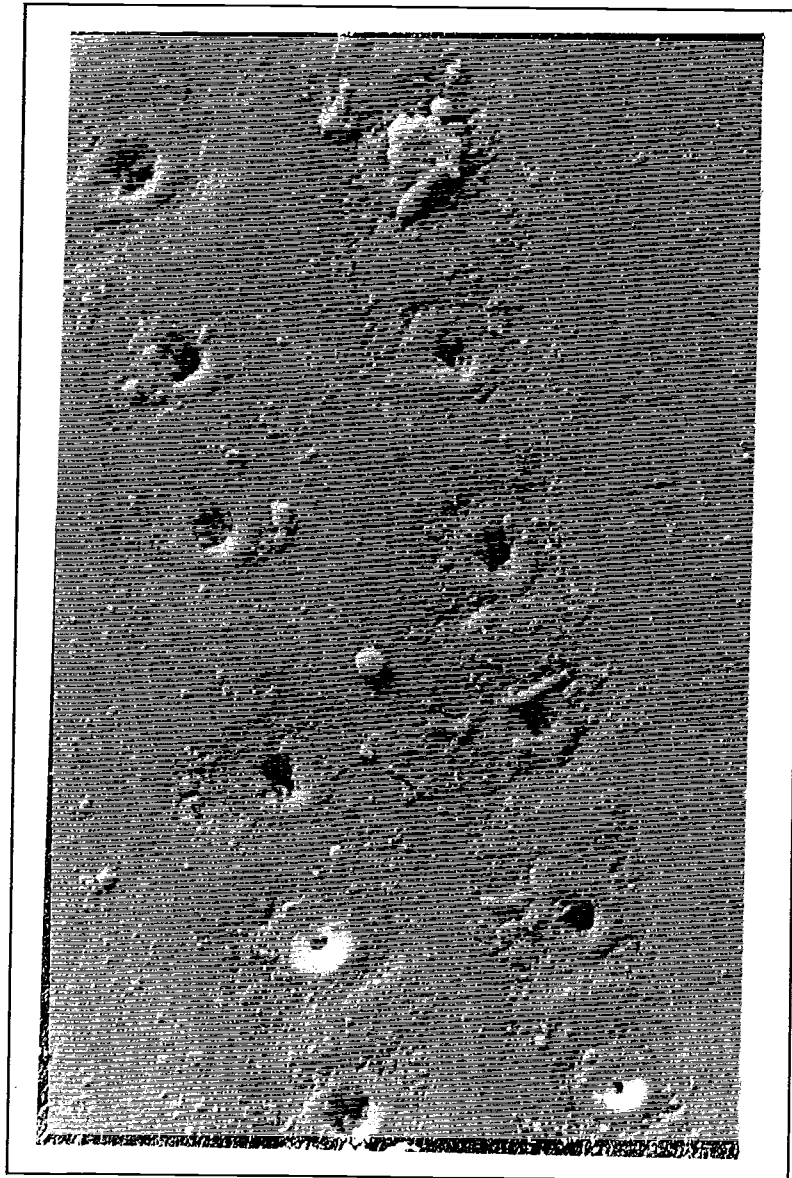


Effect van droge NH_3 depositie op vorsttolerantie en metabolisme van wintertarwe en grove den



Doctoraalverslag Jan Henk Venema
Rijksuniversiteit Groningen
1992

**Effecten van droge NH₃ depositie op
vorsttolerantie en metabolisme van
wintertarwe (*Triticum aestivum* L.)
en grove den (*Pinus sylvestris* L.)**

**Verslag doctoraalonderwerp Jan Henk Venema
Begeleid door Drs. Han Clement en Dr. Philip R. van Hasselt
Periode februari - september 1992
Laboratorium voor Plantenfysiologie,
Afdeling Biologie Rijksuniversiteit Groningen**

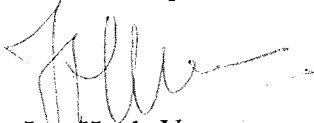
Inhoudsopgave

| | |
|--|----|
| Voorwoord | 3 |
| Hoofdstuk 1 Algemene inleiding | 4 |
| Hoofdstuk 2 Effecten van droge NH ₃ depositie op metabolisme en vorsttolerantie van wintertarwe (<i>Triticum aestivum</i> L.) bij een temperatuur van 4°C | 9 |
| Hoofdstuk 3 Effecten van droge NH ₃ depositie op metabolisme en vorsttolerantie van wintertarwe (<i>Triticum aestivum</i> L.) bij een temperatuur van 20°C | 16 |
| Hoofdstuk 4 Effecten van droge NH ₃ depositie op metabolisme en vorsttolerantie van wintertarwe (<i>Triticum aestivum</i> L.) bij een temperatuur van 4°C en 18.5°C | 22 |
| Hoofdstuk 5 Effecten van droge NH ₃ depositie op vorsttolerantie en metabolisme van grove den (<i>Pinus sylvestris</i> L.) | 28 |
| Hoofdstuk 6 Samenvatting | 35 |
| Bijlage | 37 |
| Literatuur | 39 |

Voorwoord

Het in dit verslag beschreven doctoraalonderzoek werd uitgevoerd op het laboratorium voor plantenfysiologie van de *Rijksuniversiteit* Groningen. Het onderzoek van dit laboratorium richt zich op de invloed van het milieu op planten: hoe worden signalen vanuit het milieu waargenomen en vertaald in reacties van de plant die al of niet van waarde zijn als aanpassing van de plant aan de veranderde omstandigheden. Het onderzoek strekt zich dan ook uit van onderzoek aan protoplasten tot de reactie van de gehele plant. Er wordt gebruik gemaakt van geavanceerde biofysische technieken als electrofysiologie, "patch-clamp" en *in vivo* fluorescentie. Diepgaande biochemische studies over het metabolisme van N, S en C worden in onderlinge samenhang uitgevoerd. Deze studies kunnen als basis kunnen dienen voor de beoordeling en toepassingen in maatschappelijke vraagstukken over luchtverontreiniging, zure regen, broeikas effecten, nitraatophoping in groenten, energiebesparing in de glastuinbouw, een mogelijk efficiënter gebruik van mineralen door gewassen.

In dit kader wordt door Drs. Han Clement promotie onderzoek gedaan naar de effecten van verhoogde ammoniak concentraties op planten. Dit onderzoek sprak mij zeer aan gezien de sterke vitaliteitsafname van de Nederlandse bossen in de laatste jaren en de mogelijke rol die ammoniak hierin speelt. Zeker wanneer je weet dat dit gas als één van de belangrijkste luchtverontreinigingscomponenten in bepaalde, qua vegetatietype kwetsbare gebieden van Nederland geldt. Zodoende besloot ik mij gedurende mijn eerste doctoraalonderwerp te gaan bezighouden met onderzoek naar de effecten van ammoniak (NH_3) op de vorsttolerantie, fotosynthese en N-metabolisme van wintertarwe (*Triticum aestivum* L.) en later ook van grove den (*Pinus sylvestris* L.). Het werd een leerzame periode waarin ook ruimte was om aan nevenactiviteiten van het lab deel te nemen. Al met al heb ik plezierige tijd gehad, ondanks de vaak 'negatieve' verkregen resultaten. Ik bedank hierbij Han en Flip van Hasselt voor de attente begeleiding.



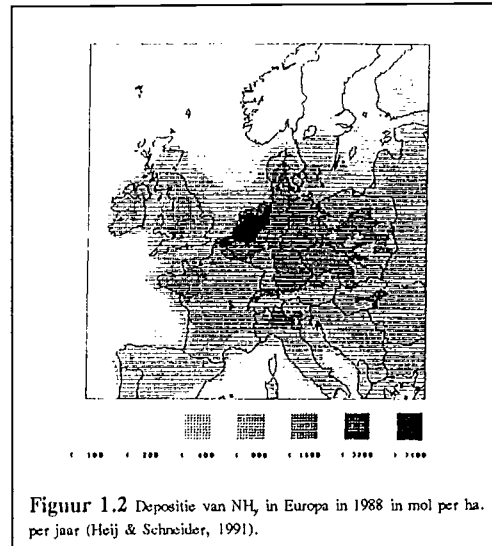
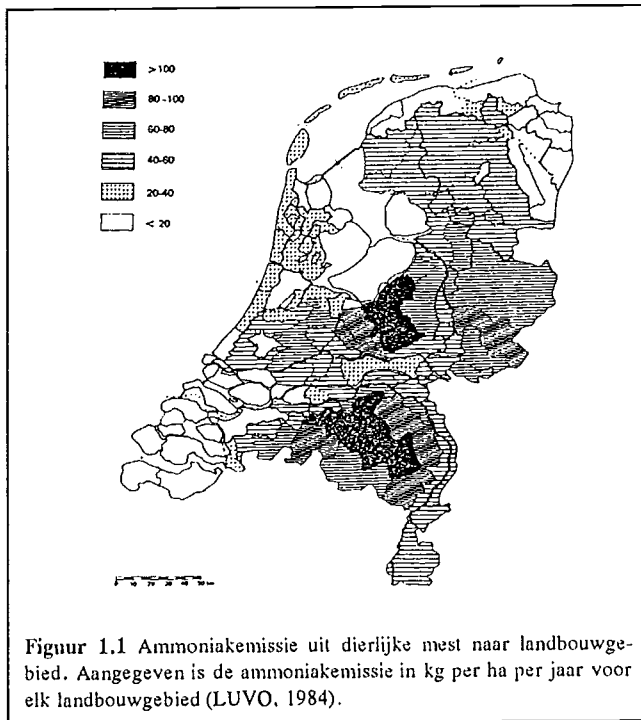
Jan Henk Venema,
najaar 1992

Hoofdstuk 1

Algemene inleiding

Ammoniakemissie

Er bestaan een aantal hypothesen die de sterke vitaliteitsafname van de Europese bossen in de laatste jaren zouden kunnen verklaren. Hierbij wordt in eerste instantie gedacht aan de rol die fytotoxische gassen als zwaveldioxide (SO_2) en stikstofoxides (NO_x) in de vorming van zure regen en ozon spelen (Nihlgård, 1985). Pas de laatste jaren is door onderzoek duidelijk geworden dat ook de verhoogde depositie van NH_y (ammoniak plus ammonium) een mogelijke rol in de achteruitgang van de bossen speelt. Dit geldt zeker voor de Nederlandse bossen gezien het feit dat in ons land de hoogste concentraties aan NH_3 van Europa gemeten worden (gemiddeld $35 \mu\text{g m}^{-3}$ met piekbelastingen tussen de 500 en $4400 \mu\text{g m}^{-3}$ (van Hove, 1989)).



Een grote hoeveelheid NH_3 wordt geëmitteerd door de veeteelt (dierlijk mest). De emissies vinden verhoogd plaats in concentratie gebieden van de bio-industrie veelal gelegen op de

schrale zandgronden (Veluwe en de Peel) waarop bovendien ook nog gevoelige vegetatietypen voorkomen. In figuur 1.1 is de ammoniakemissie uit dierlijke mest naar landbouwgebied in Nederland uitgezet terwijl figuur 1.2 een beeld geeft van de emissie van NH_y in Europa. Hieruit blijkt dat Nederland gemiddeld de hoogste depositie aan stikstof kent. In veel mindere mate dragen kunstmest, industriële activiteiten en uitlaatgassen van auto's bij. In tabel 1.1 is weergegeven wat de jaarlijkse emissie van deze bronnen is. Hieruit blijkt dat emissies uit dierlijke mest verreweg het belangrijkste zijn (bijna 90%). De emissie van mest is echter sterk seizoensafhankelijk maar ook temperatuur, windsnelheid

en regenval hebben hun invloed. Wat echter van nog grotere invloed hierop is zijn de periodes wanneer mest uitgereden mag worden.

Tabel 1.1 Ammoniakemissies in Nederland naar bron in tonnen per jaar (LUVU, 1984).

| bron | ammoniakemissie (ton NH ₃ per jaar) |
|----------------|---|
| dierlijke mest | 114.100 |
| kunstmest | 8.350 |
| industrie | 7.600 |
| overig | 500 |
| totaal | 130.550 |

De jaargemiddelde ammoniak concentratie in Nederland is $\pm 35 \mu\text{g m}^{-3}$ (46 ppb) maar is sterk afwijkend naar plaats en tijdstip. Metingen aan de emissies van de drie belangrijkste luchtverontreinigingscomponenten in ons land toonden aan dat in het afgelopen decennium de emissie van SO₂ was gedaald terwijl de emissie van NO_x gelijk gebleven was. De emissie van ammoniak echter is de laatste jaren sterk gestegen (Schneider & Bresser,

1987). Uit die gegevens bleek eveneens dat een derde van de verzurende luchtverontreinigingscomponenten nat gedepositeerd wordt (zure regen). Het overige deel vindt plaats in de gasvorm; de zogenaamde droge depositie.

Ammoniakcyclus

Ammoniak kan door droge depositie of door uitwassing via regendruppels direct uit de atmosfeer verdwijnen. Ook kan ammoniak met salpeterzuur of zwavelzuur omgezet worden tot ammonium in aerosolvorm (ammoniumsulfaat en ammoniumnitraat) of via een reactie met hydroxylradikalen omgezet worden tot stikstofmonoxide.

Voor de plant betekent dit dat NH₃ zowel bovengronds via de huidmondjes alswel ondergronds via de wortels opgenomen kan worden en hiermee de metabole en fysiologische processen in de plant kan beïnvloeden.

Effecten van ammoniak op bodem en wortelmilieu.

Ten gevolge van natte depositie van NH₃ neemt het stikstofaanbod in de bodem toe. Enerzijds kan dit tot een verhoogde nitrificatie leiden waarbij nitriet, nitraat en salpeterzuur gevormd worden. Bij deze reacties komen protonen vrij, wat tot verzuring van het bodemmilieu leidt.

Bij coniferen is aangetoond dat in voldoende vochtige bodems waarin zowel ammonium als nitraat aanwezig zijn, de bomen bij voorkeur stikstof opnemen in de ammoniumvorm (Gijsman, 1990; Kamminga-van Wijk, 1991; Flaig *et al.*, 1992). De NH₄⁺ concentratie in de bodem zal toenemen bij depositie van NH₃. Hierdoor zal een verhoogde opname van ammonium plaatsvinden en wordt de wortelrhizosfeer extra verzuurd doordat de opname gepaard gaat tegen de uitwisseling van een proton. Dit in tegenstelling tot opname van stikstof in de nitraatvorm waarbij OH⁻ wordt uitgescheiden en dus leidt tot alkalisatie.

Deze verzuring van het wortelmilieu kan leiden tot het in oplossing geraken van kationen waardoor toxische elementen als Al³⁺ vrijkomen. Bovendien kunnen andere voor de plant benodigde kationen zoals Mg²⁺, Ca²⁺ en K⁺ uit hun complex verdreven worden doordat ze de competitie met NH₄⁺, H⁺ en het in lage concentraties aanwezige Al³⁺ verliezen. Zo kunnen ze uit de wortelzone lekken en kunnen deficiënties optreden die in de plant kunnen leiden tot een sterk verstoorde nutriëntenbalans. Dit is de reden dat de effecten van NH₃ zich vooral doen gelden op de nutriëntenarme zandgronden.

Een direct gevolg van de verzuring van het wortelmilieu is de groeiremming van wortels en het afsterven van de wortelharen wat ook bijdraagt aan nutriëntendeficiënties in de plant (Gijsman, 1990; Kamminga-van Wijk, 1991).

Effect van ammoniak op de spruit

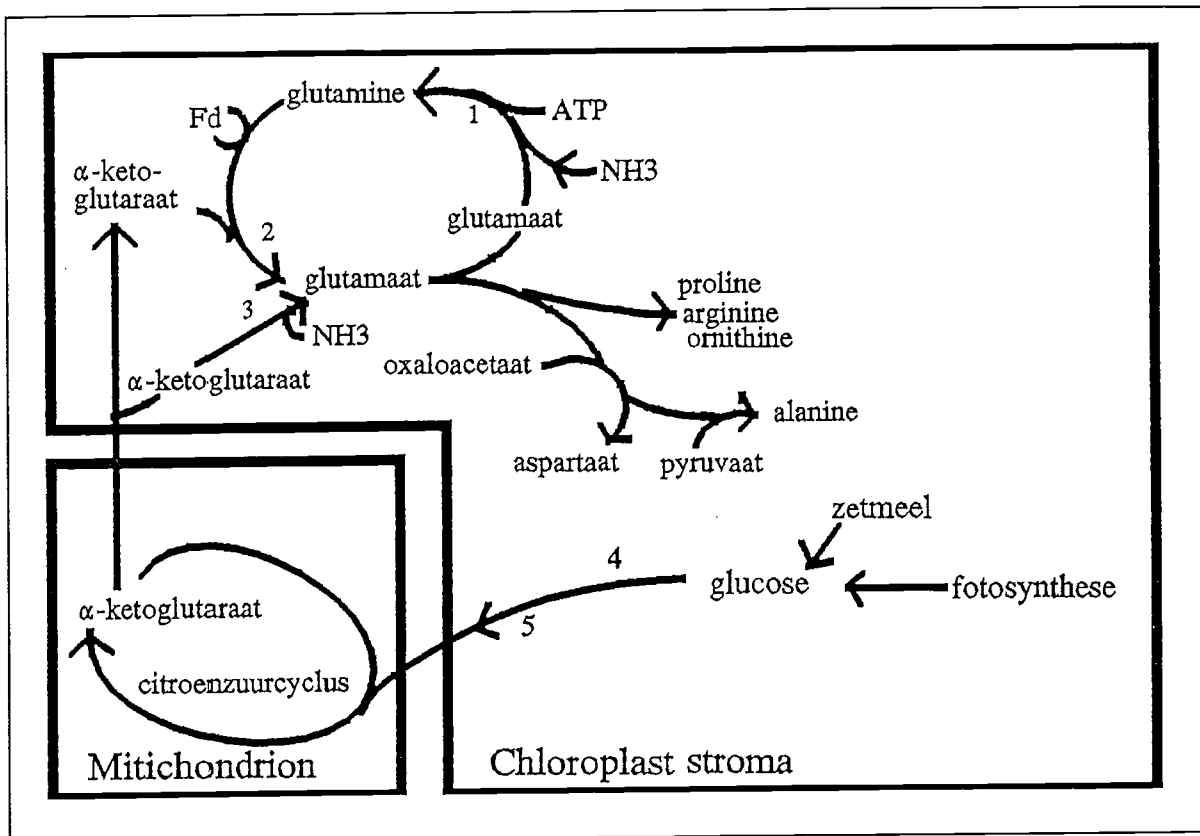
Het NH_3 zelf wordt voornamelijk via droge depositie door de bovengrondse delen van de plant via de stomata opgenomen worden terwijl ook opname van NH_4^+ door het blad kan voorkomen (van der Eerden, 1992).

Voordat NH_3 echter het blad binnenkomt kan het de kristallijne structuur van de epicuticulaire waslaag aantasten zoals door Dueck *et al.* (1991) en van der Eerden (1992) gevonden werd bij grove den. De aanwezigheid van SO_2 heeft een synergistisch effect op dit proces. Dit kan leiden tot beschadiging van de epidermis wat de droogte- en vorstgevoeligheid kan verhogen. Van Hove (1989) vond echter geen aantasting van de cuticula bij de bladeren van acht weken begaste ($65 \mu\text{g m}^{-3}$) populierestekken, ook niet in combinatie met SO_2 ($45 \mu\text{g m}^{-3}$).

De opnamecapaciteit van de bladeren voor NH_3 is groot, wat bleek uit het lineaire verband tussen concentratie en NH_3 opname, zelfs bij hele hoge concentraties. Verder is het transport van NH_3 vanuit de atmosfeer grenzend aan het bladoppervlak afhankelijk van de grenslaagweerstand en de weerstand van de stomata van het blad terwijl er geen interne weerstand bestaat tegen NH_3 transport. Het transport via de cuticula is te verwaarlozen waardoor de NH_3 flux in het blad berekend kan worden uit de weerstand van de grenslaag en stomata voor H_2O en de concentratie NH_3 op het bladoppervlak (van Hove, 1989).

In de bladeren wordt NH_3 ingebouwd in glutamaat via de glutamine/glutamaat cyclus waarbij de enzymen glutamine synthetase (GS) en glutamaat synthase (GOGAT) betrokken zijn. Om deze cyclus draaiende te houden is α -keto-glutaraat nodig afkomstig uit de citroenzuurcyclus. De affiniteit van glutamaat dehydrogenase (GDH) voor NH_3 is dermate laag dat het waarschijnlijk geen rol speelt bij de detoxificatie. Onder invloed van NH_3 wordt de activiteit van de enzymen GS en GOGAT verhoogd terwijl die van GDH niet beïnvloed of verlaagd wordt (Vollbrecht *et al.*, 1989). Ook is een verhoogde activiteit van PEP carboxylase en pyruvaat kinase gevonden onder N-verrijking gevonden wat tot stimulatie van de citroenzuurcyclus en dus een verhoogde synthese van α -keto-glutaraat leidt (Platt *et al.*, 1977; Paul *et al.*, 1978). Deze verhoogde koolstofflux in de richting van α -keto-glutaraat lijkt ten koste te gaan van de synthese van koolwaterstoffen zoals suikers en zetmeel. Het lijkt er dus op dat bij de fotosynthese gefixeerd koolstof in plaats van naar de koolhydraten naar aminozuren wordt gedistribueerd wat de verhoogde concentraties aan aminozuren (arginine, glutamine, glutamaat, aspartaat en proline) zou kunnen verklaren (Platt *et al.*, 1977; Paul *et al.*, 1978; van Dijk & Roelofs, 1988). Deze gewijzigde koolstofflux zou in combinatie met de lage metabolische activiteit in herfst en winter de planten gevoeliger voor vorst kunnen maken. Tevens bestaat de gedachte dat onder de extra N gift de planten later in dormancy gaan wat tot een verlate afharding leidt (Platt *et al.*, 1977; De Temmerman *et al.*, 1988; van Hove, 1989; van der Eerden, 1992). Vele studies hebben reeds aangetoond dat er een positieve niet lineaire relatie bestaat tussen het stikstofgehalte en de CO_2 assimilatiesnelheid in het blad (Evans, 1983; Hirose & Werger, 1987). Ook planten blootgesteld aan verhoogde concentraties aan NH_3 gaven een stimulatie van de maximale fotosynthese (P_{max}) te zien terwijl de 'quantum yield' gelijk bleef (van Hove, 1989; van Hove *et al.*, 1991; Snel *et al.*, 1991; van der Eerden, 1992). Deze stimulatie van de fotosynthese wordt algemeen verklaard door een stijging van RuBisCO- en chlorofylgehalte (van Hove *et al.*, 1989; van der Eerden, 1992). Ook zijn er aanwijzingen dat de stomataire geleidbaarheid door NH_3 wordt verhoogd via een verlaging van de interne CO_2 concentratie waardoor NH_3 zijn eigen opname stimuleert (van Hove, 1989). Dit feit verklaart mogelijk de verlaagde waterpotentiaal en de

verhoogde transpiratie bij planten onder hoge NH_3 concentraties en maakt deze planten gevoeliger voor droogtestress (van der Eerden, 1992).



Figuur 1.3 Detoxificatie- en assimilatie-route van NH_3 in het blad. 1=glutamine synthetase (GS), 2=glutamaat synthase (GOGAT), 3=glutamaat dehydrogenase (GDH), 4=pyruvaat kinase (PK), 5=fosfoenolpyruvaat carboxylase (PEP_c).

Algemeen kan men stellen dat onder invloed van verhoogde NH_3 concentraties in atmosfeer en bodem het totale gehalte aan stikstof in de plant zal stijgen en het van de dosis en blootstellingsduur zal afhangen of NH_3 bemestend dan wel toxisch zal werken. Bij een NH_3 -concentratie op bemestingsniveau zal dit leiden tot een verhoogde biomassa-productie of een opslag van stikstof wat hiervoor niet meer gebruikt wordt (Cowing & Lockyer, 1981; van der Eerden, 1992; Flaig & Mohr, 1992). Bereikt de concentratie het toxische niveau dan zullen groeiremming of zelfs sterfte kunnen optreden. Gelukkig wordt dit niveau in veldsituaties alleen maar bereikt in de directe omgeving van NH_3 -bronnen. Veelal echter zal NH_3 niet toxisch werken maar zal door de beïnvloeding van metabolische en fysiologische processen in de plant de vitaliteit en mycorrhiza-infectie verminderen (Kamminga-van Wijk, 1991) en de gevoeligheid voor stressfactoren als droogte, vorst en insectenplagen doen verhogen (De Temmerman *et al.*, 1988; van Hove, 1989; Dueck *et al.*, 1991; van der Eerden, 1992).

Fysiologisch mechanisme van afharding

Vorsttolerantie is een erfelijke eigenschap van alle winterplanten groeiende in de gematigde klimaatzones welke onder specifieke condities tot expressie komen in de ontwikkeling van bescherming tegen (of herstel van) intra- en extracellulair vorstschade. Naast de verstoring van metabolische en fysiologische processen heeft koude- en vorstschade vooral een verstoring aan membraanstructuren tot gevolg. Vorsttolerantie is

geen permanente eigenschap van planten maar ontwikkeld zich pas onder specifieke condities die afhankelijk zijn van de soort. De genetisch vastgelegde opbouw van vorsttolerantie wordt het proces van afharding genoemd. Het proces van afharding treedt op gedurende blootstelling aan lage temperaturen ($<5^{\circ}\text{C}$). Ook kan bij sommige soorten (met name bomen) de verkorting van de fotoperiode (het korten van de dagen) de koudeacclimatie op gang brengen (Christersson, 1978). Maximale afharding treedt op bij temperaturen onder het vriespunt (Levitt, 1978).

Er worden een vijftal mogelijke mechanismen genoemd die een rol spelen in het afhardingsproces; verlaging van de waterpotentiaal, verhoging van de osmotische waarde, wijziging in membraansamenstelling, hydratatie van macromoleculen en een verlaging van de celturgor. Deze avoidance mechanismen richten zich vooral op het voorkomen van dehydratie van de intracellulaire ruimtes en het verhogen van de fase-transitietemperatuur; de kritische temperatuur waarbij membranen een vaste structuur aannemen (kristaliseren) (Levitt, 1978). Bij het verhogen van de osmotische waarde van de cel speelt de accumulatie van osmotisch actieve stoffen (koolhydraten, vrije aminozuren als proline, alanine, glutamine, glutaraat, glycine, serine) bij veel planten een grote rol terwijl de fase-transitietemperatuur gewijzigd wordt door een verhoging van de concentratie aan onverzadigde vetzuren en sterolen. Over tolerantiemechanismen en de regulatie van koudeacclimatie is nog maar weinig bekend (Salisbury & Ross, 1985).

Effecten van NH_3 op het afhardingsproces

Er zijn aanwijzingen dat de luchtverontreiniging de gevoeligheid van planten voor koude en vorst kan vergroten (Davison, 1988). Zo treedt door de aanwezigheid van vrije radicalen sneller foto-oxidatie op. Ook kunnen luchtverontreinigingscomponenten waterdeficiëntie veroorzaken door stimulatie van het openen van de stomata of reactie met de epicuticulaire waslaag. Bovendien kunnen deze componenten reageren met eiwitten en vetzuren in de membranen wat kan leiden tot een verstoring van de osmoregulatie (Davison, 1988).

Onder N-bemesting werd een verhoogde vorstgevoeligheid bij afgeharde planten gemeten terwijl bij de niet geacclimatiseerde planten geen effect van bemesting gevonden werd (Dueck *et al.*, 1991). Er bestaan een aantal hypothesen over de verhoogde vorstgevoeligheid door verhoogde stikstof concentraties in bodem en lucht. Zo wordt aangenomen dat onder deze condities verlengde groei en dus een verlate dormancy zal optreden of een minder sterke accumulatie aan koolhydraten (zoals voor NH_3 voorgesteld in figuur 1.3) (Davison, 1988; Dueck *et al.*, 1991). Hellergren's hypothese (1981) was dat onder N-bemesting zich grotere cellen met meer vakuoli gaan vormen wat de cel vorstgevoeliger maakt. Ook veronderstelt hij een verhoogde fase-transitietemperatuur van de membraan. Het hier beschreven onderzoek was vooral gericht op het testen van de hypothese dat onder NH_3 depositie de vorstgevoeligheid van planten toeneemt en dat deze gevoeligheids-toename mogelijk (deels) verklaard zou kunnen worden door een verlaagd koolhydraatgehalte bij deze planten.

Hoofdstuk 2

Effecten van droge NH₃ depositie op metabolisme en vorsttolerantie van wintertarwe (*Triticum aestivum* L.) bij een temperatuur van 4°C

Zaailingen van wintertarwe (*Triticum aestivum* L. cv. Urban) werden opgekweekt op hydrocultuur met 1/8 Hoagland voedingsoplossing. 17 dagen oude planten werden overgebracht naar begassingstonnen waar onder condities van korte dag (10h fotoperiode), laag licht (70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en een temperatuur van $4 \pm 1^\circ\text{C}$ de effecten van kortdurende begassing met 375 ppb (285 $\mu\text{g m}^{-3}$) NH₃ op de vorsttolerantie en het metabolisme van wintertarwe ten opzichte van controle lucht bestudeerd werd. Onder gegeven condities was sprake van een viervoudige stijging in het oplosbaar suikergehalte van de spruit binnen een koude-acclimatieduur van drie weken waarbij echter geen effect van NH₃ begassing gevonden werd. De vorsttolerantie steeg in deze periode met bijna 5°C naar een LT₅₀ van -7.8°C. Ook hierin werd geen effect van NH₃ gemeten. Wel was er in de laatste week sprake van een lichte groeistimulatie onder invloed van NH₃. Metingen aan de fotosynthese van het jongste vol-groeide blad gaven een lichte stimulatie van de fotosynthese onder hoge lichtintensiteit te zien bij de NH₃ begaste planten terwijl de quantum yield van CO₂-fixatie en donkerrespiratie niet beïnvloed werden. Er werd geen effect van NH₃ op de RuBisCo-activiteit gemeten. Geconcludeerd werd dat onder gegeven condities begassing van wintertarwe met 375 ppb gedurende 3 weken tot een te geringe stijging van het totaal N-gehalte had geleid om tot echt duidelijk significante effecten op de onderzochte parameters te resulteren. In vervolggexperimenten met wintertarwe zal begast worden onder een hogere temperatuur, lichtintensiteit en eventueel NH₃ concentratie bij de bestudering van de effecten van NH₃ gedurende een korte begassingsperiode.

Sleutelwoorden - Afharding, ammoniak, fotosynthese, luchtverontreiniging, oplosbaar suikergehalte, RuBisCO, *Triticum aestivum*.

Afkortingen: DW=drooggewicht; F_{max}=maximale fotosynthese, FW=versgewicht; LT₅₀=temperatuur waarbij sprake is van 50% electrolytlekkage; R_d=donkerrespiratie, RuBisCO=RibuloseBisfosfaatCarboxylase/Oxygenase; QY=quantum yield.

Inleiding

Er zijn aanwijzingen dat luchtverontreinigingscomponenten als SO₂, H₂S, O₃,

NO₂ en ook NH₃ de koude en vorstgevoeligheid van planten verhogen (Hellergrén, 1981; Davison *et al.*, 1988; Dueck *et al.*, 1991; Stuiver *et al.*, 1992). Van de fysio-

logische mechanismen die hierbij een mogelijke rol spelen is echter nog niet veel bekend. Voor NH_3 en andere N-bronnen betreft, wordt gedacht aan een verlengde groei in de late zomer en vroege herfst. Deze verlate groeistop zou de eerste fase van afharding kunnen beïnvloeden. Ook zou via het mechanisme beschreven in de algemene inleiding (hoofdstuk 1) sprake kunnen zijn van een verminderde ophoping aan oplosbare suikers waarvan aangenomen wordt dat het een rol speelt in de opbouw van vorsttolerantie.

Bij de bestudering van de effecten van droge NH_3 depositie op de vorsttolerantie van planten, werd in eerste instantie gekozen voor wintertarwe (*Triticum aestivum* L.). Het werken met tarwe kent veel experimentele voordelen. Bovendien wordt deze plant veelvuldig gebruikt bij fysiologisch onderzoek. Daarbij komt dat wintertarwe een winterhard landbouwgewas is en dat daarom veel onderzoek aan de opheldering van het afhardingsproces aan deze plant is gedaan. Door de vele publikaties die dit werk heeft opgeleverd is veel bekend geworden over de mechanismen die bij wintertarwe een rol spelen in de vorsttolerantie (Levitt, 1978).

Om de effecten van blootstelling aan NH_3 te versterken werden de zaailingen opgekweekt onder lage nutriëntcondities van 1/8 Hoaglandoplossing.

In dit eerste pilot experiment werden effecten op de fysiologische parameters groei, fotosynthese, RuBisCO-activiteit, oplosbaar suikergehalte en afharding bestudeerd.

Materiaal en methode

Plantmateriaal

Zaden van wintertarwe (*Triticum aestivum* L. cv. Urban) werden gedurende drie dagen tot ontkieming gebracht op nat filterpapier in een warme stoom (23°C). Na drie dagen werden de reeds ontkiemde za-

den overgebracht naar een klimaatkamer met dag en nachttemperaturen van respectievelijk 20°C en 18°C. De relatieve vochtigheid bedroeg 60-70% en de fotoperiode duurde 14h bij een lichtintensiteit van 225 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. De planten werden gekweekt op hydrocultuur (30l containers) met 1/8 Hoaglandoplossing (Bijlage III). De 17 dagen oude zaailingen werden vervolgens overgezet op 11 potten (6 zaailingen per pot) met 1/8 Hoaglandoplossing met een limiterende NO_3^- concentratie van 3 μM (1/10 van de hoeveelheid die normaal wordt opgenomen bij 4°C).

NH_3 begassing onder afhardingscondities

De 17 dagen oude zaailingen werden overgebracht naar de begassingstonnen zoals die beschreven staan in bijlage I. De planten werden gedurende drie weken blootgesteld aan een NH_3 concentratie van 375 ppb (285 $\mu\text{g m}^{-3}$). De dag- en nachttemperatuur bedroeg $4 \pm 1^\circ\text{C}$ terwijl de fotoperiode 10h duurde bij een lichtintensiteit van 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (tussen de 400-700nm). De relatieve vochtigheid in de tonnen bedroeg $55 \pm 5\%$. De potten werden geaereerd en om de drie dagen voorzien van nieuwe voedingsoplossing (1/8 Hoagland). Iedere week werden op vaste tijdstippen van de dag een vast aantal planten geoogst en gebruikt voor bepalingen van de onderzochte parameters.

Groeibepalingen

Een negental planten werd wekelijks geoogst voor bepalingen aan totaal versgewicht en de afzonderlijke versgewichten van spruit en wortel. Deze planten werden vervolgens gedurende 48h gedroogd in een warme stoom bij 80°C waarna vervolgens het drooggewicht bepaald werd.

Oplosbare suiker bepaling

Een vooraf gewogen hoeveelheid vers bladmateriaal ($\pm 250 \text{ mg}$) afkomstig van 5 planten werd fijngemalen in een mortier met kwartsand. De oplosbare suikers

werden geëxtraheerd met 96% ethanol en afgecentrifugeerd gedurende 20 min. met 20000 rpm. Het ontstane pellet werd vervolgens nog twee maal geresuspendeerd en afgedraaid met 20000 rpm. gedurende 10 min. In het supernatant werd de fractie koolhydraten colorimetrisch bepaald met anthronreagens (Fales, 1951).

Vorsttolerantie bepaling

Bladeren werden in 3mm strips gesneden. Tien van deze strips werden overgebracht naar een reageerbuis (1cm doorsnee; 10cm lang). De buizen werden afgesloten met een stop. Om te voorkomen dat de bladeren zouden uitdrogen werden de buizen voorzien van een 0.50 cm² nat filtreerpapierje. De buizen werden in een Julabo F40 ethanol koelwaterbad (Julabo Labor-technik, Seelbach, Duitsland) bij 4°C geplaatst. De bladstukjes werden gedurende 30 minuten bij deze temperatuur gepreincubeerd. Vervolgens werd de temperatuur met 4°C h⁻¹ verlaagd (middels een aangesloten interface-computerprogramma) tot een temperatuur van -20°C. Bij een temperatuur van ca. -1°C werden aan alle buisjes stikstofkristallen toegevoegd zodat geen onderkoeling van water kon optreden. Bij 8 verschillende temperaturen werden monsters (in 5-voud) uit het koelbad gehaald en overnacht, na toevoeging van demiwater, bij 4°C in het donker geplaatst. De monsters werden vervolgens geïncubeerd in een waterbad bij een temperatuur van 30°C. Na 30 minuten werd de geleidbaarheid gemeten met een Höfelt geleidbaarheidmeter. Hierna volgde incubatie bij 100°C gedurende 20 minuten en incubatie bij 30°C (30 min.). Ook hierna werd de geleidbaarheid gemeten.

$$RC (\%) = \frac{C_{100^\circ C} - C_{30^\circ C}}{C_{100^\circ C}}$$

De door vorstschade veroorzaakte lekkage van electrolyten werd uitgedrukt als de relatieve geleidbaarheid en berekend vol-

gens bovenstaande formule. De vorsttolerantie werd uitgedrukt in de LT_{50} die de temperatuur weergeeft waarbij 50% van de electrolyten uit het monster is gelekt.

Fotosynthesemetingen

Fotosynthese (gemeten aan bladreepjes uit het midden van het jongst volgroeide blad als O₂-productie) werd gemeten met een Clark O₂-electrode (LD2; Hansatech, Kings Lynn, Norfolk, UK). Met een waterbad werd de temperatuur op 20°C gehouden. Lichtresponscurven werden gemaakt bij 2% O₂. CO₂ (4.5%) werd voorzien door een 1ml 1M Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer (1:9, v/v), opgebracht op een sponsje in het cuvet. De netto fotosynthese werd gedurende 5 minuten bij 11 verschillende lichtintensiteiten gemeten.

Meting RuBisCO-activiteit

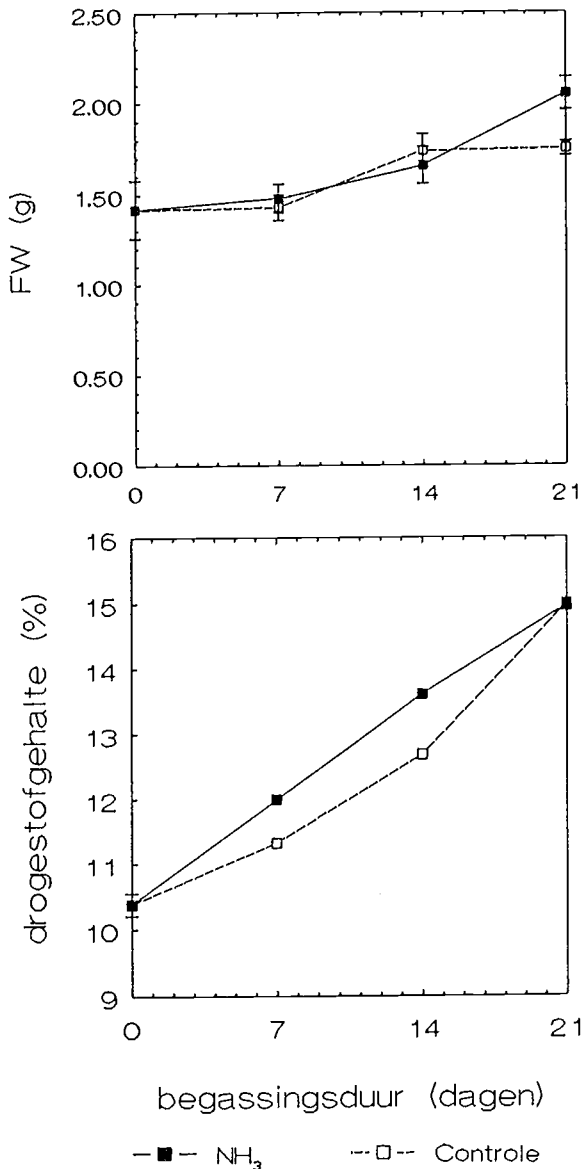
Circa 25 mg vers bladmateriaal werd gehomogeniseerd in een mortier met kwartszand in 10ml extractiemedium bestaande uit: 50mM HEPES-KOH (pH 8.0), 20mM MgCl₂, 25mM KHCO₃, 0.2 mM Na₂EDTA, 5.0mM DiThioThreitol en ± 0.1 g polyclar AT. Het homogenaat werd gedurende 10 minuten afgedraaid bij 20000 rpm. Het supernatant werd verder gebruikt bij de uitvoering van het uiteindelijke enzym assay.

De activiteit van RuBisCO werd spectrofotometrisch bepaald door de continue meting van de 3-PGA-afhankelijke NADH oxidatie in een meervoudig enzymstelsel zoals beschreven door Besford (1984). Het reactie mengsel bevatte: 700µl reactie medium (50mM HEPES-KOH, 20mM MgCl₂, 25mM KHCO₃, 0.2mM Na₂EDTA, 5.0mM DiThioThreitol pH 8.0), 50µl 3.5mM ATP, 10µl 42mM NADH, 50µl 84mM fosfocreatine, 50µl 6 units 3-PGA-fosfokinase, 40µl 4 units glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase, 100µl 10 units creatine fosfokinase en 50µl RuBisCO-monster. De reactie werd gestart door de toevoeging van 100µl 5.76mM Ribulose-5-

fosfaat. De verandering in absorptie bij 340 nm werd gevolgd bij 20°C met een Beckman 34 spectrofotometer.

Statistiek

De *student t test* met $\alpha < 0.05$ werd gebruikt bij de bepaling van de significantie.



Figuur 2.1A,B Effect van NH₃ begassing 375 ppb (285 $\mu\text{g m}^{-3}$) op de groei van *Triticum aestivum* L. bij 4°C, 10h fotoperiode met een lichtintensiteit van 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$: totaal versgewicht (A) en percentage droge stof gehalte (B). De weergegeven waarden geven het gemiddelde van 9 zaailingen (\pm SE).

Resultaten

Groei

Na drie weken van blootstelling aan 375 ppb (285 $\mu\text{g m}^{-3}$) NH₃ onder afhardingscondities (4°C, 10h fotoperiode, 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) steeg het totale versgewicht van 1.42 naar 2.05 g terwijl de controle zaailingen een eindgewicht hadden van 1.75 g. Er werd na drie weken een significante groeistimulatie bij de NH₃ begaste planten gemeten ($0.005 < \alpha < 0.01$) (fig. 2.1A). Het drogestofgehalte steeg met bijna 5% gedurende 21 dagen blootstelling aan lage temperatuur (fig. 2.1B). Hier werd na twee weken begassing met NH₃ een duidelijk significant hoger drogestofgehalte ($\alpha < 0.005$). Ook de waarden van het totaal drooggewicht en versgewicht van de spruit lagen bij de planten na drie weken begast met NH₃ significant hoger dan de controle waarden ($0.005 < \alpha < 0.01$) terwijl geen effect ten aanzien van de spruit/wortel verhouding werd gevonden (tab. 2.1).

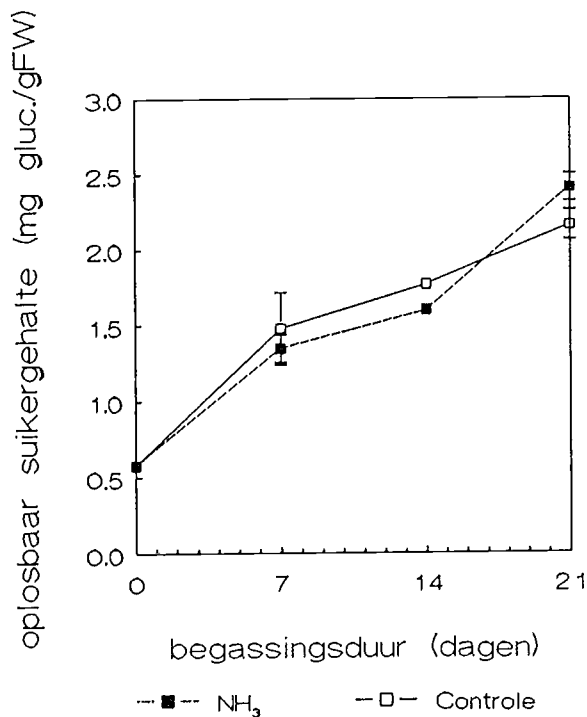
Tabel 2.1 Effect van NH₃ begassing 375 ppb (285 $\mu\text{g m}^{-3}$) op enkele groeiparameters van *Triticum aestivum* L. (FW_{spruit}, DW_{totaal} en spruit/wortel verhouding) bij 4°C, 10h fotoperiode met een lichtintensiteit van 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. De weergegeven waarden presenteren het gemiddelde van 9 zaailingen (\pm SE).

| | NH ₃ | Controle |
|----------------------|-----------------|-----------------|
| FW _{spruit} | 1.45 \pm 0.05 | 1.23 \pm 0.05 |
| DW _{totaal} | 0.31 \pm 0.01 | 0.26 \pm 0.01 |
| S/W | 2.50 \pm 0.13 | 2.41 \pm 0.09 |

Oplosbaar suikergehalte

De concentratie aan oplosbare suikers in de spruit van winterarwe gedurende 3 weken van koudeacclimatie steeg vanaf een initiële waarde van 0.58 tot 2.16 mg glucose g⁻¹FW.

Deze verviervoudiging in oplosbaar suikergehalte werd ook door de NH₃ begaste planten gehaald (fig. 2.2). Op geen enkel tijdstip verschilden de gehalten significant van elkaar.



Figuur 2.2 Oplosbaar suikergehalte (mg glucose per gram versgewicht) in de spruit van *Triticum aestivum* L. gedurende begassing met NH₃ 375 ppb (285 µg m⁻³) bij 4°C, 10h fotoperiode en een lichtintensiteit van 70 µmol m⁻² s⁻¹. Weergegeven zijn de gemiddelde waarden van twee metingen (±SE).

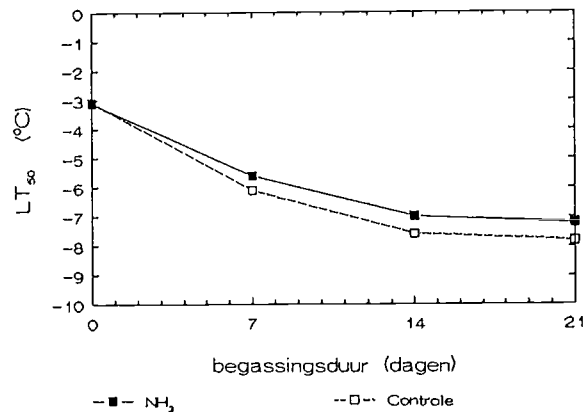
Vorsttolerantie

De ontwikkeling van vorsttolerantie bij wintertarwe onder gegeven condities be-

Tabel 2.2 Waarden voor de netto fotosynthese bij 1120 µmol m⁻² s⁻¹ (P_{max}) en quantum yield (QY, µmol O₂ m⁻² s⁻¹/µmol m⁻² s⁻¹) en de gemeten donkerrespiratie (R_d) na 13 en 26 dagen begassing met 375 ppb (285 µg m⁻³) NH₃ aan het jongst volgroeide blad van *Triticum aestivum* L. ±SE (n=2).

| 13 dagen | | |
|--|-----------------|--------------|
| | NH ₃ | Controle |
| P _{max} (µmol O ₂ m ⁻² s ⁻¹) | 29.06 ± 0.52 | 26.08 ± 0.91 |
| QY | 0.083 | 0.076 |
| R _d (µmol O ₂ m ⁻² s ⁻¹) | 1.01 ± 0.52 | 1.93 ± 0.27 |
| 26 dagen | | |
| P _{max} (µmol O ₂ m ⁻² s ⁻¹) | 27.92 ± 0.88 | 22.31 ± 0.41 |
| QY | 0.082 | 0.090 |
| R _d (µmol O ₂ m ⁻² s ⁻¹) | 2.38 ± 0.09 | 3.11 ± 0.31 |

reikte een LT₅₀ van -7.8°C in een koude acclimatieperiode van 21 dagen. De aan NH₃ blootgestelde planten vertoonden een nagenoeg gelijke afharding. Na 21 dagen koudeacclimatie werd bij deze planten een LT₅₀ van -7.2°C bereikt (fig. 2.3).



Figuur 2.3 Effect van NH₃ begassing 375 ppb (285 µg m⁻³) bij 4°C, 10h fotoperiode en een lichtintensiteit van 70 µmol m⁻² s⁻¹ op de vorsttolerantie van de spruit van *Triticum aestivum* L. De vorsttolerantie is uitgedrukt als LT₅₀ (°C).

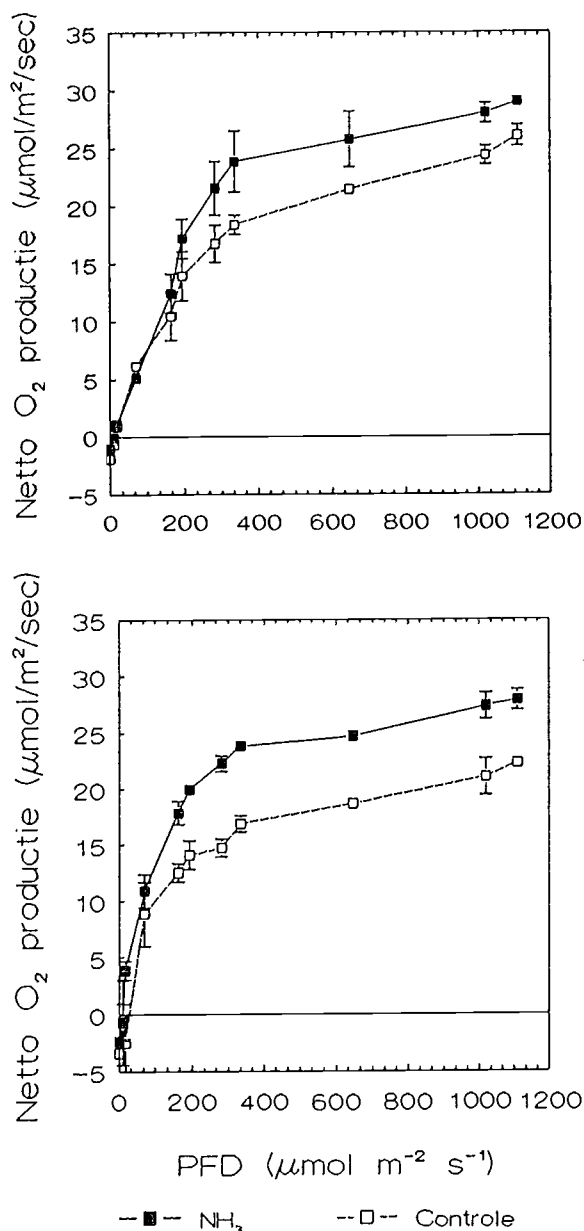
Fotosynthese

Uit de twee lichtresponscurves bleek een stimulerend effect van NH₃ op de netto fotosynthese onder hoge lichtintensiteiten. De gemeten waarden verschilden echter niet significant van elkaar.

Er werd geen significant effect op de quantum yield en donkerrespiratie werd gemeten (tab. 2.2). Het niveau van lichtverzadiging werd bij een lichtintensiteit van 1120 µmol m⁻² s⁻¹ voor wintertarwe bij 20°C nog niet bereikt (fig. 2.4A,B).

RuBisCO-activiteit

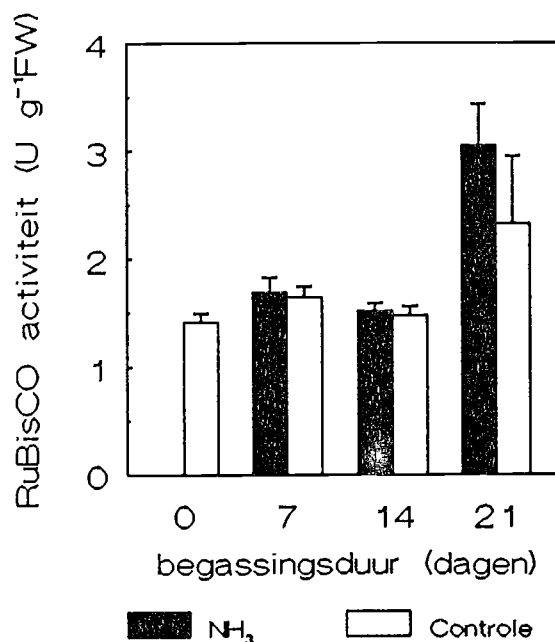
De RuBisCO activiteit, hier relatief uitgedrukt in units NADH afname per gram versgewicht, liet een nagenoeg stabiel patroon zien gedurende het experiment. De resultaten gaven geen effect van NH₃ te zien op de RuBisCO-activiteit. De waarden op dag 21 verschilden niet significant (fig. 2.5).



Figuur 2.4A,B Lichtresponscurve van het jongst volgroeide blad van *Triticum aestivum* L. bij 20°C na 21 dagen te zijn begast met 375 ppb ($285 \mu\text{g m}^{-3}$) NH_3 of met controle lucht. Weergegeven zijn de gemiddelde waarden van 2 metingen ($\pm\text{SE}$).

Discussie

Droge depositie van NH_3 kan wanneer de concentratie hoger is dan $4 \mu\text{g m}^{-3}$ bijdragen in de N-voorziening van planten (Lockyer & Whitehead, 1986). Mede hierdoor kan NH_3 de groei stimuleren zoals gevonden werd bij *Lolium perenne* L. begast bij concentraties van 148 en 550



Figuur 2.5 Effect van 375 ppb ($285 \mu\text{g m}^{-3}$) NH_3 op de activiteit van RuBisCO in het vlagblad van *Triticum aestivum* L. De activiteit is uitgedrukt in units NADH afname per minuut. De weergegeven waarden geven het gemiddelde weer van 4 metingen ($\pm\text{SE}$).

$\mu\text{g m}^{-3}$ (Cowling & Lockyer, 1981). In dit experiment werd gedurende een begassingsperiode van drie weken onder afdardingscondities (4°C , 10h fotoperiode met een lichtintensiteit van $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) met een NH_3 concentratie van $305 \mu\text{g m}^{-3}$ slechts een zeer geringe groeistimulatie gevonden (fig. 2.1A; tab. 2.1). Tevens had NH_3 alleen gedurende de eerste twee weken een gering positief effect op het drogestofgehalte (fig. 2.1B). Verwacht zou mogen worden dat een extra N-gift in de vorm van NH_3 bij planten groeiend onder N-deficiëntie tot een hoger percentage in drogestofgehalte zou leiden via een stimulatie van de biosynthese (Lockyer & Whitehead, 1986). Deze geringe effecten zouden mogelijk verklaard kunnen worden door de geringe groei bij lage temperatuur en sluiting van de stomata (waardoor minder NH_3 wordt opgenomen) onder condities van koude-acclimatie. Ook werd geen effect van NH_3 op de accumulatie van oplosbare suikers (fig. 2.2) en de opbouw van vorsttolerantie (fig. 2.3) gemeten. Toch blijkt uit enkele publicaties

dat de gevoeligheid van planten voor NH_3 juist bij lage temperatuur toeneemt door een geringer aanbod van koolhydraten waarmee NH_3 gedetoxificeerd kan worden tot aminozuren (van der Eerden, 1982; Davison, 1988; Dueck *et al.*, 1991).

De lichte stimulatie van fotosynthese (*fig.* 2.4A,B; *tab.* 2.2) onder hoge lichtintensiteiten (gemeten bij 20°C) zou verklaard kunnen worden uit het feit dat onder NH_3 begassing het chlorofylgehalte toeneemt of door een stimulatie van de RuBisCO-activiteit (Evans, 1983; Snel *et al.*, 1991; van der Eerden, 1992). Ook zou verlaging van de stomataire weerstand onder invloed van NH_3 , zoals gemeten werd door van Hove (1989), tot een stimulatie van de fotosynthese kunnen leiden. Een stijging in fotosynthesesnelheid met stijgend N-gehalte (en aantal PSII-eenheden) is een algemeen gevonden fenomeen (Evans, 1983; Snel *et al.*, 1991). NH_3 had geen effect op de donkerrespiratie en QY van CO_2 -fixatie (*tab.* 2.2). Deze resultaten werden ook gevonden door van Hove *et al.* (1991) in een soortgelijk experiment met *Populus euramericana* L. Ook van der Eerden (1992) vond geen effect van NH_3 op de QY bij *Pinus sylvestris* L. maar meette wel een stimulatie van de donkerrespiratie. Naast de positieve correlatie tussen fotosynthese en N-gehalte in bladeren bestaat een soortgelijke correlatie voor de RuBisCO-activiteit (Evans, 1983). Dat in dit experiment bij 4°C geen duidelijke stimulatie van RuBisCO-activiteit onder invloed van NH_3 begassing werd gevonden (*fig.* 2.5) kan verklaard worden uit het feit dat bij deze lage temperatuur geen eiwitsynthese plaatsvindt. De gemeten stimulatie in fotosynthese kan gezien deze resultaten niet verklaard worden door stimulatie van de RuBisCO-activiteit.

Wellicht moet worden afgeleid dat begassing met NH_3 zoals in dit experiment uitgevoerd in drie weken tijd een te gering effect heeft op het N-gehalte om echt significante effecten te kunnen vinden op

de onderzochte parameters. Om toch mogelijke effecten van NH_3 te kunnen bestuderen zal daarom in volgende experimenten bij hogere temperatuur, hogere lichtintensiteit, en hogere NH_3 concentraties gemeten worden.

Hoofdstuk 3

Effecten van droge NH₃ depositie op wintertarwe (*Triticum aestivum* L.) bij een temperatuur van 20°C

Zeventien dagen oude zaailingen van wintertarwe (*Triticum aestivum* L. cv. Urban) werden gedurende drie weken begast met 375 ppb (285 µg m⁻³) NH₃ of controle lucht bij een temperatuur van 20°C, 14h fotoperiode en een lichtintensiteit van 180 µmol m⁻² s⁻¹. De planten werden gekweekt op hydrocultuur onder N-limitatie (10µM NO₃⁻; 1/10 van normale opname bij 20°C).

Een begassingsduur van drie weken resulteerde in een kleine groeistimulatie onder invloed van NH₃. Het percentage drooggewicht lag alleen gedurende de eerste twee weken van het experiment hoger bij de aan NH₃ blootgestelde planten. Afharding van planten gedurende 7 en 14 dagen onder een temperatuur van 4±1°C en lage lichtintensiteit (70 µmol m⁻² s⁻¹) na een begassingsduur van 7 en 21 dagen leverde geen verschillen op in gehalten aan oplosbare suikers in de spruit. Na een begassingsduur van 7 dagen en een periode van 7 dagen koude-acclimatie werd een verminderde vorsttolerantie gemeten van 1.3°C bij NH₃ begaste planten. Bij overige metingen van de vorsttolerantie werden geen verschillen gemeten. De netto fotosynthese onder hoge lichtintensiteiten werd gestimuleerd onder invloed van NH₃. Het punt waarop het jongst volgroeide blad van wintertarwe lichtverzadigd raakt, leek verhoogd te worden bij de aan NH₃ blootgestelde planten. Er werd geen effect van NH₃ gevonden op de donkerrespiratie en quantum yield voor CO₂ fixatie. De eerste twee weken werd in de planten blootgesteld aan NH₃ een verhoogde RuBisCO-activiteit gevonden. Wel werd na een begassingsduur van 3 weken een sterkere afname in de RuBisCO-activiteit gemeten in de NH₃ begaste planten wat mogelijk duidde op een versnelde veroudering onder invloed van NH₃. Uit de resultaten verkregen in de eertse twee experimenten blijkt dat wintertarwe tamelijk ongevoelig is voor een korte blootstellingsduur aan 'middelhoge NH₃ concentraties'. Bij het gebruik van wintertarwe in de studie naar effecten van NH₃ in kortdurende begassingsexperimenten zullen dus hogere concentraties NH₃ gebruikt moeten worden.

Sleutelwoorden - Afharding, ammoniak, fotosynthese, oplosbaar suikergehalte, RuBisCO-activiteit, *Triticum aestivum* L., vorsttolerantie.

Afkortingen: DW=drooggewicht; FW=versgewicht; LT₅₀=temperatuur waarbij sprake is van 50% electrolytlekkage; RuBisCO=Ribulose Bisfosfaat Carboxylase Oxygenase;

Inleiding

Uit de resultaten verkregen in hoofdstuk 2 werd geconcludeerd dat een begassingsduur van drie weken onder gegeven con-

dities (4°C, 10h fotoperiode met een lichtintensiteit van 70 µmol m⁻² s⁻¹) tot een te geringe toename van het totaal N-gehalte had geleid om significante effecten aan de onderzochte parameters te creëren. Er

werd in dit experiment onderzocht wat het effect was van NH_3 begassing gedurende het afhardingsproces.

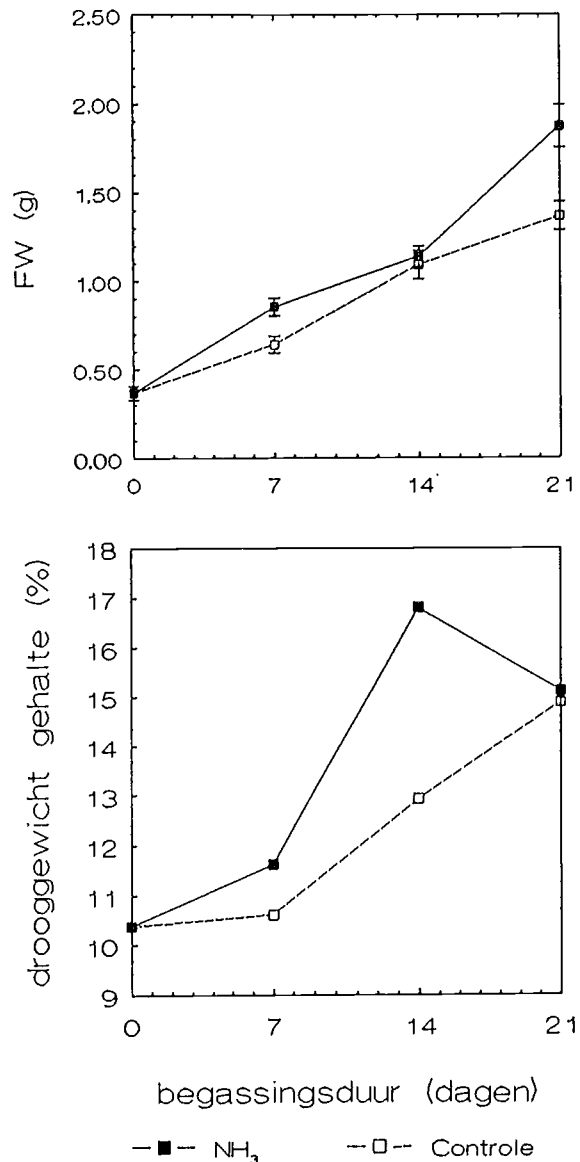
In dit experiment werd de periode van koude-acclimatie voorafgegaan door NH_3 begassing waarmee de mogelijkheid van een verlate afharding door verhoogde N-concentratie in de plant onderzocht werd. Na een begassingsduur van 1 en 3 weken met 375 ppb ($285 \mu\text{g m}^{-3}$) bij 20°C , 14h fotoperiode en een lichtintensiteit van $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, werden planten overgezet naar een klimaatkamer onder afhardingscondities.

Van de bij 20°C begaste planten werden groei, fotosynthese en RuBisCO-activiteit wekelijks gemeten. Aan de afgeharde planten werd het gehalte aan oplosbare suikers en vorsttolerantie gemeten. Om het effect droge NH_3 depositie mogelijk te versterken werden de planten opgekweekt onder N-limitatie door het NO_3^- concentratie in de voedingsoplossing te reduceren tot 1/10 van de normale NO_3^- opname bij 20°C .

Materiaal en methode

Plantmateriaal

Zaden van wintertarwe (*Triticum aestivum* L. cv. Urban) werden in drie dagen tot ontkieming gebracht op een vochtig filterpapier in een warme stoof (23°C). De zaailingen werden opgekweekt in een klimaatkamer met dag- en nachttemperaturen van respectievelijk 20°C en 18°C . De relatieve vochtigheid bedroeg 60-70% en de fotoperiode duurde 14h bij een lichtintensiteit van $225 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. De planten werden gekweekt op hydrocultuur (30l cotainers) met 1/8 Hoaglandoplossing waarin de NO_3^- concentratie 1/10 van de normale NO_3^- opname bedroeg. De 17 dagen oude zaailingen werden vervolgens overgezet op 11 potten (4 zaailingen per pot) met 1/8 Hoaglandoplossing met een limiterende NO_3^- concentratie van $10 \mu\text{M}$



Figuur 3.1A,B Effect van NH_3 begassing 375 ppb ($285 \mu\text{g m}^{-3}$) op de groei van *Triticum aestivum* L. bij 20°C , 14h fotoperiode en lichtintensiteit van $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; totaal versgewicht (A) en percentage droge stof gehalte (B). De weergegeven waarden geven het gemiddelde van 9 zaailingen (\pm SE).

(1/10 van de hoeveelheid NO_3^- die normaal wordt opgenomen bij 20°C).

NH_3 begassing

De potten met 17 dagen oude zaailingen werden overgebracht naar de begassings-tonnen zoals die beschreven staan in bijlage I. Hierin werden ze gedurende drie weken blootgesteld aan een NH_3 concentratie van 375 ppb ($285 \mu\text{g m}^{-3}$), een dagen nachttemperatuur van respectievelijk $20 \pm 1 / 18 \pm 1^\circ\text{C}$ en een relatieve vochtig-

heid van 55±5%. De lichtintensiteit bedroeg 180 μmol m⁻² s⁻¹ met een fotoperiode van 14h. De potten werden geaëreerd en om de drie dagen voorzien van nieuwe voedingsoplossing.

Iedere week werden op vaste tijdstippen planten geoogst en gebruikt voor bepalingen aan de onderzochte parameters.

Groeibepalingen

Een negental planten werd wekelijks geoogst voor bepalingen aan totaal versgewicht en de afzonderlijke versgewichten van spruit en wortel. Deze planten werden vervolgens gedurende 48h gedroogd in een warme stoof bij 80°C waarna vervolgens het drooggewicht werd bepaald.

Afhardingsprocedure

Na een begassingsperiode van 1 en 3 weken werden potten met zaailingen gedurende een periode van 7 en 14 dagen afgehard in een klimaatkamer met een temperatuur van 4±1°C (dag en nacht). De fotoperiode duurde 10 uur bij een lichtintensiteit van 70 μmol m⁻² s⁻¹. In de kamer heerste een relatieve vochtigheid van 60-70%.

Oplosbaar suikergehalte

Deze bepaling werd uitgevoerd aan vers bladmateriaal van planten die 7 en 21 dagen waren begast en vervolgens gedurende 7 en 14 dagen werden afgehard. De methode staat beschreven in hoofdstuk 2, pagina 11.

Fotosynthese

De fotosynthese werd bepaald na een begassingsduur van 21 dagen zoals beschreven staat in hoofdstuk 2, pagina 11.

RuBisCO activiteit

Deze bepaling werd wekelijks gedurende de begassingsduur van 21 dagen uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 2, pagina 11.

Statistiek

De *student t test* met $\alpha < 0.05$ werd gebruikt bij de bepaling van de significantie.

Resultaten

Groei

Onder de opgelegde groeiomstandigheden (20°C, 14h fotoperiode met een lichtintensiteit van 180 μmol m⁻² s⁻¹) nam het versgewicht in drie weken tijd toe van 0.37 naar 1.36 g. Er werd na 1 (0.01 < α < 0.025) en 3 weken ($\alpha < 0.005$) een significant hoger versgewicht gevonden van de NH₃ begaste planten die na drie weken begassingsduur een gemiddeld gewicht hadden van 1.87 g (*fig. 3.1A*). Het drogestofgehalte steeg bij beide behandelingen van 10.4 naar 15%. Na 1 ($\alpha < 0.005$) en 2 weken (0.025 < α < 0.05) werd een significant hoger drogestofgehalte gevonden bij de NH₃ begaste plant. Een week later was dit verschil geheel verdwenen (*fig. 3.1B*).

Tabel 3.1 Effect van 21 dagen NH₃ begassing 375 ppb (285 μg m⁻³) op enkele groeiparameters van *Triticum aestivum* L. (FW_{spruit}, DW_{wortel} en Spruit-Wortel verhouding) bij 20°C, 14h fotoperiode en lichtintensiteit van 180 μmol m⁻² s⁻¹. De weergegeven waarden presenteren de gemiddelde waarden van 9 zaailingen (± SE).

| | NH ₃ | Controle |
|--------------------------|-----------------|-------------|
| FW _{spruit} (g) | 0.93 ± 0.05 | 0.73 ± 0.04 |
| DW _{wortel} (g) | 0.28 ± 0.02 | 0.20 ± 0.01 |
| s/w | 1.04 ± 0.08 | 1.17 ± 0.07 |

Ook het totaal droog- (0.005 < α < 0.01) en versgewicht van de spruit (0.005 < α < 0.01) gaven na een begassingsduur van 21 dagen een significante toename door droge NH₃-depositie op wintertarwe te zien. Dit gold niet voor de spruit-wortel verhouding (*tab. 3.1*).

Vorsttolerantie en oplosbaar suikergehalte

De gemeten gehalten aan oplosbare suikers namen tijdens het afhardingsproces

Tabel 3.2 Effect van 7 en 21 dagen NH₃ begassing 375 ppb (285 µg m⁻³) bij 20°C, 14h fotoperiode en een lichtintensiteit van 180 µmol m⁻² s⁻¹ op oplosbaar suikergehalte en vorsttolerantie (LT₅₀) in de spruit van *Triticum aestivum* L. voor of na koude-acclimatie bij 4°C en 70 µmol m⁻² s⁻¹. In de linker kolom staat de begassingsduur (dagen) weergegeven met in de kolom daarnaast de afhardingsduur (dagen). Het gehalte aan oplosbare suikers (kolom 3 en 5) staat vermeld in mg glucose g⁻¹FW ±SE (n=2) met daarnaast (kolom 4 en 6) de LT₅₀ (°C) (n=8).

| aantal dagen | | NH ₃ | | Controle | |
|--------------|-----|---------------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 20°C | 4°C | glucose (mg g ⁻¹ FW) | LT ₅₀ (°C) | glucose (mg g ⁻¹ FW) | LT ₅₀ (°C) |
| 0 | - | 0.56 ± 0.07 | - | 0.56 ± 0.07 | - |
| 7 | - | 0.68 ± 0.09 | - | 0.48 ± 0.01 | - |
| 7 | 7 | 1.26 ± 0.11 | -4.2 | 0.97 ± 0.03 | -5.5 |
| 7 | 14 | 1.59 ± 0.06 | -8.5 | 2.05 ± 0.14 | -8.5 |
| 21 | 7 | 1.69 ± 0.12 | -10.0 | 1.3 ± 0.13 | -10.0 |

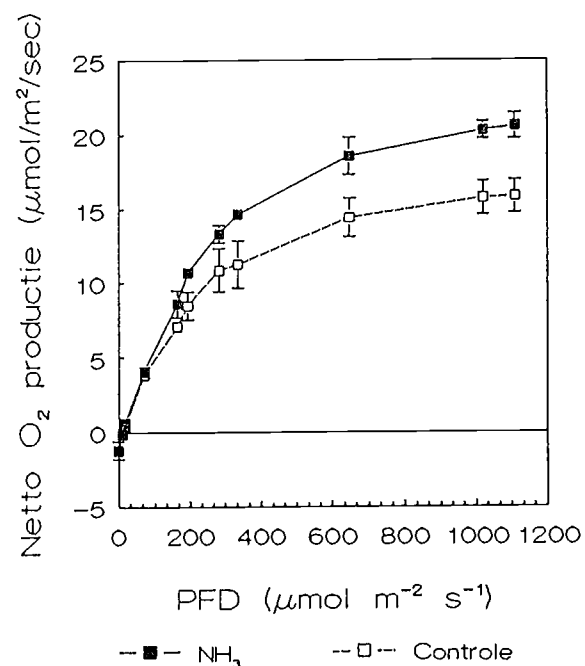
sterk toe van concentraties rond de 0.56 naar een waarde van 1.26 na 7 dagen en waarden rond de 1.59 mg glucose gFW⁻¹ na 14 dagen koude-acclimatie. Geen correlatie kon worden gevonden tussen NH₃ begassing en een verlaagd suikergehalte, behalve bij de meting na een koude-acclimatie van 14 dagen. Bij deze acclimatieperiode en een begassingsduur van 7 dagen bleef het gehalte aan oplosbare suikers achter bij die van de controle behandeling. Het verschil was echter niet significant. Bij alle andere metingen lag het suikergehalte in de NH₃ begaste planten (niet significant) hoger (tab. 3.2).

Aan de NH₃ begaste planten werd geen verhoogde vorstgevoeligheid gemeten, behalve na een begassingsduur van slechts 7 dagen, gevolgd door 7 dagen koude-acclimatie (tab. 3.2).

Fotosynthese

Figuur 3.2 geeft de lichtresponscurves van de netto O₂-productie van het jongst volgroeide blad van wintertarwe na een begassingsperiode van 21 dagen weer. De maximale fotosynthese onder lichtverzadiging werd niet bereikt. Naast stimulatie van de fotosynthese onder hoge lichtintensiteiten lijkt dat onder NH₃ begassing wintertarwe minder snel lichtverzadigd raakt. De verschillen in netto fotosynthese zoals onder de zeer hoge lichtintensiteiten gevonden waren niet significant (fig. 3.2).

Er werd geen effect gevonden op de donkerrespiratie en quantum yield terwijl een stimulatie van 23% in netto fotosynthese bij een lichtintensiteit van 1100 µmol m⁻² s⁻¹ gemeten werd (tab. 3.3).



Figuur 3.2 Lichtresponscurve van het vlagblad van *Triticum aestivum* L. na 21 dagen te zijn begast met 375 ppb (285 µg m⁻³) NH₃, of met controle lucht bij 20°C, 14h fotoperiode en een lichtintensiteit van 180 µmol m⁻² s⁻¹. Weergegeven zijn de gemiddelde waarden van 2 metingen (±SE).

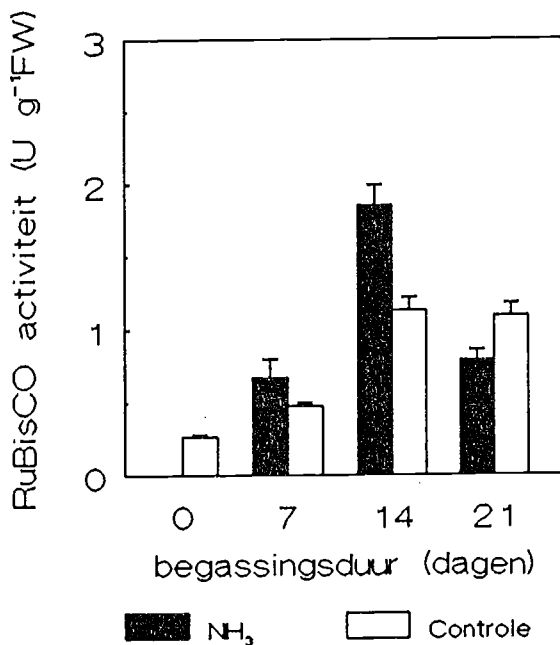
RuBisCO-activiteit

Na 14 dagen werd bij de NH₃ bagaste planten een significante stimulatie van 39% in RuBisCO-activiteit gemeten.

Tabel 3.3 Netto fotosynthesesnelheid bij 1120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (P_{max} , $\mu\text{mol O}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), quantum yield (QY, $\mu\text{mol O}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en donkerrespiratie (R_d , $\mu\text{mol O}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na 21 dagen begassing met 285 $\mu\text{g m}^{-3}$ NH₃ van het vlagblad van *Triticum aestivum* L. bij 20°C, 14h fotoperiode en een lichtintensiteit van 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

| | NH ₃ | Controle |
|------------------|-----------------|--------------|
| P_{max} | 20.57 ± 0.86 | 15.85 ± 1.12 |
| QY | 0.076 | 0.072 |
| R_d | 1.26 ± 0.32 | 1.21 ± 0.57 |

Ook bij de controle planten werd een stijging van de RuBisCO-activiteit gedurende de eerste 14 dagen gemeten. Na 21 dagen werd een veel lagere activiteit gevonden (0.79 U mg⁻¹FW) dan bij de controle planten (1.09 U mg⁻¹FW) na 21 dagen (fig. 3.3).



Figuur 3.3 Effect van NH₃ begassing 375 ppb (285 $\mu\text{g m}^{-3}$) bij 20°C, 14h fotoperiode met een lichtintensiteit van 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ op de activiteit van RuBisCO in het jongst volgroeide blad van *Triticum aestivum* L. De activiteit is uitgedrukt in units NADH afname per minuut. De weergegeven waarden geven het gemiddelde weer van 4 metingen (\pm SE).

Discussie

Net als in hoofdstuk 2 werd ook bij een temperatuur van 20°C, een fotoperiode van 14h en lichtintensiteit van 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, een zeer gering effect van NH₃ op de groei gemeten (fig. 3.1A, tab. 3.1). Ook in dit experiment hadden de NH₃ begaste planten de eerste twee weken een hoger drogestofgehalte (fig. 3.1B) en was in de derde week sprake van een significant verschil in versgewicht (fig. 3.1A). De accumulatie van suikers onder afhardingscondities werd niet beïnvloed door NH₃ terwijl geen blijvende verhoogde vorstgevoeligheid bij de NH₃ begaste planten kon worden aangetoond (tab. 3.2). Ook resultaten van metingen aan fotosynthese waren overeenkomstig met die van hoofdstuk 2: NH₃ verhoogde de P_{max} terwijl de planten bij een hogere lichtintensiteit pas lichtverzadigd raakten (fig. 3.2, tab. 3.3). Wel werd in dit experiment gedurende twee weken NH₃ begassing een lichte, niet significante stimulatie van de RuBisCO-activiteit gemeten (fig. 3.3). De sterk verlaagde activiteit na 3 weken kan mogelijk verklaard worden door het optreden van veroudering. Mogelijkerwijs leidt NH₃ depositie tot een versnelde veroudering van bladeren.

Uit deze opsomming van resultaten blijkt maar een zeer gering effect van droge depositie van een toch vrij hoge NH₃ concentratie. Van der Eerden (1982) onderzocht de NH₃ gevoeligheid van verschillende plantensoorten waaruit bleek dat de gevoeligheid afhankelijk was van verschillende milieuomstandigheden, periode van blootstelling alswel de genetische eigenschappen van de soort. Begassingsexperimenten met Engels (*Lolium perenne* L.) en Italiaans raaigras (*Lolium multiflorum* L.) lieten bij concentraties van 130 en 500 $\mu\text{g m}^{-3}$ en een begassingsduur van 26 tot 40 dagen onder verschillende N-gehaltes van de bodem (bij 20°C en 16h foto-

periode) duidelijke stimulerende effecten zien op percentage drooggewicht en totaal N-gehalte (Cowling & Lockyer, 1981; Lockyer & Whitehead, 1986). Hieruit zou wellicht verwacht mogen worden dat ook bij wintertarwe effecten van NH₃ gemeten zouden kunnen worden. Of wintertarwe wel gevoelig is voor NH₃ begassing zou getest kunnen worden in een experiment bij een hoge concentratie aan NH₃.

Bij metingen aan fotosynthese werd een verhoogde netto fotosynthese onder invloed van NH₃ bij hoge lichtintensiteiten gemeten. Door in het volgende experiment een hogere lichtintensiteit te gebruiken dan in voorgaande experimenten zouden daarom wellicht grotere groeiverschillen ontstaan tussen planten begast met NH₃ en de controle planten. Een daarop volgende koude acclimatieperiode kan mogelijk leiden tot een duidelijk meetbaar verschil in oplosbaar suikergehalte en vorstgevoeligheid bij de NH₃ begaste planten.

Hoofdstuk 4

Effecten van droge NH₃ depositie op metabolisme en vorsttolerantie van wintertarwe (*Triticum aestivum* L.) bij een temperatuur van 18.5°C en 4°C

Elf dagen oude zaailingen van wintertarwe (*Triticum aestivum* L. cv. Urban), opgegroeid op potgrond werden gedurende 14 dagen begast met 1000 ppb (776 µg m⁻³) NH₃ of met controle lucht bij een temperatuur van 18.5°C, 12h fotoperiode met een lichtintensiteit van 450 µmol m⁻² s⁻¹. Na deze periode werd in de begassingstonnen de temperatuur verlaagd naar 4°C, de fotoperiode verkort naar 8h en de lichtintensiteit verminderd tot 70 µmol m⁻² s⁻¹. De planten werden gedurende dit experiment gevoed met demiwater.

NH₃ gaf een lichte groeistimulatie terwijl in deze planten het drogestofgehalte ten opzichte van de controle planten gelijk bleef.

Gedurende de koude-acclimatie van 22 dagen was er in de spruit van controle planten sprake van een verdubbeling van het oplosbaar suikergehalte die in twee dagen bereikt werd. In de spruit van de met NH₃ begaste planten werd gedurende de afharding nauwelijks een accumulatie van oplosbare suikers gemeten. Metingen aan de vorsttolerantie met behulp van chlorofylfluorescentie gaven geen verhoogde vorstgevoeligheid bij NH₃ bagaste planten te zien.

Het totaal N-gehalte van het jongste volgroeide blad was in planten blootgesteld aan NH₃ hoger dan in de controle planten. Gedurende de koude behandeling stabiliseerde zich het verschil in N-gehaltenes terwijl het gehalte aan wateroplosbare niet-eiwit-sulphydryl verbindingen sterk toenam. Er werd geen effect gemeten van NH₃ op de accumulatie van sulphydryl verbindingen.

Sleutelwoorden - Afharding, ammoniak, oplosbaar suikergehalte, sulphydryl verbindingen, totaal N-gehalte, *Triticum aestivum*, vorsttolerantie.

Afkortingen: DW=drooggewicht; FW=versgewicht; LT₅₀=temperatuur waarbij 50% electrolytlekkage optreedt; RuBisCO=RibuloseBisfosfaatCarboxylase\Oxygenase.

Inleiding

Uit de experimenten zoals beschreven in de hoofdstukken 2 en 3 kan worden afgeleid dat wintertarwe gedurende een blootstellingsduur van 21 dagen aan een NH₃ concentratie van 375 ppb (285 µg m⁻³) bij 4° en 20°C geen effect op suikeraccumu-

latie en vorsttolerantie gevonden. Wel werd een stimulatie in fotosynthese gemeten terwijl bij 20°C ook de RuBisCO-activiteit werd gestimuleerd.

Bij experimenten met plantensoorten afkomstig uit de grassenfamilie onder soortgelijke condities bij hogere NH₃ concentraties (660 ppb; 500 µg m⁻³) en lange-

re expositietijd ook groeistimulerende effecten van NH₃ gemeten. Tevens werd in deze experimenten aangetoond dat NH₃ onder N-limitatie in de bodem voor bijna 50% kan bijdragen in het totaal N-gehalte (Cowling & Lockyer, 1981; Lockyer & Whitehead, 1986).

De opzet van het hier beschreven experiment met een zeer hoge NH₃ concentratie van 1000 ppb (776 µg m⁻³) moet de gevoeligheid van wintertarwe voor NH₃ in een kortdurend begassingsexperiment aantonen.

In dit experiment werd een hoge lichtintensiteit (450 µmol m⁻² s⁻¹) gebruikt zodat door verhoogde netto fotosynthese bij NH₃ begaste planten, zoals in voorgaande experimenten werd gemeten, er een extra groeistimulatie zou kunnen optreden.

Daar de begassingstonnen van boven gesloten zijn, zijn ze beperkt in hoogte. Daarom werd gekozen voor een begassingsduur van slechts twee weken bij 18.5°C, een fotoperiode van 12h en lichtintensiteit van 450 µmol m⁻² s⁻¹. Na deze periode werd voor een periode van 22 dagen de effecten van NH₃ op de afharding bestudeerd na omschakeling naar begassing onder afhardingscondities (4°C, 8h fotoperiode met een lichtintensiteit van 70 µmol m⁻² s⁻¹).

Er werden naast metingen aan groei, oplosbare suikers en vorsttolerantie, bepalingen aan het totaal N-gehalte en wateroplosbare niet-eiwit-SH verbindingen in bladeren gedaan. De accumulatie van deze sulfhydryl verbindingen (hoofdzakelijk glutathion) vindt snel plaats gedurende afharding (Stuiver *et al.*, 1992). Onderzocht werd of door mogelijke stijging van het totaal N-gehalte onder invloed van NH₃ begassing dit tri-peptide verhoogd gesynthetiseerd werd door mogelijke stimulatie van eiwitsynthese via een verhoogde aminozuurconcentratie.

Materiaal en methode

Plantmateriaal

Zaden van wintertarwe zaden (*Triticum aestivum* L. cv. Urban) werden gezaaid op potgrond (Florafleur potgrond, Nevena, Zwolle, Nederland) in plastic potten (8 cm diameter; 5 zaden per pot).

De zaailingen werden opgekweekt in een klimaatkamer met dag en nachttemperaturen van respectievelijk 20±1/18±1°C. De relatieve vochtigheid bedroeg 60-70% en de fotoperiode duurde 12h bij een lichtintensiteit van 225 µmol m⁻² s⁻¹. De planten werden dagelijks voorzien van kraanwater.

NH₃ begassing

Elf dagen oude zaailingen werden overgebracht naar de begassingstonnen (9 potten per ton) zoals die beschreven staat in bijlage I. Hierin werden de planten gedurende twee weken blootgesteld aan een NH₃ concentratie van 1000 ppb (776 µg m⁻³), een dag- en nachttemperatuur van respectievelijk 18.5±1/16±1°C bij een relatieve vochtigheid van 55±5%. De lichtintensiteit bedroeg 450 µmol m⁻² s⁻¹ met een fotoperiode van 12h. De potten werden dagelijks voorzien van kraanwater. Om de drie dagen werden op vaste tijdstippen planten geoogst en gebruikt voor de bepalingen van de onderzochte parameters.

Afharding van planten

Na een begassingsduur van 14 dagen werd de temperatuur in de begassingstonnen verlaagd naar 4°C. Daarnaast werd de fotoperiode verkort naar 8h en de lichtintensiteit verlaagd naar 70 µmol m⁻² s⁻¹. De NH₃ concentratie onder deze afhardingscondities bleef 1000 ppb.

Groeibepalingen

Een zestal planten werd wekelijks geoogst voor bepalingen aan totaal versgewicht en

de afzonderlijke versgewichten van spruit en wortel. Deze planten werden vervolgens gedurende 48h gedroogd in een warme stoof bij 80°C waarna vervolgens het drooggewicht werd bepaald.

Bepaling van het oplosbaar suikergehalte

Een vooraf gewogen hoeveelheid droog bladmateriaal (± 25 mg) afkomstig van 5 planten werd fijngemalen in een mortier met scherpzand. De oplosbare suikers werden geëxtraheerd met 80% ethanol en afgecentrifugeerd gedurende 20 min. met 20000 rpm. Het supernatant werd afgegoten. Hierin werd de fractie koolhydraten colorimetrisch bepaald met het anthronreagens (Fales, 1951).

Vorstschade bepaling

Twee dagen na de koelwaterbad behandeling werden aan de naalden fluorescentie metingen, zoals die beschreven staat in bijlage II, werden uitgevoerd met de Walz fluorometer en de PAM 101 en 103 (Effeltrich, FRG). De lichtintensiteit van de verzadigende lichtflits had een sterkte had $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ met een duur van 1 seconde. De metingen werden uitgevoerd bij een temperatuur van 20°C. Bepaald werd de ratio F_v/F_m na 7, 14 en 22 dagen koudeacclimatie nadat deze planten 14 dagen waren begast met 1000 ppb NH₃ bij 18.5°C, 12h fotoperiode en een lichtintensiteit van $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Totaal N-gehalte

Organisch gebonden stikstof in gedroogd bladmateriaal werd met Na-thiosulfaat, katalysator (K₂SO₄ 15 g; CuSO₄ 5 g; Na₂SeO₃ 0.085 g) en met H₂SO₄-Na-salicylaat gedestruueerd in 50ml detruueerbuisen. Hierbij werd het destruaat tot tweemaal toe opgekookt tot een temperatuur van 360°C in een Kjeldastat. Het destruaat werd aangevuld tot 50ml met demiwater. De hoeveelheid gevormde NH₄⁺ in 4.5ml werd colorimetrisch bij 415nm

bepaald na toevoeging van 0.5ml Nessler reagens en gelijk volume 9N NaOH (volgens micro-Kjeldahl aangepast door Deijis; Bradstreet, 1965).

Bepaling aan water-oplosbare niet-eiwit-SH en cysteine gehalte

Vers bladmateriaal (50 mg) van 5 planten werden in 3 mm reepjes gesneden en gehomogeniseerd in een oplossing van 80 mM sulfosalicylzuur, 0.15% (w/v) natrium ascorbaat en 1 mM Na₂EDTA (15 mg g⁻¹FW) met een Ultra Turrax op ijswater (Maas *et al.*, 1987). Zuurstof werd uit de oplossing verwijderd door de oplossing te doorborrelen met N₂. Het homogenaat werd gefilterd door 1 laag Miracloth en gecentrifugeerd bij 20000 rpm. gedurende 15 minuten bij 0°C. Het gehalte aan de totale wateroplosbare niet-eiwit-SH verbindingen en cysteine werd gemeten zoals beschreven door De Kok *et al.* (1988).

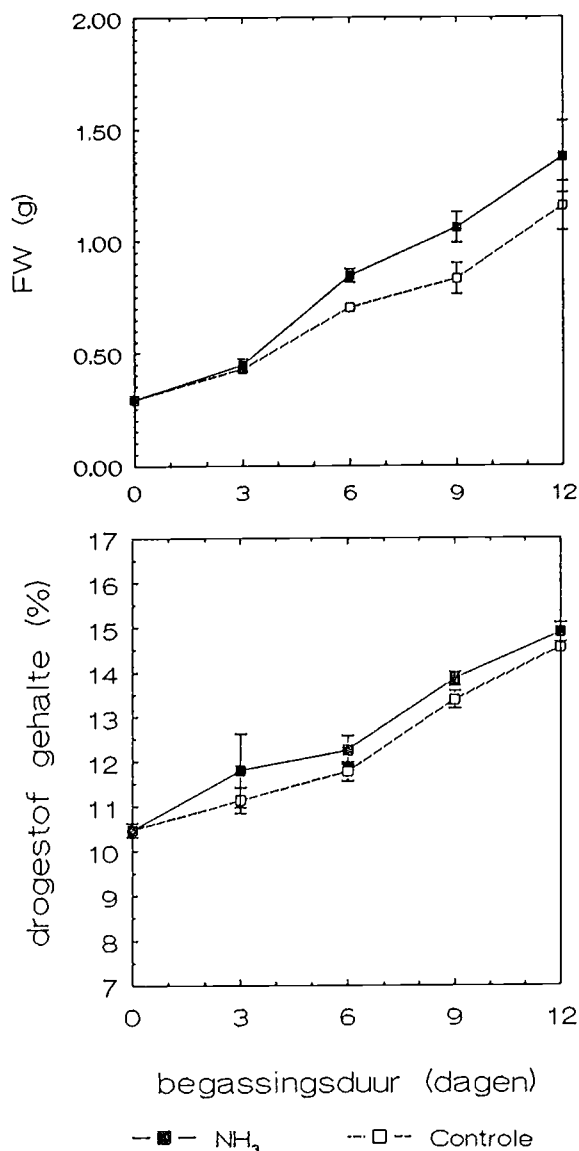
Statistiek

De *student t test* met $\alpha < 0.05$ werd gebruikt bij de bepaling van de significantie.

Resultaten

Groei

De toename in FW van 11 dagen oude wintertarwe bij een temperatuur van 18.5°C en een lichtintensiteit van $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verliep van 0.29 g (initiële waarde) naar 1.16 g binnen 12 dagen. De met 1000 ppb ($776 \mu\text{g m}^{-3}$) NH₃ begaste zaailingen leken iets sneller te groeien alhoewel deze groeistimulatie alleen na 6 ($0.01 < \alpha < 0.025$) en 9 dagen ($0.025 < \alpha < 0.05$) significant was (*fig.* 4.1A). De drogestofgehaltes gaven geen verschillen te zien gedurende 12 dagen van begassing met een hoge NH₃ concentratie (*fig.* 4.1B).

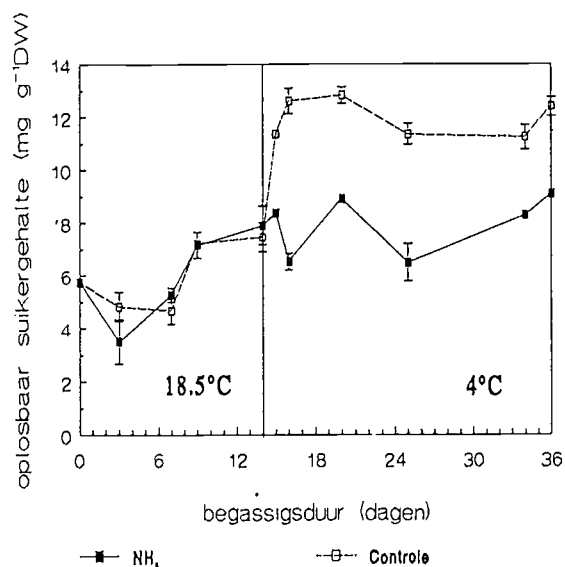


Figuur 4.1A,B Effect van NH_3 begassing met 1000 ppb ($776 \mu\text{g m}^{-3}$) op de groei van *Triticum aestivum* L. bij 18.5°C, 12h fotoperiode en een lichtintensiteit van $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gedurende 12 dagen; totaal versgewicht (A) en percentage drogestof gehalte (B). De weergegeven waarden geven het gemiddelde van 9 zaailingen ($\pm \text{SE}$).

Oplosbaar suikergehalte

De concentratie aan oplosbare suikers in de spruit van wintertarwe bij een begassingsduur van 14 dagen bij 18.5°C en een fotoperiode van 12h met een lichtintensiteit van $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ lag bij controle en NH_3 zaailingen rond $6 \text{ mg g}^{-1}\text{DW}$. Bij het verlagen van de temperatuur na 14 dagen naar 4°C steeg het suikergehalte in de controle planten in twee dagen tot een waarde van $12.6 \text{ mg g}^{-1}\text{DW}$ waarna het

gehalte zich rond deze waarde stabiliseerde.



Figuur 4.2 Oplosbaar suikergehalte (mg glucose per gram drooggewicht) in de spruit van *Triticum aestivum* L. begast met 1000 ppb ($776 \mu\text{g m}^{-3}$) NH_3 gedurende 14 dagen onder 18.5°C, 12h fotoperiode en een lichtintensiteit van $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gevolgd door 22 dagen onder 4°C, 8h fotoperiode en een lichtintensiteit van $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Weergegeven zijn de gemiddelde waarden van twee metingen ($\pm \text{SE}$).

In de NH_3 behandelde planten was gedurende de eerste fase van koudeacclimatie geen verhoging van het suikergehalte waar te nemen. Gedurende de gehele afhardingsperiode van 22 dagen bleef het gehalte vanaf de eerste dag af significant lager ($\alpha < 0.05$) dan bij de controle waarden (fig. 4.2).

Vorsttolerantie

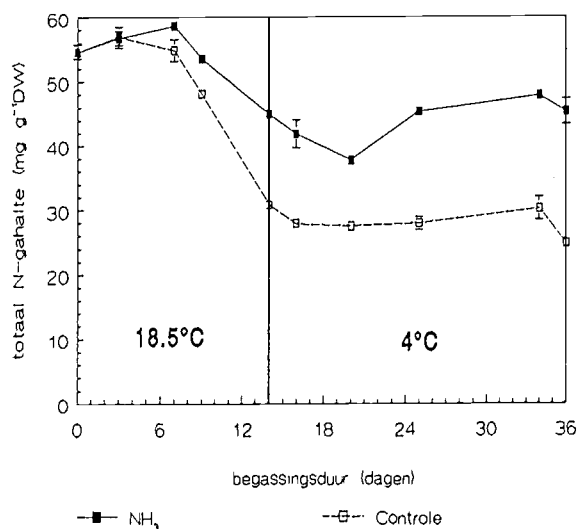
Vorsttolerantie metingen via de efficiëntie van de open PSII reactie centra (ratio F_v/F_m) aan bladeren die 14 dagen met NH_3 begaste (1000 ppb, 18.5°C, 12h fotoperiode, en een lichtintensiteit van $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) waren, hardden in een daarop volgende koude-acclimatieperiode (1000 ppb NH_3 , 4°C, 8h fotoperiode, $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) van 22 dagen af tot een temperatuur van rond de -9°C (tab. 4.1). De NH_3 ontwikkelden in die periode een iets hogere vorsttolerantie dan de controle planten.

Tabel 4.1 Temperatuur (°C) waarbij de ratio F_v/F_m van bladeren van *Triticum aestivum* L. onder de waarde 0.80 zakende gedurende een afhardingsperiode van 22 dagen waarbij de planten met 1000 ppb (776 $\mu\text{g m}^{-3}$) NH₃ begast werden bij 4°C, 8h fotoperiode bij een lichtintensiteit van 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

| dagen 4°C | NH ₃ | Controle |
|-----------|-----------------|----------|
| 7 | -4.6°C | -5.0°C |
| 14 | -7.3°C | -6.7°C |
| 22 | -9.5°C | -8.7°C |

Totaal N-gehalte

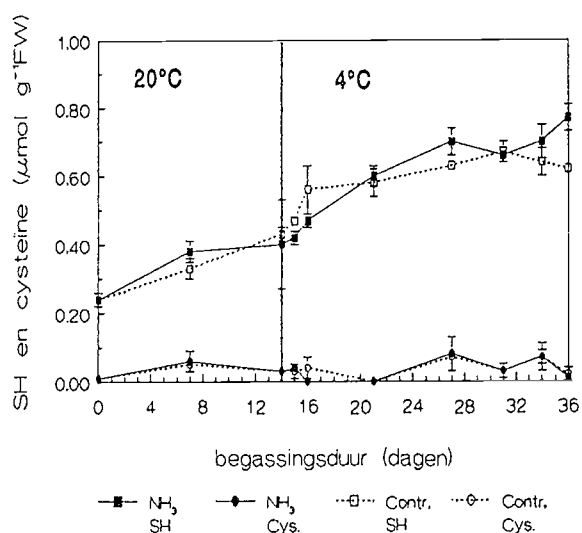
Het totaal stikstofgehalte daalde gedurende het eerste 14 dagen van het experiment (18.5°C en 12 uur fotoperiode en een lichtintensiteit van 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bij de controle planten van 54 mg tot 25 mg N g⁻¹DW. Ook het totaal N-gehalte in de spruiten van de NH₃ begaste planten daalde tot een waarde van 45 mg g⁻¹DW. Deze daling was significant minder ($\alpha < 0.05$) vanaf dag 9. Gedurende de 22 dagen van koudeacclimatie (4°C en 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) stabiliseerde het stikstofgehalte in de aan NH₃ blootgestelde spruiten zich rond 46 mg terwijl deze waarde in de controle spruiten rond de 27 mg g⁻¹DW lag (fig. 4.3).



Figuur 4.3 Totale N-gehalte in mg N per gram drooggewicht in bladeren van *Triticum aestivum* L. begast met 1000 ppb (776 $\mu\text{g m}^{-3}$) NH₃ (gesloten balken) of met controle lucht (open balken) bij 20°C en 4°C, resp. 12/8h fotoperiode met een lichtintensiteit van 450/70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. De weergegeven waarden geven het gemiddelde weer van 3 metingen (\pm SE).

SH en cysteine gehalte

Het gehalte aan wateroplosbare niet-eiwit-SH verbindingen lag in bladeren van wintertarwe gedurende een groei bij een temperatuur van 18.5°C en een lichtintensiteit van 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tussen de 0.24 en 0.40 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ (fig. 4.4). Gedurende de koudeacclimatie bij 4°C was sprake van een SH accumulatie. Deze accumulatie bereikte na een 7 dagen een waarde van 0.58 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ en na 22 dagen een eindwaarde van 0.62 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ in bladeren van controle planten. De maximale SH accumulatie bij de NH₃ begaste planten werd na 13 dagen gemeten bij een waarde van 0.71 $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ (fig. 4.4). De waarden verschilden echter op geen enkel tijdstip significant van de controle waarden.



Figuur 4.4 Gehalte aan totaal wateroplosbare niet-eiwit-SH en cysteine in μmol per gram versgewicht in bladeren van *Triticum aestivum* L. gedurende begassing met 1000 ppb (776 $\mu\text{g m}^{-3}$) NH₃ gedurende 14 dagen onder 18.5°C, 12h fotoperiode met een lichtintensiteit van 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gevolgd door 22 dagen onder 4°C, 8h fotoperiode met een lichtintensiteit van 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Weergegeven zijn de gemiddelde waarden van 3 metingen (\pm SE).

Discussie

Droge depositie van NH₃ bij een hoge concentratie (1000 ppb; 776 $\mu\text{g m}^{-3}$) leidde tot een verhoging aan het totaal N-ge-

halte in bladeren van wintertarwe. Gedurende begassing onder 20°C liep het verschil in N-gehalte op terwijl zich dit verschil bij 4°C stabiliseerde (*fig. 4.3*). Ondanks het 60% hogere N-gehalte in de bladeren begast met NH₃, werd bij deze planten slechts een zeer geringe stimulatie van het versgewicht gevonden (*fig. 4.1A*). Ook het drogestofgehalte was niet verhoogd onder invloed van NH₃ (*fig. 4.1B*). Wel werd een significant minder sterkere accumulatie in oplosbare suikers gemeten bij de planten begast met NH₃ (*fig. 4.2*). Dit pleit voor het gebruik van koolhydraten in het detoxificatie mechanisme van NH₄⁺ zoals voorgesteld in de algemene inleiding (hoofdstuk 1). In de spruit van de controle planten was sprake van een tweevoudige verhoging van de concentratie aan oplosbare suikers, een minder sterke stijging dan in hoofdstuk 2 gemeten werd. Metingen aan de vorstgevoeligheid met behulp van de chlorofylfluorescentie methode toonden aan dat de opbouw van vorsttolerantie in de NH₃ begaste planten even groot of zelfs groter was (*tab. 4.1*). Onder koude-acclimatie vond accumulatie plaats van wateroplosbare niet-eiwit-sulphydryl verbindingen. Een mogelijk verhoogde synthese van sulphydryl verbindingen (voornamelijk het tripeptide glutathion) onder invloed van NH₃ werd niet gevonden (*fig. 4.4*). De concentratie bereikte na een afharding van 2 weken een maximum waarde van rond de 0.6 μmol g⁻¹FW waarmee de resultaten overeenkomen met die uit een soortgelijk experiment beschreven door Stuiver *et al.* (1992). De stijging in SH-gehalte is vrijwel geheel te danken aan glutathion omdat de cysteine concentratie gelijk blijft. In geen van de experimenten met wintertarwe werd zichtbare schade (zoals bijvoorbeeld necrose) geconstateerd. In geen van de experimenten met wintertarwe werd een verhoogde vorstgevoeligheid onder invloed van NH₃ gemeten terwijl bij begassing met zeer hoge con-

centraties NH₃ wel een verminderde accumulatie van oplosbare suikers werd gevonden tijdens de afharding. Deze resultaten bevestigen de hypothese dat de assimilatie van NH₄⁺ zoals voorgesteld in de algemene inleiding (hoofdstuk 1) kan leiden tot een verlaging van het koolhydraatgehalte. Deze resultaten suggereren tevens dat de accumulatie van suikers in wintertarwe niet sterk gekoppeld is met verhoging van de vorsttolerantie.

Hoofdstuk 5

Effecten van droge NH₃ depositie op metabolisme en vorsttolerantie van grove den (*Pinus sylvestris* L.)

Jonge zaailingen van grove den (*Pinus sylvestris* L.) werden gedurende 4 weken begast met 400 ppb (305 $\mu\text{g m}^{-3}$) NH₃ onder condities waarbij in de natuur de eerste fase van koude-acclimatie optreedt (17.5°C, 8h fotoperiode met een lichtintensiteit van 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). In deze periode werd geen significant verschil gevonden in de opbouw van vorsttolerantie tussen controle en de met NH₃ begaste zaailingen. Het gehalte aan oplosbare suikers, waarvan aangenomen wordt dat het ook bij grove den een grote rol speelt bij het verhogen van de vorsttolerantie gedurende de vorst-afharding, liet eveneens geen verschil zien tussen beide behandelingen terwijl het totale stikstofgehalte niet significant hoger lag in de naalden van zaailingen begast met NH₃. Na een begassingsperiode van 6 weken werd in de naalden van de NH₃ begaste naalden een tweemaal hogere concentratie aan vrij NH₄⁺ gemeten. Het zetmeelgehalte nam af tot bijna 0. Ook hierin konden geen verschillen worden aangetoond.

Bij een lichtintensiteit van 1820 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ werd een stimulatie door NH₃ van de netto fotosynthese gemeten van 28% terwijl de lichtintensiteit voor het bereiken van de F_{max} veel hoger lag bij de NH₃ begaste zaailingen ($\pm 2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) t.o.v. de controle ($\pm 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Er werd na een begassingsduur van 5 weken geen effect van NH₃ op de quantumyield en donkerrespiratie gemeten.

Sleutelwoorden - Afharding, ammoniak, oplosbaar suikergehalte, Pinus sylvestris, totaal N-gehalte, vorsttolerantie, vrij-ammonium gehalte, zetmeelgehalte.

Afkortingen: Chl=chlorofyl; F₀=grondfluorescentie; F_m=maximale fluorescentie; F_v=maximale variabele fluorescentie; PFD=Photon Flux Density; P_{max}=maximale fotosynthese

Inleiding

De verminderde vitaliteit van de Nederlandse bossen, waarvan 40% uit grove den bestaat, wordt toegeschreven aan de sterk toegenomen luchtverontreiniging. In Nederland is ammoniak één van de belangrijkste luchtverontreinigingscomponenten. In gebieden waar intensieve veehouderij bedreven wordt zijn hoge plaat-

selijke emissies aan NH₃ gemeten (LUVO, 1984; hoofdstuk 1). NH₃ kan door natte en droge depositie het functioneren van de plant zowel bovengronds als via de bodem beïnvloeden zoals uitvoerig beschreven is in de algemene inleiding (hoofdstuk 1). Er zijn reeds resultaten bekend van studies die de effecten van langdurige NH₃ begassing in combinatie met andere luchtverontreinigingscompo-

nenten zoals SO₂ hebben bestudeerd aan populieren (*Populus euramericana* L.) (van Hove *et al.*, 1991). Ook op het Instituut voor Plantenziektkundig Onderzoek (IPO) zijn experimenten gedaan waarbij de effecten van langdurige (3-5 maanden) NH₃ begassing werd onderzocht op de fysiologie van de grove den (*Pinus sylvestris* L.) (van der Eerden, 1992; Dueck *et al.*, 1991). Hieruit bleek een verhoogde gevoeligheid bij de aan NH₃ blootgestelde planten voor diverse stressfactoren waaronder droogte en vorst. Het doel van het in dit hoofdstuk beschreven experiment is het bestuderen van mogelijke effecten van NH₃ op de afharding van 3 maanden oude zaailingen van grove den begast gedurende 4 weken met 400 ppb (305 µg m⁻³) onder condities waarbij in de natuur de eerste fase van afharding optreedt.

Materiaal en methode

Plantmateriaal

Zaden van de grove den (*Pinus sylvestris* L.) afkomstig uit het Voorsterbos (Staatsbosbeheer Nederland) werden gezaaid nadat ze gedurende 30 min. gesteriliseerd waren met 30% H₂O₂. Na de zaden 30 min. afgespoeld te hebben werden ze in plastic potten (7cm doorsnee, 110 cm³ volume) op scherp zand gezaaid. De planten werden opgekweekt in een kas bij een temperatuur van 22°C overdag en 18°C 's nachts bij een fotoperiode van 12h en lichtintensiteit van ongeveer 200 µmol m⁻² s⁻¹. Op donkere dagen werd automatisch bijverlicht met Philips HPL-I lampen tot eenzelfde lichtintensiteit. De zaailingen werden dagelijks bewaterd met demiwater, twee maal per week werd 10x verdunde voedingsoplossing toegediend (Christersson, 1973; bijlage IV) zodat groei onder nutriënt arme condities plaatsvond zoals ook in de natuurlijke situatie op zandgronden. Drie maanden na zaaien

werden 90 zaailingen overgebracht naar de begassingstonnen.

NH₃ begassing

Het experiment werd uitgevoerd in de begassingstonnen zoals die beschreven staat in bijlage I. De 3 maanden oude zaailingen werden gedurende vier weken begast bij een NH₃ concentratie van 400 ppb (305 µg m⁻³), een temperatuur van 17.5±1°C overdag en van 15±1°C 's nachts, bij een relatieve vochtigheid van 55±5%. De lichtintensiteit bedroeg 150 µmol m⁻² s⁻¹. De fotoperiode bedroeg 8 uren. De potten werden iedere dag voorzien van 10 ml demiwater. Twee maal per week werd 10 ml voedingsoplossing toegediend. Eénmaal per week werden op vaste tijdstippen planten geoogst en gebruikt voor bepalingen aan de onderzochte parameters.

Bepaling van oplosbare suikers en zetmeel

Per bepaling werden 5 naalden (± 50 mg FW) fijngemalen waaruit de oplosbare suikers werden geëxtraheerd met 96% ethanol en afgecentrifugeerd gedurende 20min. met 20000 rpm. Het ontstane pellet werd vervolgens nog twee maal geresuspendeerd en afgedraaid met 20000 rpm. gedurende 10min. De supernatanten werden afgegoten en bewaard terwijl het in de pellet achtergebleven zetmeel werd gehydrolyseerd met 25ml HCl (3%) door gedurende drie uur te koken op een terugvloeikoeler. De fractie koolhydraten in beide fracties werd colorimetrisch bepaald met het anthron reagens (Fales, 1951).

Totaal N-gehalte

Organisch gebonden stikstof in gedroogde naalden werd met 0.33 g Na-thiosulfaat, 2ml 33.33 mg ml⁻¹ H₂SO₄-Na-salicylaat met een spatelpunt katalysator K₂SO₄:CuSO₄:Na₂SeO₃ (15:5:0.85) gedestruerd in 50 ml destrueerbuizen. Hierbij werd het destruaat tot tweemaal toe opgekookt tot

een temperatuur van 360°C in een Kjeldahlstat. Vervolgens werden de buizen aangevuld tot 50ml met demiwater. De hoeveelheid gevormd NH₄⁺ in 4.5ml destryaat werd colorimetrisch bij 415nm bepaald na toevoeging van 0.5ml Nessler reagens (Nessler : 9N NaOH; 1:1) (volgens micro-Kjeldahl, aangepast door Deijs, Bradstreet, 1965).

Ammonium bepaling

Het vrije ammoniumgehalte werd bepaald na homogenisatie van vers materiaal (\pm 35 mg) in 3ml aqua dest met een spatelpunt kwartsand en ca. 0.1 g polyclar AT. Het homogenaat werd gedurende 20 min. gecentrifugeerd bij 20000 rpm. Aan 500 μ l supernatant werden achtereenvolgens na vortexen 2.25ml fenolnitroprusside (5 g fenol met 25mg Na-nitroprusside per 500 ml demi) en 2.25ml NaOH-hypochloriet (2.5 g NaOH en 4.2ml Na-hypochloriet per 500ml demi) toegevoegd. Na een kleurreactie van 2 uur in het donker werd de extinctie gemeten bij 620nm.

Bepaling mate van vorstgevoeligheid

Hierbij werden 4 naalden per reageerbuis (15mm diameter, 10cm lang) met een vochtig 0.5 cm² filtreerpapiertje in een Julabo F40 ethanol koelwaterbad bij 2°C geplaatst. De naalden werden gedurende 30 minuten bij deze temperatuur gepreincubeerd. Vervolgens werd de temperatuur 4°C h⁻¹ verlaagd (middels een aangesloten interface-computer) tot een temperatuur van -20°C. Bij 12 verschillende temperaturen werden monsters uit het koelwaterbad gehaald en bij 4°C in het donker geplaatst.

De daarop volgende dag werden de buizen voorzien van 1ml demiwater, overgebracht naar kamertemperatuur en in het licht (\pm 200 μ mol m⁻² s⁻¹) geplaatst.

Twee dagen na de behandeling werden aan de naalden chlorofylfluorescentie metingen, zoals die beschreven staan in bijlage II, gedaan met een Walz fluoro-

meter (PAM 101 en 103, Effeltrich, FRG). De lichtintensiteit van de verzadigende lichtflits had een sterkte van 1800 μ mol m⁻² s⁻¹ met een duur van 1 seconde. De metingen werden uitgevoerd bij een temperatuur van 20°C. Bepaald werd de ratio F_v/F_m.

Fotosynthesemetingen

Fotosynthese metingen aan 5 naalden werden gedaan in een Hansatech cuvet uitgerust met een Clark type O₂-electrode. Onder 4.5% CO₂ en 2% O₂ werden bij 17.5°C lichtresponscurven gemaakt (zie pagina 11).

Chlorofylbepaling

Aan naalden gebruikt voor de fotosynthese meting werd vervolgens het gehalte aan bladpigmenten bepaald. Hiertoe werden de naalden gehomogeniseerd met de Ultra Turrax en de pigmenten geëxtraheerd in 80% aceton. Na afcentrifugeren bij 3000 rpm. kon de absorptie bij 663.2nm, 648.6nm en 470nm worden gemeten met een Beckman 34 spectrofotometer. Uit deze absorptiewaarden werd het gehalte aan chlorofyl a en b en carotenoïde bepaald (Lichtenthaler, 1987).

Statistiek

De *student t test* met $\alpha < 0.05$ werd gebruikt bij de bepaling van de significantie.

Resultaten

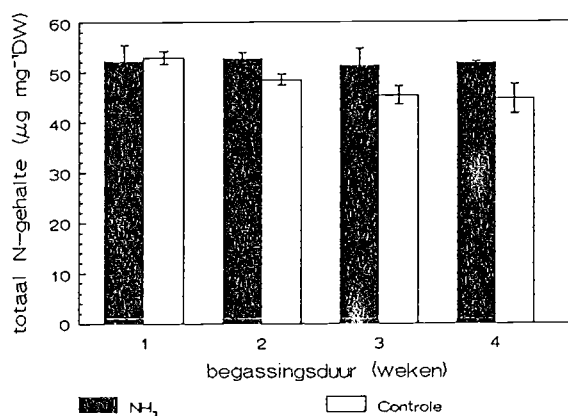
Vrij ammonium- en totaal N-gehalte

Na 6 weken begassing werd een significant (ruim twee maal) hoger vrij NH₄⁺ gehalte in de ammoniak begaste naalden ten opzichte van de controle naalden gemeten ($\alpha < 0.005$) (tab. 5.1). Het totale N-gehalte van de naalden begast met NH₃ in de weken 2 tot en met 4 lag hoger dan de naalden van de controle zaailingen. Dit verschil was niet significant.

Tabel 5.1 Vrije ammonium concentratie (ng mg⁻¹FW) in vijf weken met 400 ppb (305 µg m⁻³) NH₃ begaste naalden van *Pinus sylvestris* L. bij 17.5°C, 8h fotoperiode en een lichtintensiteit van 150 µmol m⁻² s⁻¹. Weergegeven zijn de gemiddelde waarden ± SE (n=3).

| begassingsduur | NH ₃ | Controle |
|----------------|-----------------|--------------|
| 6 weken | 72.60 ± 2.26 | 32.37 ± 0.47 |

Opvallend was de sterke stijging van 33 naar 53 µg mg⁻¹DW in de eerste week van het experiment. Hierna stabiliseerde het totaal N-gehalte in de NH₃ begaste naalden zich rond een waarde van 52 µg mg⁻¹DW terwijl het totaal N-gehalte in de controle naalden 13% omlaag ging ten opzichte van de eerste week (fig. 5.1).

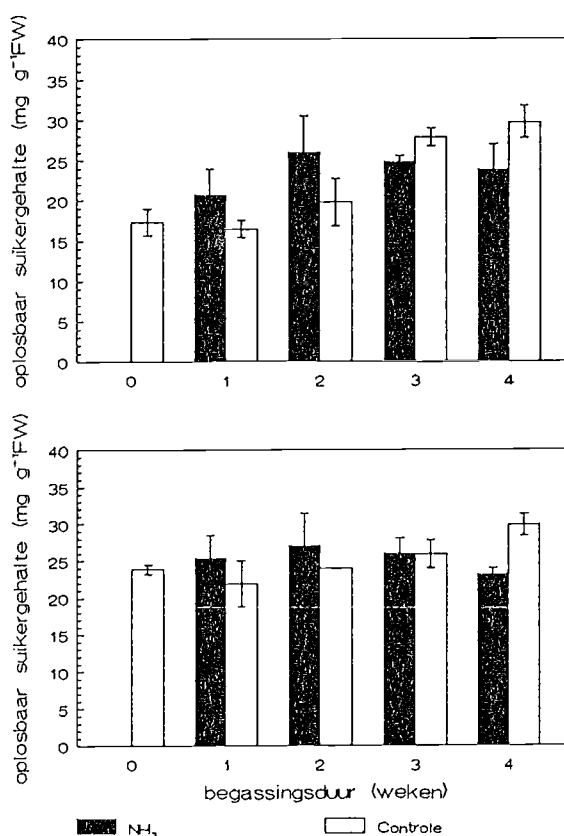


Figuur 5.1 Totale N-gehalte in naalden van *Pinus sylvestris* L. begast met 400 ppb (305 µg m⁻³) NH₃ (gesloten balken) of met controle lucht (open balken) bij 17.5°C, 8h fotoperiode met een lichtintensiteit van 150 µmol m⁻² s⁻¹. De weergegeven waarden geven het gemiddelde weer van 3 metingen (± SE).

Oplosbaar suikergehalte

Onder de opgelegde condities (8h fotoperiode met 150 µmol m⁻² s⁻¹ en temperatuur van 17.5/15°C) werd in 4 weken een toename van de suikerconcentratie in de controle naalden gemeten van 17.3/23.9 (initiale waarden van respectievelijk 'jonge' en 'oude' naalden) tot 29.8 mg g⁻¹FW bij beide (fig. 5.2A,B). Ook in de naalden van de NH₃ begaste zaailingen liep de concentratie de eerste twee weken op naar 26.1 respectievelijk 27.1 mg g⁻¹FW maar stagneerde of liep terug in de derde en vierde week tot een waarde van 23.9/23.1 mg

g⁻¹FW. Zowel de 'jonge' naalden (fig. 5.2A) als de 'oude' naalden (fig. 5.2B) lieten dit zelfde beeld zien. Toch was de stijging in suikergehalte in de 'jonge' naalden (17.3 naar 29.8 mg g⁻¹FW) sterker dan in de 'oude' naalden (23.9 naar 29.8 mg g⁻¹FW). De waarden verschilden op geen enkel tijdstip significant van elkaar.

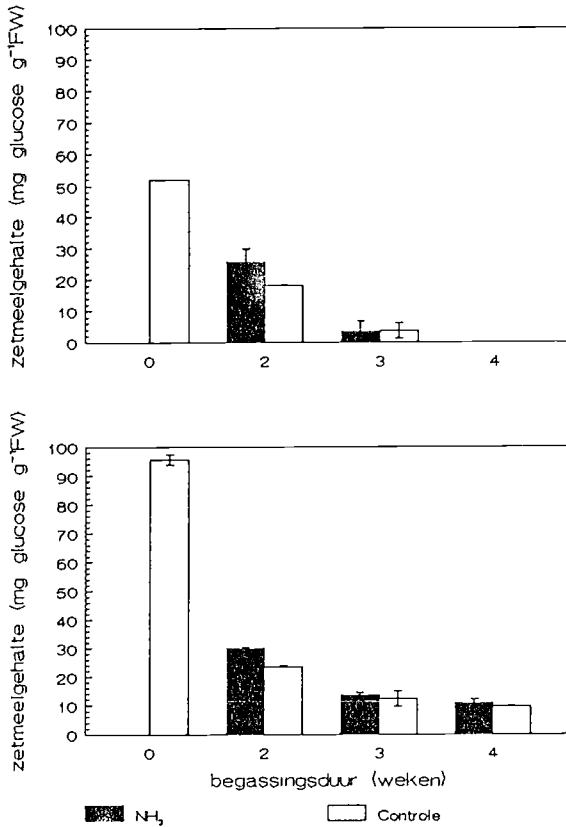


Figuur 5.2A,B Oplosbaar suikergehalte (mg glucose g⁻¹DW) in jonge zaailingen van *Pinus sylvestris* L. begast met 400 ppb (305 µg m⁻³) NH₃ (gesloten staven) of met controle lucht (open staven) bij 17.5°C, 8h fotoperiode met een lichtintensiteit van 150 µmol m⁻² s⁻¹. Figuur 2A geeft verloop van gehalte aan oplosbare suikers gedurende de begassingsperiode van jonge naalden, figuur 2B van de oude naalden. Weergegeven zijn de gemiddelde waarden ± SE (n=2).

Zetmeel gehalte

Het zetmeel gehalte in zowel de oude als jonge bladeren daalde sterk gedurende de begassingsperiode onder condities die de eerste fase van afharding bij grove den simuleerden (fig. 5.3A,B). Bij de jonge naalden werd in vier weken tijd het gehele zetmeelgehalte van 51.9 mg glucose g⁻¹FW omgezet (fig. 5.3A). Ook in de

oude naalden werd de initiële waarde van 95.5 mg glucose g⁻¹FW, met 90% gereduceerd (fig. 5.3B). Hier lag alleen na twee weken koudeacclimatie het zetmeelgehalte in de controle naalden significant lager ($0.01 < \alpha < 0.025$).



Figuur 5.3A,B. Gehalte aan zetmeel (in mg glucose per gram versgewicht) bij 'jonge' (3A) en 'oude' naalden (3B) van zaailingen begast met 400 ppb (305 $\mu\text{g m}^{-3}$) NH₃ (gearceerde balken) en met controle lucht (open balken) bij 17.5°C, 8h fotoperiode met een lichtintensiteit van 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Weergegeven zijn de gemiddelde waarden \pm SE (n=2).

Vorsttolerantie

Vorsttolerantie metingen via de efficiëntie van de open PSII reactie centra (ratio F_v/F_m) aan controle en NH₃ begaste naalden lieten zien dat gedurende de begassingsperiode de temperatuur waarbij de ratio F_v/F_m onder de 0.80 kwam daalde van -2.5°C tot -11.0°C. (tab. 5.2, fig. 5.4). Er werden kleine verschillen in vorsttolerantie gemeten tussen planten begast met NH₃ en de controle planten waaruit geen verhoogde vorstgevoeligheid

bij de NH₃ begaste planten kon worden afgeleid.

Tabel 5.2 LT₅₀ als temperatuur waarbij de ratio F_v/F_m van naalden van *Pinus sylvestris* L. onder de waarde 0.80 zakte gedurende begassingsperiode met 400 ppb (305 $\mu\text{g m}^{-3}$) NH₃ bij 17.5°C, 8h fotoperiode met 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

| week | NH ₃ (°C) | Controle (°C) |
|------|----------------------|---------------|
| 0 | - | -2.5 |
| 1 | -4.0 | -4.0 |
| 2 | -5.0 | -6.5 |
| 3 | -7.0 | -8.5 |
| 4 | -11.0 | -9.5 |

Fotosynthese

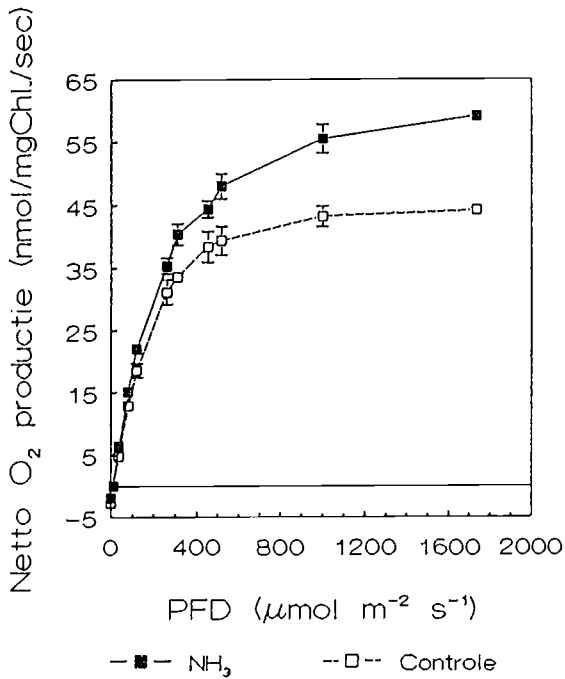
De maximale netto fotosynthese (uitgedrukt op chlorofylbasis) was na 5 weken begassingsduur met 28% gestimuleerd, gemeten bij een lichtintensiteit van 1820 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Vanaf een lichtintensiteit van 1100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ werden significant hogere waarden gevonden ($\alpha < 0.05$) terwijl dit niet gold ten aanzien van de gemeten donkerrespiratie en de quantum yield (tab. 5.3, fig. 5.5). Uit de lichtresponscurven (fig. 5.5) blijkt tevens dat de NH₃ begaste naalden bij een lichtintensiteit van 1820 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hun P_{max} nog niet bereikt hadden terwijl bij de controle naalden al rond een lichtintensiteit van 1100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ lichtverzadigd waren (fig. 5.5).

Tabel 5.3 Chlorofylgehalte ($\mu\text{g cm}^{-2}$ naaldoppervlak), donkerrespiratie ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{Chl s}^{-1}$), quantumyield ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{Chl s}^{-1} / \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) en netto fotosynthese bij 1820 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ($\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{Chl s}^{-1}$) bij 5 weken begassing met 400 ppb (305 $\mu\text{g m}^{-3}$) NH₃ of controle lucht. Weergegeven staan de gemiddeldes van twee metingen \pm SE.

| | NH ₃ | Controle |
|------------------|-----------------|-----------------|
| Chl. a+b | 57.8 \pm 6.1 | 41.1 \pm 2.5 |
| R _d | -1.9 \pm 0.4 | -2.7 \pm 0.4 |
| QY | 0.23 \pm 0.04 | 0.21 \pm 0.04 |
| P _{max} | 55.5 \pm 2.3 | 43.2 \pm 1.6 |

Chlorofylbepaling

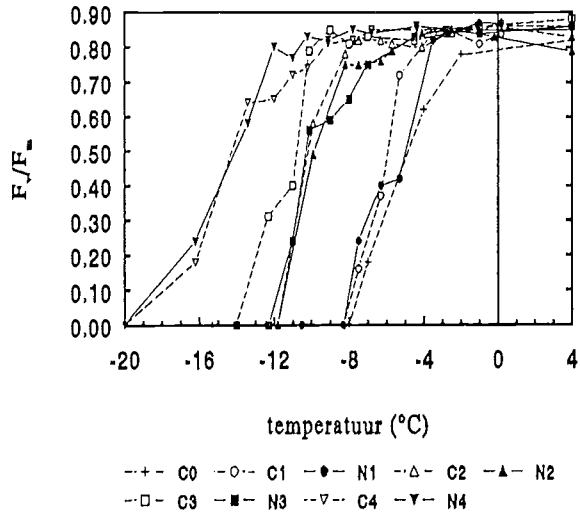
Na de fotosynthese metingen werd het chlorofylgehalte van de naalden bepaald. Het totale chlorofylgehalte in de naalden van de ammoniak begaste zaailingen lag hoger (tab. 5.3). Het betrof hier slechts een bepaling aan naalden van twee zaailingen waardoor de waarden niet significant verschilden.



Figuur 5.5 Lichtresponscurve van *Pinus sylvestris* L. zaailingen na een begassingsduur van 6 weken bij 17.5°C , 8h fotoperiode met een lichtintensiteit van $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ met 400 ppb ($305 \mu\text{g m}^{-3}$) NH_3 of met controle lucht. Weergegeven zijn gemiddelde waarden \pm SE ($n=2$).

Discussie

Onder gegeven experimentele omstandigheden waarbij 3 maanden oude *Pinus sylvestris* L. zaailingen gedurende 4 weken aan verhoogde NH_3 (400 ppb) concentraties werden blootgesteld werd een niet significante verhoging van het totale N-gehalte in de naalden gemeten (fig. 5.1). Het totaal stikstofgehalte (% van het drooggewicht) van deze 3 maanden oude naalden varieerde tussen de 4.5-5.2%. Deze waarden zijn onverklaarbaar hoog (behalve dat de hier gebruikte zaailingen



Figuur 5.4 Verloop van F_v/F_m bij naalden van *Pinus sylvestris* L. onder lage temperatuur gedurende 4 weken van begassing met 400 ppb ($305 \mu\text{g m}^{-3}$) bij 17.5°C , 10h fotoperiode en een lichtintensiteit van $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Weergegeven zijn de gemiddelde waarde van de chlorofylfluorescentie van 10 naalden.

nog maar 3 maanden oud waren) in vergelijking met metingen van Pérez Soba (1990) die in drie jaar oude naalden percentages meette tussen de 1 en 1.3%.

In de NH_3 begaste naalden werd na een begassingsduur van 6 weken een ruim twee maal zo hoge NH_4^+ concentratie gemeten (tab. 5.1). Vollbrecht *et al.* (1989) vond bij jonge zaailingen van grove den, opgekweekt onder hoge NH_4^+ concentratie in de voedingsoplossing, een sterke accumulatie van NH_4^+ in de cotylen en wortels terwijl geen stimulatie van glutamine synthetase (GS) optrad. Bij de bestudering van de effecten van NH_3 zal het belangrijk zijn of planten de activiteit van GS kunnen aanpassen onder NH_3 depositie. Zo niet dan kan NH_4^+ accumuleren tot toxische waarden en zal groeiremming kunnen optreden. Heeft de plant echter wel het vermogen om de activiteit van GS te verhogen dan zal verhoogde NH_3 depositie wellicht tot een groeistimulatie en een verlaging van de concentratie aan koolhydraten kunnen leiden.

Onder invloed van een korte fotoperiode (8 uur), laag licht ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en temperaturen van $17.5^\circ\text{C}/15^\circ\text{C}$, zoals die

in het vroege najaar voorkomen, werd een afharing in vier weken gemeten naar een temperatuur van -11°C . Deze resultaten komen overeen met die van Aronsson *et al.* (1976) die ook bij grove den een koude-acclimatie vond onder invloed van een korte fotoperiode. Uit chlorofylfluorescentie metingen werd geen effect van NH₃ op de vorstgevoeligheid gemeten (*tab.* 5.2, *fig.* 5.4).

De koppeling tussen de verhoogde koude-tolerantie en een stijging in de concentratie oplosbare suikers was minder sterk dan verwacht in vergelijking met waarden gevonden door Aronsson *et al.* (1976). Er was geen sprake van een kleinere accumulatie van oplosbare suikers onder invloed van NH₃ begassing (*fig.* 5.2A,B). Wellicht zou een langduriger begassings-experiment uiteindelijk kunnen leiden tot een significant verschillend suikergehalte zoals het verloop in concentratie van de laatste twee weken doet vermoeden.

Een extreme daling in het zetmeelgehalte (*fig.* 5.3A,B) wordt algemeen gevonden gedurende de afhardingsfase (Levitt, 1978). De vrijgekomen glucose-eenheden werden waarschijnlijk gebruikt als koolstof- en energiebron daar slechts sprake was van een zeer geringe toename in oplosbaar suikergehalte.

Een stimulatie van 28% van de naalden begast met NH₃ op de fotosynthese bij een lichtintensiteit van $1820 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (*tab.* 5.3, *fig.* 5.5) stemt overeen met gegevens in de literatuur over de positieve correlatie tussen N-gehalte in planten en fotosynthese capaciteit (Evans 1983, van Hove 1989, van der Eerden, 1992). NH₃ verhoogt de maximale CO₂ assimilatie maar heeft geen effect op de quantumyield en donkerrespiratie (*tab.* 5.3). Deze resultaten werden ook gevonden door van Hove (1989). Van der Eerden (1992) vond wel een stimulatie van de donkerrespiratie bij grove den na een begassingsperiode van 8 weken bij een concentratie van $240 \mu\text{g m}^{-3}$. Stimulatie van de

fotosynthese (hier uitgedrukt op chlorofylbasis) door NH₃ kan worden verklaard door verlaging van de stomataire weerstand en een hogere RuBisCO-activiteit. Een verhoogd chlorofylgehalte (*tab.* 5.3) werd ook gevonden door van Hove (1989) en Snel *et al.* (1991). Verdere experimenten, eventueel uitgevoerd in het veld, moeten duidelijk maken hoe verhoogde depositie van NH₃ een rol speelt in de vitaliteitsafname van de Nederlandse bossen onder meer ten gevolge van een verhoogde stress-gevoeligheid voor o.a. insectenvraat, verminderde mycorrhiza vorming, droogte en vorst.

Hoofdstuk 6

Samenvatting

Nederland kent de hoogste depositie aan NH_y (ammoniak plus ammonium) van Europa. Emmissie uit dierlijke mest is de belangrijkste bron (90%) voor deze verhoogde depositie. Zo is de totale depositie van stikstof vanuit de atmosfeer in concentratie gebieden van de bio-industrie 10-20 keer hoger dan de stikstof depositie van 5-10 $\text{kg ha}^{-1} \text{jaar}^{-1}$, die bij natuurlijke achtergrondconcentraties plaatsvindt. In deze gebieden wordt tevens een sterke vermindering van de vitaliteit van de bossen waargenomen. Onderzoekingen hebben inmiddels een duidelijk causaal verband aangetoond tussen de hoge NH_3 emissie in deze gebieden en de waargenomen effecten op de vegetatie.

Verhoogde depositie van NH_y kan tot ernstige bodemverzuring leiden waarbij toxische elementen als Al^{3+} vrijkomen van het bodemcomplex. Bovendien kunnen andere voor de plant benodigde kationen als K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} in oplossing raken waardoor ze uit de wortelzone kunnen lekken en deficiënties kunnen ontstaan.

De hoge stikstof depositie kan in het blad leiden tot verstoring van de nutriëntenbalans: door een verhoogd stikstofgehalte in bladeren ontstaat er een relatief tekort aan andere nutriënten zoals magnesium, kalium en fosfor. Door een verhoogd stikstofgehalte kan de groei worden gestimuleerd. Tevens maakt een hoger stikstofgehalte de planten gevoeliger voor insectenvraat. Er zijn aanwijzingen dat de stomataire weerstand verlaagd wordt door NH_3 , wat de planten gevoeliger maakt voor droogte. Tevens vindt bij verhoogde stikstof depositie een stimulatie van de maximale fotosynthese (F_{max}) plaats. Daarnaast zal de activiteit van glutamine synthetase (GS) en glutamaat synthase (GOGAT) worden gestimuleerd. Dit leidt tot verhoogde aminozuur (arginine, proline, glutamine, glutamaat) concentraties. Er zal bij de detoxificatie van NH_y een verhoogde koolstof flux via α -ketoglutaraat naar aminozuren plaatsvinden. NH_y kan op deze manier als toxine voor de koolhydraat-productie werken. Deze gewijzigde koolstof flux zou in combinatie met de lage metabolische activiteit in herfst en winter de planten gevoeliger voor vorst kunnen maken. Tevens bestaat de hypothese dat de planten onder verhoogde stikstof depositie later in dormancy gaan wat tot een verlate afharding leidt (*hoofdstuk 1*).

Hoofddoel van de hier beschreven experimenten was de bestudering van het effect van droge NH_3 depositie op vorstgevoeligheid en afharding van wintertarwe (*Triticum aestivum* L.) en grove den (*Pinus sylvestris* L.). Daarnaast werden effecten op groei, fotosynthese, RuBisCO-activiteit en totaal stikstof- en ammoniumgehalte onderzocht. De begassingsexperimenten werden onder laboratorium omstandigheden uitgevoerd in gesloten begassingstonnen.

Na een begassingsperiode van 21 dagen tijdens (*hoofdstuk 2*) of voorafgaande (*hoofdstuk 3*) aan de afhardingsperiode, werd bij wintertarwe geen verschil in vorstgevoeligheid gemeten tussen de controle planten en planten begast met 375 ppb ($285 \mu\text{g m}^{-3}$) NH_3 . Er werd een gelijke accumulatie van oplosbare suikers bij beide behandelingen gemeten

gedurende koude-acclimatie. Bij begassing onder 20°C (*hoofdstuk 3*) werd een lichte, niet significante, groeistimulatie gemeten terwijl geen effect op het drogestofgehalte werd gevonden. De maximale fotosynthese (gemeten bij 20°C) werd zowel bij de planten begast bij 4°C als bij 20°C gestimuleerd. Deze resultaten werden verklaard door aan te nemen dat onder NH₃ begassing het chlorofylgehalte in het blad stijgt en de stomataire weerstand verlaagd wordt. Tevens zou een verhoogde fotosynthese verklaard kunnen worden door een stimulatie van de RuBisCO-activiteit zoals gemeten werd bij de planten begast bij 20°C (*hoofdstuk 3*). Geen effect van NH₃ begassing werd gemeten op de quantum yield van CO₂-fixatie (QY) en de donker respiratie (R_d) (*hoofdstuk 2 en 3*).

De geringe effecten die in deze twee hoofdstukken werden gevonden zouden mogelijk kunnen duiden op een regulatie mechanisme bij wintertarwe om bij stikstofdepositie via het blad het totaal stikstofgehalte in de planten via de opname van stikstof via de wortels te reguleren en zo op een constante waarde te houden. In het volgende hoofdstuk werd bekeken of bij een zeer hoge concentratie van 1000 ppb dit 'regulatiemechanisme' het totaal stikstofgehalte in de planten constant zou kunnen houden.

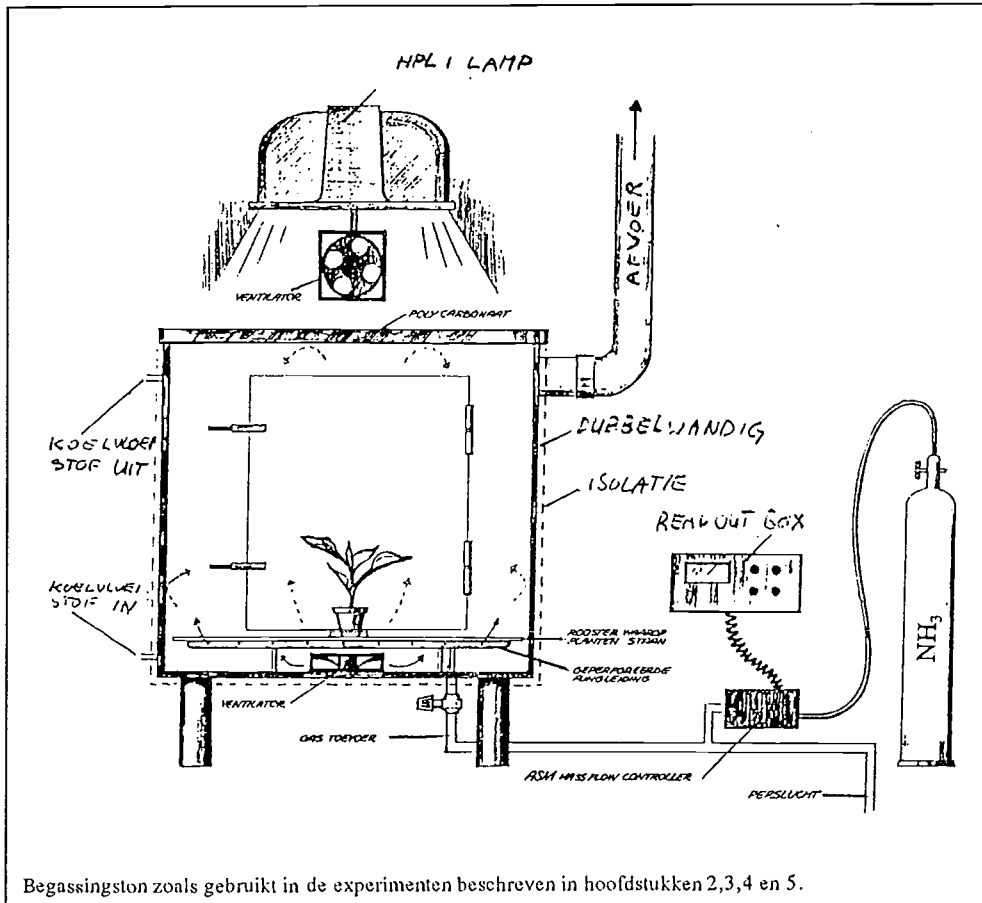
Bij een NH₃ concentratie van 1000 ppb (776 µg m⁻³) werd gedurende een begassingsperiode van 14 dagen bij 18.5°C gevolgd door een begassingsduur van 22 dagen bij 4°C. Bij 18.5° werd een lichte, niet significante, groeistimulatie gemeten. Geen effect werd gemeten op het drogestofgehalte. Er ontwikkelde zich een significant hoger totaal stikstofgehalte in de NH₃ begaste planten. Gedurende de koude-acclimatie was er in de spruit van controle planten sprake van een verdubbeling van het oplosbaar suikergehalte terwijl in de spruit van de NH₃ begaste planten nauwelijks accumulatie van suikers plaatsvond. Metingen aan de vorsttolerantie gaven echter geen verhoogde vorstgevoeligheid bij NH₃ begaste planten te zien. Geconcludeerd werd dat bij wintertarwe de opbouw van vorsttolerantie niet sterk gekoppeld is aan de accumulatie van suikers (*hoofdstuk 4*).

Ook werden effecten van droge NH₃ depositie (400 ppb; 305 µg m⁻³) gedurende 4 weken bestudeerd op grove den onder condities waarbij in de natuur de eerste fase van koude-acclimatie optreedt (17.5°C, 8h fotoperiode, 150 µmol m⁻² s⁻¹). Onder deze condities werd een lichte accumulatie in oplosbare suikers gemeten terwijl het zetmeelgehalte in 4 weken tijd tot bijna 0 daalde. Zowel in het oplosbaar suikergehalte als in het zetmeelgehalte werden geen significante verschillen gemeten. Geconcludeerd werd dat de bij de hydrolyse van zetmeel vrijgekomen glucose-eenheden gebruikt werden als koolstof- en energiebron gezien de zeer geringe toename van het oplosbaar suikergehalte. Metingen aan de vorsttolerantie met behulp van de chlorofylfluorescentie methode gaven geen eenduidig beeld over mogelijke verschillen in vorsttolerantie tussen naalden van controle boompjes en naalden van boompjes begast met NH₃. Het totaal stikstofgehalte lag in naalden van NH₃ begaste boompjes niet significant hoger dan in de naalden van controle boompjes. Wel werd een tweemaal hoger vrij ammonium gehalte gemeten in de NH₃ begaste naalden na een begassingsperiode van 6 weken. Geconcludeerd werd dat het belangrijk is of in planten de activiteit van glutamine synthetase (GS) gestimuleerd wordt onder verhoogde NH₃ depositie. Uit literatuurgegevens bleek dat de GS activiteit van grove den niet verhoogd werd bij groei onder hogere NH₄⁺ concentraties in de bodem. Er werd bij NH₃ begaste naalden van grove den ook een stimulatie van de F_{max} gemeten. Ook wanneer de fotosynthese werd uitgedrukt op chlorofylbasis zodat de stimulatie verklaard kan worden door een verlaagde stomataire weerstand en/of een stimulatie van de RuBisCO-activiteit. Ook hier werd geen effect van NH₃ gemeten op de QY en R_d (*hoofdstuk 5*).

Bijlagen

I Begassingston

De experimenten werden uitgevoerd in twee begassingstonnen waarvan één staat weer-gegeven in onderstaand figuur.



Begassingston zoals gebruikt in de experimenten beschreven in hoofdstukken 2,3,4 en 5.

Planten werden blootgesteld aan een bepaalde NH_3 concentratie of controle lucht in deze roestvrijstalen tonnen welke afgesloten werden door een 2 cm dikke plexiglas plaat. NH_3 werd gemixed met perslucht tot de vastgestelde concentratie met behulp van een 'ASM-mass flow controller' (Bilthoven, Nederland). De doorstroomsnelheid van de lucht in beide tonnen bedroeg 50 l min^{-1} . In de tonnen werd de lucht gecirculeerd door een ventilator met een capaciteit van $0.025 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. De temperatuur in de tonnen werd door de koelvloeistof (wat door de dubbele wand van de ton stroomt) gereguleerd. De relatieve vochtigheid en temperatuur in de tonnen werden weergegeven op een display. Er werden Philips HPI-T 400W lampen gebruikt met een spectrum van 400 tot 700 nm als lichtbron. Door deze lampen qua hoogtestand te wijzigen (of door een kaasdoek over de tonnen te plaatsen) en de lampen aan te sluiten op een tijdschakelaar, konden respectievelijk lichtintensiteit en fotoperiode gereguleerd worden (Bosma *et al.*, 1991).

II Fluorescentiemetingen

Bij het bepalen van vorstschade aan groene planten is bepaling van chlorofyl *a* fluorescentie emissie (naast bepalingen aan de relatieve geleidbaarheid) een goede, niet destructieve, onderzoeksmethode gebleken (Snel *et al.*, 1991). Diverse fluorescentieparameters kunnen worden geanalyseerd voor schadeonderzoek aan fotosystemen of andere celonderdelen zoals membranen waardoor fotochemische processen verstoord kunnen worden. Zo kan schade aan fotosysteem II (inclusief het aan PSII gekoppeld watersplitsend systeem) worden vastgesteld middels afname in de ratio variabele ($F_v = \text{totale fluorescentie } (F_m) - \text{grondfluorescentie } (F_0)$) tegen de maximale fluorescentie (F_m). De ratio F_v/F_m is een maat voor de potentiële fotochemische efficiëntie (fotoinhibitie) van de open PSII-reactiecentra (Krause *et al.*, 1988).

III 1/8 Hoagland-voedingsoplossing

20.85 mM KNO_3
38.52 mM CaNO_3
3.33 mM KH_2PO_4
16.02 mM MgSO_4

IV Voedingoplossing *Pinus sylvestris* (Chrisstersson, 1973)

1.75 mM NH_4NO_3
0.65 mM KH_2PO_4
0.6 mM KCl
1.0 mM CaCl_2
0.6 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
23 μmol ferro-rexonol
3 μmol $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
16 μmol H_4BO_3
0.3 μmol ZnSO_4
0.4 μmol $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0.03 μmol $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Literatuur

- Aronsson, A., Ingestad, T., Lööf, L.G. (1976) Carbohydrate metabolism and frost hardiness in Pine and Spruce seedlings grown at different photoperiods and thermoperiods. *Physiol. Plant.* **36**: 127-132.
- Bervaes, J.C.A.M., Ketchie, D.O., Kuiper, P.J.C. (1978) Cold hardiness of Pine needles and Apple Bark as affected by alteration of day length and temperature. *Physiol. Plant.* **44**: 365-368.
- Besford, R.T. (1984) Some properties of Ribulose Bisfosfaat Carboxylase extracted from Tomato leaves. *Journal of Experimental Botany* **35**, no. 153: 495-504.
- Bosma, W., Butter, M.E., de Kok, L.J. (1991) Plantenschade door zwavelwaterstof. Biologiewinkel Rijksuniversiteit Groningen, rapport **30**.
- Bradstreet, R.B. (1965) The Kjeldahl method for organic nitrogen. Academic press, New York, London.
- Christersson, L. (1973) The effect of inorganic nutrients on water economy and hardiness of conifers. I The influence of varying potassium, calcium and magnesium levels on water content, transpiration rate and the initial phase of development of frost hardiness of *Pinus sylvestris* L. seedlings. *Studia Forestalia Suecica* **103**.
- Christersson, L. (1978) The influence of fotoperiod and temperature on the development of frost hardiness in seedlings of *Pinus silvestris* L. and *Picea abies*. *Physiol. Plant* **44**: 244-294.
- Cowling, D.W. & Lockyer, D.R. (1981) Increased growth of Ryegrass exposed to ammonia. *Nature* **292**: 337-338.
- Davison, A., Barnes, J.D., Renner, C.J. (1988) Interactions between air pollutants and cold stress. In *Air pollution and plant metabolism*, Schulte-Hostede, S., Darrall, N., M., Blank, L.W., Wellburn, A.R., ed., Elsevier Applied Science, London: 307-328.
- van Dijk, H.F.G. & Roelofs, J.G.M. (1988) Effects of excessieve ammonium deposition on the nutritional status and condition of Pine needles. *Physiol. Plant* **73**: 494-501.
- Dueck, Th. A.; Dorèl F.G., ter Horst, R.; van der Eerden, L.J. (1991) Effects of ammonia, ammonium sulphate and sulfur dioxide on the frost sensitivity of Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Water, Air, and Soil Pollution* **54**: 35-49.
- van der Eerden, L.J.M. (1982) Toxicity of ammonia to plants. *Agriculture and environment* **7**: 223-235.

- van der Eerden, L.J.M. (1992) Fertilizing effects of atmospheric ammonia on semi-natural vegetations. Thesis, Free University, Amsterdam; The Netherlands.
- Evans, J.R. (1983) Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* **72**: 297-302.
- Fales, F.W. (1951) The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. *J. Biol. Chem.* **193**, 113-124.
- Flaig, H., Mohr, H. (1992) Assimilation of nitrate and ammonium by the Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) seedling under conditions of high nitrogen supply. *Physiologia Plantarum* **84**: 568-576.
- Gijsman, A.J. (1990) Nitrogen nutrition and rhizosphere pH of Douglas-fir. Thesis, State University of Groningen; The Netherlands.
- Heij, G.T. & Schneider, T. (1991) Acidification research in the Netherlands. *Environmental Science Series* no. **46**. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Hellergren, J. (1981) Frost hardiness development in *Pinus sylvestris* seedlings in response to fertilization. *Physiol. Plant.* **52**: 297-301.
- Hirose, T. & Werger, M.J.A. (1987) Nitrogen use in instantaneous and daily photosynthesis of leaves in the canopy of *Solidago altissima* stand. *Physiologia Plantarum* **70**: 215-222.
- van Hove, L.W.A. (1989) The mechanism of NH₃ and SO₂ uptake by leaves and its physiological effects. Thesis, University of Wageningen; The Netherlands.
- van Hove, L.W.A., van Kooten, O., van Wijk, K.J., Vredenberg, W.J., Adema, E.H., Pieters, G.A. (1991) Physiological effects of long term exposure to low concentrations of SO₂ and NH₃ on Poplar leaves. *Physiologia Plantarum* **82**: 32-40.
- Kamminga-van Wijk, C. (1991) Mycorrhizal and nonmycorrhizal Douglas fir grown in hydroculture. Thesis, University of Groningen; The Netherlands.
- de Kok, L.J., Buwalda, F., Bosma, W. (1988) Determination of cysteine and its accumulation in Spinach leaf tissue upon exposure to excess sulfur. *J. Plant Physiol.*, **112**: 502-505.
- Krause, G.H., Grafflage, S., Rumich-Bayer, S., Somersalo, S. (1988) Effects of freezing on plant mesophyll cells. In *Plant and temperature*, 311-327. Long, S.P., Woodward, F.I., ed., society for experimental biology 1988, Cambridge, Company Biologist LTD, UK.
- Levitt, J. (1978) An stress overview of freezing injury and survival, and its interrelationships to other stresses. In *Plant cold hardiness and freezing stress, mechanisms and crop implications*, **2**: 3-15. Li, P.H., Sakai, A., ed., Academic Press, New York.

- Lichtenthaler, H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of the photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **148**: 350-382.
- Lockyer, D.R. & Whitehead, D.C. (1986) The uptake of gaseous ammonia by the leaves of Italian Ryegrass. *Journal of Experimental Botany* **37**, no. 180, pp. 919-927.
- LUVVO (1984) Emissie van ammoniak in Nederland. Publikatierreeks lucht **22** van het ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer.
- Maas, F.M., De Kok, L.J., Peters, J.L., Kuiper, P.J.C. (1987) A comparative study on the effects of H₂S and SO₂ fumigation on the growth and accumulation of sulphate and sulphhydryl compounds in *Trifolium pratense* L., *Glycine max* Merr. and *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.*, **38**:1459-1469.
- Nilgård, B. (1985) The ammonium hypothesis -An additional explanation to the forest dieback in Europe. *Ambio* **14**: 2-8.
- Paul, J.S., Cornwell, K.L., Bassham, J.A. (1978) Effects of ammonia on carbon metabolism in photosynthesizing isolated mesophyll cells from *Papaver somniferum* L. *Planta* **142**: 49-54.
- Pérez Soba, M. (1990) Effects of NH₃ on the nitrogen metabolism of *Pinus sylvestris* L. In *Effects of NH₃ and (NH₄⁺)₂SO₄ deposition on terrestrial semi-natural vegetation on nutrient-poor soils*. Project 124/125, phase II, Dutch priority programme on acidification.
- Platt, S.G., Plaut, Z., Bassham, J.A. (1977) Ammonia regulation of carbon metabolism in photosynthesizing leaf discs. *Plant Physiol.* **60**: 739-742.
- Schneider, T. & Bresser, A.H.M. (1987) Verzuringsonderzoek eerste fase. Tussentijdse evaluatie augustus 1987. Dutch priority programme on acidification, report no. **00-04** RIVM, Bilthoven, The Netherlands.
- Snel, J.F.H., van Kooten, O., van Hove, L.W.A. (1991) Assessment of stress in plants by analysis of photosynthetic performance. *Trends in analytical chemistry*, **10** no. 1: 26-30.
- Stuiver, C.E.E., de Kok, L.J., Kuiper, P.J.C. (1991) Freezing tolerance and biochemical changes in Wheat shoots as affected by H₂S fumigation. *Plant Physiol. Biochem.*, **30** (1), 47-55.
- de Temmerman, L., Ronse, A., van den Cruys, K., Meeus-Verdinne, K. (1988) Ammonia and Pine dieback in Belgium. In: *Air pollution and ecosystems*, P.Mathy (ed.). Reidel Publ. Comp., Dordrecht, The Netherlands: 774-779.
- Trunova, T.I. (1982) Mechanism of winter wheat hardening at low temperatures. In *Plant cold hardiness and freezing stress, mechanisms and crop implications*, **2**: 41-54, Li, P.H., Sakai, A., ed., Academic Press, New York.

Vollbrecht, P., Klein, E., Kasemir, H. (1989) Different effects of supplied ammonium on glutamine synthetase activity in Mustard (*Sinapis alba*) and Pine (*Pinus sylvestris*) seedlings. *Physiologia Plantarum* 77: 129-135.

Weatherburn, M.W. (1967) Phenol-Hypochlorite Reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39, no.8: 971-974.