

Hoe werkt een Kalanchoë?

Kennisontwikkeling voor een optimale energiezuinige teelt



Juli 2018

G. Trouwborst, S.W. Hogewoning & R. Muilwijk

Hoe werkt een Kalanchoë?

Kennisontwikkeling voor een optimale energiezuinige teelt

Juli 2018

G. Trouwborst, S.W. Hogewoning & R. Muilwijk
Plant Lighting B.V.
Veilingweg 46
3981 PC Bunnik

info@plantlighting.nl
www.plantlighting.nl

REFERAAT

G. Trouwborst, S.W. Hogewoning & R. Muilwijk. 2018. Hoe werkt een Kalanchoë? Kennisontwikkeling voor een optimale energiezuinige teelt. Plant Lighting B.V., Bunnik. 40p.

© 2018 Plant Lighting B.V.

Dit rapport is tot stand gekomen in opdracht van het programma Kas als energiebron en de gewascommissie Kalanchoë. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Plant Lighting B.V. en de bovengenoemde opdrachtgevers.

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

Inhoudsopgave

SAMENVATTING.....	5
DANKWOORD.....	7
1 INLEIDING	8
1.1 Probleemstelling	8
1.2 CAM-mechanisme bij Kalanchoë	9
1.2.1 Soorten CAM-mechanismen	9
1.2.2 Klassieke CAM-fotosynthese	10
2 MATERIAAL EN METHODEN.....	12
2.1 Plantmateriaal en teelt	12
2.2 Behandelingen.....	14
2.3 Klimaat.....	14
2.4 Belichting	14
2.5 Tijdslijn proef	15
2.6 Metingen.....	15
2.6.1 Werking van de CAM-toets	16
3 RESULTATEN	18
3.1 CAM-toets.....	18
3.1.1 Metingen lange dag.....	18
3.1.2 Metingen korte dag	19
3.2 Licht en CO ₂ -response Kalanchoë in de C ₃ -fase	21
3.3 Verschuiving van C ₃ naar CAM-fotosynthese.....	22
3.3.1 Verloop C ₃ -fotosynthese in de ochtend gedurende de teelt	22
3.3.2 24-uursmetingen Kalanchoë – overgangsfase C ₃ -CAM	22
3.4 CAM-fase: 24-uursmetingen Kalanchoë.....	26
3.5 Vergelijking productiviteit C ₃ en CAM	30
3.6 Belichting aan het begin en einde van de dag	30
3.7 Eindoogst.....	32
4 CONCLUSIES EN SLOTBESCHOUWING	35
4.1 Conclusies.....	35
4.2 Slotbeschouwing.....	36
REFERENTIES.....	38
BIJLAGE 1. INLEIDING FOTOSYNTHESE.....	39

Samenvatting

Inleiding

Kalanchoë is het op één na grootste product binnen de categorie bloeiende potplanten. Over de bijzondere fysiologische eigenschappen van dit gewas is nog veel onbekend. Behalve dat Kalanchoë een korte-dag plant is, kent dit gewas ook twee verschillende vormen van fotosynthese: C3 en CAM. Jonge planten functioneren in het algemeen als C3 (CO₂ opname overdag, net als tomaat of roos) en oudere planten switchen (mogelijk) op den duur naar CAM (CO₂ opname 's nachts, net als cactus of Phalaenopsis). Het doel van dit onderzoek was om meer inzicht te verkrijgen in de werking van het CAM-mechanisme bij Kalanchoë blossfeldiana hybriden. De volgende onderzoeksvragen kwamen aan bod:

1. Wanneer vindt de overgang van C3 naar CAM precies plaats?
2. Kan de tuinder dit moment beïnvloeden met klimaatsturing?
3. Is het moment van switchen van C3 naar CAM ook genetisch bepaald?
4. Welke fase zet CO₂ en licht het meest efficiënt om in groei?

Materiaal en methoden

Er zijn drie cultivars onderzocht: 'Siberia', 'Amarillo' en 'Saja'. De planten werden gekweekt in klimaat-units van Plant Lighting onder een combinatie van kunstzonlicht (wintersimulatie, 2.3 mol PAR/dag) en SON-T (90 µmol/m²/s PAR, in de korte dag fase gedurende 10 uur, dat is 3.2 mol PAR/dag). Totaal dus 5.5 mol PAR per dag in de korte dag fase. Als behandeling werd een verschil in RV aangehouden: 55-60% ten opzichte van 80% (*in duplo*). Wekelijks werd met fotosynthese-apparatuur gescreend of planten switchten naar CAM-fotosynthese. In de eindfase werd met 24-uursmetingen de CO₂-opname per dag bij beide behandelingen bepaald.

Conclusies

- De proef startte met onbewortelde kopstekken, deze hebben vervolgens drie weken in de lange dag gestaan. De net gesneden stekken bleken als C3 te functioneren. Op het moment van aanslaan zo'n 14 dagen later, was er CAM-activiteit. Deze activiteit verminderde in de drie weken die daarna volgden. De laagste CAM-activiteit was na twee weken in de korte dag. Na drie weken korte dag nam de CAM-activiteit geleidelijk weer toe. Uit 24-uursmetingen van de CO₂-opname bleek dat de eerste stap naar het CAM-proces het vastleggen van de nachtelijke respiratie in malaat (CAM-cycling) is. Midden op de dag werd dit malaat weer afgebroken. Dit was te zien aan een dal in de CO₂-opname midden op de dag, terwijl de lichtbenutting van de fotosynthese (ETR) juist het hoogst lag. Naarmate de tijd vorderde, werd de CO₂-opname in de nacht steeds hoger en het dal in de CO₂-opname midden op de dag steeds dieper en breder. Uiteindelijk verliepen de eerste twee uur en de laatste drie uur van de dag via directe C3-fotosynthese (CAM-fase II en IV) en waren ~4 tot 5 uur midden op de dag de huidmondjes gesloten (CAM-fase III). De overgang van C3- naar klassieke CAM-fotosynthese verloopt dus heel geleidelijk.

- Een kweker kan niet zozeer het moment van overgang naar CAM beïnvloeden, maar wel de mate. Tijdens de overgangsfase van C3 naar CAM-cycling naar klassiek CAM (zoals hierboven beschreven) was onder hoge RV de C3-fotosynthese in de ochtend en middag iets hoger en de middagdip minder diep. Ook tijdens de CAM-fase later in de teelt lag de CO₂-opname hoger, deels ook door een hogere CO₂-opname overdag.
- De invloed van genetica hierop was relatief gering tussen de verschillende onderzochte cultivars. Tijdens de gesimuleerde winterse omstandigheden waren er geen heel opvallende verschillen tussen de drie cultivars. 'Amarillo' neigde wel als eerste naar CAM terwijl uiteindelijk bij 'Siberia' 75-85% van de CO₂-opname per etmaal via de nachtelijke CO₂-opname verliep en dit bij 'Amarillo' en 'Saja' op ~60% lag.
- De 100% C3-fase is fors productiever per eenheid bladoppervlak dan de CAM-fotosynthese. Dit ligt in orde van 0.26-0.29 mol CO₂-opname per dag in de C3-fase versus 0.15-0.20 mol CO₂-opname per dag tijdens de CAM-fase.

RV of beter dampdrukdeficit (VPD) bleek een factor te zijn in productiviteit van Kalanchoë. Onder een hogere RV stonden de huidmondjes verder open dan onder een lagere RV. Tijdens de C3-fase lag de fotosynthese in orde van zo'n 10% hoger. Tijdens de CAM-fase leverde een hogere RV 9-26% in dagsom aan fotosynthese op. Uiteindelijk was ook het plantgewicht 5-15% zwaarder onder een hogere RV. In deze proef was de RV 55-60% versus 80%. In de praktijk kan, zeker in het vroege voorjaar, de RV dalen tot rond de 40%. Naar verwachting zal dit dan een groter verlies aan fotosynthese opleveren.

Besparen op belichting aan de randen van de dag kan gedaan worden tijdens de CAM-fase van de teelt. De CO₂-opname bleek pas 15-25 minuten na start van de belichting op gang te komen. Hier kan rekening mee worden gehouden door—in geval dat de belichting schakelbaar is—de belichting trager op te schakelen naar een hoger lichtniveau. Aan het einde van de dag is het raadzaam om niet een te hoge lichtintensiteit te geven: Op bladniveau niet hoger gaan dan 180 μmol/m²/s PAR. Vergeleken met de teelt van Phalaenopsis is de potentiële besparing aan de randen van de dag echter beperkt.

Voor de CAM-fotosynthese geldt dat CO₂-dosereren zinloos is als de huidmondjes dicht zijn. In deze proef waren tijdens de CAM-fase later in de teelt de huidmondjes gesloten tussen ongeveer 10:00 en 14:30 uur. Dit zijn juist de uren dat de zon het hoogst staat, de ramen open staan en CO₂-dosering het minst effectief is. Hier kan dus CO₂ bespaard worden. Bovenstaande geldt echter alleen voor de CAM-fase en niet voor de C3-fase. Vanuit het oogpunt van CO₂-besparing is het dus nuttig om de teelt van Kalanchoë ook tijdens de korte dag te compartimenteren—de lange dag wordt al in een aparte ruimte uitgevoerd. Door middel van een eenvoudige scheidingswand kan ervoor gezorgd worden dat gedurende het eerste deel van de teelt er wel de hele dag (overdag, bij licht) CO₂-gedoseerd wordt, terwijl in het laatste deel van de teelt er midden op de dag geen CO₂ hoeft gedoseerd te worden en aan de randen van de dag en in de nacht juist wel.

Dankwoord

Dit rapport geeft de resultaten weer van een onderzoek naar de fotosynthese van Kalanchoë. Het onderzoek vond plaats in de klimaatunits van Plant Lighting. Dit onderzoek is ondersteund door het programma 'Kas als Energiebron', gefinancierd door het Ministerie van EZ en LTO Glaskracht Nederland en door de gewascoöperatie Kalanchoë.

We willen een aantal personen nog met name hartelijk bedanken voor hun bijdrage aan dit project. Jan de Zwaan (Slijkerman Kalanchoë), Jeroen van Dijk (SV.CO) en Ike Vlieland (Dümmen Orange) voor teeltadvies, meedenken over de proef, levering plantmateriaal en bemesting. De overige leden van de gewascoöperatie worden bedankt voor hun input tijdens de grotere bijeenkomsten en hun financiële bijdrage aan dit project. Arthur van den Berg (LTO Glaskracht Nederland) wordt bedankt voor het coördineren van de BCO's. Als laatste willen we de onderzoekscoördinatoren Dennis Medema en Leo Oprel van het programma Kas als Energiebron bedanken voor hun steun bij de totstandkoming en uitvoering van dit project.

Juli 2018,

Govert Trouwborst, Sander Hogewoning & Richard Muilwijk

1 Inleiding

1.1 Probleemstelling

Kalanchoë is het op één na grootste product binnen de categorie bloeiende potplanten. Over de bijzondere fysiologische eigenschappen van dit gewas is nog veel onbekend. Behalve dat Kalanchoë een korte-dag plant is, kent dit gewas ook twee verschillende vormen van fotosynthese: C3 en CAM. Jonge planten functioneren in het algemeen als C3 (CO₂ opname overdag, net als tomaat of roos) en oudere planten switchen (mogelijk) op den duur naar CAM (CO₂ opname 's nachts, net als cactus of Phalaenopsis).

Een aantal fysiologische eigenschappen die bepalend zijn voor een optimale energiezuinige teelt zijn nog niet of onvoldoende bekend:

1. Wanneer vindt de overgang van C3 naar CAM precies plaats? Of gebeurt dit niet altijd?
2. Kan de tuinder dit moment beïnvloeden met klimaatsturing?
3. Is het moment van switchen van C3 naar CAM ook genetisch bepaald, met andere woorden, verschilt het misschien ook per ras en per veredelaar?
4. Welke fase zet CO₂ en licht het meest efficiënt om in groei? Men gaat er vaak vanuit dat de C3-fase het meest efficiënt is. Maar bij een nachtlengte van 14 uur is dat nog maar de vraag, want de plant heeft daardoor veel tijd voor opslag van CO₂ als malaat.

Een beter begrip van de fysiologie geeft tuinders de mogelijkheid om efficiënter licht en CO₂ te benutten voor groei. Mogelijk kan worden gestuurd op een zo lang mogelijke periode C3 of CAM, afhankelijk van welke periode het meest effectief is. Daarnaast kan de veredeling wellicht op basis van deze gegevens gericht gaan werken aan een zo efficiënt mogelijke plant.

Belichting en CO₂ dosering kan op basis van een antwoord op bovengenoemde vragen ook worden afgestemd op de optimale strategie per fase. Dit zou forse besparingen op kunnen leveren. Zo kan als het switch-moment bekend is, een besparing op CO₂ tot 50% worden gerealiseerd door gebruik te maken van een tussenwand tussen planten in de C3 fase (overdag CO₂ doseren) en de CAM-fase ('s nachts CO₂ doseren). De mogelijk te behalen besparing zal afhankelijk zijn van hoe scherp de switch tussen C3 en CAM is. Ook de belichting kan mogelijk worden gereduceerd: In de CAM-fase is meer licht dan benodigd om het in de nacht opgeslagen CO₂ om te zetten in suikers waarschijnlijk niet zinvol. Hoeveel dat is en of dat zo werkt is nog niet bekend. Bij CAM-plant Phalaenopsis bleek bijvoorbeeld dat fors (>30%) op elektra bespaard kan worden door licht te dimmen in de vroege ochtend en namiddag, omdat de plant het licht dan niet goed kan benutten (Trouwborst *et al.* 2016). Als een vergelijkbaar principe ook voor Kalanchoë geldt, kan ook bij dit gewas bespaard worden aan de randen van de dag.

Kortom, er is nog weinig bekend over de fysiologie van Kalanchoë. Met een antwoord op bovengenoemde vragen, kunnen elektra en CO₂ efficiënter worden ingezet (besparing per m²). Als ook het switch-moment beïnvloedt kan worden, dan kan de productiviteit mogelijk ook worden verhoogd door te sturen op de meest effectieve fase.

1.2 CAM-mechanisme bij Kalanchoë

De meeste tuinbouwgewassen hebben het zogeheten C₃-metabolisme, waarbij overdag CO₂ wordt opgenomen door de bladeren en met behulp van energie uit licht wordt vastgelegd in suikers. Bij jonge Kalanchoë's is dit ook het geval. Naarmate de plantleeftijd vordert, schakelt de Kalanchoë over op het CAM-metabolisme¹ (Crassulacean Acid Metabolism). CAM wordt gekenmerkt door een nachtelijke CO₂-opname.

1.2.1 Soorten CAM-mechanismen

In de literatuur worden drie gradaties CAM van zwak tot sterk onderscheiden (Matiz et al. 2013):

- CAM-cycling: Overdag C₃-fotosynthese met huidmondjes open en 's nachts wordt de CO₂ die vrijkomt door respiratie vastgelegd als malaat. De bladeren zijn dus 's ochtends licht zuur. Overdag wordt het malaat weer afgebroken.
- Klassiek CAM: Hier zijn de vier CAM-fasen van toepassing, deze worden toegelicht in 1.2.2.
- CAM-idling: De huidmondjes zijn dag en nacht gesloten, netto is er dus geen CO₂-opname en groei. Dit kan voorkomen bij extreme droogte.

Een ander onderscheid wat men tegenkomt in de literatuur, is het onderscheid tussen facultatief en obligaat CAM. De exacte begrenzing tussen beide begrippen is moeilijk aan te geven. Over het algemeen kunnen facultatieve CAM-planten switchen tussen C₃ en klassiek CAM onder invloed van omgevingsfactoren, ongeacht de plant- of bladleeftijd (juveniel of adult). Obligate CAM-planten zijn vaak als juveniele plant C₃ (en soms facultatief CAM), maar als adulte plant zijn ze klassiek CAM en kunnen ze niet meer terug naar C₃ (Matiz *et al.* 2013). Volgens de literatuur is Kalanchoë zo'n plant die als C₃ begint (lange dag) en eindigt als CAM-plant (korte dag; Rustin en Claret, 1985). CAM-cycling kan gezien worden als het eerste stadium in de overgang van C₃ naar klassiek CAM (Borland *et al.* 2011).

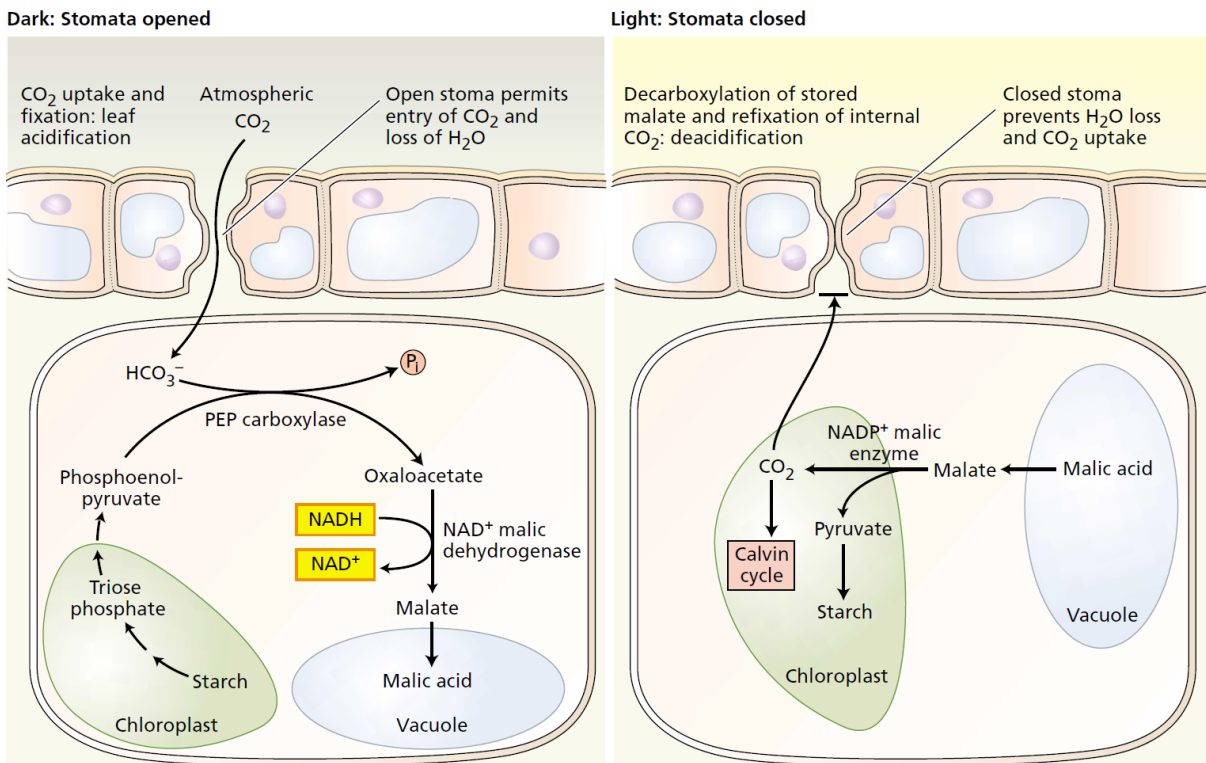
¹ In diverse Nederlandstalige rapporten is al aandacht besteed aan hoe de CAM-fotosynthese verloopt, zoals:

- Warmenhoven *et al.* 2003: CO₂ opname bij Kalanchoe;
- Warmenhoven *et al.* 2005: Crassulaceën-metabolisme in Kalanchoë
- Trouwborst *et al.* 2013: Meer rendement uit belichting en CO₂ bij Kalanchoe.
- Trouwborst *et al.* 2014: Minder belichten Phalaenopsis zonder productieverlies?

Hoofdstuk 1.2 is een bewerking van een bijlage uit Trouwborst *et al.* 2014.

1.2.2 Klassieke CAM-fotosynthese

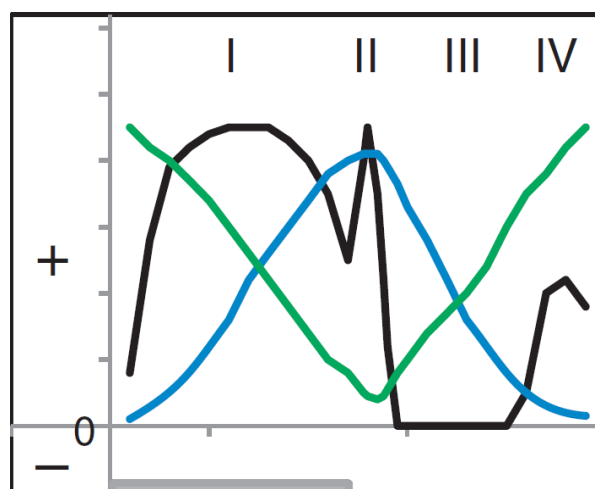
Bij CAM-planten zijn overdag de huidmondjes dicht en staan ze 's nachts open (Figuur 1). 's Nachts wordt de CO₂ via het enzym PEPc (fosfo-enol-pyruvaat carboxylase) opgenomen en vervolgens vastgelegd als malaat (appelzuur) in de vacuole. Overdag wordt het malaat afgebroken en stijgt de CO₂ concentratie binnenin het blad tot zeer hoge waarden. Het CO₂ wordt vervolgens via de normale C₃-fotosynthese vastgelegd als suiker: Het enzym Rubisco legt met behulp van lichtenergie CO₂ vast als suikers.



Figuur 1. Schematische tekening van de werking van CAM-fotosynthese. 's Nachts zijn de huidmondjes geopend (links) en wordt CO₂ door middel van PEP-carboxylase vastgelegd als malaat (appelzuur). Overdag (rechts) zijn de huidmondjes gesloten, komt het CO₂ weer vrij uit het malaat en wordt vervolgens vastgelegd door Rubisco in de Calvin Cyclus. Bron: Taiz & Zeiger, 2010.

Het 'klassieke mechanisme' van de CAM-fotosynthese kan opgedeeld worden in 4 fasen (Figuur 2):

- *Fase I, Nacht:* Tijdens de nacht zijn de huidmondjes open en wordt CO₂ opgenomen. Door middel van het enzym PEPc wordt CO₂ vastgelegd als malaat (appelzuur) en opgeslagen in de vacuole.
- *Fase II, Nacht-dag overgang:* Deze fase is kort en niet altijd duidelijk aanwezig. Hierbij zijn de huidmondjes (nog) open terwijl de dag begint. Op dat moment is er reeds een kleine hoeveelheid licht aanwezig. De plant zal op het einde van deze fase zijn huidmondjes sluiten. In deze fase is het mogelijk dat er direct CO₂ wordt gebonden aan Rubisco (directe C3-fotosynthese).
- *Fase III, Overdag:* De huidmondjes zijn gesloten. CO₂ wordt vrijgemaakt uit malaat, waarbij het interne CO₂-gehalte in het blad stijgt tot zeer hoge waarden. Met behulp van lichtenergie wordt deze CO₂ vastgelegd als suikers via het enzym Rubisco (indirecte C3-fotosynthese).
- *Fase IV, Dag-nachtovergang:* De huidmondjes gaan open. In deze fase is het mogelijk dat er direct CO₂ wordt gebonden aan Rubisco (directe C3-fotosynthese).



Figuur 2. Voorbeeld vier fasen van CAM-fotosynthese. CO₂-opname=zwart; malaatconcentratie=blauw; suikerconcentratie=groen. NB de ochtend- en middagpiek (respectievelijk CAM-fase II en IV) in de zwarte lijn wordt niet altijd aangetroffen! (bron: Borland et al, 2011).

Bovenstaande fasen-verdeling maakt duidelijk dat tijdens de fase dat Kalanchoë klassiek CAM is, er nog steeds C3-fotosynthese in de CAM-fasen 2 en 4 kan voorkomen. In hoeverre dit bij Kalanchoë een rol speelt is nog onbekend. Voor de belichting en CO₂-dosering is of er wel of niet lichtafhankelijke fotosynthese ('directe C3-fotosynthese') plaatsvindt gedurende fase II en IV een belangrijke vraag. Gedurende deze twee fasen kan er concurrentie om CO₂ plaats vinden door de enzymen Rubisco en PEPc. Rubisco kan direct CO₂ binden voor de fotosynthese (lichtafhankelijk). PEPc bindt CO₂ onafhankelijk van licht. De affiniteit om CO₂ te binden, is bij PEPc vele malen groter dan bij Rubisco. Hier tegenover staat dat PEPc uitgeschakeld kan zijn. Als PEPc gedurende die twee fasen dominant is, dan heeft belichting dus weinig direct nut voor extra suikerproductie. Indirect kan er door belichting mogelijk een signaal gegeven worden voor de grootte van de malaatpool.

2 Materiaal en methoden

2.1 Plantmateriaal en teelt

Het plantmateriaal was afkomstig van drie veredelaars. Om de voorgeschiedenis te neutraliseren zijn er stekken genomen en beworteld bij Slijkerman Kalanchoë. Na beworteling zijn er van alle drie de cultivars kopstekken genomen (Foto 1) die 23 januari geplant zijn bij Plant Lighting. De cultivars (allen Kalanchoë Blossfeldiana hybriden) verschillen in groeisnelheid, reactietijd en warmtetolerantie:

- 'Siberia', dubbelbloemig, wit; Slijkerman Kalanchoë, reactietijd ~9-10 weken.
- 'Don Amarillo', gevuldbloemig, geel, snel; KP Holland gemiddelde reactietijd ~8-9 weken.
- 'Saja', enkelbloemig, geel, hitte tolerant; Dümmer Orange, ~reactietijd 9 weken.



Foto 1. Kopstekken van bewortelde stekken, cv. 'Siberia'. De ronde gaatjes in de bladeren zijn veroorzaakt door het nemen van bladponsjes voor de CAM-toets. Foto 24 januari 2018.

Zie Tabel 1 voor de specificaties van de teelt. Elke klimaatunit was identiek ingericht volgens Foto 2.

Tabel 1. Teeltdetails

Dichtheid	48 planten per m ²
Substraat	BvB potgrond: 50% kokos/50% veen
Potmaat	10.5 cm (400 stuks)
Watergift	De watergift is naar behoefte uitgevoerd. Een gemiddelde watergift was 20 L per m ² via eb/vloed voor ongeveer 10 minuten. Hierdoor werden de potten vochtig, maar niet door en door nat. Gedurende de teelt werd er bij de laag RV behandeling eens in de 3-4 dagen een watergift gegeven. Bij de hoog RV behandeling was dit eens in de 5-6 dagen.
Voeding	De voedingsoplossing voor de lange dag had een EC van 2.8 mS, de voedingsoplossing voor de korte dag had een EC van 3.0 Beide werden in geconcentreerde vorm (A en B) aangeleverd door Slijkerman. De voedingsoplossing had een pH van 5.6-5.7
Overige	Standaard remmiddelen toegepast, geleverd door Slijkerman <ul style="list-style-type: none">• LD-remming met Tilt en Cycocel (3^e week LD)• KD-remming met Alar en Cycocel rond (4^e week KD)



Foto 2. Inrichting klimaatunit van 2m² met drie cultivars Kalanchoë: 'Siberia' (links: geel etiket), 'Amarillo' (midden: wit etiket), 'Saja' (rechts: blauw etiket). Foto 8 februari 2018.

2.2 Behandelingen

Dit experiment is uitgevoerd in een klimaatcel van Plant Lighting te Bunnik. Binnen deze klimaatcel staan afzonderlijke klimaatunits (2m² ieder) wat het o.a. mogelijk maakt om verschillende behandelingen te realiseren waarbij de overige klimaatcondities identiek zijn.

Er werden twee RV behandelingen in tweevoud uitgevoerd (4 klimaatunits).

- RV 55-60%
- RV 80-85%

2.3 Klimaat

Zie tabel 2 voor de gerealiseerde klimaatinstellingen.

Tabel 2. Klimaatinstellingen

Parameter	Etmaal	Dag	Nacht
Temperatuur (°C)	19.5	21	19
CO ₂ (ppm)	700	700	700

2.4 Belichting

Het daglicht rond de kortste dag in Nederland is met daglichtsimulatoren gesimuleerd (lichtsom ~2.3 mol/m²/dag, 8:30-16:30, 80 μmol/m²/s). Door middel van bijbelichting met SON-T lampen werd er drie weken een lange dag en 10-12 weken een korte dag gegeven (Foto 3):

1. Lange dag: 16 uur (2:00-18:00, 90 μmol/m²/s, 5.2 mol/dag)
2. Korte dag: 10 uur (8:00-18:00, 90 μmol/m²/s, 3.2 mol/dag)

Tijdens de eerste 5 dagen van de bewortelingsfase was de lichtintensiteit SON-T 40 μmol/m²/s (2.3 mol/dag).



Foto 3. Impressie van de belichting in de vier kweekunits. In het midden hangt het kunstmatig zonlicht, ernaast hangen twee SON-T lampen. Tussen de lampen en de planten hangt een diffuus makende folie.

2.5 Tijdslijn proef

In tabel 3 staan de belangrijkste teelthandelingen vermeld.

Tabel 3. Tijdslijn proef.

datum	handeling
23-1-2018	Aankomst kopstekken Kalanchoe, cv 'Siberia', 'Amerillo' en 'Saja', lichtintensiteit SON-T op 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, RV op ~75%. Lange Dag.
29-1-2018	Lichtintensiteit SON-T 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, RV op ~75%.
8-2-2018	Inzet behandelingen, laag en hoog RV
12-2-2018	toediening remmiddel (tilt+cycocel)
14-2-2018	start korte dag Kalanchoe
13-3-2018	remmiddel alar + cycocel (alle drie de cultivars)
20-3-2018	remmiddel alar + cycocel (alle drie de cultivars)
4-4-2018	remmiddel alar + cycocel (alleen 'Siberia')
4-4-2018	start 24-uursmetingen CAM-fotosynthese
18-4-2018	'Saja' en 'Amerillo' veiltrijp
23-4-2018	eindogst 'Saja' en 'Amerillo'
7-5-2018	'Siberia' veiltrijp, eindogst

2.6 Metingen

De volgende metingen zijn uitgevoerd:

- Malaat via de CAM-toets (zie par 2.6.1): stekstadium (altijd ochtend en ook middagmeting als check of er malaat-afbraak is) bij start en net na beworteling tot dag 42 KD.
- Wekelijkse screeningsmetingen voor toetsing C3 of CAM met de Li-6400 draagbare fotosynthesemeter, halve dagen, start na beworteling tot dag 49 KD (Foto 4).
- Etmaalmetingen met de Li-6400 draagbare fotosynthesemeter tijdens de CAM-fase (CO₂ opname, lichtbenutting, huidmondjes-geleidbaarheid).
- Vers- en Drooggewicht einde teelt

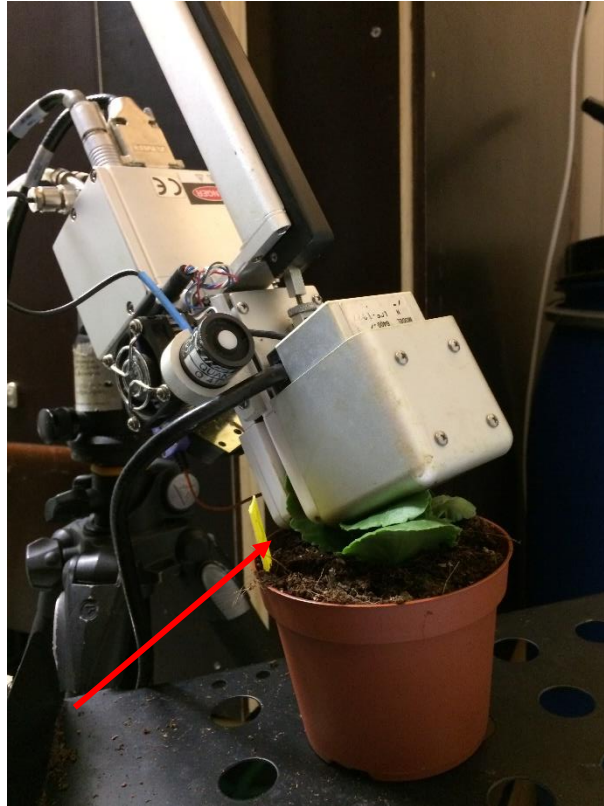


Foto 4. Li-6400 draagbare fotosynthesemeter voor het meten van de CO₂ opname (fotosynthese) in de praktijk. In het apparaat kunnen PAR, CO₂, temperatuur en vocht gevarieerd worden. Met dit apparaat is wekelijks nagegaan of er overdag C3-fotosynthese plaats vond. Tevens is in de C3-fase de fotosynthese-snelheid gemeten bij oplopend PAR of CO₂ aan een ingeklemd blad (rode pijl). Gedurende de CAM-fase werd de meter 24 uur per dag aangesloten op een blad. Foto 13 februari 2018.

2.6.1 Werking van de CAM-toets

De CAM-toets is gebaseerd op vloeistof met pH-indicator. Hiermee kan kwalitatief worden aangetoond of er sprake is van het CAM-mechanisme in bladeren. De test is gebaseerd op de pH van een bladponsje die in een oplossing direct een kleuromslag laat zien. Het testresultaat is dus direct zichtbaar.

Zoals genoemd in hoofdstuk 1.2 nemen CAM-planten in de nacht CO₂ op dat vastgelegd wordt in malaat (appelzuur). Door de malaatopbouw in de nacht zakt de pH van de bladeren van ongeveer 6.5 aan het eind van de dag tot ongeveer 4 tot 4.5 aan het einde van de nacht. Door aan het einde van de dag en 's ochtends de pH van bladponsjes te bepalen kan worden nagegaan of het CAM-mechanisme in bladeren werkt of niet. Hierbij moet worden opgemerkt dat er wel kan worden aangetoond dat er een werkend CAM-mechanisme aanwezig is, maar niet of er sprake is van klassiek CAM, of van CAM-cycling waarbij er feitelijk de hele dag C3-fotosynthese gaande is (zie paragraaf 1.2).

Werkwijze:

Met een pipet worden enkele gaten van het microwell-plaatje met neutrale indicatorvloeistof (rood) gevuld. Er worden bladponsjes met een kurkboor genomen en in de vloeistof gedaan.

Vervolgens worden de bladponsjes geplet zodat het sap van de bladeren zich mengt met de vloeistof. Het resultaat wordt direct genoteerd of vastgelegd via een foto (als voorbeeld, zie Foto 5).

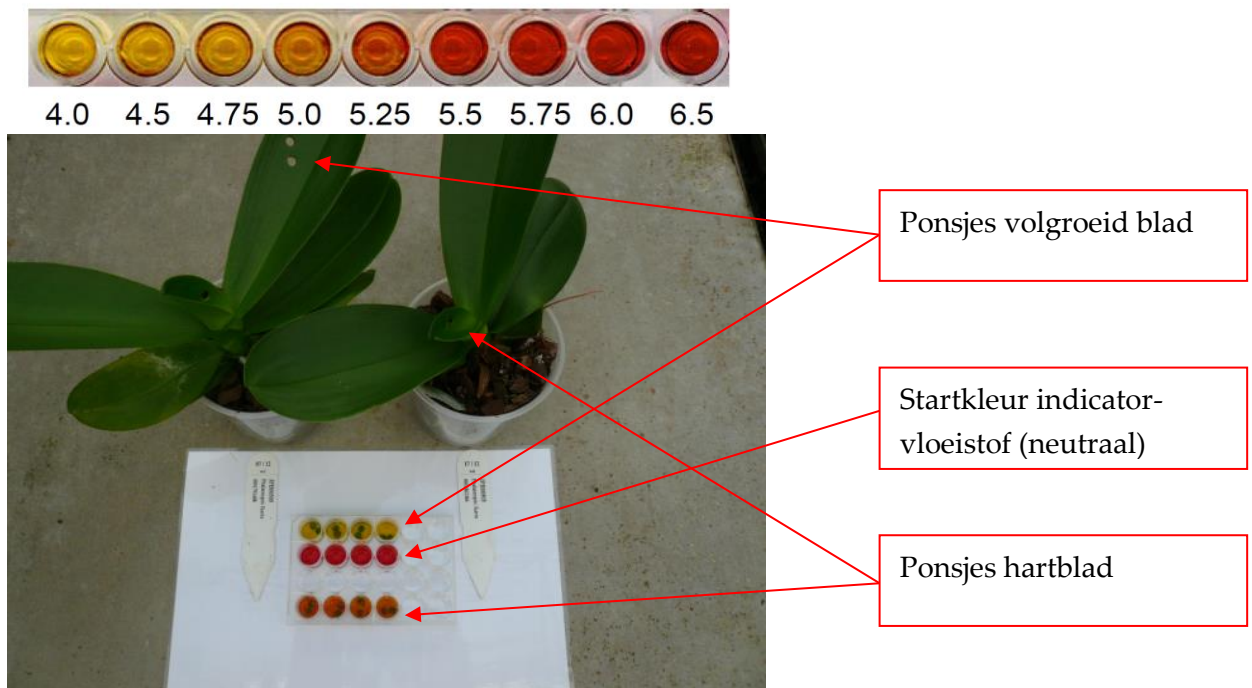


Foto 5. Kleurindicator met bijbehorende pH en toepassing van de CAM-toets bij *Phalaenopsis* 'Ikaria' vroeg in de ochtend. De volgroeide bladeren kleurden de rode neutrale vloeistof direct geel (zuur), conclusie: bladeren hebben CAM-fotosynthese. De hartbladeren kleurden de vloeistof oranje, conclusie: waarschijnlijk ook al CAM-fotosynthese met nog maar een kleine malaatopbouw in de nacht (Trouwborst et al. 2013b).

3 Resultaten

3.1 CAM-toets

3.1.1 Metingen lange dag

Bij start van de proef is de malaattoets uitgevoerd aan de bewortelde stekken in de tray en aan de onbewortelde kopstekken (1 dag bewaring). De CAM-toets liet geen enkele vorm van verkleuring zien. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de (on)bewortelde stekken geen malaatopslag hadden, en dus volledig als C3-plant functioneerden. Warmerhoven *et al.* (2005) daarentegen vonden bij de onbewortelde stekken wel malaatopslag. Vermoedelijk was er in onze proef geen malaat aanwezig vanwege het feit dat er weer kopstekken zijn genomen van bewortelde stekken (dus stek van stek). Mogelijk had de bewortelde stek waarvan de stekken genomen waren wel CAM-activiteit tijdens de bewortelingsfase (zie onder).

De net bewortelde stekken (Foto 6, 14 dagen na start) lieten 's ochtends wel een kleuromslag zien van rood naar geel, dus malaatopslag. Tegen het einde van de dag werd er geen kleuromslag waargenomen. Dit duidt erop dat er 's ochtends malaat aanwezig was en 's middags niet meer. Hier functioneert dus het CAM-mechanisme.

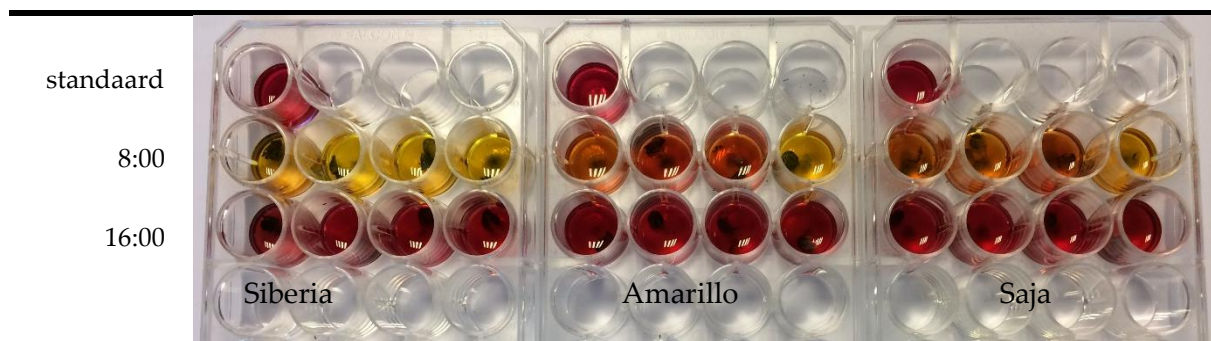


Foto 6. Resultaat malaattoets op net bewortelde stekken (14 dagen na planten), van links naar rechts 'Siberia', 'Amarillo', 'Saja'. De bladeren zijn 's ochtends duidelijk zuur (geel) en 's middags niet meer zuur (rood). Dit duidt op CAM-activiteit. NB de dag begon om 2:00 's nachts, dus de eerste meting is 6 uur na start dag! Foto 7 februari 2018.

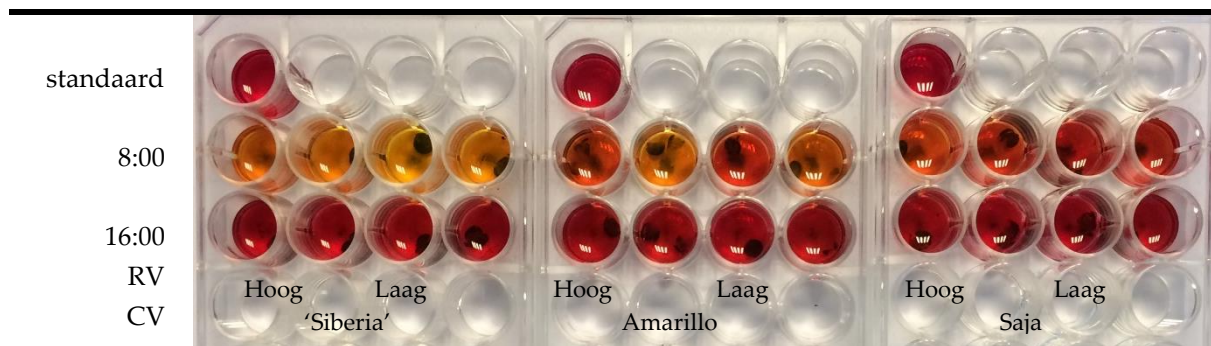


Foto 7. Resultaat malaattoets 21 dagen na planten, van links naar rechts 'Siberia', 'Amarillo', 'Saja'. De bladeren zijn 's ochtends nog enigszins zuur (oranje) en 's middags niet meer zuur (rood). Dit duidt op enige CAM-activiteit. NB de ochtendkleuring is duidelijk minder geel dan de week ervoor. Dit duidt erop dat de CAM-activiteit is afgenomen. Foto 13 februari 2018, laatste lange dag.

NB deze test toont wel aan dat het CAM-mechanisme werkt, maar geeft niet aan of dit klassiek CAM is, of dat hier sprake is van CAM-cycling (voor uitleg zie paragraaf 1.2). Een week na start van de RV-behandelingen (21 dagen na start proef, laatste lange dag) is opnieuw de malaattoets uitgevoerd (Foto 7 boven). Deze liet zien dat de indicatorvloeistof minder geel kleurde. De CAM-activiteit nam dus af.

3.1.2 Metingen korte dag

Tot proefdag 63 (42 dagen KD) is de CAM-toets uitgevoerd. Via Foto 8-13 wordt dit weergegeven. Te zien is dat de geelverkleuring in de ochtend minimaliseert tot op dag 35 (14 dagen KD) en daarna weer toeneemt. Foto 13 laat zien dat de geelverkleuring ook om 12:00 nog aanwezig is. Dit duidt erop dat de CAM-activiteit tot 14 dagen KD afneemt en daarna weer langzaam toeneemt (dag 21 KD en dag 28 KD zijn duidelijk minder geel dan dag 35 KD). Verschillen tussen hoog en laag RV zijn nauwelijks waarneembaar. Wel lijkt op dag 28 KD (Foto 11) de vloeistof met ponsjes uit laag RV planten iets scherper geel te kleuren. Op dag 21 KD en 28 KD (Foto 10&11) lijken de ponsjes van 'Amarillo' een iets scherpere geelverkleuring te geven dan die van 'Siberia' en 'Saja'.

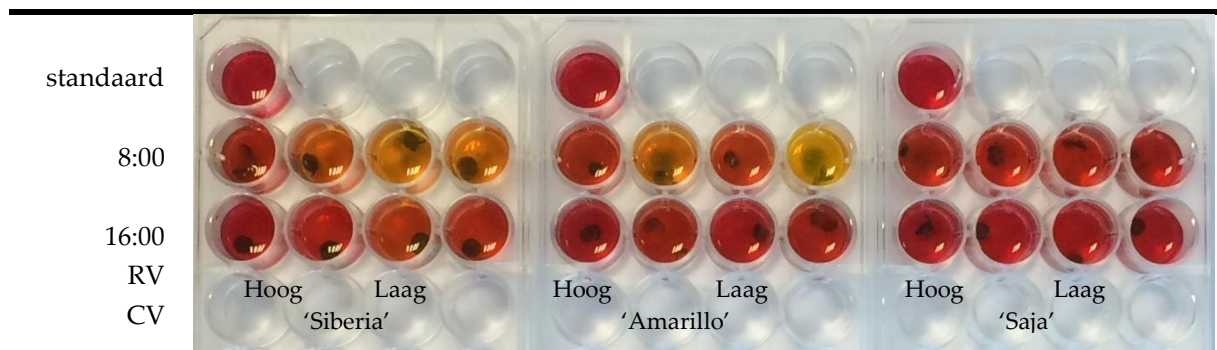


Foto 8. Resultaat malaattoets 28 dagen na planten, 8^e dag KD, van links naar rechts 'Siberia', 'Amarillo', 'Saja'. De bladeren van 'Siberia' en 'Amarillo' zijn 's ochtends van nog enigszins zuur (oranje) en 's middags niet meer zuur (rood). Dit duidt op enige CAM-activiteit. Bij 'Saja' is er nauwelijks verkleuring in de ochtend. Dit duidt erop dat de CAM-activiteit is afgenomen. Foto 21 februari 2018, 8^e dag KD.

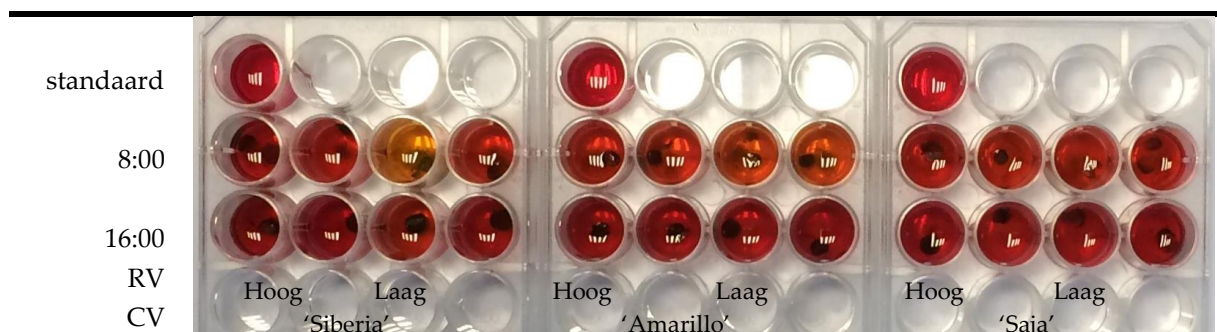


Foto 9. Resultaat malaattoets 35 dagen na planten, 14^e dag KD, van links naar rechts 'Siberia', 'Amarillo' & 'Saja'. De bladeren van 'Siberia' en 'Amarillo' zijn 's ochtends nog enigszins zuur (oranje) en 's middags niet meer zuur (rood). Dit duidt op enige CAM-activiteit. Bij 'Saja' is er nauwelijks verkleuring in de ochtend. De CAM-activiteit is nog verder afgenomen. Foto 27 februari 2018, 14^e dag KD.

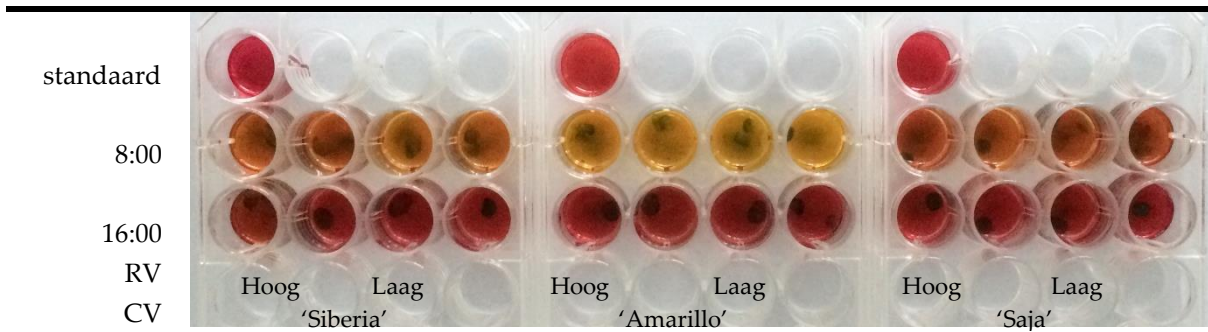


Foto 10. Resultaat malaattoets 42 dagen na planten, 21^e dag KD, van links naar rechts 'Siberia', 'Amarillo' & 'Saja'. De bladeren zijn 's ochtends enigszins zuur (geel-oranje) en 's middags niet meer zuur (rood). De kleurintensiteit is toegenomen ten opzichte van de week ervoor. Dit duidt erop dat de CAM-activiteit is toegenomen. Foto 6 maart 2018, 21^e dag KD.

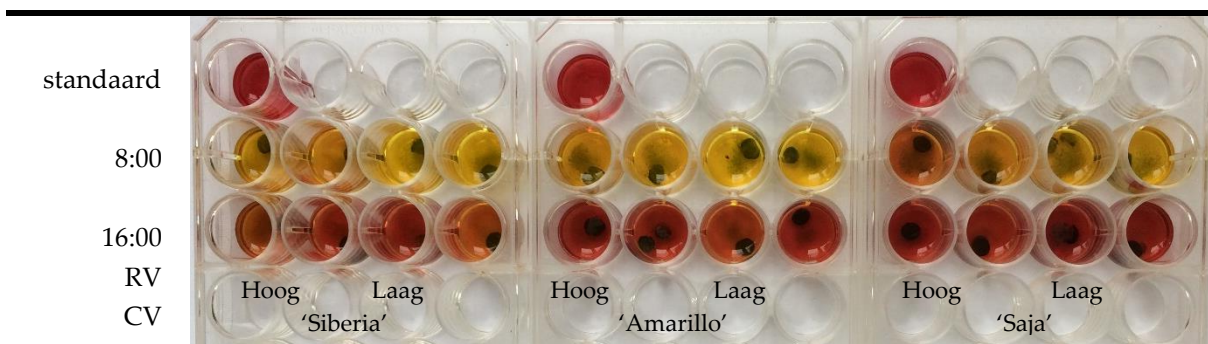


Foto 11. Resultaat malaattoets 49 dagen na planten, 28^e dag KD, van links naar rechts 'Siberia', 'Amarillo' & 'Saja'. De bladeren zijn 's ochtends zuur (geel) en 's middags niet meer zuur (rood). Dit duidt op CAM-activiteit. De ochtendkleuring is scherper dan week ervoor. Dit duidt erop dat de CAM-activiteit is toegenomen. Foto 20 maart 2018, 28^e dag KD.

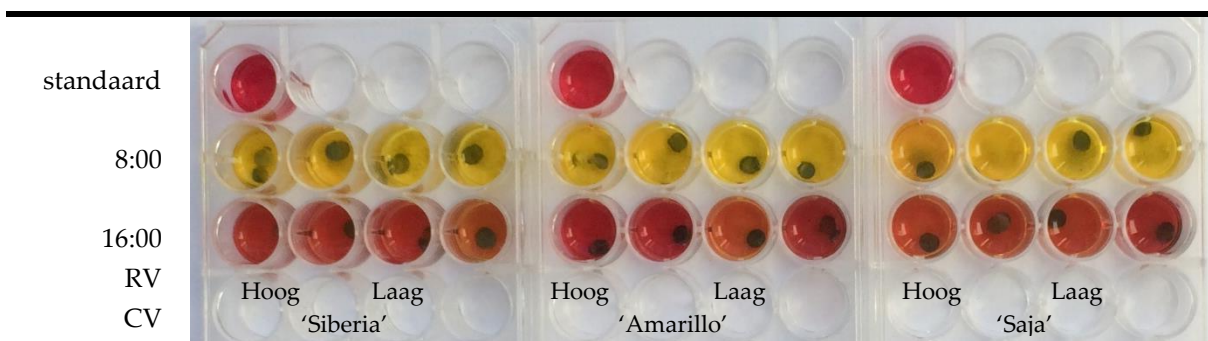


Foto 12. Resultaat malaattoets 56 dagen na planten, 35^e dag KD, van links naar rechts 'Siberia', 'Amarillo' & 'Saja'. De bladeren zijn 's ochtends zuur (geel) en 's middags niet meer zuur (rood). Dit duidt op CAM-activiteit. De ochtendkleuring is opnieuw scherper dan week ervoor. Dit duidt erop dat de CAM-activiteit is toegenomen. Foto 27 maart 2018, 35^e dag KD.

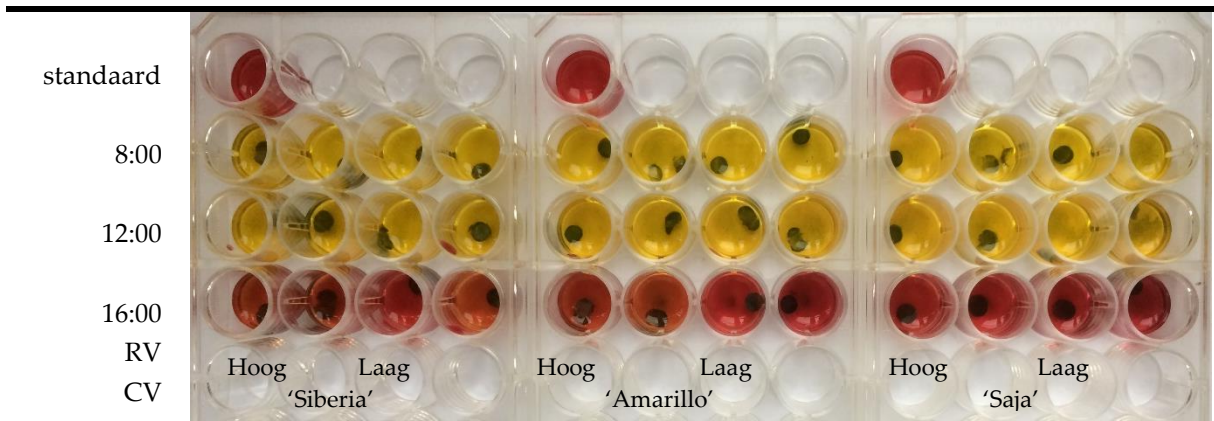
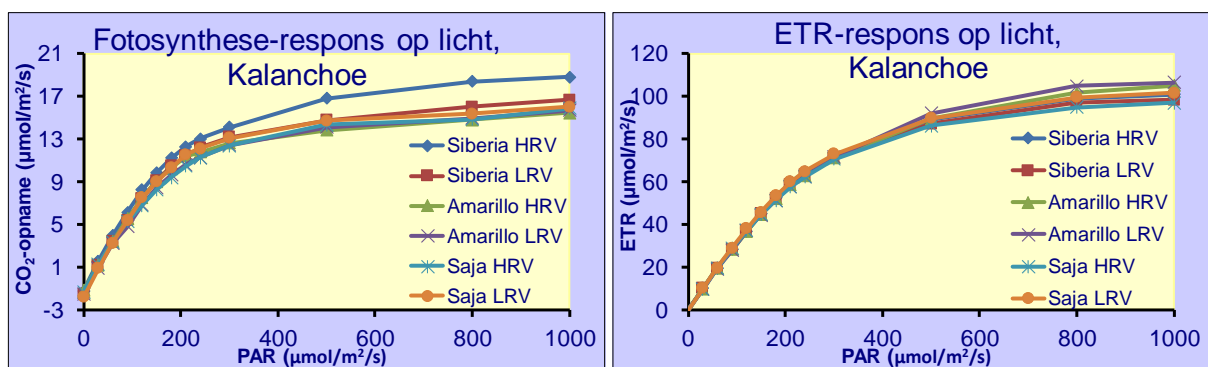


Foto 13. Resultaat malaattoets 63 dagen na planten, 42^e dag KD, van links naar rechts 'Siberia', 'Amarillo' & 'Saja'. De bladeren zijn 's ochtends zeker tot 12:00 zuur (geel) en 's middags niet meer zuur (rood). Dit duidt op CAM-activiteit. Foto 3 april 2018, 42^e dag KD.

3.2 Licht en CO₂-response Kalanchoë in de C3-fase

Rond 14 & 21 dagen KD is nagegaan of de lichtrespons van de fotosynthese nog verschilde tussen de drie cultivars. Figuur 3 laat zien dat alleen 'Siberia' onder hoog RV een hogere maximale fotosynthese heeft. Echter, dat is mogelijk een toevalligheid en komt doordat bij deze planten de huidmondjesopening fors hoger lag (geleidbaarheid huidmondjes 150 mmol/m²/s t.o.v. 100 mmol/m²/s), maar dat is niet altijd gemeten.

Er zijn ook enkele CO₂-respons-curves gemeten, deze lieten zien dat CO₂-verzadiging rond de 800 ppm lag. Dit komt overeen met wat eerder gevonden is (Trouwborst *et al.* 2013). De toen gemeten cultivar 'Don Nando' liet een scherpe sluitingsreactie zien van de huidmondjes boven 800 ppm, bij deze cultivars was dit veel minder het geval.



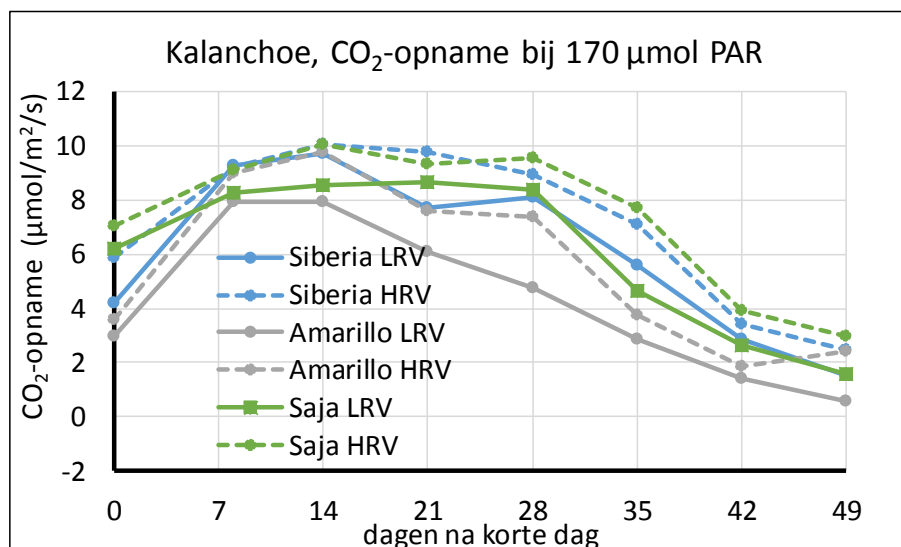
Figuur 3. Lichtrespons op de CO₂-opname (links) en ETR (rechts) van Kalanchoë 'Siberia', 'Amarillo' en 'Saja' onder laag (LRV) of hoog RV (HRV) gemeten bij 700 ppm CO₂. De ETR is een maat voor de snelheid van de lichtreactie van de fotosynthese: de door licht opgewekte energiestroom om suikers te maken (data 14&21 dagen KD, n=3).

3.3 Verschuiving van C3 naar CAM-fotosynthese

3.3.1 Verloop C3-fotosynthese in de ochtend gedurende de teelt

Figuur 4 geeft de ochtendgemiddelden van de C3-fotosynthese weer. De volgende zaken vallen op:

- Globaal laten alle drie de cultivars eenzelfde patroon zien over de teeltduur. De C3-fotosynthese bij 170 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR neemt eerst toe, bereikt een maximum op dag 14 KD, en neemt daarna cultivarafhankelijk af naarmate de teeltduur vordert.
- De fotosynthese onder hoog RV ligt meestal net iets hoger dan onder laag RV. Bij 'Siberia' is er geen verschil tussen beide RV's op dag 8 en 14. De gemeten ETR (ETR is de door licht opgewekte energiestroom om suikers te maken) was gelijk voor beide behandelingen, dus de iets hogere fotosynthese kan worden verklaard door de iets verdere openingsstand van de huidmondjes onder hoog RV.
- De fotosynthesesnelheid neemt bij 'Amarillo' eerder af dan bij 'Siberia' en 'Saja'. Dit zou erop kunnen duiden dat het CAM-systeem bij 'Amarillo' sneller actief wordt. Kwalitatief is dit nog enigszins terug te zien op foto 10 en 11 (CAM-toets dag 21 & 28 KD) waar de geelverkleuring iets scherper is bij 'Amarillo' dan 'Siberia' en 'Saja'.



Figuur 4. Ochtendgemiddelden van metingen van de CO₂-opname van drie cultivars Kalanchoë. De metingen vonden plaats in de ochtend bij 700 ppm CO₂ en 170 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR. Te zien is dat de CO₂-opname eerst toeneemt en op dag 14 het hoogtepunt bereikt en daarna langzaam afneemt (n=6-10).

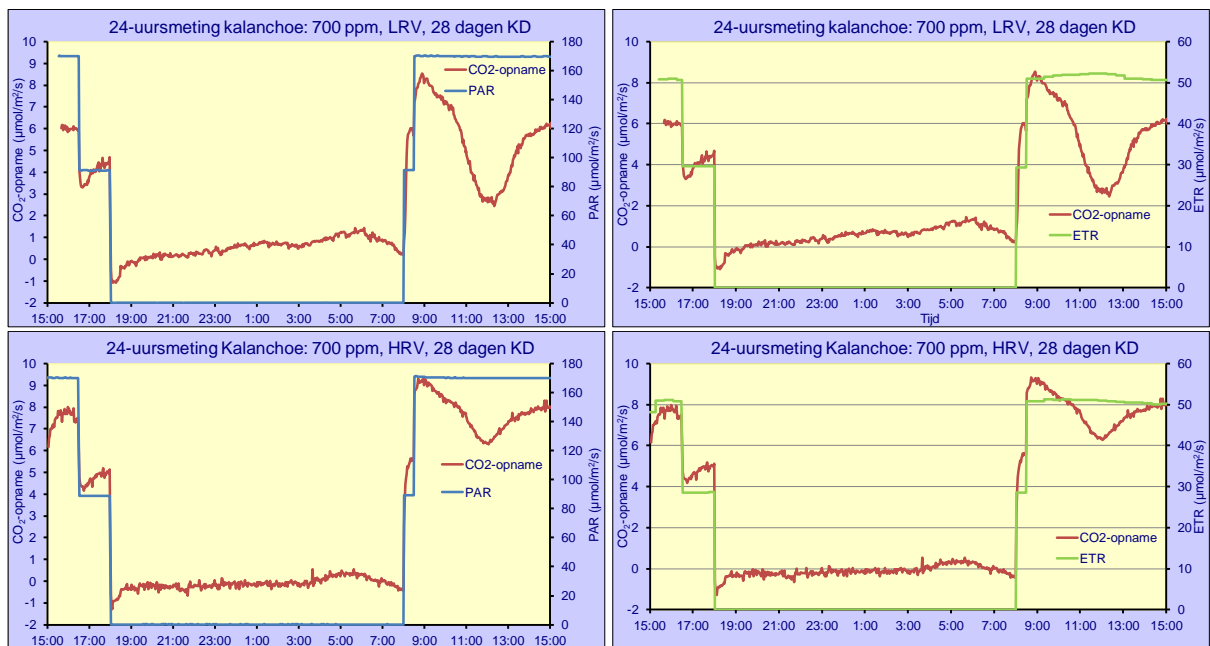
3.3.2 24-uursmetingen Kalanchoë – overgangsfase C3-CAM

Gedurende de groeiperiode zijn er enkele 24-uurs fotosynthese-metingen gedaan om vast te leggen of er nachtelijke CO₂-opname is. De metingen geven een redelijk beeld weer van de verschuiving van C3- naar CAM-fotosynthese en worden getoond in Figuur 5 & 6. Figuur 5 is 28 dagen na start korte dag gemeten en laat het volgende zien:

- In plaats van dat de CO₂-opname door nachtelijke respiratie op ongeveer -1 ligt (waarde aan het begin van de nacht), ligt de CO₂-opname (rode lijn) op de nullijn of

zelfs iets erboven. Dit betekent dat de nachtelijke CO₂ uit respiratie niet ontsnapt, maar vastgelegd wordt als malaat.

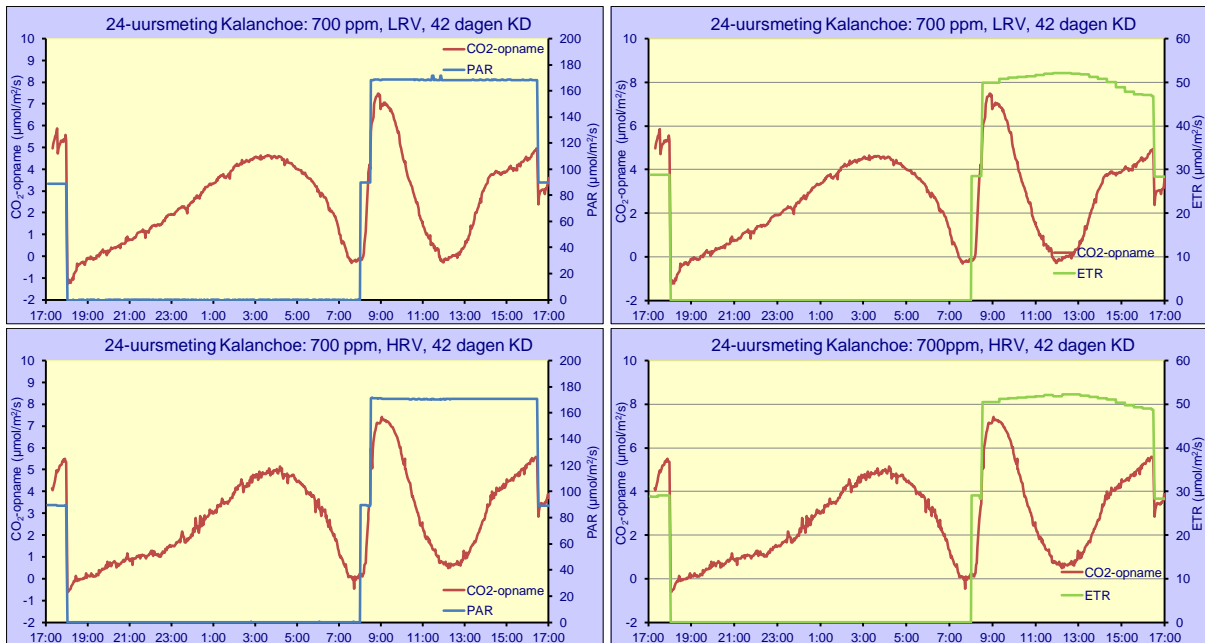
- Overdag stijgt de CO₂-opname snel maar zakt rond het middaguur in. Dit is echter geen zogeheten 'midday depression' zoals bij Anthurium, want het verloop van de ETR (groene lijn, rechts) laat zien dat dan juist de hoogste ETR wordt bereikt. Dus juist een hoge lichtbenutting. Het ligt voor de hand dat op dat moment de CO₂ die 's nachts was vastgelegd weer vrijkomt uit malaat.
- Verder valt op dat de nachtelijke opname en de dip overdag onder hoog RV kleiner zijn dan onder laag RV, dus hoog RV lijkt minder CAM-activiteit te hebben (NB n=1).
- Dit hele proces is een mooi voorbeeld van CAM-cycling.



Figuur 5. Verloop CO₂-opname (rode lijn bij Kalanchoë 'Amarillo' op dag 28KD. Boven lage RV en onder hoge RV. De blauwe lijn geeft de lichtintensiteit (PAR) aan. De groene lijn geeft het verloop van de ETR weer (rechts) (n=1).

Figuur 6 is 42 dagen na start van de korte dag gemeten. De volgende zaken vallen op:

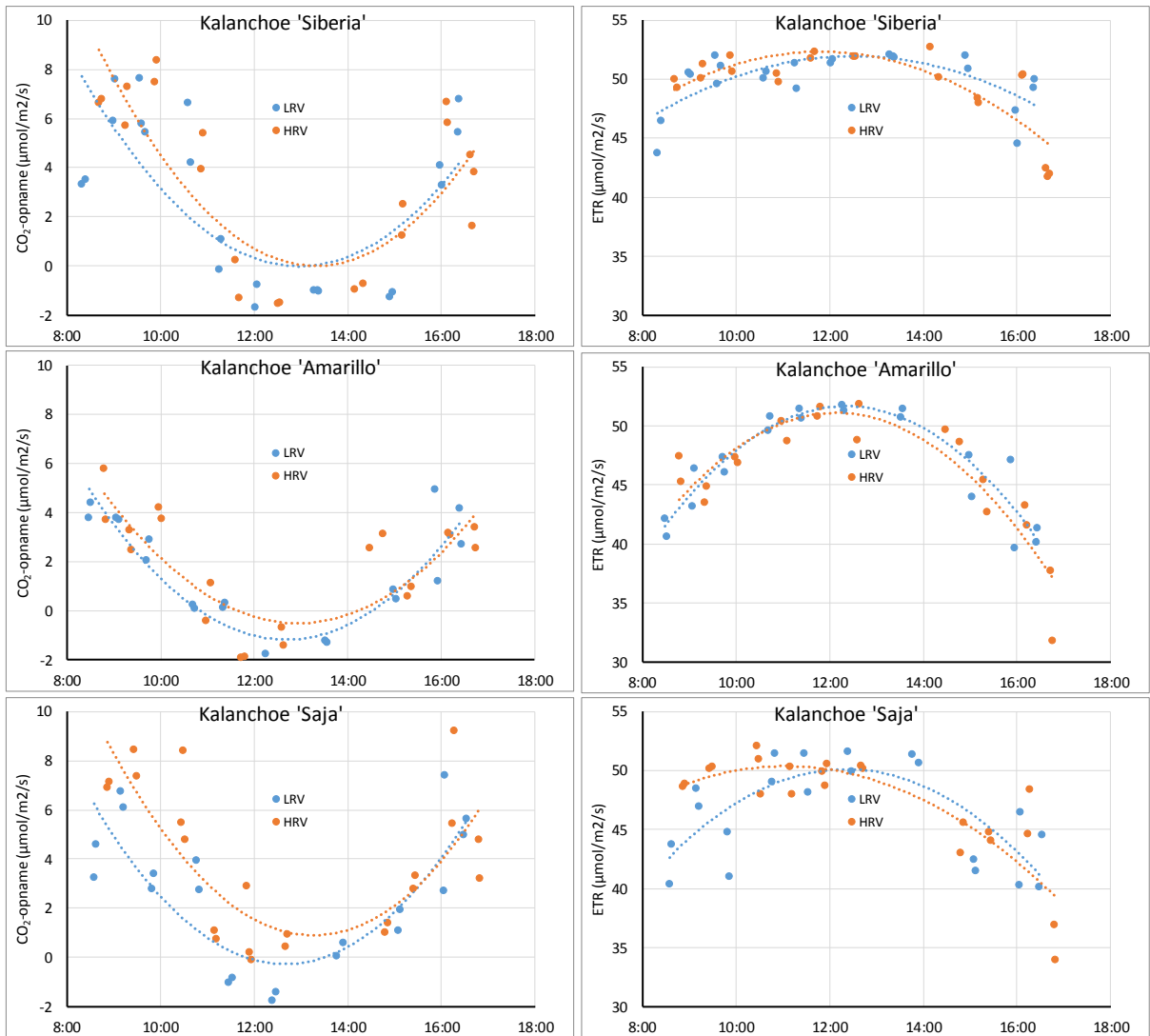
- 's Nachts is er CO₂-opname en overdag een forse middagdip in de C₃-fotosynthese.
- Tijdens de dip in fotosynthese is de ETR (groene lijn) hoog, dus op dat moment komt CO₂ vrij uit malaat.
- De nachtelijke CO₂-opname ligt net onder de 50% van de dagsom CO₂-opname.
- De dip overdag valt net boven of onder de 0. De planten zitten in dit stadium dus tussen CAM-cycling en klassieke CAM-fotosynthese met een zeer korte CAM-fase III (fase dat overdag huidmondjes dicht zitten) in.



Figuur 6. Verloop CO₂-opname (rode lijn) bij Kalanchoë 'Siberia' op dag 42KD. Boven lage RV en onder hoge RV. De blauwe lijn geeft de lichtintensiteit (PAR) aan. De groene lijn geeft het verloop van de ETR weer (rechts) (n=1).

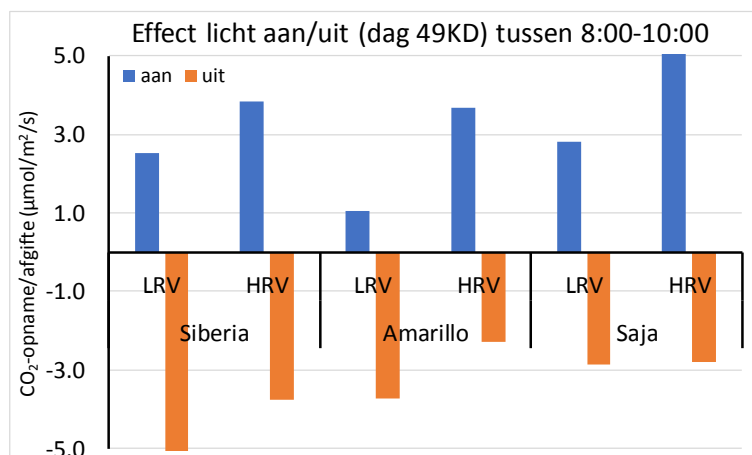
Op dag 42 KD is ook via kortstondige metingen het dagpatroon van de fotosynthese bij 170 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR vastgelegd (Figuur 7 onder). Hierbij worden de gemeten dagpatronen van Figuur 6 bevestigd:

- bij alle drie de cultivars daalt de CO₂-opname gedurende de ochtend, ligt rond het middaguur rond de 0 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, en neemt vervolgens 's middags weer toe (patroon dalparabool).
- De ETR laat juist het tegengestelde beeld zien en is rond het middaguur het hoogst. Dus het lichtrendement is het hoogst als de huidmondjes gesloten zijn. Er moet dus een interne CO₂-bron aanwezig zijn (malaat) omdat bij CO₂-gebrek ook de ETR zal dalen (zie o.a. Pot *et al.* 2015).



Figuur 7. Verloop CO₂-opname en ETR over een dag via kortstondige metingen (meting 27 maart, 42 dagen KD). Ieder punt in de grafiek is de meting van een afzonderlijk blaadje (~3 minuten per meetblad).

Figuur 8 laat zien dat er door 's ochtends (C3-fase, dag 49 KD, tussen 8:00 en 10:00 uur) tijdelijk de lamp uit te zetten, er hoge CO₂-afgiftes werden gemeten. Veel hoger dan normale respiratie. Dit wijst op lekkage van CO₂ uit malaat en laat zien dat er op dat moment een combinatie is van opname van CO₂ uit buitenlucht en uit malaat.



Figuur 8. Ochtendgemiddelde (8:00-10:00) van de CO₂-opname/afgifte bij lamp aan en uit (n=4). Door 's ochtends (C3-fase) tijdelijk de lamp uit te zetten, werd er een hoge CO₂-afgifte gemeten. Veel hoger dan normale respiratie. Dit wijst op lekkage van CO₂ uit malaat en laat zien dat er een combinatie is van opname van CO₂ uit buitenlucht en uit malaat.

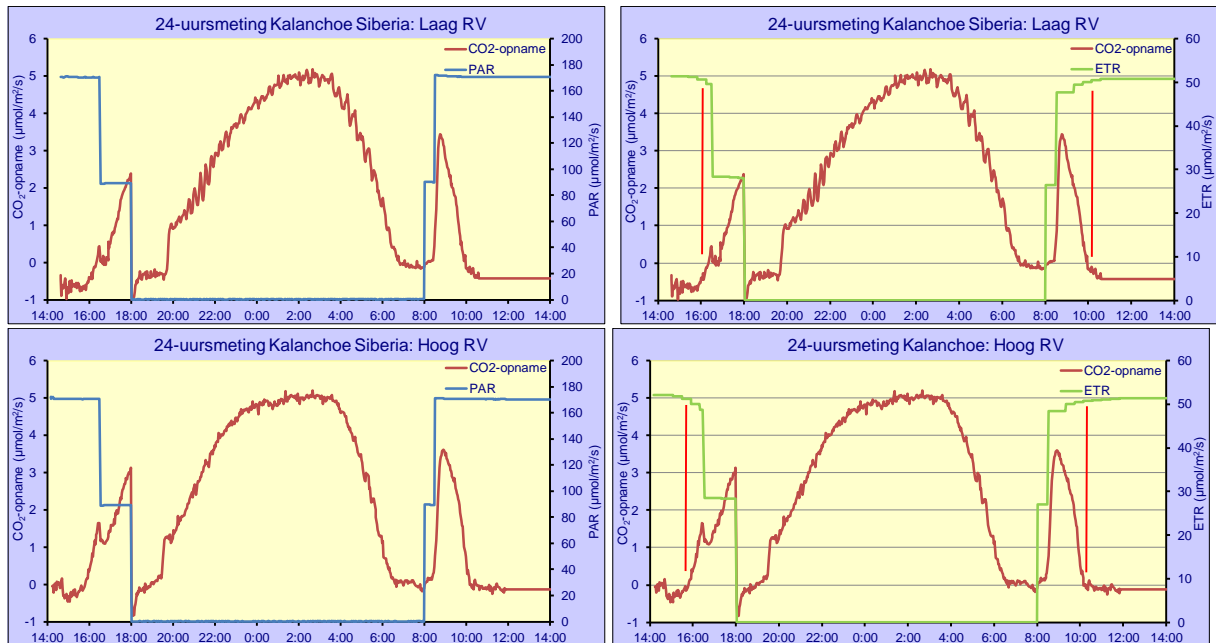
3.4 CAM-fase: 24-uursmetingen Kalanchoë

In dit hoofdstuk worden per cultivar de patronen van CO₂-opname en lichtbenutting (ETR) later in de teelt getoond (meetperiode gedurende ~ 3 weken vanaf dag 49 KD).

Figuur 9-11 tonen de CO₂-opname (rode lijn) en de ETR (groene lijn) over 24 uur bij cv 'Siberia', 'Amarillo' en 'Saja'. Tabel 4-6 geven bijbehorende parameters weer. Het volgende valt op:

- De nachtelijke CO₂-opname is veel dominanter geworden ten opzichte van de CO₂-opname overdag, vergeleken met eerdere stadia in de teelt. Bij 'Siberia' ligt dit op ~80% van de totale CO₂-opname. En bij 'Saja' en 'Amarillo' op ~60%.
- De CO₂-opname komt 's ochtends traag op gang, zie ook Figuur 12.
- Het dal in de CO₂-opname overdag is dieper en breder geworden. CAM-fase III (de tijd dat de huidmondjes overdag gesloten zijn) is dan ruwweg 3-4 uur voor 'Amarillo' en 'Saja' en 4.5-6 uur voor 'Siberia' (Tabel 4-6).
- Rond 16:00 begint de ETR te dalen, dit valt samen met opening van de huidmondjes. Rond 10:00 stijgt de ETR niet meer, dit valt samen met sluiting van de huidmondjes (zie verticale rode lijnen in rechterfiguren).
- Onder hoog RV liggen de dagsommen van de CO₂-opname hoger dan onder laag RV (Tabel 4-6; niet significant voor 'Saja').
 - Bij 'Siberia' is dit voornamelijk toe te schrijven aan een hogere CO₂-opname overdag (CAM-fase II&IV). Bij 'Amarillo' grotendeels 's nachts (CAM-fase I).

Op basis van bovenstaande kan worden geconcludeerd dat uiteindelijk 'Siberia' het sterkst CAM is: langste CAM-fase III en veruit hoogste aandeel nachtelijke CO₂-opname.

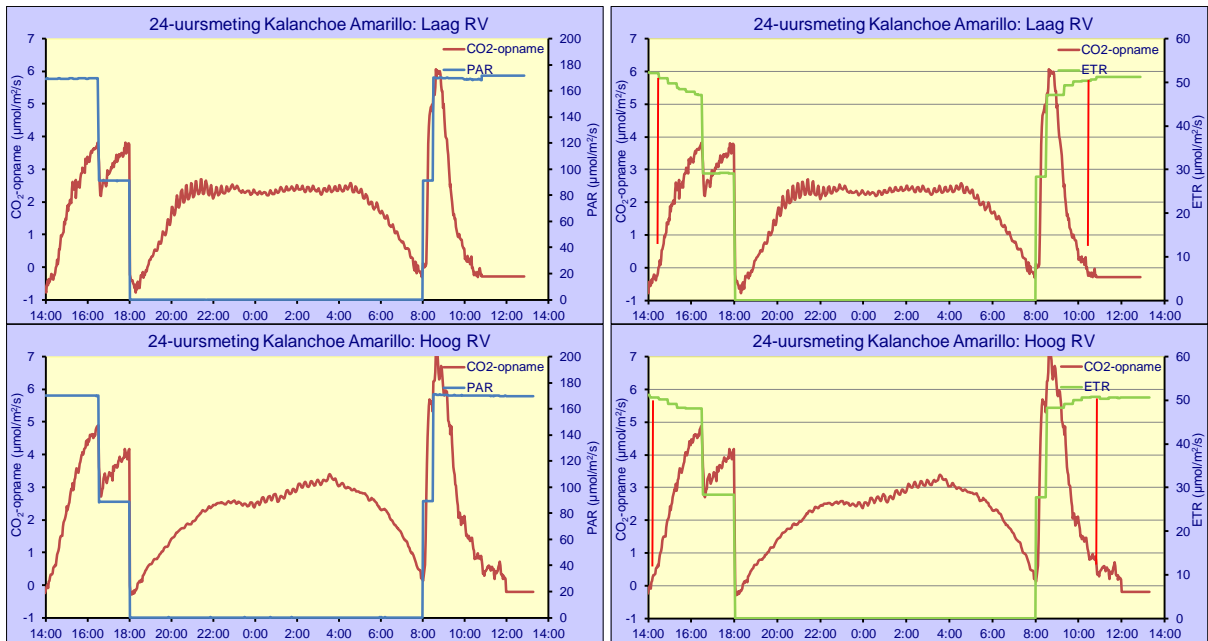


Figuur 9. Effect van RV op de CO₂-opname (rode lijn) bij Kalanchoë 'Siberia'. De blauwe lijn geeft de lichtintensiteit (PAR) aan. De groene lijn geeft het verloop van de ETR weer (rechts). De gekozen grafieken liggen het dichtst bij het gemiddelde van de desbetreffende behandeling. De gemiddelden van de CO₂-opname staan weergegeven in Tabel 4. Te zien is dat de daling in ETR 's middags min of meer samenvalt met de start van de CO₂-opname (= opening huidmondjes) en de maximale ETR 's ochtends na het stoppen van de CO₂-opname (=sluiting huidmondjes) bereikt wordt (zie verticale rode lijnen in rechterfiguren).

Tabel 4. Effect van RV op de CO₂-opname tijdens de verschillende CAM-fases, de dagsom ETR, de tijd dat huidmondjes gesloten zijn, en de maximale huidmondjesopening overdag en 's nachts bij Kalanchoe 'Siberia'. Verschillende letters (a, b) geven statistisch significante verschillen tussen de gemiddelden aan (n=6, T-test, $\alpha < 0.05$; ns= niet significant).

	Laag RV	Hoog RV
24-uurssom CO₂-opname (mol/m²/dag)	0.156 ^b	0.177 ^a
som CO₂-opname CAM-fase I, donker (mol/m²/dag)	0.134 ^{ns}	0.134 ^{ns}
som CO₂-opname CAM-fase II+IV, licht (mol/m²/dag)	0.022 ^b	0.042 ^a
som CO₂-opname CAM-fase II (mol/m²/dag)	0.012 ^b	0.022 ^a
som CO₂-opname CAM-fase IV (mol/m²/dag)	0.011 ^b	0.020 ^a
dagsom ETR (mol e-)	1.64 ^{ns}	1.64 ^{ns}
start CO₂-opname	15:57 ^b	14:58 ^a
eind CO₂-opname	10:00 ^a	10:40 ^b
tijd CAM-fase III	5:55 ^a	4:18 ^b
huidmondjesopening G_{s(max)} (nacht)	0.014	*
huidmondjesopening G_{s(max)} (ochtend)	0.022 ^b	0.027 ^a

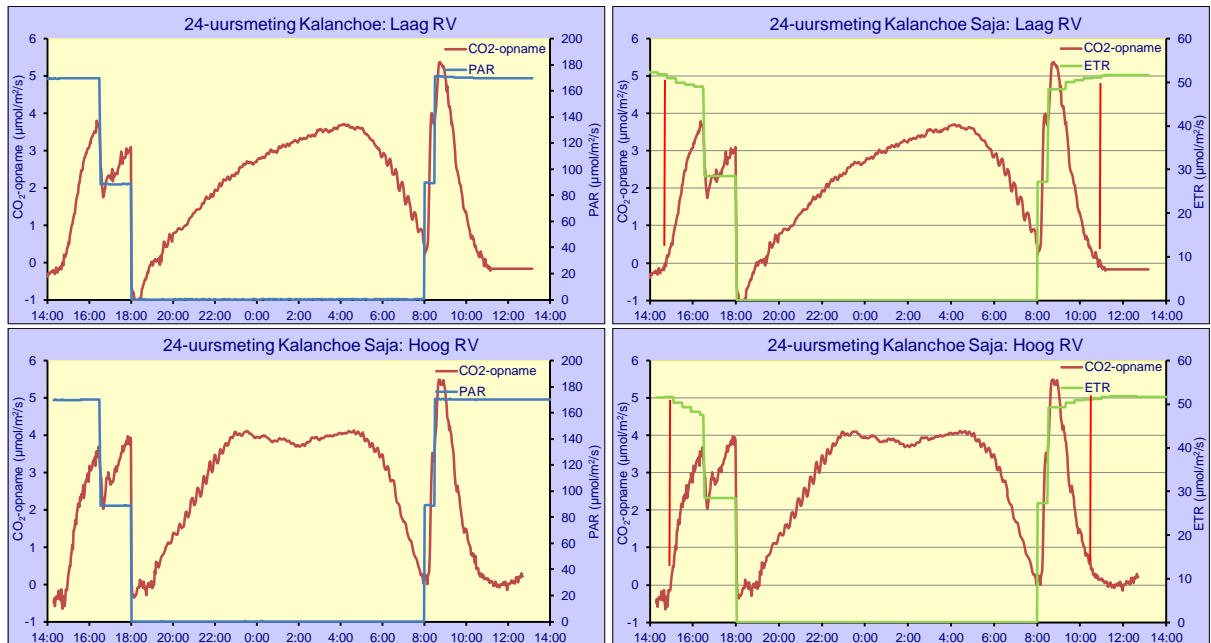
* door ruis op signaal van de gemeten verdamping was de G_s niet nauwkeurig te bepalen.



Figuur 10. Effect van RV op de CO₂-opname (rode lijn) bij Kalanchoe 'Amarillo'. De blauwe lijn geeft de lichtintensiteit (PAR) aan. De groene lijn geeft het verloop van de ETR weer (rechts). De gekozen grafieken liggen het dichtst bij het gemiddelde van de desbetreffende behandeling. De gemiddelden van de CO₂-opname staan weergegeven in Tabel 5. Te zien is dat de daling in ETR 's middags min of meer samenvaalt met de start van de CO₂-opname (= opening huidmondjes) en de maximale ETR 's ochtends na het stoppen van de CO₂-opname (=sluiting huidmondjes) bereikt wordt (zie verticale rode lijnen in rechterfiguren).

Tabel 5. Effect van RV op de CO₂-opname tijdens de verschillende CAM-fases, de dagsom ETR, de tijd dat huidmondjes gesloten zijn, en de maximale huidmondjesopening overdag en 's nachts bij Kalanchoe 'Amarillo'. Verschillende letters (a, b) geven statistisch significante verschillen tussen de gemiddelden aan (n=8, T-test, $\alpha < 0.05$; ns= niet significant).

	Laag RV	Hoog RV
24-uursom CO₂-opname (mol/m²/dag)	0.151 ^b	0.191 ^a
som CO₂-opname CAM-fase I, donker (mol/m²/dag)	0.088 ^b	0.118 ^a
som CO₂-opname CAM-fase II+IV, licht (mol/m²/dag)	0.063 ^{ns}	0.073 ^{ns}
som CO₂-opname CAM-fase II (mol/m²/dag)	0.028 ^b	0.035 ^a
som CO₂-opname CAM-fase IV (mol/m²/dag)	0.035 ^{ns}	0.038 ^{ns}
dagsom ETR (mol e-)	1.653 ^{ns}	1.629 ^{ns}
start CO₂-opname	14:20 ^{ns}	14:43 ^{ns}
eind CO₂-opname	10:37 ^a	11:40 ^b
tijd CAM-fase III	03:44 ^{ns}	03:03 ^{ns}
huidmondjesopening G_{s(max)} (nacht)	0.011 ^{ns}	0.011 ^{ns}
huidmondjesopening G_{s(max)} (ochtend)	0.025 ^b	0.030 ^b



Figuur 11. Effect van RV op de CO₂-opname (rode lijn) bij Kalanchoe 'Saja'. De blauwe lijn geeft de lichtintensiteit (PAR) aan. De groene lijn geeft het verloop van de ETR weer (rechts). De gekozen grafieken liggen het dichtst bij het gemiddelde van de desbetreffende behandeling. De gemiddelden van de CO₂-opname staan weergegeven in Tabel 6. Te zien is dat de daling in ETR 's middags min of meer samenvalt met de start van de CO₂-opname (= opening huidmondjes) en de maximale ETR 's ochtends na het stoppen van de CO₂-opname (=sluiting huidmondjes) bereikt wordt (zie verticale rode lijnen in rechterfiguren).

Tabel 6. Effect van RV op de CO₂-opname tijdens de verschillende CAM-fases, de dagsom ETR, de tijd dat huidmondjes gesloten zijn, en de maximale huidmondjesopening overdag en 's nachts bij Kalanchoë 'Saja'. Verschillende letters (a, b) geven statistisch significante verschillen tussen de gemiddelden aan (n=6-8, T-test, $\alpha < 0.05$; ns= niet significant).

	Laag RV	Hoog RV
24-uurssom CO₂-opname (mol/m²/dag)	0.180 ^{ns}	0.197 ^{ns}
som CO₂-opname CAM-fase I, donker (mol/m²/dag)	0.110 ^{ns}	0.122 ^{ns}
som CO₂-opname CAM-fase II+IV, licht (mol/m²/dag)	0.070 ^{ns}	0.076 ^{ns}
som CO₂-opname CAM-fase II (mol/m²/dag)	0.036 ^{ns}	0.040 ^{ns}
som CO₂-opname CAM-fase IV (mol/m²/dag)	0.034 ^{ns}	0.037 ^{ns}
dagsom ETR (mol e-)	1.666 ^{ns}	1.653 ^{ns}
start CO₂-opname	14:36 ^{ns}	14:39 ^{ns}
eind CO₂-opname	11:19 ^{ns}	11:26 ^{ns}
tijd CAM-fase III	03:14 ^{ns}	03:12 ^{ns}
huidmondjesopening G_{s(max)} (nacht)	0.010 ^{ns}	0.010 ^{ns}
huidmondjesopening G_{s(max)} (ochtend)	0.024 ^b	0.031 ^a

3.5 Vergelijking productiviteit C3 en CAM

De vergelijking van de productiviteit tussen C3 en CAM is alleen redelijk te maken op basis van metingen in de periode dat er nog nauwelijks CAM-activiteit aanwezig was (geen daling van de fotosynthese rondom het middaguur), tegenover metingen laat in de teelt (volledig CAM). Voor een onbeschaduwd blad zijn de volgende fotosynthesesnelheden gemeten:

- 8 uur lang 170 $\mu\text{mol PAR}$ met $\sim 9\text{-}10 \mu\text{mol/m}^2/\text{s CO}_2\text{-opname}$
- 2 uur lang 90 $\mu\text{mol PAR}$ met $\sim 6 \mu\text{mol/m}^2/\text{s CO}_2\text{-opname}$
- 14 uur nacht met $\sim 0.8 \mu\text{mol/m}^2/\text{s CO}_2\text{-afgifte}$

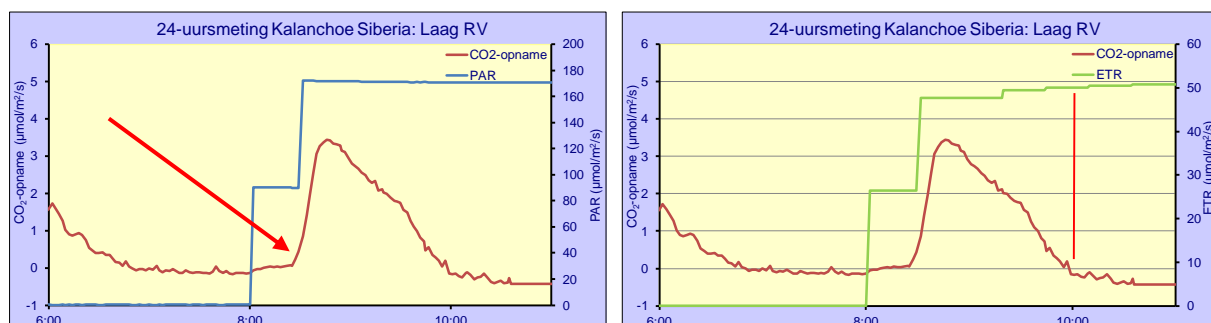
Tabel 7 geeft de sommatie weer over 24 uur. De netto CO_2 opname blijkt qua orde-grootte tussen de 0.26-0.29 mol/dag te liggen. De CO_2 -opnames gedurende de CAM-fase lagen qua orde grootte tussen de 0.15-0.20 mol/dag (Tabel 4-6). Duidelijk is dus dat de C3-fase fors productiever is.

Tabel 7. Geschatte CO_2 -opname over een etmaal gedurende de fase dat Kalanchoe 100% C3 is.

uur	Intensiteit PAR ($\mu\text{mol / m}^2 / \text{s}$)	CO_2 -opname ($\mu\text{mol / m}^2 / \text{s}$)	Som (mol CO_2)
8	170	9-10	$\sim 0.26 - \sim 0.29$
2	80	5.5	~ 0.04
14	0	-0.8	~ -0.04
24			$\sim 0.26 - \sim 0.29$

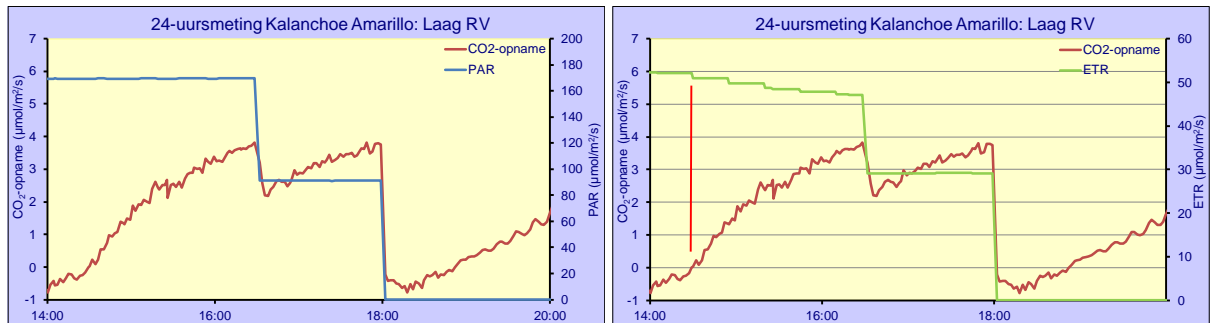
3.6 Belichting aan het begin en einde van de dag

In de laatste fase van de teelt (100% CAM) kwam de CO_2 -opname na aangaan van het licht zeer traag op gang (Figuur 12). Bij 'Siberia' start de CO_2 -opname pas 25 minuten later. Bij 'Amarillo' en 'Saja' was dit ongeveer een kwartier. Rond 10:00 zijn huidmondjes dicht en is de ETR (groene lijn rechts) echt op stoom. Doordat de SON-T in de proef een half uur eerder aanging dan de daglichtsimulatie (dus beperkte lichtintensiteit), zijn de ETR-verliezen in de ochtend redelijk beperkt. Met de trage start in CO_2 -opname kan rekening gehouden worden met het opschakelen van de belichting, door bijvoorbeeld pas na een kwartier op te schakelen in belichting. Hiertoe dient wel in meerdere strengen geschakeld te kunnen worden.



Figuur 12. De CO_2 -opname (rode lijn) komt traag op gang bij Kalanchoe 'Siberia', zie rode pijl). De blauwe lijn geeft lichtintensiteit (PAR) aan. De groene lijn geeft het verloop van de ETR weer (rechts). De maximale ETR wordt pas bereikt als de CO_2 -opname onder nul komt (=huidmondjes dicht; bij verticale rode lijn).

Aan het einde van de dag komt na 14:00 de CO₂-opname weer langzaam op gang (Figuur 13). Opvallend is dat de CO₂-opname niet meer het niveau bereikt dat 's ochtends bereikt wordt onder 170 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Verlaging in lichtniveau van 170 naar 90 μmol (16:30, afschakeling zonlichtsimulatie) gaf maar een beperkte daling in de fotosynthese. Het verlies aan lichtrendement (ETR, groene lijn rechts) in de middag tussen 14:00-16:30 (170 μmol PAR) ligt in de orde van maximaal 10%. Bij het lagere lichtniveau tussen 16:30-18:00 werd geen afname in ETR meer geconstateerd. Op grond hiervan kan voorzichtig geconcludeerd worden dat enige afbouw in lichtintensiteit aan het einde van de dag gewenst is. Ook komen deze resultaten redelijk overeen met wat eerder gemeten is aan 'Don Nando' om in de namiddag de 180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR (lamplicht + daglicht) niet te overschrijden (Trouwborst *et al.* 2013).



Figuur 13. De CO₂-opname (rode lijn) komt 's middags in CAM-fase IV traag op gang bij Kalanchoë 'Amarillo'. De blauwe lijn geeft de lichtintensiteit (PAR) aan. De groene lijn geeft het verloop van de ETR weer (rechts). De ETR begint te dalen als de CO₂-opname begint te stijgen (=huidmondjes open; bij verticale rode lijn).

3.7 Eindooft

In tabel 8 staat het gemiddeld aantal dagen tot veilrijp (= gemiddeld 3 bloemen per plant open). 'Siberia' deed er, zoals verwacht, fors langer over dan 'Amarillo' en 'Saja'. Onder laag RV waren de planten gemiddeld 2-3 dagen sneller. Ongeremde planten van de cultivars 'Siberia' en 'Amarillo' waren ruim 3 dagen sneller. Ongeremd was 'Saja' wel 7 dagen sneller (!).

Tabel 8. Gemiddeld aantal dagen tot veilrijp (=gemiddeld 3 bloemen per plant open). De Laag RV behandeling was gemiddeld 2-3 dagen sneller

	geremd	Ongeremd
Siberia	83	80
Amarillo	66	63
Saja	66	59

Tabel 9 geeft de gewichten bij de eindooft weer. De ongeremde randplanten (NB slechts 4 per cultivar per klimaat-unit) waren 15-35% zwaarder (zie ook foto 14-17). Dit effect was fors groter dan het effect van hoog RV wat 5-15% zwaardere planten opleverde. Dit effect was voor 'Siberia' niet significant.

Tabel 9. Effect van RV op het vers- en drooggewicht van Kalanchoë. Verschillende letters (a, b) geven statistisch significante verschillen tussen de gemiddelden aan (n=24, T-test, $\alpha < 0.05$; ns= niet significant). NB er stonden 4 ongeremde plantjes per cultivar per unit. Deze stonden tegen de achterwand en zijn alle gewogen. Hier is bewust geen statistiek op toegepast.

	Geremd Laag RV	Geremd Hoog RV	Ongeremd Laag RV	Ongeremd Hoog RV
Siberia				
Versgewicht (g)	118 ^{ns}	123 ^{ns}	134	141
Drooggewicht (g)	5.88 ^{ns}	6.04 ^{ns}	7.09	7.38
Fractie drooggewicht	5.0% ^{ns}	4.9% ^{ns}	5.3%	5.2%
Amarillo				
Versgewicht (g)	108 ^b	125 ^a	138	132
Drooggewicht (g)	4.86 ^b	5.52 ^a	6.41	6.11
Fractie drooggewicht	4.5% ^a	4.4% ^b	4.6%	4.6%
Saja				
Versgewicht (g)	153 ^b	174 ^a	221	222
Drooggewicht (g)	6.66 ^b	7.38 ^a	10.24	10.06
Fractie drooggewicht	4.4% ^a	4.2% ^b	4.6%	4.5%



Foto 14. Overzicht van de units Kalanchoë, laag (links) en hoog (rechts) RV bij de eind oogst. Duidelijk is te zien dat de niet geremde planten op de achterste rij veel forser zijn (foto 23 april 2018).

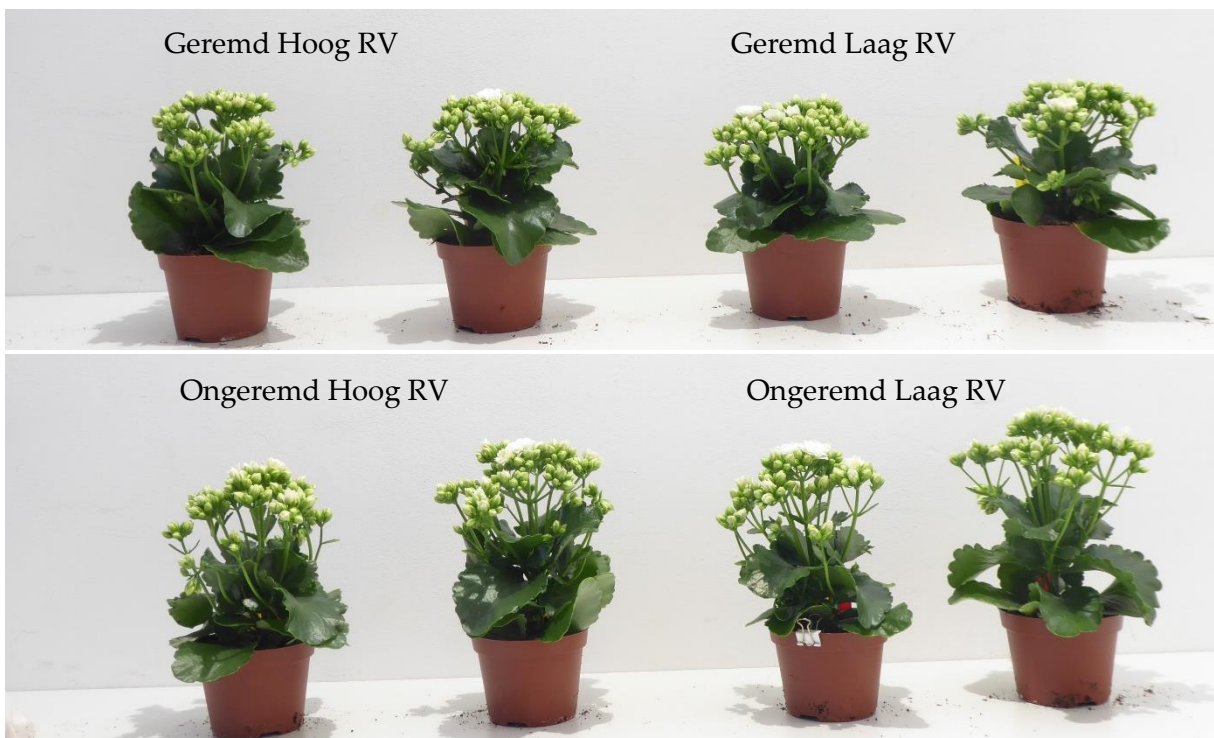


Foto 15. Kalanchoe 'Siberia' bij eind oogst (foto 7 mei 2018). Visueel is er niet of nauwelijks verschil te zien tussen laag en hoog RV. De ongeremde planten zijn wel een stuk forser (~15% zwaarder).

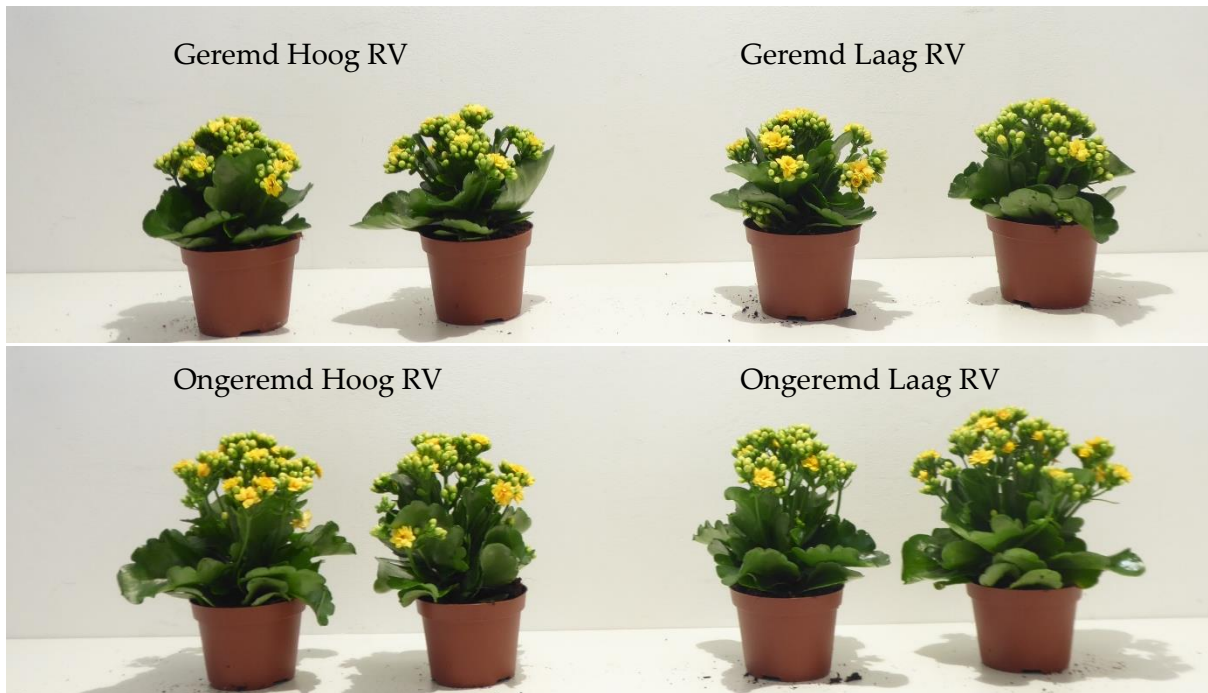


Foto 16. Kalanchoë 'Amarillo' bij eind oogst (foto 23 april 2018). Visueel is er niet of nauwelijks verschil te zien tussen laag en hoog RV. De ongeremde planten zijn wel een stuk forser (~18% zwaarder).

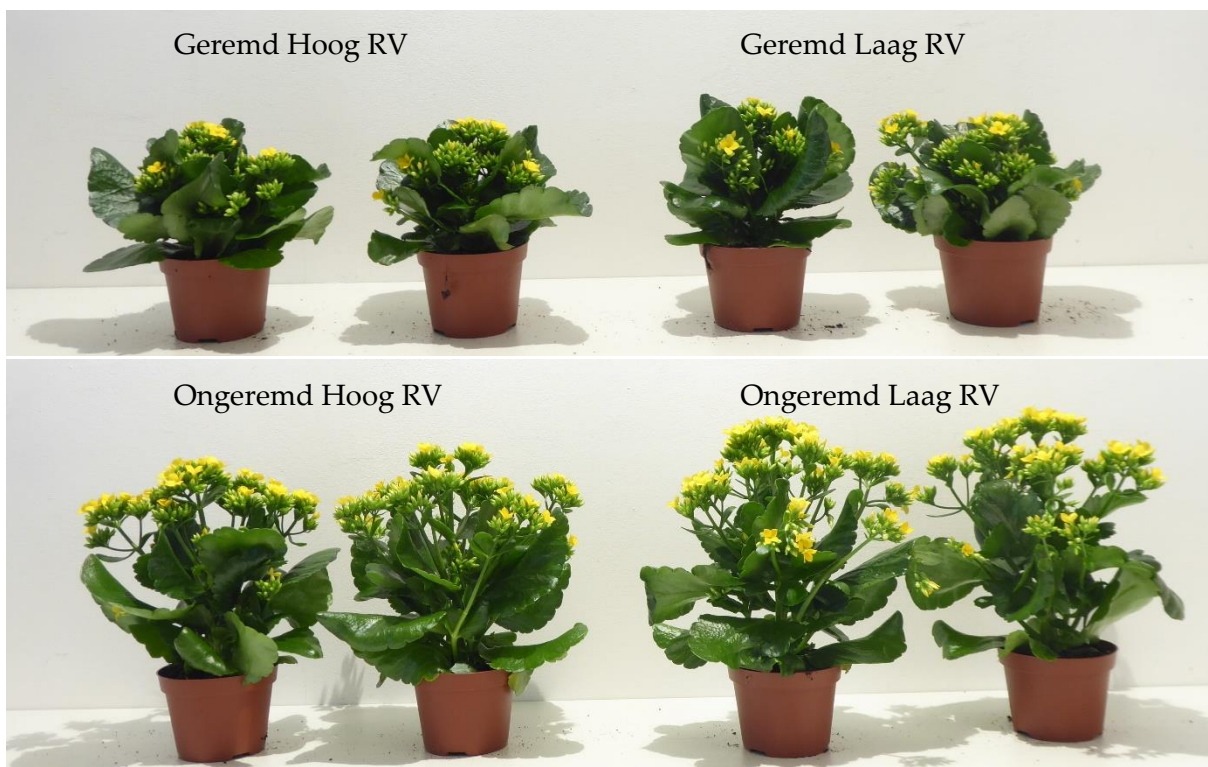


Foto 17. Kalanchoë 'Saja' bij eind oogst (foto 23 april 2018). Visueel is er niet of nauwelijks verschil te zien tussen laag en hoog RV. De ongeremde planten zijn wel een stuk forser (~35% zwaarder).

4 Conclusies en slotbeschouwing

4.1 Conclusies

De volgende vier onderzoeksvragen zijn gesteld:

1. Wanneer vindt de overgang van C3 naar CAM precies plaats?
2. Kan de tuinder dit moment beïnvloeden met klimaatsturing?
3. Is het moment van switchen van C3 naar CAM ook genetisch bepaald, met andere woorden, verschilt het misschien ook per ras en per veredelaar?
4. Welke fase zet CO₂ en licht het meest efficiënt om in groei?

In onderstaand overzicht worden deze vragen puntsgewijze beantwoord.

Wanneer vindt de overgang van C3 naar CAM plaats?

- Malaattoets:
 - door het stekken en uitdroging ontstaat enige cam-activiteit
 - na beworteling neemt CAM-activiteit af (laagste activiteit 14 dagen KD)
 - erna weer toename CAM-activiteit
- Fotosynthese-metingen: Overgang naar CAM gaat geleidelijk van C3 via CAM-cycling naar klassiek CAM
 - De middagdip wordt steeds dieper en breder
 - De nachtelijke opname wordt steeds groter

Kan een kweker het moment van overgang naar CAM beïnvloeden?

- Niet zozeer het moment, wel enigszins de mate:
 - Overgangsfase: Onder hoog RV is de C3-fotosynthese iets hoger en de middagdip minder diep
 - CAM-fase: Onder hoog RV ligt de CO₂-opname hoger, deels ook door een hogere CO₂-opname overdag

Wat is de invloed van genetica hierop?

- Geen heel opvallende verschillen tussen de drie cultivars (winterse omstandigheden!)
 - Amarillo neigt als eerste naar CAM
 - Siberia is uiteindelijk het sterkst CAM: 75-85% via nachtelijke CO₂-opname (Amarillo en 'Saja' ~60%)

Welke fase is eigenlijk het meest productief? C3 of CAM?

- 100% C3-fase is fors productiever per eenheid bladoppervlak

4.2 Slotbeschouwing

Hoofddoel van dit onderzoek was meer inzicht verkrijgen in de werking van het CAM-mechanisme bij *Kalanchoë blossfeldiana*. Het was al bekend dat een Kalanchoë gedurende zijn ontwikkeling van stek tot bloeiende plant switcht van C3- naar CAM-fotosynthese, maar wanneer dat gebeurt en onder welke omstandigheden was nog niet bekend. Het is de overtuiging van de auteurs dat ontrafeling van dit mechanisme bijdraagt aan een energie-efficiëntere teelt. Een beter begrip van de fysiologie geeft tuinders namelijk de mogelijkheid om efficiënter licht en CO₂ te benutten voor groei.

RV of beter dampdrukdeficit (VPD) bleek een factor te zijn in productiviteit van Kalanchoë. Onder een hogere RV stonden de huidmondjes verder open dan onder een lagere RV. Tijdens de C3-fase lag de fotosynthese in orde van zo'n 10% hoger (Figuur 4). Tijdens de CAM-fase (Tabel 4-6) leverde dit 9-26% in dagsom aan fotosynthese op. Uiteindelijk was het plantgewicht 5-15% zwaarder onder een hogere RV. In deze proef was het verschil in RV 55-60% versus 80%. In de praktijk kan, zeker in het vroege voorjaar, de RV dalen tot rond de 40%. Naar verwachting zal dit dan een groter verlies aan fotosynthese opleveren.

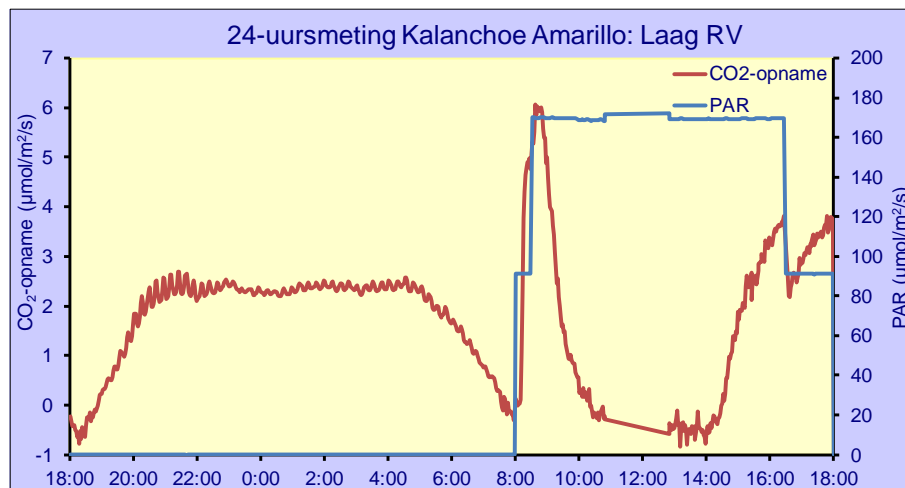
Besparen op belichting aan de randen van de dag kan gedaan worden tijdens de CAM-fase van de teelt. De CO₂-opname bleek pas 15-25 minuten na start van de belichting op gang te komen. Hier kan rekening mee worden gehouden door—in geval de belichting schakelbaar is—de belichting trager op te schakelen naar een hoger lichtniveau. Aan het einde dag is het raadzaam om niet een te hoge lichtintensiteit te geven: Op bladniveau niet hoger gaan dan 180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ PAR. Vergeleken met de teelt van *Phalaenopsis* is de potentiële besparing aan de randen van de dag echter beperkt (Trouwborst *et al.* 2016).

Voor de CAM-fotosynthese geldt dat CO₂-doseren zinloos is als de huidmondjes dicht zijn². In deze proef waren tijdens de CAM-fase de huidmondjes gesloten tussen ongeveer 10:00 en 14:30 uur (Figuur 14). Dit zijn juist de uren dat de zon het hoogst staat, de ramen open staan en CO₂-dosering het minst effectief is. Hier kan dus CO₂ bespaard worden. Bovenstaande geldt echter alleen voor de CAM-fase en niet voor de C3-fase. Vanuit het oogpunt van CO₂-besparing is het dus nuttig om de teelt van Kalanchoë ook tijdens de korte dag te compartimenteren—de lange dag wordt al in een aparte ruimte uitgevoerd. Door middel van een eenvoudige scheidingswand kan ervoor gezorgd worden dat gedurende het eerste deel van de teelt er wel de hele dag (overdag, bij licht) CO₂-gedoseerd wordt, terwijl in het laatste deel van de teelt er

² NB bij de C3-fotosynthese kunnen overdag de huidmondjes dermate geknepen staan dat in het blad de CO₂ heel schaars is. Theoretisch heeft het dan juist wel zin om heel veel te doseren: door een groot verschil in CO₂-concentratie tussen buiten en binnen het blad, kan CO₂ als het ware naar binnen worden geperst ondanks een hoge weerstand (=geknepen huidmondjes). Praktisch heeft dat vaak geen nut omdat in dit soort situaties de ramen vaak zodanig open zijn dat een CO₂-verhoging niet/nauwelijks haalbaar is.

midden op de dag geen CO₂ hoeft gedoseerd te worden en aan de randen van de dag en in de nacht juist wel.

Dit onderzoek is uitgevoerd bij 700 ppm. De vraag kan gesteld worden hoeveel CO₂ optimaal is als de huidmondjes open zijn. Overdag (C₃-fotosynthese) is hier het enzym Rubisco bij betrokken. Vermoedelijk ligt het optimum rond de 700-800 ppm (zie ook Trouwborst *et al.* 2013). 's Nachts (CAM-fotosynthese) speelt het enzym PEPC de hoofdrol. De gevoeligheid voor CO₂ is bij dit enzym veel hoger dan bij Rubisco. De optimale concentratie zou dan ook wel eens wat lager kunnen liggen dan de 700-800 ppm. Hier staat tegenover dat 's nachts de verliezen aan CO₂ vrij beperkt zijn door gesloten luchtramen. De kosten voor CO₂-dosering zijn op dat moment gering ten opzichte van overdag doseren.



Figuur 14. CO₂-opname (rode lijn) bij Kalanchoe 'Amarillo'. De blauwe lijn geeft de lichtintensiteit (PAR) aan (zelfde figuur als figuur 11 maar dan anders weergegeven). Bij 'Amarillo' zijn tussen 10:00 en 14:30 de huidmondjes dicht en heeft CO₂-dosering in deze fase geen enkele zin. CO₂-dosering aan de randen van de dag heeft wel zin voor de fotosynthese.

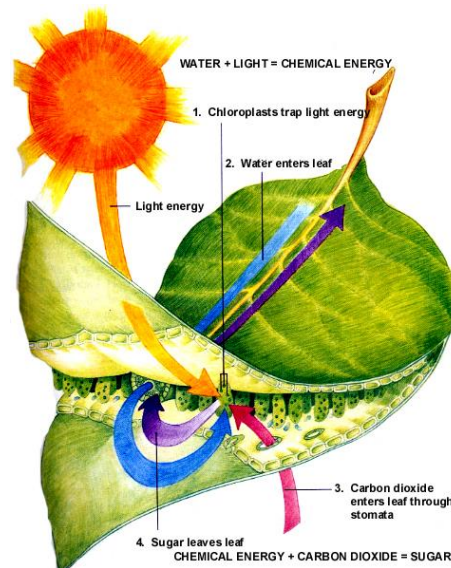
Overigens blijft het de vraag of de fotosynthese altijd geoptimaliseerd moet worden. Uiteindelijk zal het spel van vraag en aanbod van assimilaten (source-sink balans) ook in ogeschouw moeten worden genomen. Vanuit het teeltverloop van Kalanchoë lijkt het voor de hand liggend te zijn om te verwachten dat de vraag naar assimilaten afneemt gedurende de laatste 3-4 weken van de teelt. De plant is dan qua blad (vegetatieve groei) uitontwikkeld en alleen de bloemen (generatieve groei) ontwikkelen nog verder. Het bloemgewicht ligt ook maar rond de 11-12% van het totale plantgewicht (Hogewoning *et al.* 2015). De assimilatenvraag lijkt dus in de eerste 5-6 weken van de teelt fors hoger te zijn dan daarna. Vanuit die gedachte zou bij inzet van schaarse middelen (belichting en CO₂-dosering) de focus vooral op de beginperiode van de teelt moeten liggen.

Referenties

- Borland AM, Barrera Zambrano VA, Ceusters J, Shorrocks K.** 2011. The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. *New Phytologist* 191, 619-633.
- Hogewoning SW, Trouwborst G, Pot CS, Eveleens BA, Dueck TA.** 2015. Sturen op compactheid zonder bloeivertraging? Plant Lighting B.V., Bunnik. 35p.
- Matiz A, Miotto PT, Mayorga AY, Freschi L, Mercier H.** 2013. CAM Photosynthesis in Bromeliads and Agaves: What can we learn from these plants? In: Dubinsky Z, ed. Photosynthesis: InTech, 91-134.
- Pot CS, de Vreede S.J.M., Trouwborst G, Hogewoning SW.** 2015. Activeren van de fotosynthese door sturing op huidmondjesopening. Plant Dynamics B.V. & Plant Lighting B.V., Randwijk. 53p.
- Rustin P, Queiroz-Claret C.** 1985. Changes in oxidative properties of *Kalanchoe blossfeldiana* leaf mitochondria during development of Crassulacean acid metabolism. *Planta* 164, 415-422.
- Taiz L, Zeiger E.** 2015. Plant physiology and development. Sunderland (USA): Sinauer. 761p.
- Trouwborst G, Hogewoning SW, Pot CS,** 2014. Minder belichten Phalaenopsis zonder productieverlies? Plant Lighting B.V., Bunnik. 60p.
- Trouwborst G, Hogewoning SW, van der Spek R.** 2016. Minder belichten Phalaenopsis zonder productieverlies II, Plant Lighting B.V., Bunnik. 45p.
- Trouwborst G, Hogewoning SW, Pot CS.** 2013. Meer rendement uit licht en CO₂ bij Kalanchoë. Bunnik: Plant Lighting B.V en Randwijk: Plant Dynamics B.V. 27p.
- Trouwborst G, Hogewoning SW, Pot CS.** 2013b. Meer rendement uit licht en CO₂ bij Phalaenopsis. Bunnik: Plant Lighting B.V en Randwijk: Plant Dynamics B.V. 27p.
- Warmenhoven, M., N. Marissen en F. van Noort,** 2003. CO₂ opname bij Kalanchoë. PPO-Glastuinbouw rapport GT33092.
- Warmenhoven, M., N. Marissen & F. van Noort,** 2005. Crassulaceën-metabolisme in Kalanchoë. PPO rapport 41313009. 27p.

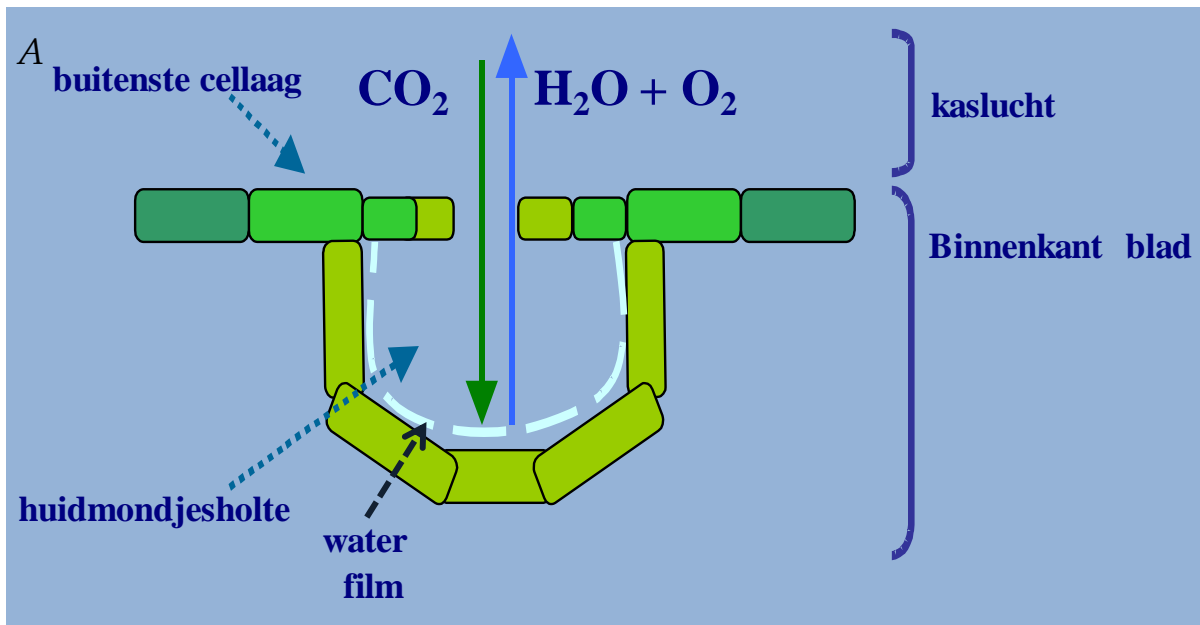
Bijlage 1. Inleiding fotosynthese

Planten nemen water en voedingsstoffen op via hun wortels en CO₂ via de huidmondjes in hun bladeren. Fotosynthese is het proces waarbij de plant met behulp van lichtenergie het opgenomen water en CO₂ omzet in suikers (assimilaten). De fotosynthese is dus de motor van de plant en CO₂ fungeert als brandstof.

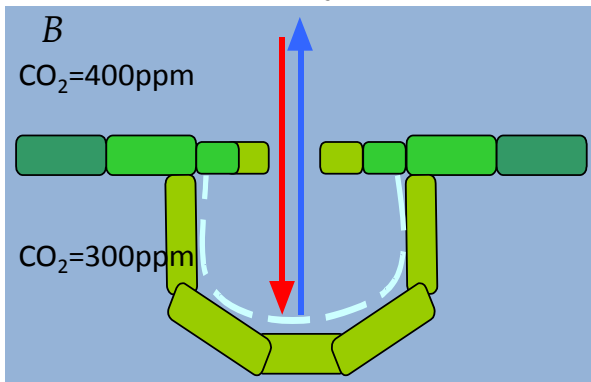


Figuur 15. Essentiële zaken rondom de fotosynthese: Lichtenergie wordt geabsorbeerd door het blad (1). Water komt binnen via de nerven (2). Tevens komt er CO₂ binnen via de huidmondjes (3). Met behulp van de lichtenergie worden er suikers gemaakt (4).

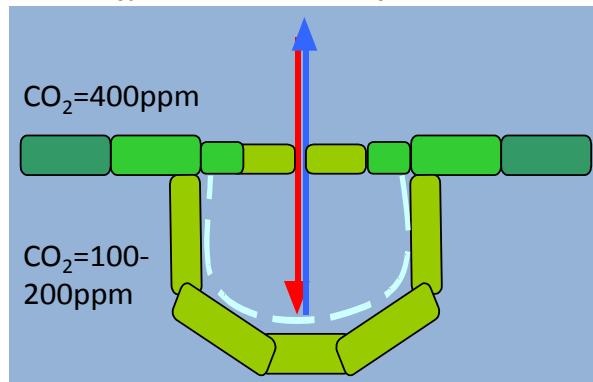
Huidmondjes zijn poriën in het blad waardoor water kan verdampen en de CO₂ naar binnen kan gaan (zie nr. 3 in Figuur 15 en Figuur 16A). Bij een grotere geleidbaarheid van de huidmondjes komt het CO₂ gemakkelijker het blad binnen en verdampt de plant tegelijkertijd ook meer. De plant is in staat de openingsgrootte van deze poriën actief te reguleren. Als de verdamping te hard gaat, kan de plant de huidmondjesopening beperken (knijpende huidmondjes), zodat de plant minder water verliest. De keerzijde van deze beperking is dat de CO₂ minder goed naar binnen kan. Hierdoor kan het interne CO₂-gehalte in het blad fors dalen ten opzichte van dat van de kaslucht. Als de huidmondjes open zijn ligt de interne CO₂-concentratie op ongeveer 70% van de concentratie in de buitenlucht, maar dit kan bij knijpende huidmondjes dalen tot bijvoorbeeld 25% (Zie Figuur 16B). De consequentie is dat de fotosynthese bij knijpende huidmondjes fors lager ligt dan bij normaal geopende huidmondjes.



Normaal huidmondje:



Knijpend huidmondje:



Figuur 16. Schematische tekening van een huidmondje (A) en het verschil tussen de CO_2 -concentratie in de kaslucht en in het blad door de mate van huidmondjesopening (B).