

Verlaging van de zuurstofspanning in combinatie met een besmette voedingsoplossing (in het kader van onderzoek naar wortelverdikking bij komkommer)

M. Blom-Zandstra & L. Baan Hofman-Eijer

ab-dlo

Inhoudsopgave

	pagina
Samenvatting	1
Vraagstelling	3
1. Variatie van de zuurstofconcentratie in het wortelmilieu en gebruik van 'besmet' water van het PBG	5
1.1 Materiaal en methode	5
1.1.1 Opkweek	5
1.1.2 Beperking O ₂ -concentratie in het wortelmilieu	5
1.1.3 Chlorofylgehalte en -fluorescentie	7
1.1.4 Beoordeling van de wortels door een panel	7
1.1.5 Objectiviteit panelleden	7
1.2 Resultaten	8
1.2.1 Groei van de spruit	8
1.2.2 Chlorofylgehalte en fluorescentie	9
1.2.3 Uiterlijk van de wortels	10
1.3 Discussie	12
2. Microscopisch onderzoek	15
2.1 Materiaal en methode	15
2.2 Resultaten	15
2.2.1 Uiterlijke kenmerken	15
2.2.2 Weefselkarakteristieken	17
2.2.3 Algemene indruk preparaten met verdikt wortelmateriaal	19
2.3 Discussie	19
2.3.1 Conclusie	20
3. Perspectieven voor toekomstig onderzoek	21
3.1 Mechanistisch onderzoek	22
3.1.1 Besmette voedingsoplossing: DNA-fingerprinting van 1) besmet water en 2) zieke planten	22
3.1.2 Denitrificatie, nitrietvorming en kasluchtkwaliteit	22
3.1.3 Non-invasieve metingen wortelverdikking	23
3.2 Praktijkwaarnemingen	23
3.2.1 Inventarisatie omgevingsfactoren	23
3.3. Aanpassingen op praktijkniveau	24
3.3.1 HCN-productie door pseudomonaden	24
4. Literatuur	25
5. Bijlagen	
Bijlage I	1 p.
Bijlage II	1 p.
Bijlage III	1 p.

Samenvatting

In deze studie is gekeken naar het effect van verlaagd zuurstofgehalte in het wortelmilieu op het ontstaan van wortelverdikking bij komkommerplanten. Een aantal verschillende zuurstofconcentraties is getest in combinatie met twee verschillende watergeefregiems (eb/vloedsysteem, druppelbevloeiing). Bovendien is gekeken naar het effect van een combinatie van lage zuurstofspanning en het geven van een 'besmette' voedingsoplossing die vanuit het Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente (PBG) in Naaldwijk is aangevoerd. De wortels van de behandelde planten zijn door een extern panel beoordeeld op het optreden van kringeling, glazigheid en wortelverdikking. Als interne controle is aan de proefplanten een aantal planten met geringe en zeer uitgesproken wortelverdikking toegevoegd, die bij een teler waren opgehaald.

Hoewel de panelleden onderling verschillen bleken aan te geven in de mate van verdikking, werd de wortelverdikking van de zieke planten wel consequent als verdikking aangemerkt. Lage zuurstofspanning had kringeling tot gevolg, maar geen duidelijke wortelverdikking. Ook de behandeling met besmet water in combinatie met lage zuurstofspanning resulteerde niet in het optreden van wortelverdikking.

Daarnaast is een microscopische studie verricht aan planten die wortelverdikking in verschillende stadia vertoonden. Daarbij is ook gekeken naar de vitaliteit van het weefsel aan de hand van UV-fluorescentie-microscopie. Uit deze studie kan worden geconcludeerd dat het optreden van wortelverdikking waarschijnlijk primair wordt geïnitieerd in de cortexcellen van groeiend weefsel. Eerst treedt buitenproportionele celvergroting en intracellulaire decompartmentalisatie op, waarna de epidermis scheurt en het weefsel kwetsbaar wordt voor pathogenen.

De hypothese wordt besproken dat initiatie van wortelverdikking plaatsvindt wanneer omgevingsfactoren (voornamelijk lichtintensiteit en temperatuur) veranderen, waardoor er aanpassingen in groei en ontwikkeling van de plant moeten plaatsvinden. Om uit te zoeken hoe onder veranderende uitwendige omstandigheden wortelverdikking optreedt, moet gekozen worden voor een geïntegreerde aanpak. Er worden aanbevelingen gedaan voor vervolgonderzoek op basis van huidige kennis vanuit het bodembioologisch en luchtverontreinigingsonderzoek.

Vraagstelling

Het optreden van wortelverdikking bij komkommer is de laatste jaren een toenemend probleem in de Nederlandse glastuinbouw. Het verschijnsel gaat over het algemeen gepaard met het optreden van wortelkringeling, waarbij niet duidelijk is of de kringeling een stadium is dat vooraf gaat aan verdikking of dat de kringeling een nevenfenomeen is. Bij planten met problemen van wortelverdikking is de groei van de bovengrondse delen geremd en de vruchtproductie sterk afgenomen. Het is onduidelijk of en, zo ja, hoe het fenomeen zich van de ene plant naar de andere verspreid en in hoeverre er herstel mogelijk is. Zodra het probleem wordt geconstateerd, besluiten telers in het algemeen om de hele teelt op te ruimen, hetgeen tot enorme economische verliezen leidt.

Het is onduidelijk welke primaire factor of factoren verantwoordelijk zijn voor het optreden van wortelverdikking. Een uitgebreide meetcampagne door TNO bij verschillende bedrijven met of zonder wortelverdikkingsproblemen (Heimovaara, 1997) was aanleiding voor het formuleren van een aantal factoren die mogelijk de oorzaak zijn van wortelverdikking bij komkommer; daarvan waren (locaal) zuurstofgebrek en (locale) ethyleenproductie de belangrijkste.

Op verschillende onderzoeksinstellingen in Nederland is onderzoek gestart naar het effect van deze factoren op wortelverdikking bij komkommer. AB-DLO is begonnen met onderzoek naar het effect van verlaagde zuurstofspanning. In een eerste serie experimenten veroorzaakte verlaagde zuurstofspanning heel duidelijk kringeling, maar geen wortelverdikking. Omdat niet is aangetoond of wortelkringeling werkelijk een voorstadium is van wortelverdikking, is in deze studie gekeken naar nog lagere zuurstofspanningen en een combinatie van lage zuurstofspanning met een 'besmette' voedingsoplossing van het PBG.

Daarnaast is een microscopische studie verricht naar ziek wortelmateriaal. Hiervoor is materiaal gebruikt van verschillende leeftijden, waarbij het stadium van wortelverdikking sterk verschilde, om zo inzicht te krijgen in de dynamiek van de processen die tijdens wortelverdikking worden doorlopen. Met behulp van UV-fluorescentie is de vitaliteit van gezond en aangetast weefsel bestudeerd.

1. Variatie van de zuurstofconcentratie in het wortelmilieu en gebruik van 'besmet' water van het PBG

Er zijn twee experimenten gedaan waarin de zuurstofconcentratie is gevarieerd. In het eerste experiment is dit gecombineerd met twee watergeefregiems: een eb/vloed-systeem en druppelbevloeiing om verschillen in waterstatus binnen de steenwol te bewerkstelligen. In het tweede experiment zijn enkele zuurstofspanningen gecombineerd met 'besmet water' van het PBG. Een indicatie voor het optreden van wortelverdikking is een achterblijvende groei en mogelijk een veranderende chlorofylfluorescentie als gevolg van stress (Ketel & Lotz, 1998). Er bestaat nog geen objectieve meetmethode voor wortelverdikking. In deze studie is gebruik gemaakt van het oordeel van enkele experts, die in de praktijksituatie veel te maken hebben met het fenomeen wortelverdikking.

1.1 Materiaal en methode

1.1.1 Opkweek

Komkommerplanten (*Cucumis sativus* L. cv. Europa) werden gezaaid in steenwolblokjes en aangeaard met kokos. Na 16 dagen werden ze overgezet in bakken, die zodanig werden afgesloten met plastic (boven wit, onder zwart; Foto 1) dat de blokjes met wortelstelsel konden worden begast.

1.1.2 Beperking O₂-concentratie in het wortelmilieu

In een eerste experiment vond gedurende 16 dagen permanente begassing plaats met vijf percentages O₂: 0, 2,5, 5,0, 10,0 en 20,0% (gerealiseerd door bijmengen van lucht met stikstof (Foto 2)). De samenstelling van de uitgaande begassingslucht werd regelmatig gecontroleerd met behulp van een O₂-electrode verbonden met een recorder (Foto 3).

Planten kregen de eerste week van de behandeling twee maal voedingsoplossing en de tweede week drie maal volgens twee watergeefregiems:

- eb/vloed
- druppelen

In een tweede experiment vond gedurende 16 dagen permanente begassing plaats met drie percentages O₂: 2,5, 10,0 en 20,0%. De begaste planten kregen twee soorten voedingsoplossing toegediend via een eb/vloedsysteem:

- een normale Steiner-oplossing
- of • een besmette voedingsoplossing van het PBG-Naaldwijk (beide voedingsoplossingen waren voor toediening geëereerd).

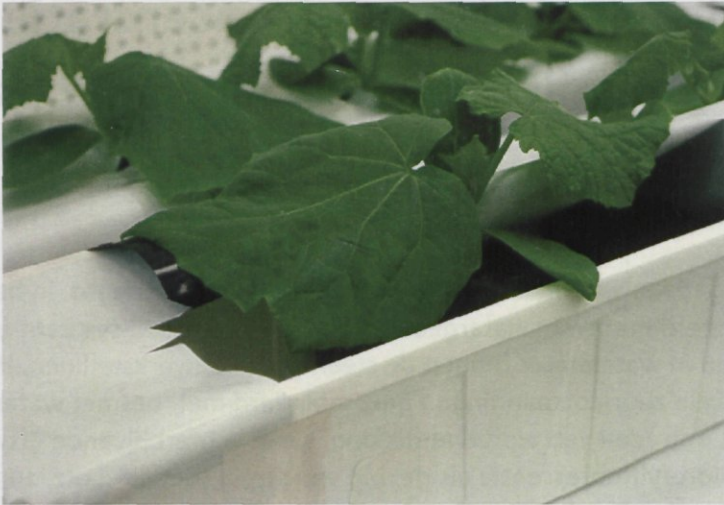


Foto 1 Komkommerplanten geplaatst in bakken, die luchtdicht zijn afgesloten met plastic.

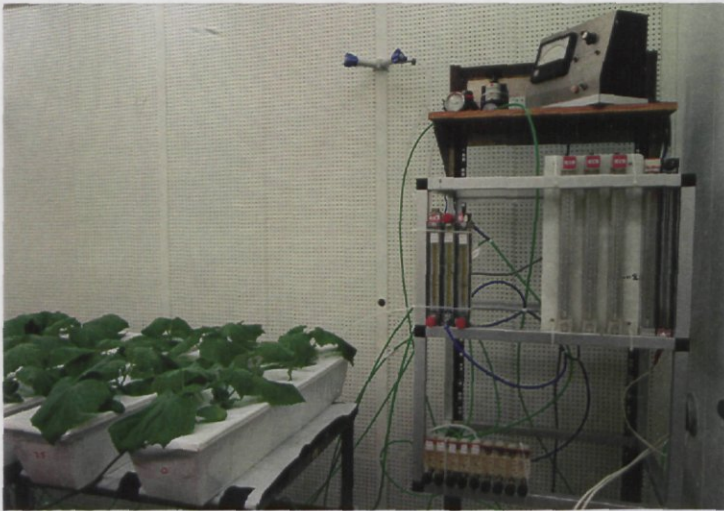


Foto 2 De wortelstelsels worden permanent begast met verschillende zuurstofconcentraties.



Foto 3 On-line controle van de zuurstofconcentratie van de begassingslucht met behulp van een zuurstofelektrode.

In het tweede experiment werd bovendien een aantal planten geteeld in open bakken (vergelijkbaar met de praktijksituatie) in combinatie met de twee soorten bovengenoemde voedingsoplossingen.

In beide experimenten werden vijf herhalingen per behandeling gebruikt.

1.1.3 Chlorofylgehalte en -fluorescentie

Tijdens de behandeling zijn periodiek de chlorofylgehalten van de bladeren (> 2 cm) bepaald met behulp van een SPAD-meter.

Chlorofylfluorescentie van de bladeren is gemeten mbv een MLHD-methode.

1.1.4 Beoordeling van de wortels door een panel

Planten werden willekeurig over de hele populatie genummerd. Bij de oogst werd de spruit zo laag mogelijk in het zaaigat van het steenwolblokje afgesneden, gewogen en gedroogd voor een droge-stofbepaling. De steenwolblokjes met wortelstelsel werden verticaal (dwars door het zaaigat) in tweeën gesneden en de ene helft van elk blokje werd ter beoordeling aangeboden. Bij aanvang van de beoordeling hebben de leden van het panel (zie onder) enkele blokken gezamenlijk bekeken om de criteria onderling af te stemmen. Vervolgens kreeg elk panellid de totale populatie ter beoordeling. De beoordelaars zaten op enige afstand van elkaar en spraken onderling niet over de beoordeling. De wortels werden beoordeeld op: kringeling, verdikking en glazigheid middels het aangeven van een score van 0 (geen symptomen) tot 3 (zeer overtuigende symptomen). De overgebleven helften van de steenwolblokjes zijn gebruikt voor het maken van foto's.

De beoordelaars waren:

Experiment 1:

- L. Breedveld, Hagelunie
- R. van der Heijden, PBG-Naaldwijk

Experiment 2:

- A. van de Broek, NAKG
- R. van der Heijden, PBG-Naaldwijk
- J. Boersma, DLV*

1.1.5 Objectiviteit panelleden

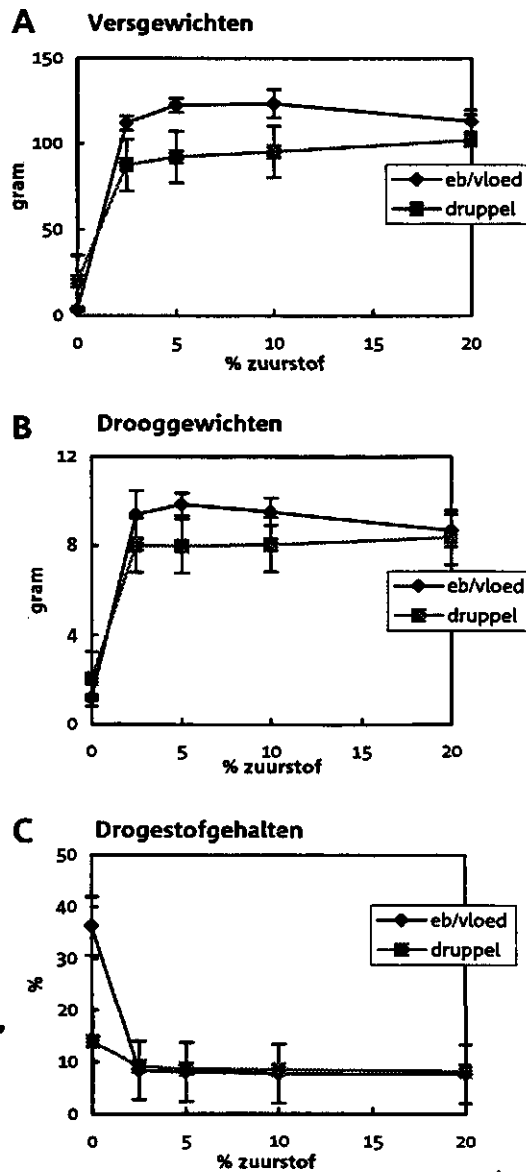
Voor een evaluatie van de objectiviteit van de beoordelaars is ook een aantal aangetaste planten (vijf met een zeer uitgesproken besmetting en drie met een geringe aantasting) bij een kweker/teler gehaald. De naam van deze kweker/teler was door een medewerker van The Greenery doorgegeven. De planten zijn op vergelijkbare wijze verwerkt als de planten uit de experimenten. De halve steenwolblokjes zijn tussen de behandelde planten geloot en tegelijkertijd aangeboden aan de panelleden.

* Deze beoordelaar gebruikte overeenkomstig zijn gewoonte een loep

1.2 Resultaten

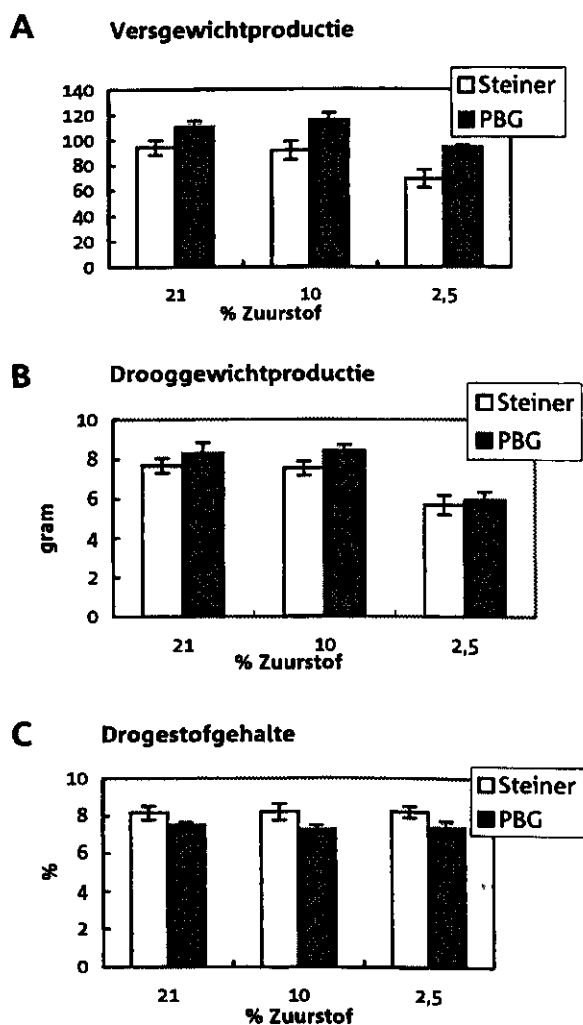
1.2.1 Groei van de spruit

In het eerste experiment had een O_2 -gehalte van 2,5 en hoger geen significant effect op de vers- en drooggewichten van de planten (Fig. 1A en B). Bij 0% zuurstof was de groei ernstig vertraagd. Het watergeefregiem had wel effect op de groei. De planten die via het druppelsysteem voedingsoplossing hadden gekregen, groeiden minder snel dan degene, die met een eb/vloed-systeem waren bevochtigd. De droge-stofgehalten verschilden niet tussen beide groepen (Fig. 1C).



Figuur 1 Versgewichten (A), drooggewichten (B) en percentages droge stof (C) van de bovengrondse delen van de komkommerplanten in relatie tot de zuurstofconcentratie waarbij de planten gedurende twee weken zijn behandeld. Er is op twee manieren voedingsoplossing toegediend zoals weergegeven in de figuur.

In het tweede experiment was geen duidelijk verschil in groei waarneembaar tussen een zuurstofgehalte van 10% of 20% (Fig. 2). Bij 2,5% zuurstof was zowel vers- als drooggewichtproductie enigszins lager. Het soort voedingsoplossing had wel effect op de groei. De planten die werden voorzien van PBG-‘water’ vertoonden een hogere vers- en drooggewichtproductie dan degenen die Steiner-oplossing kregen. De droge-stofpercentages waren echter significant lager.



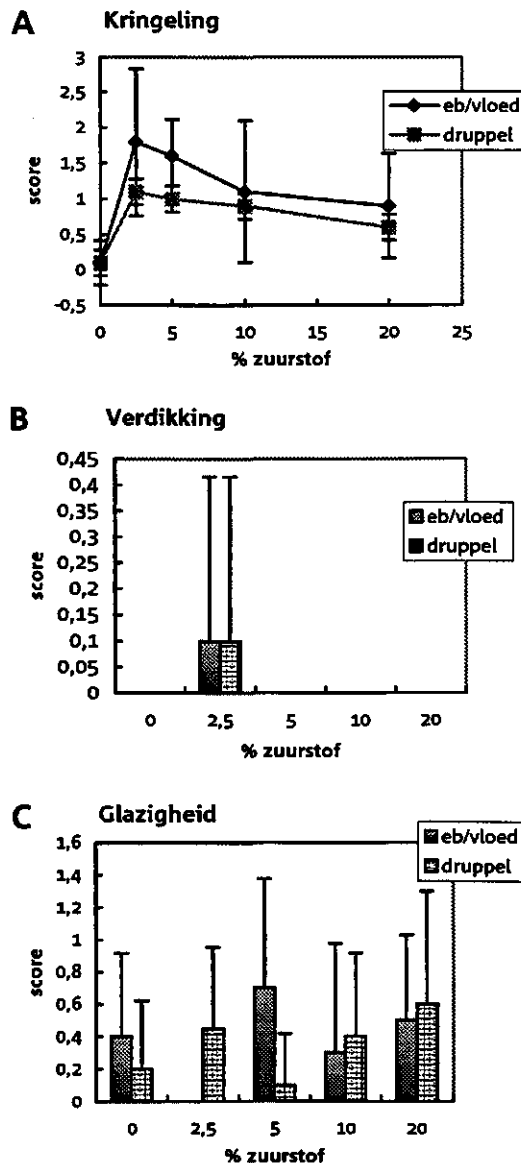
Figuur 2 Versgewichten (A), drooggewichten (B) en percentages droge stof (C) van de bovengrondse delen van de komkommerplanten in relatie tot de zuurstofconcentratie waarbij de planten gedurende twee weken zijn behandeld. De planten hebben een normale Steiner-voedingsoplossing gehad of zijn voorzien van voedingsoplossing met ‘besmet’ water van het PBG uit Naaldwijk.

1.2.2 Chlorofylgehalte en fluorescentie

Het chlorofylgehalte en de chlorofylfluorescentiemetingen gaven hele wisselende getallen, afhankelijk van de bladstage waaraan de metingen werden uitgevoerd (gegevens niet getoond). Er waren echter geen duidelijke verschillen te zien tussen de behandelingen (zie Bijlage I).

1.2.3 Uiterlijk van de wortels

De beoordeling van steenwolblokjes met wortels door het panel na het eerste experiment is gemiddeld en weergegeven in Figuur 3. De beoordelingen verschilden sterk tussen de verschillende beoordelaars (zie Bijlage II). De mate van kringeling nam toe met afnemende zuurstofspanning (Fig. 3A). De kringeling bij 2,5% vertoonde het karakteristieke 'kurkentrekker'-patroon (overzicht wortelstelsel: Foto 4; detail: Foto 5). Een effect van watergeef-regiem op het optreden van kringeling werd slechts door één beoordelaar waargenomen. Wortelverdikking (Fig. 3B) werd slechts door één beoordelaar in twee blokjes (2,5% O₂) waargenomen (voor gegevens individuele beoordelaars: zie Bijlage II). Glazigheid (Fig. 3C) werd heel duidelijk waargenomen, maar de score vertoonde geen correlatie met de zuurstofspanning.



Figuur 3 Het optreden van kringeling (A), verdikking (B) of glazigheid (C) nadat de wortels gedurende twee weken een behandeling met verschillende zuurstofconcentraties hebben gehad.



Foto 4 Het wortelstelsel van een komkommerplant dat onderuit het steenwol is gegroeid. Plant behandeld met 2,5% zuurstof en bevochtigd met behulp van een eb/vloed-systeem.



Foto 5 Een uitgeprepareerd stukje wortel van het wortelstelsel weergegeven op foto 4.

Tabel 1 Beoordeling van kringeling, verdikking en glazigheid door drie panelleden.

Algemene informatie	Soort voedingsopl.	% O ₂	Baknr	Score					
				kringeling		verdikking		glazigheid	
				gemidd.	s.d.	gemidd.	s.d.	gemidd.	s.d.
Begassingsexperiment en doordrenkt via eb/vloed-systeem	Steiner	21	3	1,3	1,00	0,7	0,62	0,7	0,90
		10	4	1,3	1,03	0,3	0,62	0,5	0,52
		2,5	5	1,9	1,06	0,3	0,49	0,3	0,62
	PBG	21	8	1,5	0,83	0,7	0,82	1,2	0,73
		10	9	1,3	1,05	0,5	0,64	0,8	0,41
		2,5	10	1,8	0,80	0,4	0,84	0,9	0,86
	Gekregen zieke planten		7	1,3	0,59	2,1	0,74	2,3	0,59
	Op weg naar ziek		2	1,3	0,50	1,2	1,20	2,0	0,71
	Met PBG-water behandeld		6	0,8	0,41	0,3	0,46	0,9	0,46
Met Steiner behandeld		1	1,0	0,68	0,5	0,61	0,9	0,59	

De beoordelingen na het tweede experiment zijn eveneens gemiddeld en weergegeven in Tabel I. Ook in deze evaluatie verschilde de beoordeling tussen de verschillende beoordelaars (zie Bijlage II). DLV gaf over het algemeen een hogere score dan NAKG en PBG. De mate van kringeling nam iets toe met afnemende zuurstofspanning, alhoewel dit duidelijker werd waargenomen bij planten die de normale voedingsoplossing hadden gekregen dan in planten die waren behandeld met PBG-water. De kringeling bij 2,5% vertoonde het karakteristieke 'kurkentrekker'-patroon. Het was opvallend dat in de controleplanten (baknrs. 3 en 1) ook een zekere mate van kringeling werd waargenomen. Wortelverdikking werd duidelijk waargenomen in de zieke planten (en ernstiger beoordeeld door DLV dan door de twee andere panelleden; zie Bijlage II). In de begaste planten was deze waarneming minder duidelijk. Glazigheid werd ook duidelijk waargenomen in de zieke planten en eveneens minder duidelijk in de begaste planten.

1.3 Discussie

De behandelingen met een verlaagde zuurstofconcentratie in combinatie met verschillende watergeefregiems of al of niet besmet water van het PBG hebben enige effecten op de groei. Vooral een zuurstofspanning van 2,5% vertraagt de groei enigszins, zoals verwacht kon worden. Het was verassend dat het besmette PBG-water een stimulering van de groei tot gevolg had. Blijkbaar kwamen de planten niet in een stress-situatie, zoals ook wordt bevestigd door de resultaten van de chlorofylfluorescentiemetingen.

De interactie tussen verlaging van de zuurstofspanning en twee watergeefregiems of de combinatie met het 'besmette' water van het PBG heeft eveneens geen invloed op de vorming van dikke wortels. Uit de resultaten van de beoordelingen blijkt duidelijk dat een verlaging van de zuurstofspanning heel duidelijk kringeling oproept, maar geen wortelverdikking. Dit komt ook overeen met de resultaten die men in Nijmegen heeft verkregen bij de studie van het effect van

ethyleen op wortelverdikking. Daarom is het dan ook zeer twijfelachtig of kringeling wel een voorloper is van wortelverdikking.

Een beoordeling op wortelverdikking is een moeilijk te objectiveren eenheid. Discussies tijdens bijeenkomsten van onderzoekers en leden van de stuurgroep over relevante uiterlijke kenmerken (vgl. gesprek hierover op de KUN op 6 okt. '98) geven aan dat het lang niet altijd duidelijk is wanneer een afwijkende wortelmorfologie nu iets met het probleem 'wortelverdikking' te maken heeft. De Grower (20 augustus 1998, Vol. 130 (9), p. 24) beschrijft een fenomeen dat zich al jaren bij komkommer en sinds kort ook bij tomaat in Engeland en Frankrijk voordoet. Deze afwijking wordt omschreven als 'root mat disease' en wordt toegeschreven aan een infectie door *Agrobacterium biovar I rhizogenic*, maar men veronderstelt dat het probleem in Nederland toch van een andere aard is. De beoordeling door het panel heeft toch een redelijk eenduidig resultaat opgeleverd. Vooral de check met het 'zieke' materiaal uit de praktijk, waarbij significant hoger werd gescoord op wortelverdikking en glazigheid, geeft aan dat een dergelijke methode geschikt is voor een studie naar wortelverdikking. De beoordelaars verschilden onderling in benaderingswijze (met of zonder loep bijvoorbeeld), waardoor onderlinge verschillen tussen de beoordelaars ook tamelijk groot waren en grote standaardafwijkingen opleverden. De proeven waren echter zodanig opgezet dat elke beoordelaar zichzelf controleerde, waardoor er een statistisch betrouwbaar behandelingseffect kon worden bepaald.

Waarschijnlijk is het optreden van wortelverdikking een veel ingewikkelder proces en zijn er meerdere factoren nodig om de afwijkende wortel- of celgroei te induceren. Eén van de factoren die een rol kan spelen is de steenwol. Van steenwol is onduidelijk of de chemische en fysische eigenschappen een rol spelen bij de vorming van wortelverdikking. Deze factor is in de proeven echter al impliciet meegenomen en heeft dus geen overheersende rol in het oproepen van wortelverdikking. Een factor die echter wel principiële anders is in de klimaatkamerproeven is het dagelijks terugkerende, voortdurend veranderen van de omgevingsfactoren. In het dynamische milieu van de kas zal de plant zich voortdurend aanpassen en nieuwe 'steady-state' situaties creëren. Wanneer paprikaplanten worden overgezet van 15°C naar 25°C, blijkt dat de netto fotosynthese gedurende ongeveer een dag aanmerkelijk wordt verlaagd (F. Maas, pers. comm.). Voor erwt is aangetoond dat na een temperatuursovergang van 25°C naar 32°C de primaire wortelgroei wordt vertraagd en de initiatie van laterale worteltjes wordt geremd (Gladish & Rost, 1993). Deze tijdelijke groeivertragingen kunnen dus in combinatie met momentaan veranderend watertransport door de plant en veranderende aanvoer van assimilaten of nutriënten belangrijke gevolgen hebben voor de celontwikkeling in groeiende delen. Door de complexiteit van veranderingsprocessen zijn in het huidige stadium de consequenties voor de plant- of wortelontwikkeling moeilijk te overzien. Het is wel de moeite waard om aan de hand van gegevens over weersveranderingen in het verleden en gegevens over het optreden van problemen van wortelverdikking aanwijzingen gevonden kunnen worden voor een relatie tussen veranderingen van omgevingsfactoren en het ontstaan van dikke wortels. Hiervoor zou te rade kunnen worden gegaan bij DACOM in Emmen, waar men beschikt over veel data over komkommerteelten van de afgelopen jaren.

2. Microscopisch onderzoek

Een karakterisering van wortelverdikking op cellulair niveau door middel van microscopische studies is al meermalen door enkele onderzoeksgroepen uitgevoerd (Verkerke & Kersten, 1997; Heimovaara, 1997; Pierik & Visser, 1998). Het is duidelijk dat de afwijkingen in celgrootte vooral de cortexcellen van de wortel betreffen; scheuring van de epidermis is duidelijk in beeld gebracht en de aanwezigheid van een grote hoeveelheid micro-organismen in aangetast materiaal is zeer duidelijk aangetoond. Het is echter nog niet duidelijk in welke volgorde de groei-afwijkingen optreden, zodat ook nog geen helder beeld is ontstaan over de primaire aanleiding voor celvergroting en scheuren van weefsel.

In deze studie is gebruik gemaakt van UV-fluorescentie-microscopie om een beter beeld te krijgen van de vitaliteit van cellen en de intracellulaire decompartmentalisatie tijdens de wortelverdikking. Daarbij is met name materiaal gebruikt van verschillende leeftijden en verschillende stadia waarin de wortelverdikking zich bevond. Door het volgen van de veranderingen in vitaliteit van de cellen is een reconstructie gemaakt van de vervolgprocessen in het ontstaan van dikke wortels.

2.1 Materiaal en methode

Aangetast plantmateriaal van ca. 3 weken en 6 weken oude komkommerplanten is aan AB-DLO aangeboden door een teler en bewaard in de steenwolblokjes en stukken van de steenwolmat bij 10°C. Voor microscopische studie werd het materiaal vers aangesneden en in een fosfaatbuffer (2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 139 mM NaCl, 16 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4) gelegd. De preparaten werden bekeken onder de binoculair of lichtmicroscop. In de lichtmicroscop werden zowel golflengten in het zichtbare gebied (400-700 nm) als in het UV-gebied (excitatie 400-440 nm; emissie 470 nm) gebruikt.

2.2 Resultaten

2.2.1 Uiterlijke kenmerken

De wortelverdikking had enkele verschillende uiterlijke vormen, afhankelijk van de leeftijd van de planten en het stadium van de wortelverdikking (Foto 6-8):

- zeer lokale en plotselinge verdikking van de wortel,
- geleidelijke verdikking,
- in ouder weefsel en een verder stadium van wortelverdikking was callusvorming zichtbaar als kralen die op regelmatige afstand van elkaar voorkwamen. De callusvorming was ontstaan op plaatsen waar een zijwortel was afgebroken en een nieuwe, korte zijwortel zich had ontwikkeld.

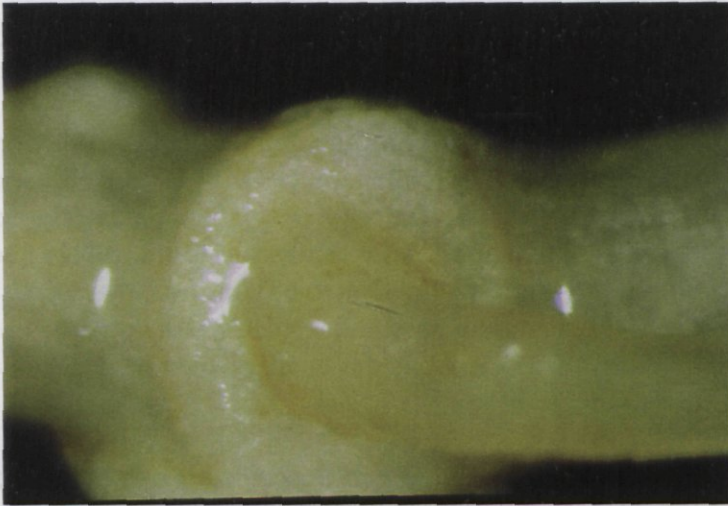


Foto 6 Callusvorming op een stukje wortel waar de zijwortel is afgebroken en een nieuwe zijwortel is bijgegroeid. Opname gemaakt met een binoculair.



Foto 7 Wortelverdikking en -kringing bij komkommer, geobserveerd door een binoculair.

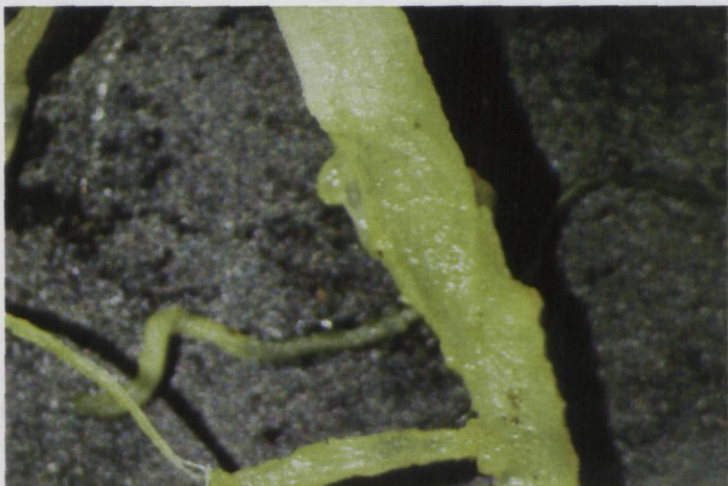


Foto 8 Wortelverdikking en glazigheid bij komkommer, geobserveerd door een binoculair.

2.2.2 Weefselkarakteristieken

Gezonde stukken wortel vertoonden een karakteristiek fluorescentiepatroon (Foto 9), zoals het oplichten van xyleembanen en de groeipunt. Dit patroon werd onderbroken in de zones waar wortelverdikking optrad. Verdikking trad op in de cortexcellen (Foto 10), terwijl de centrale cilinder volledig intact bleef. Gezonde wortelcellen waren langwerpiger, maar in de verdikte zone werden de cellen ronder. De vergrootte cellen in het jonge aangeyaste materiaal waren duidelijk nog intact (ook de celwand). In het iets oudere materiaal was op de plaatsen van wortelverdikking het fluorescentiepatroon waziger geworden. Daar waren in de cellen minder duidelijk compartementen te onderscheiden, zoals de vacuole, die in gezonde cellen prominent te zien is.

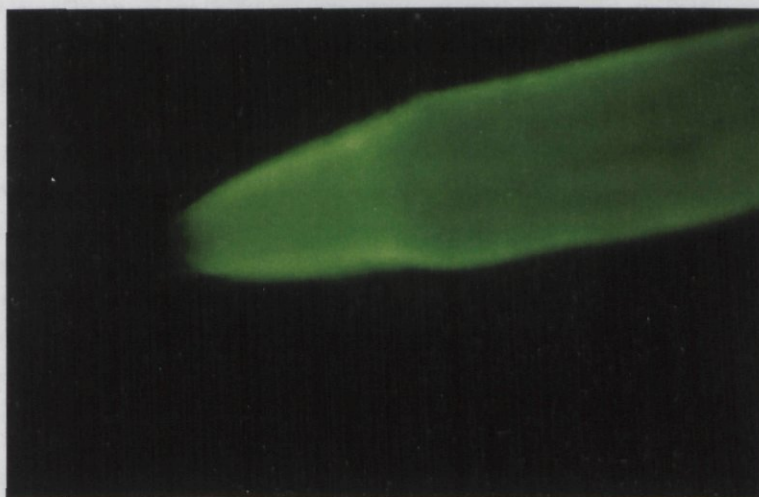


Foto 9 Een actief en vitaal groeipunt van een komkommerwortel met karakteristiek fluorescentiepatroon, geobserveerd met een fluorescentiemicroscoop.

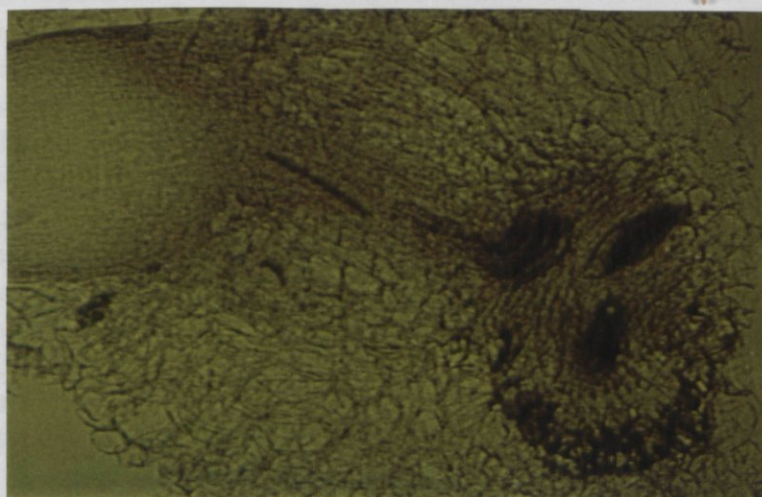


Foto 10 Celvergroting van de cortexcellen in de zone, waar een zijwortel zich heeft ontwikkeld, geobserveerd met een lichtmicroscoop.

In het nog oudere weefsel was de samenhang tussen de cellen soms verdwenen. De cellen lagen soms los en er zaten scheuren in de cortex als gevolg van een sterke vergroting van de cortex-cellen. In een aantal gevallen was duidelijk lucht in het weefsel aanwezig (Foto 11), waardoor de wortel een glazig uiterlijk kreeg. Het zijn echter niet de intercellulaire ruimtes, die vergrootten. Deze werden door de zwelling van de cellen juist dichtgedrukt.

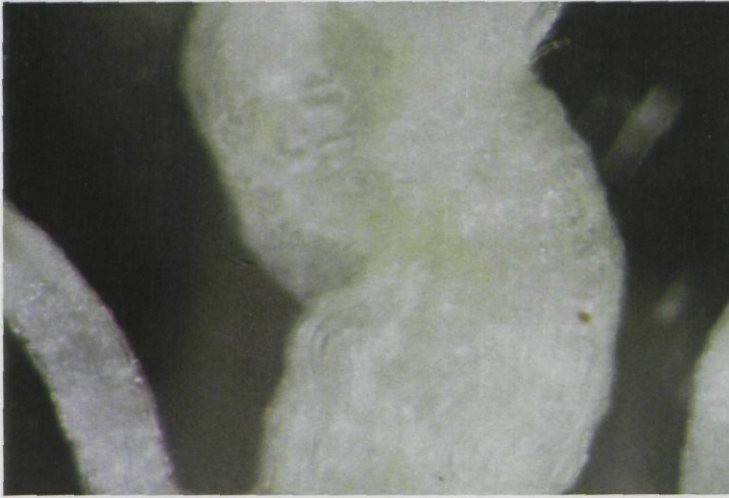


Foto 11 Wortelverdikking met karakteristieke luchtophoping, geobserveerd met een binoculair.

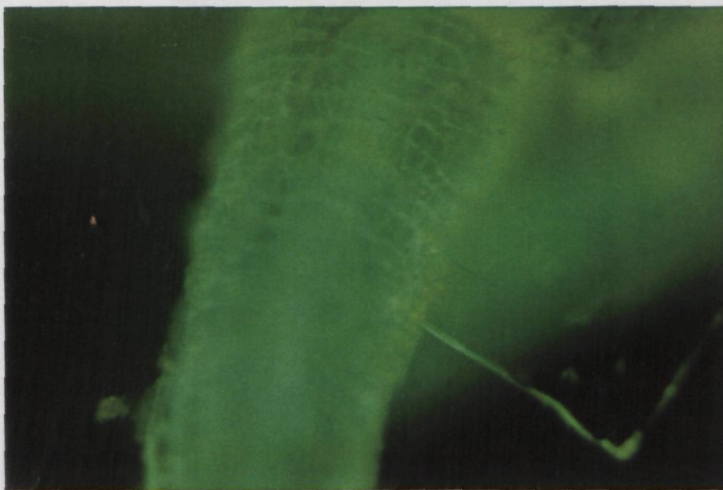


Foto 12 Karakteristiek fluorescentiepatroon van een vitale wortel van komkommer, waarin een stukje steenwol is vergroeid, geobserveerd met een fluorescentiemicroscoop.

2.2.3 Algemene indruk preparaten met verdikt wortelmateriaal

De preparaten bevatten zeer veel niet-stekeldragende aaltjes en een aantal eencellige organismen, waarschijnlijk pantoffeldiertjes. In de wortels zaten heel duidelijk steenwolnaalden geprikt, die heel scherp oplichtten onder de UV-lamp. In een aantal gevallen waren de naalden vergroeid met de wortel en staken dwars door de centrale cilinder heen. De steenwolnaalden zaten zowel in gezonde als zieke wortels geprikt (Foto 12).

2.3 Discussie

Een microscopische studie levert in het algemeen uitsluitend informatie over een bestaande situatie waarin weefsel verkeert. In deze studie is gebruik gemaakt van verschillende stadia waarin het proces van wortelverdikking voortgeschreden is. Dit levert enige aanknopingspunten voor een hypothese over de opeenvolging van gebeurtenissen tijdens het proces.

De uiterlijke kenmerken van wortelverdikking vertoonden wezenlijke verschillen. Naast opzwellen van het weefsel als gevolg van groter wordende cortexcellen was in het oudere materiaal ook callusvorming waar te nemen. Dit is een duidelijke wondreactie, veroorzaakt door het afbreken van een zijwortel zoals dat elke keer duidelijk waar te nemen was. Hoe de zijworteltjes zo systematisch kunnen afbreken is onduidelijk, maar het is niet waarschijnlijk dat deze callusvorming wortelfuncties verstoort. Daarom is het aannemelijk dat vooral de andere vorm van wortelverdikking (nl. het opzwellen van de cortexcellen) de groei van de spruit kan belemmeren en overeenkomt met het 'échte' dikke-wortel-probleem uit de praktijk.

Bij de planten die een beginstadium van wortelverdikking vertoonden, was duidelijk dat de celwand nog intact was. De zwelling was dus duidelijk door osmotische stress veroorzaakt. De celvorm veranderde ook duidelijk van langwerpig naar een meer ronde vorm, waardoor duidelijk een expansie van de wortel naar buiten optrad. Deze opmerkelijke verandering in groeirichting in de fase waarin nog geen celwand is aangelegd is in de literatuur beschreven als gevolg van een pH-verandering (Tang et al., 1992). Een verhoging van de pH tot 8,0 heeft binnen een uur een respons tot gevolg. Deze respons is reversibel, hetgeen suggereert dat het een direct effect is op cellen die zich in de strekkingszone bevinden. De pH-verhoging heeft geen enkel effect op celdeling. Dus een wortelverdikking als gevolg van een pH-effect kan uitsluitend door expansie van cellen optreden. In de praktijksituatie is deze verandering van pH in combinatie met dikke-wortel-vorming tot nu toe ook al verschillende keren vermeld (Heimovaara, 1997; Pittens-van der Heijden et al., 1998).

Het wazige fluorescentiepatroon dat in een iets verder stadium van wortelverdikking optreedt, kan duidelijk een gevolg zijn van decompartmentalisatie. Bij vergelijkbaar onderzoek aan tomaat naar het effect van calcium-gebrek op het ontstaan van necrose van cellen (nog te publiceren), is eveneens een wazig worden van het fluorescentiepatroon door decompartmentalisatie binnen de cellen waar te nemen. Evenals in deze studie is ook hier de celwand nog intact. Dit duidt dus op een degeneratieproces dat binnen de cel start. Scheuring van de epidermis treedt ook duidelijk pas in een later stadium op als gevolg van een sterke expansie van de cortexcellen. Ook scheuring kan een gevolg zijn van lokale pH-verhoging. Tang et al. (1993) toonden aan dat bij lupine een pH van 7,5 al resulteerde in het scheuren van de epidermis. De expansie van cortexcellen was er de oorzaak van dat intercellulaire holtes werden dichtgedrukt.

Dit is een principiële ander fenomeen dan het ontstaan van holtes ten gevolge van zuurstofgebrek.

Zoals ook al in andere studies is vermeld, blijft de centrale cilinder opmerkelijkerwijs onaangetaast. Hierdoor behoudt de wortel dus de potentie om in de groeipunt weer normale groei te initiëren en is herstel zeker mogelijk.

Het fluorescentiepatroon van de wortels is over het algemeen zeer karakteristiek. De onderbreking van dit patroon in de zones waar wortelverdikking optreedt kan daardoor een handvat zijn voor het vroegtijdig herkennen van optredende groeiafwijkingen.

2.3.1 Conclusie

Er lijkt een dus een duidelijke opeenvolging van gebeurtenissen plaats te vinden: eerst een opzwellen van cellen en daarna scheuren van de epidermis. Dit duidt erop dat wortelverdikking wellicht een gevolg is van een aantal omgevingsfactoren die een abnormale groei of celvergroting induceren. Vooral de veranderingen van omgevingsfactoren kunnen de ontwikkeling van cellen beïnvloeden, doordat er een temporele onbalans kan ontstaan tussen aanvoer van componenten voor structurele groei en de behoefte voor celstrekking en celwandaanmaak. Een aanval van bacteriën kan pas plaatsvinden na het scheuren van het weefsel.

3. Perspectieven voor toekomstig onderzoek

De oorzaak van wortelverdikking is nog steeds niet duidelijk. Het probleem is niet eenduidig op te roepen en daardoor is niet aan te geven welke maatregelen effectief genomen kunnen worden om het probleem te bestrijden of te voorkomen. Veel factoren zijn al bekeken tijdens de uitgebreide meetcampagne van TNO (Heimovaara, 1997). De campagne was echter een eerste verkenning en vergde een epidemiologische aanpak omdat er nog geen aanknopingspunten waren. Een dergelijke aanpak levert correlatieve verbanden op tussen uitwendige parameters en het optreden van wortelverdikking en de tegelijkertijd optredende processen. Daarbij kon niet gekeken worden naar de dynamiek van het systeem. Dit maakt een conclusie over oorzaak en gevolg onmogelijk. Factoren die wortelverdikking zouden kunnen initiëren zijn mogelijkere wijs maar een korte tijd aanwezig geweest en kunnen bij een dergelijke aanpak worden gemist.

In de hele campagne is een totaalanalyse gedaan van mogelijke factoren, waardoor er geen rekening kon worden gehouden met effecten op microniveau (pH, toxische componenten) binnen de steenwolmat waarbij lokaal heel toxische concentraties kunnen voorkomen. Bij bulk-analyse worden de factoren of componenten zeer sterk gebufferd of verdund gemeten.

Inmiddels is een aantal factoren dat ervan verdacht werd wortelverdikking te veroorzaken op verschillende plaatsen in het land onderzocht (hypoxie, vorming van ethyleen, etc.). Een heel interessante toepassing is inmiddels door TNO gevonden; aangetoond is dat toevoeging van acetyl-salicylzuur (aspirine) aan de voedingsoplossing de symptomen van wortelverdikking kan verminderen, waarbij de stof niet in de komkommervruchten komt wanneer jonge planten worden behandeld. In geen van de studies kon echter tot nu toe eenduidig en reproduceerbaar het probleem wortelverdikking worden opgeroepen. Dit rechtvaardigt de conclusie dat de groeiverstoring in de wortel als gevolg van een combinatie veranderende omgevingsfactoren waarschijnlijk het resultaat is van een cascade van processen.

Voor een goede inventarisatie van mogelijke oorzaken is het van belang te bedenken dat een steenwolblokje of -mat bijzondere eigenschappen heeft: bovenin het blokje komen zeer droge omstandigheden voor terwijl onderin juist een heel natte, bijna anaërobe zone aanwezig is. Het systeem wordt voortdurend voorzien van een grote hoeveelheid nutriënten en als gevolg van voortdurende secretie van wortel-exudaten en het afsterven van wortelmateriaal is er een grote aanvoer van koolstof- en stikstofverbindingen. Dit zijn zeer gunstige omstandigheden voor bacteriële groei. Kortom: het systeem is vergelijkbaar met een bodembiotop waarin zich een rijk bodemleven kan handhaven. Op grond van kennis die is opgedaan binnen het bodembioologisch en luchtkwaliteitsonderzoek, kunnen enkele voorzetten worden gedaan voor vervolgonderzoek.

3.1 Mechanistisch onderzoek

3.1.1 Besmette voedingsoplossing: DNA-fingerprinting van 1) besmet water en 2) zieke planten

De besmette voedingsoplossing in Naaldwijk geeft enigszins wissellende resultaten (zie experiment PBG van 7 mei 1998, Pittens-van der Heijden et al., 1998). Zoals aangegeven in het rapport van het PBG lijkt de wortelverdikking te worden veroorzaakt door een chemische of biologische component die mogelijkerwijs wordt veroorzaakt door microbiële activiteit, maar daarvan een afgeleide is. Het is echter nog onduidelijk onder welke omstandigheden deze wordt geproduceerd en tevens wanneer het actief tot wortelverdikking leidt. Uit de experimenten op AB-DLO blijkt dat een combinatie van besmet water en lage zuurstofspanning niet voldoende is om wortelverdikking op te roepen. Er moet aan meer of andere factoren worden voldaan.

Door DNA-analyse kan worden nagegaan in hoeverre het biologische systeem van besmet water of zieke planten zich onderscheidt van gezond water of gezonde planten. Zolang de causaliteit nog niet bekend is, kan deze worden getoetst door gezonde planten te inoculeren met geïsoleerd wortelmateriaal van ziek en gezond water of wortelmateriaal, waarbij dit laatste voorkeur geniet vanwege de grotere kans op succes.

3.1.2 Denitrificatie, nitrietvorming en kasluchtkwaliteit

Het vermoeden bestaat dat in de microsites binnen de steenwol denitrificatie optreedt, waardoor nitrietvorming en NO_x -emissie kunnen plaatsvinden. Door lokale anaërobie in de steenwol zijn omstandigheden gunstig voor nitrietvorming, zoals ook al aangetoond in pilotproefjes door A.J.C. de Visser. Nitriet is zeer toxisch voor wortelgroei. In de literatuur wordt 50% reductie van de wortelgroei vermeld bij 440 mg/l (= 6,4 mM) NaNO_2 en één van 20% bij 1,16 mM (Przymusiński & Gwózdź, 1994). Het TNO-onderzoek (Heimovaara, 1997) meldt gemeten nitrietwaarden van 400 $\mu\text{mol/l}$ met een grote standaardafwijking, hetgeen lokale waarden van 1 mM mogelijk maakt.

Voor een (onvolledige) denitrificatie is aanwezigheid van een elektronenleverancier noodzakelijk. Vooral bij lage zuurstofspanning (en daarbij lager wordende redoxpotentiaal, zie ook verslag TNO) zijn Fe^{2+} of Mn^{2+} de voor O_2 alternatieve elektronendonoren bij de denitrificatieprocessen. In Grodan steenwol is een kleine hoeveelheid MnO aanwezig (tabel II, Verwer & Welleman, 1980). Mn^{2+} kan als reductor de elektronen aanleveren voor de omzetting van nitraat. De informatie is weliswaar oud, maar gegevens van de huidige situatie zijn niet meer te verkrijgen. Hoewel het productieproces sinds die tijd veranderd is, is het niet uit te sluiten dat de Mn^{2+} -concentratie sinds die tijd slechts in geringe mate is veranderd.

Onvolledige denitrificatie kan bovendien het vrijkomen van aanzienlijke hoeveelheden vluchtige N-componenten uit steenwol tot gevolg hebben (Daum et al., 1997). De auteurs tonen aan dat bij temperatuursverhoging (16°C – 30°C) en verhoging van de pH (4-7) de hoeveelheid vluchtige N-componenten exponentieel toeneemt. Uit lopend milieu-onderzoek op AB-DLO blijkt eveneens overduidelijk dat steenwol in combinatie met voedingsoplossing enkele bio-

chemische reacties op gang brengt die in de samenstelling van de kaslucht goed te detecteren en herkenbaar zijn. Daarbij is met name een verhoging van de NO-concentratie opmerkelijk. De vorming van NO is vrijwel zeker het gevolg van een onvolledige denitrificatie in de steenwolmat. NO heeft fytotoxische eigenschappen voor planten. In vervolgonderzoek moet het kwantitatieve belang van de vorming van verschillende vormen van NO_x worden bestudeerd en worden nagegaan of deze componenten slechts een tracer zijn voor het proces of zelf fytotoxische effecten teweeg kunnen brengen. Bovendien moet dan worden onderzocht of het proces door een voor de praktijkteelt eenvoudige maatregel kan worden gestopt.

3.1.3 Non-invasieve metingen wortelverdikking

Een non-invasieve studie van het ontstaan van wortelverdikking wordt relevant zodra het proces representatief kan worden opgeroepen. Een geschikte methode om dan het proces van verdikking visueel te kunnen vervolgen en materiaal te kunnen gebruiken voor verdere microscopische studie is door gebruikmaking van wortelbakken. Hierin is een schuine perspex wand aanwezig, waar de wortels tegenaan en vervolgens langs groeien, zodat elke verandering in morfologie nauwkeurig kan worden gevolgd.

3.2 Praktijkwaarnemingen

3.2.1 Inventarisatie omgevingsfactoren

De verandering van omgevingsfactoren als factor bij het ontstaan van verstoringen in de groei is in voorgaande hoofdstukken beschreven. Hiervoor zou een inventarisatie kunnen worden gemaakt op basis van teeltgegevens die zijn verzameld door Dacom Automatisering BV in Emmen. Dit biedt wellicht een goede ingang voor het leggen van correlatieve verbanden ten aanzien van wortelverdikking.

Tabel 2 Chemische samenstelling van Grodan steenwol in 1980.

Component	Percentage
SiO ₂	47
Al ₂ O ₃	14
TiO ₂	1
Fe ₂ O ₃	8
CaO	16
MgO	10
MnO	1
Na ₂ O	2
K ₂ O	1

3.3. Aanpassingen op praktijkniveau

3.3.1 HCN-productie door pseudomonaden

In het wortelmilieu komt een groot aantal bacteriën voor, waaronder vele pseudomonaden. Het blijkt dat ca. 50% van alle pseudomonaden, voorkomend in de aardappel-rhizosfeer, in staat is om *in vitro* HCN te produceren bij een hoge beschikbaarheid van Fe^{3+} (Bakker & Schippers, 1987). Dit veroorzaakt zeer snel (8 dagen) een zeer ernstige groeireductie van de wortels. In deze studie waren niet voldoende ziekteverwekkende pathogenen aanwezig om de groeireductie te verklaren. Mogelijk heeft vorming van HCN zelf effect op wortelverdikking, omdat in potentie veel HCN-producenten in de rhizosfeer aanwezig zijn en de beschikbaarheid van Fe^{3+} (Tabel 2) en de aanwezigheid van specifieke aminozuren bepalend kunnen zijn voor eventuele HCN-productie (P. Bakker, plantenpatholoog, Plantenecologie en Evolutiebiologie, RUU, persoonlijke communicatie). Een oplossing voor het optreden van deze HCN-vorming kan zijn om de ontwikkeling van pseudomonaden te remmen door introductie van een concurrent of antagonist van deze bacterie.

4. Literatuur

- Bakker AW & Schippers B (1987) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and pseudomonas spp-mediated plant growth stimulation, *Soil Biology and Biochemistry* 19: 451-457.
- Daum D, Schenk MK & Roeber RU (1997) Extent of N_2O/N_2 ratio of gaseous nitrogen losses from a soilless culture system, In: *Proceedings of the International Symposium on Growing Media and Plant Nutrition in Horticulture*, Freising, Germany, 2-7 September 1996. *Acta Horticulturae* 450: 519-526.
- Gladish DK & Rost TL (1993) The effects of temperature on primary root growth dynamics and lateral root distribution in garden pea (*Pisum sativum* L., cv. 'Alaska') *Environmental and Experimental Botany* 33: 243-258.
- Heimovaara S (1997) Onderzoek dikke wortelvorming: Meetcampagne bij diverse bedrijven, TNO Voeding Plantenbiotechnologie, Vertrouwelijk rapport V 97.950, 61 pp.
- Ketel DH & Lotz LAP (1998) Influence of allocation and detoxification of metribuzin in *Chenopodium album* on the reliability of prediction of the minimum lethal herbicide dose rate. *Weed Research* 38: 267-274.
- Pierik R & Visser EJW (1998) Effecten van ethyleen en laag zuurstof op de groei en ontwikkeling van komkommerwortels in relatie tot wortelverdikking, Rapport in opdracht van Stuurgroep 'wortelverdikking', Nederland, 22 pp.
- Pittens-van der Heijden R-J, Verkerke W & Paternotte P (1998) Wortelverdikking komkommer, onderzoek 1e helft 1998, Modelstelsel, epidemiologie en methodisch onderzoek, PBG Naaldwijk, rapport 153, 41 pp.
- Przymusiński R & Gwózdź EA (1994) Increased accumulation of the $16 \times 10^3 M$, polypeptide in lupin roots exposed to lead, copper and nitrite ions. *Environmental and Experimental Botany* 34: 63-68.
- Tang C, Longnecker NE, Thompson CJ, Greenway H & Robson AD (1992) Lupin (*Lupinus angustifolius* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) roots differ in their sensitivity to pH above 6.0. *Journal of Plant Physiology* 140: 715-719.
- Tang C, Kuo J, Longnecker NE, Thompson CJ, Robson AD (1993) High pH causes disintegration of the root surface in *Lupinus angustifolius* L. *Annals of Botany* 71: 201-207.
- Verwer FL & Welleman JJC (1980) The possibilities of Grodan Rockwool in Horticulture. In: *Proceedings of the fifth International Congress on Soilless culture* (ed. A.A. Steiner), Wageningen 1980, PP. 263-278
- Verkerke W & Kersten M (1997) Anatomie van wortelverdikking bij komkommer, PBG Naaldwijk, rapport 110, 23 pp.

5. Bijlagen

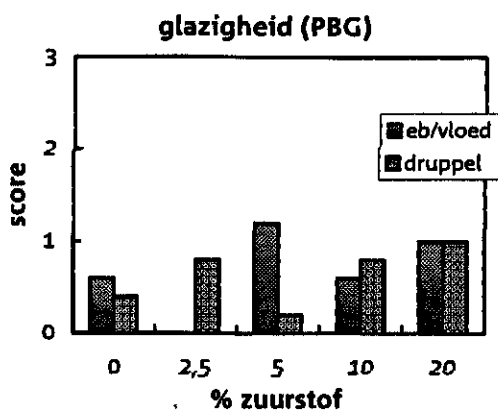
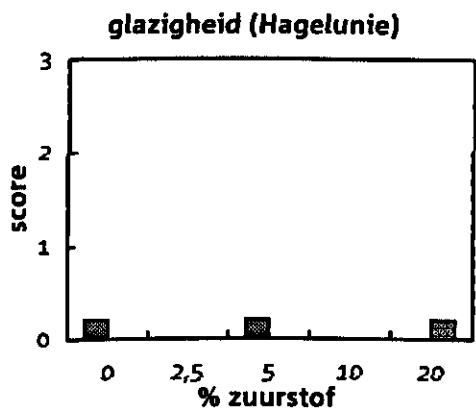
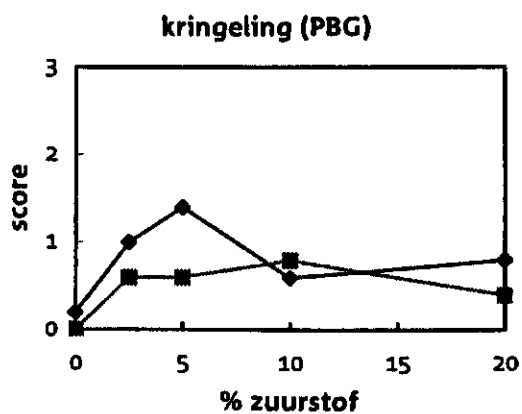
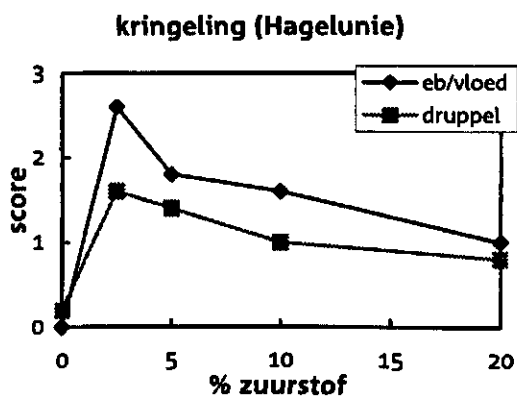
Bijlage I

Chlorofylgehalten (SPAD) en chlorofylfluorescentie (MLHD) gedurende het tweede experiment.

				Dagen na start							
				6		10		13		16	
Voed. opl.	% O ₂	gem	sd	gem	sd	gem	sd	gem	sd	gem	sd
SPAD-metingen	Steiner	21	46,1	10,1	50,9	3,3	46,2	6,3	44,8	5,3	
		10	45,9	5,0	52,5	2,8	45,9	5,4	45,7	4,3	
		2,5	49,1	9,6	52,5	8,9	50,9	9,1	49,2	9,2	
	PBG	21	45,4	7,4	54,5	3,1	48,7	6,2	49,2	2,7	
		10	45,9	8,8	53,4	2,7	47,6	5,2	47,5	2,3	
		2,5	50,1	10,7	52,5	7,8	49,3	7,3	50,1	3,2	
MLHD-metingen	Steiner	21	63,3	2,0	65,9	2,9	65,4	4,9	67,1	3,9	
		10	62,8	2,1	65,8	2,8	64,7	5,1	66,0	5,1	
		2,5	63,2	2,5	65,0	3,0	65,7	4,7	66,2	3,9	
	PBG	21	62,9	1,8	64,5	1,8	64,3	4,8	65,3	2,7	
		10	63,7	2,7	65,3	1,7	65,4	5,4	64,6	2,4	
		2,5	64,3	3,3	65,4	3,5	65,8	4,8	68,7	1,6	

Bijlage II

Scores op kringeling en glazigheid na experiment I van de individuele beoordelaars.



Bijlage III

Scores op kringeling, verdikking en glazigheid na experiment II van de individuele beoordelaars.

Soort	Algemene info	Score 1 (DLY)				Score 2 (NAKG)				Score 3 (PBG)									
		kringe- ling	verdik- king	glazig- heid	kringe- ling	verdik- king	glazig- heid	kringe- ling	verdik- king	glazig- heid	kringe- ling	verdik- king	glazig- heid						
	% O ₂ Baknr	gemidd.	s.d.	gemidd.	s.d.	gemidd.	s.d.	gemidd.	s.d.	gemidd.	s.d.	gemidd.	s.d.						
Begassingsexp.	Steiner	21	3	2,4	0,65	0,8	0,84	0,6	1,34	0,6	0,89	0,6	0,89	1,2	0,45	0,6	0,55	1,0	0,00
en doordrenkt via		10	4	2,4	0,55	0,8	0,84	0,6	0,55	0,2	0,45	0,2	0,45	1,2	0,45	0,0	0,00	0,4	0,55
eb/voed-systeem		2,5	5	3,0	0,00	0,8	0,45	0,4	0,89	0,6	0,55	0,2	0,45	2,0	0,00	0,0	0,00	0,2	0,45
		21	8	1,8	1,10	1,4	0,89	1,3	0,97	1,2	0,84	0,4	0,55	1,4	0,55	0,2	0,45	1,4	0,55
	PBG	10	9	2,6	0,55	1,2	0,45	0,8	0,45	0,4	0,55	0,2	0,45	1,0	0,00	0,0	0,00	1,0	0,00
		2,5	10	2,4	0,89	1,0	1,22	0,8	1,30	1,0	0,00	0,0	0,00	1,8	0,45	0,0	0,00	0,6	0,55
Gekregen zieke planten		7		1,5	0,87	3,0	0,00	3,0	0,00	1,4	0,55	1,6	0,55	2,0	0,00	1,0	0,00	1,8	0,45
Op weg naar ziek		2		1,7	0,58	2,3	1,15	2,7	0,58	1,3	0,58	0,7	1,15	1,7	0,58	1,0	0,00	0,7	0,58
Met PBG-water behandeld		6		1,0	0,00	0,6	0,55	1,0	0,71	0,4	0,55	0,2	0,45	0,8	0,45	1,0	0,00	0,0	0,00
Met Steiner behandeld		1		1,6	0,65	1,0	0,61	1,4	0,55	0,4	0,55	0,2	0,45	0,6	0,55	1,0	0,00	0,2	0,45