020). Diversity of anthocyanin and proanthocyanin biosynthesis in land plants. *Current opinion in plant biology*, 55, 93-99.
- Sato, R., Ito, H., & Tanaka, A. (2015). Chlorophyll b degradation by chlorophyll b reductase under high-light conditions. *Photosynthesis research*, 126(2), 249-259.
- Shi, M. Z., & Xie, D. Y. (2010). Features of anthocyanin biosynthesis in *pap1-D* and wild-type *Arabidopsis thaliana* plants grown in different light intensity and culture media conditions. *Planta*, 231(6), 1385-1400.
- Shichijo, C., Hamada, T., Hiraoka, M., Johnson, C. B., & Hashimoto, T. (1993). Enhancement of red-light-induced anthocyanin synthesis in sorghum first internodes by moderate low temperature given in the pre-irradiation culture period. *Planta*, 191(2), 238-245.
- Shin, J., Park, E., & Choi, G. (2007). PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 49(6), 981-994.
- Singh, A., Selvi, M. T., & Sharma, R. (1999). Sunlight-induced anthocyanin pigmentation in maize vegetative tissues. *Journal of Experimental botany*, 50(339), 1619-1625.
- Smillie, R. M., & Hetherington, S. E. (1999). Photoabatement by anthocyanin shields photosynthetic systems from light stress. *Photosynthetica*, 36(3), 451-463.
- Snel, J. F., Meinen, E., Bruins, M. A., van Ieperen, W., Hogewoning, S. W., & Marcelis, L. F. M. (2011). Fotosynthese-efficiency bij verschillende golflengten (No. 1151). Wageningen UR Glastuinbouw.
- Stafford, H. A. (1994). Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science*, 101(2), 91-98.
- Stapleton, A. E. (1992). Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *The Plant Cell*, 4(11), 1353.
- Steponkus, P. L. (1969). The relationship of anthocyanin content to cold hardiness of *Hedera helix*. *Hortscience*, 4, 55-56.
- Steyn, W. J., Wand, S. J. E., Holcroft, D. M., & Jacobs, G. J. N. P. (2002). Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155(3), 349-361.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in food science & technology*, 15(1), 19-38.
- Sun, J., Nishio, J. N., & Vogelmann, T. C. (1998). Green light drives CO₂ fixation deep within leaves. *Plant and Cell Physiology*, 39(10), 1020-1026.
- Tanaka, T., Shnimizu, M., & Moriwaki, H. (2012). Cancer Chemoprevention by Carotenoids. *Molecules*, 17(3), 3202-3242.
- Teng, Z., Jiang, X., He, F., & Bai, W. (2020). Qualitative and quantitative methods to evaluate anthocyanins. *eFood*, 1(5), 339-346.
- Teramura, A. H., & Sullivan, J. H. (1994). Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynthesis research*, 39(3), 463-473.
- Toscano, S., Trivellini, A., Ferrante, A., & Romano, D. (2018). Physiological mechanisms for delaying the leaf yellowing of potted geranium plants. *Scientia Horticulturae*, 242, 146-154.

- Trojak, M., & Skowron, E., 2017 Role of anthocyanins in high-light stress response. *World Scientific News* 81(2) (2017) 150-168
- Tsormpatsidis, E., Henbest, R. G. C., Davis, F. J., Battey, N. H., Hadley, P., & Wagstaffe, A. (2008). UV irradiance as a major influence on growth, development and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce 'Revolution' grown under polyethylene films. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3), 232-239.
- Tignor, M. E., Davies, F. S., Sherman, W. B., & Davis, J. M. (1997). Rapid freeze acclimation of *Poncirus trifoliata* seedlings exposed to 10 C and long days. *HortScience*, 32(5), 854-857.
- Timm, S., & Hagemann, M. (2020). Photorespiration—how is it regulated and how does it regulate overall plant metabolism?. *Journal of Experimental Botany*, 71(14), 3955-3965.
- van Hoogdalem, M., Streminska, M., Cuesta Arenas, Y., de Gelder, A., Weerheim, K. & Dieleman, A. (2021). Nieuwe balansen in Het Nieuwe Telen: Hormonen en Ecologie. Wageningen University & Research. Rapport WPR-996.
- van Hoogdalem, M., Weerheim, K., de Gelder, A., & Dieleman, A. (2022). LEDs: het pad naar de praktijk: een roadmap voor tomaat (No. WPR-1138). Wageningen Plant Research.
- Wada, M. (2013). Chloroplast movement. *Plant Science*, 210, 177-182.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1997). Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 45(2), 304-309.
- Wang, J., Wu, D., Wang, Y., & Xie, D. (2019). Jasmonate action in plant defense against insects. *Journal of Experimental Botany*, 70(13), 3391-3400.
- Wargovich, M. J., Morris, J., Moseley, V., Weber, R., & Byrne, D. H. (2012). Developing fruit cultivars with enhanced health properties. *Fruit breeding*, 37-68.
- Xu, S., Zhu, X., Li, C., & Ye, Q. (2014). Effects of CO₂ enrichment on photosynthesis and growth in *Gerbera jamesonii*. *Scientia Horticulturae*, 177, 77-84.
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
- Yang, W., Xu, H., Xiao, Q., Li, X., & Shao, Q. (2023). Combined analysis of metabolome and transcriptome provides insights into metabolisms of chlorophylls, carotenoids, and flavonoids in the yellowing leaves of 'HAES344' macadamia. *Scientia Horticulturae*, 308, 111600
- Yoshida, K., Toyama-Kato, Y., Kameda, K., & Kondo, T. (2003). Sepal color variation of *Hydrangea macrophylla* and vacuolar pH measured with a proton-selective microelectrode. *Plant and cell physiology*, 44(3), 262-268.
- Yuan, Y., Chiu, L. W., & Li, L. (2009). Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage. *Planta*, 230(6), 1141-1153.
- Zhang, Y., Zheng, S., Liu, Z., Wang, L., & Bi, Y. (2011). Both HY5 and HYH are necessary regulators for low temperature-induced anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of plant physiology*, 168(4), 367-374.
- Zhang, T., & Folta, K. M. (2012). Green light signaling and adaptive response. *Plant signaling & behavior*, 7(1), 75-78.
- Zhang, Y., Butelli, E., & Martin, C. (2014). Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current opinion in plant biology*, 19, 81-90.
- Zhang, Y., Jiang, L., Li, Y., Chen, Q., Ye, Y., Zhang, Y., ... & Tang, H. (2018). Effect of red and blue light on anthocyanin accumulation and differential gene expression in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Molecules*, 23(4), 820.
- Zhang, Y., Xu, S., Cheng, Y., Peng, Z., & Han, J. (2018). Transcriptome profiling of anthocyanin-related genes reveals effects of light intensity on anthocyanin biosynthesis in red leaf lettuce. *PeerJ*, 6, e4607.

Bijlage 1 Inventarisatie van voorbeelden anthocyaanvorming

Foto	Gewas cultivar; plantdeel	Situatie project/praktijk; datum	Licht lichtbron; intensiteit; spectrum; daglengte	Teeltcondities Temperatuur; CO ₂ ; etc.	Overige details & waarnemingen
 	Alstroemeria Cleo (boven) en Forza (onder); Blad	Praktijk; Maart 2019	Hybride (SON-T+LED toplight); ±150μmol/m ² s LED; LED spectrum R/B=95/5%; Daglengte 16-17 uur	Etmaaltemperatuur ca. ±18°C; ±800 ppm CO ₂	Waargenomen tijdens bedrijfsbezoek i.h.k. van project "Monitoring Alstroemeria".

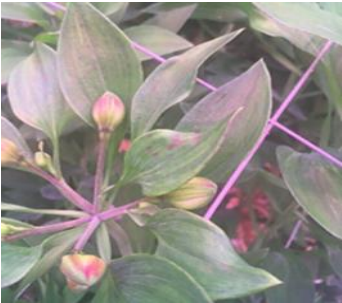
Foto	Gewas cultivar; plantdeel	Situatie project/praktijk; datum	Licht lichtbron; intensiteit; spectrum; daglengte	Teeltcondities Temperatuur; CO ₂ ; etc.	Overige details & waarnemingen
	Alstroemeria; Cleo; Blad	Praktijkbedrijf monitoringsproject, streepjes opwekken; 3 juli 2020	Onbelicht	Nachttemperatuur 17°C; 1800 ppm CO ₂ gedurende de nacht	
	Alstroemeria; Noize; Blad en bloemstelen (foto boven), blad van loze takken (foto onder).	Project Alstroemeria: teelt van de toekomst, dichtbij (KaE); Verkleuring zoals op foto's te zien in periode december 2020 – februari 2021	LED toplight; ±200μmol/m ² s; LED spectrum B/G/R/FR=8/13/67/12%; Daglengte 16 uur	Etmaaltemperatuur 17-18°C; ±800 ppm CO ₂	Verkleuring in sommige takken van Noize waargenomen, maar niet in ras Virginia (een witte). Voor meer informatie zie (García Victoria <i>et al.</i> 2022b).
					

Foto	Gewas cultivar; plantdeel	Situatie project/praktijk; datum	Licht lichtbron; intensiteit; spectrum; daglengte	Teeltcondities Temperatuur; CO ₂ ; etc.	Overige details & waarnemingen
	Alstroemeria; Noize; Blad (Boven) en steel (midden en onder)	Project Alstroemeria en haar lichtcriteria (KaE); Foto's gemaakt januari (bovenste) en februari 2020	LED toplight; ±190µmol/m ² s; 4 verschillende LED spectra: <i>Hoog rood</i> B/G/R/FR=10/6/84/1% <i>Hoog rood +FR</i> B/G/R/FR=9/6/85/14% <i>Hoog blauw wit</i> B/G/R/FR=13/15/72/1% <i>Hoog blauw wit +FR</i> B/H/R/FR=15/14/71/14%; Daglengte 16 uur	Etmaaltemperatuur ±18°C; ±700 ppm CO ₂	Blauw-/paarsverkleuring in blad en steel van sommige takken van Noize waargenomen, maar niet in de andere rassen (Virginia, Jaffa en Elegance). Onder alle spectra werd de verkleuring waargenomen, maar het leek iets erger in het Hoog blauw wit spectrum. In de spectra met verrood was de verkleuring minder dan in de spectra zonder verrood. Wanneer op vaas gezet werden de paarse plekken uiteindelijk necrotisch. Met behulp van (microscopisch) onderzoek is vastgesteld dat de verkleuringen veroorzaakt werden door chlorofylafbraak en anthocyaanvorming. Voor meer informatie zie (Garcia Victoria, 2022a).
					
					

Foto	Gewas cultivar; plantdeel	Situatie project/praktijk; datum	Licht lichtbron; intensiteit; spectrum; daglengte	Teeltcondities Temperatuur; CO ₂ ; etc.	Overige details & waarnemingen
	Potanthurium; Royal Champion Bloemsteel en abaxiale kant van het spathe	Potanthurium teelt in demokas 2030 (KaE); Foto genomen 23 januari 2021	LED toplight; ±250 µmol/m ² /s; LED spectrum B/G/R=8/6/86%; Daglengte 12 uur	Etmaaltemperatuur 22°C; ±500ppm CO ₂	
	Gerbera; Rich; Blad	Project Teelt Gerbera in Balans (KaE); April 2016	SON-T; ±90 µmol/m ² /s; Daglengte 11.5 uur	Etmaaltemperatuur van rond de 15°C was het streven, maar lag in april soms een paar graden hoger; ±600ppm CO ₂	In dit project werden drie teeltbehandelingen getest. Alleen in de teeltbehandeling waar lage etmaaltemperaturen werden aangehouden, ongeacht de lichtsom, werd paarsverkleuring van het blad waargenomen. De paarse bladeren bleken een hoog droge stof gehalte te hebben. Er is geen verdere actie van onderzoek op deze afwijking gezet. De verkleuringen namen niet verder toe en bij het verouderen van deze bladeren zijn ze verdwenen. Voor meer informatie zie (García Victoria, 2017).
	Gerbera; Ladies First; Blad	Gerberateelt in demokas 2030 (KaE); Januari 2022	LED toplight; ±210 µmol/m ² /s; B/G/R/VR=5/6/88/1%; Daglengte 11.5 uur	Etmaaltemperatuur 18-19°C (dagtemperatuur ca. 1°C hoger dan nachttemperatuur); ±600ppm CO ₂	Paarsverkleuring alleen te zien in Ladies First, niet in het ras Kimsey. Dit terwijl ze op dezelfde wijze, onder dezelfde condities, worden geteeld. Door adviseurs en telers gezegd dat het vaker voorkomt in dit ras wanneer temperaturen lager liggen maar er toch wordt belicht of relatief veel natuurlijk licht aanwezig is zoals de winter (in geval van belichte teelt) of het vroege voorjaar.

Foto	Gewas cultivar; plantdeel	Situatie project/praktijk; datum	Licht lichtbron; intensiteit; spectrum; daglengte	Teeltcondities Temperatuur; CO ₂ ; etc.	Overige details & waarnemingen
	Gerbera; Ladies First; Blad	Gerberateelt in demokas 2030 (KaE); Mei 2022	Natuurlijk licht (Er werd niet meer belicht in deze periode)	Etmaaltemperatuur ±22°C; 500-600ppm CO ₂	Net als in januari was (paars-/rood)verkleuring alleen te zien in Ladies First, niet in het ras Kimsey. Paars-/roodverkleuring in het blad ging op andere plekken in het blad samen met vergeling, waarschijnlijk door chlorofylafbraak. Mogelijk werd dit veroorzaakt door een tekort aan sporenelementen ontstaan door storing met het bemestingssysteem. Dit veroorzaakte bladafsterving in Kimsey.
 	Roos; Red Naomi!; Blad, stelen en bloem	Verschillende onderzoeken naar het telen van een "Perfecte Roos" (KaE); Winterperiodes 2016- 17, 2017-18	LED toplight; 190 µmol/m ² /s; twee tralies B/R=4/96% en één tralie B/G/R=8/5/87%; Daglengte 20-24 uur	Etmaaltemperatuur afhankelijk van PARsom maar gemiddeld in winterperiode tussen 18 en 19°C; ±1000ppm CO ₂	Anthocyaanvorming in blad en stelen en bloem (donkere bloemen) ging gepaard met andere kwaliteitsproblemen zoals overmatige bedoorning en onvoldoende bladstrekking ('het syndroom') De verkleuringen traden vooral op in de winterperiodes wanneer het grootste aandeel licht afkomstig was van de LEDs en het meest onder het B/R spectrum. Anthocyaanvorming kon worden tegengaan door het lichtspectrum van de LEDs aan te passen: het vervangen van de lampen met de B/R en B/G/R spectra door lampen met een B/G/R/VR=77/9/5/9% spectrum zorgde ervoor dat er geen/nauwelijks paarsverkleuring meer plaatsvond. Voor meer informatie zie (de Gelder & van der Burg, 2017; de Gelder <i>et al.</i> , 2018; de Gelder <i>et al.</i> , 2022).

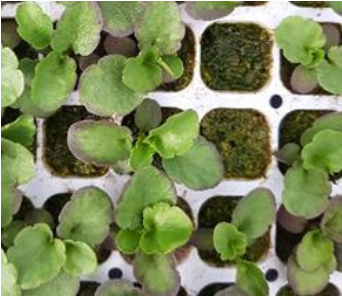
Foto	Gewas cultivar; plantdeel	Situatie project/praktijk; datum	Licht lichtbron; intensiteit; spectrum; daglengte	Teeltcondities Temperatuur; CO ₂ ; etc.	Overige details & waarnemingen
  	Roos; Red Naomi; Blad (boven en onderkant)	Praktijk, Monitoringsproject LED bij roos; Foto's gemaakt op 1 februari 2023	LED toplight		Hybride belichting (LED en SONT) geeft minder paarsverkleuring dan alleen LED.
	Viola wittrockiana; Blad van zaailingen (trayplantjes)	Project Licht en Groei (KaE en Club van 100 WUR glastuinbouw); Foto 27 juni 2022. Teelt onder gesimuleerde wintercondities	LED toplight; 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; B/G/R=35/5/60% of B/G/R=10/5/85%; Daglengte 14 uur	Etmaaltemperatuur 18°C. Temperatuur was constant 18°C of dagtemperatuur was 22°C en nachttemperatuur 14°C.; 600ppm CO ₂	De verkleuring was in de meeste plantjes alleen te zien in de randen van het blad. De verkleuring was alleen zichtbaar in jonge trayplantjes, niet tijdens latere teeltstadia. De verkleuring leek het ergst onder het spectrum met 35% blauw in combinatie met de constant 18°C temperatuurbehandeling. Echter, er zijn geen anthocyanen gemeten.

Foto	Gewas cultivar; plantdeel	Situatie project/praktijk; datum	Licht lichtbron; intensiteit; spectrum; daglengte	Teeltcondities Temperatuur; CO ₂ ; etc.	Overige details & waarnemingen
	Freesia; Corvette; Blad	Project LED licht met de zon mee, Freesia proef (KaE); Januari 2022	LED toplight; Behandelingen: <i>Referentie</i> ±200 µmol/m ² /s; Daglengte 16 uur; B/G/R/FR=8/6/86/0% <i>Laag blauw</i> ±200 µmol/m ² /s; Daglengte 16 uur; B/G/R/FR=4/6/90/0% <i>Hoog blauw</i> ±200 µmol/m ² /s; Daglengte 16 uur; B/G/R/FR=16/6/78/0% <i>Laag verrood</i> ±200 µmol/m ² /s; Daglengte 16 uur; B/G/R/FR=8/6/81/5% <i>Hoog verrood</i> ±200 µmol/m ² /s; Daglengte 16 uur; B/G/R/FR=8/6/76/10% <i>Lagere intensiteit</i> ±135 µmol/m ² /s; Daglengte 16 uur; B/G/R/FR=8/6/86/0% <i>Kortere daglengte</i> ±200 µmol/m ² /s; Daglengte 12 uur; B/G/R/FR=8/6/86/0%	10-12°C (substraat en kasttemperatuur tijdens periode waarin bladverkleuring werd waargenomen); ±600ppm CO ₂	Paarsverkleuring voornamelijk te zien in bladeren van gemiddelde leeftijd van het ras Corvette maar niet/nauwelijks in blad van het ras Soleil. Uit metingen met een multi pigment meter (MPM) bleek de paarsverkleuring veroorzaakt door anthocyanen. Anthocyaanvorming ging samen met vergeling door chlorofylafbraak. Paarsverkleuring in het blad ontstond in periode dat temperatuur verlaagd werd naar 10-12°C. Paarsverkleuring was voornamelijk zichtbaar op plekken die veel direct lichtopvingen. Uit droge stof analyse bleek dat Mg gehalte in paars blad laag was. Door verhoging van temperatuur naar 14°C en aanpassing bemesting werd paarsverkleuring verholpen.
			Er werd een necrosevirus aangetroffen in het gewas dat ook andere type verkleuringen/schade veroorzaakte.		
			Het hoogste % planten met paarse bladeren (27-28%) werd gevonden bij de behandelingen <i>Laag blauw</i> en <i>Hoog verrood</i> . De behandelingen <i>Referentie</i> , <i>Hoog blauw</i> en <i>Laag verrood</i> resulteerde in iets minder planten met paarse bladeren (17-16%) en de minste planten met paars blad werden gevonden bij de behandelingen <i>Lagere intensiteit</i> (9%) en <i>Kortere daglengte</i> (0%).		

Foto	Gewas cultivar; plantdeel	Situatie project/praktijk; datum	Licht lichtbron; intensiteit; spectrum; daglengte	Teeltcondities Temperatuur; CO ₂ ; etc.	Overige details & waarnemingen
	Tomaat; Kop van het gewas (voornamelijk stengeldelen)	Project teelt onder diffuus glas (Spanje); Oktober 2012	Onbelicht	Etmaaltemperatuur ±22°C; 500-600ppm CO ₂	Oktober 2012. Project teelt onder diffuus glas. Spanje. Onbelicht. 19 C, 480 ppm CO ₂ . Assimilaten overschot. Opgelost door temperatuur te verhogen en enkele bladeren te plukken.
					
					

Foto	Gewas cultivar; plantdeel	Situatie project/praktijk; datum	Licht lichtbron; intensiteit; spectrum; daglengte	Teeltcondities Temperatuur; CO ₂ ; etc.	Overige details & waarnemingen
	Aardbei; Favori; Blad- en bloemstelen	Aardbeienteelt in demokas 2030 (KaE); Foto genomen 14 januari 2022	LED toplight; ±250 µmol/m ² /s; Twee verschillende spectra: <i>Spectrum 1</i> B/G/R=5/6/89% <i>Spectrum 2</i> B/G/R=5/6/89% +FR(11%); Daglengte 14 uur	Etmaaltemperatuur ±17°C (dag >18°C/ nacht ±15°C); ±650ppm CO ₂	Een aantal planten onder beide spectra werd bespoten met gibberellinezuur (Novagib GA4/GA7). Deze planten vertoonden roodverkleuring van stelen. Roodverkleuring was veel minder bij planten onder spectrum 2, het spectrum met verrood (FR; onderste foto).
					

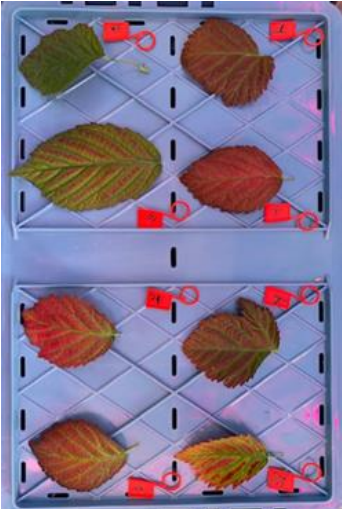
Foto	Gewas cultivar; plantdeel	Situatie project/praktijk; datum	Licht lichtbron; intensiteit; spectrum; daglengte	Teeltcondities Temperatuur; CO ₂ ; etc.	Overige details & waarnemingen
	Braam; Chester en Loch Ness; Blad	Project Nieuw licht op houtig kleinfruit (proeven bij WUR en Delphy); Winterperiode 2018-19	LED toplight of LED top+interlight; 200 µmol/m ² /s top of 90 top en 2x55 inter		Resultaten WUR: In januari 2019: spectrum met verrood: minder chlorofyl, diffuus glas: minder chlorofyl en meer anthocyaan. spectrum met meer blauw: meer anthocyaan Februari 2019: minder chlorofyl en meer anthocyaan. Toename anthocyaan minder onder spectrum met verrood en helder glas Resultaten Delphy: Maart 2019: LED belichting in voorjaar gaf toename anthocyanen. Reductie in chlorofyl gaat gepaard met toename in anthocyaan. Minder bladgroen en meer anthocyaan = minder fotosynthese door lagere efficiëntie. Verrood wel positief voor bladkwaliteit, maar niet voor fotosynthese, netto resultaat lager.
	Soja; Viola en Obelix; stengels, peulen en bladranden	Strategisch project BU Glastuinbouw (WUR) gericht op telen van eiwitrijkgewas in een Vertical Farm en sturen van eiwitgehalte; Juli t/m November 2021	LED toplight (daglichtloos); 500 µmol/m ² /s; Twee verschillende spectra: <i>Controle</i> B/G/R=22/8/70% +FR(14%) <i>Hoog Blauw</i> B/G/R=46/8/46% +FR(9%); Daglengte 13 uur	Temperatuur dag/nacht = 24/22°C of 18/16°C; 800ppm CO ₂	Paarsverkleuring werd in beide cultivars nauwelijks waargenomen bij temperaturen van 24/22°C, onder <i>Controle</i> spectrum. Planten geteeld onder het <i>Hoog Blauw</i> spectrum lieten af en toe paarsverkleuring zien. De planten geteeld bij lagere temperaturen en onder een <i>Hoog Blauw</i> spectrum lieten de meeste paarsverkleuring zien. Het effect van lagere temperaturen op paarsverkleuring in soja lijkt in deze proef sterker dan het effect van lichtspectrum.

Foto	Gewas cultivar; plantdeel	Situatie project/praktijk; datum	Licht lichtbron; intensiteit; spectrum; daglengte	Teeltcondities Temperatuur; CO ₂ ; etc.	Overige details & waarnemingen
 	Medicinale Cannabis; bladsteel	Proef binnen Business to Business Project; November 2021	LED toplight; 1000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; Breed spectrum of spectrum met meer rood, geen FR in spectrum; Daglengte 12 uur	Temperatuur dag/nacht = 26/22°C; 800ppm CO ₂	Opdrachtgevers hebben indruk dat planten met meer paarsverkleuring (anthocyaan) minder vitaal zijn.

Bijlage 2 Input voor de workshop

Voorkomen van paarsverkleuring van het blad

Light event 2023 - Workshop 9

1 februari 2023

Mark van Hoogdalem en Nieves Garcia



LED dringt steeds meer door in de (sier)teelt

- Regelmatig ongewenste paarsverkleuring van blad waargenomen bij telen onder LED bij weinig natuurlijke instraling (proeven en praktijk)
- Oorzaak? Hoe voorkomen?



2

Anthocyanen

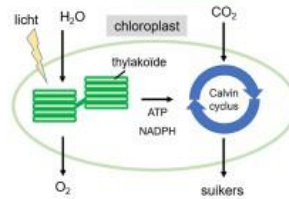
- Meeste niet-groene verkleuring in blad van tuinbouwgewassen veroorzaakt door ophoping anthocyanen
- Anthocyanen variëren in kleur van rood tot paars-blauw
- Functies anthocyanen in het blad:
 - Fotoprotectie: bescherming tegen teveel instraling



3

Wat is teveel instraling?

- Wanneer er fotoinhibitie plaatsvindt
- Fotoinhibitie : afname van fotosynthese doordat er meer fotonen (licht) wordt geabsorbeerd door het blad dan kan worden verwerkt via de fotosynthese.
- Kan ook worden veroorzaakt door beperking in voedingsstoffen, beperkte activiteit enzymen, of te weinig 'sinks'.



Anthocyanen

- Meeste niet-groene verkleuring in blad van tuinbouwgewassen veroorzaakt door ophoping anthocyanen
- Anthocyanen variëren in kleur van rood tot paars-blauw
- Functies anthocyanen in het blad:
 - Fotoprotectie: bescherming bij teveel instraling
 - Absorptie overmatig licht (zonnebrand)
 - Opruimen schadelijke verbindingen (ROS)
 - Bescherming tegen vraat en ziektes
 - Bescherming tegen abiotische stress (zoals droogte en kou)

Anthocyanen: gewenst of ongewenst?

- Waarom gewenst?
 - Verhoging sierwaarde
 - Gezondheid (vruchten)
- Waarom ongewenst?
 - Verminderde sierwaarde
 - Indicatie van assimilatenoverschot of stress → niet-optimale teeltcondities
 - Negatieve effecten op fotosynthesecapaciteit

Project: "Groen of rood gewas: Anthocyaanvorming en Chlorofylafbraak onder LED"

1. Inventarisatie: Wanneer komt het voor? Hoe groot is het probleem? Hoe wordt anthocyaanvorming gereguleerd? Literatuur en ervaringen. Focus op teelt onder LED.
2. Conceptueel kader schetsen: hoe beïnvloeden verschillende teeltfactoren anthocyaanvorming in het blad?
3. Resultaten presenteren en bespreken met stakeholders (Workshop)
4. Conclusies en aanbevelingen voor voorkomen van paarsverkleuring in blad bij telen onder LED en opstellen toetsbare hypothesen voor vervolgonderzoek (rapport, voorstel)



7

Inventarisatie:

Enkele voorbeelden van anthocyaanvorming onder LED

Tabel 5.1 Voorbeelden van anthocyaanvorming in groenten bij het telen onder LED

Foto	Plantensoort	Plantenstand	LED-lichtbron	Teeltomstandigheden	Overige details & vermeldingen
	Rose	Red, Rose	LED light	Temperature: 18-20°C, CO2: 1000 ppm	Anthocyanin formation in leaves of roses under LED light. The leaves show a reddish color, which is characteristic of anthocyanin formation. The leaves are also showing signs of chlorophyll degradation.
	Rose	Red, Rose	LED light	Temperature: 18-20°C, CO2: 1000 ppm	Anthocyanin formation in leaves of roses under LED light. The leaves show a reddish color, which is characteristic of anthocyanin formation. The leaves are also showing signs of chlorophyll degradation.
	Rose	Red, Rose	LED light	Temperature: 18-20°C, CO2: 1000 ppm	Anthocyanin formation in leaves of roses under LED light. The leaves show a reddish color, which is characteristic of anthocyanin formation. The leaves are also showing signs of chlorophyll degradation.



8

Roos

SON-T

Spectrum 95% R 5% B

Rozenspectrum



9

Aardbei

+ GA, spectrum zonder FR



+GA, spectrum met FR



10

Freesia

- Getriggerd door: lage temperatuur, Mg gebrek, spectrum, lange dag (16 uur)
- voorkomen door: korte dag (12 uur), lagere lichtintensiteit, spectrum



11

Alstroemeria

Steel verkleuring
bij spectra
zonder FR



Blad verkleuring ondanks FR
in spectrum.



Hybride SON-T en
LED (95/5)



12

Andere voorbeelden



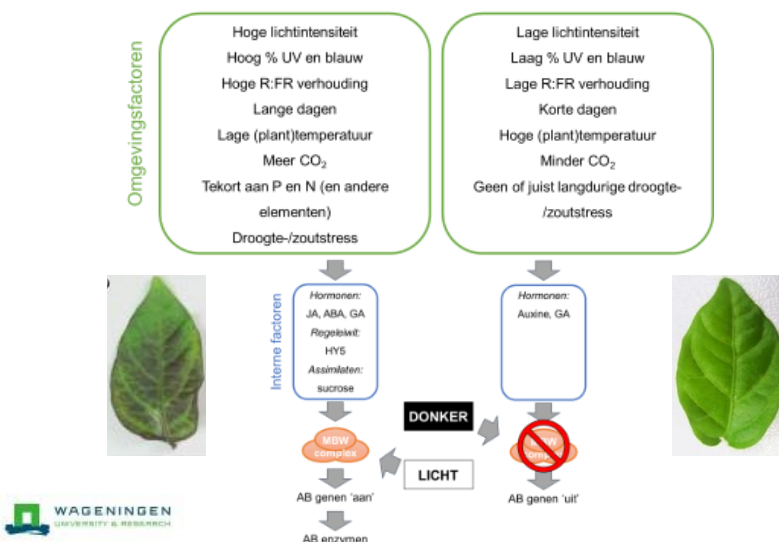
13

Conceptueel kader voor regulatie van anthocyaanvorming in het blad

- Uit meeste voorbeelden blijkt m.n. lichtintensiteit, spectrum en temperatuur effect te hebben.
- Uit literatuur blijken ook andere factoren en onderliggende processen die dit veroorzaken.
- Alle informatie samen gebruikt voor opstellen van conceptueel kader.



14



15

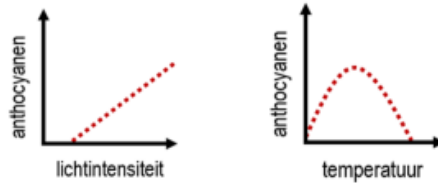
In hoeverre strookt dit kader met jullie waarnemingen, ervaringen en ideeën?

Aantekeningen bij conceptueel kader (1)

- Effect van omgevingsfactoren op anthocyaanvorming niet zwart/wit
- Voorbeelden:

Anthocyaanvorming neemt toe naarmate lichtintensiteit toeneemt

Er is een optimale temperatuur voor anthocyaanvorming

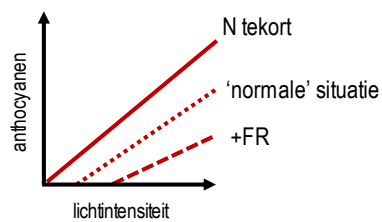


Aantekeningen bij conceptueel kader (2)

- Er is interactie tussen omgevingsfactoren
- Voorbeelden:

Het effect van lichtintensiteit op anthocyaanvorming is sterker bij een tekort aan stikstof (N) ...

... maar minder sterk wanneer het spectrum meer verrood licht bevat



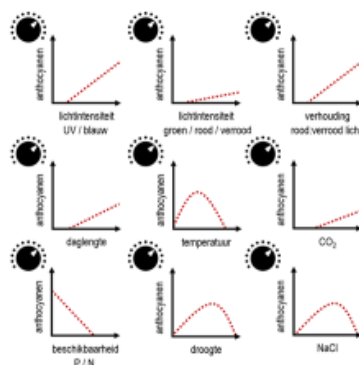
Aantekeningen bij conceptueel kader (3)

- Exacte effect van omgevingsfactoren op anthocyaanvorming hangt af van:
 - Soort
 - Cultivar
 - Ontwikkelingsstadium
- Interne factoren gereguleerd door de circadiaanse klok: effect van omgevingsfactoren op anthocyaanvorming mogelijk tijdstip -afhankelijk
 - Effect starten of eindigen met natuurlijk licht?

Voorkomen (verhelpen) van paarsverkleuring van het blad?

- Oorzaak vaak combinatie van factoren.
- Verschillende mogelijkheden waar men op kan sturen, maar hoe precies kan per situatie verschillen.

Energie-efficiënte mogelijkheden om anthocyaanvorming te voorkomen of verhelpen?



Een aantal opties voor opwekken / voorkomen

- CO₂
- Daglengte
- Moment van belichten
- Voeding (N of P, spore elementen?)
- RH/VD?

Bedankt voor uw aandacht

Vragen?

mark.vanhoogdalem@wur.nl

nieves.garcia@wur.nl



To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen University & Research,
BU Glastuinbouw
Postbus 20
2665 ZG Bleiswijk
Violierenweg 1
2665 MV Bleiswijk
T +31 (0)317 48 56 06
www.wur.nl/glastuinbouw

Rapport WPR-1204

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.