

Kwaliteitsproblemen door een verstoorde calciumhuishouding

Aanknopingspunten voor
verklarend onderzoek

M. Blom-Zandstra

cabo-dlo

Verslag nr. 167, oktober 1992

ISBN 272441



CENTRALE LANDBOUWCATALOGUS

0000 0502 4209

Inhoudsopgave

pagina

Voorwoord	
Samenvatting	1
1. Inleiding	3
2. Kwaliteit in relatie tot lokalisatie en hoeveelheid calcium.....	5
2.1. Distributie van calcium in de cel	6
2.2. Functies van het calcium	6
2.2.1. Celdeling en -strekking.....	6
2.2.2. Membraanstabiteit en celintegriteit	7
2.2.3. Hormonen	7
2.2.4. Signaaloverdracht.....	7
3. Calciumtransport over korte en lange afstand.....	9
3.1. Opname	9
3.2. Transport van wortel naar spruit	10
3.3. Import in de vrucht	13
3.4. Verdeling binnen de vrucht	14
3.5. Calcium in de 'signaal-transductie'-keten.....	14
4. Technische ontwikkelingen	17
4.1. Meting van intracellulair calcium	17
4.2. Transport over membranen.....	19
5. Ingangen voor nieuw onderzoek	21
5.1. Orgaan- en 'hele plant'-niveau	21
5.2. Cellulair en subcellulair niveau	22
5.3. Genetische manipulatie.....	24
6. Conclusie	25
Literatuur.....	26

Voorwoord

Kwaliteit van consumptie- en sierteeltgewassen is momenteel een belangrijk aandachtsgebied binnen het landbouwkundig onderzoek. Hoewel kwaliteit een moeilijk definieerbaar begrip is, zijn er een aantal uitwendige fysiologische afwijkingen die een produkt onverkooptbaar maken. De economische schade die dit kan veroorzaken, varieert uiteraard per gewas. Met name bij tomaat en paprika, momenteel de twee belangrijkste tuinbouwgewassen, kunnen door kwaliteitsproblemen opbrengstderivingen van circa 7-10 % optreden. Voor deze produkten betekent dat een schade van enige miljoenen guildens per jaar. Het oplossen van deze problemen vraagt om een gerichte onderzoeks aanpak, waarbij inzicht in fundamentele processen van groot belang is.

Er zijn veel aanwijzingen dat een aantal van deze kwaliteitsproblemen worden veroorzaakt door een verstoring van de calciumhuishouding in de plant. De enorme aandacht die in het onderzoek gedurende lange tijd besteed is aan de rol van calcium in het plantmetabolisme heeft inmiddels al veel kennis opgeleverd, maar de onderzoeksstrategie heeft zich voornamelijk gericht op de 'hele-plant-fysiologie'. Gebrek aan technieken om de calciumhuishouding op celniveau te bestuderen, hebben de mogelijkheden tot verdere detailstudies lange tijd beperkt. Door een snelle technologische ontwikkeling gedurende de laatste tien jaar vindt er momenteel een verschuiving plaats van hele-plant-niveau naar cellulair en subcellulair niveau. Bij het onderzoek naar de oorzaken van kwaliteitsproblemen zijn beide onderzoeksstrategieën echter nog niet optimaal geïntegreerd. Het is nodig om te evalueren waar de verschillende onderzoeksniveaus aan elkaar grenzen en zo elkaar kunnen aanvullen bij het leveren van inzicht in de fysiologische achtergronden van genoemde problemen.

In dit rapport wordt getracht om reeds verworven inzichten en verschillende mogelijkheden voor de toekomst op een rij te zetten ten behoeve van innovatie van onderzoek aan de calciumhuishouding in planten. Om het onderzoek een nieuwe impuls te kunnen geven, zal breder overleg nodig zijn tussen universiteiten, instituten en proefstations. Dit rapport kan daarbij een handreiking bieden.

Samenvatting

Verstoringen in de groei en ontwikkeling van planten kunnen belangrijke negatieve gevolgen hebben voor de uitwendige kwaliteit en houdbaarheid van het eindprodukt. Er wordt aangenomen dat een verstoring in de calciumhuishouding een belangrijke oorzaak hiervan kan zijn. Opname, transport en verdeling van calcium over de verschillende organen is in het verleden op 'hele plant'-niveau uitputtend bestudeerd. Er is nauwelijks sprake van beperkingen in de calciumopname door planten. Dus een oorzaak voor optredende tekorten in plantweefsel is primair een gevolg van een inadequaat verdeling binnen de plant. Bij het transport van calcium van de wortel naar de spruit via de apoplast bepaalt watertransport in belangrijke mate waar het calcium uiteindelijk terecht komt. Een nieuwe lijn in het onderzoek is het bestuderen van rol, lokalisatie en transport van calcium op cellulair en subcellulair niveau. In het cytoplasma is het van belang dat de calciumconcentratie heel laag blijft. Hierdoor kan het ion een goede functie vervullen bij signaaloverdracht binnen de plant. Het is wel duidelijk dat hoge calciumconcentraties buiten de cellen van belang zijn voor een goed functioneren van van deze signaaloverdracht, maar de relaties tussen extracellulair en intracellulair calcium zijn nog onbekend. Het is dus ook niet duidelijk of een verstoring van dit signaaloverdracht-mechanisme consequenties heeft voor de uiteindelijke kwaliteit van het geoogste produkt. Op grond van de huidige kennis kunnen nieuwe onderzoeksvoorstellen worden geformuleerd, waarbij integratie van de verschillende niveaus wenselijk is. In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de kennis die het onderzoek heeft opgeleverd. Er worden enkele ingangen voor nieuw onderzoek aangegeven.

1. Inleiding

Afwijkingen in het metabolisme van de plant tijdens de groei en aanleg van organen kunnen de uitwendige kwaliteit en houdbaarheid van het geoogste produkt aanmerkelijk verlagen. Kenmerken van dit kwaliteitsverlies zijn verlies van stevigheid of afsterving van (delen van) blad of vrucht. Kwaliteitsproblemen doen zich voornamelijk voor in de intensieve land- en tuinbouw (Kirkby & Pilbeam, 1984), zijn sterk afhankelijk van de gevoeligheid van het gebruikte ras en kunnen van zeer uiteenlopende aard zijn. Een aantal van deze problemen zijn weergegeven in Tabel I.

Tabel I. Kwaliteitsproblemen die bij verschillende consumptie en sierteeltgewassen kunnen optreden.

Kwaliteitsprobleem	Gewas	Referenties
Verbranden bladpunt/ bladmisvorming	aardbei	Guttridge et al. (1981)
Stip	appel, paprika	Ferguson & Watkins (1989) Janse & De Kreij (1989)
Klappers	aubergine	De Kreij (1990a)
Kelkverdroging	aubergine	Welles (1990)
Vingers	aubergine	van Slobbe (1992)
Bolblad	komkommer	De Kreij (1990b)
Broeikop	komkommer	de Hoog (1991)
Glazigheid	sla	Maaswinkel & Welles (1986)
Rand	sla, kool, andijvie	Buitelaar, (1985) Collier & Tibbits (1984) de Hoog (1989)
Zwarte harten	selderij	De Kreij (1990b)
Interne bruinkleuring	spruitkool	De Kreij (1990b)
Kort blad	tomaat	De Kreij (1992)
Meligheid	tomaat	Disco (1992)
Goudspikkels	tomaat	Den Outer & van Veenendaal (1988) De Kreij et al. (1992)
Neusrot	tomaat, paprika	Wiersum (1965) De Kreij (1990b)
Bladnecrose	tomaat, poinsettia	Adams (1988) Bierman et al. (1990)
Kiepen	tulpen	De Kreij (1990b)
Bruine pit	witlof	Jolivet et al. (1988) Den Outer (1989)
Lage temperatuur bederf	witlof	De Kreij (1990b)
Holten	wortel	De Kreij (1990b)

Wetenschappelijk onderzoek ten behoeve van kwaliteitsproblemen dateert al van de vorige eeuw. Aanvankelijk heeft het onderzoek zich voornamelijk geconcentreerd op 'stip' bij appel, maar na opkomst van de kasteelt heeft de aandacht zich verbreed naar andere gewassen.

In enkele goede overzichtsartikelen (Clarkson, 1984; Ferguson & Watson, 1989; Hepler & Wayne, 1985; Kirkby & Pilbeam, 1984) is de problematiek uitgebreid en systematisch beschreven. Er wordt algemeen aangenomen dat de oorzaak van de kwaliteitsproblemen gezocht moet worden in een verstoring van de calciumhuishouding. Met name lokaal calciumgebrek in cellen veroorzaakt irreversibele desintegratie van het weefsel. Ondanks de vele kennis die momenteel aanwezig is, komen Ferguson & Watkins (1989) echter tot de conclusie dat er nog een aantal belangrijke gaten in de kennis zijn overgebleven. Hoe is de relatie tussen het optreden van calciumgebrek en de verhouding van andere mineralen? Hoe kunnen de symptomen van de gebreksverschijnselen worden gelokaliseerd? Welke metabolische aspecten zitten er aan het optreden van calciumgebrek? Waarom is het nog steeds niet gelukt om de problemen via de veredeling te verminderen, terwijl ze toch duidelijk rasafhankelijk zijn? Een belangrijke oorzaak van deze lacunes in de kennis is dat het zowel in het anatomisch/morfologisch als het biochemisch onderzoek lange tijd niet mogelijk is geweest de calciumhuishouding op cellulair en subcellulair niveau te bestuderen. Juist door het lokale karakter van het calciumgebrek als oorzaak voor het optreden van weefseldesintegratie is het van belang inzicht te krijgen in de lokalisatie van het calcium binnen de cel en de rol die het speelt in het metabolisme. De vraag die daaruit volgt is of een verstoring in de calciumhuishouding binnen de cel ook consequenties kan hebben voor de kwaliteit van het produkt.

Door de technologische ontwikkeling van de laatste tien jaar kan calcium in de cel tegenwoordig wel worden gelokaliseerd (Bush & Jones, 1990) en onderscheid worden gemaakt tussen vrij en niet-vrij calcium (Blatt et al., 1990; Gilroy et al., 1990). Deze nieuwe technieken bieden mogelijkheden voor een nauwkeurige analyse van calciumtransport en calcium-distributie over de verschillende cellen en organellen. Dankzij de nieuwe ontwikkelingen kunnen nu de uiteenlopende functies van calcium op verschillende niveaus beter in kaart worden gebracht. Hierdoor is duidelijk geworden dat calcium naast een functie bij de celwandstevigheid en membraanstabieleit nog een geheel andere functie heeft bij de signaaloverdracht in de plant, de zogenaamde 'signaal-transductie'-keten (Schroeder & Thuleau, 1991).

De ontwikkeling van deze technieken is niet primair gericht geweest op de opheldering van kwaliteitsproblemen. Recente literatuur over het 'calciumprobleem in de praktijk', bekeken vanuit een (sub)cellulaire onderzoeksstrategie is niet aanwezig. Het gebruik van deze nieuwe technieken kan inzicht geven in de oorzaken van kwaliteitsproblemen. Het is echter de vraag of hiermee de problemen kunnen worden opgelost.

In dit rapport zal een overzicht worden gegeven van literatuurgegevens over de relatie tussen kwaliteit en calcium in zijn verschillende functies. Ook opname en transport van calcium door de plant wordt beschreven. Vervolgens worden enkele technieken vermeld waarmee calcium op cellulair en subcellulair niveau kan worden gemeten. Dit wordt gevolgd door enkele suggesties voor nieuwe onderzoeksingangen.

2. Kwaliteit in relatie tot lokalisatie en hoeveelheid calcium

Al aan het eind van de vorige eeuw werd het optreden van bepaalde kwaliteitsproblemen bij de appel toegeschreven aan een verstoring in de fysiologie van de plant (McAlpine, 1912). Een indicatie dat vooral calcium hierbij een belangrijke rol speelt kreeg men later, toen men ontdekte dat er een duidelijke relatie bestaat tussen het optreden van 'stip' en een laag calciumgehalte in het aangetaste weefsel (DeLong, 1936). Bovendien konden de problemen sterk worden verminderd door tijdens de groei of na de oogst de plant of vrucht te bespuiten met of te dompelen in een calciumchlorideoplossing (Askew et al. 1960, Jolivet et al. 1988).

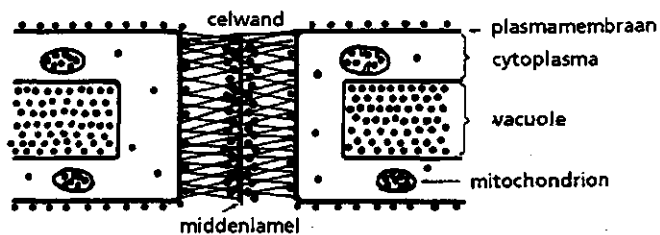
Calcium is een essentieel element in planten. Het speelt binnen verschillende systemen of processen - op heel verschillende niveaus, van hele plant tot subcellulair - een essentiële rol. Het lijkt erop dat de hoeveelheid calcium in die delen van het weefsel, waar het een essentiële functie vervult, slechts binnen nauwe marges mag variëren. Afwijkingen van optimale groei of kwaliteitsverlies door het optreden van necrose van weefsel gaan dikwijls gepaard met veranderingen (meestal een verlaging) van de hoeveelheid calcium of de (K+Mg)/Ca-verhouding in (delen van) de plant. Hierbij is het niet duidelijk of een verandering in de calciumbalans de oorzaak is van het optreden van kwaliteitsproblemen dan wel het gevolg.

Verminderde kwaliteit kan het gevolg zijn van een calciumgebrek of van calciumovermaat. Goudspikkels bij tomaat zijn een voorbeeld van calciumophoping (De Kreij, 1990b). Calcium vormt een complex met een organisch zuur, zoals oxaalzuur. De gevormde kristallen beschadigen het weefsel, waardoor de houdbaarheid van het produkt afneemt. Binnen één planteorgaan kunnen tegelijkertijd calciumgebrek als calciumovermaat voorkomen. De hoeveelheid calcium en de lokalisatie ervan in het weefsel is van belang voor een goede kwaliteit.

Kwaliteitsverlies, waarbij calcium een rol speelt, beperkt zich altijd tot enkele delen van de plant of deelgebieden van de vrucht. Verstoringen van de calcium- en waterhuishouding treden dus heel lokaal op. Dit betekent dat metingen op weefselniveau misleidende resultaten kunnen geven ten aanzien van de interpretatie van gegevens: Zowel gezond als ziek weefsel worden samen geanalyseerd, omdat deze weefsels vrijwel niet te scheiden zijn. Calciumgehalten zijn dan niet representatief voor ziek weefsel. Bovendien worden ionenanalyses uitgevoerd aan weefsel waarin de symptomen al zichtbaar zijn. Vaak zijn de calciumconcentraties ten gevolge van uitdroging hierin hoog (Ferguson & Watkins, 1989). Dit soort analyses geeft daarmee geen beeld van de voorgeschiedenis en dus de oorzaak van het kwaliteitsverlies.

2.1. Distributie van calcium in de cel

Calcium is zeer ongelijkmatig over de cel verdeeld (Figuur 1).



Figuur 1. Schematische weergave van twee naast elkaar gelegen cellen met een karakteristieke verdeling van calcium (Marschner, 1986)

Het grootste deel van de totale hoeveelheid calcium in de plant is gelokaliseerd in de celwand. Deze bezit een groot aantal bindingsplaatsen, waaraan calcium makkelijk bindt. Het calcium vormt bruggen tussen de fosfaat- en carboxylgroepen van de fosfolipiden en eiwitten (Caldwell & Haug, 1981). Daardoor heeft calcium een belangrijke functie bij de membraanpermeabiliteit en de stevigheid van de celwand. Afbraak van pectines uit de celwand door polygalacturonase, waardoor het weefsel zacht wordt en in sterke mate verouderd (bij tomaat bijvoorbeeld) wordt in belangrijke mate tegengegaan door hoge calciumconcentraties (Corden, 1965).

De vacuole bevat calciumoxalaat en calciumfosfaat. Het cytoplasma heeft echter een zeer lage calciumconcentratie. Het ER (endoplasmatisch reticulum) is van belang bij de calcium-homeostasis (Hepler & Wayne, 1985). Door de aanwezigheid van actieve calciumpompen kan een lage calciumconcentratie in het cytoplasma worden gehandhaafd.

2.2. Functies van het calcium

Calcium heeft een aantal uiteenlopende functies in de plant:

2.2.1. Celdeling en -strekking

Calcium speelt een rol bij celdeling (Schmit, 1981) en mogelijk ook bij celstrekking (Marschner & Richter, 1974). Dit wordt geconcludeerd uit experimenten waarbij calcium in voedingsoplossingen werd weggelaten en er kan dus ook sprake zijn van een indirect effect. Het is wel een feit dat calciumgebrek allereerst optreedt in meristematisch weefsel (Dekock et al., 1975). De kwaliteitsproblemen worden pas in een veel later stadium zichtbaar.

2.2.2. Membraanstabiliteit en celintegriteit

De fundamentele rol van calcium in de membraanstabiliteit en celintegriteit komt op verschillende manieren tot uiting. Bij calciumgebrek of verandering van de verhouding tussen calcium en andere kationen neemt de lek van laag moleculaire componenten door membranen toe (Van Goor, 1968). Bij ernstig calciumgebrek treedt zelfs desintegratie van de membraanstructuur op (Hecht-Buchholz, 1979) en verdwijnt de compartimentatie binnen de cel. Door activiteit van proteolytische enzymen die uit de vacuole vrijkomen, wordt de fysiologie binnen de cel verstoord, de ademhaling neemt toe (Bangerth et al., 1972) en vervolgens treedt degeneratie van de cel op.

De mate waarin calciumgebrek effect heeft op kwaliteitsvermindering van het weefsel hangt af van de verdamping door de plant. Een hoge luchtvochtigheid en beperking van vochtverlies kan over het algemeen kwaliteitsverlies door calciumgebrek verminderen (Perring, 1986).

2.2.3. Hormonen

Calcium speelt ook bij de werking van hormonen een rol. De relatie tussen calcium en hormonen is tweeledig: de werking van hormonen kan worden gemoduleerd door calcium, terwijl andersom de werking van calcium kan worden gemoduleerd door hormonen (voor een overzicht zie Elliott, 1986). Vooral de abscissinezuur, auxinen, cytokininen en gibberellinen vertonen interactie met calcium. Calcium kan hun werking versterken. Bij sommige functies is de aanwezigheid van calcium zelfs een vereiste. Ook bij de productie van ethyleen speelt calcium een rol. Er blijkt een duidelijk verband tussen de calciumgeruleerde membraanpermeabiliteit en de biosynthese van ethyleen (Mattoo & White, 1991). Om de ethyleensynthese in het celwandplasmamembraan-complex op gang te brengen, is het noodzakelijk dat de calciumconcentratie daarin daalt. Redistributie van calcium in de cel is in dit geval de primaire stimulus voor het verouderingsproces.

2.2.4. Signaaloverdracht

Een geheel andere, maar minstens zo belangrijke functie vervult calcium in het cytoplasma in de overdracht van signalen binnen de plant, de zogenaamde 'signaal-transductie'-keten (zie Hoofdstuk 3.5). In tegenstelling tot meeste bovenstaande functies, is het hierbij juist van belang dat de calciumconcentratie heel laag (in orde van grootte van nanomolair) blijft.

Deze ogenschijnlijk tegenstrijdige eisen ten aanzien van de calciumconcentraties in verschillende delen van het weefsel maken een nauwkeurige regulering van calciumtransport van groot belang. Over calciumtransport is al één en ander bekend, waarvan hierna een kort overzicht wordt gegeven.

3. Calciumtransport over korte en lange afstand

Het transport van calcium door de plant heen is op verschillende integratieniveaus bestudeerd: transport door vaatbundels, membraantransport en recent transport binnen de cel. Bij het transport van calcium vanuit de bodem de plant in naar de vrucht komen de verschillende niveaus aan de orde. Hieronder zal de loop van calcium vanuit de bodem tot in de vrucht worden gevolgd, waarna het intracellulair calciumtransport binnen de 'signaal-transductie'-keten aan de orde komt.

3.1. Opname

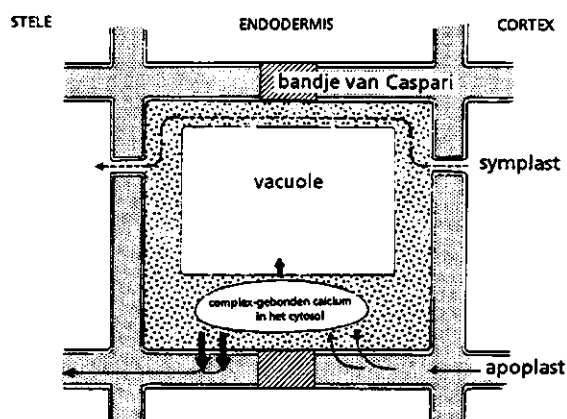
De hoeveelheid calcium die beschikbaar is in de bodem is zelden beperkend voor de ontwikkeling van planten. Het optreden van kwaliteitsproblemen is dan ook eerder een gevolg van een niet-optimale calciumverdeling binnen de plant (Clarkson, 1984).

De hoeveelheid calcium die de wortel in wordt getransporteerd, wordt in belangrijke mate bepaald door de CEC (cation exchange capacity) van de celwanden van de wortels. Deze kan per plantesoort verschillen (Knight & Crooke, 1973).

Calcium-opname is een weinig metabolisch gereguleerd proces in vergelijking met bijvoorbeeld kalium-opname (Kirkby & Pilbeam, 1984). Calcium komt gemakkelijk de extracellulaire ruimte van cortex binnen (Clarkson & Sanderson, 1971) en wordt met de waterstroom via de apoplast naar de spruit verder getransporteerd (Hylmō, 1953). Transport van calcium door de plant vereist daardoor veel minder energie dan kaliumtransport (Armstrong & Kirkby, 1979). Een passieve opname van calcium met de waterstroom geldt in ieder geval voor de hogere concentraties (5-50 mM). Voor de heel lage concentraties (5-50 μ M) wordt de opname wellicht metabolisch gereguleerd (Maas, 1969).

De calciumopname beperkt zich voornamelijk tot jonge wortels (Russell & Clarkson, 1976). Daarin is de endodermis met de bandjes van Caspari nog redelijk toegankelijk, omdat de celwanden nog niet verdikt zijn met suberine en lignine (Clarkson & Robards, 1975). In het allerjongste weefsel zijn de bandjes van Caspari zelfs nog helemaal niet ontwikkeld en hoeft het calcium geen plasmamembraan te passeren.

In de zone waar calcium wel de bandjes van Caspari moet passeren, moet het door het cytoplasma van de cel worden getransporteerd (Figuur 2).



Figuur 2. Calcium-influx in de protoplast van endodermis cellen, gevolgd door actieve calcium-efflux in de apoplast van de stele (Clarkson, 1984)

Calcium diffundeert de cel in via kanalen, terwijl het actief de apoplast van de stele weer wordt ingepompt met behulp van calciumpompen. Het calcium in het cytosol is waarschijnlijk voor 99,9 % gebonden. Mogelijk speelt cyclose een rol bij het transport van gebonden calcium door het cytosol. Dit houdt in dat een deel van het cytoplasma beweegt ten opzichte van rest, soms volgens vaste kanalen. Deze plasmastroming verbruikt energie. Dit transportmodel wordt ondersteund door de waarneming dat toevoeging van de ontkoppelaar DNP (2,4-dinitrofenol) het calciumtransport naar het xyleem voor 98 % remt (Bengtsson, 1982). Bengtsson vond echter geen enkel effect van DNP op het watertransport.

De bandjes van Caspari zijn maar in een deel van de wortels aanwezig. Het percentage is afhankelijk van groeiomstandigheden en teeltwijze. Wanneer door bijvoorbeeld variatie in weersomstandigheden of een ongunstige bodemgesteldheid dit percentage wordt verhoogd, kunnen problemen ontstaan bij de calciumvoorziening van de spruit. Dit kan dan leiden tot kwaliteitsproblemen.

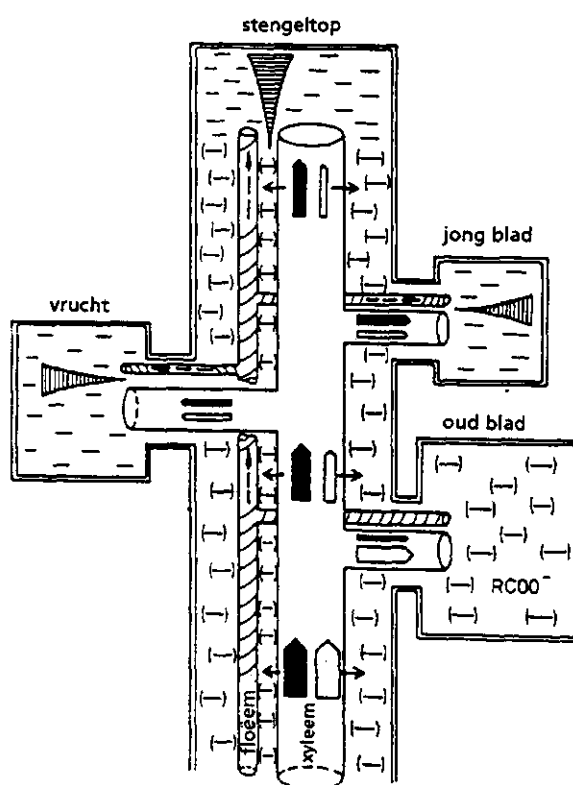
3.2. Transport van wortel naar spruit

Het calciumtransport is na passage van de bandjes van Caspari in principe een apoplastisch transport door de xyleemvaten. De xyleembanen vertakken bij elk blad of ander orgaan. Het vaatstelsel is zò ver ontwikkeld dat het helemaal doorloopt tot vlak bij het delende en strekkende weefsel zonder dat de apoplastische stroom wordt onderbroken door een overgang (Hanger, 1979). Groeiend weefsel vormt een 'sink' voor calcium, maar is afhankelijk van floëemaanvoer.

Calcium kan in drie vormen worden getransporteerd: als vrij ion, gecomplexeerd aan een organisch zuur, met name citraat (Bradfield, 1976) of gebonden aan de 'exchange sites' op de vaatwand.

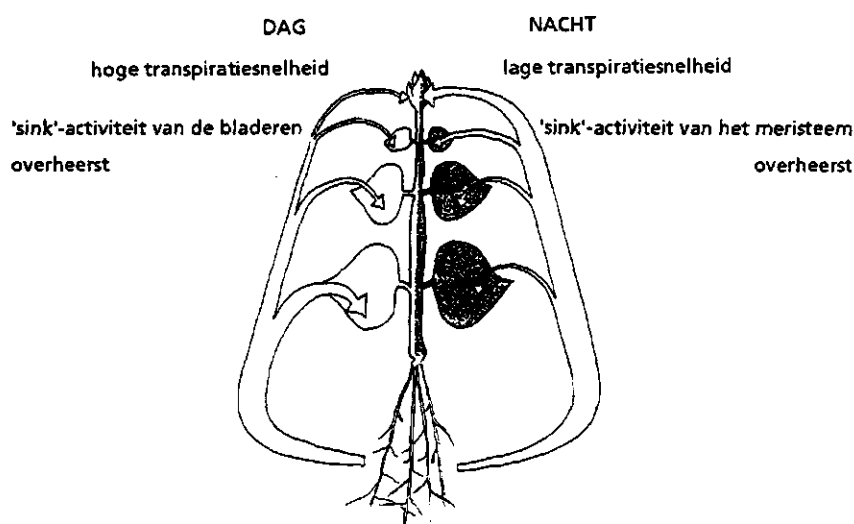
De vaatwanden bevatten een groot aantal 'exchange sites' voor calcium en andere divalente ionen, die over het algemeen nagenoeg verzadigd zijn (Van de Geijn & Petit, 1979). Vrij calcium in het xylemsap wisselt uit met gebonden calcium. Zo springt het calcium van de ene bindingsplaats op de andere. De grootte van de sprong wordt bepaald door de calciumconcentratie in het xylemsap en de snelheid van het watertransport. Wanneer de concentratie hoog is, zal de verdeling van het ion nauw gecorreleerd zijn aan de distributie van water. Calcium wordt dan in grote hoeveelheden naar de oudere, niet meer groeiende maar wel transpirerende bladeren getransporteerd. Het calcium dat gecomplexeed is met organische zuren, daarentegen, zal eerder via floëemtransport naar de nog wél groeiende delen van de plant worden getransporteerd.

De hoeveelheid calcium die in het uitwisselingsproces wordt vervoerd, hangt af van de CEC van de vaatwanden, de concentratie van concurrerende kationen, zoals magnesium, en de hoeveelheid calcium die door cellen naast de vaatbundels van de bindingsplaatsen wordt afgehaald. De CEC van de sinks bepaalt ook in sterke mate hoeveel calcium erheen stroomt. In het blad, bijvoorbeeld, neemt de grootte van de calciuminflux sterk af nadat het volledig is uitgegroeid, terwijl de transpiratiesnelheid constant blijft (Koontz & Foote, 1966). Groeiend weefsel, daarentegen, vormt nieuwe bindingsplaatsen en vormt daardoor een sink voor calcium. Dit weefsel wordt zo op twee manieren met calcium bevoorradt: via de CEC en door aanvoer van calcium gecomplexeed met organische zuren. Een model voor calciumtransport en -distributie is weergegeven in figuur 3.



Figuur 3 Calciumtransport in de spruit. β is de grootte van de calciumstroom; \pm is de grootte van de waterstroom (Marschner, 1983)

Dus meristematisch weefsel en transpirerende bladeren zijn twee verschillende sinks die ieder op een eigen manier de calciumstroom beïnvloeden. Wanneer er voldoende calcium in het xyleemsap aanwezig is, heeft competitie tussen deze twee sinks nauwelijks schadelijke gevolgen. Toch wisselt de sterkte van deze twee sinks sterk over de dag, terwijl door een wisselende verdamping ook de calciumconcentratie in het xyleem (en daarmee dus aanvoer naar verdampende bladeren) kan variëren. In het algemeen geldt dat calcium overdag naar de transpirerende delen wordt aangevoerd, terwijl 's nachts het meristematisch weefsel van calcium wordt voorzien (Figuur 4).



Figuur 4. Dagelijkse variatie in de calcium aanvoer vanuit de wortels naar de spruit (Clarkson, 1984)

Wanneer de hoeveelheid calcium in het xyleem laag is, gaat dit verdelingspatroon niet op. Dan bepaalt de sinksterkte waar het ion uiteindelijk terecht komt. Hierdoor kunnen in sommige delen van de plant tekorten optreden, waarvan kwaliteitsproblemen het gevolg kunnen zijn.

De bijdrage van de worteldruk aan het calciumtransport en daarmee de verdeling over de plant is onduidelijk. De literatuur doet daar tegenstrijdige mededelingen over (Palzkill & Tibbitts, 1977; Van de Geijn & Smeulders, 1981). Wellicht is dit soortspecifiek en/of afhankelijk van uitwendige omstandigheden.

De hoeveelheid calcium die door het floëem wordt getransporteerd is laag. Door aanwezigheid van relatief hoge concentraties fosfaat (5-20 μM , Raven, 1977) in het floëem zal calcium voornamelijk in gebonden vorm aanwezig zijn. Ondanks het feit dat calcium erg immobiel is, is er toch een zekere calciuminflux in het floëem (Peel, 1972). De bijdrage die het daarmee kan leveren aan de calciumvoorziening van bijvoorbeeld vruchten moet dan ook niet worden onderschat (zie verderop). Het is nog niet duidelijk hoe het calcium het floëem in komt. Calcium wordt niet vanuit het blad geremobiliseerd (Hemelrick & McDuffie, 1983), maar lateraal transport tussen xyleem en floëem is niet onmogelijk (Wieneke & Führ, 1975). Voor het al of niet optreden van kwaliteitsproblemen is de aanwezige hoeveelheid kalium en magnesium en hun onderlinge verhouding met calcium eveneens van belang. Met name

magnesium kan met calcium concurreren om bindingsplaatsen in de xyleembanen en zo de influx van calcium in verschillende plantedelen beperken. Zowel kalium als magnesium kunnen het calcium van de bindingsplaatsen in de celwanden verdrijven. Ze nemen echter niet de functie van calcium in de celwandstabiliteit over, want die is calciumspecifiek (Van Steveninck, 1965).

3.3. Import in de vrucht

Over het calciumtransport naar de vrucht is nog veel onbekend. Al lange tijd wordt de theorie aangehangen dat het meeste calcium via het xyleem met de waterstroom de vrucht in wordt getransporteerd (Ferguson & Watkins, 1989). Dit gebeurt zolang de verdamping van het oppervlak nog optimaal is en de oppervlakte/volume-verhouding van de vruchten nog zo laag is (in het vroege stadium van de groei) dat de transpiratie voldoende waterstroming naar de vrucht in gang houdt. Bij toenemend vruchtgewicht neemt de bijdrage van het xyleemtransport in de watervoorziening geleidelijk af en wordt de aanvoer van water, mineralen en assimilaten via het floëem steeds belangrijker. Deze theorie is nooit afdoende bewezen, maar lijkt het meest logische scenario (Ferguson & Watkins, 1989). De switch van xyleemaanvoer naar floëemaanvoer wordt verondersteld te zijn gekoppeld aan de overschakeling van celdeling naar celstrekking. Tijdens die overgang moet dan de totale hoeveelheid calcium in de vrucht afnemen door een afname in de verhouding tussen calciumaanvoer en vruchtgroei.

Een aantal patronen in de ontwikkeling klopt echter niet met deze hypothese. Calciumaanvoer in de vrucht gaat namelijk lange tijd door. Ofwel de xyleemaanvoer blijft toch een langere periode in de vruchtgroei belangrijk, ofwel de aanvoer via het floëem wordt onderschat, of er spelen nog andere, onbekende factoren een rol bij de calciumimport. Tromp (1975) doet de suggestie dat er verschillende patronen kunnen bestaan, waarbij het soort influxpatroon dat optreedt, afhangt van de uitwendige omstandigheden. De snelheid waarmee de vrucht groeit, bepaalt dan de verhouding tussen xyleem- en floëemaanvoer.

Sommige resultaten van experimenten rechtvaardigen de suggestie dat er naast import ook export van water en calcium zou kunnen plaatsvinden (Ferguson & Watkins, 1989). Er zijn echter nog nooit directe metingen aan verricht, dus blijft het vooralsnog een speculatie. Voor balansstudies zouden kwantitatieve gegevens hierover zeer nuttig zijn.

De hoeveelheid calcium die naar de vrucht wordt getransporteerd, is afhankelijk van de blad/vrucht-verhouding (Ferguson & Watkins, 1989). Door het snoeien van bladeren in een geschikt seizoen (Wertheim et al., 1976) kan de import van calcium in vruchten dus zodanig worden beïnvloed, dat het optreden van kwaliteitsproblemen zou kunnen worden vermindert of voorkómen.

De calcium-influx in de vrucht is een metabolisch gereguleerd proces. Wanneer de remmer van het auxintransport, 2,3,5-trijoodbenzoëzuur (TIBA) op appelbomen wordt gesproeid, is calciumophoping in de vrucht verlaagd en het optreden van stip na oogst verhoogd (Himelrick & Ingle, 1981). Ook bij tomaten is een dergelijk effect gevonden (Banuelos et al., 1987). Dit effect wordt echter slechts in een beperkte periode van de vruchtgroei gevonden, namelijk vooral tijdens de celdeling. Tijdens de celdeling vormt de vrucht dus een sterke sink voor calcium influx en auxine speelt hierbij een rol.

3.4. Verdeling binnen de vrucht

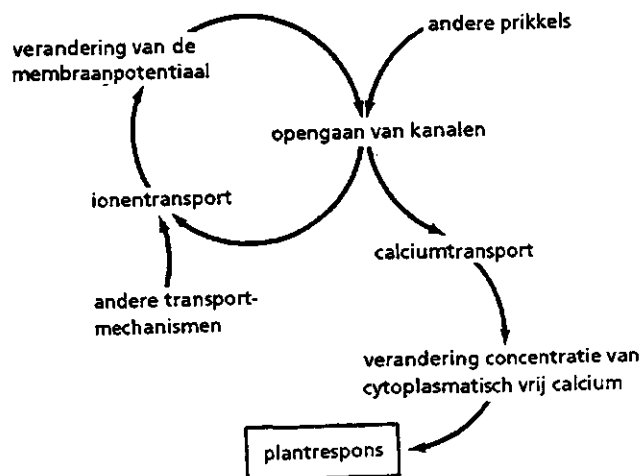
Tijdens de ontwikkeling van de vrucht ontstaat een calciumgradiënt in de vrucht, waarschijnlijk door een afnemende snelheid van calcium-influx. Doordat een deel van het calcium via het xyleem wordt aangevoerd, is de uiteindelijke plaats waar het terecht komt sterk afhankelijk van de plaats waar xyleembanen lopen, namelijk in de buurt van het transpirerende oppervlak. Verdere verdeling vindt plaats via diffusie en de plaats waar het calcium dan terecht komt is moeilijk te voorspellen.

Er wordt wel gesuggereerd, dat in de vrucht redistributie van calcium plaats vindt, maar onzekerheden over de analysemethode maken deze veronderstelling zwak (Ferguson & Watkins, 1989).

3.5. Calcium in de 'signaal-transductie'-keten

In tegenstelling tot de situatie in celwanden of membranen moet de concentratie vrij calcium in het cytoplasma zeer laag worden gehouden. Te hoge concentraties calcium kunnen enzymen inactiveren, of concurreren te sterk met magnesium bij de complexvorming met energierijke fosfaatverbindingen (ATP, GTP, etc.). Het is dus noodzakelijk dat de calciumconcentratie laag blijft voor een goed functioneren van het metabolisme.

Door een lage concentratie in het cytoplasma kan calcium bovendien een belangrijke rol spelen bij de overdracht van signalen, in de 'signaal-transductie'-keten (Fig. 5).



Figuur 5. Signaaloverdracht door calcium in de 'signaal-transductie'-keten. Belangrijke processen in de keten zijn veranderingen van de membraanpotentiaal, het openen van kanalen (Δ gates) en de daardoor veroorzaakte ionfluxen (Hille, 1992)

Dit is een keten van reacties die verlopen vanaf een moment dat de cel een prikkel - 'stimulus' - krijgt (bijvoorbeeld binding van een hormoon aan een receptor in de membraan) tot aan de uiteindelijke respons (bijvoorbeeld celstrekking). In een aantal van deze 'signaal-transductie'-systemen is er een stap waarin gedurende korte tijd calcium wordt vrijgemaakt uit een opslagpool (mogelijk ergens in de membraan) en deze 'vrij calcium'-puls weer andere reacties in gang zet, zoals het activeren van ionkanalen of het activeren van bepaalde enzymen. Voor een goed functioneren van de 'signaal-transductie'-keten is het van belang dat in de evenwichtstoestand de concentratie vrij calcium in het cytoplasma zeer laag is, namelijk in de orde van grootte van 150 nM (Marmé, 1986). Een geringe verandering in de hoeveelheid vrij calcium ten gevolge van een stimulus door bijvoorbeeld een hormoon (Poovaiah & Reddy, 1987) of blauw licht (Gallagher et al., 1988) kan de concentratie van 150 nM meer dan verdrievoudigen. Dit heeft een enorm effect op allerlei fysische of fysiologische processen.

De plant heeft een nauwkeurig reguleringsmechanisme om de calciumconcentratie in het cytoplasma laag te houden. De plasmamembraan vormt een grote barrière voor calcium, waardoor de influx laag is. Er zijn calcium-effluxpompen aanwezig op de plasmamembraan en actieve influxpompen op het membraan van het ER en de vacuole. Bovendien zijn calciumbindende eiwitten aanwezig, die door hun hoge affiniteit voor calcium de concentratie vrij calcium laag kunnen houden en daarmee waarschijnlijk een belangrijke rol spelen in de signaaltransductie.

De best gekarakteriseerde calciumbindende eiwitten zijn calmoduline en de recent geïdentificeerde CDPK's (calcium-dependent protein kinases, Roberts & Harmon 1992). Het complex calcium/calmodulin speelt een rol bij de activering van een aantal enzymen, zoals het Ca^{2+} -ATPase op de plasmamembraan (Dieter, 1984). Ook transportprocessen op andere membranen, zoals de tonoplast, worden waarschijnlijk door calmoduline beïnvloed (Roberts & Harmon, 1992). De CDPK's, die zowel gebonden aan membranen als vrij in het cytoplasma kunnen voorkomen, kunnen op verschillende manieren in het 'signaal-transductie'-systeem een regulerende rol spelen. Waarschijnlijk zijn ze betrokken bij ionentransport, fosforyleringsreacties en cytoplasmastroming.

Bij de calciuminflux in het cytoplasma zijn verschillende kanalen betrokken (Fig. 6). De kennis hierover met betrekking tot planten loopt enigszins achter bij die uit de dierfysiologie. Toch zijn er bij planten ook al een aantal calciumkanalen geïdentificeerd of zijn er sterke aanwijzingen voor hun bestaan. Dit omvat zowel calciuminfluxkanalen op de plasmamembraan als kanalen waardoor calcium vrijkomt uit opslagcompartimenten binnen de cel.

De 'trigger' voor het opengaan van de kanalen kan zijn:

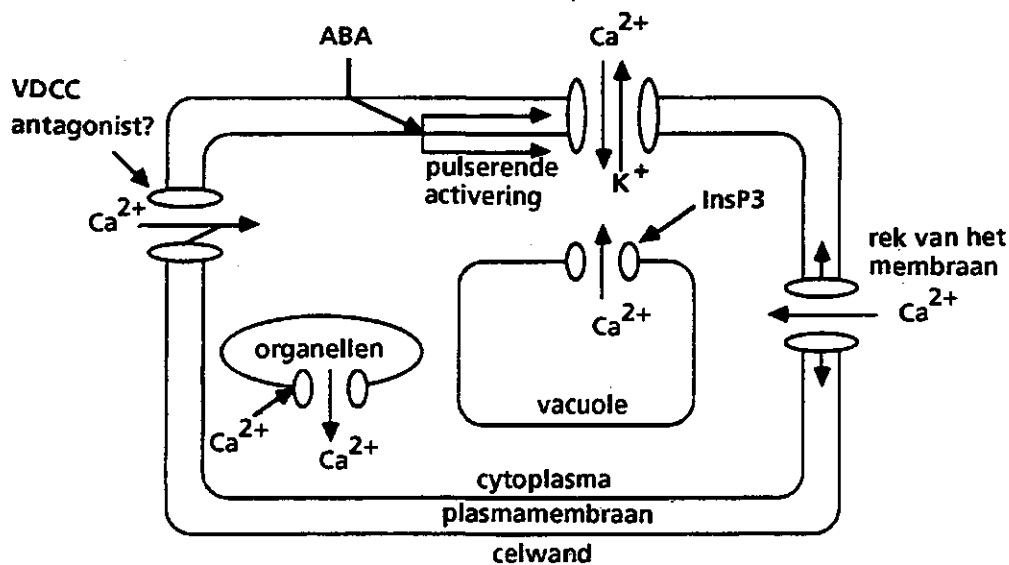
- een verandering van het potentiaalverschil over de membraan;
- binding van een hormoon, zoals ABA (abscissinezuur) aan een receptor. Deze binding kan een oscillerende verandering van de calciumconcentratie veroorzaken (zie Fig. 6); *(NB. Vaak vinden er synchroon oscillaties in een aantal naast elkaar gelegen cellen plaats. Waarschijnlijk functioneren cellen dus in clusters, waarbinnen, mogelijk via de plasmodesmata, een nauwgezette communicatie plaats vindt (Peterson & Wakui, 1990).*
- activering door InsP3 (inositol 1,4,5-trifosfaat);
- activering door Ca zelf, vrijkomend uit opslagpools na activatie van kanalen door InsP3;
- activering door rek van de plasmamembraan, zoals bij celstrekking kan optreden.

Het blijkt dat de grote hoeveelheid calcium die buiten de cel aanwezig is een belangrijke rol kan spelen in de 'signaal-transductie'-keten (Peterson & Wakui, 1990). De achtergrond van

deze relatie is nog niet duidelijk. Mogelijk raken de calciumpools in de cel na langdurige stimulatie uitgeput en is aanvulling van buitenaf nodig.

De bestudering van calcium op cellulair en subcellulair niveau is tot op heden nog niet onder de aandacht geweest in het kwaliteitsonderzoek. Het is duidelijk dat eisen ten aanzien van calciumconcentraties op verschillende plaatsen in het weefsel nogal sterk uiteenlopen: hoge concentraties in de celwand tegenover zeer lage concentraties in het cytoplasma. Dit vergt zeer goed gereguleerde transportsystemen door de hele plant heen.

Bij het onderzoek naar de oorzaken van kwaliteitsproblemen is het van belang inzicht te hebben in wisselwerking tussen de verschillende reguleringsmechanismen. Hierover bestaat momenteel nog nauwelijks kennis. De recente technische ontwikkelingen maken het mogelijk hier in de toekomst meer onderzoek aan te doen.



Figuur 6. Schematisch overzicht van de verschillende calciumkanalen, die betrokken zijn in het signaal-transductie-systeem (Schroeder & Thuleau, 1991)

4. Technische ontwikkelingen

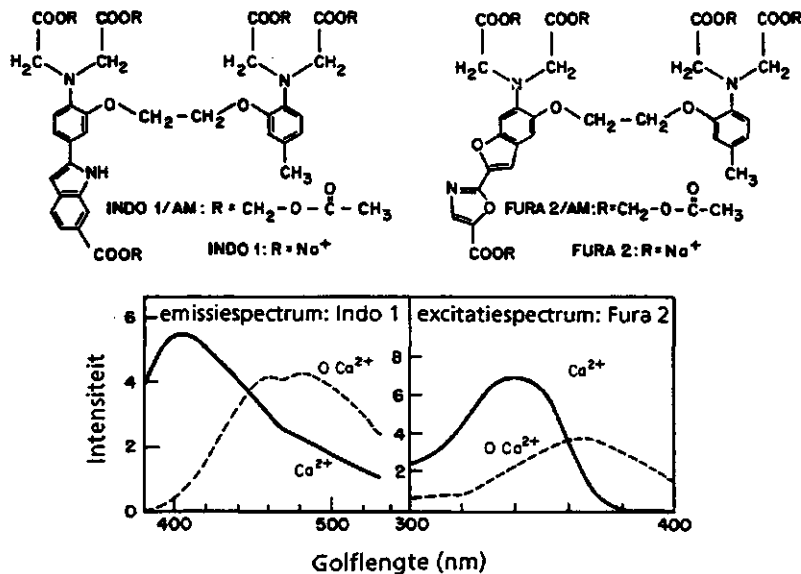
Tot aan het begin van de tachtiger jaren heeft het onderzoek naar de relatie tussen het optreden van kwaliteitsproblemen en storingen in de calciumhuishouding zich moeten beperken tot 'hele plant'-fysiologie. Dit heeft veel kennis opgeleverd over calciumtransport door de plant en de verdeling binnen de verschillende plantorganen. Het is ook duidelijk geworden dat verstoringen van de calciumhuishouding, die voorafgaan aan kwaliteitsvermindering, zeer lokaal optreden. Het lijkt voor de hand te liggen dat verder onderzoek zich nu moet concentreren op het verwerven van inzicht in processen die binnen deze lokale gebieden op cellulair of subcellulair niveau plaatsvinden.

Sinds het begin van de tachtiger jaren zijn de technische mogelijkheden om de calciumhuishouding op celniveau te bestuderen sterk uitgebreid. Door het ontwikkelen van de mogelijkheden om protoplasten en vacuoles te isoleren uit weefsel, is de cel veel toegankelijker geworden. Meer inzicht in de calciumhuishouding in de cel kan momenteel worden verkregen door niet-destructieve meting van snelle veranderingen in de hoeveelheid vrij en niet-vrij calcium en meting van calciumtransport over membranen.

4.1. Meting van intracellulair calcium

Een ideale methode om de calciumhuishouding te bestuderen is één waarbij tijdens de metingen de celstructuur intact kan blijven, zodat er inzicht wordt verkregen in de compartimentatie van het calcium in verschillende pools. NMR en x-ray microanalyse (Hughes, 1986) zijn hiervoor goede methoden. Deze technieken vereisen fixatie van het weefsel en leveren daarmee alleen momentopnames op van de situatie die heerst op het moment van fixeren. Meer informatie over reguleringsmechanismen (en dus de dynamiek van de plant) wordt verkregen, wanneer de plant intact blijft tijdens de metingen en er veranderingen in calciumconcentraties in het cytoplasma kunnen worden gemeten. Dit soort metingen is mogelijk geworden door de ontwikkeling van methoden waarbij de hoeveelheid vrij calcium in het cytoplasma in een in-vivo-situatie gemeten kan worden.

De drie meest gebruikte methoden om calcium in het cytoplasma van plantecellen te kunnen meten, zijn door gebruikmaking van lichtgevoelige eiwitten, fluorescente probes en Ca-selectieve micro-elektrodes (Thomas, 1986). Als lichtgevoelig eiwit werd aequorine als eerste met succes gebruikt (Williamson & Ashley, 1982). Dit eiwit, afkomstig uit een kwal, emitteert licht bij een reactie waarbij calcium de katalysator is. Als fluorescente probes zijn vooral de recent ontwikkelde fura analogen (Grynkiewicz et al. 1985) geschikt. De fura-analogen indo 1 en fura-2 (Fig. 7) hebben beide een EGTA-achtige tetracarboxylzuurstructuur, maar hebben een verschillende fluorescente groep. Deze verbindingen fluoresceren zodra ze een complex hebben gevormd met calcium.



Figuur 7. De chemische structuren van indo-1 en fura-2 en het effect van calciumbinding op de emissie en excitatiespectra van respectievelijk indo-1 en fura-2 (Bush & Jones, 1990)

Afgezien van de technieken waarbij enkele nieuwere probes worden gebruikt, is het bij al deze methodieken noodzakelijk micro-elektroden te gebruiken, hetzij voor injectie (van de probe) hetzij voor de meting zelf. Bij het onderzoek is de aanwezigheid van een celwand of celafmetingen kleiner dan 100 mM nogal eens problematisch. Bovendien is er het probleem dat de pipet vaak in de vacuole wordt gestoken in plaats van in het cytoplasma.

De interpretatie van de gegevens is gecompliceerd. De hoeveelheid vrij calcium in het cytoplasma is laag en in evenwicht met een betrekkelijk grote hoeveelheid calcium, die gebonden is of opgeslagen in allerlei pools. Het gevolg daarvan is dat de concentratie vrij calcium gemakkelijk kan veranderen ten gevolge van redistributie, verandering van de pH, nalevering vanuit pools of zelfs door interactie met een probe. Bovendien is niet duidelijk of de concentratie dan wel de activiteit van het calcium van belang is voor de 'signaal-transductie'-processen in het cytoplasma. Momenteel wordt veel onderzoek gedaan aan veranderingen van de hoeveelheid vrij calcium en niet-vrij calcium tijdens allerlei fysiologische processen. Vooral bij de bestudering van het openen en sluiten van huidmondjes is al succes op dit gebied behaald (Blatt et al., 1990; Gilroy et al., 1990).

Al leveren deze technieken kwantitatief nog problemen, ze zijn zeer waardevol in het geven van kwalitatieve informatie. De ontwikkeling van de technieken heeft zeker nieuwe inzichten opgeleverd in bijvoorbeeld het signaal-transductie-systeem.

4.2. Transport over membranen

Het meten van de hoeveelheid vrij calcium kan indirect informatie opleveren over het calciumtransport. Het is echter beter om hiervoor een meer directe methode te gebruiken. Het isotoop ^{45}Ca wordt al langere tijd gebruikt in transportstudies (Ho, 1989), maar directe meting van transport over membranen is pas mogelijk sinds protoplasten of vacuoles kunnen worden geïsoleerd of membraanvesicles kunnen worden gemaakt. Deze studies leveren nuttige informatie op over de regulering van calciumopname door membranen.

Meer specifieke informatie over de kinetiek van het transport door kanalen en momentane veranderingen erin door stimuli (licht, hormonen, veranderingen membraanpotentiaal, etc.; zie Fig. 6) leveren studies met behulp van elektrofysiologische technieken, zoals de 'patch-clamp'-opstelling (Schroeder & Thuleau, 1991).

Een nadeel van deze methodieken kan zijn dat er altijd aan deelsystemen wordt gemeten. Het vertalen van de gegevens naar andere integratieniveaus (blad, vrucht, hele plant) is moeilijk. Toch kunnen de resultaten uit cel- of membraanstudies in het algemeen richtinggevend zijn voor verder onderzoek aan de hele plant.

5. Ingangen voor nieuw onderzoek

Nu de technische ontwikkeling in de tachtiger jaren zo'n vlucht genomen heeft, is het de vraag of gebruik ervan het onderzoek naar de relatie tussen kwaliteitsproblemen en verstoringen in de calciumhuishouding een nieuwe impuls kan geven. In hoeverre kan onderzoek op cel-, membraan- of moleculair niveau richtinggevend zijn voor verder onderzoek op orgaan- of 'hele plant'-niveau?

Er zijn enkele onderzoeksgebieden aan te geven:

1. Het is van belang allereerst een goede vraagstelling te formuleren. Hier zit een belangrijk probleem. Het is momenteel nog steeds niet mogelijk om een goede prognose te geven over het eventueel optreden van kwaliteitsproblemen in delen van het weefsel.
2. Er is te weinig inzicht in de localisatie van de symptomen van kwaliteitsvermindering (c.q. lokaal calciumgebrek of -overmaat) in blad of vrucht.
3. Bovendien is er gebrek aan inzicht in de relatie tussen een kwaliteitsprobleem en het niet-optimaal functioneren van biochemische processen, waarbij calcium en eventueel ook kalium en magnesium betrokken zijn. Heel direct onderzoek naar deze relatie lijkt mij niet mogelijk. Maar men kan er wel vanuit gaan dat aanwezigheid van calcium in het cytoplasma in hoeveelheden, zoals beschreven in Hoofdstuk 3.5 essentieel is voor de vitaliteit van cel en weefsel. Het is een vereiste voor een optimale vitaliteit van de cellen dat calcium onder alle omstandigheden beschikbaar is of uit pools vrij kan komen. Bovendien moet het aanwezige calcium in balans zijn met de andere mineralen.

Bovenstaande toont aan dat het nodig is om een gedetailleerd inzicht te krijgen in de manier waarop calcium terechtkomt op de plaatsen waarop het een functie vervult (zie Fig. 1). Dit betekent mijns inziens dat het accent van het toekomstig onderzoek moet liggen op de bestudering van de (regulatie van) transportprocessen van calcium op verschillende integratieniveaus: transport over grote afstand door de vaatbundels en cellulair en subcellulair transport. Een voorwaarde daarbij is dat de verschillende niveaus naast elkaar worden bestudeerd en de resultaten uit de verschillende deelonderzoeken onderling worden vergeleken. Zowel een fysiologische als moleculair biologische onderzoeksaanpak zijn daarbij relevant. Hierna volgen enkele indicaties voor nieuwe onderzoeksingangen. Er zal niet al te uitgebreid worden ingegaan op materiaal en methode van het onderzoek, want dat valt buiten het bestek van dit rapport.

5.1. Orgaan- en 'hele plant'-niveau

Op het integratieniveau van orgaan of hele plant is het van belang om het be- en ontladen van het meristematisch weefsel te bestuderen. Het is duidelijk dat meristematisch weefsel 's nachts meer aanvoer van calcium krijgt dan overdag. Een goede uitgangstelling voor onderzoek is:

De hydrostatische potentiaal van bladeren concurreert met de osmotische potentiaal van de vrucht. Overdag trekt de hydrostatische gradiënt het calcium naar de bladeren. 's Nachts zal de osmotische potentiaal van de vruchten juist Ca-transport naar de vruchten veroorzaken.

Een belangrijk gat in de kennis is, hoe het watertransport precies verloopt en wat de bijdrage van xyleemtransport en floëemtransport in de calciumvoorziening van meristemen is. Het is van belang om (bijvoorbeeld met ^{45}Ca en $^3\text{H}_2\text{O}$) hierover meer kwantitatieve informatie te verzamelen. Belangrijke vragen in dit verband zijn:

- zijn de xyleemvaten naar de vrucht tijdens de fase, waarin calciumtransport naar de vrucht van belang is, volledig ontwikkeld?
- hoe is de verdeling xyleemtransport/floëemtransport in de calciumvoorziening?
- zijn er tijdens de duur van de vruchtgroei duidelijk twee fasen te onderscheiden waartussen verschillen optreden in de calciumimport. Zo ja, corresponderen deze twee fasen met xyleem- en floëemtransport?
- correspondeert een overgang van overwegend xyleemtransport naar overwegend floëemtransport met een overgang van een celdelingsfase naar een celstrekingsfase?
- is het juist dat de eerste fase (indien aanwezig; zie boven) het meest bepalend is voor het uiteindelijke calciumgehalte in het betreffende plantedeel? Hoe is het calciumtransport tijdens de betreffende fase te beïnvloeden (wanneer de snelheid van de vruchtgroei laag wordt gehouden, is het uiteindelijk calciumgehalte in de rijpe vrucht relatief hoog). Wat is het effect van een tijdelijke onderbreking van het calcium- en watertransport op lokale calciumgehalten?
- is het knikpunt tussen de eventueel aanwezige fasen te beïnvloeden (door temperatuur of relatieve luchtvochtigheid)?
- hoe is de relatie met de verdamping?

Het is niet duidelijk in welke mate het calcium binnen de vrucht wordt geredistribueerd of dat er zelfs efflux uit de vrucht plaatsvindt. Een eventuele efflux van calcium uit de vrucht kan een belangrijke rol spelen bij de uiteindelijke hoeveelheid calcium. Concreet komt dit type onderzoek neer op het maken van balansstudies, waarbij de volgende fasen van belang zijn:

- eerste periode van calcium-belading via xyleemvaten;
- tweede-fase-belading;
- verder is inzicht nodig in dag/nacht in- en efflux;
- hoe is de situatie waarin de concurrentie wordt beïnvloed via Ca-aanvoer vanuit de wortel.

Bij de bestudering van deze onderwerpen is het zinvol om modelsystemen te bestuderen (bijvoorbeeld een tak met een vrucht op een vaas, waarbij de worteldruk kan worden nagebootst met behulp van een pressurebomb). De gegevens kunnen aan een intact systeem worden getoetst met bijvoorbeeld ^{45}Ca en $^3\text{H}_2\text{O}$.

5.2. Cellulair en subcellulair niveau

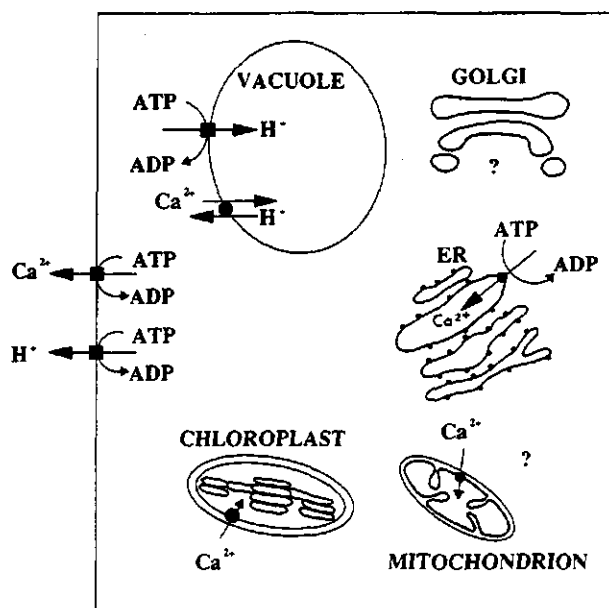
De concentratie van het calcium in het cytoplasma kan door de plant goed worden gereguleerd. Er zijn een aantal transportsystemen bekend die verantwoordelijk zijn voor in- en efflux van calcium door verschillende membranen in de cel (Fig. 8).

Er is echter nog weinig kennis over de interactie tussen deze systemen en de invloed van allerlei in- en uitwendige stimuli (stuurlicht, droogte, hormonen, etc.) in-vivo. Het is daarbij heel belangrijk meer inzicht te krijgen in eventuele verschillen in de eigenschappen van deze transportprocessen tussen cellen of weefsels. Alle kennis die men nu heeft over het signaal-transductie-systeem is algemeen. Men kent nog niet de orgaanspecifieke aard van de cellen

in dit mechanisme. Het is daarom zinvol om (bijvoorbeeld met behulp van immunologische technieken) de aanwezigheid van calciumbindende eiwitten te identificeren en deze informatie te koppelen aan bepalingen van concentraties vrij calcium (met bijvoorbeeld fluorescente probes) in meristeem of andere organen. Dit kan een goed inzicht opleveren in transportmogelijkheden binnen de verschillende cel- of weefseltypen, die gevoelig kunnen zijn voor kwaliteitsproblemen.

Daarnaast is meer inzicht nodig in de hoeveelheid calcium die werkelijk functioneel in de cel beschikbaar kan komen vanuit de opslagpools, zoals de vacuole of het endoplasmatisch reticulum.

Behalve onderzoek aan enkele cellen of zelfs membranen, is het symplastisch transport van calcium via de plasmodesmata (gebonden aan eiwitten, organische zuren of vrij; Raven, 1986) eveneens een onderdeel, dat in dit kader van belang kan zijn. Calcium heeft hierbij waarschijnlijk een belangrijke functie bij de signaaloverdracht tussen cellen, de zogenaamde cel/cel-communicatie. Zoals al vermeld, treden oscillaties binnen het signaal-transductiesysteem op in celclusters. Dit kan erop duiden dat de clusters misschien heel autonome, begrensde gebieden zijn. Het is nog niet duidelijk hoe de relatie is tussen de hoeveelheid extracellulair en intracellulair calcium. Hoe dus een lokaal calciumgebrek ingrijpt op de signaaloverdracht is nog niet bekend. Met behulp van fluorescente probes die door plasmodesmata kunnen permeëren (Terry & Robards, 1986) kan meer informatie op dit gebied worden verkregen.



Figuur 8. Overzicht van verschillende transportprocessen van calcium over membranen in de plantecel (Evans et al., 1991)

5.3. Genetische manipulatie

Het is duidelijk dat calcium bij een groot aantal processen een rol speelt, waarbij waarschijnlijk meerdere sleutelenzymen betrokken zijn. Het is dus niet mogelijk één bepaald eiwit of proces aan te duiden, waardoor de regulering van de calciumhuishouding wordt bepaald. Dit maakt het moeilijk om een goed aanknopingspunt te vinden voor genetische manipulatie. Er zijn echter wel mogelijkheden, zoals de literatuur aantoont. Poovaiah (1979) beschrijft een niet-afrijpende (*rin*) mutant van tomaat die significant meer gebonden calcium in de afrijpende vrucht bevat dan de controleplant. Dit blijkt gekoppeld te zijn met een geringere stijging van het polygalacturonase in de mutant dan in de controleplant. Recentelijk is een transformant van tomaat ontwikkeld, waarin expressie van het polygalacturonase-gen werd geremd (Pike, K., ICI Seeds, Surrey, UK, lezing NIABA Annual Meeting, Den Haag, 9 april 1992). Hierdoor werd de synthese geremd van het enzym polygalacturonase, dat verantwoordelijk is voor de celwandafbraak en had tot gevolg dat de veroudering meer dan een week werd uitgesteld. Hiermee werd de houdbaarheid van de tomaat verlengd.

Zinvol onderzoek met behulp van moleculair biologische technieken kan gebeuren aan calciumtransporteiwitten, mits de regulering van het betreffende transporteiwit maar niet op translatieniveau plaats vindt (Evans et al., 1991). Productie van transgene planten met een gestimuleerde dan wel geremde expressie van calciumtransporteiwitten kan inzicht geven in regulering van cytoplasmatische calciumconcentraties voor zover translatie hierbij betrokken is.

Een andere mogelijkheid moet misschien gezocht worden in de betrokkenheid van hormonen bij de calciumhuishouding. Calcium beïnvloedt de werking van hormonen, maar de hormonen auxine, cytokinine en gibberelline hebben ook effect op calciumtransport (Elliott, 1986). Net als bij transporteiwitmutanten kan ontwikkeling van transgene planten met een gestimuleerde dan wel geremde expressie van de productie van één van de genoemde hormonen inzicht geven in de regulering van calciumtransport.

6. Conclusie

Voor innovatie van het onderzoek naar de relatie tussen calciumhuishouding en het optreden van kwaliteitsproblemen kunnen de nieuwere technieken van groot nut zijn bij het verwerven van meer inzicht. Het onderzoek zal zich nu in eerste instantie moeten richten op de bestudering van het calciumtransport zowel op hele-plant- en orgaanniveau (lange afstandstransport) als op cellulair en subcellulair niveau (membraantransport en intracellulair transport). Het is van essentieel belang om beide lijnen van onderzoek parallel aan te pakken en de resultaten van beide onderzoekslijnen te integreren. Dit vergt overleg tussen proefstations, instituten en universiteiten, gezien het brede onderzoeksterrein waarover zich dit kan uitstrekken.

Technische expertise voor een dergelijke brede aanpak is op het CABO-DLO slechts gedeeltelijk aanwezig. De deelgebieden waarbij nutriëntentransport en waterhuishouding een wezenlijk onderdeel vormen van het onderzoek, kunnen op het CABO-DLO worden uitgevoerd. Voor die onderdelen waarbij meer naar cellulair en subcellulair niveau moet worden gekeken, is het CABO-DLO echter niet voldoende toegerust. Dit type onderzoek vereist zeer kostbare apparatuur en goede expertise en maakt nauwe samenwerking met andere onderzoeksinstituten noodzakelijk.

Dit rapport kan als uitgangsmateriaal dienen voor overleg en de formulering van daaruit voortvloeiende projecten.

Literatuur

- Adams, P., 1988.
Some effects of environment on the calcium status of tomato leaves, In: K.E. Cockshull (Ed.), The effects of high humidity on plant growth in energy-saving greenhouses, Commission of the European Communities, Luxembourg, Agricultural Series 11261, 61-70.
- Armstrong, M.J. & E.A. Kirkby, 1979.
Estimation of potassium recirculation in tomato plants by comparison of the rates of potassium and calcium accumulation in the tops with their fluxes in the xylem stream. *Plant Physiology* 63: 1143-1148.
- Askew, H.O., E.T. Chittenden, R.J. Monk & J. Watson, 1960.
Chemical investigations on bitter pit of apples. II. The effect of supplementary mineral sprays on incidence of pitting and on chemical composition of Cox's Orange fruit and leaves. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 3: 141-168.
- Bangerth, F., D.R. Dilley & D.H. Dewey, 1972.
Effect of calcium infusion on internal break-down and respiration of apple fruits. *Journal of American Society of Horticultural Science* 97: 679-682.
- Banuelos, G.S., F. Bangerth & H. Marschner, 1987.
Relationship between polar basipetal auxin transport and acropetal Ca^{2+} transport into tomato fruits. *Physiologia Plantarum* 71: 321-327.
- Bengtsson, B., 1982.
Uptake and translocation of calcium in cucumber. *Physiologia Plantarum* 54: 107-111.
- Bierman, P.M., C.J. Rosen & H.F. Wilkins, 1990.
Leaf edge burn and axillary shoot growth of vegetative poinsettia plants: influence of calcium, nitrogen form and molybdenum. *Journal of American Society of Horticultural Science* 115: 73-78.
- Blatt, M., G. Thiel & D.R. Trentham, 1990.
Reversible inactivation of K^+ channels of *Vicia* stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-triphosphate. *Nature* 346: 766-769.
- Bradfield, E.C., 1976.
Calcium complexes in the xylem sap of apple shoots. *Plant and Soil* 44: 496-499.
- Buitelaar, K., 1985.
Drie manieren om rand te voorkomen. *Tuinderij* 28 februari 1985: 41.
- Bush, D.S. & R.L. Jones, 1990.
Measuring intracellular Ca^{2+} levels in plant cells using the fluorescent probes, indo-1 and fura-2. *Plant Physiology* 93: 841-845.
- Caldwell, C.R. & A. Haug, 1981.
Temperature dependence of the barley root plasma membrane-bound Ca^{2+} and Mg^{2+} -dependent ATPase. *Physiologia Plantarum* 53: 117-124.
- Clarkson, D.T. & J. Sanderson, 1971.
Inhibition of the uptake and long-distance transport of calcium by aluminium and other polyvalent cations. *Journal of Experimental Botany* 23: 837-851.
- Clarkson, D.T. & A.W. Robards, 1975.
The endodermis, its structural development and physiological role. In: J.G. Torrey & D.T. Clarkson (Eds.) *The development and function of roots*, Acad. Press, London, 415-436.

- Clarkson, D.T., 1984.
Calcium transport between tissues and its distribution in the plant. *Plant, Cell and Environment* 7: 449-456.
- Collier, G.F. & T.W. Tibbits, 1984.
Effects of relative humidity and root temperature on calcium concentration and tipburn development in lettuce. *Journal of American Society Of Horticultural Science* 109: 128-131.
- Corden, M.E., 1965.
Influence of calcium nutrition on Fusarium wilt of tomato and polygalacturonase activity. *Phytopathology* 55: 222-224.
- Dekock, P.C., P.W. Dyson, A. Hall & F. Grabowska, 1975.
Metabolic changes associated with calcium deficiency in potato sprouts. *Potato Research* 18: 573-581.
- Delong, W.A., 1936.
Variations in the chief ash constituents of apples affected with blotchy cork. *Plant Physiology* 11: 453-456.
- Dieter, P., 1984.
Calmodulin and calmodulin-mediated processes in plants. *Plant Cell and Environment* 7: 371-380.
- Disco, A., 1992.
Meligheid objectief beoordelen: Groenten en Fruit 1 mei 1992: 19.
- Elliott, D.C., 1986.
Calcium involvement in plant hormone action. In: A.J. Trewavas (Ed.), *Molecular and cellular aspects of calcium in plant development*, NATO ASI Series, 104, Plenum Press, New York and London, 285-292.
- Evans, D.E., S.-A. Briars & L. Williams, 1991.
Active calcium transport by plant cell membranes. *Journal of Experimental Botany* 42: 285-303.
- Ferguson, I.B. & C.B. Watkins, 1989.
Bitter pit in apple fruit. *Horticultural Reviews* 11: 289-355.
- Gallagher, S. T.S. Short, P.M. Ray, L.H. Pratt & W.R. Briggs, 1988.
Light-mediated changes in two proteins found associated with plasma membrane fractions from pea stem sections, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 85: 8003-8007.
- Geijn, S.C. van de & C.M. Petit, 1979.
Transport of divalent cations. Cation exchange capacity of intact xylem vessels. *Plant Physiology* 64: 954-958.
- Geijn, S.C. van de & F. Smeulders, 1981.
Diurnal changes in the flux of calcium toward meristems and transpiring leaves in tomato and maize plants. *Plant Physiology* 151: 265-271.
- Gilroy, S., N.D. Read & A.J. Trewavas, 1990.
Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 346: 769-771.
- Goor, B.J. van, 1968.
The role of calcium and cell permeability in the disease blossom end rot of tomatoes. *Physiologia Plantarum* 21: 1110-1121.
- Gryniewicz, G., M. Poenie & R.Y. Tsien, 1985.
A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260: 3440.

- Guttridge, C.G., E.G. Bradfield & R. Holder, 1981.
Dependence of calcium transport into strawberry leaves on positive pressure of xylem. *Annals of Botany* 48: 473-480.
- Hanger, B.C., 1979.
The movement of calcium in plants. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 10: 171-193.
- Hecht-Buchholz, C., 1979.
Calcium deficiency and plant ultrastructure. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 10: 67-81.
- Hepler, P.K. & R.O. Wayne, 1985.
Calcium and plant development. *Annual Review of Plant Physiology* 36: 397-439.
- Hille, B., 1992.
Ionic channels of excitable membranes. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, 607 pp.
- Himelrick, D.G. & M. Ingle, 1981.
Calcium levels of apple leaves and fruit following tree sprays with EDTA, oxalic acid, TIBA, and calcium chloride. *HortScience* 16: 167-168.
- Himelrick, D.G. & R.F. McDuffie, 1983.
The calcium cycle: uptake and distribution in apple trees. *HortScience* 18: 147-151.
- Ho, L.C., 1989.
Environmental effects on the diurnal accumulation of ^{45}Ca by young fruit and leaves of tomato plants. *Annals of Botany* 63: 281-288.
- Hoog, J. de, 1989.
Kwaliteit Chinese kool; calcium in het hart geeft rand geen kans. *Tuinderij* 69: 30-31.
- Hoog, J. de, 1991.
Korte zomerteelt blijft moeilijk. *Groenten en Fruit* 24 mei 1991: 12-13
- Hughes, W.A., 1986.
NMR and x-ray microanalysis methods for measurement of calcium in plant cells, In: A.J. Trewavas (Ed.), *Molecular and cellular aspects of calcium in plant development*, NATO ASI Series, 104, Plenum Press, New York and London, 157-164.
- Hylmö, B., 1953.
Transpiration and ion absorption. *Physiologia Plantarum* 6: 333-405.
- Janse, J., 1988.
Goudspikkels bij tomaat: een oplosbaar probleem. *Groenten en Fruit* 1 april 1988: 30-31.
- Janse, J. & C. de Kreij, 1989.
Paprika. Vooral stip bij hoog calciumgehalte in de vrucht. *Groenten en Fruit* 44: 40-41.
- Jolivet, E., V. Fiala, J. Laville & J.-P. Cochet, 1988.
Prevention de la coloration brune de l'axa du chinon d'endive par traitement de la racine par une solution de chlorure de calcium. *P.H.M. - Revue Horticole* 283: 33-38.
- Kirkby, E.A. & D.J. Pilbeam, 1984.
Calcium as a plant nutrient. *Plant, Cell and Environment* 7: 397-405.
- Knight, A.H. & W.M. Croke, 1973.
Cation exchange capacity and chemical composition of the floral parts of *Antirrhium* and *Lilium*. *Annals of Botany* 37: 155-157.
- Koontz, H.V. & R.E. Foote, 1966.
Transpiration and calcium deposition by unifoliate leaves of *Phaseolus vulgaris* differing in maturity. *Physiologia Plantarum* 14: 313-321.
- Kreij, C. de, 1990a.
Klappers veroorzaakt door gebrek aan calcium. *Groenten en Fruit* 31 augustus 1990: 35.

- Kreij, C. de, 1990b.
Calcium in de plant. Proefstation voor Tuinbouw Onder Glas te Naaldwijk, Intern verslag nr 26, 30 pp.
- Kreij, C. de, 1992.
Kort blad door ophoping assimilaten. Groenten en Fruit 17 april 1992: 16-17.
- Kreij, C. de, J. Janse, B.J. van Goor & J.D.T. van Doesburg, 1992.
The incidence of calcium oxalate crystals in fruit walls of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by humidity, phosphate and calcium supply. The Journal of Horticultural Science 67: 45-50.
- Maas, E.V., 1969.
Calcium uptake into excised maize roots and interactions with alkali cations. Plant Physiology 44: 985-989.
- Maaswinkel, R.H.M. & G.W.H. Welles, 1986.
Factors influencing glassiness in lettuce. Netherlands Journal of Agricultural Science 34: 57-65.
- Marmé, D., 1986.
The role of calcium in the regulation of plant metabolism. In: A.J. Trewavas (Ed.), Molecular and cellular aspects of calcium in plant development. Plenum Press, New York and London, 1-8.
- Marschner, H. & C. Richter, 1974.
Calcium-Transport in Wurzeln von Mais- und Bohnenkeimpflanzen. Plant Soil 40: 193-210.
- Marschner, H., 1983.
General introduction to the mineral nutrition of plants. In: A. Läuchli & R.L. Bielecki (Eds.), Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series, 15A, Springer-Verlag, Berlin, 5-60.
- Marschner, H., 1986.
Function of mineral nutrients: macronutrients. In: Mineral nutrition of higher plants, Acad. Press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, London, 195-268.
- Mattoo, A.K. & W.B. White, 1991.
Regulation of Ethylene Biosynthesis. In: A.K. Mattoo & J.C. Suttle (Eds.), Plant Hormone Ethylene, CRC Press Inc, Boca Raton, 21-42.
- McAlpine, D., 1912.
Bitter pit in investigations. The past history and present position of the bitter pit question. First progress report, 1911-1912, Commonwealth Australia, Melbourne.
- Outer, R.W. den, 1989.
Internal browning of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.). Journal of Horticultural Science 64: 697-704.
- Outer, R.W. den & W.L.H. van Veenendaal, 1988.
Gold speckles and crystals in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.). The Journal of Horticultural Science 63: 645-649.
- Palzkill, D.A. & T.W. Tibbitts, 1977.
Evidence that root pressure flow is required for calcium transport to head leaves of cabbage. Plant Physiology 60: 854-856.
- Peel, A.J., 1972.
The control of solute movement into sieve elements. Pesticide Science 3: 631-641.
- Perring, M.A., 1986.
Incidence of bitter pit in relation to the calcium content of apples: problems and paradoxes, a review. Journal of the science of Food and Agriculture 37: 591-606.

- Peterson, O.H. & M. Wakui, 1990.
Oscillating intracellular Ca^{2+} signals evoked by activation of receptors linked to inositol lipid hydrolysis: mechanism of generation. *Journal of Membrane Biology* 118: 93-105.
- Poovaiah, B.W., 1979.
Role of calcium in ripening and senescence. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 10: 83-88.
- Poovaiah, B.W. & Reddy, A.S.N., 1987. Calcium messenger system in plants. *CRC Critical Reviews in Plant Science* 6: 47-103.
- Raven, J.A., 1977.
 H^+ and Ca^{2+} in phloem and symplast: relation of relative immobility of the ions to the cytoplasmic nature of the transport paths. *New Phytologist* 79: 465-480.
- Raven, J.A., 1986. Long distance transport of calcium. In: A.J. Trewavas (Ed.), *Molecular and cellular aspects of calcium in plant development*, NATO ASI Series, 104, Plenum Press, New York and London, 241-250.
- Roberts, D.M. & A.C. Harmon, 1992.
Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 375-414.
- Russell, R.S. & D.T. Clarkson, 1976.
Ion transport in root systems. In: N. Sunderland (Ed.), *Perspectives in Experimental Biology*, 2; Botany, Pergamon Press, Oxford, 401-411.
- Schmit, J.-N., 1981.
Le calcium dans le cellule génératrice en mitose. Etude dans le tube pollinique en germination de *Clivia nobilis* Lindl. (*Amaryllidaceae*), *Comptes rendus des seances de l'Academie des Sciences, Serie 3* 293: 755-760.
- Schroeder, J.I. & P. Thuleau, 1991.
 Ca^{2+} channels in higher plant cells. *The Plant Cell* 3: 555-559.
- Slobbe, M.H.M. van, 1992.
Waslaag en sterk weefsel onontbeerlijk. *Groenten en Fruit* 24 april 1992: 37.
- Steveninck, R.F.M. van, 1965.
The significance of calcium on the apparent permeability of cell membranes and the effects of substitution with other divalent ions. *Physiologia Plantarum* 18: 54-69.
- Terry, B.R. & A.W. Robards, 1986.
Direct estimation of plasmodesmatal conductivity, In: A.J. Trewavas (Ed.), *Molecular and cellular aspects of calcium in plant development*, NATO ASI Series, 104, Plenum Press, New York and London, 407.
- Thomas, M.V., 1986.
The definition and measurement of intracellular free Ca, In: A.J. Trewavas (Ed.), *Molecular and cellular aspects of calcium in plant development*, NATO ASI Series, 104, Plenum Press, New York and London, 141-147.
- Tromp, J., 1975.
The effect of temperature on growth and mineral nutrition of fruits of apple, with special reference to calcium. *Physiologia Plantarum* 33: 87-93.
- Welles, G.W.H., 1990.
Belangrijke kwaliteitsproblemen bij de teelt van groentegewassen onder glas, In: H.M. Dekhuijzen & S.C. van de Geijn (Eds.), *Agrobiologische Thema's 2*, Centrum voor Agrobiologisch Onderzoek (CABO), Wageningen, 3-14.
- Wertheim, S.J., B.J. van Goor, O.L. Staden & M. Herregods, 1976.
Fysiogene afwijkingen van de vrucht, In: J. Tromp, H. Jonkers & S.J. Wertheim (Eds.), *Grondslagen van de fruitteelt, De fysiologie van de vruchtboom*, Staatsuitgeverij, 's-Gravenhage, 308-338.

Wieneke, J. & F. Führ, 1975.

Untersuchungen zur Translokation von ^{45}Ca im Apfelbaum. IV Sekundäre Ca-Verlagerung nach der Ruheperiode. *Gartenbauwissenschaft* 40: 105-112.

Wiersum, L.K., 1965.

Invloed van groei en verdamping der vruchten op het optreden van neusrot bij tomaten. *Mededelingen Directie Tuinbouw* 28: 264-267.

Williamson, R.E. & C.C. Ashley, 1982.

Free Ca and cytoplasmic streaming in alga *Chara*. *Nature* 296: 647.