

Minder belichten Phalaenopsis zonder productieverlies IV

Belichten Phalaenopsis op plantbehoefte



Oktober 2019

Govert Trouwborst, Stefan van den Boogaart & Sander Hogewoning

Minder belichten Phalaenopsis zonder productieverlies IV

Belichten Phalaenopsis op plantbehoefte

Oktober 2019

G. Trouwborst, S. van den Boogaart & S.W. Hogewoning

Plant Lighting B.V.

Veilingweg 46

3981 PC Bunnik

info@plantlighting.nl

www.plantlighting.nl

REFERAAT

G. Trouwborst, S. van den Boogaart, S.W. Hogewoning. 2019. Minder belichten Phalaenopsis zonder productieverlies IV: Belichten Phalaenopsis op plantbehoefte. Plant Lighting B.V., Bunnik. 59p.

Projectnummer: 20074



Ministerie van Landbouw,
Natuur en Voedselkwaliteit



© 2019 Plant Lighting B.V.

Dit rapport is tot stand gekomen in samenwerking met het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit en Glastuinbouw Nederland in het kader van het programma Kas als Energiebron, ter stimulering van energiebesparende maatregelen in de tuinbouw. Het onderzoek is mede mogelijk gemaakt door bijdragen vanuit de gewascoöperatie potorchidee. De resultaten mogen vrij gebruikt worden, mits de bronnen worden vermeld.

Plant Lighting B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen als gevolg van gebruik van gegevens uit deze uitgave.

Inhoudsopgave

REFERAAT	3
SAMENVATTING	5
DANKWOORD	7
1 INLEIDING	8
1.1 Kader onderzoek	8
1.2 Probleemstelling	8
1.3 Onderzoeksvragen	11
1.4 Leeswijzer	11
1.5 Gebruikte begrippen in het rapport	12
2 MATERIAAL EN METHODEN	13
2.1 Plantmateriaal, teeltcondities en tijdslijn proef	13
2.2 Belichting	15
2.3 Behandelingen en metingen korte termijn	15
2.4 Behandelingen en metingen lange termijn	17
2.5 Malaat- en citraatmetingen	19
3 RESULTATEN EN DISCUSSIE	21
3.1 Effect verandering lichtintensiteit op korte termijn	21
3.2 Effect verandering lichtintensiteit op lange termijn	26
3.3 Eindkwaliteit planten	34
4 BELICHTINGSSTRATEGIE VOOR DE PRAKTIJK	36
4.1 Praktische consequenties voor de teelt	36
4.2 Waar staan we nu?	38
REFERENTIES	39
BIJLAGE 1 LITERATUURSTUDIE REGULATIE AFBRAAK MALAAT	42
B1.1 Inleiding	42
B1.2 Regulatie malaat in CAM-fase III	43
B1.3 Rol van Citraat	52
BIJLAGE 2 METINGEN VAN CITRAAT	58
B2.1 Korte termijn verandering citraat	58
B2.2 lange termijn verandering citraat	58

Samenvatting

Doelstelling en onderzoeksvragen

Het ritme van *Phalaenopsis* kent vier fases per etmaal. In CAM-fase III zijn de huidmondjes gesloten, wordt malaat afgebroken, en wordt het uit het malaat vrijkomende CO₂ met behulp van licht geassimileerd tot suikers. CAM-fase III duurt vaak 8 tot 10 uur, en in die periode moet de plant het grootste deel van de dagelijkse lichtsom krijgen. Het is voor *Phalaenopsis* niet bekend in hoeverre de intensiteit van het licht een directe invloed heeft op de afbraak van malaat gedurende CAM-fase III. De basisvraag die centraal stond in dit onderzoek was hoe het patroon van malaatafbraak verloopt gedurende CAM-fase III. Verloopt dit in een constant patroon ongeacht de lichtintensiteit, verandert het tempo van afbraak, of past het tempo zich aan de lichtintensiteit aan? Een antwoord op deze vraag is belangrijk voor een efficiënte benutting van belichting.

Er stonden drie praktijkgerichte onderzoeksvragen centraal:

1. Is lichtintegratie binnen CAM-fase III mogelijk, of moet een constante lichtintensiteit worden gehandhaafd?
2. Is lichtintegratie over een hele dag mogelijk?
3. Is lichtintegratie over meerdere dagen mogelijk?

Proefopzet

Er werden *Phalaenopsis* planten cv. Sacramento gedurende 30 weken geteeld in zes klimaatunits van 2m² bij Plant Lighting te Bunnik. Gedurende drie weken kregen alle planten eenzelfde behandeling (aanpassingsfase). Na deze drie weken werd het effect van een 1-dagsverandering in lichtregime op de malaatafbraak getest via metingen met fotosyntheseapparatuur en via biochemische metingen van het verloop van de malaatafbraak. Hierna werden zes lange termijn behandelingen ingezet waarbij de totale lichtsom en daglengte gelijk bleven, maar waarbij volgens verschillende ritmes belicht werd:

Bij de eerste vier behandelingen verschilde alleen het patroon van de lichtsom gedurende CAM-fase III. Ervoor in CAM-fase II (6:00-7:00) en erna in CAM-fase IV (17:00-22:00) 60 µmol. Deze behandelingen dienden om na te gaan hoe malaat wordt afgebroken gedurende CAM-fase III en of lichtintegratie binnen CAM-fase III mogelijk is.

1. Controle, 120 µmol licht gedurende CAM-fase III gedurende 7:00-17:00.
2. Eerste helft CAM-fase III hoog licht (180 µmol), tweede helft laag licht (60 µmol).
3. Eerste helft CAM-fase III laag licht (60 µmol), tweede helft hoog licht (180 µmol).
4. Sinuspatroon van 60 µmol naar 180 µmol (midden CAM-fase III) naar 60 µmol licht.

Behandeling 5 diende om lichtintegratie over een hele dag te toetsen.

5. Laag licht (60 µmol) in CAM-fase III en dat gecompenseerd door hoog licht (180 µmol) in CAM-fase IV.

Behandeling 6 diende om lichtintegratie over meerdere dagen te toetsen.

6. Drie tot vier dagen hoog (180 µmol) of laag (60 µmol) licht gedurende CAM-fase III.

Aan het einde van de opkweek werden nogmaals de CO₂-opname en de hoeveelheid en afbraak van malaat gemeten. Vervolgens werden de planten gekoeld en afgekweekt en werd de uiteindelijke plantkwaliteit gemeten.

Conclusies

1. Is lichtintegratie binnen CAM-fase III mogelijk? Ja, het bleek dat lichtintensiteit bij *Phalaenopsis* een sturende rol heeft in de snelheid van malaatafbraak. Variatie in lichtintensiteit gedurende CAM-fase III gaf geen verlaging van de CO₂-opname ten opzichte van constant licht. Lichtintegratie binnen CAM-fase III is dus mogelijk.
2. Is lichtintegratie over een hele dag mogelijk? Nee, de CO₂-opname over een etmaal lag ~25% lager bij behandeling 5 met een lage lichtintensiteit gedurende CAM-fase III en vervolgens een hoge intensiteit in CAM-fase IV. Wel kan er deels worden gecompenseerd door wat meer te belichten aan het einde van de dag als de lichtsom in CAM-fase III onverwacht lager uitvalt. De laatste 2.5 uur lijkt dit geen zin meer te hebben omdat dan PEPC een overheersende rol speelt in de CO₂-opname. Een hoog lichtniveau in CAM-fase IV geeft lichtstress.
3. Is lichtintegratie over meerdere dagen mogelijk? Ten dele: Indien het gewas niet zoveel licht krijgt dat de CO₂-opname verzadigd is, dan wordt de lagere CO₂-opname na donkerdere dagen ten dele gecompenseerd door een hogere CO₂-opname op lichtere dagen. De CO₂-opname over meerdere dagen lag ruim 10% lager bij behandeling 6 met wisselende lichtsommen per dag. De wisseldag van laag naar hoog licht geeft lichtstress.

De resultaten van de metingen van de CO₂-opname en de malaatopbouw per dag waren helder en consistent. Het aantal meertakkers en bloemknoppen per tak verschilde uiteindelijk minder tussen de behandelingen dan dat op basis van de verschillen in CO₂-opname verwacht zou mogen worden.

De hoofdconclusie is dat sturen op lichtsom in CAM-fase-III veel zinvoller is dan sturen op lichtsom per dag op zich. Door zo goed mogelijk gebruik te maken van het daglicht en van lichtintegratie binnen CAM-fase-III, en door in CAM-fase-II en IV niet op volle intensiteit te belichten, kan met zo min mogelijk elektraverbruik worden geteeld.

Dankwoord

Dit rapport geeft de resultaten weer van een 30 weken durend belichtingsonderzoek aan Phalaenopsis. Dit onderzoek vond plaats in klimaatcellen van Plant Lighting. Er werd nieuwe kennis over belichting ontwikkeld aangaande de regulatie van malaatafbraak. Dit onderzoek is ondersteund door het programma 'Kas als Energiebron', gefinancierd door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit en Glastuinbouw Nederland, en door de gewascoöperatie potorchidee.

We willen een aantal personen nog met name hartelijk bedanken voor hun bijdrage: Erwin van der Werken (Floricultura) voor de teeltbegeleiding. Peter Ammerlaan (Ammerlaan orchideeën), Erwin van Vliet (Levoplant), Wouter Smaal (SO natural), Henri Buttermann (Piko Plant) en Erwin van de Werken (Floricultura) worden bedankt voor hun positief-kritische bijdrage in de BCO. Piko Plant wordt ook bedankt voor het regelen van de planten voor het onderzoek. Astrid van der Helm (Glastuinbouw Nederland) wordt bedankt voor het coördineren van de BCO's. Als laatste willen we de onderzoekscoördinatoren Dennis Medema en Leo Oprel van het programma Kas als Energiebron bedanken voor hun steun bij de totstandkoming en uitvoering van dit project.

Oktober 2019,

Sander Hogewoning

1 Inleiding

1.1 Kader onderzoek

In het kader van het streven naar een klimaat-neutrale glastuinbouw is Phalaenopsis een belangrijk gewas: Met een areaal van >200 ha en een teeltduur van bijna een jaar is het een energie-intensieve teelt. In de opkweekfase wordt gedurende 24-28 weken de kas verwarmd tot 29°C. Ten behoeve van de bloei-inductie (18-19 °C) en de opvolgende afkweekfase (19-21 °C) is er koeling nodig wat eveneens veel energie kost. Daar komt nog eens bij dat er aanzienlijke belichtingsniveaus worden gehanteerd tot ruim boven de 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$.

De afgelopen jaren is mede daarom door de gewascoöperatie potorchidee en het programma Kas als Energiebron geïnvesteerd in strategisch onderzoek naar methoden om met minder belichting en CO₂ te kunnen telen. En met succes: op basis van inzichten uit recente onderzoeken wordt belichting bij de voorlopers nu al gedimd op uren dat de plant licht niet efficiënt benut (Trouwborst *et al.* 2013,2014, 2016a, 2017), en wordt minder uren per dag CO₂ gedoseerd (Trouwborst *et al.* 2016b, Trouwborst & Hogewoning 2017, Hogewoning *et al.* 2019).

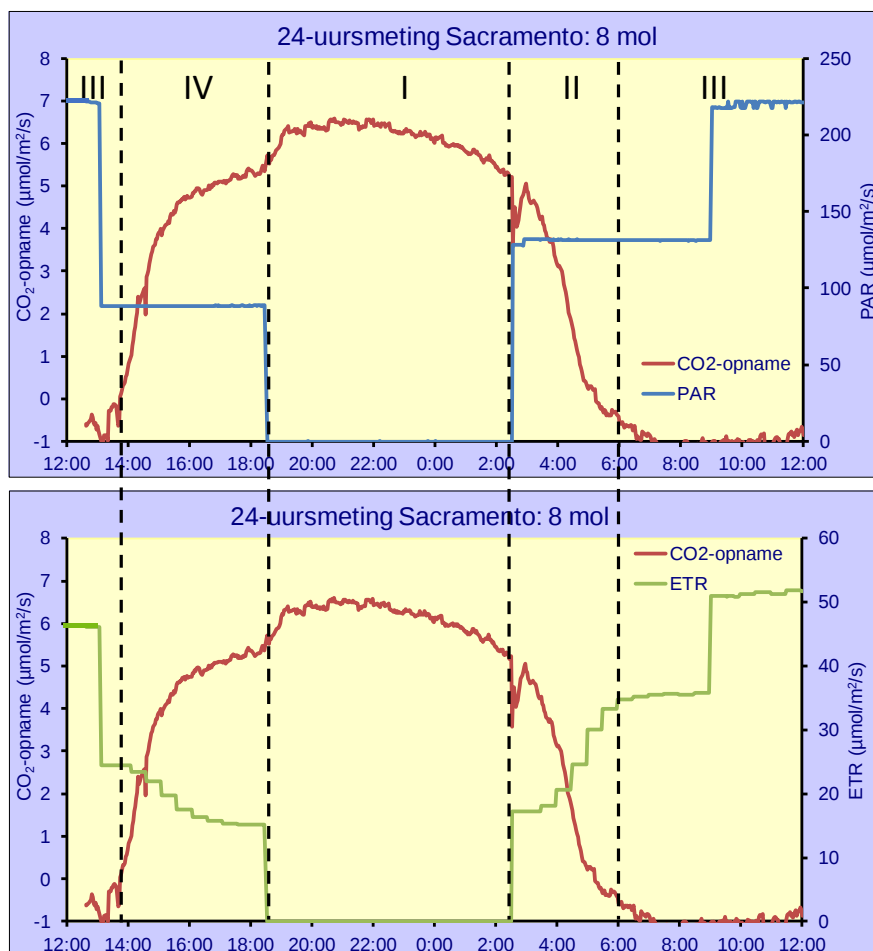
Dit onderzoek richt zich op een belangrijk gat in de tot nu toe opgebouwde kennis. Namelijk de lichtbenutting van Phalaenopsis gedurende de periode dat de lichtbehoefte veruit het grootst is, dat is gedurende CAM-fase III (zie uitleg hieronder).

1.2 Probleemstelling

Het ritme van Phalaenopsis kent vier fases per etmaal (Zie Figuur 1 + onderschrift). In CAM-fase III zijn de huidmondjes gesloten, wordt malaat afgebroken, en wordt het uit het malaat vrijkomende CO₂ met behulp van licht geassimileerd tot suikers. CAM-fase III duurt vaak 8 tot 10 uur, en in die periode moet de plant het grootste deel van de dagelijkse lichtsom krijgen. Uit eerdere berekeningen komt naar voren dat dit idealiter ± 5 mol licht is (4-4.5 mol in het platte vlak, dit wordt door schuinere bladstanden door bijvoorbeeld vazenteelt meer; Trouwborst *et al.* 2014 & 2017). In 9 uur tijd is dat ~ 0.56 mol/uur, waartoe een lichtintensiteit van 154 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ voor benodigd is. Dat is een hoge lichtintensiteit die veel energie kost als daaraan met alleen belichting voldaan moet worden.

Het is niet bekend in hoeverre de intensiteit van het licht een directe invloed heeft op de afbraak van malaat gedurende CAM-fase III. Wat gebeurt er als er gedurende enige tijd niet genoeg licht beschikbaar is om alle uit malaat vrijkomend CO₂ om te zetten in assimilaten? Gaat het CO₂ dan gedeeltelijk verloren door weg te lekken? (N dat kan ook bij gesloten huidmondjes door groot verschil in concentratie binnen-buiten blad) Of wordt het proces van malaat-afbraak dan geremd? En andersom als er meer licht beschikbaar is: Wordt de malaatafbraak dan versneld, of wordt het extra licht eenvoudigweg niet benut? Met andere woorden: de vraag is hoe het patroon van malaatafbraak verloopt gedurende CAM-fase III.

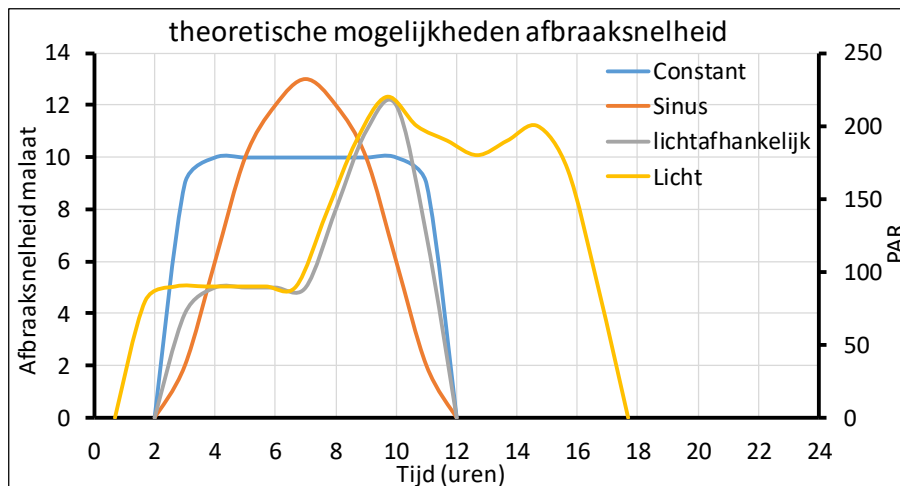
Verloopt het tempo van de afbraak van malaat volgens een constant patroon ongeacht de lichtintensiteit? Of past het tempo zich aan de lichtintensiteit aan? Zie Figuur 2 voor visualisatie van wat mogelijkheden. Een antwoord op deze vraag is belangrijk voor een efficiënte benutting van de belichting.



Figuur 1. CAM-fases I, II, III en IV zoals eerder gemeten aan *Phalaenopsis* (Trouwborst et al. 2014).

- In fase I is het donker, staan de huidmondjes open en is er CO₂ opname (rode lijn) dat wordt opgeslagen als malaat.
- In fase II wordt het licht (blauwe lijn) terwijl de CO₂ opname nog niet klaar is; de malaat-pool wordt nog verder gevuld en er kan enige directe C3-fotosynthese plaatsvinden. De lichtbenutting is dan laag en loopt langzaam op (groene ETR-lijn).
- In fase III zijn de huidmondjes dicht (geen CO₂-opname), wordt malaat afgebroken en het vrijkomend CO₂ omgezet in assimilaten. De lichtbenutting is dan hoog (groene ETR-lijn).
- In fase IV is het malaat op, zakt de lichtbenutting in, gaan de huidmondjes weer open en begint de plant met CO₂-opname: De malaat-pool wordt verder gevuld voor de volgende dag en er kan enige directe C3-fotosynthese plaatsvinden.

In CAM-fase II en IV is een relatief lage intensiteit licht voldoende en kan op belichting worden bespaard. In fase III moet het meeste licht worden aangeboden: hoe in die periode optimaal te belichten is nog onbekend en daarover moet dit project helderheid geven.



Figuur 2. Theoretische mogelijkheden afbraaksnelheid malaat: Constant patroon over de 9 uur; Sinuspatroon; Tempo afbraak (deels) afhankelijk van lichtintensiteit. Verlenging van CAM-fase III richting CAM-fase IV als de lichtsom gedurende CAM-fase III erg laag is geweest (niet in figuur)

Indien er sprake is van een constant patroon in malaatafbraak, dan kan de belichting daarop worden aangepast: niet méér belichten dan nodig zodat de belichting dus ook al snel kan worden uitgeschakeld bij voldoende daglicht-instraling. Dit bespaart energie. Indien het tempo van malaatafbraak zich aan de lichtintensiteit aanpast, dan kan gebruik gemaakt worden van de METEO-module in de klimaat-computer: Bij lage verwachte instraling moet worden doorbelicht. En bij hoge verwachte instraling later in de ochtend, kan al eerder de belichting worden teruggeschakeld. Elektriciteit kan op zulke momenten ook worden teruggeleverd aan het net. Kortom, kennis over het patroon van malaatafbraak maakt het mogelijk belichting doelmatiger in te zetten. Dat leidt tot een efficiëntere teelt met een lagere energievraag. Dit word met onderstaande twee scenario's geïllustreerd:

- **Scenario 1:** Malaatafbraak blijkt vooral licht-gereguleerd en het opgeslagen CO₂ gaat niet verloren bij lage lichtintensiteiten aan het begin van de dag. METEO voorspelt een heldere dag met lichtsom 5 mol/m² in kas tussen 10:00 en 14:00. Tuinder start belichting om 4:00 uur en CAM-fase III valt van 5:00-14:00. De lampen mogen dan gedeeltelijk uitgeschakeld blijven (bijvoorbeeld tweederde of de helft uit) tussen 4:00 en 10:00. Er is daarna genoeg daglicht om alle nog opgeslagen CO₂ om te zetten in suikers (lampen uit).
- **Scenario 2:** Malaatafbraak blijkt vooral klok-gereguleerd, het opgeslagen CO₂ komt gelijkmatig vrij en gaat wel verloren bij lage lichtintensiteiten aan het begin van de dag. METEO voorspelt heldere dag met lichtsom 5 mol/m² in kas tussen 10:00 en 14:00. Tuinder start belichting om 4:00 uur en CAM-fase III valt van 5:00-14:00. Lampen moeten dan wel voluit aan vanaf 5:00 uur, want tekort aan licht leidt tot minder suikerproductie. Maar de lampen kunnen uit zodra er 150 μmol/m²/s daglicht in de kas is (~100W instraling). Meer licht heeft namelijk ook geen zin. Door een scherpere daglichtdrempel kan ook elektra worden bespaard, maar minder dan in scenario 1.

1.3 Onderzoeksvragen

De plantfysiologische onderzoeksvraag is hoe de malaatafbraak in CAM-fase III verloopt en wat het effect van licht daarop is. Een antwoord op die vraag maakt ook een antwoord op een aantal praktijkgerichte onderzoeksvragen mogelijk. De volgende drie praktijkgerichte vragen staan centraal:

1. Is lichtintegratie binnen CAM-fase III mogelijk of moet een constante lichtintensiteit, of een lichtintensiteit volgens een vast patroon, worden gehandhaafd?
2. Is lichtintegratie over een hele dag mogelijk?
 - a. Duurt CAM-fase III langer als er tekort licht is?
 - b. Kun je aan het einde van de dag (in CAM-fase IV) het tekort aan licht compenseren?
3. Is lichtintegratie over meerdere dagen mogelijk?
 - a. Hoe reageert de plant op wisselend licht van dag tot dag?
 - b. Leidt een paar dagen minder licht tot slechtere lichtbenutting op een lichtere dag daarna?

1.4 Leeswijzer

Het rapport is als volgt opgebouwd: Paragraaf 1.5 bevat een tabel met veel gebruikte begrippen rondom CAM-fotosynthese. Hoofdstuk 2 beschrijft de gebruikte onderzoeksmaterialen en methoden. Hoofdstuk 3 geeft het resultaat weer en beantwoordt de gestelde onderzoeksvragen. Hoofdstuk 4 schetst een belichtingsstrategie voor de praktijk. Bijlage 1 biedt een literatuuronderzoek naar de regulatie van afbraak van malaat in CAM-planten.

1.5 Gebruikte begrippen in het rapport

In Tabel 1 worden de meest gebruikte begrippen kort toegelicht. Lezers die deze begrippen niet kunnen plaatsen, worden aangeraden Bijlage 1 van het rapport 'Minder belichten Phalaenopsis zonder productieverlies I' (Trouwborst *et al.* 2014) te lezen.

Tabel 1. Toelichting van de meest gebruikte begrippen in het rapport.

Begrip	Toelichting
C3-fotosynthese	'Normale' fotosynthese zoals optreedt bij de meeste planten. Dit proces bestaat uit twee deelprocessen die tegelijkertijd plaats vinden: Lichtreactie: gemeten d.m.v. chlorofyl-fluorescentie en uitgedrukt in elektronentransportsnelheid (ETR). Donkerreactie: Binding van CO ₂ (en O ₂ , zie fotorespiratie) via Rubisco (centraal enzym uit de Calvin-cyclus) en verdere verwerking van CO ₂ tot suiker. De snelheid van de donkerreactie is o.a. afhankelijk van de energie die wordt geleverd door de lichtreactie, het aanbod van CO ₂ en de efficiëntie van Rubisco.
Calvin-cyclus	Binding van CO ₂ via Rubisco en verdere verwerking van CO ₂ tot suiker. Ook wel lichtonafhankelijke reactie of donkerreactie genoemd.
CAM-plant	Plant met het Crassulecean Acid Metabolisme
CAM-fotosynthese	CAM-fotosynthese kan benoemd worden als <i>indirecte</i> C3-fotosynthese. Het CO ₂ wordt 's nachts door middel van het enzym PEPc gebonden en vervolgens vastgelegd als malaat (appelzuur). Overdag komt dit CO ₂ vrij en wordt gebruikt door Rubisco. In de CAM-fotosynthese worden vier CAM-fasen onderscheiden.
CAM-fasen	Fase I: nacht, huidmondjes open, opgenomen CO ₂ wordt vastgelegd als malaat. Fase II: overgang nacht naar dag, huidmondjes sluitende, mogelijkheid tot opname van CO ₂ dat direct gebonden wordt aan Rubisco (directe C3-fotosynthese). Fase III: overdag, huidmondjes gesloten, CO ₂ in het blad komt vrij uit malaat. Via de C3-fotosynthese wordt dit verwerkt tot suiker. Fase IV: overgang dag naar nacht: malaat op, huidmondjes gaan open, mogelijkheid tot opname van CO ₂ dat direct gebonden wordt aan Rubisco (directe C3-fotosynthese).
ETR	Elektronentransport-snelheid; de snelheid van de lichtreactie van de fotosynthese. Met andere woorden: ETR is de door licht opgewekte energiestroom die aangewend kan worden om suikers te maken. Deze wordt gemeten door middel van chlorofyl-fluorescentie.
Fotorespiratie	Het enzym Rubisco bindt O ₂ i.p.v. CO ₂ en er komt CO ₂ vrij. Dit is dus een verliespost. Hoe hoger de verhouding O ₂ /CO ₂ hoe meer fotorespiratie er plaats vindt.
Huidmondjes	Poriën in het blad waardoor CO ₂ naar binnen kan en water naar buiten gaat (verdamping).
PEP	Fosfo-enol-pyruvaat: grondstof voor malaatvorming
PEPc	Fosfo-Enol-Pyruvaat-Carboxylase: Enzym dat CO ₂ bindt aan PEP zodat er uiteindelijk malaat ontstaat.
Rubisco	Ribulose-bifosfaat-carboxylase/oxygenase: Centraal enzym voor de eerste stap in de Calvin-cyclus: Het bindt CO ₂ aan RuBP, en in een aantal vervolgstappen worden suikers gevormd. NB afhankelijk van de verhouding CO ₂ /O ₂ in het blad bindt Rubisco ook zuurstof. Dit wordt fotorespiratie genoemd.

2 Materiaal en methoden

2.1 Plantmateriaal, teeltcondities en tijdlijn proef

De Phalaenopsis planten cv. Sacramento werden geleverd door Piko Plant op 18 september 2018 (week 38). Deze partij was in week 21 opgepot (17 weken oud). Gedurende drie weken kregen alle planten dezelfde behandeling (aanpassingsfase). Na deze drie weken werd het effect van een 1-dagsverandering in lichtregime op de malaatafbraak getest en vervolgens werden lange termijn behandelingen ingezet (zie 2.3 en 2.4). De gehanteerde tijdlijn van opkweek via koeling naar afkweek inclusief bijbehorende etmaaltemperaturen en plantdichtheden staat vermeld in Tabel 2. In week 16 van 2019 werden de bloeiende planten teruggeleverd aan Piko Plant.

De planten werden geteeld in zes klimaat-units van ieder 1.65 bij 1.25 m (ruim 2m²) gesitueerd in een klimaatkamer bij Plant Lighting te Bunnik (Foto 1). De etmaaltemperatuur was tijdens de opkweek 29°C. De plantdichtheid was tijdens de aanpassingsfase van 3 weken 65 planten/m². Na de metingen om het effect van een 1-dagsverandering in lichtregime op de malaatafbraak na te gaan, werd gedurende de verdere opkweek 56 planten/m² aangehouden. De RV was ~70% en de CO₂ was 800 ppm. Er werd naar behoefte gegoten (EC≈1.2, pH≈5.8). Gemiddeld was dit eens in de 4-5 dagen. Tijdens de 8 weken koeling werd begonnen met een 'voorkoelfase' van enige dagen waarin de gemiddelde etmaal-temperatuur werd afgebouwd van 22°C naar de uiteindelijke koelfase van 19°C (de planttemperatuur lag hier ongeveer 0.5°C boven). Tevens werd de plantdichtheid verlaagd van 56 naar 41 planten/m². Tijdens de daaropvolgende afkweek werd de etmaal-temperatuur weer verhoogd naar 21.5°C.

Tabel 2. Overzicht tijdlijn van de proef.

Weeknummer, jaar	Handeling	Plant- dichtheid (#/m ²)	Etmaal temperatuur (°C)
21, 2018	opgepot bij Piko plant		
38, 2018	start proef met aanpassingsfase van 3 week	65	29
40, 2018	24-uursmetingen met fotosynthese-apparaat	65	29
41, 2018	1 dags-lichtprogramma voor malaatmeting: korte termijn aanpassing aan verandering licht	65	29
41, 2018	start proef met verschillend lichtprogramma en plantdichtheid verlaagd: lange termijn aanpassing aan verandering licht	56	29
47-50, 2018	24-uursmetingen met fotosynthese-apparaat	56	29
49-50, 2018	malaatmonsters verspreid over 8 dagen	56	29
51, 2018	begin koelfase (maandag-woensdag)	41	22 /20
51, 2018	daadwerkelijk koelfase	41	19
7, 2019	start afkweek	41	21.5
16, 2019	1-2 bloemen open, planten teruggeleverd aan Piko Plant	41	21.5

Plantgrootte bij aanvang acclimatiefase (20 september 2018)



Plantgrootte bij aanvang koelfase (21 december 2018)



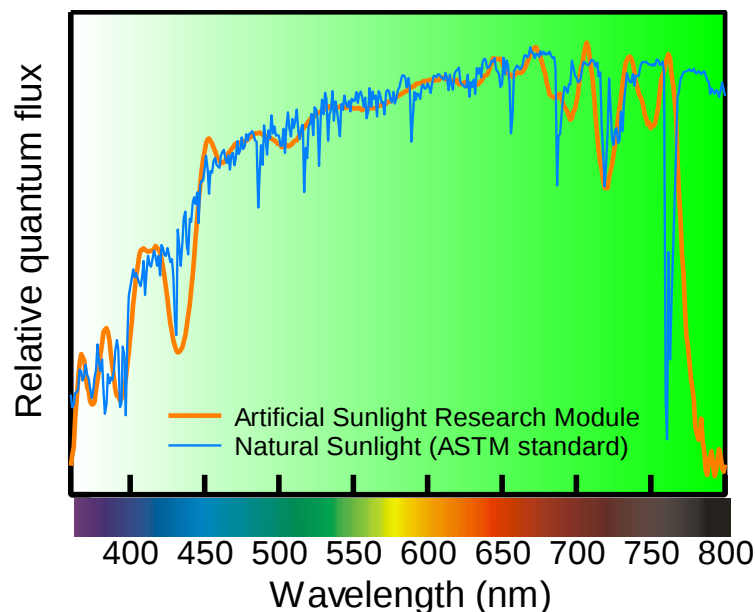
Planten vlak voor teruglevering (16 april 2019)



Foto 1. Overzicht groeiproef Phalaenopsis 'Sacramento' in zes klimaatunits van 2m² bij Plant Lighting te Bunnik.

2.2 Belichting

De belichting in de klimaat-units bestond uit *kunstmatig* daglicht. Dit kunstmatig daglicht werd gecreëerd door een op een LED-lampen gebaseerde, dimbare, en programmeerbare lichtbron (Artificial Sunlight Research Module, Specialty Lighting Holland, Breda, Nederland). Deze lichtbron produceert licht met een spectrale samenstelling die vrijwel gelijk is aan het lightspectrum van natuurlijk daglicht (golflengtegebied 360-760 nm; Figuur 3). Het kunstmatig daglicht werd gedurende de eerste drie weken in trappen op- en afgeschakeld in het volgende ritme: 16 uur fotoperiode, van 6:00-7:30 60 μmol (CAM-fase II); van 7:30-17:30 120 μmol (CAM-fase III), van 17:30-22:00 60 μmol (CAM-fase IV). Dit resulteerde in een lichtsom van 5.6 mol/m²/dag. NB gedurende CAM-fase III (gesloten huidmondjes) werd er dus 4.3 mol PAR gegeven. Na deze drie weken werd er één dag een fors ander lichtregime doorgevoerd om het effect hiervan op de malaatafbraak te meten. De behandelingen staan vermeld in Tabel 3 en worden in onderstaande paragraaf toegelicht. Vervolgens zijn zes verschillende lichtbehandelingen ingezet voor de resterende tijd van de teelt (zie paragraaf 2.4).



Figuur 3. Spectrale samenstelling van natuurlijk zonlicht (blauwe lijn) en van de zonlichtlampen (oranje lijn).

2.3 Behandelingen en metingen korte termijn

Aan het einde van de aanpassingsperiode is het ritme van de plant (tijdstippen start en einde van de vier CAM-fases) gemeten met fotosynthese-meetapparatuur (Li-6400/Li-6800). Vervolgens zijn verschillende belichtings-behandelingen ingezet en direct metingen gedaan om het effect daarvan op het patroon van de malaatafbraak te meten. De behandelingen:

1. Controle: Gelijkmatic licht gedurende CAM-fase III (120 μmol gedurende 7:30-17:30)
2. Hoog licht gedurende CAM-fase III (180 μmol)
3. Laag licht gedurende CAM-Fase III (60 μmol)
4. Eerste helft CAM-fase III hoog licht (180 μmol), tweede helft laag licht (60 μmol)
5. Eerste helft CAM-fase III laag licht (60 μmol), tweede helft hoog licht (180 μmol)
6. Zeer hoog licht gedurende CAM-fase III (300 μmol)

Zie tabel 3 voor de details.

Tabel 3. Behandelingen 1-dagsverandering in lichtintensiteit. Alle lichtintensiteiten staan in $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR weergegeven. De belichting was met zonlicht-simulatoren.

	CAM-fase I 22:00-6:00	CAM-fase II 6:00-7:30	CAM-fase III-A 7:30-12:30	CAM-fase III-B 12:30-17:30	CAM-fase IV 17:30-22:00
1 Controle*	0	60	120	120	60
2 Hoog licht	0	60	180	180	60
3 Laag licht	0	60	60	60	60
4 Laag-Hoog	0	60	60	180	60
5 Hoog-Laal	0	60	180	60	60
6 Zeer Hoog	0	60	300	300	60

* De eerste drie weken werd in alle zes klimaatunits deze behandeling gegeven.

De snelheid van de malaatafbraak tijdens CAM-fase III werd in bovenstaande behandelingen biochemisch geanalyseerd door met vaste tijdsintervallen van rond de twee uur bladponsjes te nemen, in te vriezen in vloeibare stikstof, te bewaren bij -80°C en vervolgens de malaat-inhoud te meten in een biochemisch laboratorium (meting via HPLC, zie uitgebreidere methode-omschrijving in paragraaf 2.5). De volgende vragen konden zo worden beantwoord:

1. Hoe verloopt het patroon van malaatafbraak als het licht constant is? Gaat malaat gelijkmatig op, eerst snel dan langzaam, eerst langzaam dan snel, of wellicht volgens een sinus-curve?
2. Past het tempo van malaat-afbraak zich aan de lichtintensiteit aan?

Tevens zijn bij de behandelingen met een constante lichtintensiteit gedurende CAM-fase III (behandeling 1,2, 3 en 6 in Tabel 3) vijf minuten durende fotosynthesemetingen met de Li-6400 gedaan aan zoveel mogelijk bladeren per behandeling. Dit om te meten hoe het blad fysiologisch reageert op de overschakeling naar een hoger of lager lichtniveau in CAM-fase III. De volgende vragen konden zo worden beantwoord:

3. Is malaat eerder op bij hoog licht (daling ETR)? NB Dat volgt natuurlijk ook uit de biochemische metingen voor vraag 2. Loopt de ETR-daling dan nog synchroon met de huidmondjesopening?
4. Wordt uit malaat vrijkomend CO_2 ten dele gedumpt bij laag licht? Of duurt CAM-fase III wellicht langer dan de gebruikelijke 9 à 10 uur om het malaat toch op te krijgen?

2.4 Behandelingen en metingen lange termijn

Na de aanpassingsperiode van de eerste drie weken en de korte termijn metingen (zie paragraaf 2.3) werden de lange termijn behandelingen ingezet. Deze behandelingen worden weergegeven in Tabel 4 en Figuur 4.

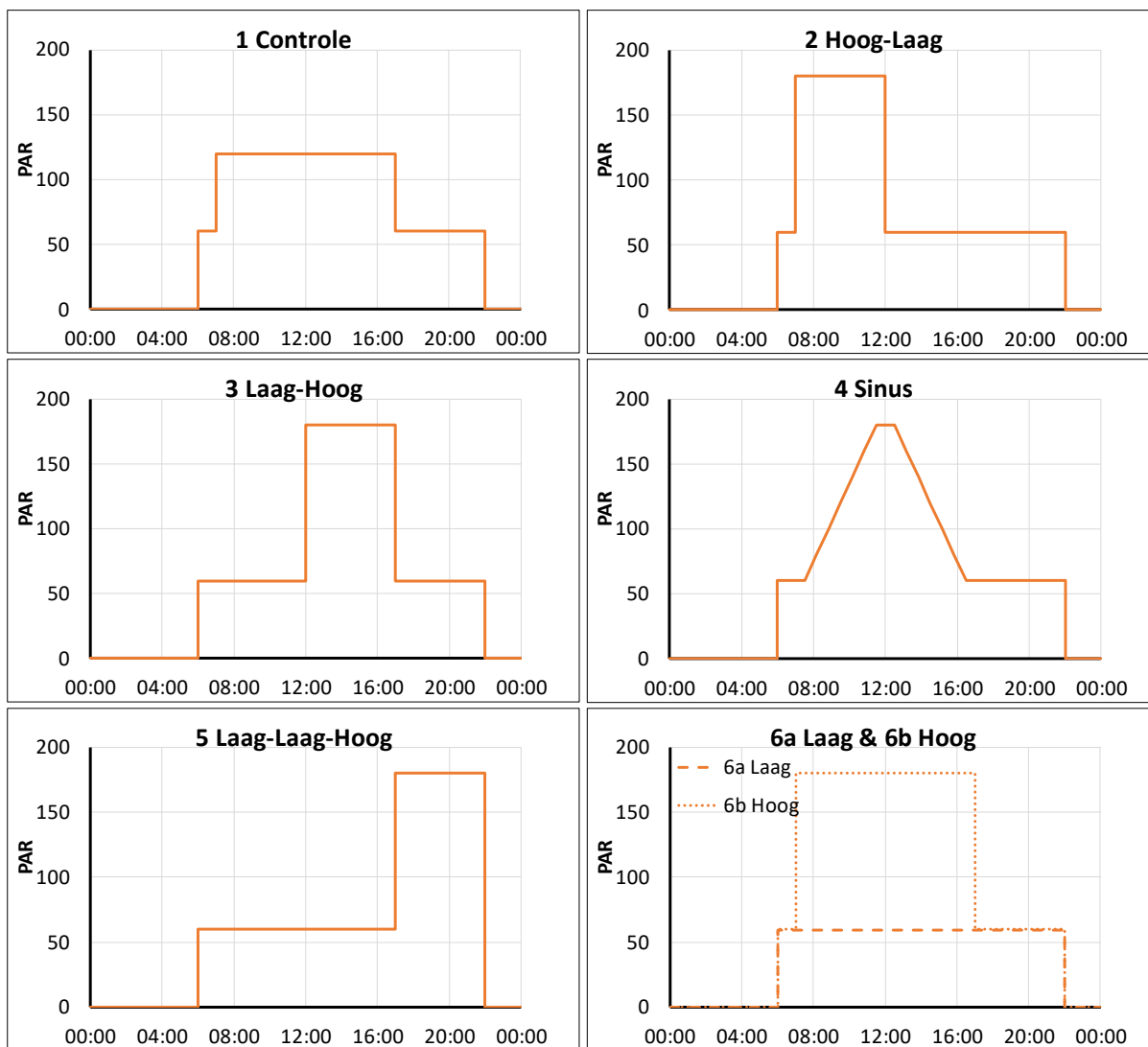
Tabel 4. Behandelingen voor de lange termijn. Alle lichtintensiteiten staan in $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR weergegeven. De belichting was met zonlicht-simulatoren.

	CAM-fase I 22:00-6:00	CAM-fase II 6:00-7:00	CAM-fase III A 7:00-12:00	CAM-fase III B 12:00-17:00	CAM-fase IV 17:00-22:00
1 Controle	0	60	120	120	60
2 Hoog-Laal	0	60	180	60	60
3 Laag-Hoog	0	60	60	180	60
4 Sinus	0	60	sinus, Figuur 4	sinus, Figuur 4	60
5 Laag-Laal-Hoog	0	60	60	60	180
6a Wisselend hoog/laag*	0	60	180	180	60
6b Wisselend hoog/laag*	0	60	60	60	60

*Bij behandeling 6 werden er 4 dagen hoog licht, vervolgens 4 dagen laag licht, vervolgens 3 dagen hoog licht en weer 3 dagen laag licht gegeven. De gemiddelde lichtsom was dus over 14 dagen gelijk aan de controle.

Hierbij wordt nog het volgende opgemerkt:

- Alle behandelingen hebben voor en na CAM-fase III een gelijke lage lichtintensiteit van $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ behalve behandeling 5.
- Alle behandelingen hebben gemiddeld een gelijke PAR-som.
- Behandeling 1, 2, 3 en 4 hebben een gelijke PAR-som in CAM-fase III. Hieruit volgt het patroon van malaatafbraak, de invloed die het belichtingsritme daarop heeft en het effect op de totale CO_2 -opname per etmaal (dat is de maat voor de potentiële productiviteit van de plant).
- Behandeling 5 zou een 'niet slimme' behandeling moeten zijn. De vraag is wat er gebeurt met het malaat als er niet genoeg licht is om het vrijkomende CO_2 om te zetten in suikers gedurende de 'normale' tijdsduur voor CAM-fase III (9 à 10 uur). Duurt CAM-fase III dan langer, dumpst het blad CO_2 , of gaat de plant steeds minder CO_2 opslaan? Wordt de C3-fase in de middag wellicht belangrijker?
- Behandeling 6 heeft een gemiddelde lichtsom over de teelt gelijk aan de andere behandelingen, gerealiseerd door een aantal dagen een fors lagere lichtsom afgewisseld door dagen met een fors hogere lichtsom. Behandeling 6 zal laten zien wat de gevolgen zijn van lichtintegratie over meerdere dagen bij Phalaenopsis. Lichtintegratie over meerdere dagen biedt mogelijkheden voor verdergaande energiebesparing.



Figuur 4. Lichtbehandelingen lange termijn. Behandeling 4 sinus werd gesimuleerd door de lichtintensiteit vloeiend van 60 naar 180 μmol te laten stijgen en weer te laten dalen. Dit is mogelijk met de zonlicht-simulatoren. Bij behandeling 6 werden er 4 dagen hoog licht en 4 dagen laag licht, vervolgens 3 dagen hoog licht en 3 dagen laag licht geprogrammeerd. De gemiddelde lichtsom was dus over 14 dagen gelijk aan de controle.

Er is gewacht met metingen tot nieuwe bladeren onder bovenstaande behandelingen waren ontwikkeld (~6 weken). Vervolgens zijn de volgende fysiologische metingen uitgevoerd aan nieuw ontwikkeld blad:

- De CO_2 -opname over 24 uur is in alle behandelingen gemeten aan 6 bladeren. Uit deze metingen met de fotosynthese-meetapparatuur volgt ook de huidmondjes-opening en het moment wanneer malaat op begint te raken. Dit beantwoordt wat het effect van de verschillende belichtingsritmes op de CO_2 -opname op de lange termijn is.
- Opnieuw is de snelheid van de malaatafbraak in alle behandelingen biochemisch geanalyseerd door met vaste tijdsintervallen van rond de twee uur bladmonsters te nemen (details in paragraaf 2.5). Dit beantwoordt wat het effect van de verschillende belichtingsritmes op de malaat-aanmaak en het afbraakpatroon op lange termijn is: Mogelijk is wisselend licht op korte termijn ongunstig, maar past een Phalaenopsis zich aan als de plant voor langere tijd aan die omstandigheden wordt blootgesteld.

2.5 Malaat- en citraatmetingen

De methode van de 24-uursfotosynthesemetingen met de Li-6400 is al in een aantal rapporten toegelicht (Trouwborst *et al.* 2014, 2016a & 2017). Het malaat en citraat is gemeten met een HPLC (high pressure liquid chromatography). Omdat bij de citraatmetingen behandelingspatronen ontbraken, staan deze in Bijlage 2 weergegeven.

Het verzamelen van de bladponsjes werd gedaan volgens de volgende methode:

- Bladmonsters werden gedurende de lichtperiode eens per ongeveer twee uur genomen.
- Per meetmoment werden er 6-8 bladmonsters verzameld.
- Ieder monster bestond uit 4 bladponsjes van 1cm doorsnee, afkomstig van 2 planten. Het was niet mogelijk om 9 tijdstippen maal 4 ponsjes uit 1 blad te halen, daarom werden er twee planten samengevoegd tot 1 monster (Foto 2).
- De ponsjes werden van bladpunt (start dag) naar bladbasis (einde dag) genomen.
- Het bladmonster (de vier ponsjes) werd in een eppendorftube gedaan en direct in de vloeibare stikstof (-196°C) gedompeld en daarna in een -80°C vriezer bewaard voor verdere analyse.
- De bladmonsters zijn gedroogd in een vriesdroger (Foto 3) en daarna gewogen.
- Vervolgens zijn de bladmonsters tot poeder vermalen met behulp van een kogelmolen (1 minuut met 2 metalen balletjes van 3 mm).
- Vervolgens werd rond de 15 mg afgewogen voor verdere analyse in de HPLC (Foto 3) en werd het biochemische protocol afgewerkt (verder details volgen in Van Tongerlo *et al.* 2020).



Foto 2. Impressie van het nemen van bladponsjes: de planten zijn van tevoren paarsgewijze neergezet (8 plantparen). Een plantmonster bestond uit 4 bladponsjes uit twee planten. Tijdens de dag van monsternamen werden er ieder meetmoment per plant telkens twee bladponsjes (half bladmonster) genomen. In dit geval op 9 tijdstippen gedurende de 16 uur licht, ponsjes over de tijd van bladpunt naar bladbasis. Alleen de bovenste helft van het blad dat vol in het licht stond, werd gebruikt voor monsternamen.



Foto 3. Impressie verwerking bladmonsters in de vriesdroger (links) en eppendorftubes met opgeloste bladmonsters in de HPLC (rechts) voor malaat- en citraatmetingen.

3 Resultaten en discussie

Dit hoofdstuk met resultaten is onderverdeeld in de effecten van een korte-termijn-verandering in lichtintensiteit van één dag op het patroon van malaatafbraak (hoofdstuk 3.1), en het effect over een lange termijn waarbij er gemeten werd aan bladeren die ontwikkeld zijn tijdens de lichtbehandelingen (hoofdstuk 3.2). Er wordt afgesloten met de eindkwaliteit van de planten (hoofdstuk 3.3).

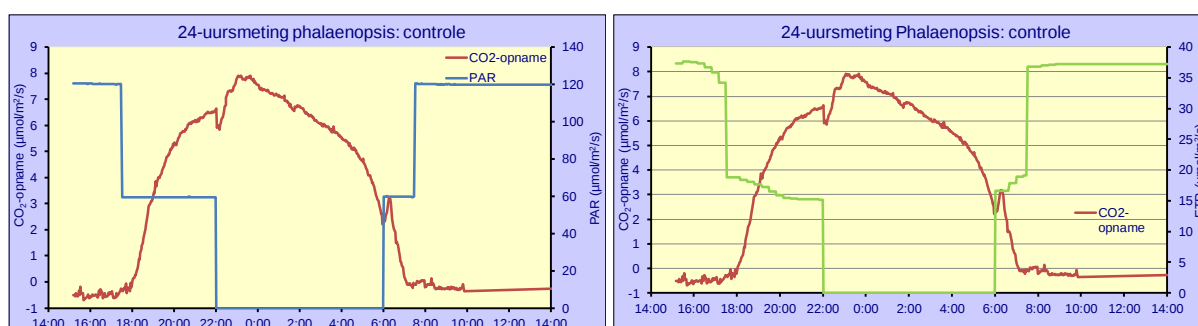
3.1 Effect verandering lichtintensiteit op korte termijn

Voor de metingen aan malaatafbraak door een korte-termijn-verandering in lichtintensiteit van één dag stonden de volgende onderzoeksvragen centraal:

1. Hoe verloopt het patroon van malaatafbraak gedurende CAM-fase III. Verloopt het tempo van de afbraak van malaat volgens een constant patroon ongeacht de lichtintensiteit? Of past het tempo zich aan de lichtintensiteit aan?
2. Is malaat eerder op bij hoog licht? Daalt ETR dan ook rond dat moment? Loopt de ETR-daling dan nog synchroon met huidmondjesopening?
3. Wordt uit malaat vrijkomende CO₂ ten dele gedumpt bij laag licht? Of duurt CAM-fase III wellicht langer dan de gebruikelijke 9 à 10 uur om het malaat toch op te krijgen?

3.1.1 Verloop CO₂-opname over een etmaal na de aanpassingsperiode van drie weken

De laatste vier dagen van de 3^e aanpassingsweek werden gebruikt om het 24-uursritme van de planten in beeld te brengen. Deze staan weergegeven in Figuur 5 en Tabel 5. Het bleek dat CAM-fase III al om 7:00 begon. Daarom is besloten om voor het vervolgonderzoek de tijd voor CAM-fase III een half uur te vervroegen (zie ook Tabel 3 en 4).



Figuur 5. Representatieve patronen van de CO₂-opname (rode lijn links) en de ETR (groene lijn rechts) over een etmaal van de controle. De blauwe lijn geeft de meetlichtintensiteit aan. De gemiddelden staan weergegeven in Tabel 5. Op basis van deze metingen is de tijd voor CAM-fase III verzet van 7:30-17:30 naar 7:00-17:00 voor het tweede deel van het onderzoek

Tabel 5. Plantritme na aanpassing aan 3 weken hetzelfde belichtingsritme per dag (controle; n=8).

parameter	Controle
Dagsom CO ₂ -opname (mol CO ₂ 24-uur)	0.25
Som CO ₂ -opname (mol CO ₂ fase I =nacht)	0.18
som CO ₂ -opname (mol CO ₂ fase IV)	0.06
som CO ₂ -opname (mol CO ₂ fase II)	0.01
som CO ₂ -opname (mol CO ₂ fase III)	-0.01
Lichtsom CAM-fase III (Gs=0)	4.34
Dagsom ETR totaal (mol e-)	1.67
som ETR CAM-fase III (mol e-)	1.32
Moment start opname	17:44
Moment eind opname	7:05
Opnametijd (CAM-fase IV,I,II)	13:20
Tijdsduur CAM-fase III	10:39
G _s _{max} nacht (mol/m ² /s)	0.020

3.1.2 Screening fotosynthese op de dag van verandering in lichtintensiteit

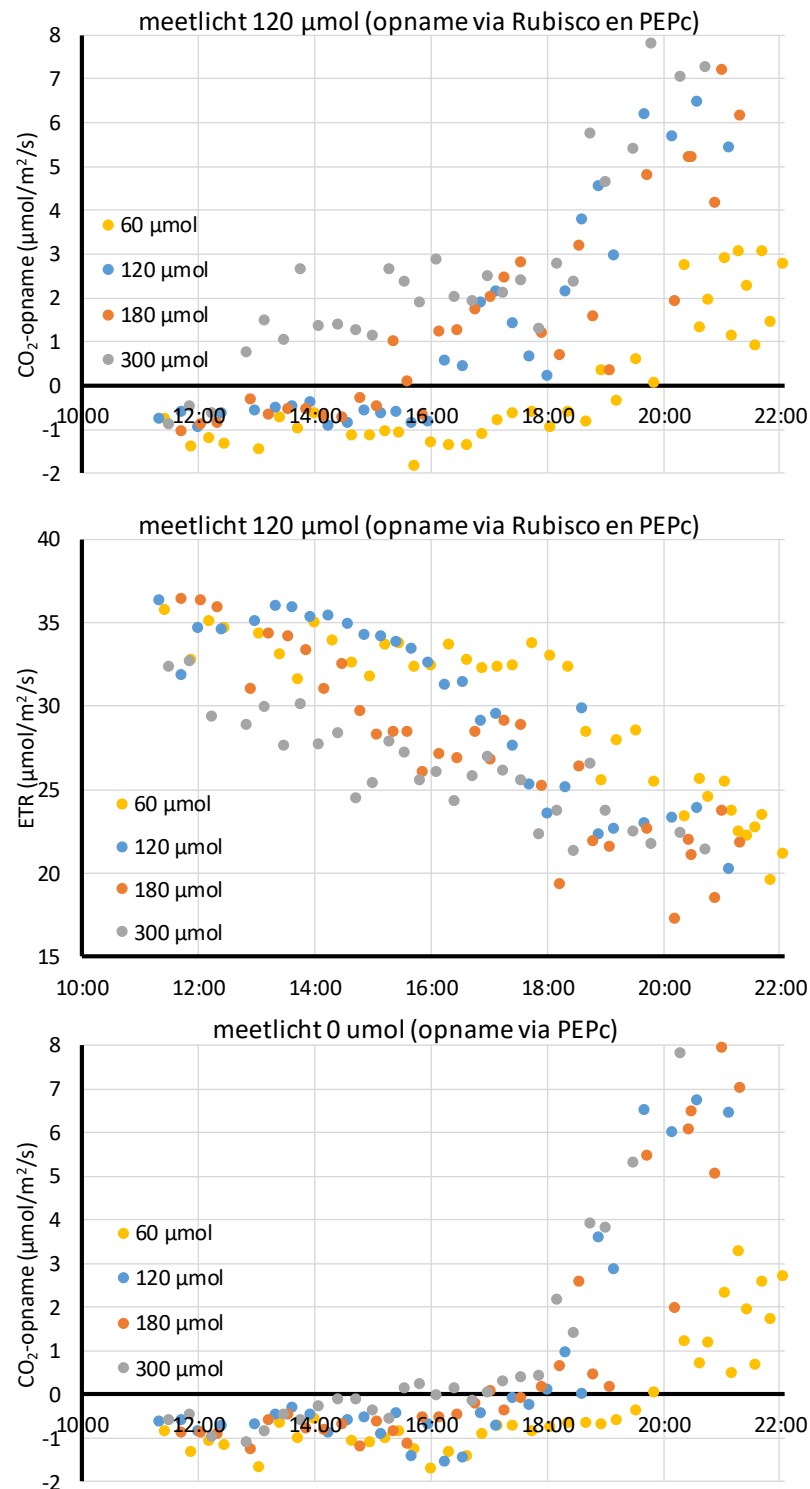
Op de dag van de blootstelling van de planten aan een verandering in lichtintensiteit gedurende CAM-fase III (Tabel 3), zijn er de hele dag door bladmonsters genomen voor metingen van veranderingen in malaatconcentratie (zie paragraaf 3.1.3). Diezelfde dag zijn er kortdurende (~5 minuten) fotosynthese-metingen gedaan aan zoveel mogelijk bladeren van de planten die gedurende CAM-fase III (7:30-17:30), blootgesteld werden aan:

- 60 μmol
- 120 μmol (controle)
- 180 μmol
- 300 μmol

Hierbij is er een meetlicht-intensiteit in de meetcuve van de fotosynthese-apparatuur van 120 en van 0 μmol PAR gebruikt. Door ook bij 0 μmol PAR te meten kon worden achterhaald of de CO₂-opname via directe C3-fotosynthese verliep (opname zakt in bij 0 μmol PAR) of dat de opgenomen CO₂-vastgelegd werd als malaat (opname onafhankelijk van licht).

In Figuur 6A (meetlicht aan op 120 μmol) is te zien dat bij de planten die werden blootgesteld aan 300 μmol , al rond 12:45 een positieve CO₂-opname optreedt (dus huidmondjes open). Bij 180 μmol gebeurt dit om ongeveer 15:30 uur, bij 120 μmol om ongeveer op 16:15, terwijl dit bij 60 μmol pas na 19:00 begon. In Figuur 6B is te zien dat de daling van de ETR bij iedere behandeling ruwweg een half uur eerder begint. In Figuur 6C (meetlicht uit 0 μmol) is te zien dat de CO₂-opname voor malaatvorming rond 18:15 begint voor de behandelingen 120/180 & 300 μmol . Terwijl dit voor de 60 μmol pas rond 20:15 begint. Hieruit kan worden geconcludeerd dat door onverwachts een lage lichtintensiteit (donkere dag of lampuitval) het einde van CAM-fase III en dus het begin van CAM-fase IV wordt uitgesteld. Er moet nog worden opgemerkt dat de planten een dag voor deze metingen water kregen. Er was dus absoluut geen sprake van droogtestress. Het is goed mogelijk dat onder invloed van (milde) droogtestress de huidmondjes later opengaan dan nu is waargenomen. De CO₂-opname bij de

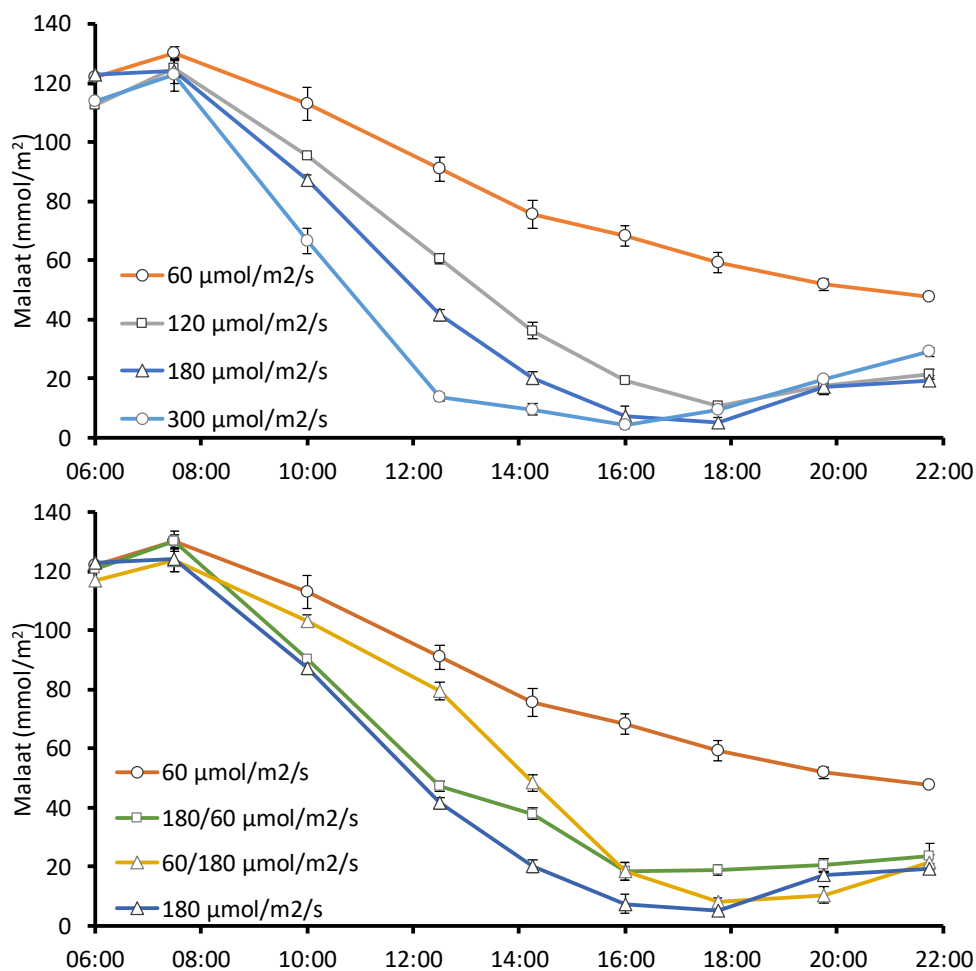
24-uursmetingen van de controle-behandeling startte rond 17:45 (Tabel 5). Dit is 1.5 uur later dan de eerste planten bij de kortdurende fotosynthesemetingen. Echter rond 17:45 zijn ook daar punten gemeten (Figuur 6A) waarbij er nog maar een zeer geringe CO₂-opname was. Hier is dus variatie tussen planten aanwezig.



Figuur 6. 5-minutenmetingen met fotosynthese-apparatuur van de CO₂-opname (A&C) en de ETR (B) aan bladeren die aangepast waren aan 120 μmol gedurende CAM-fase III en blootgesteld werden aan 60 /120/180/300 μmol . Ieder punt is een meting aan een ander blad. Het meetlicht in de cuvet was 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (A & B) of 0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (C) en er werd gemeten bij 800 ppm CO₂.

3.1.3 *Patroon malaatafbraak op de dag van verandering in lichtintensiteit*

In Figuur 7 wordt het biochemisch gemeten patroon van malaatafbraak weergegeven onder invloed van een verschil in lichtintensiteit gedurende CAM-fase III (zie ook Tabel 3). De behandelingen laten een lichte stijging zien in de hoeveelheid malaat gedurende CAM-fase II (6:00-7:30) en vervolgens een afname van malaat in CAM-fase III. Na verloop van tijd volgt weer een lichte stijging in de hoeveelheid malaat gedurende CAM-fase IV (behalve bij 60 μmol). Tevens is te zien dat een verlaging in lichtintensiteit van 120 μmol naar 60 μmol een vertraging geeft van de malaatafbraak. Het malaat raakt bij 60 μmol dan ook niet op aan het einde van de dag. Door verhoging van de lichtintensiteit van 120 μmol naar 180 μmol of zelfs 300 μmol tijdens CAM-fase III neemt het malaat versnelt af. De wisselbehandelingen lopen tijdens de eerste helft van CAM-fase III parallel aan de respectievelijke behandelingen met een constante lichtintensiteit (Figuur 7 onder). Duidelijk is dat de snelheid van malaatafbraak bij *Phalaenopsis* gereguleerd wordt door de lichtintensiteit.



Figuur 7. Verloop van de malaat-concentratie per m^2 blad over de lichtperiode. De behandelingen verschilden alleen gedurende CAM-fase III (7:30-17:30) in lichtintensiteit. Verticale balkjes geven de SD aan (SE's zouden onzichtbaar zijn). Te zien is dat hoe hoger de lichtintensiteit, hoe sneller het malaat afbreekt (boven). De beide behandelingen met een wisselmoment in lichtintensiteit tijdens CAM-fase III hebben aan het einde van de lichtperiode een min of meer gelijke lage hoeveelheid malaat over (onder).

Tevens kan worden gesteld dat de gevonden patronen met de fotosynthese-apparatuur (Figuur 6), overeenkomen met de patronen van malaatafbraak (Figuur 7):

- Uren vertraging in start van CAM-fase IV bij 60 μmol .
- Ruwweg gelijke start van malaatopbouw bij de behandelingen 120, 180 en 300 μmol (Figuur 6C). Terwijl de daling van de ETR (Figuur 6B) en de CO_2 -opname (en dus opening huidmondjes; Figuur 6A) eerder begint naarmate de lichtintensiteit in CAM-fase III hoger is.

3.1.4 Conclusies korte termijn

De volgende onderzoeksvragen waren gesteld:

1. Hoe verloopt het patroon van malaatafbraak gedurende CAM-fase III. Verloopt het tempo van de afbraak van malaat volgens een constant patroon ongeacht de lichtintensiteit? Of past het tempo zich aan de lichtintensiteit aan?
 - Het patroon van malaatafbraak past zich aan de lichtintensiteit aan.
2. Is malaat eerder op bij hoog licht? Daalt ETR dan ook rond dat moment? Loopt de ETR-daling dan wel of niet nog synchroon met de huidmondjesopening?
 - Malaat is eerder op bij hoog licht en dit gaat samen met eerdere huidmondjesopening (bij planten zonder waterstress). De ETR-daling (fotosynthese-metingen) valt inderdaad samen met het moment dat malaat op is (biochemische metingen). Dan gaan de huidmondjes ook open. De directe C_3 -fotosynthese in de middag wordt dus vervroegd bij hoog licht.
 - Er is nauwelijks verschil in startmoment malaatopbouw in de namiddag tussen 120/180/300 μmol , maar het startmoment ligt beduidend later bij 60 μmol (NB op korte termijn!).
3. Wordt uit malaat vrijkomend CO_2 ten dele gedumpt bij laag licht? Of duurt CAM-fase III wellicht langer dan de gebruikelijke 9 à 10 uur om het malaat toch op te krijgen?
 - Verlaging van lichtintensiteit geeft een tragere uitputting van de malaatpool. Van dumpen van CO_2 is dus geen sprake. Ongeveer drie uur (16:15 naar 19:00 uur) later dan de controle gaan huidmondjes open, het malaat is dan nog lang niet op.

Malaatafbraak reageert dus vrij direct op de lichtintensiteit. Lichtintegratie binnen CAM-fase III lijkt daarom goed mogelijk. De lange-termijn behandelingen moeten dit bevestigen (zie 3.2).

3.2 Effect verandering lichtintensiteit op lange termijn

Dit hoofdstuk bevat de resultaten van het effect van een lange-termijn-verandering van het belichtingsritme op de malaatopbouw en het patroon van malaatafbraak. De totale gemiddelde PAR-som was gedurende de teelt in iedere behandeling gelijk. De volgende onderzoeksvragen stonden centraal:

1. Is lichtintegratie binnen CAM-fase III mogelijk.
2. Is lichtintegratie over een hele dag mogelijk?
3. Is lichtintegratie over meerdere dagen mogelijk?

De eerste vraag is via de korte termijn metingen (hoofdstuk 3.1) al positief beantwoord. In dit hoofdstuk wordt nagegaan of deze conclusie ook voor de lange termijn getrokken kan worden en wordt naar een antwoord gezocht voor de 2^e en 3^e onderzoeksvraag.

3.2.1 24-uursmetingen *Phalaenopsis* met fotosynthese-meetapparaat

Aan het einde van de opkweek zijn van alle behandelingen de CO₂-opname, lichtbenutting (ETR) en huidmondjesopening over een etmaal gemeten aan bladeren die gedurende de behandeling zijn ontwikkeld. Deze worden weergegeven in Tabel 6. Het volgende valt op:

- Er zijn geen significante verschillen in totale CO₂-opname per dag tussen de behandelingen 1-4. Op basis van de CO₂-opnames kan dus de conclusie getrokken worden dat lichtintegratie binnen CAM-fase III ook op de langere termijn goed mogelijk is. Behandeling 3 start wel later met opnemen van CO₂ en is later klaar, waarvoor vooralsnog een verklaring ontbreekt.
- Hoog licht in CAM-fase IV ter compensatie van laag licht tijdens in CAM-fase III (behandeling 5, LLH) resulteert in een lagere CO₂-opname. Dit laat zien dat er geen langdurige lichtintegratie over de dag mogelijk is zonder in te leveren op productiviteit. CAM-fase IV start iets vertraagd, dit suggereert dat als er onverhoopt een te lage lichtintensiteit is gedurende CAM-fase III, er aan het begin van CAM-fase IV nog wel voor een gedeelte gecompenseerd kan worden. Het hoge lichtniveau tijdens CAM-fase IV resulteert ook in een laag lichtrendement dus lichtstress (Figuur 11).
- Bij behandeling 6 (afwisseling van 4 dagen hoog licht en 4 dagen laag licht gedurende CAM-fase III) zijn er metingen gedaan op de 1^e en 4^e dag van zowel hoog als laag licht. Deze metingen worden als volgt aangeduid: Hoog licht nacht 1 (HN1; nacht 1 volgt op dag 1), hoog licht nacht 4 (HN4), laag licht nacht 1 (LN1) & laag licht nacht 4 (LN4). Dit resulteert in het volgende:
 - Laag licht nacht1 (LN1): na 1e dag laag licht raakt malaat niet op: er blijft nog een kleine 30% over (Figuur 9, LD1) en er is daardoor een ruim 50% lagere CO₂-opname in de daaropvolgende nacht (Tabel 6; detail: ook de Gs is ruim 40% lager). Het lijkt er dus op dat de plant aan het begin van de tweede dag de beschikking heeft over een malaatpool die (nog) net zo groot is als de dag ervoor. Een dag een lager lichtniveau geeft dus wel direct een verlaagde CO₂-

- opname in de erop volgende nacht, maar dit lijkt nog geen effect te hebben op de totale hoeveelheid malaat die de daaropvolgende ochtend beschikbaar is.
- Laag licht nacht4 (LN4): na de 4^e dag laag licht is de CO₂-opname vergelijkbaar met die van behandeling 5 (LLH). Dit onderstreept een eerder getrokken conclusie dat vooral het licht in CAM-fase III belangrijk is (Trouwborst *et al.* 2016). Immers, de PAR-som in CAM-fase III is gelijk in behandeling 5 en 6 bij laag licht, maar de PAR-som per dag is respectievelijk 5.6 en 3.5 mol/m²/dag.
 - Hoog licht nacht 1 (HN1): Na 1 dag hoog licht, ligt de nachtelijke CO₂-opname weer op het niveau van de controle. Op de 1^e dag hoog licht is het malaat wel al rond het middaguur op. Vanaf dat moment zijn de bladeren gevoelig voor lichtstress (laag lichtrendement; Figuur 12) en dat is een aandachtspunt voor de praktijk.
 - Hoog licht nacht 4 (HN4): Vier dagen 180 µmol in plaats van 120 µmol licht in CAM-fase III (controle) verhoogt de CO₂-opname iets: 0.31 t.o.v. 0.27 mol/m²/s. De gemiddelde CO₂-opname van 4 dagen hoog licht en 4 dagen laag licht zit iets onder controle: 0.24 ten opzichte van 0.27 mol/m²/s. Dit houdt in dat er door lichtwisselingen enig verlies is aan productiviteit. Lichtintegratie over meerdere dagen is dus niet mogelijk zonder verlies aan CO₂-opname. Echter, een lichtere dag (of dagen) volgend op een donkerdere periode is wel degelijk zinvol indien de donkere periode niet te voorkomen is of energetisch erg gunstig uitkomt. Aan die compensatie zit wel een maximum, want vanaf een zekere lichtsom treedt verzadiging op en neemt de CO₂ opname toch niet verder toe.

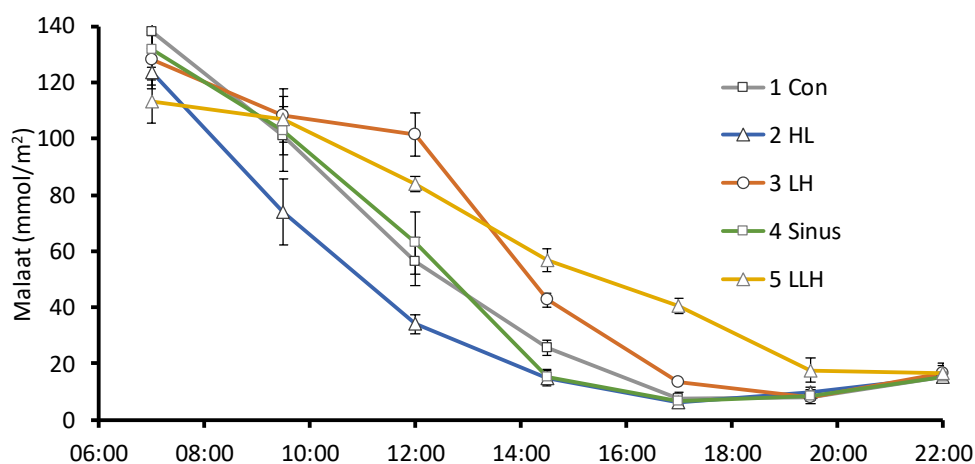
	1 Con	2 HL	3 LH	4 Sinus	5 LLH	6 HN1	6 HN4	6 LN1	6 LN4
Dagsom CO ₂ -opname (mol CO ₂ 24-uur)	0.27 ^b	0.27 ^b	0.28 ^b	0.27 ^b	0.20 ^c	0.29 ^{ab}	0.31 ^a	0.15 ^e	0.21 ^c
Som CO ₂ -opname (mol CO ₂ fase 1)	0.17 ^b	0.16 ^c	0.20 ^a	0.18 ^{ab}	0.15 ^{cd}	0.14 ^d	0.18 ^{ab}	0.11 ^e	0.14 ^d
som CO ₂ -opname (mol CO ₂ fase 4)	0.01 ^{bc}	0.00 ^e	0.02 ^a	0.01 ^b	0.01 ^d	0.01 ^d	0.01 ^{cd}	0.00 ^e	0.01 ^d
som CO ₂ -opname (mol CO ₂ fase 2)	-0.02 ^{cd}	-0.03 ^b	-0.02 ^{bcd}	-0.01 ^d	-0.02 ^{bc}	-0.01 ^{cd}	-0.05 ^a	-0.03 ^{bc}	-0.02 ^{bc}
som CO ₂ -opname (mol CO ₂ fase 3)	0.09 ^{cd}	0.10 ^{bc}	0.06 ^{ef}	0.07 ^{de}	0.04 ^{fg}	0.14 ^a	0.12 ^{ab}	0.03 ^g	0.05 ^{ef}
Lichtsom CAM-fase III (Gs=0)	3.96 ^c	4.31 ^{bc}	4.46 ^b	4.30 ^{bc}	3.15 ^d	4.62 ^b	6.03 ^a	2.58 ^e	2.33 ^e
Dagsom ETR totaal (mol e-)	1.64 ^c	1.60 ^c	1.63 ^c	1.65 ^c	1.38 ^d	1.99 ^b	2.18 ^a	1.08 ^f	1.06 ^f
som ETR CAM-fase III (mol e-)	1.20 ^b	1.25 ^b	1.31 ^b	1.29 ^b	0.96 ^c	1.28 ^b	1.72 ^a	0.83 ^{cd}	0.75 ^d
Moment start opname	16:32 ^d	16:39 ^c	18:14 ^{ab}	17:12 ^c	18:09 ^{ab}	12:36 ^e	16:31 ^d	18:39 ^a	17:49 ^b
Moment eind opname	7:28 ^a	6:35 ^c	7:45 ^a	7:30 ^a	7:07 ^b	7:35 ^a	7:12 ^b	6:39 ^c	7:08 ^b
Opnametijd (CAM-fase 4,1,2)	14:56 ^b	13:56 ^{cd}	13:30 ^{cde}	14:18 ^{bc}	12:57 ^e	19:07 ^a	14:40 ^b	11:59 ^f	13:19 ^{de}
Tijd CAM-fase 3	9:03 ^e	10:03 ^{cd}	10:29 ^{bcd}	9:41 ^d	11:02 ^b	4:52 ^f	9:19 ^e	12:00 ^a	10:40 ^{bc}
GS _{max} nacht (mol/m ² /s)	0.024 ^a	0.019 ^{ab}	0.020 ^{ab}	0.017 ^{bc}	0.017 ^{bc}	0.019 ^b	0.022 ^{ab}	0.013 ^c	0.016 ^{bc}

Tabel 6. Effect van de lange-termijn lichtbehandeling op o.a. de CO₂-opname, opnametijd, ETR en lichtsom tijdens CAM-fase III aan het einde van de opkweek. Behandeling 6 is onderverdeeld in 4 meetmomenten: Hoog licht nacht 1 (HN1; nacht 1 volgt op dag 1 hoog licht), hoog licht nacht 4 (HN4), Laag licht nacht 1 (LN1) & laag licht nacht 4 (LN4). Verschillende letters (a, b, c) geven per teeltfase statistisch significante verschillen tussen de gemiddelden aan (n=8, Fisher's LSD, $\alpha < 0.05$; ns= niet significant).

3.2.2 Malaatmetingen

Figuur 8 laat het patroon van de malaat-concentratie over de lichtperiode zien bij de eerste vijf behandelingen. Hierbij is te zien dat, naar gelang de hoogte van de lichtintensiteit, het malaat sneller of langzamer afneemt dan de controle. De eerste vier behandelingen hebben uiteindelijk eenzelfde start- en eindpunt, waardoor ook voor de lange-termijn-behandelingen de conclusie getrokken kan worden dat lichtintegratie gedurende CAM-fase III goed mogelijk is.

Behandeling 5 (hoog licht in CAM-fase IV) heeft een lagere maximale waarde en een hogere minimale waarde. Het verschil tussen het minimum en het maximum is het dagelijkse verbruik aan malaat. Deze ligt 25% lager dan de behandelingen 1-4. Qua orde van grootte komt dit goed overeen met de lagere dagsom van de CO₂-opname (Tabel 6). Dit bevestigt de betrouwbaarheid van de meetmethoden. Het dieptepunt van de hoeveelheid malaat in het blad ligt ook 2.5 uur later. Dit laat zien dat CAM-fase III bij deze behandeling langer is geworden en CAM-fase IV korter is geworden. De laatste 2.5 uur vindt er geen afname en (nog) geen toename van malaat plaats (Figuur 8) en om 22:00 (licht uit) vertoont de CO₂-opname een dip (Figuur 10). Tesamen suggereert dit voor behandeling 5 dat voor de opname van CO₂ Rubisco tot 19:30 dominant is en tot 22:00 nog in zekere mate actief is.

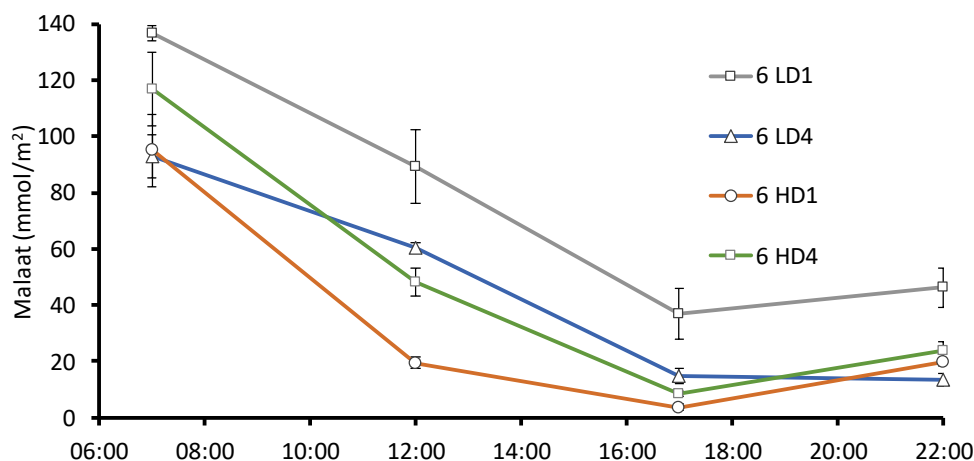


Figuur 8. Verloop van de malaat-concentratie per m² blad over de lichtperiode (6:00-22:00) van lange-termijn belichtingsbehandelingen 1-5. De PAR-som was in alle vijf behandelingen gelijk. Behandelingen 1-4 verschilden alleen gedurende CAM-fase III (7:00-17:00) in belichtingsritme. Behandeling 5 had laag licht gedurende CAM-fase III, maar hoog licht gedurende CAM-fase IV. Verticale balkjes geven de SD aan (n=3; SE's zouden deels onzichtbaar zijn).

Bij behandeling 6 wisselden de dagen met hoog licht zich af met laag licht gedurende CAM-fase III. Tijdens de metingen werd er eens per 4 dagen gewisseld in lichtintensiteit. Er is gemeten op de eerste en vierde dag van het lage en van het hoge lichtniveau. De volgende zaken vallen op (Figuur 9):

- Laag licht dag 1 (LD1; grijs) heeft aan het begin van de dag een relatief hoge hoeveelheid malaat die is aangepast aan vier dagen hoog licht op de voorgaande dagen. Het malaat raakt daarom die dag met laag licht niet op.
- Laag licht dag 4 (LD4; blauw) heeft aan het begin van de dag een hoeveelheid malaat die is aangepast aan laag licht op de voorgaande drie dagen, zodat het niveau aan het einde van de dag een stuk lager ligt dan op dag 1.
- Hoog licht dag 1 (HD1; oranje) heeft aan het begin van de dag een hoeveelheid malaat die is aangepast aan vier dagen laag licht op de voorgaande dagen. Het malaat is om 12:00 al grotendeels op en het laagste punt ligt erg diep.
- Hoog licht dag 4 (HD4; groen) heeft aan het begin van de dag een hoeveelheid malaat die is aangepast aan drie dagen hoog licht op de voorgaande dagen. Dat HD4 met iets minder malaat start dan LD1 kan komen door de extra dag hoog licht voorafgaand aan LD1, of het is toevallige variatie tussen meetbladeren (of beide).

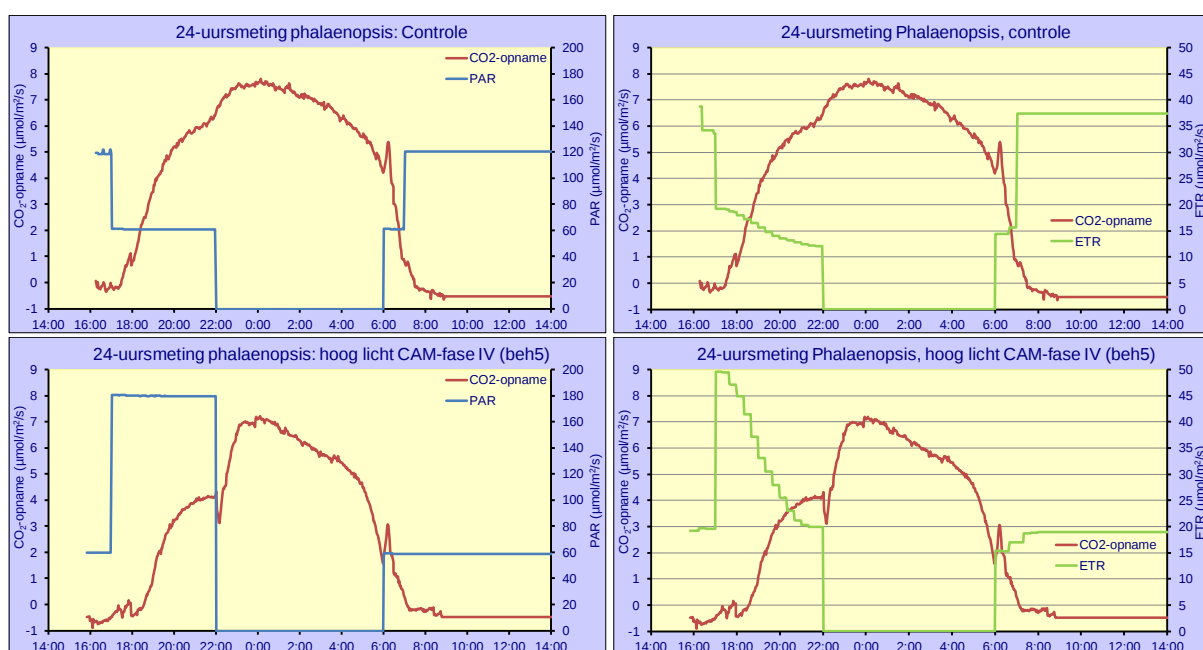
Deze patronen laten zien dat *Phalaenopsis* in staat is te reageren op een verlaging en verhoging van het lichtniveau. Na meerdere donkere dagen op een rij, zal het malaat dus op een lichte dag snel op zijn en is er meer kans op lichtstress door een laag lichtrendement, omdat malaat al halverwege de dag op is.



Figuur 9. Verloop van de malaat-concentratie per m^2 blad over de lichtperiode van lange-termijn behandeling 6. Tijdens deze metingen wisselden 4 dagen laag licht zich af met 4 dagen hoog licht (respectievelijk $60 \mu\text{mol}$ en $180 \mu\text{mol}$ PAR gedurende CAM-fase III). Vandaar dat deze patronen gemeten zijn op de eerste en vierde dag van het lage licht (LD1 & LD4) en op de eerste en vierde dag van het hoge licht (HD1 & HD4). Verticale balkjes geven de SD aan ($n=3$).

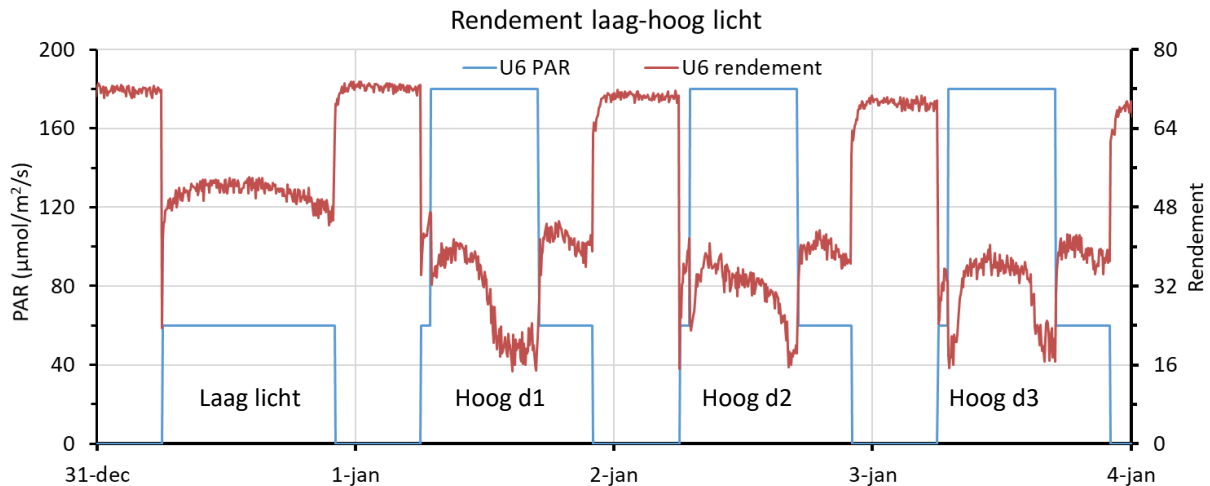
3.2.3 Lichtstress

Figuur 10 laat zien dat gedurende de tijd van CAM-fase IV (17:00-22:00) de ETR (groene lijn) bij behandeling 5 (hoog licht in CAM-fase IV) van 50 naar 20 afneemt terwijl deze bij de controle van 20 (het licht is dan al is teruggeschakeld naar 60 $\mu\text{mol PAR}$) terugzakt naar 13. Het rendement was om 22:00 ~ 0.27 versus ~ 0.45 bij de controle. In behandeling 5 is er dus fors meer lichtstress dan in de controle-behandeling. Naar verwachting is de lichtstress die optrad in deze proefbehandeling lager dan in de praktijk, vanwege het stabiele CO_2 -gehalte dat op de 800 ppm gehouden werd en de RV die rond de 70% bleef in de klimaatkamer. Naar alle waarschijnlijkheid zal in de praktijk met een lagere RV in combinatie met een laag CO_2 -gehalte in de namiddag het lichtrendement nog lager uitkomen, wat tot bladvergeling zou kunnen leiden. In de proef was hier echter geen sprake van.



Figuur 10. Representatieve patronen van de CO_2 -opname (rode lijn links) en de ETR (groene lijnen rechts) over een etmaal van de controle en behandeling 5 (LLH=hoog licht in CAM-fase IV). De blauwe lijn geeft de meetlichtintensiteit aan. De gemiddelden staan weergegeven in Tabel 6. Te zien is dat bij behandeling 5 in CAM-fase IV, onder gelijkblijvend hoog licht, de ETR sterk afneemt wat lichtstress geeft.

Ook bij behandeling 6, waarbij de dagen wisselden tussen 4 dagen hoog licht en 4 dagen laag licht, is op de eerste dag hoog licht halverwege de dag een zware verlaging in lichtrendement te zien (Figuur 11). Dit komt omdat dan het malaat al op is (Figuur 9). Overigens regelt de plant zich al snel bij: Op de tweede dag vindt het verval in rendement al drie uur later plaats.



Figuur 11. Lichtstress van laag naar hoog licht in behandeling 6 met afwisselend 4 dagen hoog en 4 dagen laag licht. De blauwe lijn geeft de lichtintensiteit aan, de rode lijn het lichtrendement. Halverwege de 1^e dag hoog licht stort het lichtrendement in omdat het malaat op is. Te zien dat de plant zich snel bijregelt: de dag erna treedt het verval in rendement al drie uur later in (deze data is verzameld met een prototype van de Hortisensor, zie hiervoor Trouwborst & Hogewoning 2019).

3.2.4 Conclusies lange termijn

De volgende onderzoeksvragen stonden centraal:

1. Is lichtintegratie binnen CAM-fase III mogelijk?
 - Lichtintensiteit heeft bij *Phalaenopsis* een sturende rol in de snelheid van malaatafbraak. Ook op de langere termijn geeft variatie in lichtintensiteit gedurende CAM-fase III geen verlaging van de CO₂-opname ten opzichte van constant licht. Dus lichtintegratie gedurende CAM-fase III is mogelijk.
2. Is lichtintegratie over een hele dag mogelijk?
 - Nee, de CO₂-opname over een etmaal ligt ~25% lager. Wel kan er deels worden gecompenseerd met een hogere lichtintensiteit later op de dag als de lichtsom in CAM-fase III onverwacht lager uitvalt. Echter, de laatste uren van de dag lijkt dit geen zin meer te hebben omdat dan PEPC een overheersende rol gaat spelen. Een hoog lichtniveau in CAM-fase IV geeft wel snel lichtstress.
3. Is lichtintegratie over meerdere dagen mogelijk?
 - Ten dele: Indien het gewas niet zoveel licht krijgt dat de CO₂-opname verzadigd is, dan wordt de lagere CO₂-opname na donkerdere dagen ten dele gecompenseerd door een hogere CO₂-opname op lichtere dagen. De CO₂-opname gemiddeld over meerdere dagen lag uiteindelijk ruim 10% lager. De wisseldag van laag naar hoog licht geeft lichtstress.

Het totaal van deze metingen laat opnieuw zien dat de lichtsom gedurende CAM-fase III de bepalende factor is voor een hoge CO₂-opname. In de praktijk zal men dus moeten weten wat ongeveer de tijden zijn waarbinnen CAM-fase III verloopt. Vervolgens moet er niet specifiek gestuurd worden op een bepaalde dagsom PAR maar op een bepaalde PAR-som gedurende CAM-fase III. Die PAR-som mag tot stand komen met een variërende lichtintensiteit (lichtintegratie binnen CAM-fase III). Op grond van voorgaand onderzoek (Trouwborst *et al.* 2014 & 2017) ligt de PAR-som voor een maximale CO₂-opname rond de 4.5 mol in het platte vlak en wordt beduidend hoger naarmate de bladhoek toeneemt. Hiervan is sprake bij teelt in vazen of met kragen. Overigens is de CO₂-opname bepalend voor de *potentiële* groei, maar is het nog niet zeker of een maximale CO₂-opname altijd ook daadwerkelijk tot meer groei leidt. Vooral tijdens de opkweek is het de vraag of de plant voldoende sinks heeft voor alle geproduceerde assimilaten.

3.3 Eindkwaliteit planten

Aan het einde van de afkweek zijn het aantal bloemtakken, zijtakken en bloemknoppen geteld. Het aantal bloemtakken, zijtakken en bloemknoppen is op twee manieren geteld: Botanisch en commercieel volgens de veilingdefinitie (VBN, product specification, phalaenopsis in pots, 2013). Bij de botanische telling zijn alle bloemtakken, zijtakken en bloemknoppen ongeacht grootte meegeteld. De veilingdefinitie komt kortgezegd op het volgende neer:

- Alleen bloemknoppen groter dan 0.5 cm tellen mee
- Takken met drie of meer bloemknoppen (groter dan 0.5 cm) tellen mee als tak, mits de lengte van de tak groter is dan de laagst zittende bloem(knop) van de voorgaande tak.
- Een plant is 'vertakt' als de plant tenminste 10 knoppen (groter dan 0.5 cm) heeft en er tenminste drie bloemknoppen (groter dan 0.5 cm) op de zijtakken zitten.

Tabel 7 geeft de resultaten weer van de bloemtellingen. Overall zijn er weinig 1-takkers (0-5 op 82 planten). Behandeling 5 (LLH) heeft de meeste 1-takkers. Tevens was er enkele dagen verschil in rijpheid tussen de verschillende behandelingen. Behandeling 5 (LLH) en 6 (wisseldagen) waren 3-4 dagen eerder rijp dan de behandelingen 3LH en 4sinus. Dit kan voor de knoppen van rond de 5 mm een klein verschil geven in de commerciële telling. Opvallend genoeg was het verschil in aantal knoppen tussen alle behandelingen beperkt. Op grond van de metingen aan de CO₂-opname en het malaat was de verwachting dat behandeling 6 (wisseldagen) en vooral behandeling 5 (LLH) minder knoppen zouden hebben. Bij behandeling 5 (LLH) lag de CO₂-opname en het delta malaat rond de 25% lager. Echter, bij de eindtelling werden bij behandeling 5 alleen iets minder meertakkers gemeten, maar bij de tweetakkers nauwelijks minder bloemknoppen per bloemtak. Behandeling 6 (wisseldagen) had wel het laagste aantal knoppen. Ook bij behandeling 2 (HL) lag het aantal knoppen aan de lage kant ten opzichte van de behandelingen 1, 3 & 4. Echter hier bleek een foutje in het aantal planten te zijn gemaakt: 85 in plaats van 82 planten. Als dit rekenkundig verdisconteerd wordt, stijgt het gemiddelde met 1 knop. Al met al ligt het voor de hand dat als de dagelijkse CO₂-opname lager uitvalt, dit uiteindelijk resulteert in minder knoppen. Schaalgrootte kan een factor zijn waardoor dit niet (geheel) tot uiting komt.

Behandeling	Ras	Sacramento					
		1 - controle	2 - HL	3 - LH	4 - sinus	5 - LLH	6 - laag of hoog
Aantal planten totaal		82	85	82	83	82	82
% 1-takker		2.4 (2)	3.5 (3)	0.0	2.4 (2)	6.1 (5)	3.7 (3)
% 2 takker		95.1 (78)	94.1 (80)	95.1 (78)	94.0 (78)	91.5 (75)	95.1 (78)
% 3-takker		2.4 (2)	2.4 (2)	4.9 (4)	3.6 (3)	2.4 (2)	1.2 (1)
Alleen twee-takkers:							
Gemiddelde van open bloemen totaal		2.4 ^b	2.4 ^b	0.5 ^c	1.6 ^b	3.3 ^a	3.4 ^a
Gemiddelde van knop hoofdkam com		18.2 ^{ab}	18 ^{ab}	18.9 ^a	17.8 ^b	18.0 ^{ab}	17.6 ^b
Gemiddelde van knop totaal com		22.4 ^{ab}	21.3 ^{ab}	23.1 ^a	22.1 ^{ab}	22.1 ^{ab}	20.7 ^b
Gemiddelde van knop totaal bot		25.5 ^a	23.1 ^{ab}	24.4 ^{ab}	24.6 ^{ab}	23.7 ^{ab}	22.3 ^b
Gemiddelde % vertakt com		63 ^{ab}	47 ^b	73 ^a	61 ^{ab}	57 ^{ab}	51 ^{ab}
Verschil lengte tak1 - tak 2 (cm)		5.3 ^{n.s.}	5.8 ^{n.s.}	5.1 ^{n.s.}	5.7 ^{n.s.}	5.5 ^{n.s.}	4.8 ^{n.s.}
teeltduur vanaf koeling		121	121	123	122	119	119

Tabel 7. Effect van de verschillende belichtingsbehandelingen op de bloei-kenmerken van *Phalaenopsis* 'Sacramento'. Meetwaarden worden gegeven voor alleen de tweetakkers. Verschillende letters (a, b) geven statistisch significante verschillen tussen de gemiddelden aan (ns=niet significant verschil; Fisher's LSD, $\alpha < 0.05$).

4 Belichtingsstrategie voor de praktijk

In onderstaand hoofdstuk worden de praktische consequenties voor de teelt van phalaenopsis geschetst (4.1) en wordt kort de huidige stand van zaken weergegeven (4.2).

4.1 Praktische consequenties voor de teelt

Per onderzoeksvraag wordt puntsgewijze nagegaan welke consequenties de uitkomst heeft voor de teelt

1. Lichtintegratie binnen CAM-fase III?

Lichtintegratie gedurende CAM-fase III is goed mogelijk op basis van CO₂-opname en de bloemtellingen. Er kan dus overwogen worden om te sturen op lichtsom in combinatie met een Meteo-module. Hierbij wordt eerst vastgesteld wat voor lichtsom gewenst is gedurende CAM-fase III. Dit ligt op basis van voorgaand onderzoek rond de 4-4.5 mol in het platte vlak (dus meer bij hoge bladhoek door hoge plantdichtheid en/of vazenteelt). Het volgende winterscenario is dan mogelijk:

- 4:00 uur licht aan
- 5:00 uur start afbraak malaat (start fase III)
- Tot 15:00 uur belichting met daglichtdrempel en minder belichten als meteo-module meer buitenlicht voorspelt.
- 15:00 uur malaat op en terugschakelen naar een laag lichtniveau
- Indien lichtsom nog niet behaald is (en malaat dus nog niet op is, nog even vol doorbelichten tot maximaal 17:30 uur
- Na 17:30 uur niet / nauwelijks eventuele compensatie voor CAM-fase III meer mogelijk, belichting op een laag lichtniveau (~30 μmol, Trouwborst *et al.* 2017)
- 20:00 uur donker
- Effect daglengte 15 of 16 uur weten we niet
- Dimlicht wel aan tijdens dure uren stroom (per bedrijf verschillend)

Zoals eerder aangegeven, laat dit onderzoek opnieuw zien dat de lichtintensiteit gedurende CAM-fase III de bepalende factor is voor een hoge CO₂-opname. Telers die een relatief lichte belichtingsinstallatie hebben hangen moeten er —plantkundig gezien— dus voor zorgen dat 's winters CAM-fase III gelijk valt met het hoogste niveau aan natuurlijk daglicht. Op grond van voorgaand onderzoek (Trouwborst *et al.* 2014, 2017) ligt deze PARsom rond de 4-4.5 mol in het platte vlak en wordt hoger naarmate de bladhoek toeneemt. CAM-fase III duurde meestal 8 tot 10 uur. Als we rekenen met 9 uur tijd is dat ~0.5 mol/uur, dus een lichtintensiteit van 140 μmol/m²/s (en hoger bij hogere bladhoeken). Dat is een hoge lichtintensiteit die veel energie kost als daaraan met alleen belichting voldaan moet worden. In combinatie met gratis daglicht kan er met een veel beperktere belichtingsinstallatie toch worden voldaan aan de

lichtbehoefte in CAM-fase III. Een interessante vraag in dit verband is of het mogelijk is om die 8-10 uur voor CAM-fase III standaard op te rekken naar 12-13 uur (van de totale daglengte van 16 uur). In dat geval is er voor 12 uur slechts een gemiddelde lichtintensiteit van 104 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ nodig waardoor er ook een lagere belichtingscapaciteit nodig zou zijn. Mogelijk gaat dit wel ten koste van de beperkte C3 fotosynthese die in de opkweek in CAM-fase IV voorkomt (~6%; Trouwborst *et al.* 2014, 2016).

2. Lichtintegratie over de hele dag?

Lichtintegratie was op basis van de CO₂-opname (~25% minder) niet mogelijk (behandeling 5 LLH). Er waren echter nauwelijks minder bloemen en maar enkele procenten 1-takkers. Dit wekt de suggestie dat er bij een afkweek van 21.5°C in deze behandeling al genoeg suikers worden geproduceerd. Hier staat tegenover dat de proef kleinschalig is. Juist in de opkweek lijkt maximale suikerproductie niet altijd zinvol maar wel in de koeling en afkweek om zoveel mogelijk bloemen te krijgen. Zeker is dat een hoog lichtniveau in CAM-fase IV meer lichtstress oplevert voor de bladeren die in het volle licht staan. Als dan onverhoopt het CO₂-niveau en de RV laag zijn, kan de lichtstress te hoog oplopen met bladvergelting als gevolg. Wel bleek uit deze behandeling dat door het lage lichtniveau CAM-fase III wat langer duurt. Dus als de lichtsom niet gehaald wordt tijdens de uren waarin normaliter CAM-fase III plaats vindt, kan er deels gecompenseerd worden in de tijd dat CAM-fase IV normaliter plaat vindt: CAM-fase III wordt dan langer en CAM-fase IV wordt dan korter. De laatste uren van CAM-fase IV lijkt dat geen zin meer te hebben.

3. Lichtintegratie over meerdere dagen?

Lichtintegratie over meerdere dagen leverde een verlaging van CO₂-opname en aantal bloemen ~10% op. Op zich valt dit dus mee. Voor kwekers in het middensegment die niet heel zwaar belichten, biedt dit mogelijkheden om over meerdere dagen te sturen op een gelijke PAR-som tijdens CAM-fase III. Er zijn twee opmerkingen op z'n plaats:

- Als de malaatopslag al een maximum heeft bereikt onder het gemiddelde lichtniveau, dan heeft meer licht ter compensatie van een donkere dag geen zin.
- Wisseling van een aantal dagen een laag lichtniveau naar een hoog lichtniveau geeft een snelle uitputting van de malaatpool en dus al vrij vroeg lichtstress.

4.2 Waar staan we nu?

Naar aanleiding van vier onderzoeken aangaande minder belichten zonder productieverlies (Trouwborst *et al.* 2014, 2016a, 2017) en twee onderzoeken naar het CO₂-niveau (Trouwborst *et al.* 2016b, Trouwborst & Hogewoning 2017, Hogewoning *et al.* 2019), dringt de vraag zich op wat nu de huidige stand van zaken is voor het onderzoek naar Phalaenopsis. Dit wordt puntsgewijze weergegeven.

Om de suikerproductie van phalaenopsis te maximaliseren, moet het volgende gedaan worden:

- CAM-fase I: CO₂ hoog voor meer malaatopslag.
- CAM-fase II: CO₂ hoog voor meer malaatopslag. Licht gedimd aan.
- CAM-fase III: CO₂ uit. Voldoende lichtsom halen. Lichtintegratie mag binnen CAM-fase III. Als de lichtsom niet te halen is, mag CAM-fase III verlengd worden naar de tijd dat normaliter (de eerste uren van) CAM-fase IV plaats vindt.
- CAM-fase IV: CO₂ hoog voor meer malaatopslag. Licht gedimd aan. Voldoende daglengte halen voor maximale CO₂-opname (15-16 uur licht per dag).

Hierbij hoort de opmerking dat een hoge RV de CO₂-opname helpt. Terwijl een te droge pot de CO₂-opname remt via 'geknepen' huidmondjes. Sensoren kunnen ingezet worden om na te gaan wanneer de huidmondjes opengaan (CO₂ doseren) en malaat op is (lampen dimmen/schermen):

- Via chlorofyl-fluorescentie kan worden nagegaan wanneer het malaat op is. In het algemeen valt dit moment samen met het moment dat ook de huidmondjes weer opengaan, tenzij er droogtestress is.
- Via het verschil tussen blad- en luchttemperatuur, al dan niet met behulp van de energiebalansmethode van de stomatasensor (LetsGrow, voor beschrijving zie hoofdstuk 5 in Trouwborst *et al.* 2017), kan worden nagegaan of de huidmondjes open zijn.

De vraag kan nog steeds gesteld worden of er in iedere teeltfase gestreefd moet worden naar de maximalisatie van de suikerproductie. In de opkweek is er mogelijk sprake van sink-limitatie zodat er niet altijd gestreefd hoeft te worden naar maximale suikerproductie. In de afkweek is er een duidelijke relatie met de temperatuur (source/sink balans): Hoe koeler telen, hoe langer de afkweekperiode, hoe meer bloemen. Anders gezegd: bij gelijke temperatuur levert meer licht meer bloemen op. In de opkweek en koeling is er overigens weinig speelruimte met temperatuur vanwege respectievelijk het vegetatief houden en de takuitloop. Als laatste is op dit moment (2019) het effect van daglengte aan het einde opkweek op takinductie nog niet helder. Als een kortere dag in de laatste weken van de opkweek een positief effect heeft op de snelheid en homogeniteit van de takuitloop tijdens de daaropvolgende koelfase, kan dit belangrijker zijn dan maximalisatie van de CO₂-opname.

Referenties

- Abraham PE, Yin H, Borland AM, Weighill D, Lim SD, De Paoli HC et al.** 2016. Transcript, protein and metabolite temporal dynamics in the CAM plant Agave. *Nature Plants* 2, 16178
- Barrow SR, Cockburn W.** 1982. Effects of light quantity and quality on the decarboxylation of malic Acid in crassulacean Acid metabolism photosynthesis. *Plant Physiology*, 69: 568–571.
- Borland AM, Griffiths H, Hartwell J, Smith JAC.** (2009). Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. *Journal of Experimental Botany*, 60: 2879–2896.
- Brilhaus D, Bräutigam A, Mettler-Altmann T, Winter K, Weber APM.** 2016. Reversible Burst of Transcriptional Changes during Induction of Crassulacean Acid Metabolism in *Talinum triangulare*. *Plant Physiology*, 170: 102–122.
- Ceusters J, Borland AM, Taybi T, Frans M, Godts C, De Proft MP.** 2014. Light quality modulates metabolic synchronization over the diel phases of crassulacean acid metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 65:.
- Chen WH, Tseng YC, Liu YC, Chuo CM, Chen PT, Tseng KM, Yeh YC, Ger MJ, Wang HL.** 2008. Cool-night temperature induces spike emergence and affects photosynthetic efficiency and metabolizable carbohydrate and organic acid pools in *Phalaenopsis aphrodite*. *Plant Cell Reports*, 27: 1667–1675.
- Endo M, Ikusima I.** 2018. Changes in Concentrations of Sugars and Organic Acids in the long lasting flower clusters of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Physiology* 33, 7–12.
- Hogewoning, SW, Harbinson J.** 2006. Insights on the development, kinetics, and variation of photoinhibition using chlorophyll fluorescence imaging of a chilled, variegated leaf. *Journal of experimental botany* 58: 453–463
- Hogewoning SW, J. Sanders, A. de Jong, S. Persoon.** 2019. *Phalaenopsis* met minimale input: CO₂, licht en vocht naar gewasbehoefte. Deelrapport II: Energiezuinige teelt. Plant Lighting B.V., Bunnik, 31p.
- Holtum, JAM, Smith, JAC, Neuhaus, HE.** 2005. Intracellular transport and pathways of carbon flow in plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology*, 32: 429–449.
- Kluge, M.** 1968. Untersuchungen über den gaswechsel von *Bryophyllum* während der lichtperiode II. Beziehungen zwischen dem malatgehalt des blattgewebes und der CO₂-aufnahme, *Planta* 80: 359–377.
- Nishida K, Hayashi Y.** 1980. Inhibition of de-acidification (loss of titratable acidity) by photosynthetic inhibitors in leaves of a CAM plant. *Plant Science Letters* 19, 271–276.

- Liu, YC, Liu CH, Lin YC, Lu CH, Chen, WH, Wang HL.** 2016. Effect of low irradiance on the photosynthetic performance and spiking of Phalaenopsis. *Photosynthetica*, 54: 259–266.
- Liu YC, Tseng KM, Chen CC, Tsai YT, Liu CH, Chen WH, Wang HL.** 2013. Warm-night temperature delays spike emergence and alters carbon pool metabolism in the stem and leaves of Phalaenopsis aphroide. *Scientia Horticulturae* 161: 198–203.
- Lüttge, U.** 1988. Day-night changes of citric acid levels in crasulacean acid metabolism: phenomenon and ecophysiological significance. *Plant, Cell and Environment*, 11, 445–451.
- Lüttge, U.** 1990. Nocturnal citrate accumulation and its response to environmental stress in the CAM plant Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. *Plant, Cell & Environment* 13: 977–982.
- Lüttge, U.** 2002. CO₂-concentrating: consequences in crassulacean acid metabolism. *Journal of Experimental Botany* 53: 2131–2142.
- Lüttge, U.** 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of Botany*, 93: 629–652.
- Lüttge, U.** 2006. Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: Questions and lessons from Clusia, the only CAM tree, in the neotropics. *New Phytologist*, 171:7–25.
- Lüttge, U.** 2007. *Clusia a woody neotropical genus of remarkable plasticity and diversity*. Ecological studies Volume 194. Springer Science & Business Media
- Miszalski Z, Kornas A, Rozpadek P, Fischer-Schliebs E, Lüttge U.** 2013. Independent fluctuations of malate and citrate in the CAM species Clusia hilariana Schltdl. Under low light and high light in relation to photoprotection. *Journal of Plant Physiology*, 170: 453–458.
- Osmond CB.** 1978. Crassulacean Acid Metabolism: a curiosity. *Annual Review of Plant Physiology* 29: 379–414.
- Owen, NA, Griffiths H.** 2013. A system dynamics model integrating physiology and biochemical regulation predicts extent of crassulacean acid metabolism (CAM) phases. *New Phytologist*, 200: 1116–1131.
- Pereira PN, Gaspar M, Smith JAC, Mercier H.** 2018. Ammonium intensifies CAM photosynthesis and counteracts drought effects by increasing malate transport and antioxidant capacity in Guzmania monostachia. *Journal of Experimental Botany*, 69: 1993–2003.
- Pollet, B.** 2010. Impact of cool night temperatures on Phalaenopsis photosynthetic activity and physiology to support an energy conscious greenhouse heating. PhD thesis Ghent University, Belgium 187p.
- Thomas DA, André M, Granzin AM.** 1987. Oxygen and carbon dioxide exchanges in crassulacean acid metabolism plants. II: Effects of CO₂ concentration and irradiance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 25: 95–103.

- Trouwborst G, Hogewoning SW, Pot CS.** 2013. Meer rendement uit belichting en CO₂ bij Phalaenopsis. Bunnik: Plant Dynamics B.V. & Plant Lighting B.V., 28.
- Trouwborst G, Hogewoning SW, Pot CS.** 2014. Minder belichten Phalaenopsis zonder productieverlies? Plant Lighting B.V., Bunnik. 60p.
- Trouwborst G, Hogewoning SW, van der Spek R.** 2016a. Minder belichten Phalaenopsis zonder productieverlies II. Plant Lighting B.V., Bunnik. 45p.
- Trouwborst G, Hogewoning SW, Van der Spek R, Pot CS.** 2016b. Zuiniger met CO₂ bij gelijkblijvende of hogere productie: Phalaenopsis. Plant Lighting B.V., Bunnik. 37p.
- Trouwborst G, Hogewoning SW, van der Spek R.** 2017. Minder belichten Phalaenopsis zonder productieverlies III. Maximale daglichtbenutting voor minimale belichting Phalaenopsis. Plant Lighting B.V., Bunnik. 52p.
- Trouwborst G, Hogewoning SW.** 2017 Phalaenopsis met minimale input: CO₂, licht en vocht naar gewasbehoefte. Deelrapport I: Plantenfysiologisch onderzoek op procesniveau. Plant Lighting B.V., Bunnik, 27p.
- Trouwborst G, Hogewoning SW,** 2019. Hortisensor: Regeling belichting, scherming en CO₂ op plantbehoefte. Plant Lighting B.V., Bunnik.
- Van Tongerlo E, Trouwborst G, Hogewoning SH, Dieleman JA, Marcelis LFM, Van Ieperen W.** 2020. CAM species differ in contribution of C3 and C4 carboxylation to end of day CO₂ fixation. In voorbereiding

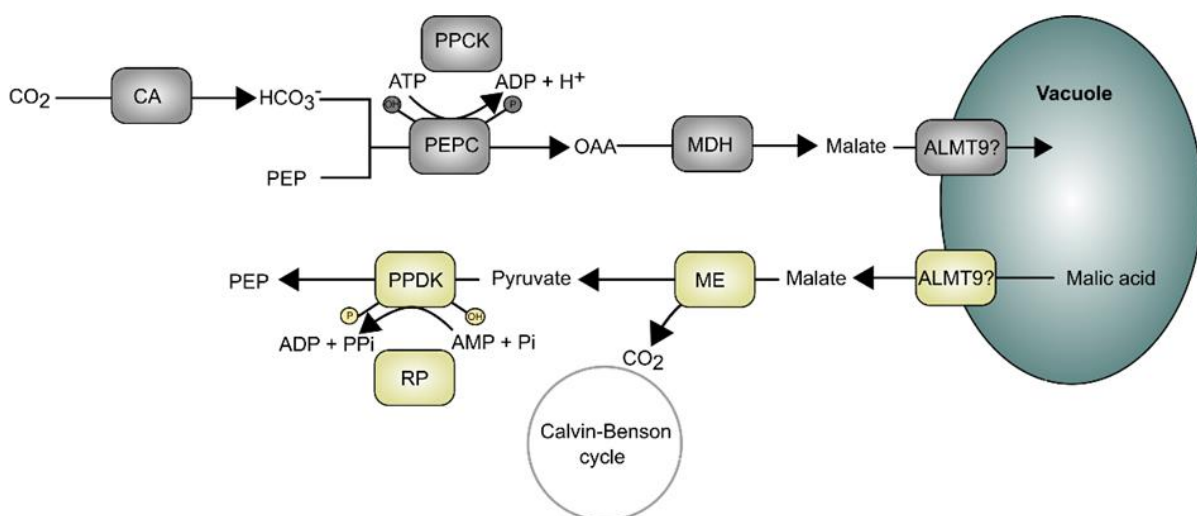
Bijlage 1 Literatuurstudie regulatie afbraak malaat

B1.1 Inleiding

In deze literatuurstudie wordt onderzocht wat er in de wetenschappelijke literatuur bekend is over de regulatie van de organische zuren malaat en citraat gedurende CAM-fase III. Afbraak van organische zuren is bij CAM-planten de bron van het voor de fotosynthese benodigde CO₂ achter gesloten huidmondjes overdag. Voor malaat zijn dit de drie volgende stappen (zie ook Figuur 12 gele blokken onder):

- (1) malaat-efflux uit de vacuole naar het cytosol (=‘celvloeistof’ zonder de daarin drijvende organellen).
- (2) malaatafbraak in het cytosol
- (3) lichtafhankelijke assimilatie van CO₂ via rubisco (= normale fotosynthese)

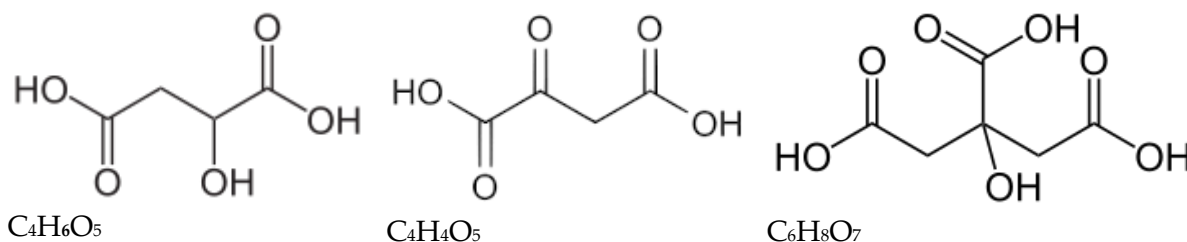
Een van deze drie stappen zal snelheids-beperkend/ regulerend zijn voor de malaatafbraak. De eerste 2 stappen worden in paragraaf B1.2 toegelicht. Voor toelichting van de lichtafhankelijke assimilatie van CO₂ via rubisco zie Trouwborst *et al.* 2013. In paragraaf B1.3 wordt ingegaan op de mogelijke rol van citraat.



Figuur 12. Overzicht van de nachtelijke carboxylatie (grijze blokken boven) en de de-carboxylatie overdag (gele blokken onder) van malaat in het CAM-systeem. De nachtelijke reactie met bijbehorende enzymen is al besproken in Trouwborst *et al.* 2016. Bij de de-carboxylatie-reactie overdag is voor de efflux van malaat uit de vacuole een tunnelpoteïne betrokken. Mogelijk is dit een CAM-ortholoog van het *Arabidopsis thaliana* proteïne ALMT9 (aluminium activated malate transporter 9). Vervolgens zijn er ‘malic enzymes’ (ME) betrokken bij de afbraak van malaat in pyruvaat en CO₂ (dat dan beschikbaar is voor de fotosynthese). Vervolgens wordt er door middel van het enzym PPDK (pyruvate orthophosphate dikinase) PEP gevormd. RP is een PPDK-regulator proteïne. Bron: Abraham *et al.* 2016.

In Figuur 12 is ook te zien dat in de vacuole malaat als malaatzuur voorkomt. Malaat is een tweewaardig anion (malaat²⁻) met een brutoformule van C₄H₄O₅. Malaatzuur bestaat uit malaat²⁻ + 2H⁺ en heeft dus een brutoformule van C₄H₆O₅. De anion-vorm malaat²⁻ heeft

dezelfde brutoformule als oxaalacetaat ($C_4H_4O_5$), maar wel een andere structuurformule (Figuur 13).



Figuur 13. Structuurformules van malaatzuur (links), oxaalacetaat (midden), en citroenzuur (rechts). Oxaalacetaat heeft dus 3 in plaats van 2 dubbelgebonden zuurstofatomen. Bron: Wikipedia.

B1.2 Regulatie malaat in CAM-fase III

Malaat-efflux uit de vacuole

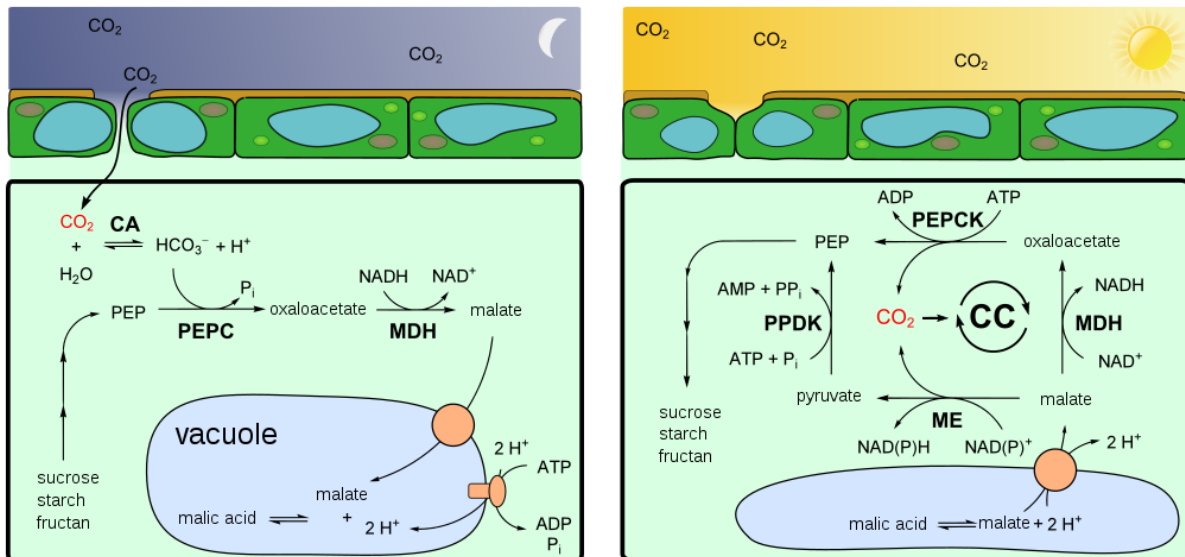
Volgens Borland *et al.* (2009) is lang gedacht dat de export van malaat uit de vacuole naar het cytosol via een passief proces verliep, min of meer gekoppeld aan de efflux van $2H^+$ per malaat. In 2009 was de moleculaire identiteit van dit transportsysteem nog niet geïdentificeerd. Borland *et al.* noemen als mogelijkheid de CAM-ortholoog van de tonoplast dicarboxylate transporter (geïdentificeerd in *Arabidopsis thaliana*). Brilhaus *et al.* (2016) hebben via een studie naar gentranscriptie naast de tonoplast dicarbonate transporter ook nog twee malaat-kanalen uit de aluminium activated malate transporter familie (ALMT) achterhaald. In tegenstelling tot Abraham *et al.* (2016) noemen Brilhaus *et al.* (2016) en Pereira *et al.* (2018) ALMT1 in plaats van ALMT9 (Figuur 12). Anno 2019 is het dus nog niet geheel duidelijk hoe de transportprocessen van malaat exact plaatsvinden.

Malaatafbraak

De manier van decarboxylase van malaat (=‘malaat-afbraak’) afkomstig uit de vacuole is soortafhankelijk (Ceusters *et al.* 2014). Standaardplaatjes van de CAM-fotosynthese (o.a. Figuur 12 in dit rapport en Figuur 21 in Trouwborst *et al.* 2014) noemen vaak alleen maar malic enzymen (ME) als mogelijkheid voor malaatafbraak. Maar er blijken tenminste 3 routes mogelijk (Holtum *et al.* 2005 en Figuur 14 rechts):

- Via NAD-malic enzymen in de mitochondriën (NAD-ME)
- Via NADP-malic enzymen in het cytosol of in de chloroplasten (NADP-ME)
- Via PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxy kinase) in het cytosol. (NB dit enzym mag niet verward worden met het enzym phosphoenolpyruvate carboxylase kinase PPCK, zie Figuur 12, dat het enzym PEPC fosforiliseert, zie voor uitleg Trouwborst *et al.* 2016, Figuur 13).

In de literatuur worden CAM-typen soms onderscheiden naar ME- of PEPCK-typen (Osmond 1978). Bij ME-type CAM-planten wordt pyruvaat uit malaat geproduceerd. Dit pyruvaat kan, behalve dat het kan worden omgezet in PEP (Figuur 12 en 14rechts), ook door de mitochondriën via de citroenzuurcyclus omgezet worden in energie (NADH) waarbij dan ook CO₂ vrijkomt (Figuur 20). Bij PEPCK-type CAM-planten wordt malaat eerst omgezet in oxaalacetaat en vervolgens gedecarboxyleerd tot PEP (Figuur 14rechts).



Figuur 14. CAM-fotosynthese, inclusief de benodigde enzymen. De volgende afkortingen worden gebruikt: CA carbonic anhydrase; CC calvin cycle; PEP phosphoenolpyruvic acid; PEPC phosphoenolpyruvate carboxylase; PEPCK phosphoenolpyruvate carboxykinase; MDH malate dehydrogenase; ME malic enzyme (malate dehydrogenase); PPDK pyruvate, phosphate dikinase. Zie Tabel 8 voor de enzymreacties. Bron: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:CAM_cycle.svg.

Tabel 8. Enzymreacties behorend bij Figuur 14.

Enzym	Reactie
Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)	Phosphoenolpyruvate + HCO ₃ ⁻ → oxaloacetate + Pi
NADP malate dehydrogenase (MDH)	Oxaloacetate + NADPH + H ⁺ → malate + NADP ⁺
NAD(P) malic enzyme (ME)	Malate + NAD(P) ⁺ → pyruvate + CO ₂ + NAD(P)H + H ⁺
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)	Oxaloacetate + ATP → phosphoenolpyruvate + CO ₂ + ADP
Pyruvate-orthophosphate dikinase (PPDK)	Pyruvate + Pi + ATP → phosphoenolpyruvate + AMP + PPi

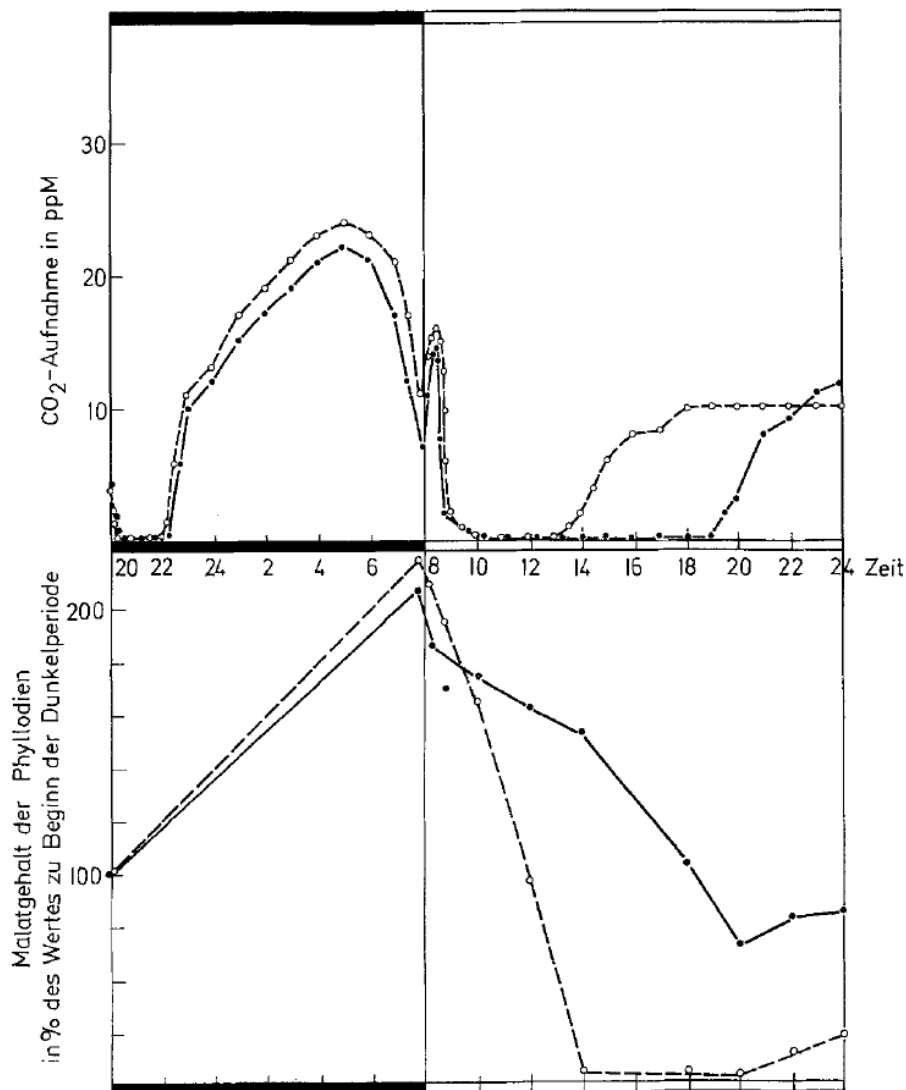
Waar zit de snelheidsregulerende stap?

Zoals aangegeven in de inleiding zijn er drie mogelijkheden voor de snelheidsregulerende stap van de malaatafbraak gedurende CAM-fase III: (1) malaat-efflux uit de vacuole, (2) malaatafbraak in het cytosol, (3) lichtafhankelijke assimilatie van CO₂ via Rubisco.

Holtum *et al.* (2005) merken op dat de efflux van malaat en H^+ uit de vacuole een logische of mogelijk zelfs een doorslaggevende snelheids-beslissende stap is gedurende de ontzuring van de vacuole overdag. Als namelijk de decarboxylatie van malaat in het cytosol trager verloopt dan de aanvoer zou dit ongewenste verzuring van het cytosol tot gevolg hebben. Bij PEPCK-type CAM-planten overtreft—gemiddeld genomen—de extraheerbare activiteit van PEPCK verreweg de benodigde activiteit voor de waargenomen snelheid van ontzuring van de vacuole (alhoewel *in vivo* de enzymactiviteit lager zou kunnen liggen dan *in vitro*). Bij ME-type CAM-planten ligt de snelheid van de-carboxylase dichterbij de buurt van de snelheid van ontzuring. Hier zou het enzym PPDK (Figuur 14; Tabel 8), gezien de lage hoeveelheden, op z'n minst deels snelheidsbeperkend kunnen zijn in het overall proces van ontzuring (Holtum *et al.* 2005). Blijkbaar kan een ophoping van pyruvate maar beperkt voorkomen.

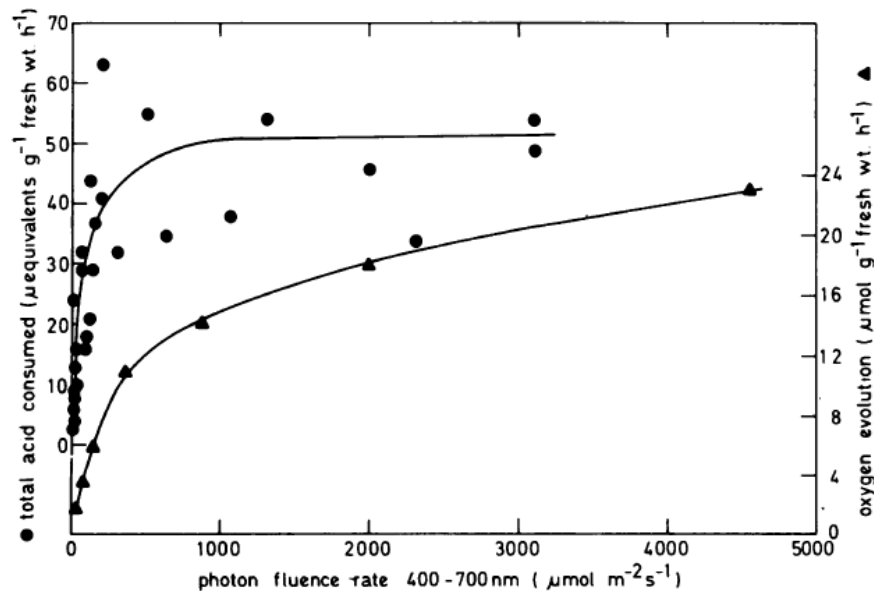
Lüttge (2004) merkt op dat lichtintensiteit gedurende CAM-fase III de snelheid van mobilisatie van organische zuren uit de vacuole bepaalt. Hij verwijst dan naar drie oudere onderzoeken: Kluge, 1968; Barrow & Cockburn, 1982; en Thomas *et al.*, 1987. Deze worden hieronder besproken.

Kluge (1968) laat bij *Kalanchoë tubiflora* zien dat door verschillende condities aan te leggen die resulteren in een kleine malaatpool aan de start van de lichtperiode (verwijdering van CO_2 in het donker, een verlengde donkerperiode, hoge temperaturen in het donker) ervoor zorgen dat de CO_2 -opname die CAM-fase IV inluidt, eerder begint dan bij de controle. Tevens gebeurt dit bij een verhoging van de lichtintensiteit van 7000 naar 17000 lux (~ 91 en $\sim 221 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR), dat een stuk snellere degradatie van de malaatpool laat zien zodat CAM-fase IV uren eerder begint (Figuur 15). Lichtintensiteit is dan dus een (in)directe stuurfactor van de malaatafbraak.



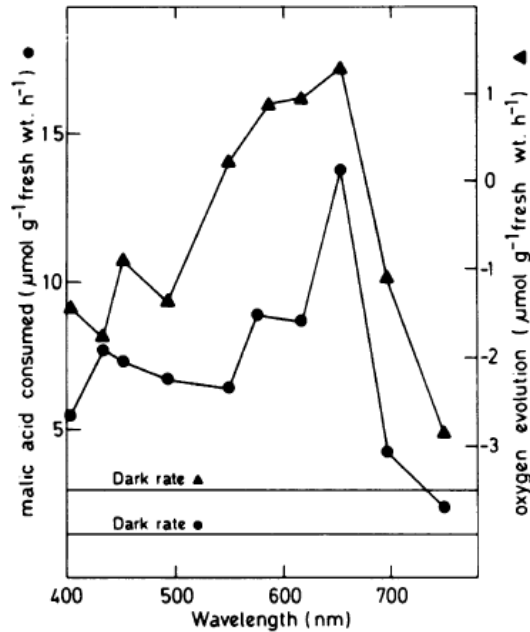
Figuur 15. Verloop van de CO₂-opname (boven) en het malaatgehalte (onder) bij *Kalanchoë tubiflora* door een verhoging van de lichtintensiteit. —=controle; --=behandeling. Bron: Kluge 1968.

Barrow & Cockburn (1982) concluderen in een onderzoek bij *Kalanchoë daigremontiana* dat de bij een toename in lichtintensiteit de malaatafbraak altijd sneller verloopt dan de vastlegging van CO₂ (Figuur 16). De afbraaksnelheid van malaat was bij *Kalanchoë* dus nooit de beperkende stap en de snelheidsbeperking ligt dus bij lichtafhankelijke assimilatie van CO₂ via Rubisco. Barrow & Cockburn noemen als logisch gevolg dat dit verklaart waarom hoge CO₂-gehalten in het blad achter de gesloten huidmondjes kunnen voorkomen. Luttge, (2004) geeft een overzicht dat varieert van 800 ppm voor *Hoya carnosa* (grote wasbloem) tot 25.000 ppm bij *Opuntia* (schijfcactus).



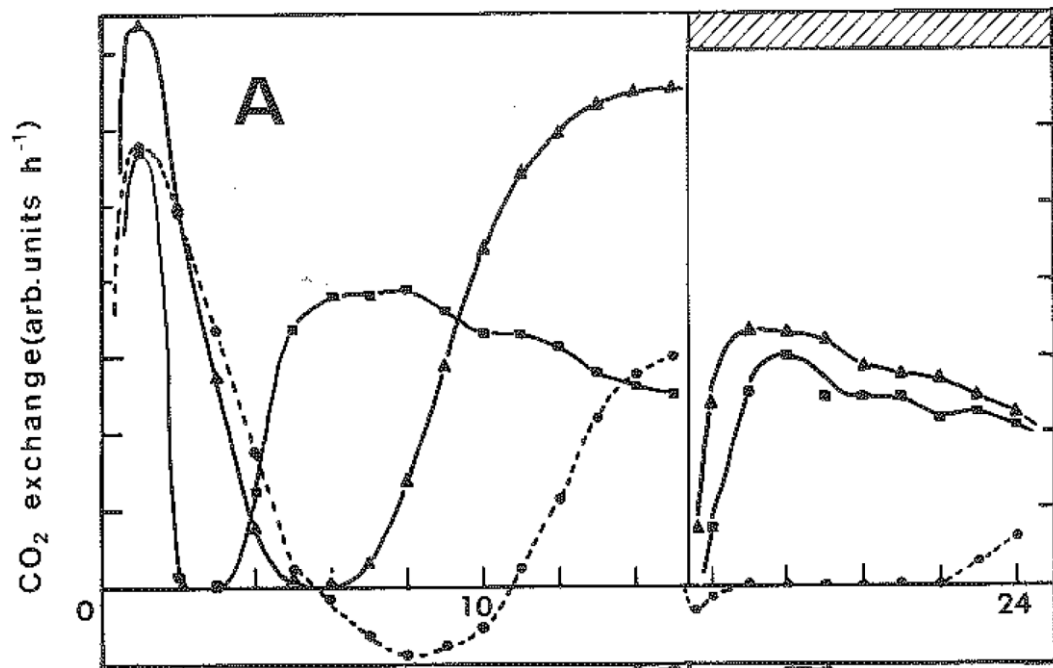
Figuur 16. Lichtafhankelijke 'malaatzuur-consumptie' (=malaatafbraak, ronde symbolen) en zuurstofproductie (=fotosynthesesnelheid van de lichtreactie, driehoek symbolen) bij Kalanchoë. Malaatafbraak-snelheid is gemeten aan bladponsjes die een maximale malaathoeveelheid bevatten. Zuurstofproductie is gemeten aan bladponsjes die een minimale malaathoeveelheid bevatten, daar werd natriumwaterstofcarbonaat als CO_2 -bron gebruikt. Bron: Barrow & Cockburn 1982.

Actiespectra van de malaatafbraak en de snelheid van de lichtreactie van de fotosynthese lieten een gelijksoortig patroon zien (Figuur 17): minder effectieve golflengtes voor de fotosynthese zoals 400 nm en 750 nm laten in grote lijnen ook een lagere malaafbraak-snelheid zien. Dit overeenkomende patroon laat zien dat de snelheid van malaatafbraak gelinkt is aan de snelheid van het fotosyntheseproces. Opgemerkt werd dat malaatafbraak kan worden verhinderd door het gebruik van een PSII-blokker (DCMU; Nishida & Hayashi 1981). Opnieuw duidt dit erop dat het tempo van malaat-afbraak bij Kalanchoë gerelateerd is aan de fotosynthese-snelheid. Welk signaal uiteindelijk bepalend is in de regulatie van malaat-afbraak is onbekend: mogelijk is dat de ETR, of mogelijk een daling van de CO_2 concentratie in het cytosol.



Figuur 17. Actiespectrum van 'malaatzuur-consumptie' (=malaatafbraak, ronde symbolen) en zuurstofproductie (=fotosynthesesnelheid van de lichtreactie, driehoek-symbolen) bij *Kalanchoë* bij 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PFD. Zuurstofproductie is gemeten aan bladponsjes die een minimale malaathoeveelheid bevatten, daar werd natriumwaterstofcarbonaat als CO_2 -bron gebruikt. Bron Barrow & Cockburn 1982.

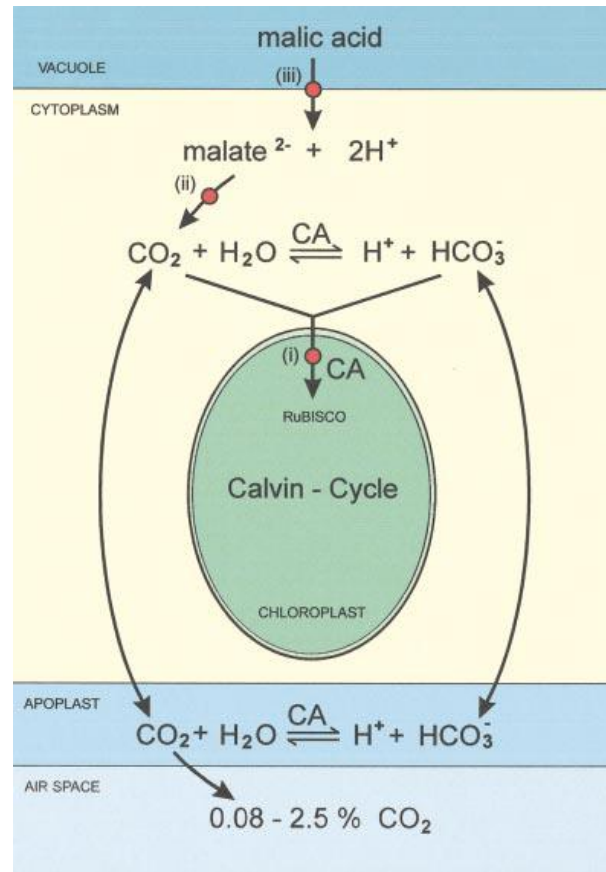
Thomas *et al.*, 1987 laten bij *Kalanchoë Blossfeldiana* zien dat door respectievelijk een verhoging en verlaging in lichtintensiteit ten opzichte van de teeltomstandigheden, CAM-fase IV (malaat op, huidmondjes gaan weer open) veel eerder en later begint dan onder de standaard teeltomstandigheden (Figuur 18). Dit laat opnieuw zien dat er een directe of indirecte regulerende werking van de lichtintensiteit op de snelheid van malaatafbraak uitgaat. Wel wederom bij een *Kalanchoë*-soort; de vraag is of andere CAM-planten op eenzelfde manier reageren.



Figuur 18. Effect van lichtintensiteit op de dagelijkse CO_2 -opname van *Kalanchoe Blossfeldiana*. Groei-omstandigheden $390 \mu\text{mol}$ (driehoek-symbolen) Vermindering in licht naar $100 \mu\text{mol}$ (ronde symbolen) en verhoging in lichtintensiteit naar $790 \mu\text{mol}$ (vierkante symbolen). Te zien is dat door een verhoging in lichtintensiteit CAM-fase IV uren eerder start en door een verlaging in lichtintensiteit juist uren later start dan de controle-behandeling. *Sempervivum tectorum* liet eenzelfde soort patroon zien. Bron: Thomas et al. 1987.

Bovenstaande drie onderzoeken laten dus bij verschillende soorten *Kalanchoë* zien dat de lichtintensiteit de malaatafbraak aanstuurt en dat het fotosynthese-proces hierbij betrokken is. Een voor de hand liggende gedachte is dat er een vraag/aanbod mechanisme aan het werk is. De lichtreactie van de fotosynthese (ETR) bepaalt de vraag naar CO_2 via levering van energie (ATP en NADPH) aan de donkerreactie (Calvincyclus) van de fotosynthese. Er kan echter ook een aparte (nog onbekende) aansturing zijn die werkt op lichtintensiteit.

Lüttge (2002) benoemt dat in een groot aantal onderzoeken het gemeten CO_2 -gehalte in het blad in CAM-fase III op of onder het CO_2 -verzadigingsniveau ligt (CO_2 -verzadiging tussen de 1000-4000 ppm). Oververzadiging tot wel 25000 ppm kwam wel voor bij twee *Opuntia*'s (schijfcactussen). Oververzadiging is een teken dat er van regulering via de CO_2 -vraag van Rubisco geen sprake is. Het feit dat het interne CO_2 -gehalte op of (iets) onder verzadigingsniveau ligt in het merendeel van de gemeten gevallen, maakt het aannemelijk dat regulatie van malaatafbraak door Rubisco plaats vindt (vraaggestuurd) en dat de CO_2 -concentratie functioneert als regulerende factor. Een belangrijk enzym hierbij zou volgens Lüttge carbonic anhydrase (CA) kunnen zijn (Figuur 19). Carbonic Anhydrase reguleert namelijk het $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_2$ evenwicht in het cytosol en chloroplast stroma, en de levering van CO_2 aan Rubisco.

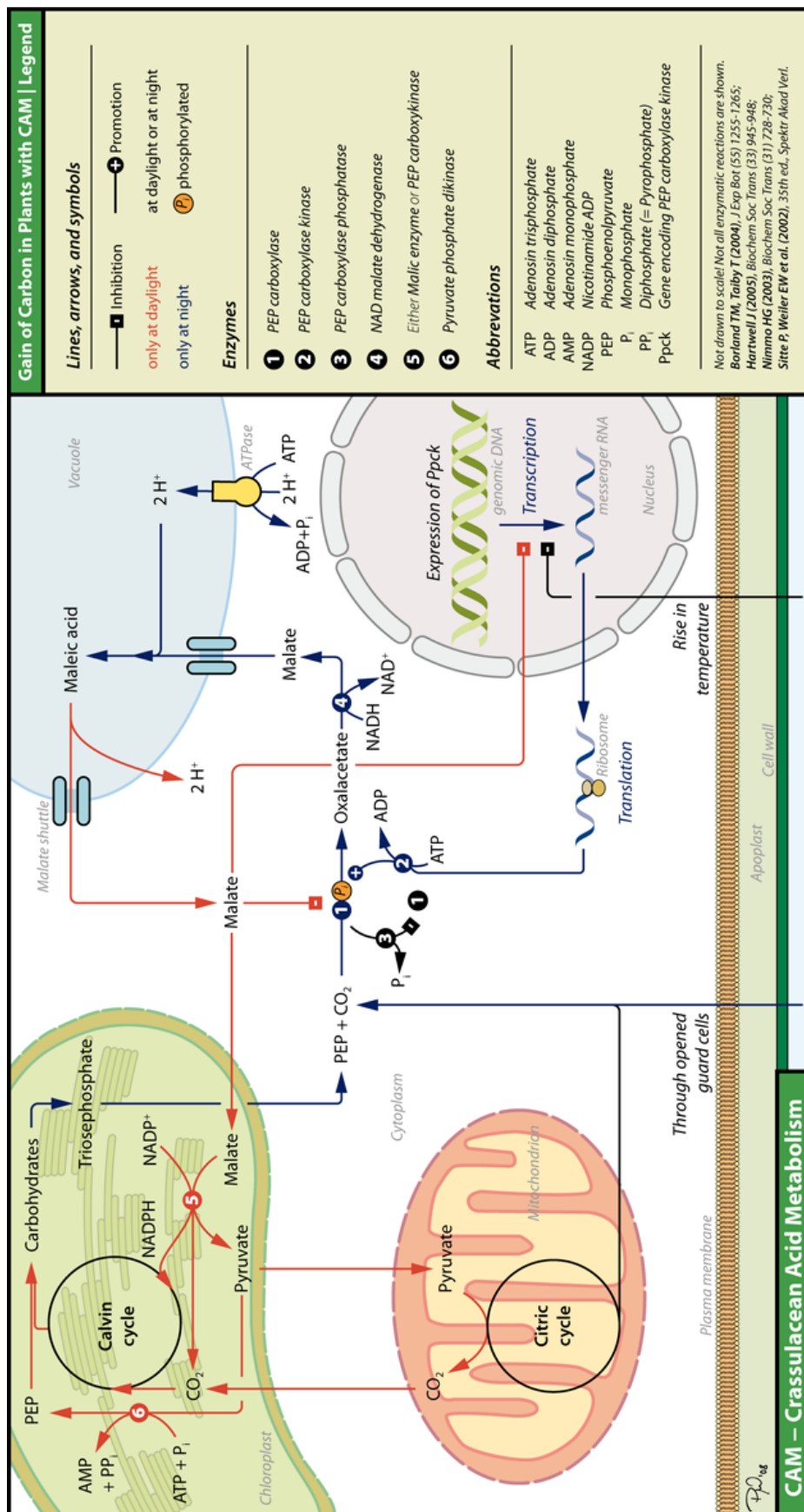


Figuur 19. Malaatzuur/malaat remobilisatie en decarboxylatie en opbouw van een hoge interne CO₂-concentratie in CAM-fase III en mogelijke controle-punten (i) CO₂-consumptie door Rubisco, (ii) consumptie van malaat in het cytosol door decarboxylase, en (iii) efflux van malaatzuur uit de vacuole. Carbonic anhydrase (CA) is een enzym dat een evenwicht creëert tussen HCO₃⁻ en CO₂. Bron: Luttge 2002.

Als laatste kan nog worden vermeld dat Owen & Griffiths (2013) een zo mechanistisch mogelijk computermodel hebben ontwikkeld. Ondanks dat ze de precieze regulatie van de afbraak van malaat niet kennen, konden ze door de aanname te doen dat de maximale carboxylase-capaciteit van Rubisco (=V_{Cmax}) de snelheids-beperkende factor is (dus de malaatafbraak-snelheid limiteert de carboxylase snelheid niet), redelijk de lengte van CAM-fase III voorspellen. Dat impliceert dus dat ofwel de afbraak-snelheid van malaat gereguleerd wordt door de vraag naar CO₂, of dat de afbraak-snelheid van malaat hoger ligt dan de vraag naar CO₂.

Samenvattend

Waarschijnlijk is efflux van malaat uit de vacuole en de daaropvolgende afbraak van malaat niet snelheidsbeperkend voor de daaropvolgende fotosynthese. Een te hoge efflux uit de vacuole brengt het gevaar van een (te grote) verzuring van het cytosol met zich mee. Een regelmechanisme die stuurt op een partiele CO₂-druk die (net aan) verzadigend is voor de fotosynthese, lijkt het meest functioneel. Hoe dit precies verloopt is nog onderwerp van onderzoek.

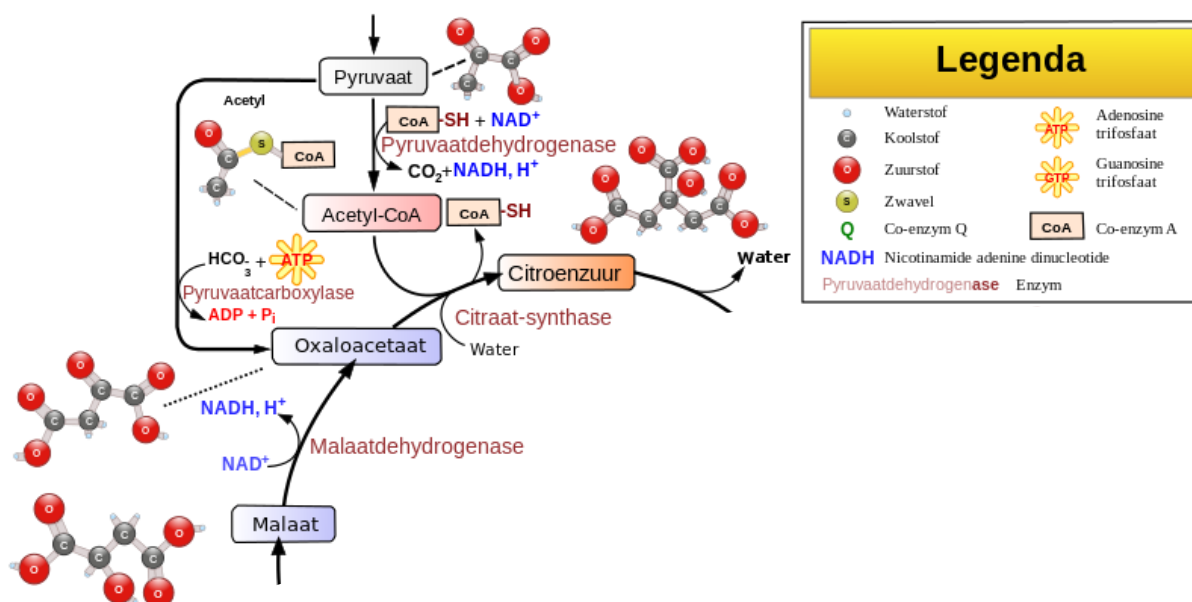


Figuur 20. Overzicht van het CAM-metabolisme, met hierin opgenomen de mitochondriële respiratie. Bron: https://en.wikipedia.org/wiki/Crassulacean_acid_metabolism#/media/File:CAM.png

B1.3 Rol van Citraat

Hoewel hoofdzakelijk malaat gebruikt wordt als CO₂-opslag in CAM-planten is dit niet altijd het geval. Waar malaat als CO₂-opslag wordt gebruikt, uit zich dit in een dagelijkse fluctuatie van de concentratie malaatzuur. In sommige soorten, en in het bijzonder wel *Clusia* (Clusiaceae) maar ook in soorten uit de families Aizoaceae, Crassulaceae, Orchidaceae, Vitaceae en Bromeliaceae, kunnen ook dagelijkse fluctuaties in citroenzuur voorkomen (geciteerd in Holtum, 2005). Deels betreft dit een toename in citraat overdag en deels een afname overdag gecombineerd met een nachtelijke toename (Lüttge, 1988). Dit laatste suggereert dat de nachtelijke opslag van citroenzuur (mede) een bron is voor CO₂ overdag. Een mol citraat kan dusdanig afgebroken worden dat er 3 mol CO₂ vrijkomt, terwijl 1 mol malaat 1 mol CO₂ oplevert.

Lüttge (1988) betoogt dat nachtelijke vorming van citroenzuur geen netto CO₂-opslag genereert. Bij de malaatroute worden er voor ieder hexose molecuul (C6-suiker waaruit twee PEP-moleculen worden gevormd), twee CO₂-moleculen vastgelegd als malaat (C4-suiker) via het enzym PEPCase. De aanmaak van citroenzuur (C6-suiker, Figuur 13) via citraat synthase vereist oxaalacetaat (C4) en een acetylgroep (C2). Bij de vorming van oxaalacetaat uit PEP (C3) wordt 1 CO₂ molecuul vastgelegd. Maar bij de vorming van de acetylgroep uit pyruvaat (C3) via pyruvaat dehydrogenase gaat juist 1 CO₂-molecuul verloren (Figuur 21). Netto levert dit dus geen CO₂-opslag op.



Figuur 21. Vorming van citroenzuur uit oxaalacetaat en een acetylgroep. Het figuur is een deel uit de citroenzuurcyclus. Bron: <https://nl.wikipedia.org/wiki/Citroenzuurcyclus>

Gezien het feit dat er toch significante hoeveelheden citroenzuur in CAM-planten worden opgeslagen, zal dit wel een functie hebben. Echter, deze functie is nog niet geheel duidelijk

(Lüttge 2006). In Tabel 9 worden potentiële voor- en nadelen benoemd. Een belangrijk punt is hierbij het energiebudget. Nachtelijke accumulatie van citroenzuur is energetisch voordeliger dan malaatopslag. Malaatproductie in het cytosol kost netto geen energie, maar transport naar de vacuole wel: de afbraak van 1 mol hexose levert 2 mol malaat in de vacuole op, maar kost 2 mol ATP. De netto kosten van 1 mol hexose die omgevormd wordt tot 1 mol citraat zijn 1.5 mol ATP (Tabel 10). Overdag loopt het verschil in energiebudget tussen malaat en citraat fors uiteen: Doordat er bij afbraak van 1 mol citraat 3 mol CO₂ vrijkomt, moet er om netto op 0 uit te komen ook drie mol CO₂ via Rubisco worden vastgelegd. Dit kost fors meer ATP (Tabel 10). Wat energetisch een nadeel is, kan in sommige gevallen een voordeel zijn, namelijk in omstandigheden waar CO₂ schaars is en lichtenergie ruim voorradig is. Dit is het geval bij CAM-idling (huidmondjes dag en nacht volledig gesloten, geen netto groei). Door de CAM-cyclus (grotendeels) te laten draaien op citraat, komt er overdag relatief veel CO₂ vrij. Hierdoor kan de lichtreactie van de fotosynthese langer draaien zonder beperkt te zijn in CO₂. Hierdoor zal kans op foto-inhibitie of ergere schade verminderd worden. Overschakeling naar CAM-idling wordt geïnduceerd door forse stress. Lüttge (1990) laat inderdaad een door stress toegenomen delta citraat zien bij *Kalanchoe pinnata*. Recenter laten Miszalski *et al.* (2013) zien dat bij *Clusia Hillariana* citraat in eerste instantie geen functie heeft als CO₂-bron gedurende CAM-fase III, terwijl na transitie naar hoog licht (lichtstress) citraat wel als CO₂-bron fungeert. Figuur 22 geeft de CAM-cyclus met citraat als CO₂-bron weer.

Kort samengevat is 's nachts citraat energetisch voordeliger (maar levert geen CO₂-winst op) en overdag is het energetisch kostbaarder wat gunstig is in omstandigheden waar CO₂ schaars is en energie ruim voorradig is: CAM-idling.

Tabel 9. Potentiële voor- en nadelen van nacht-dagverschillen in de concentraties van malaat en citraat, gedurende de CAM-cyclus. Bron Lüttge 2006.

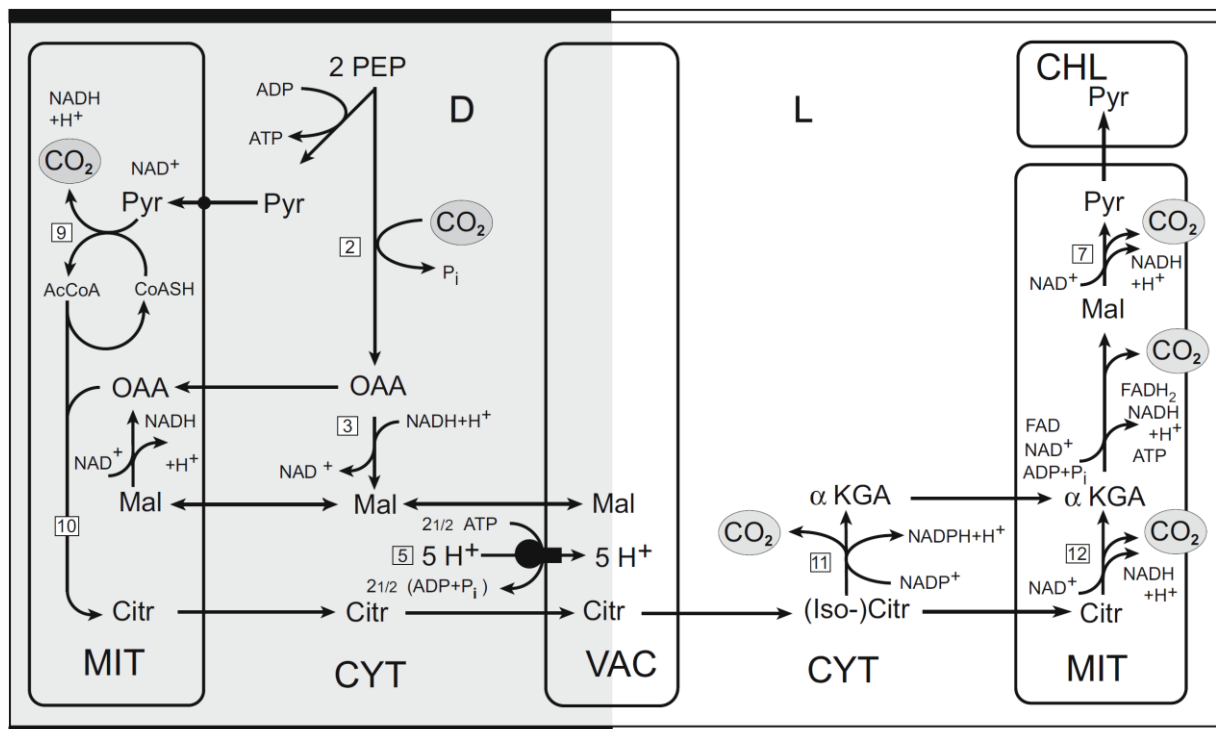
Function	Δ_{mal}	Δ_{citr}
1. CO ₂ acquisition	Yes	No
2. H ₂ O saving during CO ₂ acquisition	Yes	No
3. Carbon recycling in the dark period	CO ₂	Carbon skeleton
4. Carbon recycling in the light period and increase in internal CO ₂ concentration	CO ₂	CO ₂
5. Energy budget in the dark period	Yes	Yes, more than for malate
6. Energy budget in the light period	ATP consumption	ATP consumption and production of redox power
7. Osmotic changes	ATP consumption	Larger ATP consumption and consumption of redox power
8. Buffer capacity	Yes	Yes, less than for malate
	Low	High

Tabel 10. Energiebudget gebaseerd op een hexose-eenheid van diverse CAM-cycli uit verschillende koolhydraten en de organische zuren malaat en citraat. A: omzet van organische zuren en B: omzet van koolhydraten. Bron: Lüttge 2007.

(A)	Dark period		Light period			
	ATP	[2H]	ATP	[2H]		
2 PEP → 2 vacuolar mal	-2	-2				
2 vacuolar mal → 2 pyr			0	+2		
2 PEP → 1 vacuolar citr	-1.5	+1				
1 vacuolar citr → 1 pyr			+1	+4		
(B)	Starch		Free hexose		Sucrose	
	ATP	[2H]	ATP	[2H]	ATP	[2H]
Carbohydrates						
Dark period formation of PEP	+1	+2	0	+2	0	+2
Light period recycling of pyr	-5	-2	-4.5	-2	-4.75	-2
Malate and carbohydrates						
Dark period	-1	0	-2	0	-2	0
Light period	-5	0	-4.5	0	-4.75	0
Net	-6	0	-6.5	0	-6.75	0
Citrate and carbohydrates						
Dark period	-0.5	+3	-1.5	+3	-1.5	+3
Light period ^{a)}	-10.5	-3	-10.25	-3	-10.375	-3
Net	-11.0	0	-11.75	0	-11.875	0

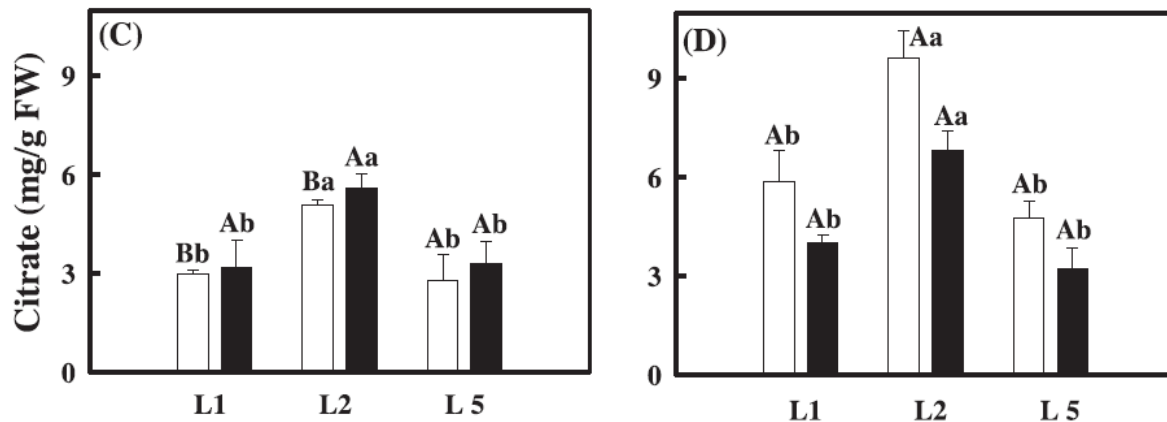
^a Only one pyr is regenerated, 3 CO₂ need to be fixed in the Calvin cycle to regenerate the second C₃ compound.

[2H]=reduction equivalent; citr=citrate, mal=malate, pyr=pyruvate; +=net production, -=net consumption.



Rol van citraat bij Phalaenopsis?

niet als CO₂-bron, Tevens moet opgemerkt worden dat er in beide behandelingen geen sprake was van lichtstress. Kortom, bij de meeste onderzoeken aan *Phalaenopsis* tot nu toe lijkt citraat geen functie gehad te hebben als CO₂-bron overdag, alleen bij het onderzoek Liu *et al.* (2013) mogelijk wel enigszins bij de warme nacht behandeling (Figuur 23).



Figuur 23. Ochtend (open staven) avond (dichte staven) variaties in citraat van bladeren van verschillende bladleeftijden geteld vanaf boven. Links (C) controle en rechts (D) warme nachten. Verschillende hoofdletters duiden op statistisch significante verschillen tussen de controle en de warme nachten. Verschillende kleine letters duiden op statistisch significante verschillen tussen verschillende bladleeftijden. Tussen de ochtend en de avonden werden bij citraat geen verschillen waargenomen, maar het resultaat bij de warme nachten wekt wel degelijk de suggestie dat hier iets aan de hand is. Bron: Liu *et al.* 2013.

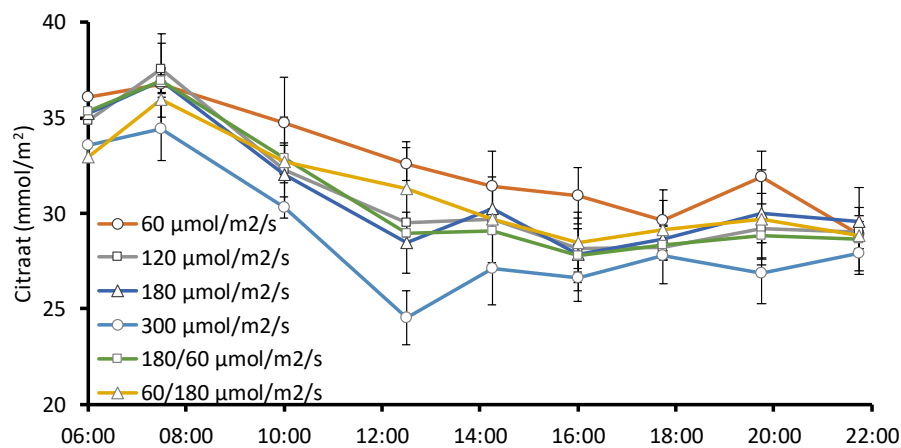
Bruno Pollet (2010) bespreekt in zijn proefschrift twee situaties waar citraat bij *Phalaenopsis* een functie lijkt te hebben. In het eerste geval (*Phalaenopsis* 'Hercules') vond Pollet bij nachttemperaturen boven de 20°C malaatconcentraties tot 140 mmol/m² en citraatconcentraties van rond de 70 mmol/m². Echter, een verlaging van de nachttemperatuur naar 12°C resulteerde in een verschuiving van organisch zuur metabolisme met vergelijkbare malaat- en citraatniveaus van beide op ongeveer 90 mmol/m². In het tweede geval als jonge bladeren van *Phalaenopsis* 'Atlantis' werden blootgesteld aan een verschuiving van 28/28°C naar 28/16°C dag/nacht, was het aandeel citraat 40% van de totale zuurhoeveelheid. Tevens liet citraat een dagelijks patroon zien van opbouw en afbraak van malaat. De omvang van de dagelijkse fluctuatie was echter veel kleiner dan de malaatfluctuatie (qua orde grootte 19 mmol/m² versus 95 mmol/m²). Pollet merkt op dat citraat cycling—dat in de lichtperiode meer energie kost (Tabel 10)—het gevaar voor foto-inhibitie en foto-destructie gedurende de lichtperiode kan reduceren (dus fungeert als een soort energievernietigingsproces). Aangezien bij tropische gewassen licht schadelijk kan zijn bij lage temperaturen (zie bijvoorbeeld Hogewoning & Harbinson, 2006), zou overschakeling naar citraat als CO₂ bron bij te lage temperaturen een beschermingsmechanisme kunnen zijn van de plant. Tevens zou het kunnen helpen voor de carbon recycling capaciteit van CAM-idling gedurende de donkerperiode omdat deze energetisch zuiniger is (Tabel 10). Lüttge noemt als essentieel voordeel van citroenzuuraccumulatie het gunstigere nachtelijke energiebudget (Lüttge 1988, 2006 en 2007 en Tabel 10).

Afsluitend kan gesteld worden dat citraat bij *Phalaenopsis* een zuur is dat in significante hoeveelheden voorkomt. De hoeveelheid titreerbaar zuur als maat voor malaat kan dus behoorlijk 'vervuild' worden door het aanwezige citraat. De amplitude van de dagelijkse fluctuaties in citraat is of afwezig of (fors) kleiner dan bij malaat. Bij behandelingen die (licht)stress geven is een rol voor citraat zeker niet uit te sluiten. Bij *Phalaenopsis* zal dus citraat ook moeten worden gemeten als we met zekerheid uitspraken willen doen over effecten van licht in CAM-fase III op het vrijkomen van CO₂ in het blad.

Bijlage 2 Metingen van citraat

B2.1 Korte termijn verandering citraat

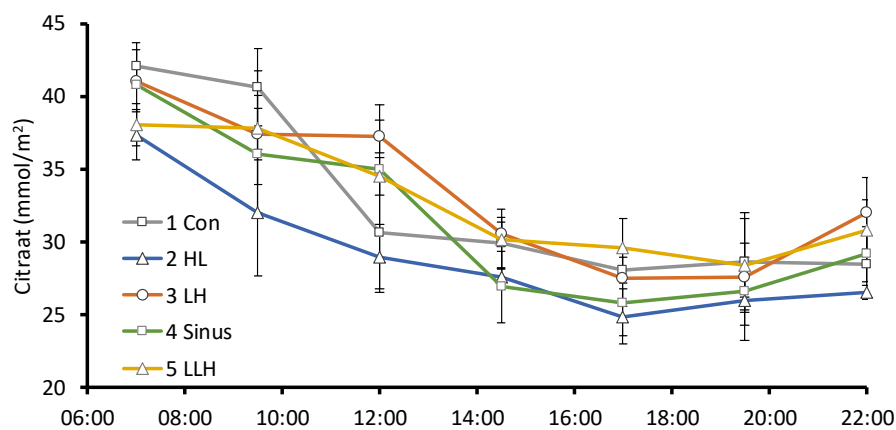
In Figuur 24 wordt het verloop van citraat voor de korte-termijn behandelingen weergegeven. Ruwweg daalt de hoeveelheid citraat gedurende de dag met ruim 20% voor alle behandelingen. Er is geen duidelijk patroon tussen de behandelingen: wel is aan het einde van de dag de hoeveelheid citraat bij 60 μmol nog het hoogst terwijl deze bij 300 μmol aan de lage kant ligt. In relatieve zin ligt het citraat bij 300 μmol echter niet lager dan bij 120 en 180 μmol , behalve het meetpunt om 12:30. Dit meetpunt zou een rol voor citraat op momenten van lichtstress kunnen suggereren (malaat op en huidmondjes niet of nauwelijks open), maar hier is bewijsvoering te dun voor.



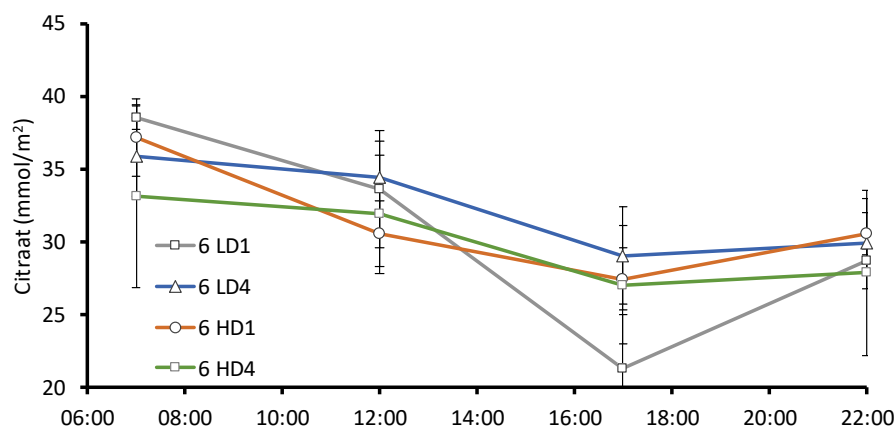
Figuur 24. Verloop van de citraat-concentratie per m^2 blad over de lichtperiode. De behandelingen verschilden alleen gedurende CAM-fase III (7:30-17:30) in lichtintensiteit (Zie Tabel 3). Verticale balkjes geven de SD aan.

B2.2 lange termijn verandering citraat

In Figuur 25 en 26 wordt het verloop van citraat voor de lange-termijn behandelingen weergegeven. Ook hier vond er dagelijks zo'n 20% daling van de hoeveelheid citraat plaats. Ook hier worden geen duidelijke verschillen tussen behandelingen waargenomen. Het enige dat opvalt is het lage meetpunt van citraat om 17:00 op de eerste dag laag licht na vier dagen hoog licht (behandeling 6 LD1; Figuur 26), maar er is forse overlap in de standaardafwijking.



Figuur 25. Verloop van de citraat-concentratie per m² blad over de lichtperiode (6:00-22:00) van de lange-termijn belichtingsbehandelingen 1-5 (zie Tabel 4). De PAR-som was in alle vijf behandelingen gelijk. Behandelingen 1-4 verschilden alleen gedurende CAM-fase III (7:00-17:00) in belichtingsritme. Behandeling 5 had laag licht gedurende CAM-fase III, maar hoog licht gedurende CAM-fase IV. Verticale balkjes geven de SD aan (n=3).



Figuur 26. Verloop van de citraat-concentratie per m² blad over de lichtperiode van lange-termijn behandeling 6. Tijdens deze metingen wisselden 4 dagen laag licht zich af met 4 dagen hoog licht (respectievelijk 60 μ mol en 180 μ mol PAR gedurende CAM-fase III). Vandaar dat deze patronen gemeten zijn op de eerste en vierde dag van het lage licht (LD1 & LD4) en op de eerste en vierde dag van het hoge licht (HD1 & HD4). Verticale balkjes geven de SD aan (n=3).