



Limburgs Universitair Centrum

Faculteit Wetenschappen

**De invloed van wit licht op de ethyleenproductie bij
intacte groene kiemplanten en de mogelijke rol hierbij
van de fotosynthese**

Proefschrift voorgelegd tot het
behalen van de graad van Doctor in de
Biologie aan het Limburgs
Universitair Centrum te verdedigen
door Jolanda Weckx

Promotor : Prof. Dr. M. Van Poucke

Diepenbeek, 1993

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK LUC



03 04 00501919

980279



27 FEB. 1998



581.19

WECK

1993

.luc.luc.luc.



Limburgs Universitair Centrum
Faculteit Wetenschappen

**De invloed van wit licht op de ethyleenproductie bij
intacte groene kiemplanten en de mogelijke rol hierbij
van de fotosynthese**

Proefschrift voorgelegd tot het
behalen van de graad van Doctor in de
Biologie aan het Limburgs
Universitair Centrum te verdedigen
door Jolanda Weckx

980279

Promotor : Prof. Dr. M. Van Poucke

Diepenbeek, 1993



27 FEB. 1998

INHOUD

Afkortingen	VI
Hoofdstuk 1 : Inleiding	1
1.1. Ethyleen : een gas als hormoon	1
1.2. Biosynthese van ethyleen	2
1.2.1. Ontdekking en verloop van de ethyleenbiosynthese	3
1.2.1.1. ACC synthase (ACC-S)	7
1.2.1.2. ACC oxidase (ACC-O)	9
1.2.1.3. N-Malonyltransferase	14
1.3. Metabolisme van ethyleen	15
1.4. Werkingsmechanisme en binding van ethyleen	18
1.5. Regulatie van de ethyleenbiosynthese	21
1.5.1. Interne factoren	22
1.5.1.1. Ethyleen	22
1.5.1.2. Andere groeistoffen	23
1.5.1.2.1. Auxinen	23
1.5.1.2.2. Cytokinen	24
1.5.1.2.3. Gibberellinen	25
1.5.1.2.4. Abscisinezuur	26
1.5.2. Externe factoren	27
1.5.2.1. Temperatuur	27
1.5.2.2. Zuurstof	28
1.5.2.3. Stressethyleen	28
1.5.2.4. Licht	30
1.5.2.5. CO ₂	34
1.6. Probleemstelling	37

Hoofdstuk 2 : Materiaal en methoden	39
2.1. Plantemateriaal	39
2.2. Plantenkweek	40
2.3. Gaschromatografische dosering van ethyleen en CO ₂	41
2.3.1. Beschrijving van de meetopstelling	42
2.3.1.1. De plantecuvet	42
2.3.1.2. Cuvet voor het afzonderlijk meten van de ethyleenproductie van fotosynthetisch actieve en inactieve delen bij intacte groene bonekiemplanten	43
2.3.1.3. Klimatisering van de plantecuvetten en belichtingsvelden	45
2.3.1.4. De ethyleenconcentratie-opstelling: vereenvoudigd schema van de gaswegen	47
2.3.1.5. Materialen	50
2.3.2. Analyseprocedure	50
2.3.2.1. Ethyleen	50
2.3.2.2. CO ₂	51
2.3.3. Ijkingsprocedure	52
2.3.3.1. Ethyleen	52
2.3.3.2. CO ₂	52
2.4. Gaschromatografische dosering van ACC en M-ACC	53
2.4.1. Extractieprocedure	53
2.4.2. Doseringsmethode	54
2.4.2.1. Reactie en reactievat	54
2.4.2.2. Schema van de gaswegen	55
2.4.3. Analyseprocedure	56
2.4.4. Ijkingsprocedure, omzettingsrendement en berekeningswijze	57
2.5. Behandeling van de intacte planten	58
2.5.1. Plaatsing van de planten in de meetcuvet	58
2.5.2. Toediening van chemicaliën aan intacte planten	58
2.5.2.1. ACC	58
2.5.2.2. Radicaalbindende chemicaliën	59
2.5.2.3. Radicaalgenerende chemicaliën	59

Hoofdstuk 3 : Wit licht effect op de ethyleenproductie en netto CO₂ evolutie bij intacte groene kiemplanten van verschillende plantesoorten	60
3.1. Inleiding	60
3.2. Gaswisselingsexperimenten onder steady state omstandigheden	61
3.3. Tijdsverloop van de ethyleenproductie en CO ₂ gaswisseling bij donker-licht overgangen	64
3.4. Bespreking	70
 Hoofdstuk 4 : Wit licht effect op de ethyleenbiosynthese bij intacte groene bonekiemplanten	 73
4.1. Effect van wit licht op ethyleenproductie en CO ₂ gaswisseling in functie van de ontwikkelingstoestand	73
4.2. Effect van wit licht op de ethyleenproductie uit exogeen ACC en op de endogene ACC en M-ACC gehalten	75
4.2.1. Effect van wit licht op de ethyleenproductie uit exogeen ACC	76
4.2.2. Effect van wit licht op de endogene ACC en M-ACC gehalten	77
4.3. Bespreking	80
 Hoofdstuk 5 : Relatie tussen fotosynthese en wit licht gestimuleerde ethyleenproductie bij intacte groene bonekiemplanten : mogelijke rol van vrije zuurstofradicalen	 83
5.1. Inleiding	83
5.2. Effect van de zuurstofradicaalbindende chemicaliën spermine, ascorbinezuur, n-propylgallaat en Na-benzoaat op de ethyleenproductie in licht	85
5.3. Effect van de zuurstofradicaalgenererende verbinding paraquat op de ethyleenbiosynthese in licht en duisternis	88
5.3.1. Effect van paraquat op ethyleenproductie en netto CO ₂ evolutie	90
5.3.2. Effect van paraquat op de ethyleenproductie uit exogeen ACC en op de netto CO ₂ evolutie	92
5.3.3. Effect van paraquat op de endogene ACC en M-ACC gehalten	93

5.4. Bespreking	94
Hoofdstuk 6 : Door wit licht gestimuleerde ethyleenproductie in fotosynthetiserende en niet-fotosynthetiserende systemen	99
6.1. Inleiding	99
6.2. Kinetisch verloop van de ethyleenproductie in licht en donker bij planten met genetische defecten in het fotosynthese-apparaat	99
6.2.1. Chlorofyldeficiënte mutanten	99
6.2.1.1. Kinetisch verloop van netto CO ₂ evolutie en ethyleenproductie bij groene en albino <i>Zea mays</i> in licht en donker	103
6.2.1.2. Kinetisch verloop van netto CO ₂ evolutie en ethyleenproductie bij groene, lichtgroene en gele <i>Glycine max.</i> in licht en donker	
6.2.2. Fotosysteem (FS) - deficiënte mutanten	107
6.2.2.1. FS2- en FS1-deficiënte mutanten van <i>Hordeum vulgare</i> cv. Svalof's Bonus	107
6.2.2.2. Kinetisch verloop van de ethyleenproductie bij FS2-deficiënte mutanten en wild type gerst in licht en donker	108
6.2.2.3. Kinetisch verloop van de ethyleenproductie bij FS1-deficiënte mutanten en wild type gerst in licht en donker	110
6.3. Ethyleenproductie in verschillende delen van intacte groene <i>Phaseolus vulgaris</i> kiemplanten	111
6.3.1. Cuvet voor gelijktijdige doch afzonderlijke ethyleenmetingen bij fotosynthetisch actieve en inactieve planteden	111
6.3.2. Kinetisch verloop van de ethyleenproductie bij fotosynthetisch actieve en inactieve organen in licht en donker	112
6.3.3. Effect van paraquat op de ethyleenproductie van fotosynthetisch actieve en inactieve organen in licht en donker	115
6.3.4. Kinetisch verloop van de ethyleenproductie bij fotosynthetisch actieve organen in licht en donker en bij fotosynthetisch inactieve organen in continu donker	117

6.3.5. Kinetisch verloop van de ACC-afhankelijke ethyleenproductie bij fotosynthetisch actieve en inactieve organen in licht en donker	121
6.3.5.1. Toediening van ACC aan de primaire bladeren	121
6.3.5.2. Toediening van ACC aan de wortels	123
6.4. Bespreking	124
 Hoofdstuk 7 : Effect van verschillende lichtkwaliteiten op de ethyleenproductie	 127
7.1. Inleiding	127
7.2. Effect van wit, rood en blauw licht op de ethyleenproductie van intacte groene bonekiemplanten	127
7.3. Effect van wit, rood en blauw licht op de ethyleenproductie van intacte groene en albino maïskiemplanten	128
7.4. Bespreking	129
 Hoofdstuk 8 : Algemene conclusies	 131
 Referenties	 135
 Nawoord	 165

AFKORTINGEN

ABA	:	abscisinezuur
ACC	:	1-aminocyclopropaan-1-carbonzuur
ACC-O	:	ACC-oxidase
ACC-S	:	ACC-synthase
AEC	:	1-amino-2-ethylcyclopropaan-1-carbonzuur
AIB	:	α -aminoisoboterzuur
AK	:	analysekolom
AOA	:	amino-oxyazijnzuur
ATP	:	adenosinetrifosfaat
AVG	:	aminoethoxyvinylglycine
CO ₂	:	koolstofdioxide
CS ₂	:	koolstofdisulfide
D	:	donker
DACP	:	diazocyclopentadien
DM	:	debietmeter
EFE	:	ethylene-forming enzyme
FID	:	vlamionisatiedetector (flame ionization detector)
FS	:	fotosysteem
GC	:	gaschromatograaf
gVG	:	gram versgewicht
HDF	:	hoge druk fles
IAA	:	indolazijnzuur
KK	:	concentratiekolom
KWS	:	koolwaterstoffen
LOX	:	lipoxigenase
M-ACC	:	N-malonyl-ACC
MK	:	meetcuvet
ML	:	monsterlus
MTA	:	5'-methylthioadenosine
MTR	:	5'-methylthioribose

NBD	:	2,5-norbornadiene
POD	:	peroxidase(n)
R	:	rood (licht)
SAM	:	S-adenosylmethionine
VAK	:	vooranalysekolom
6VK	:	zesvolumekraan
W (L)	:	wit (licht)
(2-3-4-6)WK	:	(twee-drie-vier-zes)wegskraan

HOOFDSTUK 1 : INLEIDING

1.1. Ethyleen : een gas als hormoon

Ethyleen (etheen) is een eenvoudige organische molecule met een dubbele binding tussen twee koolstofatomen. Bij kamertemperatuur en onder normale druk is ethyleen een kleurloos, reukloos en makkelijk ontvlambaar gas.

In 1864 werd voor het eerst een reactie van planten beschreven, die achteraf aan ethyleen kon worden toegeschreven. Een aantal bomen langs een laan vertoonde een abnormaal sterke bladval; een lek in de gasleiding van de stadsverlichting was de oorzaak. Pas rond de eeuwwisseling suggereerde de Russische plantenfysioloog Neljubov (1901) dat ethyleen de biologisch actieve component van het stadsgas was. Hij merkte eveneens op dat jonge erwteplanten na exogene toediening van ethyleen (0,06 ppm) de zgn. "triple respons" vertonen : horizontale groei van de kiemplanten en inhibitie van de lengtegroei van de stengels gekoppeld aan een toegenomen diktegroei. De eerste echte aanwijzing dat planten zelf ethyleen produceren stamt uit 1910. Cousins (1910) stelde vast dat sinaasappelen een gas produceren dat de rijping van bananen stimuleert. Het duurde echter nog tot 1934 voordat Gane, met behulp van een chemische absorptietechniek, kon bewijzen dat rijpend fruit ethyleen produceert.

Crocker en med. (1935) vermeldten voor het eerst ethyleen als plante-hormoon. Bovendien constateerden deze auteurs dat er een gelijkenis bestaat tussen ethyleeneffecten en effecten veroorzaakt door auxinen. Michener (1938) twijfelde aan de rol van ethyleen als hormoon. Uit zijn onderzoek met *Pisum sativum* bleek dat auxinen noodzakelijk waren voor het tot stand komen van de "triple respons". Tekortkomingen van de ethyleendoserings-technieken waren de oorzaak voor een stagnatie van het fundamenteel onderzoek over ethyleen op het einde van de jaren dertig.

In 1952 ontwikkelden Young en med. een manometrische methode om kleine hoeveelheden ethyleen te doseren. De ontwikkeling van de gaschromatografie (Burg en Stolwijk 1959, Huelin en Kennett 1959) bracht echter het onderzoek naar de ethyleenhuishouding van planten in een stroomversnelling. De meeste planten produceren maar zeer weinig ethyleen. Daardoor is gaschromatografische detectie en nauwkeurige meting van het gas slechts mogelijk nadat men het enige tijd in een afgesloten ruimte laat ophopen. Bijgevolg gebeuren de ethyleenmetingen niet onder fysiologische omstandigheden. Continue verversing van de lucht in een zgn. doorstroomsysteem is gewenst om de natuurlijke ethyleenproductie te doseren onder beter controleerbare en fysiologische omstandigheden. De Greef en med. (1976) ontwikkelden een dergelijke techniek : een doorstroomsysteem wordt gekoppeld aan gaschromatografie. Dit systeem is uitermate geschikt om kinetische studies van de ethyleenproductie uit te voeren. Onder 2.3.1.4 wordt deze techniek beschreven. Recent werd een lasergestuurde fotoakoestische detectiemethode voor ethyleendosering ontwikkeld met een gevoeligheid van enkele ppt's (parts per trillion) (Woltering en med. 1988). Tenslotte beschreven Eklund en Collin (1991) microdialyse als een effectieve methode om de interne ethyleenconcentratie in levende planteweefsels te bepalen.

1.2. Biosynthese van ethyleen

Alle hogere planten, alle tot nu toe onderzochte lagere planten, bepaalde fungi (Ilag en Curtis 1968), algen (Burg 1962, Watanabe en Kondo 1975) en bacteriën (zie ref. bij Fukuda en Ogawa 1991, Nagahama en med. 1992) produceren ethyleen.

Wij bespreken enkel de ethyleenbiosynthese bij de zaadplanten, omdat in dit werk enkel species van deze plantegroep gebruikt werden als studie-object.

1.2.1. Ontdekking en verloop van de ethyleenbiosynthese

Het was een moeilijke opgave om de precursoren van ethyleen te bepalen omwille van de volgende redenen :

1. na homogenisatie van weefsels, die vrij veel ethyleen produceren (appels, tomaten), kon men geen ethyleen meer detecteren,
2. omwille van de eenvoudige chemische structuur van ethyleen werden verschillende verbindingen voorgesteld als mogelijke precursoren o.a. linoleenzuur, propanal, β -alanine, β -hydroxypropionzuur, ethanol, ethaan, methionine, azijnzuur, fumaarzuur, ... (voor overzicht zie Yang 1974).

Gezien celvrije systemen geen ethyleen produceren, onderzochten Lieberman en Mapson (1964) de ethyleenproductie in een niet-enzymatisch model-systeem. Zij ontdekten als eersten dat in dit systeem methionine als precursor fungeert voor ethyleen. Enkele jaren later toonden dezelfde auteurs (Lieberman en med. 1966) aan dat methionine eveneens de precursor is van ethyleen *in vivo*. Immers bij toediening van radio-actief methionine aan stukjes appelweefsel wordt een efficiënte omzetting naar ethyleen gerealiseerd. Andere onderzoekers bevestigden deze vaststelling zowel in appel als in andere planteweefsels (Burg en Clagett 1967, Baur en med. 1971). Deze resultaten tonen aan dat methionine de belangrijkste, zonet de enige, precursor is van ethyleen *in vivo*. Sandmann en Böger (1980) beschreven in chloroplastfragmenten een niet-fysiologische vorming van ethyleen via lipidenperoxidatie; dit gebeurt hoofdzakelijk in aanwezigheid van licht en Cu^{2+} .

In planteweefsels worden de C-atomen 3 en 4 van methionine omgezet tot ethyleen. Het C_1 -atoom wordt vrijgezet als CO_2 , C_2 wordt omgezet tot mierenzuur en de $\text{CH}_3\text{-S}$ -groep wordt opnieuw in het metabolisme opgenomen.

Verdere opheldering van de ethyleenbiosyntheseweg volgde uit onderzoek van Burg (1973) en Murr en Yang (1975). Zij toonden aan dat de ethyleenproductie uit methionine geïnhibeerd wordt door 2,4-dinitrofenol (een

ontkoppelaar van de oxidatieve fosforylering) en L-canaline (inhibitor van pyridoxaalfosfaat afhankelijke reacties). Deze resultaten wijzen op de betrokkenheid van ATP en een pyridoxaalfosfaat afhankelijk enzym in de ethyleenbiosynthese. Op basis hiervan postuleerden deze auteurs dat S-adenosylmethionine (SAM) als intermediair optreedt. De rol van ATP bestaat erin methionine te activeren ter vorming van SAM. Deze hypothese werd getest door Adams en Yang (1977) in experimenten waarbij ^{14}C - of ^{35}S -gemerkt methionine toegediend werd aan appelweefsels in het climacterisch stadium. Als voornaamste metabolieten vonden zij 5'-methylthioribose (MTR) en in mindere mate 5'-methylthioadenosine (MTA). Na toediening van ^{35}S -MTA werd er zowel gemerkt MTR als gemerkt methionine geproduceerd, terwijl uit ^{35}S -MTR alleen maar gemerkt methionine werd gevormd. Uit deze resultaten concludeerden de onderzoekers dat het zwavelatoom uit MTA via MTR geïncorporeerd wordt in methionine. Na toediening van ^{14}C -methionine aan preclimacterisch appelweefsel werden de gemerkte metabolieten MTR en MTA niet teruggevonden.

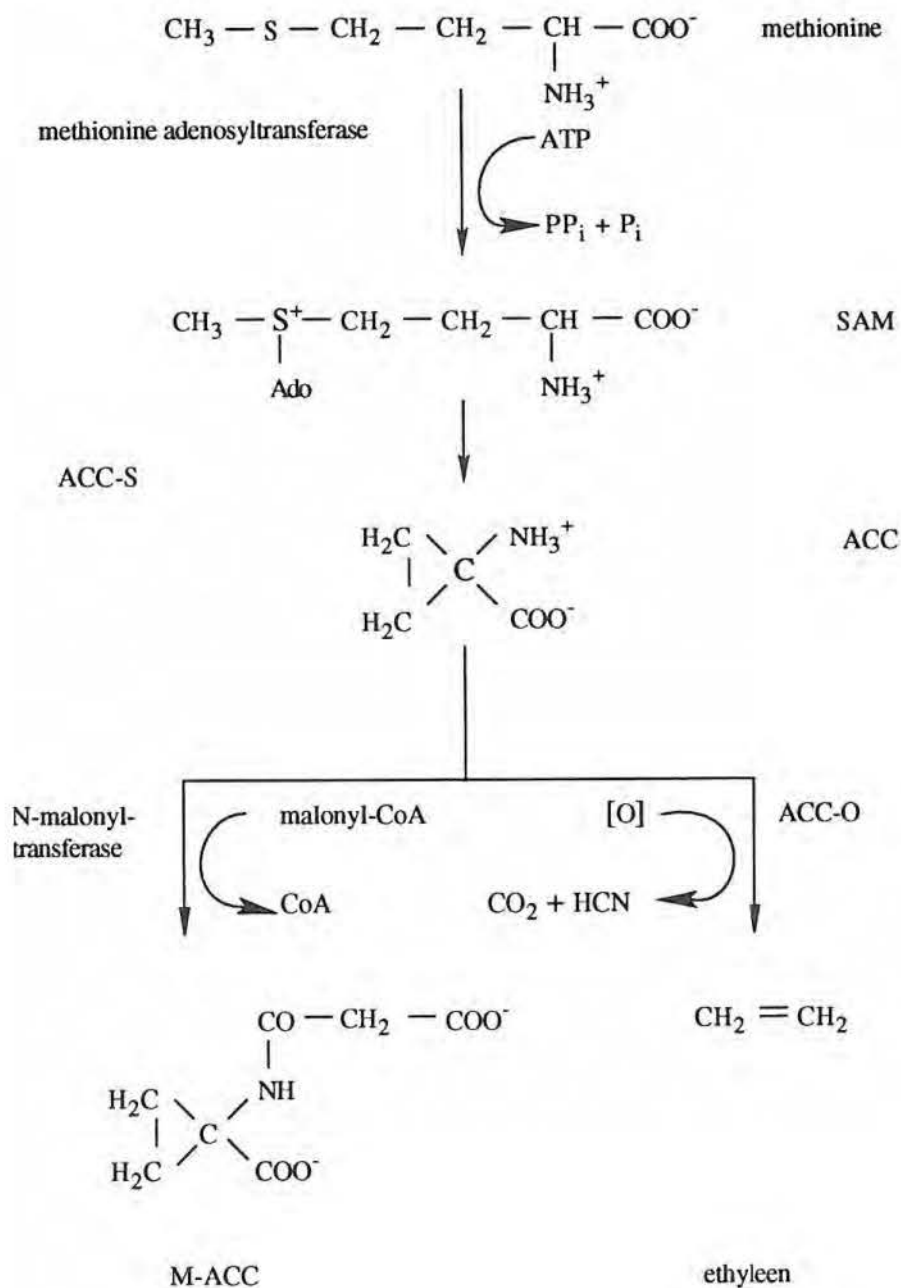
Burg en Thimann stelden in 1959 reeds vast dat in appelweefsel, bewaard onder N_2 -atmosfeer de ethyleenproductie sterk onderdrukt wordt. Transfer naar aërobe condities brengt echter een sterke stijging van de ethyleenproductie teweeg. Ook Adams en Yang (1979) vonden dat weefsels onder anaërobe omstandigheden geen ethyleen produceren; enkel MTR en een verbinding, die geïdentificeerd werd als 1-aminocyclopropan-1-carbonzuur (ACC), accumuleren. Bij overgang naar een zuurstofatmosfeer wordt ACC onmiddellijk omgezet tot ethyleen. Hieruit werd afgeleid dat ACC een tussenproduct is en dat de omzetting van ACC naar ethyleen afhankelijk is van zuurstof. Onafhankelijk van Adams en Yang stelden Lürssen en med. (1979) vast dat bladweefsel van soja, na behandeling met ACC, een verhoogde ethyleenproductie vertoont. Deze door ACC geïnduceerde ethyleenproductie kan enkel doorgaan in aërobe omstandigheden. Cameron en med. (1979) toonden aan dat verschillende weefsels van diverse plantesoorten in hoge mate ACC kunnen omzetten tot ethyleen. Ook Boller en med. (1979) deden soortgelijke waarnemingen. Zij concludeerden hieruit dat

de ethyleensynthese gereguleerd wordt op het niveau van de ACC productie, eerder dan op de omzetting van ACC naar ethyleen. De ACC synthese is dus blijkbaar de snelheidsbepalende stap in de ethyleenbiosynthese.

Amrhein en med. (1981) en Hoffman en Yang (1982) toonden aan dat naast de omzetting tot ethyleen, het ACC ook in een gebonden vorm kan voorkomen in planteweefsels. Zij identificeerden deze gebonden vorm als N-malonyl-ACC (M-ACC). Al snel bleek deze verbinding in verschillende weefsels een stabiel eindproduct van ACC te zijn (Amrhein en med. 1982).

De ethyleenbiosyntheseweg (fig. 1.1) kan als volgt worden samengevat. Methionine wordt door ATP geactiveerd tot SAM; deze omzetting wordt gekatalyseerd door methionine adenosyltransferase (Konze en med. 1978, Konze en Kende 1979a). SAM wordt enzymatisch gefragmenteerd in ACC en MTA. ACC synthase (ACC-S), het enzym verantwoordelijk voor deze conversie, is pyridoxaalfosfaat afhankelijk. ACC tenslotte fungeert als de directe precursor van ethyleen. Het "ethylene-forming enzyme (EFE)", ook het ACC oxidase (ACC-O) genoemd, katalyseert deze finale stap in de ethyleenbiosynthese. De vorming van M-ACC uit ACC en malonyl-CoA wordt bemiddeld via het N-malonyltransferase; de malonylgroep van malonyl-CoA wordt getransfereerd naar de aminogroep van ACC.

In de volgende paragrafen zullen wij de karakteristieken van ACC-S, ACC-O en N-malonyltransferase nader behandelen.

Fig. 1.1 : Samenvatting van de ethyleenbiosyntheseweg.

1.2.1.1. ACC synthase (ACC-S)

Korte tijd na de ontdekking van de ethyleenbiosyntheseweg rapporteerden Boller en med. (1979) en Yu en med. (1979b) de enzymatische vorming van ACC uit SAM in celvrije tomaatextracten. Het enzym, ACC-S, wordt als volgt gekarakteriseerd :

- Het is een oplosbaar enzym, dat de synthese van ACC katalyseert in het cytoplasma.
- SAM en in mindere mate S-adenosylethionine zijn specifieke substraten.
- Het is een pyridoxaalfosfaat afhankelijk enzym. Dit wordt aangetoond door de sterke inhibitie van de enzymatische activiteit door 2 welbekende inhibitoren van pyridoxaalfosfaat afhankelijke enzymatische reacties, aminoethoxyvinylglycine (AVG) en amino-oxyazijnzuur (AOA).
- Het pH-optimum bedraagt 8,5.
- Het enzym heeft een Km-waarde voor SAM van 13 μ M (Boller en med. 1979) tot 20 μ M (Yu en med. 1979b).
- Het molecuulgewicht van tomaat ACC-S, bepaald via gelfiltratie, bedraagt 55.000-58.000 daltons (Yang 1980, Acaster en Kende 1983).
- De omzetting van SAM naar ACC is de snelheidsbepalende stap in de ethyleensynthese ; ACC-S vertegenwoordigt aldus het regulatiepunt in de biosyntheseweg.
- De turnover rate van het enzym is vrij kort, de half-life tijd bedraagt 25 min in met auxine behandelde stengels van *Vigna radiata* (Yoshii en Imaseki 1982) en 30 tot 40 min in tomaten (Kende en Boller 1981). Zowel de synthese als de inactivatie van ACC-S bepalen dus de intensiteit van de enzymatische reactie. Boller (1985) en Satoh en Esashi (1986) rapporteerden dat SAM niet alleen als substraat maar tevens als een enzym geactiveerde irreversiebele inactivator fungeert voor ACC-S. De vlugge daling van de enzymatische activiteit in intacte weefsels wordt hierdoor verklaard. De inactivatie van ACC-S door SAM zou het gevolg zijn van de covalente binding van een fragment van de SAM molecule op de actieve plaats van het enzym (Satoh en Yang 1988). Spanu en med. (1990), daarentegen, vermeldde dat de inactivatie van ACC-S *in vitro* en

in vivo van elkaar verschillen. *In vitro* wordt de inactivatie van ACC-S door SAM efficiënt geblokkeerd door AVG. *In vivo*, bladweefsel en celsuspensieculturen van tomaat, heeft AVG geen effect op de "turnover" van ACC-S. Daaruit concludeerden deze onderzoekers dat in deze weefsels de substraatsafhankelijke inactivatie van ACC-S niet verantwoordelijk is voor de vlugge afname van de enzymatische activiteit. Deze korte actieve periode van het enzym schept de mogelijkheid tot een nauwkeurige regeling van het ACC productieniveau in de plant. Op dit "kontrolepunt" werken o.a. IAA, verwonding en andere vormen van stress in.

- Polyaminen blijken de ACC-S activiteit op een niet-competitieve wijze te inhiberen (Hyodo en Tanaka 1986). Li en med. (1992) suggereerden dat deze verbindingen de ethyleenbiosynthese specifiek regelen op het niveau van de accumulatie van ACC-S transcripts.

De zuivering van ACC-S was zeer moeilijk omwille van de labiliteit en de zeer lage concentratie van het enzym. In verschillende planteweefsels werd echter een vrij goede zuivering van het enzym bekomen :

- *Lycopersicon esculentum* (Bleecker en med. 1986, Mehta en med. 1988, Van Der Straeten en med. 1989),
- *Cucurbita maxima* (Nakajima en Imaseki 1986),
- *Cucurbita pepo* (Sato en Theologis 1989),
- *Vigna radiata* (Tsai en med. 1991),
- *Malus sylvestris* (Yip en med. 1991).

Tevens werden monoclonale antilichamen bereid (Bleecker en med. 1986, 1988, Mehta en med. 1988, Dong en med. 1991a) en het cDNA, coderend voor ACC-S, gecloneerd (Sato en Theologis 1989, Nakajima en med. 1990, Van Der Straeten en med. 1990, Dong en med. 1991b, Park en med. 1992).

Zoals boven reeds vermeld, wordt de ACC-S activiteit beïnvloed door verschillende stimuli. Regelen al deze stimuli de expressie van 1 ACC-S gen of bestaan er verschillende ACC-S genen die elk door een specifieke stimulus worden gereguleerd ?

In de literatuur zijn er voldoende bewijzen om aan te nemen dat ACC-S in het plantegenoom wordt gecontroleerd door meer dan 1 gen. Zo toonden Nakagawa en med. (1988) aan dat zowel in *Lycopersicon esculentum* als in *Cucurbita maxima* de primaire structuur van ACC-S, geïnduceerd door verwonding enerzijds en auxinen anderzijds, verschillend is. Zij suggereerden dat er 2 genen bestaan : 1 voor wondinductie en 1 voor auxineninductie van het enzym. Verschillende onderzoekers bevestigden het voorkomen van 2 genen voor ACC-S (*Lycopersicon esculentum* : Van Der Straeten en med. 1990, Olson en med. 1991; *Cucurbita maxima* : Nakajima en med. 1990; *Cucurbita pepo* : Huang en med. 1991, Sato en med. 1991). Botella en med. (1992), daarentegen, toonden aan dat er minstens 3 genen voor ACC-S bestaan in geëtiolerde *Vigna radiata*. Rottmann en med. (1991) identificeerden in tomaat 5 verschillende genen, coderend voor ACC-S; minstens 2 genen zijn functioneel. Yip en med. (1992), tenslotte, isoleerden 4 verschillende cDNA fragmenten uit tomaat, die elk, in verschillende omstandigheden, coderen voor ACC-S isozymen.

De huidige consensus is dat ACC-S gecodeerd wordt door een multigen-familie waarvan de leden een differentiële expressie ondergaan als respons op ontwikkelings-, omgevings- en hormonale factoren (Yip en med. 1992, Mori en med. 1993).

1.2.1.2. ACC oxidase (ACC-O)

De laatste stap in de ethyleenbiosynthese, de oxidatie van ACC tot ethyleen, wordt gekatalyseerd door het enzym (of enzymcomplex) "ethylene-forming enzyme (EFE)", ook ACC-O genoemd (Apelbaum en med. 1981a, Yang en Hoffman 1984). *In vivo* is deze omzettingsreactie afhankelijk van O₂ (Adams en Yang 1979). Tevens wordt zij geïnhibeerd door Co²⁺ (Lürssen en med. 1979), ontkoppelaars van het protonentransport (Yu en med. 1980, Apelbaum en med. 1981b, John en med. 1985) en metaalchelaterende verbindingen (Apelbaum en med. 1981a, Bouzayen en med. 1991). Bij volledige homogenisatie (celvrij extract), osmotische shock en hoge of lage

temperaturen verliest een weefsel de capaciteit om ethyleen te vormen. Daarom suggereerde men dat ACC-O membraangebonden is en enkel functioneert als de cellulaire integriteit bewaard blijft (Imaseki en Watanabe 1978, Apelbaum en med. 1981a). Hoffman en med. (1982) toonden met behulp van 2-ethylanalogen van ACC (AEC) aan dat ACC-O stereoselectief is voor zijn substraat. Het enzym zet *in vivo* enkel (1R, 2S)-AEC om tot 1-buteen.

Er werden verscheidene celvrije ethyleenvormende systemen beschreven (Konze en Kende 1979b, Mayak en med. 1981, McRae en med. 1982). Venis (1984) gebruikte de stereoselectiviteit van ACC-O als criterium om de fysiologische betekenis van de verschillende *in vitro* systemen te evalueren. McKeon en Yang (1984) rapporteerden dat celvrije systemen van erwten niet de stereospecificiteit vertonen, die eigen is aan intact erwteweefsel. Enkel vacuolen geïsoleerd uit protoplasten van *Pisum sativum* en *Vicia faba* hadden dezelfde karakteristieken als het *in vivo* ACC-O (Guy en Kende 1984). De niet-stereospecifieke omzetting van ACC naar ethyleen werd toegeschreven aan contaminatie met enzymen, die vrije radicalen produceren (Diolez en med. 1986).

De betrokkenheid van vrije radicalen in de ethyleenbiosynthese *in vivo* en *in vitro* werd eveneens gesuggereerd door de resultaten van experimenten waarin radicaalbindende chemicaliën gebruikt worden (Beauchamp en Fridovich 1970, Baker en med. 1978, Apelbaum en med. 1981b, Parups 1984, Thompson en med. 1984, Paulin en med. 1986). Het was echter onduidelijk welk het specifieke radicaalspecies en het betrokken reactiemechanisme was (Dollwet 1978, Legge en med. 1982, McRae en med. 1982, Legge en Thompson 1983).

Lipoxygenase (LOX) werd voorgesteld als een mogelijke kandidaat voor ACC-O. Bousquet en Thimann (1984) beschreven een enzymstelsel dat *in vitro* ACC tot ethyleen oxideert. Linoleenzuur, pyridoxaalfosfaat, mangaan en LOX maken er deel van uit. Kacperska en Kubacka-Zebalska (1985) toonden aan dat de toename van ACC en LOX activiteit gelijktijdig optreden

en een stijging van de ethyleenproductie veroorzaken in *Brassica napus*. Uit de resultaten van Nilsen en med. (1988) bleek een betrokkenheid van vrije zuurstofradicalen, mogelijk gegenereerd door peroxidatie van lipiden. Zij suggereerden een "samenwerking" tussen LOX en ACC-O. Hydroperoxiden, producten van LOX activiteit, kunnen de chemische omzetting van ACC naar ethyleen vergemakkelijken (Legge en Thompson 1983, Lynch en med. 1985, Pirrung 1986, Gardner en Newton 1987, Wang en Yang 1987). Het LOX systeem verschilt echter van het natuurlijke ACC-O (Lynch en med. 1985, Pirrung 1986, Wang en Yang 1987). Men verwierp daarom de hypothese dat LOX overeenkomt met ACC-O in fysiologische omstandigheden.

Tevens werd aandacht besteed aan de betrokkenheid van peroxidasen (POD) bij de *in vivo* omzetting van ACC naar ethyleen. Rohwer en Mäder (1981) bestudeerden deze omzetting en de POD activiteit in extracten van geëtioleerde erwtekiemplanten. Zij vonden geen relatie tussen beide. *In vitro* systemen met POD en de nodige cofactoren kunnen de omzetting van ACC naar ethyleen wel degelijk realiseren (Osswald en med. 1989, Acosta en med. 1991a, b). Acosta en med. (1991a, b) beschreven het reactiemechanisme van de ethyleenproductie in deze systemen. ACC wordt geoxideerd tot ethyleen in een 2staps-1-electron reactie. Hierbij worden 2 tussenproducten gevormd : een ACC radicaal ($ACC\cdot$) en een ACC kation (ACC^+). De omzetting van het $ACC\cdot$ tot het ACC^+ kan ofwel enzymatisch ofwel via een metaalion (of een metaalhoudende verbinding) worden gerealiseerd. Bij een niet onmiddellijke oxidatie van de ACC radicalen, worden deze gestabiliseerd tot hydroperoxiden. Dit heeft tot gevolg dat de productie van ethyleen wordt verhinderd. Deze auteurs suggereerden dat een interactie tussen ACC en POD *in vivo* mogelijk is. Men kan echter de relatie van dit systeem met het *in vivo* ACC-O in vraag stellen zolang men geen $ACC\cdot$ detecteert, de "factor" die de $ACC\cdot$ omzet tot ethyleen niet identificeert alsook de verbindingen, die uit de ACC hydroperoxiden gevormd worden, niet isoleert in een *in vivo* ethyleenvormend systeem. Recent toonden Kevers en med. (1992) aan dat er een nauw verband bestaat tussen de activiteit van ascorbaatperoxidase en de capaciteit om ACC in ethyleen om te zetten bij intacte weefsels van *Vigna*

radiata en *Beta vulgaris* en bij intacte *Acetabularia mediterranea*. Zij stelden voor dat ascorbaatperoxidase een directe of indirecte rol vervult in het ACC-O systeem.

Onlangs werd een belangrijke doorbraak gerealiseerd in het onderzoek naar ACC-O op 2 domeinen :

1. Er werd een gen geïdentificeerd dat een polypeptide component van ACC-O codeert (Hamilton en med. 1990).
2. De ACC-O activiteit werd volledig gerecupereerd *in vitro* (Ververidis en John 1991).

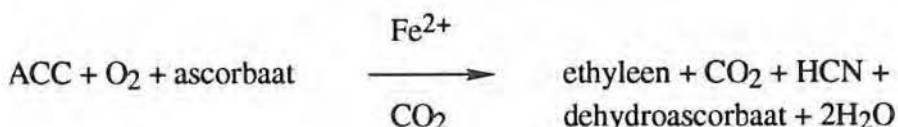
Een cDNA clone, pTOM13, oorspronkelijk geïsoleerd als een gen dat tussenkomt in het rijpingsproces bij tomaten (Holdsworth en med. 1987) vertoonde eveneens expressie als reactie op verwonding (Smith en med. 1986) en in senescerende bladeren (Davies en Grierson 1989). De functie van dit gen werd in eerste instantie onderzocht door de productie van het corresponderende mRNA in transgene tomaten te inhiberen via een antisens-gen benadering. Niet alleen de ethyleenproductie maar ook de ACC-O activiteit werden sterk geïnhibeerd in deze "antisensplanten" (Hamilton en med. 1990). Hieruit werd geconcludeerd dat het pTOM13 mRNA codeert voor een polypeptide component van ACC-O. De aminozuursequentie van dit polypeptide vertoont een sterke homologie met die van een flavanone-3-hydroxylase. De functie van het pTOM13 polypeptide werd tevens bestudeerd na expressie in *Saccharomyces cerevisiae*; dit gebeurde na correctie van kleine cloneringsartefacten (Hamilton en med. 1991). De gecorrigeerde clone werd pRC13 genoemd. In tegenstelling tot normale gistcellen converteren getransformeerde cellen ACC tot ethyleen. De ACC-O activiteit heeft dezelfde kenmerken als die in planteweefsels. Er is een stereoselectieve omzetting en een sterke inhibitie door Co^{2+} en 1,10-phenanthroline (metaalchelaterende verbinding). Opnieuw wordt ACC-O tot de groep van de hydroxylasen gerekend. Net zoals bij deze enzymen, wordt de activiteit van ACC-O gestimuleerd na toediening van ascorbaat en geïnhibeerd door Fe-chelaterende verbindingen (Bouzayen en med. 1992). De bekomen resultaten wijzen erop dat een één-gen-product voldoende is om ACC-O activiteit te bekomen. Het

35 kDa polypeptide gecodeerd door pTOM13 (pRC13) is geen membraan-eiwit en beschikt niet over een signaalpeptide; dit wijst erop dat het een cytoplasmatisch eiwit is. Deze waarnemingen komen niet overeen met de vermeende lokalisering van ACC-O in de membraan (zie boven). Dit kan eventueel verklaard worden als volgt : het proteïne, gecodeerd door pRC13 interageert met, of is voor zijn activiteit afhankelijk van, andere membraan-eiwitten. Het is echter ook mogelijk dat het enzym werkelijk oplosbaar is, zoals trouwens werd waargenomen door Ververidis en John (1991). Spanu en med. (1991) isoleerden verschillende pTOM13 homologen en zij identificeerden 1 hiervan, nl. pHTOM5 als een ACC-O clone op basis van zijn functionele expressie in oöcyten van *Xenopus laevis*. Na screening van alle beschreven genen bij tomaat met pTOM13 cDNA werden minstens 3 ACC-O genen gevonden (Bouzayen en med. 1993). Zij werden eth1, eth2 en eth3 genoemd. Clonering van deze genen in *E. coli* bewees dat er zeker op mRNA niveau een expressie is. Bepaling van de "factoren" die de specifieke expressie van deze genen in verschillende weefsels en ontwikkelingsstadia reguleren, is een volgende stap in het onderzoek.

Latché en med. (1993) demonstreerden met behulp van licht- en electronen-microscopische immunolokalisatie studies dat het merendeel van de ACC-O activiteit bij rijpende tomaten aanwezig is in de apoplast. Er is een duidelijke contradictie tussen deze lokalisatie en de tot nu toe geïdentificeerde eiwit-structuren afgeleid uit cDNA sequenties. Men kan immers in geen enkel geval een signaalsequentie terugvinden die instaat voor excretie van het proteïne.

Ververidis en John (1991) waren de eersten die erin slaagden om het ACC-O van meloenen *in vitro* volledig te zuiveren. Zij identificeerden ACC-O als een oplosbaar enzym enkel actief na toediening van Fe^{2+} en ascorbaat. Bouzayen en med. (1991) toonden aan dat Fe eveneens een essentiële cofactor is bij de *in vivo* conversie van ACC naar ethyleen. Later werd het enzym gezuiverd uit appels (Dilley en Kuai 1993, Latché en med. 1993, Yang en med. 1993) en avocado's (Christoffersen en med. 1993). Deze onderzoekers vonden dezelfde kenmerken van het enzym terug. Yang en med. (1993) en Smith en John (1993) toonden bovendien aan dat CO_2 strikt noodzakelijk is om ACC tot ethyleen om te zetten.

De vorming van ethyleen uit ACC verloopt als volgt :



Gentechnologie alsook de zuivering van het enzym maakten een enorme vooruitgang in het ethyleenonderzoek mogelijk. Laat ons hopen dat onderzoekers in al hun "moleculaire" ijver de fysiologische aspecten niet uit het oog verliezen.

1.2.1.3. N-Malonyltransferase

Kionka en Amrhein (1984) konden in extracten van *Vigna radiata* hypocotylen het enzym N-malonyltransferase aantonen. Dit enzym katalyseert de vorming van M-ACC uit ACC en malonyl-CoA. Dezelfde auteurs toonden een analogie aan tussen de malonylering van ACC enerzijds en die van D-aminozuren anderzijds. De vorming van M-ACC wordt competitief geïnhibeerd door D-aminozuren; L-aminozuren hebben geen effect. Omgekeerd wordt eveneens de vorming van N-malonyl-D-aminozuren geïnhibeerd door ACC. Beide malonyleringsreacties worden veroorzaakt door hetzelfde enzym (Su en med. 1985). Liu en med. (1984) toonden eveneens een nauw verband aan tussen de malonylering van α -aminoisoboterzuur (AIB), een structurele ACC analoog, D-aminozuren en ACC. De oxidatieve decarboxylatie van AIB vertoont dezelfde karakteristieken als de oxidatieve afbraak van ACC tot ethyleen.

De conjugatie van ACC tot M-ACC is essentieel irreversiebel en het M-ACC is metabolisch inactief (Hoffman en med. 1983). De accumulatie van M-ACC in de plant treedt vooral op wanneer zij aan stress wordt blootgesteld. Bijgevolg kan het M-ACC gehalte beschouwd worden als een indicator van de stress voorgeschiedenis van de plant (Hoffman en med. 1983). Jiao en

med. (1986) en Hanley en med. (1989) rapporteerden dat in sommige weefsels M-ACC terug kan gehydrolyseerd worden tot ACC. Deze reactie vindt enkel plaats na toediening van M-ACC in niet-fysiologische concentraties.

Autoïnhibitie van de ethyleenproductie in *Nicotiana tabacum* (Philosoph-Hadas en med. 1985), *Citrus paradisi* (Liu en med. 1985a) en *Lycopersicon esculentum* (Liu en med. 1985b) na exogene toediening van ethyleen wordt niet alleen veroorzaakt door een onderdrukking van de ACC synthese maar ook door een stimulering van de malonylering. Tevens werd de regulerende rol van de malonyleringsreactie bij de endogene ethyleenproductie beschreven (Jiao en med. 1987, Vangronsveld en med. 1988).

M-ACC accumuleert hoofdzakelijk in de vacuool (Amrhein en med. 1987). Bouzayen en med. (1988) toonden aan dat M-ACC gesynthetiseerd wordt in het cytosol en vervolgens getransporteerd wordt naar de vacuool. Het transport doorheen de tonoplast wordt bemiddeld door een transporteiwit (M-ACC carrier) gedreven door een protonengradiënt veroorzaakt door ATP-ase (Bouzayen en med. 1989). De retentie van M-ACC in de vacuool is te wijten aan (Pedreño en med. 1991) :

1. de ionaire toestand van de molecule; er is een lage membraire permeabiliteit voor het M-ACC anion,
2. een niet-efflux via de M-ACC carrier.

1.3. Metabolisme van ethyleen

Het metabolisme van ethyleen werd bestudeerd in *Pisum sativum* (Beyer 1975a), *Dianthus caryophyllus* (Beyer 1977), *Ipomoea tricolor* (Beyer en Sundin 1978), *Vicia faba* (Jerie en Hall 1978), *Gossypium hirsutum* (Beyer 1979b) en *Lycopersicon esculentum* (Beyer en Blomstrom 1980). Hiertoe werden planten of plantedelen blootgesteld aan door gaschromatografie sterk gezuiverd ^{14}C -ethyleen. Men toonde aan dat de ^{14}C enerzijds in het weefsel

en anderzijds in vluchtige componenten wordt geïncorporeerd. In erwtekiemplanten werden ethyleenglycol ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) en zijn glucose conjugaat ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OGlu}$) geïdentificeerd als de belangrijkste metabolieten van ethyleen, geïncorporeerd in het weefsel. Daarnaast werd aanvankelijk enkel de oxidatie van ethyleen tot CO_2 vastgesteld (Beyer 1975a). Jerie en Hall (1978), daarentegen, vonden dat ethyleenoxide ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$) als enig oxidatieproduct van ethyleen voorkomt in cotyledonen van *Vicia faba*. Later kon Beyer (1980) naast CO_2 ook ethyleenoxide aantonen als metaboliet in erwtekiemplanten. Een monooxygenase is betrokken in het ethyleenmetabolisme (Beyer 1984). Smith en med. (1985) karakteriseerden dit enzym in celvrije extracten van *Vicia faba* cotyledonen. Het enzym heeft zuurstof en NADPH nodig voor zijn activiteit en katalyseert de volgende reactie :



Beyer (1984) constateerde dat het ethyleenmetabolisme vrij algemeen voorkomt in het plantenrijk. Vervult dit proces dan een fysiologische rol in planten ? Deze auteur stelde 3 mogelijke functies voor :

1. Het ethyleenmetabolisme reguleert de endogene ethyleenconcentratie. Deze hypothese werd vroeger reeds verworpen op basis van de volgende vaststellingen. Planten metaboliseren zodanig weinig ethyleen dat dit proces onmogelijk kan beschouwd worden als een effectief systeem om de interne ethyleenconcentratie te verlagen (Beyer 1980). Experimenten met koolstofdisulfide (CS_2) bevestigen deze waarneming. CS_2 inhibeert het metabolisme maar heeft geen invloed op de ethyleenproductie (Beyer 1977). Ook bestaat er geen goede correlatie tussen ethyleenproductiesnelheden en het ethyleenmetabolisme. Tenslotte diffundeert ethyleen zeer gemakkelijk uit weefsels. De interne ethyleenconcentratie wordt dus op voldoende wijze onder controle gehouden door de regulatie van de ethyleenbiosynthese.
2. De oxidatieproducten van ethyleen kunnen de gevoeligheid van planteweefsels aan ethyleen moduleren.

Beyer (1984) vermeldde dat specifieke ethyleeneffecten versterkt worden als ethyleenoxide samen met ethyleen wordt toegediend. Hierbij moet echter

gewezen worden op de niet-fysiologische concentraties waarin het ethyleenoxide werd aangewend.

3. Er bestaat een nauwe relatie tussen het metabolisme en de werking van ethyleen.

Ag^+ ionen inhiberen de incorporatie van gemerkt ethyleen in planteweefsels terwijl CO_2 de oxidatie van ethyleen tot CO_2 verlaagt (Beyer 1979a). De mate waarin de inhibitie van de twee verschijnselen optreedt, is evenredig met het reverserend effect van Ag^+ en CO_2 op het ethyleeneffect bij erwtekiemplanten. Beyer (1979a) besloot uit deze waarnemingen dat het ethyleenmetabolisme rechtstreeks in verband staat met het werkingsmechanisme van het hormoon. Sanders en med. (1986) verdedigden eveneens de hypothese van de relatie tussen ethyleenmetabolisme en ethyleenwerking. Zij stelden de ethyleenreceptor en het enzymstelsel voor ethyleenincorporatie/-oxidatie gescheiden van elkaar voor. Het enzym (oxygenase) produceert ethyleenoxide dat op zijn beurt kan interageren met de receptor samen met ethyleen zelf om alzo de gepaste biochemische respons tot stand te brengen. Het CO_2 vormend systeem zou, indien aanwezig en indien het deel uitmaakt van hetzelfde complex, een rol hebben in het verhogen van de activiteit van het ethyleen monooxygenase (Evans en med. 1984). Glycosylatie van ethyleenglycol zou een inactivatiereactie van ethyleenoxide kunnen zijn. Enzym en receptor zijn in deze hypothese niet identisch. Het oxygenase werkt niet als receptor, maar is actief in het voorzien van een modulator (ethyleenoxide). Met deze hypothese wordt meteen een oplossing geboden aan het probleem van de lage affiniteit die het metaboliserend systeem voor ethyleen heeft. Immers, als het enzym zelf niet als receptor fungeert, is het niet nodig een hoge affiniteit voor ethyleen te bezitten. De geldigheid van deze hypothese kan echter alleen maar getoetst worden als de componenten van het systeem geïsoleerd en gekarakteriseerd kunnen worden. Het is bovendien moeilijk het belang van de ethyleenoxidatie te evalueren zolang er niet meer geweten is over het primaire mechanisme van de ethyleenwerking (zie 1.4).

In de literatuur bestaan echter ook aanduidingen contra de mogelijke relatie ethyleenmetabolisme/ethyleenwerking. Zo zijn fysiologische reacties verzaagd bij een ethyleenconcentratie tussen 1 en 10 $\mu\text{l/l}$, terwijl de oxidatieve

afbraak van ethyleen zelfs bij 100 $\mu\text{l/l}$ niet verzadigd is (Beyer 1975a). Daarnaast wordt propyleen, een fysiologisch analoog van ethyleen, veel vlugger gemetaboliseerd dan ethyleen terwijl de inductie van karakteristieke ethyleenreacties minstens honderdmaal minder efficiënt gebeurt (Beyer 1978). Tenslotte kwamen Sanders en med. (1989a, b, *Pisum sativum*) en Raskin en Beyer (1989, *Amaranthus retroflexus*) onafhankelijk van elkaar tot de conclusie dat het ethyleenmetabolisme niets te maken zou hebben met het werkingsmechanisme van het hormoon. Dit besluit steunden zij op de volgende vaststellingen :

1. effecten van inhibitoren op ethyleenwerking en -metabolisme komen niet overeen,
2. elicitoren van ethyleeneffecten hebben niet de te verwachten effecten op het ethyleenmetabolisme,
3. inhibitoren van het ethyleenmetabolisme beïnvloeden de reactie van planten op ethyleentoediening niet.

1.4. Werkingsmechanisme en binding van ethyleen

Het fytohormoon ethyleen is een natuurlijk hormoon bij hogere planten. Deze gasvormige component beïnvloedt talrijke complexe reacties tijdens verscheidene ontwikkelingsfasen en in vrijwel alle organen van de plant. Zo heeft ethyleen een effect op de zaadkieming, vegetatieve groei, bloei-inductie, bladabscissie, vruchtrijping en senescentie (Abeles 1973).

Burg en Burg (1967) voerden een gedetailleerde vergelijking uit van de chemische structuur van verschillende gassen noodzakelijk om een typisch ethyleeneffect te induceren, nl. inhibitie van de lengtegroei van geëtioleerde erwtestengels. Op basis van hun bevindingen postuleerden deze onderzoekers dat, om biologisch actief te zijn zoals ethyleen, moleculen aan de volgende kenmerken dienen te voldoen :

1. Enkel onverzadigde alifatische verbindingen zijn actief. Een dubbele binding is veel actiever dan een drievoudige binding.

2. De activiteit is omgekeerd evenredig met de grootte van de molecule.
3. Electrofiële substituties (zuigen electronen uit de onverzadigde binding) reduceren de biologische activiteit van de molecule.
4. De onverzadigde binding moet gelegen zijn naast een terminaal C-atoom. Zo is methylacetyleen ($\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{CH}$) actief, terwijl CO_2 en acetonitrile ($\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{N}$) dit niet zijn.
5. Het terminaal C-atoom mag geen positieve lading dragen. Dus is koolstofmonoxide (CO) actief en formaldehyde (HCHO) inactief.

Concentraties van 0,01 ppm zijn voor de meeste ethyleeneffecten reeds voldoende voor het induceren van significante reacties. Halfmaximale effecten worden bekomen bij toediening van 0,1 ppm ethyleen (Burg en Burg 1967) terwijl verzadiging bereikt wordt bij 1 tot 10 ppm (Burg en Burg 1968, Goeschl en Pratt 1968, Abeles 1973). CO_2 inhibeert op competitieve wijze de ethyleenwerking (Burg en Burg 1965, 1967). Op moleculair niveau is zulke inhibitie gemakkelijk te verklaren daar CO_2 een nauw structureel analoog is van alleen ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{CH}_2$), een verbinding met ethyleenactiviteit. CO_2 vertoont geen ethyleenwerking wegens het ontbreken van een terminaal C-atoom en omdat het een negatieve lading draagt aan beide uiteinden (zie boven). Burg en Burg (1967) bewezen dat CO_2 competitief werkt m.b.t. ethyleen door epicotylsegmenten van *Pisum sativum* in verschillende CO_2 - en ethyleenconcentraties te plaatsen. Ethyleen inhibeert de strekkingsgroei van het epicotyl. In afwezigheid van ethyleen heeft CO_2 geen effect op de groei. In functie van een verhoogde CO_2 concentratie verhoogt echter de concentratie aan ethyleen nodig voor een halfmaximale respons. Op analoge wijze toonden zij aan dat O_2 eveneens de ethyleenwerking beïnvloedt. Bij lage zuurstofgehalten wordt de epicotylgroei minder snel door ethyleen geremd dan bij hoge zuurstofconcentraties.

Algemeen wordt gesteld dat binding van hormonen met cellulaire receptoren noodzakelijk is voor de expressie van hun biologische activiteit. Burg en Burg (1967) suggereerden dat een metaal betrokken is bij de binding van ethyleen. Beyer (1976) stelde een interactie tussen ethyleen en een Cu

bevattende receptor voor; Cu vormt immers complexen met ethyleen. Volgens deze auteur zou Ag^+ de ethyleenwerking kunnen inhiberen door Cu^+ te verdringen van de receptor. Specifieke binding van ethyleen werd waargenomen in tabaksbladeren (Sisler 1979), *Vigna radiata* kiemplanten (Sisler 1980, 1984), komkommerbladeren (Goren en med. 1984), cotyledonen van bonekiemplanten (Bengochea en med. 1980a, b, Hall en med. 1984, Thomas en med. 1985) en epicotylen van erwten (Sisler en Yang 1984, Sanders en med. 1989a, b). De binding van ethyleen voldoet aan bepaalde criteria om de betrokkenheid van een actieve receptor te veronderstellen (Sisler en Goren 1981) :

- de binding is reversiebel,
- de bindingsplaats is specifiek en verzadigbaar,
- het aantal bindingsplaatsen is laag,
- chemische modificaties wijzigen zowel de bindingsaffiniteit als de biologische activiteit.

De bindingscomponenten zijn gelokaliseerd in membranen van het endoplasmatisch reticulum of van eiwitstructuren (Evans en med. 1982). Verdere studies toonden aan dat de receptor een lipofiel eiwit is, dat met behulp van Triton-X-100 kan opgelost worden zonder activiteitsverlies of verandering in affiniteit en specificiteit voor ethyleen (Thomas en med. 1985). De daling van het aantal bindingsplaatsen bij senescerende anjers wordt hoofdzakelijk verklaard door de extensieve membraanafbraak tijdens senescentie (Brown en med. 1986). De verlaagde affiniteit voor ethyleen in ouder weefsel toont tevens aan dat de bindingsplaatsen gewijzigd worden tijdens het verouderingsproces.

Niet alleen Ag^+ ionen maar ook het cyclisch olefine 2,5-norbornadiene (NBD) blokkeren de ethyleenwerking door hun interactie met de ethyleenbindingsplaats (Sisler en Yang 1984). Inhibitie van de ethyleenwerking door NBD werd waargenomen in epicotylsegmenten van erwten (Sisler en Yang 1984) en in senescerende anjers (Veen 1985, Peiser 1989, Wang en Woodson 1989). NBD is een vluchtige verbinding en verlaat bijgevolg de bindingsplaats na enkele uren. Een continue toediening aan een biologisch

systeem is noodzakelijk om de inhibitie van de ethyleenwerking te verzekeren. Sisler en med. (1993) ontdekten dat diazocyclopentadien (DACP) eveneens reversiebel kan binden op de receptor en op deze wijze ethyleenresponsen inhibeert. Bestraling met fluorescentielicht veroorzaakt echter een permanente binding. Deze onderzoeker stelde 2 mogelijke inactivatiemechanismen van de ethyleenreceptor voor :

1. gebonden DACP ondergaat een lichtreactie *in situ* waardoor de inactivatie optreedt,
2. vrij DACP wordt getransformeerd door licht en inactieveert vervolgens de receptor.

Bleecker en med. (1988) beschreven een mutant van *Arabidopsis thaliana*, *etr* (ethylene resistant), die zowel deficiënt is in ethyleenbinding als in ethyleenrespons. Het ETR gen codeert een belangrijke component in de ethyleenperceptie, mogelijk de ethyleenreceptor. Chang en med. (1992) trachtten het ETR gen te isoleren en via moleculaire en biochemische analyses het ETR gen product te karakteriseren. In de toekomst zal wellicht de signaaltransductie van het plantehormoon ethyleen worden opgehelderd.

1.5. Regulatie van de ethyleenbiosynthese

Tijdens de ontwikkeling van planten wordt de ethyleenproductie geïnduceerd bij kieming, vruchtrijping, bladabscissie en senescentie. Vaak blijkt ethyleen zelf een rol te spelen bij de regulatie van zijn eigen productie. Ook de andere plantehormonen, auxinen, cytokininen, gibberellinen en abscisinezuur, kunnen de ethyleenbiosynthese beïnvloeden. Vooral de interactie tussen auxinen en ethyleen is goed bekend. Daarnaast reguleren verschillende externe factoren, zoals temperatuur, O₂, stress, licht en CO₂ de ethyleenproductie.

Vermits dit proefschrift handelt over de effecten van wit licht op de ethyleenproductie bij intacte groene planten, bespreken wij uitvoerig de

beschikbare literatuurgegevens over de regulatie van de ethyleenproductie door licht en CO₂. De andere regulerende factoren komen beperkt aan bod.

1.5.1. Interne factoren

1.5.1.1. Ethyleen

Autokatalyse (positieve feedback) van de ethyleenproductie is een typisch kenmerk van rijpende vruchten en andere senescerende weefsels na blootstelling aan ethyleen. Ethyleen versnelt de stijging van de ethyleenproductie in climacterische vruchten; de rijpheid en de gevoeligheid van de weefsels bepalen de tijd nodig voor het optreden van dit fenomeen. De rol van ethyleen bij het stimuleren van de climacterische ethyleenproductie is zeer complex en waarschijnlijk indirect. Peacock (1972) suggereerde dat in preclimacterische (onrijpe) vruchten endogene inhibitoren van het rijpingsproces voorkomen en dat deze worden vernietigd na blootstelling aan ethyleen. In preclimacterische vruchten kan de toename van de ethyleenproductie slechts gerealiseerd worden als de lage ACC-S en ACC-O activiteit wordt gestimuleerd. Liu en med. (1985c) toonden aan dat begassing van onrijpe vruchten van *Lycopersicon esculentum* en *Cucumis melo* met ethyleen eerst een verhoging van de ACC-O activiteit en pas daarna een stijging van de ACC-S activiteit veroorzaakt. Bufler (1986) deed dezelfde vaststellingen in *Malus domestica*.

Autoinhibitie (negatieve feedback) van de ethyleenproductie wordt eveneens waargenomen in vruchten en in vegetatieve weefsels (Vendrell en McGlasson 1971, Zeroni en med. 1976, Aharoni en med. 1979, Riov en Yang 1982). Riov en Yang (1982) en Yoshii en Imaseki (1982) suggereerden dat de autoinhibitorische werking van ethyleen het gevolg is van een onderdrukking van de ACC-S activiteit. Autoinhibitie van de ethyleenproductie in bladweefsel van *Nicotiana tabacum* (Philosoph-Hadas en med. 1985) en in preclimacterische vruchten van *Citrus paradisi* (Liu en med. 1985a) en

Lycopersicon esculentum (Liu en med. 1985b) na exogene toediening van ethyleen werd niet alleen veroorzaakt door het onderdrukken van de ACC synthese maar ook door een gestimuleerde malonylering.

1.5.1.2. Andere groeistoffen

Verschillende studies betreffende effecten van andere groeistoffen op de ethyleenbiosynthese leveren niet altijd eenduidige resultaten op.

Verstoring van de hormonenbalans heeft erg complexe gevolgen. Het veranderen van de concentratie aan 1 hormoon veroorzaakt een ganse reeks wijzigingen, o.a. aan de gehalten van de andere hormonen. Daarom is het dikwijls moeilijk de eigenlijke oorzaak van de respons juist te interpreteren. Algemeen mogen we stellen dat auxinen, cytokininen, gibberellinen en abscisinezuur de ethyleenbiosynthese kunnen beïnvloeden.

1.5.1.2.1. Auxinen

Zimmerman en Wilcoxon stelden in 1935 als eersten vast dat auxinen de ethyleenproductie stimuleren. In vegetatieve weefsels wordt de ethyleenproductie gereguleerd door de interne auxine gehalten (Abeles 1973). De omvang van de IAA geïnduceerde ethyleenproductie is evenredig met de hoeveelheid vrij IAA aanwezig in het weefsel (Lieberman 1979). De stimulering van de ethyleenproductie door auxinen wordt teniet gedaan door inhibitoren van RNA- en proteïnesynthese. Deze resultaten wijzen op een inductie van enzymen die betrokken zijn in de ethyleenbiosynthese (Abeles 1966, Burg en Burg 1966, Kang en Ray 1969, Sakai en Imaseki 1971, Lieberman en Kunishi 1975). Yu en Yang (1979), Jones en Kende (1979) en Yoshii en Imaseki (1981) onderzochten met behulp van precursoren (methionine, SAM en ACC) en inhibitoren (AVG) op welk niveau van de ethyleenbiosynthese auxinen tussenkomen. De gestimuleerde ethyleenproductie is het gevolg van een verhoogde omzetting van SAM naar ACC. Zowel de ACC-S activiteit als het ACC gehalte in de weefsels blijkt toegenomen na IAA behandeling

(Yoshii en Imaseki 1982). Uit deze resultaten, tesamen met de effecten van inhibitoren van RNA- en eiwitsynthese, kan men besluiten dat IAA de synthese van ethyleen induceert door een inductie van het ACC-S.

Van ethyleen zelf werd aangetoond dat het in verschillende planteweefsels het endogene IAA gehalte kan verlagen (Ernest and Valdovinos 1971, Beyer 1975b, Lieberman en Knecht 1977). Op deze wijze kan ethyleen regulerend inwerken op zijn eigen productie. Het IAA verlagend effect van ethyleen zou resulteren uit een verhoogde conjugatie en decarboxylatie (Beyer en Morgan 1969, Ernest en Valdovinos 1971, Riov en med. 1982), een verlaagde synthese (Ernest en Valdovinos 1971) en een gereduceerd transport van IAA vanaf de syntheseplaats (Beyer 1973). Een aantal onderzoekers suggereerden dat ethyleen vooral de conjugatie van IAA naar IAA-aspartaat stimuleert (Ernest en Valdovinos 1971, Riov en Goren 1979, Epstein 1982, Riov en med. 1982, Wood 1985, Sagee en med. 1989).

1.5.1.2.2. Cytokinen

Cytokinen stimuleren de ethyleenproductie in verschillende planteweefsels (Abeles 1973). Fuchs en Lieberman (1968) toonden aan dat er een synergistisch effect van kinetine en auxine bestaat op de ethyleenproductie bij geëtiolerde erwtekiemplanten. Lau en Yang (1974) verklaarden dit synergistisch effect door een verhoogde IAA opname en een reductie van de IAA conjugatie met aspartaat. Dit resulteert in een verhoging van het inwendige IAA gehalte waardoor de ethyleenproductie wordt gestimuleerd. Imaseki en med. (1975), daarentegen, rapporteerden dat het effect van cytokinen niet alleen kan verklaard worden door hun remmend effect op de IAA conjugatie.

Yoshii en Imaseki (1981) vermeldten dat benzyladenine, een synergistische stimulator van de auxine gestimuleerde ethyleenproductie, in aanwezigheid van IAA het ACC gehalte parallel aan de ethyleenproductie doet stijgen. In afwezigheid van IAA neemt wel de ethyleenproductie maar niet het ACC

gehalte toe. Deze resultaten doen een effect van cytokininen op het ACC-O vermoeden. Suttle (1986) kon eveneens aantonen dat cytokininen de stap van ACC naar ethyleen stimuleren door een verhoging van de ACC-O activiteit. In tegenstelling met de hoger vermelde resultaten kwamen Mor en med. (1983) en Cook en med. (1985) tot de vaststelling dat in *Dianthus caryophyllus* zowel de omzetting van ACC naar ethyleen als de accumulatie van endogeen ACC geïnhibeerd worden door benzyladenine. Zij concludeerden hieruit dat cytokininen rechtstreeks of onrechtstreeks tussenkomen op het niveau van ACC-S en ACC-O. In bladsegmenten van spinazie zou benzyladenine ook een effect hebben op de ACC aanmaak en zelfs op de malonylering van ACC (Philosoph-Hadas en med. 1989).

1.5.1.2.3. Gibberellinen

Er worden uiteenlopende resultaten bekomen voor wat betreft de effecten van gibberellinen op de ethyleenproductie. In verschillende groeiprocessen hebben gibberellinen en ethyleen een antagonistisch effect. Zo wordt de strekkingsgroei van *Lactuca sativa* hypocotylen gestimuleerd door gibberellinen, terwijl deze respons in aanwezigheid van ethyleen niet meer wordt waargenomen (Scott en Leopold 1967). De door ethyleen geïnduceerde radiaire diktegroei van geëtiolerde epicotylsegmenten van *Pisum sativum* wordt verhinderd na toediening van gibberellinezuur (Stewart en med. 1974). Synergistische effecten van ethyleen en gibberellinen worden daarentegen waargenomen bij de door ethyleen geïnduceerde bladabscissie bij *Gossypium hirsutum* (Morgan en Durham 1975) en bij de kieming van *Lactuca sativa* zaden (Dunlop en Morgan 1977).

Wright (1980) toonde aan dat in bladeren van *Triticum aestivum* onder waterstress gibberellinen de productie van stressethyleen significant stimuleren. In turgescient bladweefsel is het stimulerend effect van gibberellinen eveneens duidelijk doch minder uitgesproken. Gibberellinen zouden de ethyleenproductie kunnen beïnvloeden door een stimulering van de stap van SAM naar

ACC (Yang en Hoffman 1984) en een onderdrukking van de ACC malonylering (Philosoph-Hadas en med. 1989).

1.5.1.2.4. Abscisinezuur

Bij geëtiolerde *Pisum sativum* kiemplanten wordt zowel de endogene als de auxine geïnduceerde ethyleenproductie geremd na toediening van abscisinezuur (ABA) (Lieberman en Kunishi 1971, Gertman en Fuchs 1972). Ook bij zaden van *Arachis hypogaea* (Ketring en Morgan 1969), hypocotylsegmenten van *Phaseolus aureus* (Kondo en med. 1975) en *Vigna radiata* (Yoshii en Imaseki 1981) wordt een door ABA geïnduceerde verlaging van de ethyleenproductie gemeten. Yoshii en Imaseki (1981) stelden bovendien vast dat ABA de ACC aanmaak inhibeert. De ethyleenproductie van onder waterstress geplaatste *Triticum aestivum* bladeren neemt eveneens sterk af na toediening van ABA, wat wijst op een antagonisme tussen ABA en gibberellinen (Wright 1980, zie 1.5.1.2.3). Chen en Kao (1990) namen een sterke inhibitie van de ethyleenproductie door ABA waar in *Oryza sativa*. Zij verklaarden deze remming door een verlaagde ACC synthese en/of conversie van ACC naar ethyleen en tevens een blokkering van de malonylering van ACC door ABA.

Craker en Abeles (1969), daarentegen, vonden een in functie van de ABA concentratie toenemende ethyleenproductie bij *Phaseolus vulgaris* en *Gossypium hirsutum*. Lieberman en Kunishi (1971) en Mayak en Dilley (1976) vonden ook in bladsegmenten van *Nicotiana tabacum* en bloemen van *Dianthus caryophyllus* een stimulering van de ethyleenproductie in functie van de ABA concentratie. In schillen van citrusvruchten (Goldschmidt en med. 1973) bestaat er een positieve correlatie tussen de hoeveelheid vrij ABA en de ethyleenproductie. Philosoph-Hadas en med. (1989) stelden vast dat ABA in bladeren van *Spinacia oleracea* zowel een verhoging van de ACC synthese en de ethyleenvorming uit ACC als een duidelijke stimulering van de ACC malonylering tot gevolg heeft.

1.5.2. Externe factoren

1.5.2.1. Temperatuur

De ethyleenproductie wordt in belangrijke mate beïnvloed door de temperatuur. De optimale temperatuur ligt rond 30 °C. Bij temperaturen hoger dan 40 °C en lager dan 5 °C wordt de ethyleenproductie vrijwel volledig lamgelegd (Burg 1962). Deze temperatuursafhankelijke inhibitie van de ethyleenproductie is niet geassocieerd met een permanente weefselbeschadiging. De ethyleenproductie herstelt zich immers bij transfer van het weefsel naar optimale temperaturen (Field 1985).

Yu en med. (1980) suggereerden dat de conversie van ACC naar ethyleen de temperatuursgevoelige stap is in de ethyleenbiosyntheseweg. Apfelbaum en med. (1981a) stelden vast dat hoge temperaturen hun inhiberend effect uitoefenen op de ethyleenproductie door een verstoring van de cellulaire membranen. Deze auteurs concludeerden eveneens dat de geremde ethyleenproductie het gevolg is van de inhibitie van de membraangeassocieerde oxidatie van ACC naar ethyleen. Deze interpretatie moet gerelativeerd worden omdat meer recent onderzoek aantoonde dat ACC-O niet membraangebonden is (zie 1.2.1.2.). Horiuchi en Imaseki (1986), daarentegen, toonden aan dat in *Vigna radiata* hypocotylen, behandeld met auxinen, de inductie van ACC-S o.i.v. auxinen gevoeliger is voor hoge temperaturen dan de omzetting van ACC naar ethyleen. Biggs en med. (1988) onderzochten meer in detail het (de) mechanisme(n) betrokken bij de inhibitie van de ethyleenproductie bij hoge temperaturen in rijpende tomaten. Zij toonden aan dat transfer van tomaten van 25 °C naar 35 of 40 °C een vlugge daling veroorzaakt van de ACC-S activiteit terwijl de ACC-O activiteit slechts langzaam afneemt. Zij concludeerden hieruit dat de initiële reductie van de ethyleenproductie bij hogere temperaturen te wijten is aan een gebrek of een compartimentatie van ACC terwijl een tweede fase wordt veroorzaakt door een reductie van de ACC-O activiteit.

1.5.2.2. Zuurstof

Verschillende onderzoekers observeerden een inhibitie van de ethyleenproductie in anaërobe of in lage O₂ condities. De conversie van ACC naar ethyleen is meer bepaald de O₂ afhankelijke stap in de ethyleenbiosyntheseweg (Adams en Yang 1979, zie ook 1.2.1). Yip en med. (1988) rapporteerden dat ACC-O eerst bindt met O₂ waarna het ACC-O-O₂ complex reageert met ACC om alzo de omzettingsreactie naar ethyleen te realiseren.

Commercieel maakt men gebruik van lage O₂ gehalten om de bewaartijd van vruchten, vooral appels en peren, te verlengen. Kidd en West (1934) suggereerden als eersten dat deze gunstige O₂ effecten op de bewaring van fruit gerelateerd zijn met de productie en/of werking van ethyleen. Burg en Burg (1967) bewezen dat ethyleen O₂ nodig heeft om zijn biologische effecten uit te oefenen. Het inhiberend effect van lage O₂ concentraties op de ethyleenwerking is geen indirect effect van een verlaagde respiratie (Burg en Burg 1967, 1969).

1.5.2.3. Stressethyleen

Als universele respons op "stress" wordt een stimulering van de ethyleenproductie waargenomen; men spreekt over stress- of wondethyleen (Abeles 1973). Deze stress geïnduceerde ethyleenproductie kan veroorzaakt worden door :

1. Fysische factoren :

- mechanische verwonding (snijden, kneuzen) en bestraling (Yu en Yang 1980, Konze en Kwiatkowski 1981, Nakajima en med. 1988, Hyodo en med. 1991),
- extreme temperaturen (hitte, koude, bevriezing, zie ook 1.5.2.1) (Cooper en med. 1969, Elstner en Konze 1976, Etani en Yoshida 1987),

- droogte (McMichael en med. 1972, Kobayashi en med. 1981, Morgan en med. 1990).
2. Chemische factoren :
- metalen (Yu en Yang 1980, Hogsett en med. 1981, Rodecap en med. 1981, Fuhrer 1982, Mattoo en med. 1986, 1992, Gora en Clijsters 1989),
 - herbiciden (Tingey 1980),
 - ozon (Tingey 1980, Hogsett en med. 1981, Rodecap en Tingey 1986, Taylor en med. 1988, Mehlhorn en med. 1991),
 - SO₂ (Kimmerer en Kozlowski 1982),
 - zure neerslag (Chen en Wellburn 1989),
 - zouten (Chrominski en med. 1986).
3. Biologische factoren :
- virussen, bacteriën en schimmels (de Laat en Van Loon 1981, Rickauer en med. 1990).

In een aantal gevallen wordt een fysiologische rol toegekend aan stress-ethyleen. De gestimuleerde ethyleenproductie in bladeren van onder water-stress geplaatste planten versnelt de abscissie waardoor het waterverlies wordt gereduceerd (McMichael en med. 1972). De verhoogde ethyleenproductie als reactie op mechanische stress kan de groei van een plant reguleren, bijvoorbeeld versteviging van kiemplanten bij het doordringen van de bodem tijdens het kiemingsproces (Goeschl en med. 1966).

Algemeen neemt men aan dat de productie van stressethyleen via dezelfde biosyntheseweg verloopt als de normale ethyleenproductie. Yu en Yang (1980) stelden als eersten vast dat de gestimuleerde ethyleenproductie bij verwonding het gevolg is van een inductie van de ACC-S synthese. Experimenten met cycloheximide toonden aan dat de *de novo* synthese van dit enzym wordt gestimuleerd. Later werden deze resultaten bevestigd door meerdere auteurs (Hogsett en med. 1981, Konze en Kwiatkowski 1981, Fuhrer 1982, Nakajima en Imaseki 1986, Spanu en Boller 1989). Mattoo en med. (1986) constateerden echter dat de ACC vorming niet betrokken is bij de Cu²⁺ geïnduceerde ethyleenproductie in de waterplant *Spirodela*

oligorrhiza. Dit stressethyleen is tenminste gedeeltelijk het gevolg van membraanbeschadiging veroorzaakt door singlet zuurstof. Dezelfde onderzoekers (1992) vergeleken de ethyleenproductie van de waterplant *Spirodela oligorrhiza* en de landplant *Nicotiana tabacum* onder Cu-stress. Beide planten produceren ethyleen als respons op Cu maar de biosynthese van dit ethyleen gebeurt via verschillende wegen. Bij *Nicotiana tabacum* wordt het stressethyleen uitsluitend uit methionine gevormd, terwijl bij *Spirodela oligorrhiza* methionine en linolzuur in gelijke mate worden omgezet tot ethyleen. Kacperska en Kubacka-Zebalska (1989) rapporteerden dat de verhoogde ethyleenvrijzetting in bladeren van *Brassica napus* blootgesteld aan waterstress of lage temperaturen behalve een inductie van de ACC-S activiteit ook de activering van een radicaalgenererend systeem vereist. Stress geïnduceerde veranderingen in membraaneigenschappen resulteren in de stimulering van de activiteit van het membraangeassocieerde lipoxigenase enzym, dat vervolgens door een verhoogde productie van vrije radicalen een chemische omzetting van ACC naar ethyleen veroorzaakt.

1.5.2.4. Licht

Verscheidende onderzoekers beschreven de modulerende rol van licht op de ethyleenproductie.

De eerste lichteffecten werden waargenomen bij geëtiolerde kiemplanten die een kortstondige bestraling kregen met rood licht. Men stelde zowel inhiberende (*Pisum sativum* : Goeschl en med. 1967, Rohwer en Schierle 1984; *Oryza sativa* : Imaseki en med. 1971; *Phaseolus vulgaris* : Kang en Ray 1969, De Proft 1983, Vangronsveld 1988, 1990; *Glycine max.* : Samimy 1978; *Triticum aestivum* : Jiao en med. 1987; *Cucumis sativus* : Vangronsveld 1990) als stimulerende (*Sinapsis alba* : Bühler en med. 1978; *Cucumis sativus* : Dei 1981; *Pisum sativum* : Rohwer en Schierle 1982; *Helianthus annuus* : Vangronsveld 1990) rood licht effecten vast op de ethyleenproductie. In de meeste gevallen kan dit rood licht effect geheel of gedeeltelijk gereverseerd worden door een daaropvolgende donkerrood

bestraling. Dit is een aanwijzing voor de betrokkenheid van fytochroom bij de regulatie van de ethyleenproductie in deze planten. Craker en med. (1973) vonden bij *Sorghum vulgare* een stimulering van de ethyleenproductie na bestraling met blauw of donkerrood licht. Zij suggereerden dat deze door licht gestimuleerde ethyleenproductie een hoge energie reactie is met fytochroom als initiële fotoreceptor.

Naast de effecten van deze kortstondige bestralingen met rood licht werden ook effecten beschreven van langdurige bestralingen met wit licht op de ethyleenproductie bij groene planten. Ook hier zijn de waargenomen responsen verschillend (tabel 1.1). Gepstein en Thimann (1980) rapporteerden als eersten dat in bladeren van *Nicotiana tabacum* en *Avena sativa* de ethyleenproductie uit exogeen ACC geïnhibeerd wordt door wit licht. de Laat en med. (1981) vonden eveneens dat de omzetting van exogeen toegediend ACC naar ethyleen in bladsegmenten van *Nicotiana tabacum* op reversiebele wijze geremd wordt door wit licht. De endogene ethyleenproductie, daarentegen, wordt niet beïnvloed. In bladsegmenten van *Xanthium strumarium* (Grodzinsky en med. 1982a), *Oryza sativa* en *Nicotiana tabacum* (Kao en Yang 1982) reduceert wit licht zowel de endogene als de ACC geïnduceerde ethyleenproductie. Ook Wright (1981, *Triticum aestivum*), Grodzinsky en med. (1982b, *Xanthium strumarium* en *Zea mays*; 1983, *Gomphrena globosa*), Rodecap en Tingey (1983, *Glycine max.* en *Lycopersicon esculentum*) en Preger en Gepstein (1984, *Avena sativa*) beschreven een lichtgeïnduceerde inhibitie van de ethyleenproductie onder bepaalde omstandigheden. In tegenstelling tot deze verlagende effecten van wit licht op de ethyleenvrijstelling wordt in verschillende planteweefsels de ethyleenproductie gestimuleerd door wit licht : kiemende zaden van *Cucumis sativus* (Saltveit en Pharr 1980), *Gusmania lingulata* planten (De Greef en med. 1980), thalli van *Marchantia polymorpha* (Veroustraete 1983) en *Phaseolus vulgaris* kiemplanten (De Proft 1983, Van Genechten 1985). Bassi en Spencer (1983) vergeleken het effect van wit licht op de ethyleenvrijzetting bij bladsegmenten geïncubeerd in gesloten vatjes versus intacte planten in een open doorstroomsysteem. Zij voerden dit experiment uit met 3 verschillende

species : *Helianthus annuus*, *Lycopersicon esculentum* en *Glycine max*. In de bladsegmenten wordt de omzetting van exogeen toegediend ACC naar ethyleen sterk geïnhibeerd door wit licht terwijl de endogene ethyleenproductie in bladsegmenten van zonnebloem en soja gestimuleerd wordt en er geen lichteffect wordt waargenomen bij tomaat. De intacte planten produceren evenveel ethyleen in licht als in donker; dit is zowel waar voor de ACC afhankelijke als de endogene ethyleenproductie.

Tabel 1.1 : In de literatuur beschreven wit licht effecten op de ethyleenproductie van groen plantemateriaal. Gegeven zijn : plantesoort, aard van de respons van de ethyleenproductie (stimulering, inhibering of nul-effect), het werken met intacte planten of plantedelen en het gebruik van een open of gesloten meetsysteem.

Auteur	soort	ethyleen-respons	delen of intact	meetsysteem
De Greef en med. 1980	<i>Gusmania lingulata</i>	+	intact	open
Gepstein en Thimann 1980	tabak haver	- -	delen	gesloten
Saltveit en Pharr 1980	komkommer	+	intact	gesloten
de Laat en med. 1981	tabak	-/0	delen	gesloten
Wright 1981	tarwe	-	delen	gesloten
Grodzinsky en med. 1982a, b	<i>Xanthium</i> maïs	- -	delen	gesloten

Tabel 1.1 : Vervolg

Auteur	soort	ethyleen- respons	delen of intact	meetsysteem
Kao en Yang 1982	rijst tabak	- -	delen	gesloten
Bassi en Spencer 1983	zonnebloem tomaat soja	-/+ -/0 -/+	delen	gesloten
Bassi en Spencer 1983	zonnebloem tomaat soja	0 0 0	intact	open
De Proft 1983	boon	+	intact	open
Grodzinsky en med. 1983	<i>Gomphrena globosa</i>	-	delen	gesloten
Rodecap en Tingey 1983	soja tomaat	- -	intact	gesloten
Veroustraete 1983	<i>Marchantia polymorpha</i>	+	intact	open
Preger en Gepstein 1984	haver	-	delen	gesloten
Van Genechten 1985	boon	+	intact	open

Het interpreteren van deze literatuurgegevens betreffende de lichteffecten op de ethyleenproductie bij geëtioleerde en groene planten wordt sterk bemoeilijkt door verschillen in gebruikt plantemateriaal (soort, delen of intacte planten) en/of experimentele omstandigheden (open of gesloten meetsysteem; endogene, door stress of exogeen ACC geïnduceerde ethyleenproductie).

Men suggereerde dat wit licht zijn invloed op de ethyleenproductie uitoefent via het fotosynthese systeem (Gepstein en Thimann 1980, de Laat en med. 1981, Grodzinsky en med. 1982a, b, 1983, Kao en Yang 1982, Preger en Gepstein 1984, De Proft 1983, Van Genechten 1985). Meerdere auteurs wezen trouwens op het grote belang van een optimale CO₂ concentratie in de atmosfeer bij het bestuderen van lichteffecten op de ethyleenproductie bij groene planten. In een gesloten meetsysteem gaat de CO₂ concentratie immers al zeer snel dalen naar het CO₂ compensatiepunt. Kao en Yang (1982) en Grodzinsky en med. (1982a, b, 1983) toonden aan dat bij de door hen onderzochte weefsels het inhiberend effect van licht op de ethyleenproductie verdwijnt of zelfs omslaat in een stimulerend effect na toediening van een CO₂ bron. Hieruit concludeerden deze onderzoekers dat niet licht op zichzelf maar wel het CO₂ metabolisme de vorming van ethyleen reguleert.

1.5.2.5. CO₂

CO₂ beïnvloedt de ethyleenproductie in verschillende planteweefsels. Een stimulerend effect van CO₂ op de ethyleenvrijstelling werd waargenomen in zaden (*Xanthium pennsylvanicum* : Esashi en med. 1986), volledige planten (*Helianthus annuus* : Dhawan en med. 1981, Bassi en Spencer 1982; *Lemna minor* : Fuhrer 1985; *Phaseolus vulgaris* : Van Genechten 1985) en bladeren (of bladsegmenten) (*Avena sativa* : Horton en Saville 1984, Preger en Gepstein 1984; *Gomphrena globosa* : Grodzinsky en med. 1983; *Nicotiana tabacum* : Kao en Yang 1982; *Oryza sativa* : Kao en Yang 1982; *Salvia splendens* : Grodzinsky 1984; *Xanthium strumarium* : Grodzinsky en med. 1982a, b, 1984; *Zea mays* : Grodzinsky en med. 1982a, b). In rijpende

vruchten, daarentegen, inhibeert CO_2 de autokatalytische ethyleenproductie. Dit werd aangetoond in tomaten (Buesher 1979), appels (Chaves en Tomás 1984, Cheverry en med. 1988) en avocado's (Cheverry en med. 1988). Het CO_2 effect op de ethyleenproductie wordt in de praktijk gebruikt om de bewaartijd van fruit te verlengen.

Het stimulerend effect van CO_2 op de ethyleenvrijstelling in vegetatieve weefsels wordt zowel voor de basale als voor de ACC afhankelijke ethyleenproductie waargenomen. Daarenboven heeft CO_2 geen effect op de vorming van ACC (Kao en Yang 1982). Daarom suggereerden o.a. deze auteurs dat CO_2 de conversie van ACC naar ethyleen stimuleert. Bovendien toonden Philosoph-Hadas en med. (1986) aan dat de synthese van ACC-O door CO_2 wordt beïnvloed.

De interactie tussen CO_2 en ethyleen is zeer complex. Enerzijds verklaarde men het CO_2 effect als een rechtstreeks effect op de ethyleenbiosynthese of ethyleenbinding (zie 1.4) en anderzijds via de effecten op het algemene metabolisme, meerbepaald op de fotosynthese. Kao en Yang (1982) suggereerden dat het interne CO_2 gehalte een rechtstreeks effect heeft op de ACC-O activiteit. Grodzinsky en med. (1982a), daarentegen, verklaarden het CO_2 effect eerder door zijn invloed op de retentie en afbraak van ethyleen. Een daling van de inwendige CO_2 concentratie als gevolg van de fotosynthese zou kunnen resulteren in een hogere retentie en bijgevolg een intenser metaboliseren van ethyleen, waardoor minder ethyleen door het betrokken weefsel wordt vrijgesteld. McRae en med. (1983) weerlegden deze hypothese. Daar in een louter chemisch modelsysteem de omzetting van ACC naar ethyleen gestimuleerd wordt door HCO_3^- stelden zij dat het CO_2 effect op de ethyleenproductie een gevolg is van een meer efficiënte omzetting van ACC naar ethyleen, mogelijk door een directe reactie van CO_2 met ACC. Het stimulerend effect van CO_2 op de ethyleenproductie bij *Marchantia polymorpha* werd door Veroustraete (1983) toegeschreven aan de in het licht optredende fotosyntheseprocessen via dewelke ook de ethyleenbiosynthese van precursoren wordt voorzien.

Het blijft niettemin onduidelijk hoe CO₂ enerzijds vooral in fotosynthetiserende weefsels van groene planten de ethyleenbiosynthese stimuleert en anderzijds voornamelijk in niet-fotosynthetiserende weefsels fysiologische responsen van ethyleen inhibeert. Volgens Sisler en Wood (1988) bestaat er alleszins een nauwe interactie tussen CO₂ en ethyleen; het mechanisme dient echter nog opgehelderd te worden.

1.6. Probleemstelling

Vanaf het begin van de jaren 80 verschenen de eerste publicaties over effecten van langdurige bestralingen met wit licht op de ethyleenproductie bij groene planten (voor overzicht zie tabel 1.1). Deze literatuurgegevens tonen aan dat er geen eenduidig effect van wit licht op de ethyleenvrijzetting bestaat. Een absolute vergelijking van deze resultaten is echter onmogelijk omwille van de volgende redenen :

1. verschillende plantespecies werden gebruikt bij verschillende ontwikkelingsstadiën,
2. het bestudeerde plantemateriaal was erg divers,
3. in de meeste experimenten werd gewerkt met bladsegmenten terwijl slechts enkele auteurs intacte planten onderzochten.

In de meeste gevallen werden de ethyleenmetingen uitgevoerd in gesloten meetsystemen. Verschillende nadelen zijn inherent aan deze doseringsmethode verbonden. De continue wijzigingen in de gehalten aan CO_2 , O_2 en ethyleen in de gasfase beïnvloeden op niet controleerbare wijze de fysiologische reacties van de plant(edelen). Zo kan het geaccumuleerde ethyleen autokatalytisch of autoinhiberend werken op zijn eigen productie. De door fotosynthese verlaagde CO_2 concentratie in de gesloten vatjes heeft eveneens een effect op de ethyleenvrijstelling. Enkele auteurs wezen trouwens op het grote belang van een optimale CO_2 concentratie in de atmosfeer bij het onderzoek van lichteffecten op de ethyleensynthese bij groene planten. In dit werk bestuderen wij de invloed van wit licht op de ethyleenproductie van intacte groene kiemplanten geïncubeerd in een open meetsysteem. Deze techniek laat toe om het ethyleen te doseren onder fysiologisch gunstige omstandigheden.

We vergelijken de lichtresponsen van de ethyleenproductie bij groene kiemplanten van verschillende plantesoorten onder identieke groeiomstandigheden. Daarna onderzoeken we het effect van wit licht meer in detail op de verschillende stappen van de ethyleenbiosyntheseweg bij groene bonekiem-

planten. Vervolgens wordt nagegaan of de fotosynthese een rol speelt in de door wit licht gestimuleerde ethyleenproductie. Het positieve lichteffect op de ethyleenvrijstelling valt immers samen met de ontwikkeling van de fotosynthetische capaciteit van de planten. Enerzijds wordt aandacht besteed aan de mogelijke betrokkenheid van fotosynthetisch geproduceerde vrije radicalen van zuurstof bij de ethyleenproductie. Verscheidene auteurs suggereerden immers dat vrije zuurstofradicalen participeren bij de omzetting van ACC naar ethyleen. Tijdens het fotosynthetisch electronentransport worden actieve zuurstofspecies gevormd. Deze radicalen kunnen de omzetting van ACC naar ethyleen stimuleren en zo (mede)verantwoordelijk zijn voor het waargenomen lichteffect. Anderzijds wordt nagegaan of dit effect kan verklaard worden door bemiddeling van het fotosyntheseproces alleen. De mogelijke betrokkenheid van de fotoreceptoren fytochroom en cryptochroom bij de lichtregulatie van de ethyleenbiosynthese wordt onderzocht in enkele oriënterende proeven.

Wanneer in dit werk gesproken wordt over ethyleenproductie (-synthese) wordt hiermee de hoeveelheid ethyleen bedoeld die door het weefsel in het milieu wordt vrijgesteld (ethyleenvrijzetting).

HOOFDSTUK 2 : MATERIAAL EN METHODEN

2.1. Plantemateriaal

Tijdens dit werk worden kiemplanten van verschillende plantesoorten gebruikt.

De meeste experimenten worden uitgevoerd met 10 of 13 dagen oude intacte groene kiemplanten van *Phaseolus vulgaris* cv. Limburgse vroege. Dit studie-object levert in korte tijd en op reproduceerbare wijze een grote hoeveelheid uniform plantemateriaal op.

In enkele proeven wordt gebruik gemaakt van intacte groene kiemplanten van 7 verschillende plantespecies, die we kunnen indelen in 3 groepen :

- Groep 1 : C3-dicotylen :
soja : *Glycine max* L.
komkommer : *Cucumis sativus* L. cv. Femgreen
zonnebloem : *Helianthus annuus* L. cv. Eenbloemige reus
- Groep 2 : C3-monocotylen :
gerst : *Hordeum vulgare* L. cv. Menuet
tarwe : *Triticum aestivum* L. cv. Melchior
haver : *Avena sativa* L. cv. Ascot
- Groep 3 : C4-monocotylen :
maïs : *Zea mays* L. cv. Anjou 18

De leeftijd van de proefplanten uit de 3 groepen bedraagt respectievelijk 12, 8 en 10 dagen bij de aanvang van de experimenten.

Tenslotte worden ook kiemplanten van mutanten gebruikt :

1. zaailingen met chlorofyldeficiëntie :
 - maïs monohybriden met groene en witte bladeren (3/1) en 100% witbladige planten (zie foto 6.1),
 - soja monohybriden met groene, lichtgroene en gele bladeren (1/2/1) (zie foto 6.2).

Deze zaden werden geleverd door de Carolina Biological Supply Company (North Carolina, USA). Deze firma kon geen informatie verschaffen omtrent het cultivartype. De experimenten werden uitgevoerd met 12 dagen oude kiemplanten.

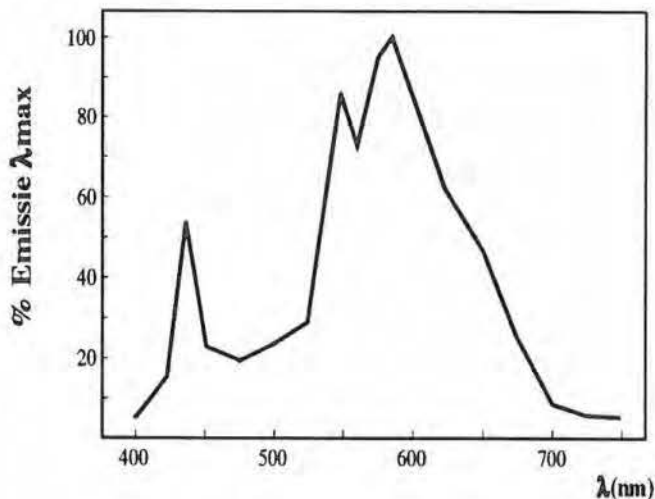
2. FS2- en FS1-deficiënte mutanten van gerst, *Hordeum vulgare* cv. Svalof's Bonus. Caryopsen van deze mutanten en van het wild type werden ter beschikking gesteld door Prof. Dr. von Wettstein (Carlsberg Laboratory, Gamle Carlsberg Vey 10, DK-2500 Copenhagen Valby, DK). De proeven werden uitgevoerd met 8 dagen oude kiemplanten.

2.2. Plantenkweek

De caryopsen van de monocotylen, zowel C3 als C4, worden gedurende 4 uren gespoeld met gedeïoniseerd water om de erop aangebrachte desinfecterende stoffen te verwijderen. De zaden van de andere planten, met inbegrip van de fotosynthetisch deficiënte planten, worden gedurende 3 uren geïmbibeerd. Na deze voorbehandeling worden de caryopsen respectievelijk zaden uitgezaaid in polyethyleenpotjes van 400 ml inhoud, gevuld met vermiculite graad 3 (Sibli). Aan dit substraat worden vooraf 100 ml gedeïoniseerd water en 50 ml voedingsoplossing (samenstelling : 5,0 g NH_4NO_3 , 2,7 g $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 2,5 g K_2SO_4 per liter) toegediend. Tijdens de groei wordt regelmatig water toegevoegd.

De kieming en het opgroeien van de kiemplanten gebeurt in geconditioneerde kamers (Weiss, Lindenstruth, B.R.D.) met een regime van 12h licht en 12h donker bij 25 °C tijdens de lichtperiode en 20 °C tijdens de donkerperiode. De relatieve luchtvochtigheid bedraagt 65%. De hoeveelheid fotosynthetisch actief licht tijdens de lichtperiode is gemiddeld $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemeten op planthoogte met een Li-COR quantum fotometer type LI 170 uitgerust met een Li-190S sensor (Li-Cor Inc., Nebraska, USA). Het emissiespectrum van het lichtplafond in de plantengroei kamers wordt gegeven in fig. 2.1.

Fig. 2.1 : Emissiespectrum van het wit licht in de geconditioneerde Weisskamers (Sylvania Cool White + Philips Philinea).



2.3. Gaschromatografische dosering van ethyleen en CO₂

De ethyleendosering gebeurt gaschromatografisch (Intersmat IGC 120FB) met een vlamionisatiedetector (FID). De hoeveelheid ethyleen uit de gasstroom wordt geabsorbeerd en geconcentreerd door middel van kolommen gevuld met Porapak S (50-80 mesh, Waters Ass., Milford, USA) gekoeld bij -95 °C (stolpunt aceton). Bij deze lage temperatuur is de retentietijd van koolwaterstoffen (KWS) op Porapak S voldoende groot opdat ethyleen, ethaan, ... dat gedurende een bepaald tijdsinterval door de kolom stroomt, geabsorbeerd en geconcentreerd wordt. Door een snelle temperatuursverhoging (onderdompeling van de kolom in kokend water) wordt de retentietijd zodanig verkort dat alle geabsorbeerde KWS worden losgelaten en dus van de kolom stromen (De Greef en med. 1976, De Greef en De Proft 1978, De Proft 1983). Deze methode laat toe de ethyleenproductie snel en nauwkeurig kwantitatief en kinetisch te bepalen zonder destructie van de planten en zonder wijziging van de atmosfeer, waarin zij zich bevinden.

Ook de CO₂ dosering gebeurt gaschromatografisch (Intersmat IGC 10C) met een katharometer (TCD, spanning 200 mA).

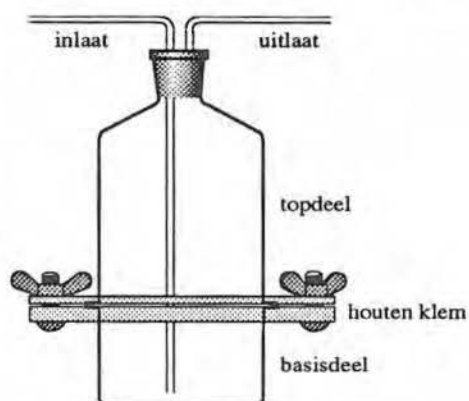
2.3.1. Beschrijving van de meetopstelling

2.3.1.1. De plantecuvet

De proefplanten worden voor het merendeel van de experimenten in eenzelfde type van cuvet, zoals geïllustreerd in fig. 2.2, geplaatst. Het volume van de cuvet is 4,3 l. De cuvet is vervaardigd uit glas; de twee helften zijn voorzien van een vlakke flens. Tussen de twee flenzen wordt een minimale hoeveelheid Apiezonvet type M (Merck) aangebracht. Elk nieuw lot van dit vet werd getest op eventuele (lichtafhankelijke) vrijstelling of binding van ethyleen. Top- en basisdeel van de cuvet worden door een houten klem met schroeven samen gehouden. In het topdeel is een B19 slijpstuk aangebracht. De verbinding met de gaswegen van de ethyleenconcentratie-opstelling wordt verzekerd door een B19 messing stop waarin de roestvrijstalen gasin- en uitlaat bevestigd zijn. Door de cuvet wordt een mengsel synthetische ethyleenvrije lucht (N₂/O₂ : 80/20, 300 µl l⁻¹ CO₂) gestuurd. Het debiet bedraagt 10 lh⁻¹. Om een optimale gasdoorstroming te bekomen, eindigt de gasinlaat zo diep mogelijk in het vat, terwijl de gasuitlaat bovenaan in de messing stop voorzien is. De cuvetten worden opgesteld in een ruimte met constante temperatuur (zie 2.3.1.3).

In de cuvet wordt een glazen beker van 250 ml met intacte planten geplaatst. De kiemplanten worden zeer voorzichtig uit de vermiculite gehaald en in de glazen beker gezet. Speciale aandacht wordt besteed om ook maar de geringste zichtbare schade aan de wortels te vermijden. Enkel de wortels zijn ondergedompeld in 100 ml geklimatiseerd leidingswater of in de te onderzoeken oplossing. Daar de gasinlaat tot helemaal beneden in de cuvet reikt, wordt de vloeistof in de beker constant verlucht. Dit zorgt tevens voor een bevochtiging van de atmosfeer in de cuvet.

Fig. 2.2 : Schema van de glazen meetcuvet gebruikt voor ethyleen- en CO₂-metingen bij groene kiemplanten (naar De Proft, 1983).

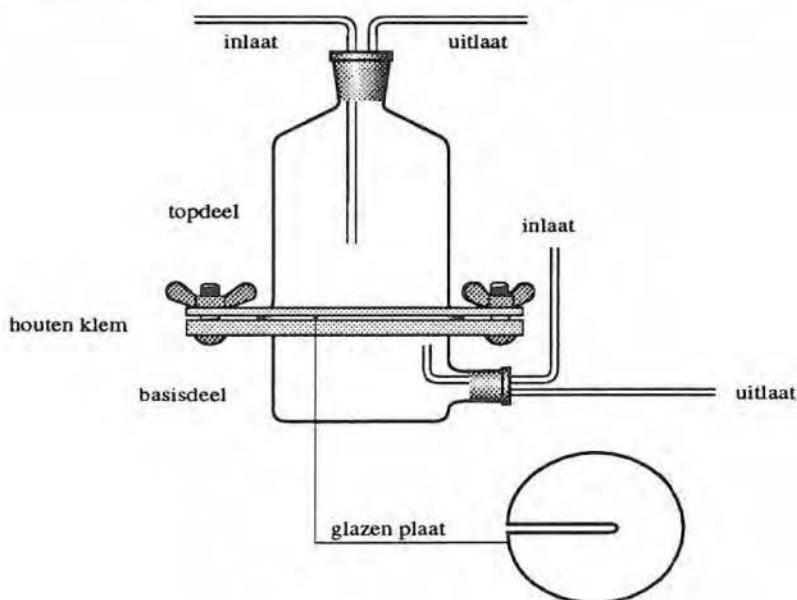


2.3.1.2. Cuvet voor het afzonderlijk meten van de ethyleenproductie van fotosynthetisch actieve en inactieve delen bij intacte groene bonekiemplanten

Wij construeerden een speciaal type cuvet om de ethyleenproductie van fotosynthetisch actieve (bladeren en stengel) en inactieve (wortels) organen apart te doseren zonder de fysiologische intactheid van de plant te verstoren. Dit type van cuvet wordt voorgesteld in fig. 2.3. Enkel het basisdeel verschilt van de meetcuvet, die voor de andere experimenten wordt gebruikt (zie 2.3.1.1 en fig 2.2). Het basisdeel bevat nu, net zoals het topdeel, een B19 slijpstuk waarin een messing stop met gasinlaat en -uitlaat kan geschoven worden. In deze cuvet wordt 1 bonekiemplant met haar wortels in een, met 100 ml leidingswater gevulde, glazen beker geplaatst. De scheiding van de fotosynthetisch actieve en inactieve organen gebeurt ter hoogte van het hypocotyl op ongeveer 4 cm van de wortels. Dit wordt gerealiseerd door een glazen plaat met een spleet van 4 mm (fig. 2.3) over de kiemplant te schuiven en op het basisdeel te leggen. Hiertoe wordt tussen de randen van de plaat en de vlakke flens van het basisdeel een kleine hoeveelheid Apiezonvet type M aangebracht. Vervolgens wordt de spleet zorgvuldig afgedicht met Polyfilla

Interior (Polyfilla Products). Dit product staat borg voor een lekvrije af-dichting en stelt bovendien geen ethyleen vrij (Vangronsveld 1990). Na volledige verharding van de Polyfilla worden de oneffenheden aan de rand van de glazen plaat geëgaliseerd. Het topdeel wordt bevestigd op de glazen plaat d.m.v. Apiezonvet (cfr. bevestiging van de plaat op het basisdeel). Tenslotte worden top- en basisdeel door een houten klem met schroeven samen gehouden. Deze cuvet wordt eveneens in een geklimatiseerde kast geplaatst, doorstroomd met ethyleenvrije synthetische lucht (N_2/O_2 : 80/20, $300 \mu l l^{-1} CO_2$) en nauwkeurig op gaslekken gecontroleerd.

Fig. 2.3 : Schema van de glazen meetcuvet gebruikt voor het afzonderlijk meten van ethyleen- en CO_2 -producties van fotosynthetisch actieve en in-actieve delen bij intacte groene bonekiemplanten.



2.3.1.3. Klimatisering van de plantecuvetten en belichtingsvelden

Zoals boven reeds vermeld worden de meetcuvetten altijd opgesteld in een kast met een constante temperatuur. De afwijking t.o.v. de ingestelde temperatuur (25 °C) is niet groter dan 0,5 °C. Naargelang het type van experiment worden de cuvetten in volledige duisternis gehouden of met verschillende lichtkwaliteiten (wit, rood en blauw licht) bestraald.

Bij aanvang van dit werk beschikten wij over een kast waarin de hoeveelheid fotosynthetisch actief licht gemeten op het niveau van de planten, al naargelang de aanschakeling van 1 of meer lichttrappen, slechts 40 of 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bedroeg. De eerste experimenten (hoofdstuk 3) worden uitgevoerd in deze kast.

Later werd een nieuwe kast gebouwd met een lichtplafond van 26 fluorescencielampen (Philips TL 33-18 W). De hoeveelheid fotosynthetisch actief licht in deze kast bedraagt 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en is dus vergelijkbaar met de intensiteit gerealiseerd in de plantengroeikamers. Dit is eveneens het geval voor de spectrale energieverdeling. De volgende proeven worden uiteraard in deze meetkast uitgevoerd. Voor enkele experimenten wordt gebruik gemaakt van rood en blauw licht, waarvoor respectievelijk rode (Philips TL 15-18W) en blauwe (Philips TL 25-18W) buislampen worden aangewend. De spectrale energieverdeling van deze lichtbronnen wordt weergegeven in fig. 2.4 en 2.5.

Fig. 2.4 : Emissiespectrum van de rode fluorescentielampen (Philips TL 15-18W).

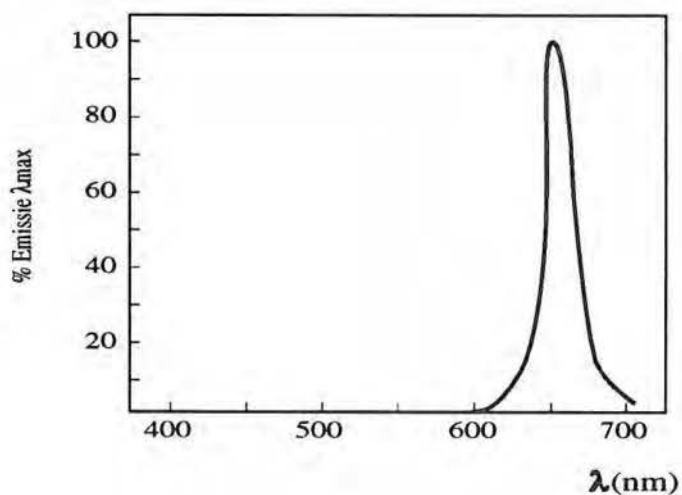
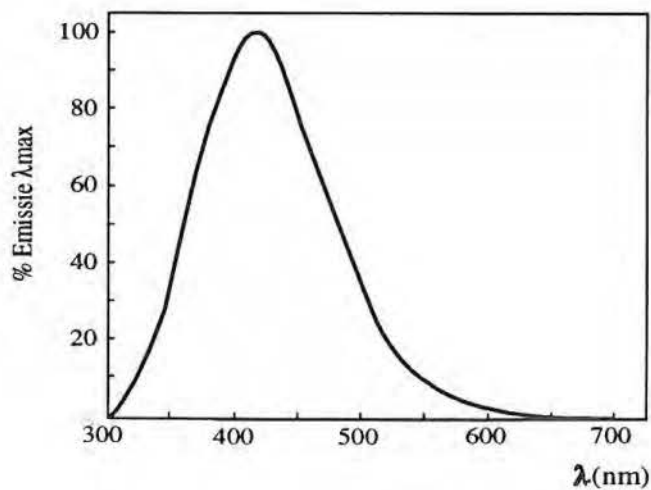


Fig. 2.5 : Emissiespectrum van de blauwe fluorescentielampen (Philips TL 25-18W).



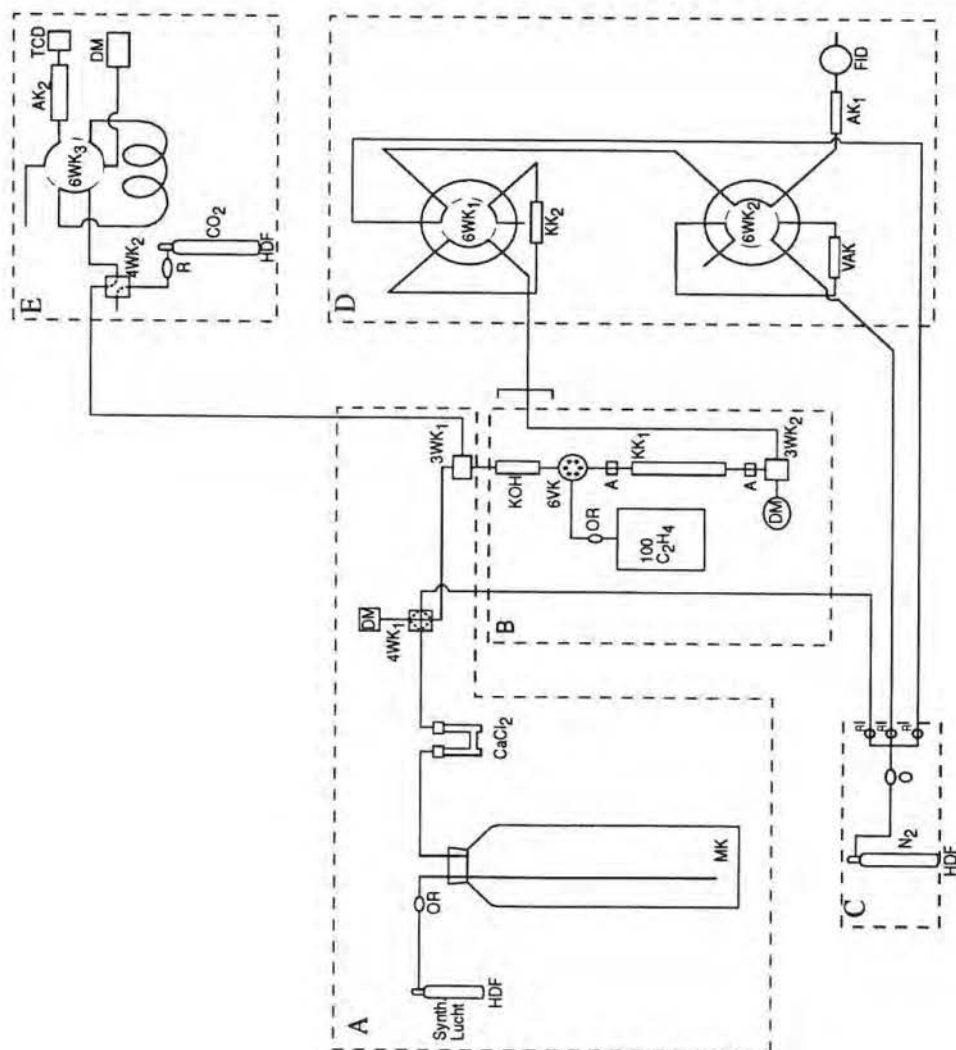
2.3.1.4. De ethyleenconcentratie-opstelling : vereenvoudigd schema van de gaswegen

Nadat de synthetische lucht door de meetcuvet (MK) is gestroomd, wordt waterdamp aan de gasstroom onttrokken d.m.v. een CaCl_2 kolom (fig. 2.6). Aldus wordt vermeden dat waterdamp op de gekoelde concentratiekolommen KK1 en KK2 zou kunnen vastvriezen (zie verder) en verstoppingen veroorzaken. Door middel van een vierwegskraan 4WK1 kan de gasstroom al dan niet naar de doseereenheden voor ethyleen en CO_2 geleid worden. Indien het gas naar de doseereenheden wordt gevoerd, passeert het vervolgens een driewegskraan 3WK1 die toelaat de gasstroom ofwel naar de ethyleenconcentratie-eenheid ofwel naar de CO_2 analyse-eenheid te leiden. Wanneer het gas naar de ethyleenconcentratie-eenheid stroomt, wordt het eerst over een KOH kolom gestuurd waardoor het CO_2 aan de gasstroom onttrokken wordt. Het CO_2 moet uit de gasstroom geëlimineerd worden daar het stolpunt van CO_2 bij $-75\text{ }^\circ\text{C}$ ligt, zodat het op de gekoelde kolom zou weerhouden worden en bij opwarmen massaal in de gaschromatograaf gestuurd worden, waardoor de vlam van de vlamionisatiedetector (FID) zou doven. Noch CaCl_2 (zie hoger) noch KOH absorberen ethyleen (Vangronsveld 1990). CaCl_2 absorbeert bovendien geen CO_2 . Vervolgens stroomt het gas door de concentratiekolom KK1. Deze bestaat uit een 10 cm lang koperen buisje (1/4 duim) gevuld met 0,4 g Porapak S (50-80 mesh). Deze concentratiekolom wordt gekoeld tot $-95\text{ }^\circ\text{C}$ (stolpunt aceton) om het geproduceerde ethyleen vast te houden. Opwarmen tot $100\text{ }^\circ\text{C}$ (kokend water) resulteert in een zeer snelle afgave van het geaccumuleerde ethyleen. Via een driewegskraan 3WK2 (ingebouwd voor controle van het debiet tijdens de accumulatie) en via een zeswegskraan 6WK1 wordt het ethyleen met N_2 als drager(vector)gas naar een tweede gekoelde ($-95\text{ }^\circ\text{C}$) concentratiekolom KK2 gebracht, welke zich in de injectieweg van de gaschromatograaf bevindt. Deze tweede kolom levert een belangrijke bijdrage tot een betere scheiding van de koolwaterstoffen (KWS) en biedt tevens de mogelijkheid om op verscheidene concentratielijnen simultaan te werken en de analyses uit te voeren op dezelfde meeteenheid. Na opwarmen ($100\text{ }^\circ\text{C}$) van kolom KK2

komen de KWS terecht op een vooranalysekolom (VAK, 1/8 duim, roestvrij staal, 1m lengte en gevuld met Porapak R, 50-80 mesh) en kan KK2 opnieuw gekoeld worden om een volgend staal te ontvangen. Deze pre-analysekolom is bedoeld om enkel de lage KWS (methaan, ethaan, ethyleen en acetyleen) op de eigenlijke analysekolom (AK, 1/8 duim, roestvrij staal, 3m lengte en gevuld met Porapak R, 50-80 mesh) te brengen. Nadat de lagere KWS over de vooranalysekolom gepasseerd zijn, worden de hogere KWS met zeer lange retentietijden d.m.v. een "back flush" met N₂ van deze vooranalysekolom "geblazen". De scheiding gebeurt bij een oventemperatuur van 75 °C en het debiet van het dragergas bedraagt 1,6 lh⁻¹. De gaschromatograaf (Intersmat IGC 120 FB) is uitgerust met een vlamionisatiedetector (FID). De detectielimiet ligt rond 200 pl ethyleen. Via de 3WK1 kan het te analyseren gas eveneens naar de CO₂ meeteenheid worden afgeleid. Een vierwegskraan 4WK2 brengt het gas langs een zeswegskraan 6WK3 in de monsterlus met een vast volume van 2 ml. Dit volume wordt in de AK (1/8 duim, roestvrij staal, 3 m lengte en gevuld met Porapak S, 50-80 mesh) geïnjecteerd, gescheiden bij 40 °C en vervolgens door de katharometer (TCD, spanning 200 mA) van de gaschromatograaf (Intersmat IGC 10C) gedetecteerd. Als dragergas wordt H₂ gebruikt met een debiet van 2 lh⁻¹.

Fig. 2.6 : Schema van de gaswegen van de meetapparatuur voor ethyleen- en CO₂-doseringen.

- A : Gasfles met synthetische lucht, plantecuvet, CaCl₂ kolom, staalnamekranen.
 B : Ethyleenconcentratie-eenheid (+ ijk kraan).
 C : Gasfles met dragergas (N₂).
 D : Ethyleenanalyse-eenheid.
 E : CO₂ analyse-eenheid



2.3.1.5. Materialen

In principe is elk materiaal dat chemisch inert is voor ethyleen, en dat onder de gegeven omstandigheden noch ethyleen absorbeert, noch ethyleen vrijstelt, geschikt voor gebruik bij ethyleenanalysen. Al de gebruikte materialen werden in dit verband grondig uitgetest. Slechts een beperkt gamma van materialen voldoet aan de gestelde eisen.

De gasleidingen bestaan uit roestvrij stalen buis van 1/8 duim. Al de aansluitingen en verbindingen worden gemaakt met Swagelock (Crawford Fitting Co, Canada) koppelingen. De aan- en afvoerleidingen van de meetcuvet staan in verbinding met de gaswegen van de ethyleenopstelling d.m.v. Swagelock snelkoppelingen, wat een snelle en tevens lekdichte verbinding van de cuvet met het meetsysteem mogelijk maakt. Twee-, drie- en vierwegskranen zijn van het merk Whitey (Whitey Co., Ohio, USA), de zeswegskranen van Intersmat. De 6 volume ijkkraan werd geleverd door L'Air Liquide.

2.3.2. Analyseprocedure

2.3.2.1. Ethyleen

Zoals hoger vermeld (2.3.1.4) kunnen verschillende concentratie-eenheden op dezelfde analyse-eenheid worden aangesloten. Wij maken gebruik van 3 concentratie-eenheden die elk via een vierwegskraan het uitstromende gas van 2 meetcuvetten kunnen ontvangen. Meting van 6 verschillende meetcuvetten d.m.v. 1 meeteenheid is aldus mogelijk.

We beschrijven hier de meetprocedure voor 1 meetlijn, zoals voorgesteld in fig. 2.6. Het gas passeert de 4WK1 die debietmeting mogelijk maakt. Voor het meten van ethyleen moet de 3WK1 de gasstroom naar de concentratiekolom KK1 leiden. Deze 3WK1 maakt de keuze tussen ethyleen en CO₂ meting (zie verder) mogelijk. Nadat de KK1 gekoeld is tot -95 °C (1 min na onderdompelen in bevroren aceton) wordt het gas afkomstig uit de meetcuvet d.m.v. het in de juiste stand plaatsen van de 4WK1 naar de concentratie-

kolom geleid. Na een concentratietijd van 10 min wordt de 4WK1 terug in de uitgangsstand gedraaid, zodat er opnieuw N₂-dragergas over de analysekolom stroomt. De staalname is daarmee gebeurd. De op de KK1 geabsorbeerde KWS moeten nu naar de ethyleenanalyse-eenheid overgebracht worden. Hiertoe wordt de 3WK2 in die stand gebracht die een verbinding met de analyse-eenheid vormt. De eerste en tweede zeswegskraan (6WK1 en 6WK2) staan nu in de stand aangeduid met de volle lijn. De KK2 van de analyse-eenheid wordt gekoeld tot -95 °C. Na opwarmen van de KK1 van de concentratie-eenheid tot 100 °C (kokend water) worden de KWS m.b.v. het vectorgas (N₂, debiet 5 lh⁻¹) overgebracht naar KK2 van de analyse-eenheid. Na 40s opwarmen van KK1 worden de 6WK1 en 6WK2 in de door de stippellijn aangegeven stand gebracht. Ongeveer 30s na deze handeling wordt ook de KK2 opgewarmd tot 100 °C. De KWS worden, gedreven door het vectorgas, op de VAK gebracht. Na 2min 30s zijn ethyleen en ethaan (onmiddellijk volgend op ethyleen) volledig van de VAK op de AK overgebracht. De twee zeswegskranen worden nu terug in de uitgangsstand gebracht; er ontstaat zo een "backflush" van N₂ die de KWS met lange retentietijden van de VAK drijft, en deze kolom alzo snel geschikt maakt voor het ontvangen van een nieuw staal.

2.3.2.2. CO₂

Voor het meten van de CO₂ concentratie in de gasstroom afkomstig van de meetcuveet worden de 4WK1 en de 3WK1 zodanig geplaatst dat het gas naar de CO₂ analyse-eenheid stroomt. De 4WK3 leidt het gas naar de 6WK3 op de gaschromatograaf, die zich bevindt in de positie aangeduid met de volle lijnen. De monsterlus (ML) van de 6WK3 wordt gedurende 2 min doorspoeld met het te analyseren gas, waarna het monster geïnjecteerd wordt door de 6WK3 te plaatsen in de stand aangeduid door de stippellijnen. Na ongeveer 10s wordt de 6WK3 terug in de oorspronkelijke stand gebracht.

2.3.3. Ijkingsprocedure

2.3.3.1. Ethyleen

Een gekende hoeveelheid van een gasmengsel N_2/O_2 (80/20) dat 100 ppm ethyleen en 100 ppm ethaan bevat, wordt met behulp van een 6 volumekraan (6VK, L'Air Liquide) geïnjecteerd. Ethyleen en ethaan worden door het vectorgas op de gekoelde KK1 gedreven. De meting gebeurt verder op dezelfde wijze als beschreven onder 2.3.2.1. De oppervlakte van de geregistreerde pieken wordt geïntegreerd met behulp van een integratieprogramma op een Apple IIc computer. Aan de hand van de piekoppervlakte van de bekende hoeveelheid ethyleen wordt de hoeveelheid ethyleen vertegenwoordigd door de piekoppervlakte van de onbekende berekend. Daar de retentietijden van ethyleen en ethaan zeer dicht bij elkaar liggen, maakt het gelijktijdig voorkomen van beide componenten in het ijkmengsel een controle van het scheidend vermogen van de kolom mogelijk.

Door 6 geijkte volumes (5, 10, 12,5, 25, 50 en 100 mm³) van een 100 ppm ethyleen en 100 ppm ethaan ijkmengsel te injecteren d.m.v. de ijk kraan worden 6 verschillende piekoppervlakten bekomen. Er bestaat een lineair verband tussen deze piekoppervlakten en de geïnjecteerde hoeveelheid ethyleen.

2.3.3.2. CO₂

De ijking voor de CO₂ metingen wordt uitgevoerd met een N_2/O_2 (80/20) gasmengsel dat een gekende hoeveelheid CO₂ (300 ppm) bevat. Via de 4WK2 wordt het ijkmengsel in verbinding gesteld met de 6WK3. De meetprocedure verloopt als beschreven onder 2.3.2.2. Uit een vergelijking van de piekhoogten wordt de CO₂ concentratie in de meetcuvet berekend.

2.4. Gaschromatografische dosering van ACC en M-ACC

De door ons gebruikte ACC extractie- en doseringsmethode werd ontwikkeld door De Proft en med. (1984). De procedure werd op punt gesteld steunend op de extractie- en doseringsmethode van Lizada en Yang (1979) en op de ervaringen met de gaschromatografische accumulatiemethode voor ethyleen-dosering (De Greef en med. 1976, De Greef en De Proft 1978).

2.4.1. Extractieprocedure

Het plantemateriaal wordt ingevroren in vloeibare stikstof en verpulverd in een speciale topmixer type A10, 20.000 rpm (Janke en Kunkel, Staufen i. Br., B.R.D.). Drie gram van dit poeder worden op een G4 glasfilter bij kamertemperatuur 4 maal gedurende 10 min geëxtraheerd met een totaal volume van 50 ml 80% methanol (1 maal 20 ml, 3 maal 10 ml). De extractievloeistof wordt opgevangen in een 200 ml kolf en de organische fase wordt onder vacuum ingedampt bij 40 °C (Büchi Rotavapor R, Flawil, CH). De waterfractie (ongeveer 10 ml) wordt van de aanwezige apolaire stoffen ontdaan door zuivering over een geactiveerd Sep-pak C18 kolommetje (Waters Ass.). De gezuiverde vloeistof wordt opgevangen in een maatkolfje en met gedeïoniseerd water aangevuld tot 25 ml. Hiervan wordt 10 ml volledig ingedampt bij 40 °C. Na oplossen van het droge extract in 2 ml gedeïoniseerd water kan het vrij ACC gehalte bepaald worden. De extractie-efficiëntie en de mate van ACC verlies tijdens de zuiveringsstap wordt nagegaan na toevoeging van 200 µl 10^{-6} M ACC aan 3 g van het verpoederde planteweefsel. Na een equilibratieperiode van 15 min wordt de extractie- en zuiveringsprocedure doorlopen. Naast het gemeten endogeen ACC gehalte, wordt gemiddeld 90% van het toegevoegde ACC teruggevonden.

Het totale (vrij + gebonden) ACC gehalte wordt bepaald door 10 ml van het bekomen extract te hydrolyseren in 6 N HCl bij 100 °C gedurende 1h. Onder deze voorwaarden wordt M-ACC volledig gehydrolyseerd zonder waarneembare afbraak van ACC. De hoeveelheid M-ACC kan dan berekend

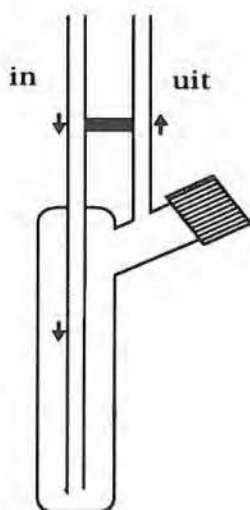
worden door het ACC gehalte vóór hydrolyse af te trekken van dit na hydrolyse.

2.4.2. Doseringmethode

2.4.2.1. Reactie en reactievat

De dosering van het ACC aanwezig in de ongekookte en gekookte fractie van de extractievloeistof is gebaseerd op een chemische omzetting van ACC tot ethyleen met HOCl in aanwezigheid van Hg^{2+} in sterk basisch midden (Lizada en Yang 1979). Deze reactie gaat door in een glazen recipiënt (fig. 2.7). Zijdelings is een schroefdop met teflon septum aangebracht. Om een optimale gasdoorstroming van het recipiënt te bekomen is de gasinvoer helemaal onderaan voorzien, terwijl de uitgang zich bovenaan bevindt.

Fig. 2.7 : Schema van het glazen recipiënt waarin ACC chemisch wordt omgezet tot ethyleen.



2.4.2.2. Schema van de gaswegen

N₂ gas wordt via een debietregelkraantje, een driewegskraan (3WK, mogelijkheid tot debietcontrole) en een vierwegskraan (4WK) naar het reactievatje gevoerd (fig. 2.8).

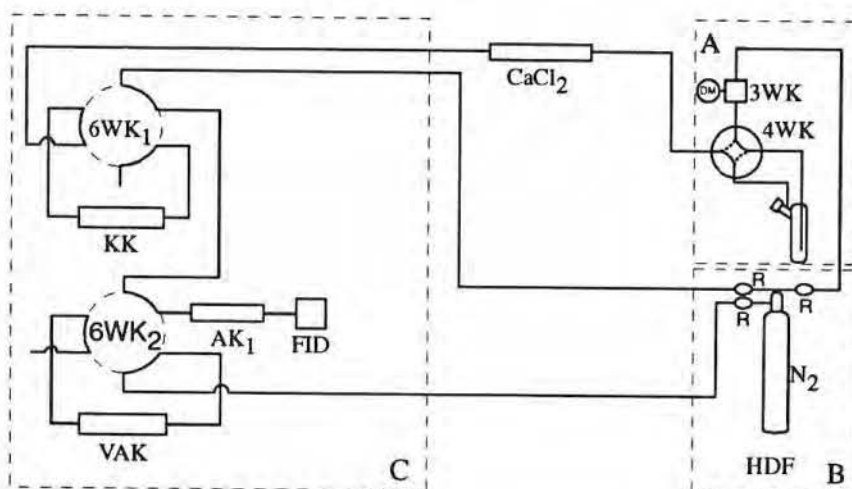
Via dezelfde 4WK wordt het gasmengsel uit het reactievatje over een CaCl₂ kolom (drogen van het gas, zie ook bij 2.3.1.4) en verder via een zeswegskraan (6WK1) naar de concentratiekolom KK gevoerd. Op deze kolom kan het ethyleen door koelen (-95 °C) en opwarmen (100 °C) respectievelijk geabsorbeerd (geconcentreerd) en terug vrijgesteld worden. Het van de KK vrijgestelde ethyleen komt via 2 zeswegskranen (6WK1 en 6WK2) op de VAK en de AK van de gaschromatograaf (Intersmat IGC 120 FB) terecht. De VAK en AK bestaan uit 1/8 duim roestvrijstalen buis gevuld met Porapak R (50-80 mesh) en zijn respectievelijk 1 en 3 m lang. De scheiding gebeurt bij een oventemperatuur van 80 °C en het debiet van het dragergas bedraagt 1,9 lh⁻¹. De gaschromatograaf is uitgerust met een vlamionisatiedetector (FID).

Fig. 2.8 : Schema van de gaswegen voor de dosering van ACC.

A: Reactievat.

B: Gasfles met vectorgas (N_2).

C: Concentratie- en analyse-eenheid.



2.4.3. Analyseprocedure

In het open reactievat, waarvan de onderste 3 cm zich tijdens de gehele procedure in ijs bevinden, worden na elkaar de volgende reagentia aangebracht :

200 μ l extract

200 μ l $HgCl_2$ (10^{-2} M)

1 ml gedeïoniseerd water

Het reactievat wordt vervolgens afgesloten d.m.v. een schroefdop met septum en gedurende 4 min doorspoeld met N_2 (debiet 5 l h^{-1}) om het eventueel in de lucht aanwezige ethyleen weg te spoelen. De 4WK staat dan in de stand aangegeven met de volle lijn (fig. 2.8). Na omschakelen naar de stand aangegeven door de stippellijn wordt de reactie gestart door het inspuiten van 600 μ l reagens d.m.v. een kleine injectiespuit via het septum. Dit reagens bestaat uit commercieel bleekwater (ongeveer 11% $NaOCl$) en verzadigde KOH oplossing in een 1:1 verhouding gemengd. Het reactievat is

nu volledig afgesloten en het N₂ gas wordt over de KK geleid. Onder regelmatig schudden op een Vortex gaat de reactie gedurende 4 min door. Tijdens de laatste minuut hiervan wordt de KK gekoeld tot -95 °C. Vervolgens wordt de 4WK terug omgeschakeld in de stand aangeduid met de volle lijnen en wordt het in het reactievat gevormde ethyleen d.m.v. het dragergas meegevoerd naar de gekoelde KK. Na 4 min uitspoeling worden de twee 6WK op de gaschromatograaf gebracht in de stand aangegeven door de stippellijnen. Een halve minuut later wordt het geaccumuleerde ethyleen in de gaschromatograaf geïnjecteerd. Via de VAK komt het gas terecht op de AK. Ongeveer 1min 40s na injectie worden de twee 6WK terug in de uitgangsstand geschakeld zodat de VAK wordt tegengespoeld met N₂. De detectie gebeurt m.b.v. een FID. De detectielimiet ligt rond 8 pmol ACC.

2.4.4. Ijkingsprocedure, omzettingsrendement en berekeningswijze

Voor het bepalen van de hoeveelheid ACC in een waterig extract dient er eerst geijkt te worden. 200 µl van een 10⁻⁶ M ACC oplossing worden volgens de hierboven beschreven procedure gemeten. De bekomen piekhoogte dient dan als referentie voor de meetwaarde. Er bestaat een lineair verband tussen piekhoogten en geïnjecteerde hoeveelheden ACC. Verder dient de efficiëntie van de chemische omzetting van ACC tot ethyleen in het reactievat bepaald te worden. Toevoeging van een gekende hoeveelheid ACC aan een extract en daaropvolgende meting van het uit dit mengsel, na chemische omzetting van ACC, vrijgesteld ethyleen levert ons informatie over de efficiëntie van deze omzetting. Voor de in dit werk voorgestelde ACC doseringen is het omzettingsrendement gelegen tussen 80 en 95%. Bij de berekeningen wordt hiermee rekening gehouden.

Het M-ACC gehalte wordt berekend door het ACC gehalte vóór hydrolyse af te trekken van het ACC gehalte gemeten na hydrolyse van het extract.

2.5. Behandeling van de intacte planten

2.5.1. Plaatsing van de planten in de meetcuvet

Vooraleer de proefplanten in de meetcuvet (zie 2.3.1.1 en 2.3.1.2) gebracht worden, verwijderen we zeer voorzichtig de vermiculite van de wortels. Vervolgens worden de planten met hun wortels in een glazen beker (250 ml), gevuld met 100 ml geklimatiseerd leidingswater of de te onderzoeken oplossing, geplaatst.

Voor de experimenten waarin een kinetische studie van de ethyleenproductie wordt uitgevoerd, worden de planten 's avonds (± 17 h) in de meetcuvet geplaatst. Ethyleen (en CO₂) metingen worden dan de volgende dag (vanaf 8h) uitgevoerd. In alle andere experimenten worden de planten 's morgens omstreeks 9h in de meetcuvetten geplaatst en worden ethyleenmetingen uitgevoerd na een equilibratieperiode van 4 of 6h. De ethyleenproductie is reeds 4h na het sluiten van de meetcuvet stabiel (Vangronsveld 1990).

2.5.2. Toediening van chemicaliën aan intacte planten

De concentraties van de verschillende stoffen worden zo gekozen dat ze geen zichtbare nadelige gevolgen hebben voor de plant tijdens de onderzochte periode.

2.5.2.1. ACC

Een waterige 1 mM ACC (Sigma) oplossing (pH 6) (500 μ l) wordt d.m.v. een penseel uitgesmeerd op de bovenkant van de primaire bladeren bij de bonekiemplanten. In één enkel experiment worden de planten met hun wortels in 100 ml van een 1 mM ACC oplossing geplaatst.

2.5.2.2. Radicaalbindende chemicaliën

Na het afsnijden van de wortels worden bonekiemplanten met hun hypocotyl in een waterige 1 mM oplossing van spermine, ascorbinezuur, n-propylgallaat of Na-benzoeaat geplaatst. Al deze producten werden geleverd door Sigma.

2.5.2.3. Radicaalgenererende chemicaliën

De bonekiemplanten worden met hun wortels in 100 ml van een 1 mM paraquatoplossing (Sigma) geplaatst.

HOOFDSTUK 3 : WIT LICHT EFFECT OP DE ETHYLEEN-PRODUCTIE EN NETTO CO₂ EVOLUTIE BIJ INTACTE GROENE KIEMPLANTEN VAN VERSCHILLENDE PLANTE-SOORTEN

3.1. Inleiding

Literatuurgegevens tonen aan dat bestralen van groen plantemateriaal met W licht leidt tot zeer uiteenlopende responsen van de ethyleenproductie. Zoals reeds uitvoerig beschreven in de inleiding (zie 1.5.2.4 en tabel 1.1) is een coherente interpretatie van deze literatuurgegevens vrijwel onmogelijk. Aan de basis hiervan liggen vooral verschillen in gebruikt plantemateriaal (soort, delen of intacte planten) en experimentele omstandigheden (gesloten of open meetsysteem, endogene, door stress of ACC geïnduceerde ethyleenproductie).

Wij stelden ons de vraag of de 3 theoretisch mogelijke reacties van de ethyleenproductie op W licht (stimulering, inhibering, nul-effect) voorkomen, wanneer er geëxperimenteerd wordt onder voorwaarden, die zoveel mogelijk hetzelfde gehouden worden.

Wij onderzochten het effect van W licht op de ethyleenproductie bij verscheidene plantesoorten (soja, komkommer, zonnebloem, boon, gerst, tarwe, haver en maïs) onder vergelijkbare meetomstandigheden, nl.

1. alle metingen worden uitgevoerd met een gaschromatografisch doorstroomsysteem ontwikkeld door De Greef en med. (1976), De Greef en De Proft (1978).
2. als proefmateriaal worden intacte groene planten gebruikt, die opgekweekt worden onder gelijke omstandigheden en zich bevinden in een jong vegetatief stadium.

3. ethyleenproducties in W licht worden steeds bepaald bij dezelfde lichtintensiteiten, nl. 40 en 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4. de stabilisatieperiode van de planten in de meetcuvetten is gelijk.

Bij de aanvang van de experimenten bevinden de proefplanten zich in ontwikkelingsstadia waarin manipulatie mogelijk is met minimale risico's voor verwonding.

De CO_2 gaswisseling van de planten in de verschillende lichtomstandigheden werd gelijktijdig met de ethyleenmetingen bepaald om hun fotosynthetische capaciteit na te gaan.

3.2. Gaswisselingsexperimenten onder steady state omstandigheden

De ethyleenproductie alsook de netto CO_2 evolutie worden bepaald na 6h equilibratie van de kiemplanten in duisternis of W licht. Er werd geopteerd, technische moeilijkheden indachtig (zie 2.3.1.3), om 2 lichtintensiteiten uit te testen, nl. 40 en 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosynthetisch actief licht. Tabel 3.1 toont de ethyleenproductie ($\text{pl h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$) bij de verschillende lichtregimes. Bij de lage lichtintensiteit vinden we bij geen enkele plantensoort een betekenisvol effect van licht op de ethyleenproductie terug. Bij de hogere lichtintensiteit van 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ daarentegen wordt de ethyleenproductie bij alle plantesoorten gestimuleerd t.o.v. de donkerproducties. Het CO_2 gehalte ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$) evolueert bij alle plantesoorten op dezelfde manier : we kunnen immers een daling waarnemen van donker naar de hogere lichtintensiteit (tabel 3.2). In de meeste gevallen is de lage lichtintensiteit nog onvoldoende om een netto fotosynthese te realiseren. Bonen, soja en in mindere mate komkommer en tarwe zijn reeds in staat tot CO_2 fixatie bij deze zwakke lichtbehandeling. Bij de hogere lichtintensiteit vertoont de CO_2 productie bij

alle gebruikte plantesoorten een negatieve waarde en kunnen zij dus netto fotosynthetiseren.

Tabel 3.1 : Ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$) gemeten bij intacte groene planten na 6h donker of W licht (PAR : 40 en $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Gegeven is : gemiddelde $\pm$ SD, aantal herhalingen tussen haakjes, percentage lichteffect.

Plantesoort	Donker	W licht	
		$40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
Soja	2586 ± 59 (6)	2688 ± 123 (9) NIHIL	4411 ± 251 (6) 71 % +
Komkommer	2253 ± 292 (14)	2364 ± 331 (4) NIHIL	3815 ± 449 (11) 69 % +
Zonnebloem	2648 ± 73 (10)	2415 ± 151 (5) NIHIL	3834 ± 288 (9) 45 % +
Boon	3291 ± 349 (9)	3677 ± 473 (6) NIHIL	4301 ± 409 (8) 31 % +
Gerst	1088 ± 61 (7)	1218 ± 73 (7) NIHIL	1405 ± 91 (7) 29 % +
Tarwe	857 ± 59 (12)	920 ± 76 (10) NIHIL	1405 ± 51 (7) 64 % +
Haver	805 ± 61 (12)	904 ± 67 (8) NIHIL	1255 ± 108 (9) 56 % +
Maïs	1262 ± 89 (25)	1282 ± 101 (10) NIHIL	1621 ± 118 (13) 28 % +

Tabel 3.2 : Netto CO₂ evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$) gemeten bij intacte groene planten na 6h donker of W licht (PAR : 40 en 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Gegeven is : gemiddelde $\pm$ SD, aantal herhalingen tussen haakjes.

Plantesoort	Donker	W licht	
		40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
Soja	130 $\pm$ 11 (9)	- 93 $\pm$ 7 (11)	- 214 $\pm$ 15 (7)
Komkommer	194 $\pm$ 9 (14)	- 13 $\pm$ 12 (6)	- 245 $\pm$ 14 (13)
Zonnebloem	173 $\pm$ 11 (12)	16 $\pm$ 8 (7)	- 242 $\pm$ 35 (10)
Boon	739 $\pm$ 101 (12)	- 395 $\pm$ 119 (6)	- 1089 $\pm$ 56 (10)
Gerst	75 $\pm$ 8 (7)	32 $\pm$ 5 (4)	- 33 $\pm$ 4 (10)
Tarwe	95 $\pm$ 4 (18)	8 $\pm$ 8 (10)	- 33 $\pm$ 6 (14)
Haver	93 $\pm$ 7 (12)	22 $\pm$ 4 (10)	- 17 $\pm$ 5 (7)
Maïs	468 $\pm$ 22 (24)	284 $\pm$ 26 (11)	- 246 $\pm$ 30 (12)

3.3. Tijdsverloop van de ethyleenproductie en CO₂ gaswisseling bij donker-licht overgangen

Deze kinetieken werden als volgt uitgevoerd. Bij het ingaan van de donkerperiode werden de planten in de meetcuvetten geplaatst (uiteeraard in volledige duisternis). De eerste ethyleen- en CO₂-metingen vonden plaats nadat de planten zich 16h in deze omstandigheden bevonden hadden. Deze meetresultaten worden op de figuren 3.1 tot 3.3 aangeduid met het tijdstip 0. Vervolgens werd 1 reeks planten in het donker gehouden (donkercontroles) terwijl een tweede reeks in onafhankelijke experimenten 2 behandelingen onderging :

- in het eerste geval (a-luik van fig. 3.1 tot 3.3) werden de planten van donker in continu W licht ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gebracht. Het verloop van ethyleen- en CO₂-productie werd gevolgd gedurende 6 à 7 uren.
- in het tweede geval (b-luik van fig. 3.1 tot 3.3) werden de planten eveneens van donker in W licht gebracht, maar slechts voor een periode van 1h (primaire bestraling). Daarna werd het licht gedurende een tweetal uren uitgeschakeld en uiteindelijk een tweede maal aangeschakeld (secundaire bestraling). Ethyleen- en CO₂-respons werden nagegaan bij deze overgangen tussen donker en licht.

Bij alle plantesoorten vertonen ethyleen- en CO₂-kinetieken kwalitatief een gelijkaardig verloop in gelijkaardige omstandigheden van licht en duisternis. Grafische voorstelling en bespreking van deze kinetieken wordt daarom beperkt tot enkele vertegenwoordigers. Zonnebloem (fig. 3.1) en boon (fig. 3.2) werden uitgekozen als representatieve voorbeelden van de C₃-dicotylen. De ethyleenproductie van de donkercontroles blijft constant gedurende de onderzochte periode. Dit is eveneens het geval voor de netto CO₂ evolutie. Bij de overgang van donker naar W licht wijzigt de ethyleenevolutie van de planten. We zien een sterke toename van de ethyleenproductie tot er na ongeveer 2h licht een constant niveau bereikt wordt. Ter vergelijking kan

worden vastgesteld dat de CO_2 gaswisseling van de planten tegengesteld is aan hun ethyleenevolutie. De CO_2 productie daalt immers en stabiliseert zich na 1 à 2h licht ver beneden de waarde van de donkercontrole. Dit wijst op een overgang van overwegend CO_2 productie naar CO_2 fixatie. Uitschakelen van het licht resulteert in een snelle daling van de ethyleenproductie. Na een tweetal uren wordt het niveau van de donkercontrole terug bereikt. Ook nu verloopt de CO_2 evolutie weer op tegengestelde wijze. De stimulering van de ethyleenproductie kan na deze korte donkerperiode terug geïnduceerd worden door de planten opnieuw in licht te plaatsen. Deze behandeling doet het CO_2 gehalte weer dalen.

Fig. 3.1a en b : Het tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$) en netto CO_2 evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$) bij overgangen tussen donker ($\bullet$) en W licht (WL, $\circ$, PAR : $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) bij 12 dagen oude intacte groene zonnebloemkiemplanten. Gegeven zijn gemiddelden en SD van tenminste 3 metingen.

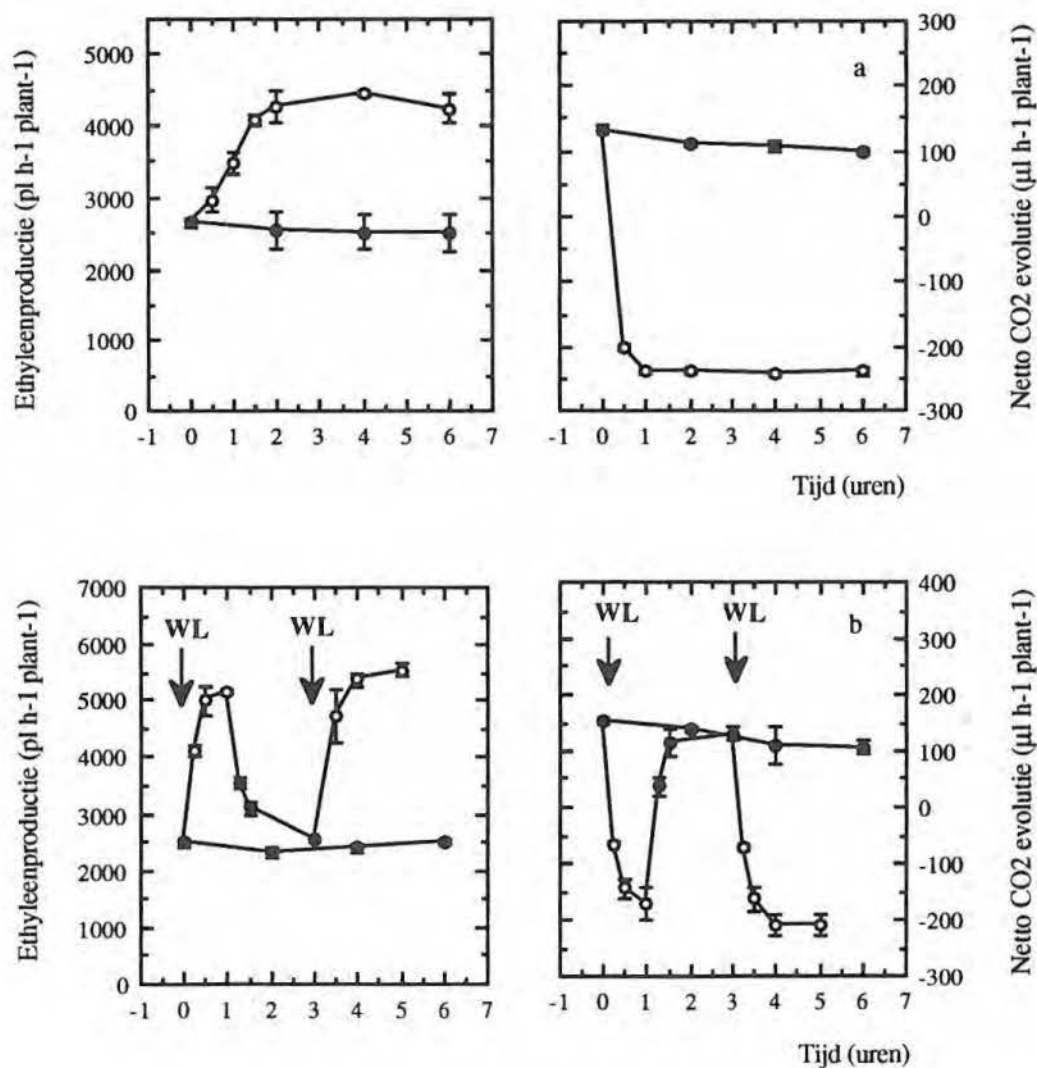
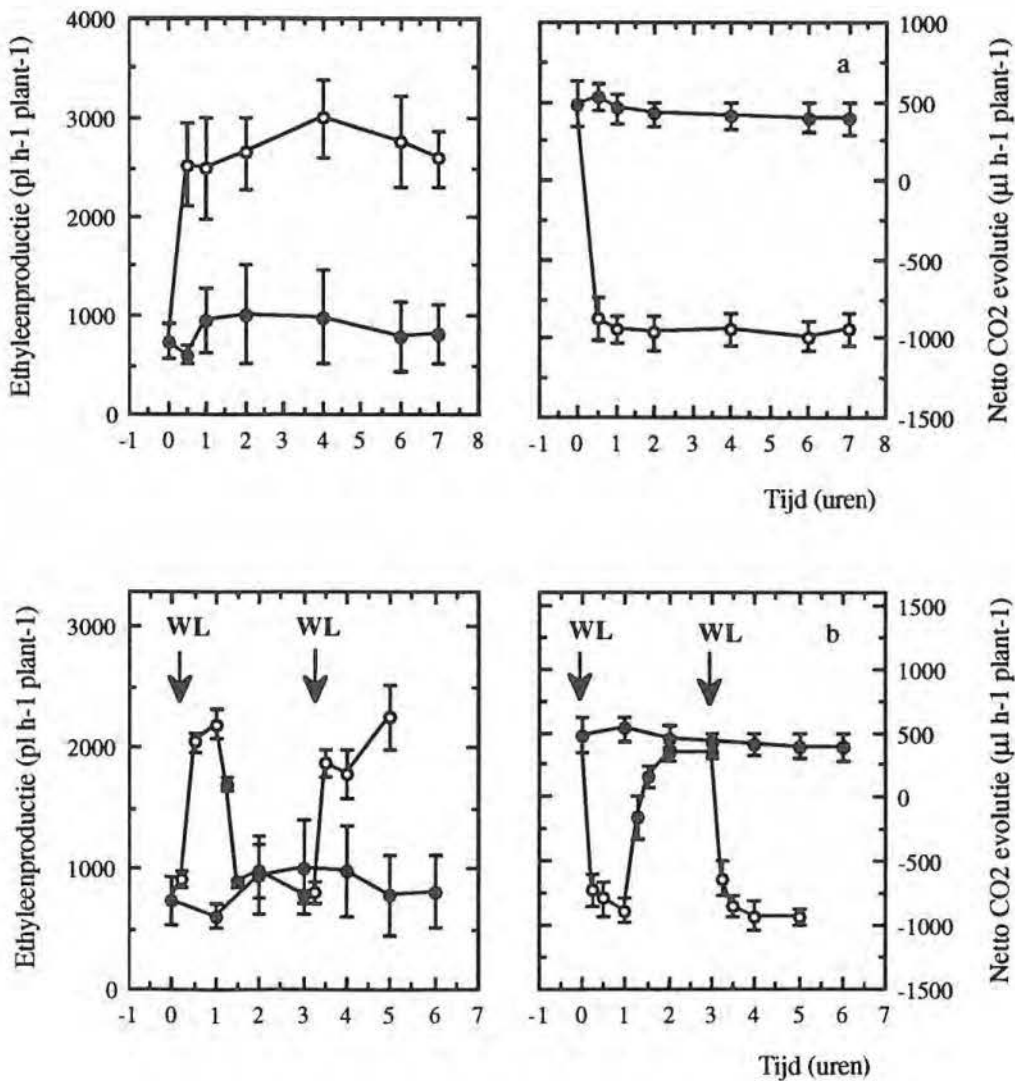


Fig. 3.2a en b : Het tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\text{pl h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$) en netto CO_2 evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$) bij overgangen tussen donker (●) en W licht (WL, ○, $\text{PAR} : 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bij 10 dagen oude intacte groene bonekiemplanten. Gegeven zijn gemiddelden en SD van tenminste 6 metingen.



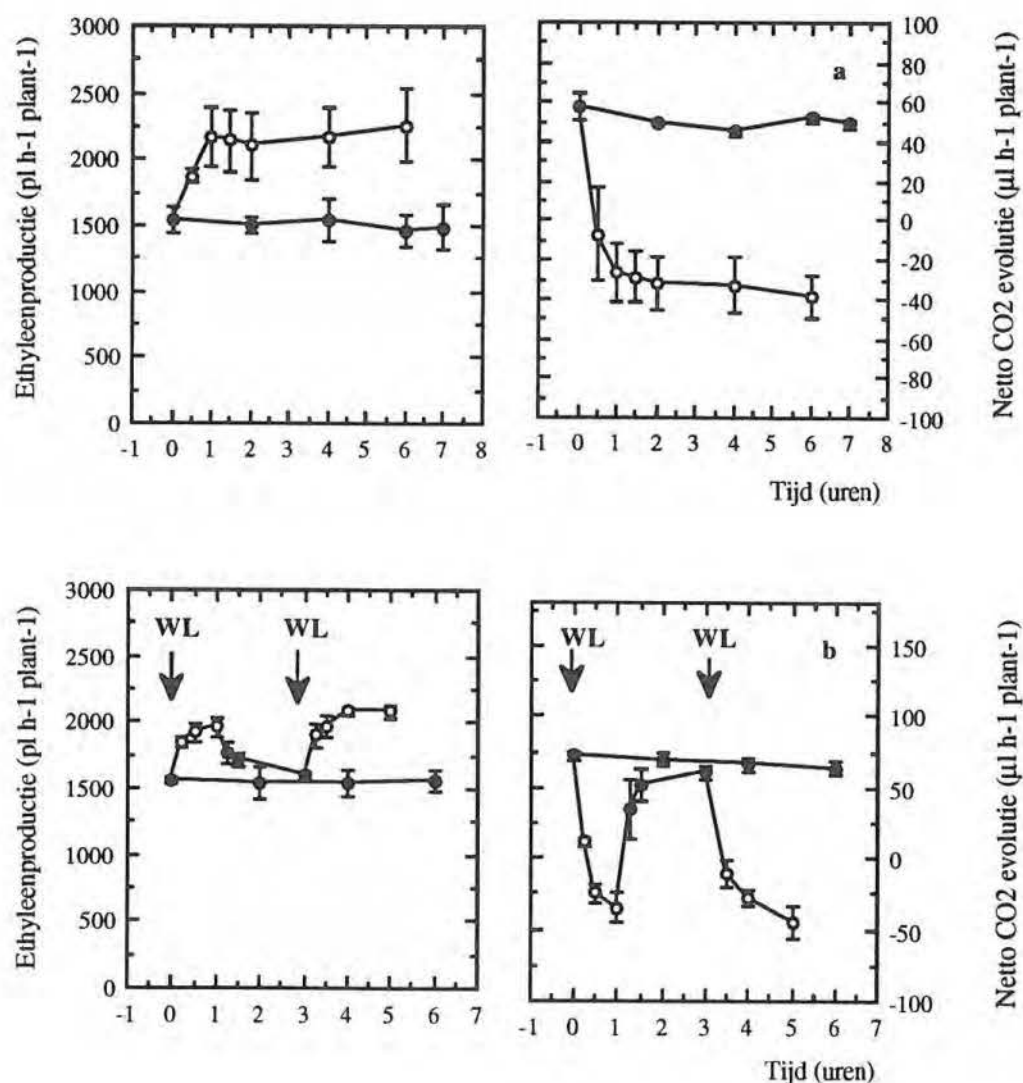
Voor de weergave van de uitgevoerde kinetieken bij de groep van de monocotylen (C3 en C4) is de keuze gevallen op gerst (fig. 3.3). Figuur 3.3 toont ons een vrijwel gelijk kwalitatief beeld van het ethyleen- en CO₂-verloop bij het wijzigen van de lichtomstandigheden als in figuur 3.1 (zonnebloem) en 3.2 (boon). Soortgelijke proefnemingen bij de andere plantesoorten (komkommer, soja, tarwe, haver en maïs) toonden aan dat, zoals boven reeds vermeld, ethyleen- en CO₂-evolutie kwalitatief hetzelfde patroon volgen bij het aan- en uitschakelen van het licht.

Resumerend kunnen we stellen dat bij alle onderzochte plantespecies :

- in continu donker ethyleen- en CO₂-concentraties vrijwel constant blijven,
- bij transfer van donker naar W licht de ethyleenproductie stijgt, terwijl het CO₂ gehalte daalt,
- bij transfer van W licht naar donker de ethyleenproductie daalt, terwijl het CO₂ gehalte toeneemt.

Deze veranderingen in ethyleen- en CO₂-concentraties bij beide transfers treden snel op, zonder lagfase, wanneer de metingen na een half uur plaats grijpen.

Fig. 3.3a en b : Het tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$) en netto CO_2 evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$) bij overgangen tussen donker (●) en W licht (WL, o, $\text{PAR} : 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) bij 8 dagen oude intacte groene gerst-kiemplanten. Gegeven zijn gemiddelden en SD van tenminste 3 metingen.



3.4. Bespreking

De beschikbare literatuurgegevens van W lichteffecten op de ethyleenproductie bij groene planten maken noch een eenduidige vergelijking noch een coherente interpretatie mogelijk (zie inleiding : 1.5.2.4 en tabel 1.1). Wij probeerden te achterhalen of positieve, negatieve alsook nul-effecten van W licht op de ethyleensynthese kunnen voorkomen. Wij onderzochten het effect van W licht op de ethyleenproductie bij verschillende plantesoorten, nl. soja, komkommer, zonnebloem, boon, tarwe, haver, gerst en maïs in vergelijkbare proefomstandigheden. Zoals reeds vermeld in de probleemstelling worden de termen ethyleenproductie (synthese) en ethyleenvrijzetting aan elkaar gelijkgesteld. Steeds gebruikten wij intacte planten in een vroeg vegetatief stadium, opgegroeid in dezelfde condities. Ethyleenbepalingen werden uitgevoerd met een gaschromatografisch doorstroomsysteem (De Greef en med. 1976, De Greef en De Proft 1978) en bij alle soorten werden gelijke lichtintensiteiten ingesteld.

Onze resultaten (tabel 3.1) tonen aan dat bij een lage lichtintensiteit ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de ethyleenproductie van de onderzochte planten het productieniveau van de donkercontroles evenaart. Bij de hogere lichtintensiteit ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) daarentegen wordt de ethyleenproductie gestimuleerd t.o.v. de donkerproductie. Het door ons gevonden stimulerend effect van W licht op de ethyleenproductie bij soja en zonnebloemen staat in tegenstelling tot het nihil-effect beschreven door Bassi en Spencer (1983) (intacte planten, vergelijkbaar meetsysteem). De stimulering van de ethyleensynthese door W licht bij intacte haverplanten verschilt van de inhibitie gerapporteerd door Gepstein en Thimann (1980) (bladsegmenten, gesloten meetsysteem) en het nihil-effect gevonden door Preger en Gepstein (1984) (bladsegmenten, gesloten meetsysteem). Tenslotte verschilt het door ons aangetoonde stimulerend effect van licht op de ethyleenproductie bij intacte

tarwekiemplanten van de inhibitie aangetoond door Wright (1981) (bladsegmenten, gesloten meetsysteem). Bij de hogere lichtintensiteit kunnen alle onderzochte plantesoorten netto fotosynthetiseren (tabel 3.2). Donker-licht overgangen maken duidelijk dat de ethyleenproductie snel reageert op het al of niet aanwezig zijn van de lichtprikkels (fig. 3.1 tot 3.3). Transfer van de planten van donker naar W licht leidt niet alleen tot een stijging van de ethyleenproductie maar tevens tot een daling van het CO₂ gehalte. De omgekeerde situatie doet zich voor wanneer de planten van licht in duisternis gebracht worden.

Bij alle onderzochte plantesoorten komen steady state analyses en kinetische resultaten met elkaar overeen. We vinden in beide gevallen een stimulering van de fotosynthetische capaciteit en van de ethyleenproductie door W licht. Deze resultaten laten vermoeden dat er een verband kan bestaan tussen de door licht gestimuleerde ethyleenproductie en de fotosynthese. Dit mogelijk verband wordt verder behandeld in hoofdstuk 5 en 6. We kunnen ons nu reeds afvragen in hoeverre de relatie fotosynthese en ethyleenproductie zich al dan niet manifesteert via een controle door licht van de stomatale weerstand. Het toeschrijven van de verhoogde ethyleenproductie aan een gereduceerde stomatale weerstand in het licht is niet in overeenstemming te brengen met een aantal literatuurgegevens. Zo wordt de ethyleenproductie bij *Marchantia polymorpha*, een levermos dat geen functionele huidmondjes bezit, eveneens gestimuleerd door licht (Veroustraete 1983). Ook Grodzinski en med. (1982a, 1984) toonden aan dat er geen rechtstreekse relatie bestaat tussen stomatale opening en ethyleenvrijzetting :

1. Donker-licht overgangen wijzigen de ethyleenproductie terwijl de stomatale opening, bepaald via directe microscopische metingen, weinig verandert.

2. Toediening van KCl in aanwezigheid van NaHCO_3 verhindert het sluiten van de stomata maar heeft geen stimulering van de ethyleenproductie tot gevolg.

Deze argumenten maken het onwaarschijnlijk dat het verschil in ethyleenproductie tussen donker en licht gereguleerd wordt via een controle van het stomatale gedrag. Het effect van licht zal eerder gelokaliseerd zijn op het niveau van de ethyleensynthese.

Als samenvatting kan worden gesteld dat met behulp van het gaschromatografisch doorstroomsysteem bij alle onderzochte plantesoorten licht met een voldoende hoge intensiteit de ethyleenproductiesnelheid en de fotosynthese activiteit verhoogt.

Deze vaststelling roept uiteraard een ganse reeks vragen op. Wij formuleren er enkele :

- Waar komt licht tussen in de ethyleenbiosyntheseweg ?
- Hoe kan licht bijdragen tot de stijging van de ethyleenproductie ?
- Welke relatie bestaat er tussen fotosynthetische processen en de licht-gestimuleerde ethyleenproductie ?

Wij opteerden om boneplanten te gebruiken voor ons verder onderzoek van de W licht respons van de ethyleensynthese. Bonekiemplanten zijn immers zeer praktische proefobjecten : niet alleen verloopt het opkweken vrijwel zonder problemen maar ook kunnen deze kiemplanten zeer gemakkelijk gemanipuleerd worden in eender welk ontwikkelingsstadium zonder dat weefselverwondingen optreden.

HOOFDSTUK 4 : WIT LICHT EFFECT OP DE ETHYLEEN-BIOSYNTHESE BIJ INTACTE GROENE BONEKIEM-PLANTEN

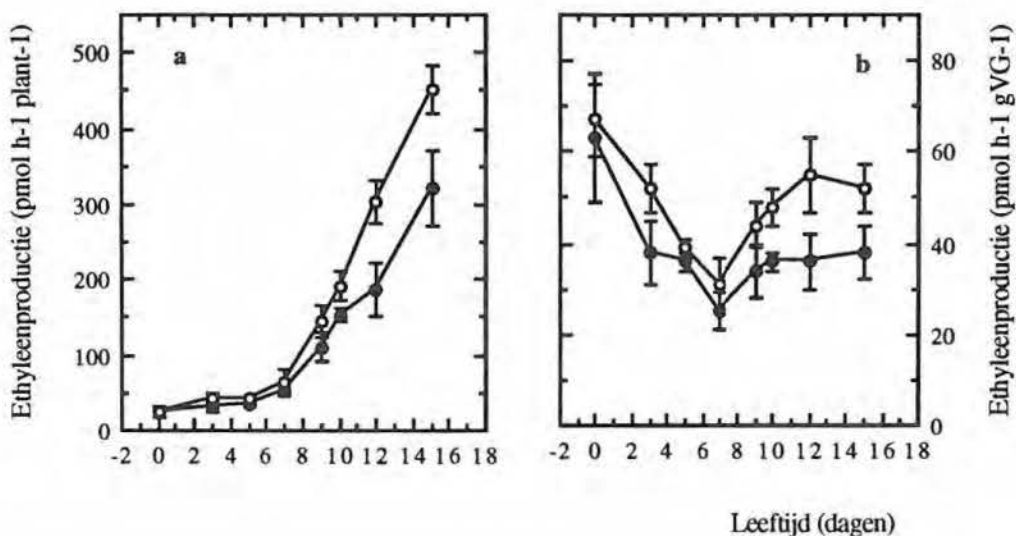
4.1. Effect van wit licht op ethyleenproductie en CO₂ gaswisseling in functie van de ontwikkelingstoestand

De ethyleenproductie van geëtiolerde bonekiemplanten is gevoelig voor een rood licht behandeling tijdens een goed afgelijnde periode in de ontwikkeling van de kiemplant. Meer bepaald is de rood licht gevoeligheid van de ethyleenproductie beperkt tot leeftijden tussen 7 en 10 dagen (Vangronsveld, 1990). Daarom gingen wij na of ook bij groene bonekiemplanten een leeftijdsafhankelijkheid van de ethyleenrespons bestaat voor W licht.

Wij volgden het verloop van de ethyleenproductie vanaf de zaadkieming totdat de groene zaailingen 15 dagen oud waren. De ethyleenproductie blijft constant tot de ouderdom van 7 dagen als zij per plant (zaad) wordt uitgedrukt (fig. 4.1a). Tussen dag 7 en 15 wordt er per plant steeds meer ethyleen vrijgezet. Reeds bij 3 dagen oude kiemplanten stimuleert licht de ethyleenproductie. Deze lichtstimulering wordt echter pas significant vanaf de leeftijd van 10 dagen. Per vers gewicht daalt de ethyleenproductie van zaden naar 7 dagen oude planten toe (fig. 4.1b). Vervolgens kunnen we een stijging waarnemen en vanaf ongeveer 10 dagen wordt een constant niveau bereikt. Ook hier treedt er een significante W licht geïnduceerde stimulering van de ethyleenproductie op als de kiemplanten 10 tot 15 dagen oud zijn.

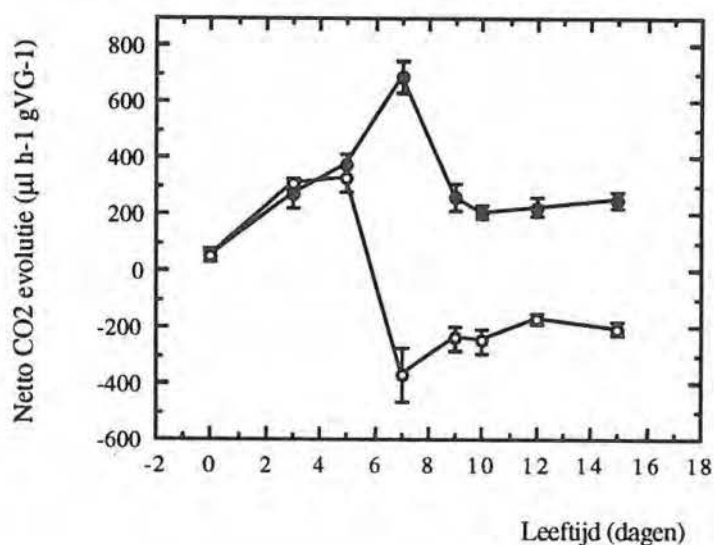
Het positieve lichteffect bedraagt tussen 30 en 50%. Verdere experimenten worden daarom uitgevoerd met 10 en 13 dagen oude bonekiemplanten.

Fig. 4.1 : Ethyleenproductie (a. $\text{pmol h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$ / b. $\text{pmol h}^{-1} \text{ g VG}^{-1}$) gedurende de ontwikkeling van intacte groene bonekiemplanten na 6h donker (●) of W licht (○, PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Gegeven zijn gemiddelden en SD van tenminste 6 metingen.



De netto CO₂ evolutie vertoont een stijging gedurende de eerste 5 tot 7 dagen vanaf de kieming (fig. 4.2). Tussen dag 7 en 9 daalt de CO₂ productie in het donker om vervolgens constant te blijven. W licht heeft geen effect op de CO₂ productie gedurende de eerste 5 dagen. Vanaf dag 7 treedt er in licht netto fotosynthese op. Het ontplooiën van de primaire blaadjes vangt aan rond de leeftijd van 7 dagen en 10 dagen oude bonekiemplanten beschikken over volledig geëxpandeerde en functionele primaire bladeren.

Fig. 4.2 : Netto CO₂ evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) gedurende de ontwikkeling van intacte groene bonekiemplanten na 6h donker (●) of W licht (○, PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Gegeven zijn gemiddelden en SD van tenminste 6 metingen.



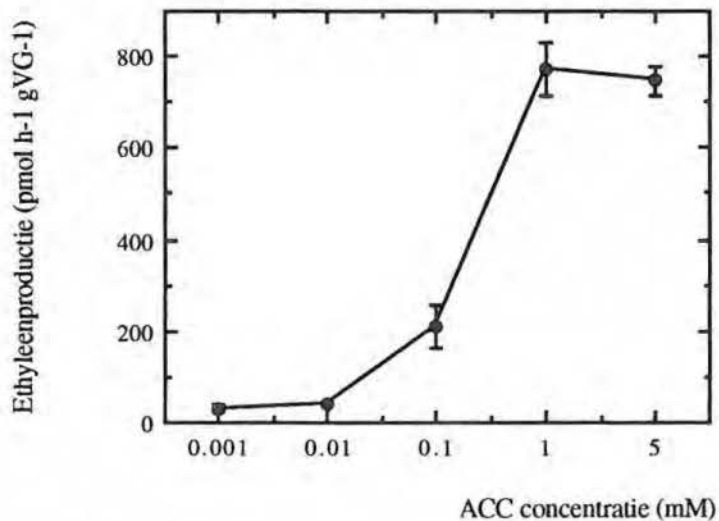
4.2. Effect van wit licht op de ethyleenproductie uit exogeen ACC en op de endogene ACC en M-ACC gehalten

Bepaling van de ethyleenvrijzetting uit exogeen toegediend ACC enerzijds en endogene ACC en M-ACC doseringen anderzijds worden uitgevoerd om te achterhalen welke stappen van de ethyleenbiosyntheseweg onderhevig zijn aan de lichtprikkel.

4.2.1. Effect van wit licht op de ethyleenproductie uit exogeen ACC

Vooreerst wordt het effect van de toediening van 500 μl van verschillende ACC concentraties aan de primaire bladeren nagegaan bij 10 dagen oude planten. ACC oplossingen van 0.001 mM tot 5 mM worden uitgetest. Na 6h donker wordt de ethyleenproductie van de behandelde planten gemeten (fig. 4.3).

Fig. 4.3 : Ethyleenproductie ($\text{pmol h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) na 6h donker van 10 dagen oude intacte groene bonekiemplanten na toediening van verschillende concentraties ACC aan de primaire bladeren. Gegeven zijn gemiddelden en SD van 4 metingen.



Vanaf een 0.1 mM ACC toediening wordt een verhoging van de ethyleenproductie waargenomen. Bij 1 mM ACC blijkt verzadiging op te treden. Gebruik makende van deze concentratie wordt nagegaan of W licht een effect heeft op de omzetting van exogeen toegediend ACC.

Hiertoe wordt aan de primaire bladeren van 10 dagen oude intacte bonekiemplanten 500 µl van een 1 mM ACC oplossing toegediend. Het verloop van de ethyleenproductie wordt van 4 tot 9h na ACC toediening gevolgd (fig. 4.4). De planten produceren ongeveer 20 maal meer ethyleen 4h na ACC behandeling. Op dit tijdstip heeft W licht geen effect op de ACC-afhankelijke ethyleenproductie. De verdere evolutie van de ACC-geïnduceerde ethyleenproductie in licht en donker toont echter aan dat deze waarden steeds meer van elkaar afwijken in functie van de tijd. In licht neemt de ACC-geïnduceerde ethyleenproductie geleidelijk toe terwijl na 6h donker een geringe daling optreedt. Dit resulteert na 9h W licht in een stimulerend effect van 60 % op de ACC-afhankelijke ethyleenproductie.

4.2.2. Effect van wit licht op de endogene ACC en M-ACC gehalten

De ethyleenproductie wordt steeds bepaald bij intacte planten. Daarom doseerden wij de gehalten aan ACC en M-ACC ook in volledige kiemplanten (10 dagen). De evolutie van deze gehalten werd gevolgd gedurende 22h donker of W licht (fig. 4.5). Omwille van de overzichtelijkheid wordt in fig. 4.5 geen spreiding weergegeven; significante effecten worden vermeld. In donkeromstandigheden blijft het ACC gehalte op een vrijwel constant niveau. De W licht behandeling, daarentegen, verhoogt het gehalte aan vrij ACC significant vanaf 6 uren (fig. 4.5a). Dit stimulerend effect wordt des te meer uitgesproken naarmate de planten langer bestraald worden. Het M-ACC gehalte kent een nogal grillig verloop maar wordt niet betekenisvol gewijzigd

door licht (fig. 4.5b). Het totale ACC gehalte is enkel na 22h belichting significant hoger dan de donkerwaarde (fig. 4.5c).

Fig. 4.4 : Tijdsverloop van de ACC-afhankelijke ethyleenproductie ($\text{pmol h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 10 dagen oude intacte groene bonekiemplanten in donker ($\bullet$) of W licht ($\circ$, PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Gegeven zijn gemiddelden en SD van tenminste 6 metingen. Tijdstip 0 geeft de ethyleenproductie van de donkercontrole weer vooraleer ACC wordt toegediend.

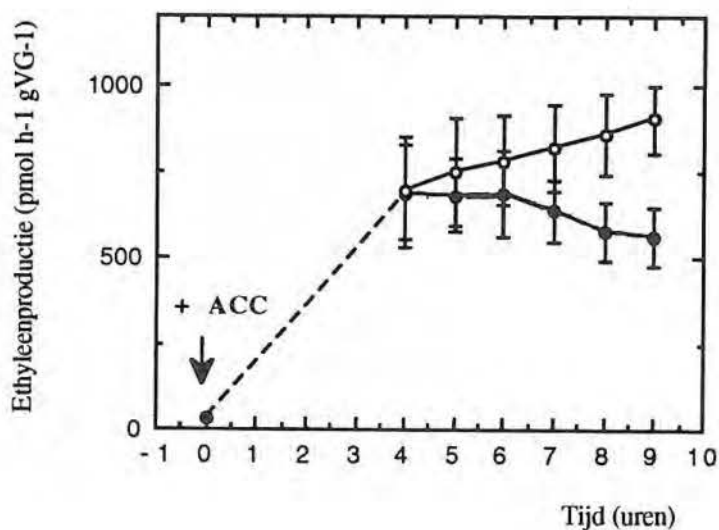
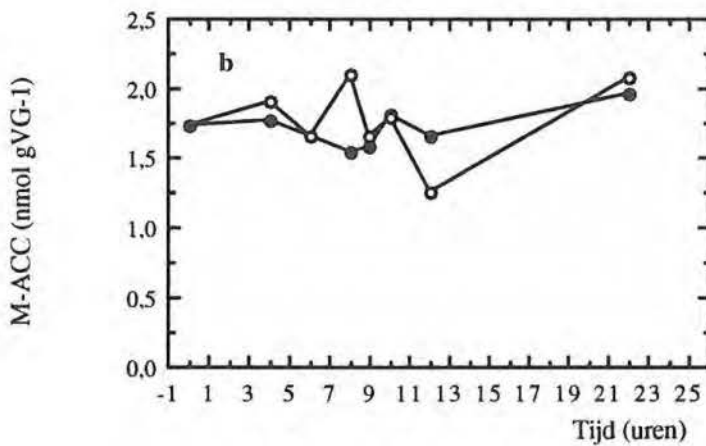
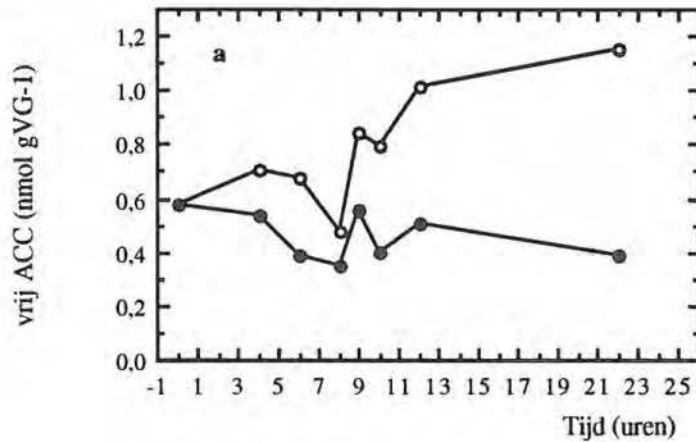
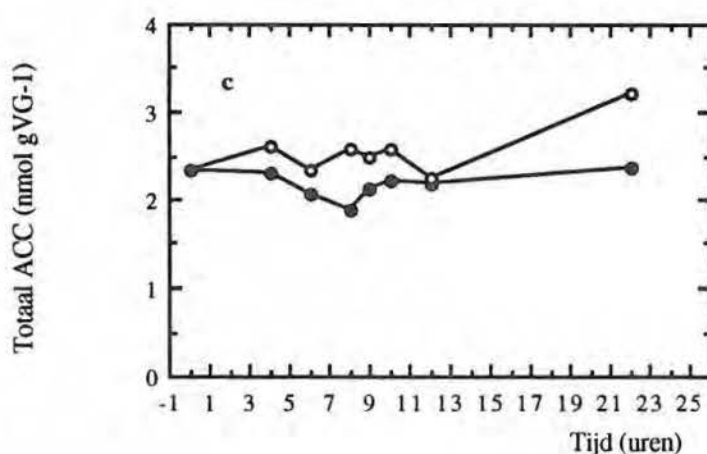


Fig. 4.5 : Gehalte (nmol gVG⁻¹) aan a) vrij ACC, b) M-ACC en c) totaal ACC van 10 dagen oude groene bonekiemplanten in donker (●) of W licht (○, PAR : 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 3 metingen.





4.3. Bespreking

In het vorige hoofdstuk hebben wij aangetoond dat W licht de ethyleenproductiesnelheid bij verschillende plantesoorten verhoogt. Wij onderzochten deze W licht respons van ethyleen bij boon in functie van de ontwikkeling bij de groene kiemplant. Vanaf tien dagen na zaai treedt er een duidelijke stimulering van de ethyleenproductie op na W licht behandeling (fig. 4.1). Dit positieve lichteffect op de ethyleenproductie valt samen met de ontwikkeling van de fotosynthetische capaciteit van de planten (fig. 4.2).

De ethyleenbiosynthese kan op verschillende niveau's beïnvloed worden : wij spitsten onze aandacht toe op de drie belangrijkste stappen volgend na S-adenosylmethionine (SAM) :

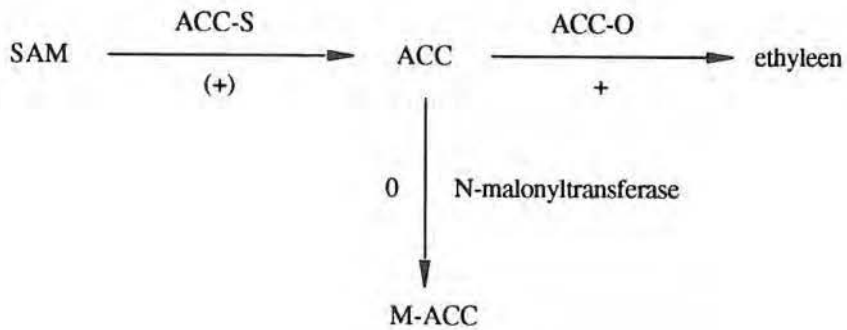
1. de synthese van ACC (ACC-S, volgens vele auteurs het "sleutelenzym" in de ethyleenbiosynthese),

2. de omzetting van ACC tot ethyleen, die gekatalyseerd kan worden door ACC-O,
3. de malonylering van ACC door het enzym N-malonyltransferase waardoor vrij ACC wordt gebonden en bijgevolg aan de omzetting tot ethyleen wordt onttrokken.

W licht behandeling verhoogt de vrije ACC inhoud (fig. 4.5a). Dit stimulerend effect wordt des te meer uitgesproken naarmate de planten langer worden bestraald. De ACC-afhankelijke ethyleenproductie wordt eveneens door licht bevorderd (fig. 4.4). Het M-ACC gehalte wordt niet gewijzigd door licht (fig. 4.5b). Het totale ACC gehalte is hoger dan de donkerwaarde; dit effect is enkel na 22h belichting significant (fig. 4.5c).

De lichtstimulering van de ethyleenproductie is dus het resultaat van een toegenomen ACC synthese en een verhoogde ACC conversie naar ethyleen (fig. 4.6). Het is niet duidelijk of de toegenomen ACC synthese een gevolg is van een stimulerend effect van licht op de genen die coderen voor ACC-S, of op de activiteit van dit enzyme. Ook valt niet uit te maken of, en zo ja hoe, deze beide mogelijkheden feedback effecten zijn van de verhoogde omzetting van ACC naar ethyleen. De omzetting van ACC naar ethyleen kan door ACC-O worden gekatalyseerd, maar kan ook chemisch gebeuren (Apelbaum en med. 1981a en b, Legge en med. 1982, McRae en med. 1982, Van Genechten 1985). Op de mogelijke invloed van licht op een van deze reactiemechanismen komen wij later terug. De malonylering van ACC wordt bij groene boneplanten niet door W licht beïnvloed (fig. 4.5b). Yang en Hoffman (1984) suggereren nochtans een regulatie van de ethyleenbiosynthese via malonylering van vrij ACC. Lichtgestimuleerde malonylering, resulterend in een verlaagd ACC gehalte en een bijgevolg lagere ethyleenproductie werd aangetoond bij geëtioleerde tarwe (Jiao en med. 1987) en boon (Vangronsveld 1990). In beide gevallen is echter duidelijk dat het om een fytochroom gereguleerd verschijnsel gaat.

Fig. 4.6 : Door wit licht beïnvloede stappen in de ethyleenbiosynthese van groene bonekiemplanten.



In de volgende twee hoofdstukken zullen wij bespreken in hoeverre de fotosynthese een rol speelt in de door W licht gestimuleerde ethyleensynthese.

HOOFDSTUK 5 : RELATIE TUSSEN FOTOSYNTHESE EN WIT LICHT GESTIMULEERDE ETHYLEENPRODUCTIE BIJ INTACTE GROENE BONEKIEMPLANTEN : MOGELIJKE ROL VAN VRIJE ZUURSTOFRADICALEN

5.1. Inleiding

De stijging van de ethyleenproductie valt samen met een stijging van de fotosynthetische activiteit van de planten (zie 3.1.1, 3.1.2 en 4.1). De vraag ligt dan ook voor de hand in hoeverre de fotosynthese een rol speelt in de door W licht gestimuleerde ethyleenproductie.

Er bestaan reeds goede argumenten uit de literatuur om aan te nemen dat de ethyleenproductie bij groene planten afhankelijk is van de fotosynthese :

1. De fotosynthese capaciteit evenals de ethyleenproductie van groene planten stijgt in functie van de lichtintensiteit (De Proft 1983, Veroustraete 1983, tabellen 3.1 en 3.2).
2. Opgroening van geëtioleerde bonekiemplanten in W licht leidt tot een stijging van de ethyleenproductie in functie van chlorofylaccumulatie en chloroplastontwikkeling (De Proft 1983, Van Genechten 1985).
3. Toediening van Norflurazon, een inhibitor van de carotenoidensynthese in planten, veroorzaakt bladverbleking. Het ontbreken van de beschermende carotenoiden heeft immers als gevolg dat chlorofyl foto-oxidatie ondergaat en de chloroplast zijn fotosynthese activiteit grotendeels verliest. Op deze wijze kan men planten in licht laten opgroeien zonder dat er fotosynthese plaatsgrijpt. Vergelijking van de ethyleenproductie in licht tussen normaal fotosynthetiserende planten en met Norflurazon behandelde planten toont een inhibitie van de ethyleenproductie bij laatstgenoemde (De Proft 1983, Van Genechten 1985).

4. DCMU, een remmer van het electronentransport van FS 2 naar FS 1 en dus ook van het fotosyntheseproces zelf, veroorzaakt een verlaging van de ethyleenproductie (De Greef en med. 1980, Veroustraete en med. 1982, Van Genechten 1985).

Theoretisch kan de verhoogde ethyleensynthese in licht onrechtstreeks veroorzaakt worden door de fotosynthese via ATP- en substraatvoorziening. Literatuurgegevens wijzen op een meer rechtstreekse mogelijke betrokkenheid van de fotosynthese bij de ethyleenrespons op licht. Verschillende auteurs suggereren dat vrije zuurstofradicalen participeren bij de omzetting van ACC naar ethyleen (Apelbaum en med. 1981a en b, Legge en med. 1982, McRae en med. 1982, Van Genechten 1985). Belangrijk hierbij is te vermelden dat deze onderzoekers zelden intact plantemateriaal gebruiken. Is ook in intacte planten een rol voor vrije zuurstofradicalen weggelegd bij het veroorzaken van het lichtstimulerend effect op de ethyleenproductie ?

In dit hoofdstuk bestuderen wij de mogelijke betrokkenheid van fotosynthetisch geproduceerde vrije zuurstofradicalen bij de ethyleenproductie. Deze radicalen kunnen de omzetting van ACC naar ethyleen stimuleren en zo (mede)verantwoordelijk zijn voor het waargenomen lichteffect. Enerzijds worden effecten van zuurstofradicaalbindende chemicaliën op de ethyleenproductie onderzocht en anderzijds worden experimenten uitgevoerd met een zuurstofradicaalgenererende verbinding.

5.2. Effect van de zuurstofradicaalbindende chemicaliën spermine, ascorbinezuur, n-propylgallaat en Na-benzoaat op de ethyleenproductie in licht

In de veronderstelling dat vrije zuurstofradicalen betrokken zijn bij de lichtgestimuleerde ethyleensynthese verwachten wij dat het toedienen van radicaalbindende chemicaliën de ethyleenproductie in licht zal remmen. Wij kozen voor een exogene toediening enerzijds van spermine en ascorbinezuur, 2 endogene potentiële radicaalovende verbindingen in planten, en anderzijds van n-propylgallaat en Na-benzoaat, 2 kunstmatige radicaalbindende chemicaliën.

Afhankelijk van de omstandigheden (eventuele variatie in kweekcondities) produceren bonekiemplanten verschillende hoeveelheden ethyleen (vergelijk tabel 5.1 tot 5.4). Daarom kan een interpretatie van de toegepaste behandeling enkel gebeuren als in elk experiment opnieuw de ethyleenproductie van controleplanten wordt gemeten.

Exogeen toegediende polyaminen inhiberen de ethyleenproductie in petalen van *Tradescantia* (Suttle 1981), segmenten en protoplasten van appels en in segmenten van bladeren (Apelbaum en med. 1981c). Drolet en med. (1986) onderzochten of deze inhibitie van de ethyleenproductie door polyaminen in verband kan gebracht worden met het feit dat deze verbindingen beschikken over radicaalbindende eigenschappen. Zij toonden aan dat niet alleen $O_2^{\cdot-}$ radicalen maar ook de sterk reactieve $OH^{\cdot}$ radicalen "gedoofd" worden door polyaminen. De efficiëntie van hun radicaalbindende eigenschappen is gecorreleerd met het aantal aminogroepen aanwezig op de molecule. Zo blijkt spermine (4 aminogroepen) de grootste dovende eigenschappen te hebben.

Wij plaatsten 10 dagen oude bonekiemplanten met hun wortels in water (controleplanten) of in een 1 mM oplossing van spermine. Na een incubatieperiode van 6h in W licht werd de ethyleenvrijzetting gemeten (tabel 5.1).

Wij vonden geen verschil in ethyleenproductie terug tussen controle en met spermine behandelde planten. Om de wortels als mogelijke barrière voor de opname van spermine uit te schakelen, herhaalden wij dit experiment met onwortelde boneplanten. Daartoe werden de kiemplantjes na het afsnijden van de wortels met hun hypocotyl in de oplossingen geplaatst. Bovendien werd de ethyleenvrijzetting bepaald na een langere incubatie van de planten in de oplossingen, nl. na 22h W licht. Deze behandeling resulteerde evenmin in enig effect van spermine op de ethyleenproductie.

Tabel 5.1 : Ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ gVG}^{-1}$) van 10 dagen oude groene bonekiemplanten na 6h incubatie met hun wortels en na 22h incubatie met hun hypocotyl in water (kontroles) of 1 mM spermine (S) in W licht (WL, PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Gegeven zijn gemiddelden en SD van tenminste 6 metingen.

Behandeling	water	1 mM S
6h WL (wortels)	1117 ± 95	1136 ± 130
22h WL (hypocotyl)	1191 ± 188	1126 ± 201

Ascorbinezuur, een welbekend anti-oxidans wordt door Nandi en Chatterjee (1987) geprezen om zijn uitstekende $\text{O}_2^{\cdot-}$ radicaal dovende capaciteit in dierlijk weefsel. In plantaardig weefsel wordt vooral aandacht besteed aan de ascorbaatinhoud van chloroplasten die tesamen met glutathion en de enzymen superoxide dismutase, ascorbaatperoxidase, dehydroascorbaatreductase en glutathionreductase de vorming van de schadelijke $\text{O}_2^{\cdot-}$ radicalen (ontstaan ten gevolge van de fotoreductie van O_2) en H_2O_2 (ontstaan door dismutatie van $\text{O}_2^{\cdot-}$) neutraliseren (Gillham en Dodge 1986, 1987, Nakano en Edwards 1987).

Wij hebben bonekiemplanten gedurende 22h met hun hypocotyl in water of in een 1 mM ascorbinezuuroplossing geplaatst in lichtomstandigheden (tabel 5.2). We konden geen invloed van de toegepaste ascorbinezuurconcentratie op de ethyleensynthese vaststellen.

Tabel 5.2 : Ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ gVG}^{-1}$) van 10 dagen oude groene bonekiemplanten na 22h incubatie met hun hypocotyl in water (kontroles) of 1 mM ascorbinezuur (A) in W licht (WL, PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Gegeven zijn gemiddelden en SD van tenminste 8 metingen.

Behandeling	water	1 mM A
22h WL	865 ± 91	870 ± 91

In een chemisch systeem kon een binding worden aangetoond tussen OH-radicalen en benzoëzuur (Neta en Dorfman 1968), terwijl voor n-propylgallaat een reactie met $\text{O}_2^{\bullet-}$ werd aangetoond (McRae en med. 1982). Propylgallaat (tabel 5.3) en Na-benzoaat (tabel 5.4) hebben geen effect op de ethyleenproductie in licht na 22h incubatie van de boneplanten in een 1mM oplossing.

Tabel 5.3 : Ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ gVG}^{-1}$) van 10 dagen oude groene bonekiemplanten na 22h incubatie met hun hypocotyl in water (kontroles) of 1 mM propylgallaat (PG) in W licht (WL, PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Gegeven zijn gemiddelden en SD van tenminste 7 metingen.

Behandeling	water	1 mM PG
22h WL	1363 ± 325	1404 ± 424

Tabel 5.4 : Ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{ gVG}^{-1}$) van 10 dagen oude groene bonekiemplanten na 22h incubatie met hun hypocotyl in water (kontroles) of 1 mM Na-Benzoaat (B) in W licht (WL, PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Gegeven zijn gemiddelden en SD van 5 metingen.

Behandeling	water	1 mM B
22h WL	1017 ± 113	968 ± 152

Samenvattend kan uit deze resultaten worden afgeleid dat geen van de uitgeteste radicaalbindende chemicaliën een effect heeft op de ethyleenproductie bij belichte planten. Een moeilijke opname resp. transport in onze testplanten zou hiervoor een mogelijke verklaring kunnen zijn. Bovendien kan een verbinding die *in vitro* over goede radicaalbindende eigenschappen beschikt slechts efficiënt zijn *in vivo* als deze verbinding op de juiste intracellulaire plaats geraakt op het juiste ogenblik en in de juiste concentratie (Slater 1979).

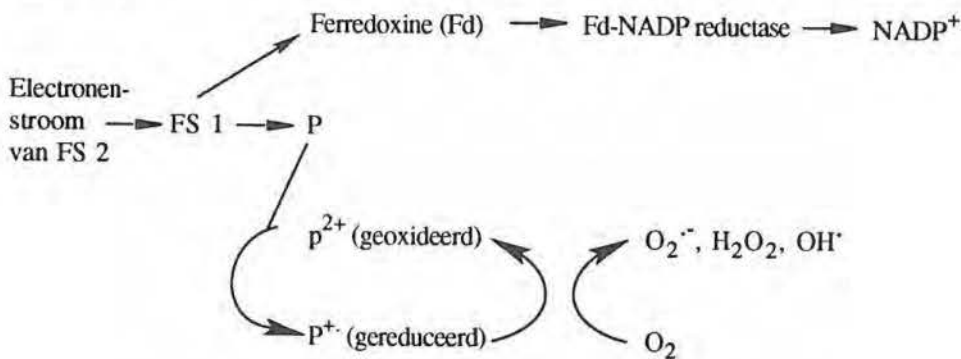
Een tweede mogelijkheid om de betrokkenheid van vrije zuurstofradicalen bij de ethyleenproductie te onderzoeken, is het toedienen van zuurstofradicaal-genererende verbindingen. Hiervoor hebben wij paraquat (= methyl viologen) aangewend.

5.3. Effect van de zuurstofradicaalgenererende verbinding paraquat op de ethyleenbiosynthese in licht en duisternis

Paraquat, ook gekend als methyl viologen, (1,1'-dimethyl-4,4'-dipyridylum dichloride) is een FS 1-acceptor herbicide. Het divalent paraquat kation (paraquat²⁺) accepteert een electron van FS 1 waarbij het monokationische

paraquat radicaal ($\text{paraquat}^{\cdot+}$) wordt gevormd. Dit radicaal is onderhevig aan een vlugge oxidatie met moleculaire zuurstof waarbij paraquat^{2+} en superoxide anion radicalen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ontstaan. De paraquatmolecule kan aldus een volgende reductie-oxidatie cyclus ondergaan. Naast het eerstgevormde superoxide anion kunnen ook de actieve zuurstofspecies H_2O_2 en $\text{OH}^{\cdot}$ gegenereerd worden (fig. 5.1) (Farrington en med. 1973, Dodge 1975, Böger and Kunert 1978, Nanni en med. 1981, Halliwell 1984, Babbs en med. 1989).

Fig. 5.1 : Werkingsmechanisme van paraquat (P) in de chloroplast (naar Dodge 1975).



Het is mogelijk om met intacte planten te werken daar het herbicide gemakkelijk wordt opgenomen via de wortels en getransporteerd wordt naar de bladeren (Halliwell 1984). Bovendien is de chloroplastenveloppe permeabel voor de paraquatmolecule zodat de bovenvermelde reductie-oxidatie cyclus (fig. 5.1) kan optreden en vrije zuurstofradicalen kunnen gevormd worden.

Wij vermoeden dat het toedienen van paraquat aan de bonekiemplanten ons zal helpen om een verklaring te vinden voor de lichtgestimuleerde ethyleenproductie omwille van de volgende redenen (zie bovenvermelde ref.) :

1. de fytotoxische effecten van paraquat worden enkel waargenomen in aanwezigheid van licht en O_2 ,
2. de primaire werking van paraquat situeert zich op chloroplastniveau.

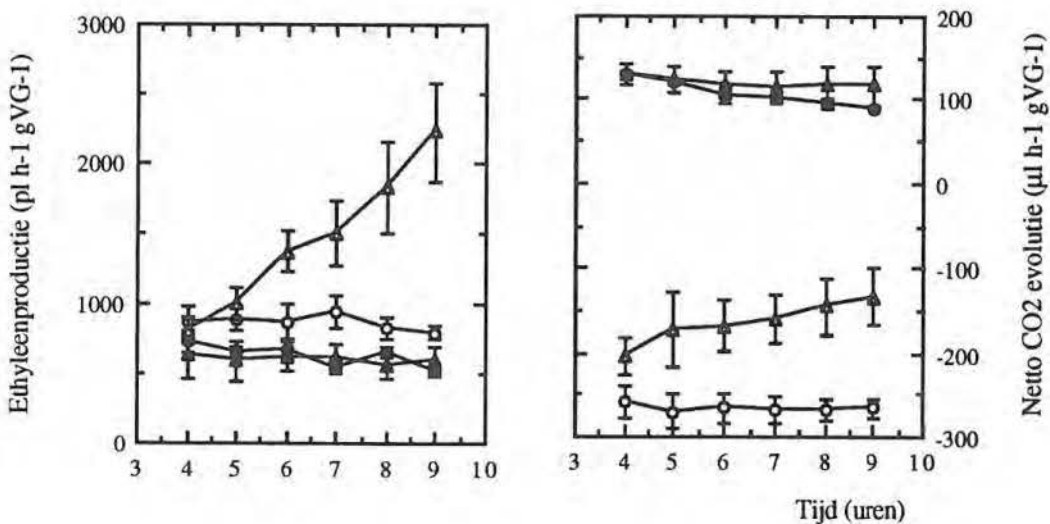
5.3.1. Effect van paraquat op ethyleenproductie en netto CO_2 evolutie

Het effect van paraquat op de ethyleenproductie van 10 dagen oude intacte groene bonekiemplanten wordt gevolgd gedurende 9h licht of donker (fig. 5.2). Bij de aanvang van het experiment worden de planten met hun wortels in water (kontroles) of in de paraquatoplossing (1 mM) geplaatst. Na een initiële equilibratieperiode van 4 uren (zie 2.5.1) worden CO_2 en ethyleen gedurende 5h om het uur gemeten. In het donker blijven ethyleenvrijzetting en netto CO_2 evolutie vrijwel constant en we kunnen geen verschil waarnemen tussen controle en paraquat behandelde planten. Zoals verwacht wordt de ethyleenproductie bij de controleplanten gestimuleerd door licht. De paraquatbehandeling verhoogt de ethyleenproductie na 5 à 6h licht t.o.v. de controles. De netto CO_2 assimilatie wordt in functie van de tijd in toenemende mate geïnhibeerd door paraquat.

De vraag kan gesteld worden in hoeverre het waargenomen verschil in het effect van paraquat op de ethyleenproductie in licht en donker al dan niet te wijten is aan een mogelijke invloed van licht op de opname van het exogeen toegediend herbicide. Dit werd nagegaan door ethyleen en CO_2 te meten bij bonekiemplanten met hun wortels geplaatst in een 1 mM paraquatoplossing na 6h WL al dan niet voorafgegaan door een donkerpre-incubatieperiode van

16h (tabel 5.5). Uit de resultaten blijkt dat deze donkerpre-incubatieperiode een duidelijke invloed heeft op de mate waarin het paraquateffect zich manifesteert in de daaropvolgende lichtperiode van 6h. Het stimulerend effect van paraquat op de ethyleenproductie is verdubbeld en de netto fotosynthese is sterker geïnhibeed. Bovendien vertonen de primaire bladeren een lichte uitbleking ter hoogte van de nerven : de fytotoxische effecten van paraquat worden zichtbaar. Het waargenomen verschil in het effect van paraquat op de ethyleenproductie in licht en donker is dus niet te wijten aan een verschil in opnamecapaciteit in licht en donker.

Fig. 5.2 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) en netto CO_2 evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 10 dagen oude intacte groene bonekiemplanten met hun wortels geïncubeerd in water (kontroles; ●, ○) of in 1 mM paraquat (▲, Δ). Gegeven zijn gemiddelden en SD van 5 metingen. Gesloten symbolen : donker; open symbolen : W licht (PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



Tabel 5.5 : Ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) en netto CO_2 evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 10 dagen oude bonekiemplanten met hun wortels geplaatst in water (kontroles) of 1 mM paraquat (P) na 6h W licht (WL, PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) al dan niet voorafgegaan door een donkerpre-incubatieperiode (D) van 16h. Gegeven zijn gemiddelden en SD (aantal herhalingen).

Behandeling		Ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$)	Netto CO_2 evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$)
6h WL	kontrole	973 ± 59 (8)	$- 258 \pm 27$ (10)
	1 mM P	1485 ± 306 (14)	$- 164 \pm 70$ (11)
16h D/ 6h WL	kontrole	874 ± 75 (3)	$- 282 \pm 48$ (4)
	1 mM P	3005 ± 272 (5)	$- 112 \pm 21$ (4)

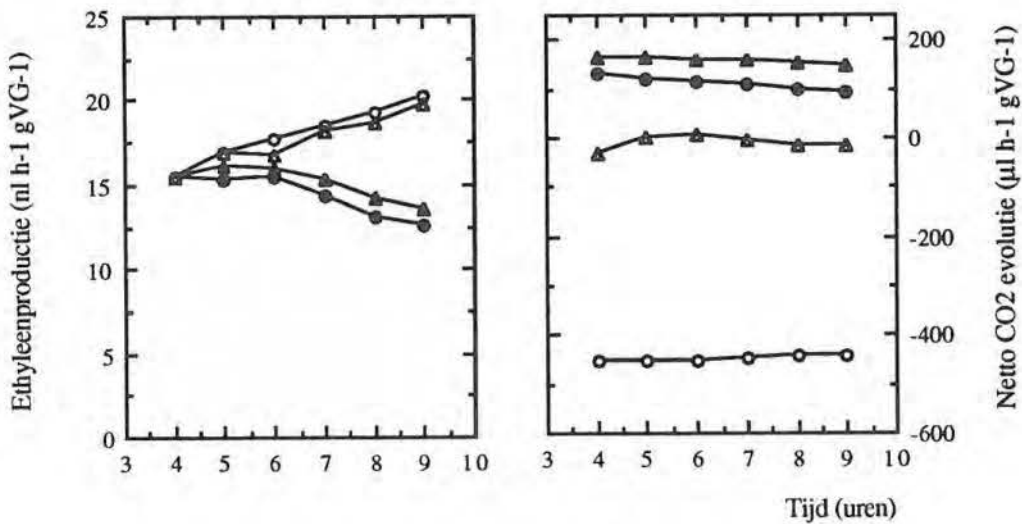
Paraquat heeft dus hetzelfde kwalitatief effect op de ethyleenproductie als wit licht. Om dit effect te lokaliseren in de ethyleenbiosyntheseweg, onderzoeken wij de invloed van paraquat op :

1. de omzetting van exogeen ACC,
2. de wijzigingen in de endogene gehalten van ACC en M-ACC.

5.3.2. Effect van paraquat op de ethyleenproductie uit exogeen ACC en op de netto CO_2 evolutie

De kinetische metingen worden onder dezelfde omstandigheden uitgevoerd als bij 5.3.1. Bij het begin van de equilibratieperiode wordt echter ACC (1mM) toegediend via de bladeren (fig. 5.3). De netto CO_2 assimilatie wordt opnieuw geïnhibeerd bij paraquat behandelde planten, wat wijst op de aanwezigheid van het herbicide in de chloroplasten. We kunnen echter geen effect van paraquat vaststellen op de ACC-afhankelijke ethyleenproductie noch in donker noch in licht.

Fig. 5.3 : Tijdsverloop van de ACC-afhankelijke ethyleenproductie ($\text{nl h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) en netto CO_2 evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 10 dagen oude intacte groene bonekiemplanten met hun wortels geïncubeerd in water (kontroles; ●, ○) of in 1 mM paraquat (▲, △). Gegeven zijn gemiddelden van 8 metingen. Gesloten symbolen : donker ; open symbolen : W licht (PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



5.3.3. Effect van paraquat op de endogene ACC en M-ACC gehalten

We vergelijken de endogene ACC inhoud van volledige bonekiemplanten na 9h incubatie in water (kontroles) of in een 1 mM paraquatoplossing (tabel 5.6). In donker kunnen we geen verschil waarnemen tussen controle en paraquat behandelde planten. In licht beschikken de paraquat behandelde planten over meer ACC dan de controles. Dit is volledig te wijten aan een

stijging van het gehalte aan vrij ACC terwijl de M-ACC concentratie constant blijft.

Tabel 5.6 : Endogene ACC inhoud (nmol gVG^{-1}) van volledige 10 dagen oude groene bonekiemplanten geïncubeerd in water (kontroles) of 1 mM paraquat (P) na 9h donker (D) of W licht (WL, PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Gegeven zijn gemiddelden en SD van 3 herhalingen.

Behandeling		ACC inhoud (nmol gVG^{-1})		
		totaal ACC	M-ACC	vrij ACC
9h D	kontrole	$1,76 \pm 0,06$	$1,57 \pm 0,08$	$0,19 \pm 0,05$
	P	$1,65 \pm 0,16$	$1,43 \pm 0,15$	$0,22 \pm 0,04$
9h WL	kontrole	$1,52 \pm 0,17$	$1,16 \pm 0,11$	$0,36 \pm 0,10$
	P	$2,77 \pm 1,08$	$1,11 \pm 0,45$	$1,67 \pm 0,63$

5.4. Bespreking

Verschillende auteurs suggereren dat vrije zuurstofradicalen participeren bij de omzetting van ACC naar ethyleen (Apelbaum en med. 1981a en b, Legge en med. 1982, McRae en med. 1982, Van Genechten 1985). Daarom kunnen we de hypothese formuleren dat het stimulerend effect van W licht op de ethyleenproductie, althans gedeeltelijk, te wijten is aan de werking van vrije zuurstofradicalen gevormd tijdens het fotosynthetisch electronentransport. Deze hypothese werd nagegaan door de effecten van enerzijds zuurstofradicaalbindende chemicaliën en anderzijds een zuurstofradicaalgenererende verbinding op de ethyleenproductie te onderzoeken. Afhankelijk van de omstandigheden (eventuele variatie in kweekcondities) produceren bonekiem-

planten verschillende hoeveelheden ethyleen. Daarom meten wij in elk experiment opnieuw de ethyleenproductie van controleplanten.

De experimenten waarbij de bonekiemplanten gedurende 22h met hun hypocotyl worden geïncubeerd in 1 mM oplossingen van spermine (tabel 5.1), ascorbinezuur (tabel 5.2), n-propylgallaat (tabel 5.3) en Na-benzoaat (tabel 5.4) tonen geen effect van deze radicaalbindende chemicaliën op de ethyleensynthese in licht. Deze verbindingen hebben eveneens geen effect op het CO₂ metabolisme van de planten (resultaten niet vermeld). Suttle (1981), daarentegen, stelde vast dat exogeen toegediend spermine de ethyleenproductie inhibeert in petalen van *Tradescantia* terwijl Apfelbaum en med. (1981c) een geremde ethyleenvrijzetting o.i.v. spermine aantoonde in segmenten en protoplasten van appels alsook in bladsegmenten van bonen en tabak. De ethyleenproductie van bloemen (Baker en med. 1977) en vruchtwefselsegmenten (Baker en med. 1978) wordt geïnhibeerd door Na-benzoaat en n-propylgallaat. Deze laatste verbinding inhibeert eveneens de ACC-afhankelijke ethyleensynthese in segmenten en protoplasten van *Ipomoea* bloemen (Konze en med. 1980) en in microsomale membranen van geëtioloerde erwtekiemplanten (McRae en med. 1982). Al deze auteurs bestudeerden de ethyleenproductie bij *in vitro* meetsystemen. Een verbinding, die *in vitro* over goede radicaalbindende eigenschappen beschikt, kan slechts efficiënt zijn *in vivo* als deze verbinding op de juiste intracellulaire plaats geraakt op het juiste moment en in de juiste concentratie (Slater 1979).

Paraquat (methyl viologen) is een herbicide dat de productie van vrije zuurstofradicalen stimuleert via een reactie tussen moleculaire zuurstof en gereduceerde paraquat radicalen (fig. 5.1). Dit herbicide wordt vlug opgenomen via de wortels en zijn werking is specifiek voor FS 1 (Farrington en med. 1973, Dodge 1975, Böger and Kunert 1978, Nanni en med. 1981, Halliwell 1984, Babbs en med. 1989). Het werkingsmechanisme van

paraquat is gecorreleerd met de fotosynthese, licht en O_2 . Daarom onderzochten wij het effect van dit vrije zuurstofradicaalgenererende herbicide op de ethyleenproductie van intacte groene *Phaseolus vulgaris* kiemplanten. Zoals verwacht heeft paraquat in donker geen effect op de ethyleenproductie noch op de netto CO_2 evolutie (fig. 5.2). In licht, daarentegen, wordt een sterke toename van de ethyleensynthese samen met een inhibitie van de CO_2 assimilatie waargenomen 5 à 6h na toediening van paraquat (fig. 5.2). Het waargenomen verschil in het effect van paraquat op de ethyleenproductie in licht en donker is niet te wijten aan het feit dat paraquat in het donker niet wordt opgenomen. Dit werd nagegaan door ethyleen en CO_2 te meten bij bonekiemplanten met hun wortels geplaatst in een 1 mM paraquatoplossing na 6h WL al dan niet voorafgegaan door een donkerpre-incubatieperiode van 16h (tabel 5.5). Uit de resultaten blijkt dat deze donkerpre-incubatieperiode een duidelijke invloed heeft op de mate waarin het paraquateffect zich manifesteert in de daaropvolgende lichtperiode van 6h. Het stimulerend effect van paraquat op de ethyleenproductie is verdubbeld en de netto fotosynthese is sterker geïnhibeerd. Bovendien vertonen de primaire bladeren een lichte uitbleking ter hoogte van de nerven : de fytotoxische effecten van paraquat worden zichtbaar. Zoals reeds vermeld in 3.4 bestaat er geen rechtstreeks verband tussen stomatale opening en ethyleenvrijstelling. Daarom menen wij dat het verschil in ethyleenproductie tussen licht en donker niet wordt veroorzaakt via een controle van het stomatale gedrag. Bovendien beschikken paraquat behandelde planten in licht over een ongeveer driemaal hogere stomatale weerstand dan controleplanten (resultaten niet vermeld) en toch zetten zij beduidend meer ethyleen vrij. Het effect van paraquat op de ethyleenproductie komt dus kwalitatief overeen met het effect van W licht. Om het paraquateffect in de ethyleenbiosyntheseweg te situeren, onderzochten wij de invloed van dit herbicide op de omzetting van exogeen ACC en op de wijzigingen in de endogene gehalten van ACC en M-ACC. De aanwezigheid van het herbicide in de chloroplasten wordt afgeleid uit de

inhibitie van de netto CO_2 assimilatie in licht. De omzetting van exogeen toegediend ACC wordt niet beïnvloed door de paraquatbehandeling noch in donker noch in licht (fig. 5.3). In het donker heeft paraquat geen effect op de endogene ACC inhoud (tabel 5.6). In licht verhoogt het de concentratie van totaal ACC; zij moet volledig worden toegeschreven aan een substantiële stijging in het vrije ACC gehalte terwijl de M-ACC concentratie constant blijft. Licht oefent dus een invloed uit op de ACC vorming en op de omzetting van ACC naar ethyleen (zie hoofdstuk 4); paraquat heeft enkel een effect op de synthese van ACC en niet op de omzetting van ACC naar ethyleen.

Deze resultaten bevestigen onze hypothese niet, waarbij - gesteund op de talrijke gegevens uit de literatuur, die aantonen dat de laatste stap van de ethyleensynthese door vrije zuurstofradicalen wordt bevorderd (zie hoger-vermelde referenties) - werd vooropgesteld dat fotosynthetisch geproduceerde zuurstofradicalen betrokken zouden zijn bij de lichtafhankelijke ethyleen-productie.

De beschreven resultaten pleiten wel voor de productie van stressethyleen onder invloed van paraquat. Hiervoor zijn er verschillende argumenten :

1. Paraquat induceert stress bij de boneplanten; na een belichting van 24h verwelken paraquat behandelde planten.
2. We kunnen een toename van de ACC vorming onder invloed van paraquat waarnemen (tabel 5.6); wellicht is dit te wijten aan een *de novo* synthese van het ACC-S. De verhoging van de ethyleenvrijstelling bij diverse vormen van stress wordt eveneens veroorzaakt door een stimulering van de *de novo* synthese van dit enzyme (Yu and Yang 1980).
3. Het primaire effect van paraquat is de remming van de fotosynthetische NADP^+ reductie. Dit effect wordt echter al vlug vergezeld door een aantasting van membranen zoals de tonoplast en de plasmalemma gevolgd door een afbraak van andere celstructuren (Böger and Kunert

1978). Stress geïnduceerde veranderingen in membraaneigenschappen zouden aanleiding kunnen geven aan een verhoging van de ethyleenproductie (Kacperska and Kubacka-Zebalska 1989).

Het geheel van deze proeven waarbij chemicaliën worden toegediend aan de bonekiemplanten bevestigt noch ontkent de mogelijke rol van fotosynthetisch geproduceerde vrije zuurstofradicalen bij de lichtgestimuleerde ethyleenproductie. Daarom streven wij een andere methodiek na om de mogelijke relatie fotosynthese - lichtgestimuleerde ethyleenproductie verder te bestuderen. Hierbij stellen wij voor enerzijds te werken met genetische mutanten die fotosynthetisch niet of minder actief zijn en anderzijds aparte ethyleenbepalingen uit te voeren van fotosynthetisch actieve en inactieve organen bij intacte groene planten.

HOOFDSTUK 6 : DOOR WIT LICHT GESTIMULEERDE ETHYLEENPRODUCTIE IN FOTOSYNTHETISERENDE EN NIET-FOTOSYNTHETISERENDE SYSTEMEN

6.1. Inleiding

Om het reële aandeel van de fotosynthese in de ethyleenproductie te bepalen, zouden we de ethyleenproductie van fotosynthetisch actieve planten moeten kunnen vergelijken met deze van planten waarbij de fotosynthese geheel of gedeeltelijk geïnhibeed wordt. Dit zou mogelijk zijn door het toedienen van chemicaliën, die het fotosyntheseproces beïnvloeden. Op deze wijze worden echter allerlei neveneffecten gecreëerd, die de interpretatie van de resultaten sterk bemoeilijken (zie 5.4). Daarom hebben wij andere experimentele methoden gezocht, waarbij de fotosynthese activiteit varieert zonder tussenkomst van inhibitoren. Wij stellen twee methoden voor :

1. Werken met fotosynthetisch deficiënte mutanten en met de overeenkomstige wild types,
2. Op intacte planten de ethyleenproductie van fotosynthetisch actieve (bladeren en stengel) en fotosynthetisch inactieve (wortel) organen afzonderlijk doseren. Dit werd gerealiseerd door de constructie van speciale plantecuvetten.

6.2. Kinetisch verloop van de ethyleenproductie in licht en donker bij planten met genetische defecten in het fotosynthese-apparaat

6.2.1. Chlorofyldeficiënte mutanten

De Carolina Biological Supply Company (North Carolina, USA) beschikt over een aantal typen zaden of caryopsen die na kieming in het licht opgroeien tot kiemplantjes met een deficiënte carotenoïd- en/of chlorofylvorming. Het

materiaal wordt hoofdzakelijk geleverd voor didactische doeleinden in de genetica : aan de hand van deze planten kan uitmendeling van monogenisch bepaalde kenmerken eenvoudig worden aangetoond. Moleculair-biologische en/of biochemische bijzonderheden van de betrokken mutaties zijn ons onbekend. Wij konden beschikken over zaaigoed van :

1. maïs monohybriden groen/albino (3/1) en albino (100%) (zie foto 6.1)
2. soja monohybriden groen/lichtgroen/geel (1/2/1) (zie foto 6.2).

Korte tijd na kieming kan men de verschillende genetische mutanten gemakkelijk visueel van elkaar onderscheiden. Zo kunnen wij de ethyleenproductie in licht en donker vergelijken enerzijds bij normaal (groene bladeren) en niet-fotosynthetiserende (witte bladeren) maïsplanten en anderzijds bij sojaplanten waarbij een afname van de fotosynthetische capaciteit gekoppeld is aan een stapsgewijze reductie van de chlorofylinhoud in de bladeren (groen/lichtgroen/geel).

Het experiment in functie van de tijd werd steeds op de volgende wijze uitgevoerd : 12 dagen oude planten worden met hun wortels geplaatst in bekken, gevuld met water. Vervolgens worden zij in cuvetten getransfereerd naar de meetkast. Een eerste meting wordt uitgevoerd na een equilibratieperiode van 16h in het donker (punt 0 op de grafieken 6.1 tot 6.8 en 6.11 tot 6.14). Na deze initiële donkermeting wordt 1 reeks planten in het licht gebracht, terwijl een andere reeks in het donker blijft. Op regelmatige tijdstippen worden ethyleenproductie en netto CO₂ evolutie gemeten. De lichtbehandelde planten worden 24h later opnieuw in het donker gezet terwijl op hetzelfde ogenblik de planten, die de lange 40h donkerperiode doorgemaakt hebben, in licht worden gebracht. Zo kunnen we tegelijkertijd de invloed van de leeftijd, de pigmentatie en de belichting op de ethyleenproductie nagaan.

Foto 6.1 : Beeld van groene en albino maïskiemplanten (12 dagen).

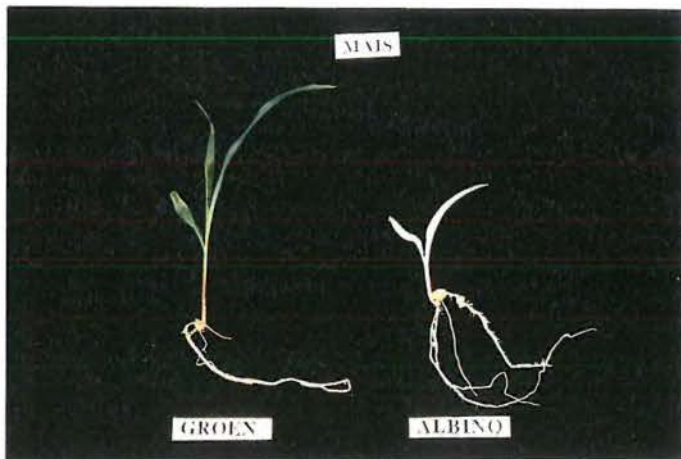


Foto 6.2 : Beeld van groene, lichtgroene en gele sojakiemplanten (12 dagen).



6.2.1.1. Kinetisch verloop van netto CO₂ evolutie en ethyleenproductie bij groene en albino *Zea mays* in licht en donker

Het verloop van de netto CO₂ evolutie in licht en donker toont, zoals verwacht, dat maïsplantjes met witte bladeren (albino) niet kunnen fotosynthetiseren (fig. 6.1). Het lichteffect bij groene maïs is beperkt tot de duur van de belichting : op minder dan 2h na het uitschakelen van het licht, bereikt de netto CO₂ evolutie de donkerwaarde.

Groene en albino maïsplanten produceren in het donker ongeveer 300 à 350 pl ethyleen per uur en per gram versgewicht (fig. 6.2). Aanschakelen van het licht na 16h donker resulteert zowel bij de groene als bij de albino kiemplanten in een verhoging van de ethyleenproductie. Na 4h belichting is de ethyleenproductie t.o.v. de donkercontroles gestimuleerd. Dit verhoogd ethyleenproductieniveau blijft behouden tot de laatste ethyleenmeting na 24h licht. Aanschakelen van het licht na 40h donker verhoogt eveneens de ethyleenproductie. Uitschakelen van het licht na 24h heeft echter binnen de volgende 6h geen daling van de ethyleenproductie tot gevolg noch bij de groene, noch bij de albino planten. In beide proefreeksen wordt aldus de ethyleenvorming door licht gestimuleerd. Anders dan bij de netto CO₂ evolutie echter is er een lange nawerking van het licht in de volgende duisternisperiode.

Fig. 6.1 : Tijdsverloop van de netto CO₂ evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 12 dagen oude intacte groene (●, ○) en albino (▲, △) maïsplanten. Punt 0 geeft de meting na 16h donker (D) weer. Na de eerste pijl (W licht, WL) geven de open symbolen de lichtbehandelde planten weer en de gesloten symbolen de donkercontroles. Na de tweede pijl (WL/D) is de situatie omgekeerd : de open symbolen staan voor de lichtbehandelde planten, die in het donker worden gebracht en de gesloten symbolen voor de donkerplanten, die in WL worden geplaatst. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 5 metingen.

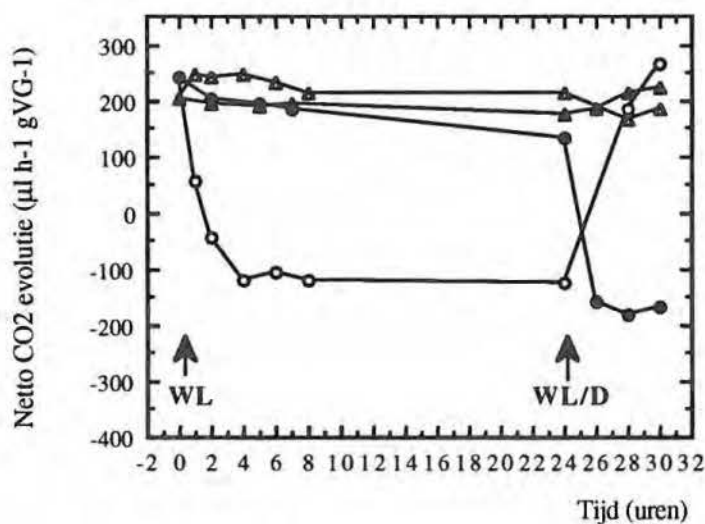
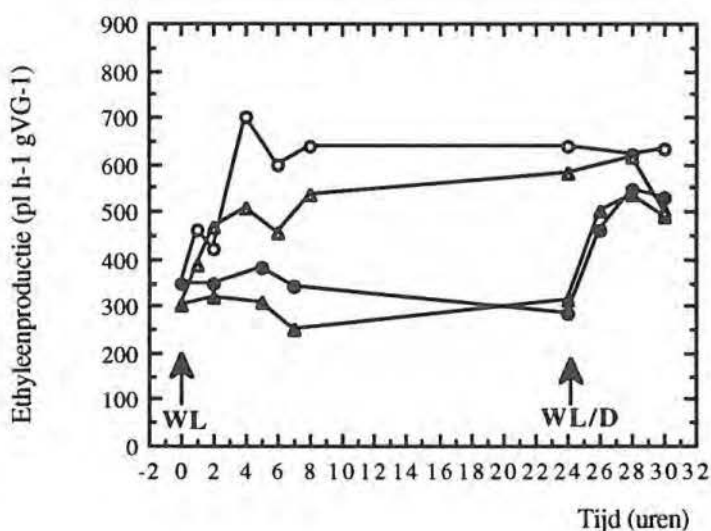


Fig. 6.2 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\text{pl h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 12 dagen oude intacte groene ($\bullet$, $\circ$) en albino ($\blacktriangle$, $\triangle$) maïsplanten. Punt 0 geeft de meting na 16h donker (D) weer. Na de eerste pijl (W licht, WL) geven de open symbolen de lichtbehandelde planten weer en de gesloten symbolen de donkercontroles. Na de tweede pijl (WL/D) is de situatie omgekeerd : de open symbolen staan voor de lichtbehandelde planten, die in het donker worden gebracht en de gesloten symbolen voor de donkerplanten, die in WL worden geplaatst. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 5 metingen.



6.2.1.2. Kinetisch verloop van netto CO₂ evolutie en ethyleenproductie bij groene, lichtgroene en gele *Glycine max.* in licht en donker

Het kinetisch verloop van de netto CO₂ evolutie toont aan dat er geen verschil bestaat in de fotosynthetische capaciteit tussen soja met groene en lichtgroene bladeren (fig. 6.3). De plantjes met de gele bladeren, daarentegen, zijn niet in staat om het fotosyntheseproces uit te voeren.

De ethyleenproductie evolueert op dezelfde wijze bij groene en lichtgroene soja (fig. 6.4). Wij kunnen geen lichtrespons van de ethyleenproductie bij deze planten waarnemen. Dit maakt het uiteraard onmogelijk om de betrokkenheid van de fotosynthese bij de ethyleenproductie te onderzoeken. Gele soja produceert duidelijk meer ethyleen dan de groene en lichtgroene planten. Het senesceren van deze plantjes, duidelijk te zien aan de bruine vlekken op de bladeren, is hiervoor wellicht verantwoordelijk. Het is immers bekend dat senescentie en verhoogde ethyleenproductie met elkaar gepaard gaan. Er is een vrij onregelmatig verloop van de ethyleenproductie waarbij geen stimulerend effect van licht kan waargenomen worden.

Fig. 6.3 : Tijdsverloop van de netto CO₂ evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 12 dagen oude intacte groene (●, ○), lichtgroene (▲, △) en gele (■, □) sojaplanten. Punt 0 geeft de meting na 16h donker (D) weer. Na de eerste pijl (W licht, WL) geven de open symbolen de lichtbehandelde planten weer en de gesloten symbolen de donkercontroles. Na de tweede pijl (WL/D) is de situatie omgekeerd : de open symbolen staan voor de lichtbehandelde planten, die in het donker worden gebracht en de gesloten symbolen voor de donkerplanten, die in WL worden geplaatst. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 5 metingen.

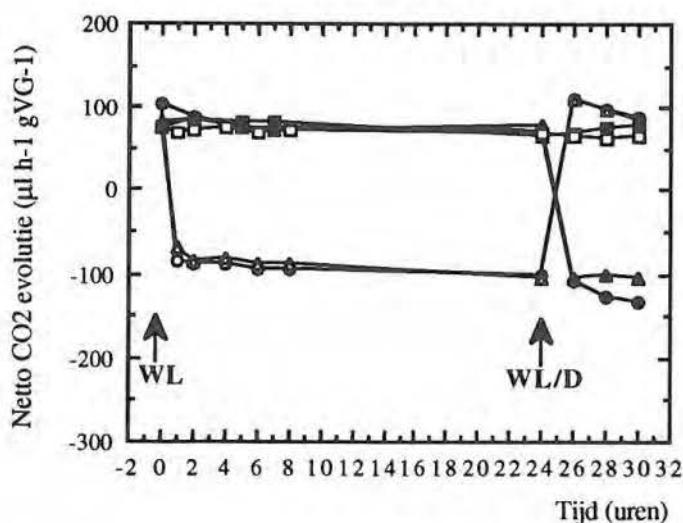
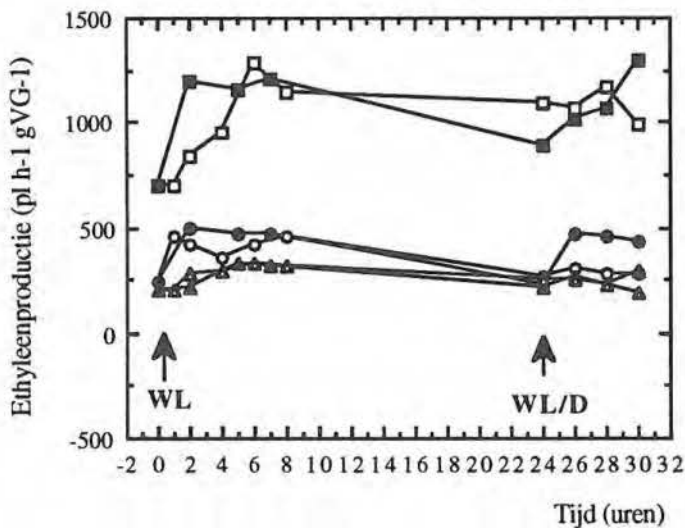


Fig. 6.4 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\text{pl h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 12 dagen oude intacte groene ($\bullet$, $\circ$), lichtgroene ($\blacktriangle$, $\triangle$) en gele ($\blacksquare$, $\square$) sojaplanten. Punt 0 geeft de meting na 16h donker (D) weer. Na de eerste pijl (W licht, WL) geven de open symbolen de lichtbehandelde planten weer en de gesloten symbolen de donkercontroles. Na de tweede pijl (WL/D) is de situatie omgekeerd : de open symbolen staan voor de lichtbehandelde planten, die in het donker worden gebracht en de gesloten symbolen voor de donkerplanten, die in WL worden geplaatst. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 5 metingen.



6.2.2. Fotosysteem (FS) - deficiënte mutanten

6.2.2.1. FS2- en FS1-deficiënte mutanten van *Hordeum vulgare* cv. Svalof's Bonus

Simpson en von Wettstein (1980) en Simpson en med. (1985) beschrijven FS1-type en FS2-type mutanten bij *Hordeum vulgare*. Hierbij zijn de *viridis* (*vir*) mutanten, oorspronkelijk geïdentificeerd door hun afwijkende bladkleur

t.o.v. het parentale wild type, goed gekarakteriseerd (Hiller en med. 1980, Simpson en von Wettstein 1980). De mutaties, die tot dit fenotype leiden, zijn meestal lethaal : de kiemplant sterft als de zetmeelreserve van het endosperm uitgeput is. Caryopsen worden dan ook altijd bewaard in de heterozygote conditie.

von Wettstein (Carlsberg Laboratory, Gamle Carlsberg Vey 10, DK-2500 Copenhagen Valby, Denemarken) was bereid om ons een beperkte hoeveelheid caryopsen te verstrekken van *vir-zd*⁶⁹ en *vir-zb*⁶³, respectievelijk FS2- en FS1-deficiënte mutanten.

Wij bestudeerden of er verschillen in ethyleenproductie bestaan tussen deze FS-deficiënte mutanten en wild type gerst. Indien vrije zuurstofradicalen, gevormd tijdens de fotolyse van water, rechtstreeks betrokken zijn bij de lichtgestimuleerde ethyleenproductie (zie hoofdstuk 5), dan verwachten we bij *vir-zd*⁶⁹ geen en bij *vir-zb*⁶³ wel een lichteffect op de ethyleenproductie. Deze hypothese impliceert echter eerst en vooral dat de ethyleenproductie van de normale gerstplanten een lichtrespons vertoont. Wij voerden de ethyleenkinetiek op dezelfde wijze uit als bij de chlorofyldeficiënte maïs- en sojaplanten (zie 6.2.1).

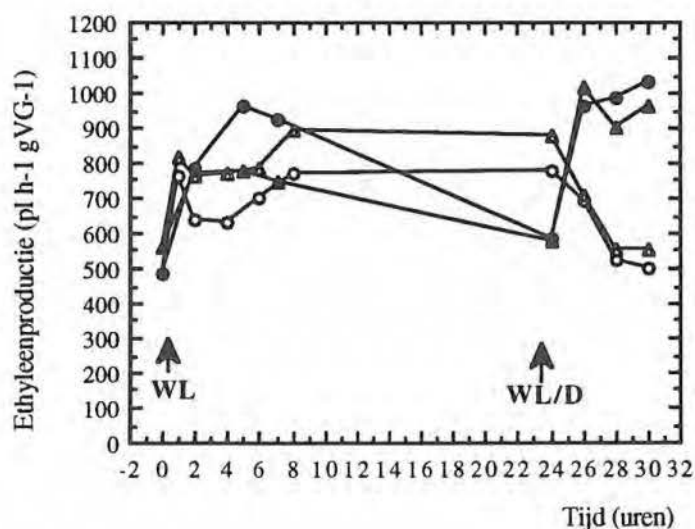
Het lethale karakter van de mutatie(s) maakt het noodzakelijk om met vrij jonge gerstplantjes te werken. Wij gebruikten 8 dagen oude kiemplantjes : op deze leeftijd kan men het groenbladige wild type gemakkelijk visueel onderscheiden van *vir-zd*⁶⁹ (geel-witte bladeren) en *vir-zb*⁶³ (geelgroene bladeren).

6.2.2.2. Kinetisch verloop van de ethyleenproductie bij FS2-deficiënte mutanten en wild type gerst in licht en donker

Er bestaat vrijwel geen verschil in het verloop van de ethyleenproductie bij donker-licht overgangen tussen normale en *vir-zd*⁶⁹ gerstplanten (fig. 6.5). Na 16h donker (de planten zijn 8 dagen oud) is de toestand vermoedelijk nog niet gestabiliseerd. De reactie van de planten is verwarrend : wild type en *vir-*

zd⁶⁹ reageren in gelijke mate op licht doch deze reactie is geringer dan de stijging van de ethyleenproductie in het donker. Pas na 24h W licht (de planten zijn ondertussen 9 dagen oud) wordt de ethyleenproductie van beide genotypen vergeleken met de donkercontroles gestimuleerd. Wanneer we vervolgens het licht uitschakelen, reageren wild type en FS2-deficiënte planten met eenzelfde vermindering van de ethyleenproductie op de inzet van donker. Na 40h donker reageren zij eveneens met eenzelfde stijging op de aanvang van het licht. Dit heeft tot gevolg dat, in tegenstelling tot de lichtbehandeling na 16h donker, de lichtbehandeling na 40h donker bij beide genotypen een stimulering van de ethyleenproductie veroorzaakt gedurende de eerste uren.

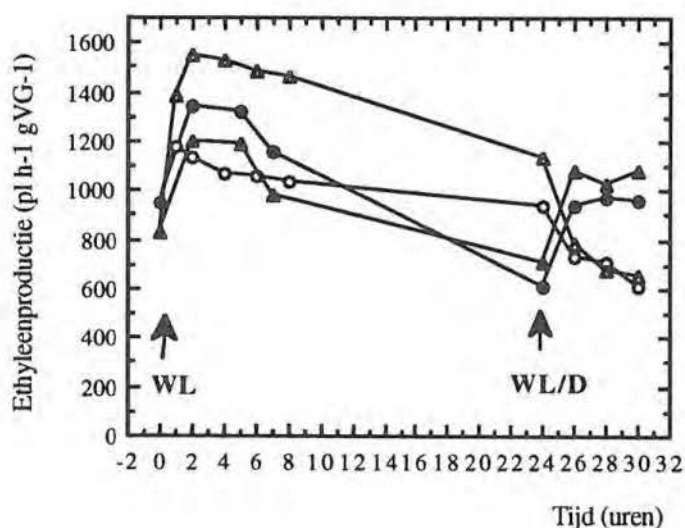
Fig. 6.5 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\text{pl h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 8 dagen oude intacte WT ($\bullet$, $\circ$) en *vir-zd*⁶⁹ ($\blacktriangle$, $\triangle$) gerstplanten. Punt 0 geeft de meting na 16h donker (D) weer. Na de eerste pijl (W licht, WL) geven de open symbolen de lichtbehandelde planten weer en de gesloten symbolen de donkercontroles. Na de tweede pijl (WL/D) is de situatie omgekeerd : de open symbolen staan voor de lichtbehandelde planten, die in het donker worden gebracht en de gesloten symbolen voor de donkerplanten, die in WL worden geplaatst. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 4 metingen.



6.2.2.3. Kinetisch verloop van de ethyleenproductie bij FS1-deficiënte mutanten en wild type gerst in licht en donker

Ook hier (zie 6.2.2.2) is de toestand na 16h donker verward : FS1-deficiënte gerstplanten vertonen na 2h belichting een gestimuleerde ethyleenproductie terwijl dit voor de wild type planten pas geldt na 24h belichting (fig. 6.6). De ethyleensynthese van normale en *vir-zb*⁶³ kiemplanten vertoont blijkbaar een ietwat verschillende respons op de lichtbehandeling na 16h donker. Na 24h W licht daalt bij beide genotypen de ethyleenproductie direct op de inzet van donker. Na 40h donker reageren zij eveneens met eenzelfde stijging op de aanvang van het licht. Dit heeft tot gevolg dat, in tegenstelling tot de lichtbehandeling na 16h donker, de lichtbehandeling na 40h donker bij beide genotypen op ononderscheidbare wijze een stimulering van de ethyleenproductie veroorzaakt.

Fig. 6.6 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\text{pl h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 8 dagen oude intacte WT ($\bullet, \circ$) en *vir-zb*⁶³ ($\blacktriangle, \triangle$) gerstplanten. Punt 0 geeft de meting na 16h donker (D) weer. Na de eerste pijl (W licht, WL) geven de open symbolen de lichtbehandelde planten weer en de gesloten symbolen de donkercontroles. Na de tweede pijl (WL/D) is de situatie omgekeerd : de open symbolen staan voor de lichtbehandelde planten, die in het donker worden gebracht en de gesloten symbolen voor de donkerplanten, die in WL worden geplaatst. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 4 metingen.



6.3. Ethyleenproductie in verschillende delen van intacte groene *Phaseolus vulgaris* kiemplanten

6.3.1. Cuvet voor gelijktijdige doch afzonderlijke ethyleenmetingen bij fotosynthetisch actieve en inactieve plantedelen

Indien fotochemisch geproduceerde zuurstofradicalen verantwoordelijk zijn voor snelle lichteffecten op de ethyleenproductie, dan moeten deze effecten beperkt zijn tot de fotosynthetische organen. We verwachten dan dat wortels

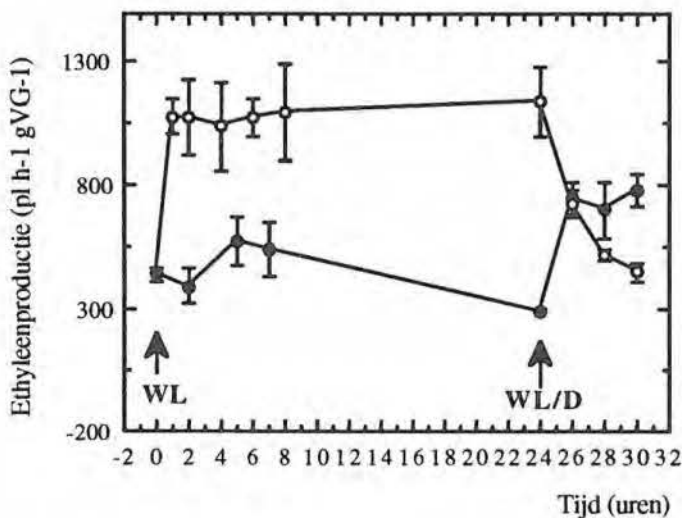
(fotosynthetisch inactieve organen) geen verhoogde ethyleensynthese vertonen in licht. Vanuit fysiologisch standpunt is het niet aangewezen om de ethyleenproductie in licht en donker te vergelijken bij afgesneden, en aldus verwonde, wortels. Daarom construeerden wij een speciaal type cuvet om de ethyleenproductie van fotosynthetisch actieve (bladeren en stengel) en inactieve (wortels) organen apart te doseren zonder de fysiologische intactheid van de plant te verstoren. Dit type van cuvet wordt volledig beschreven in 2.3.1.2 en voorgesteld in fig. 2.3.

6.3.2. Kinetisch verloop van de ethyleenproductie bij fotosynthetisch actieve en inactieve organen in licht en donker

Het kinetisch verloop van de afzonderlijke ethyleenmetingen bij fotosynthetisch actieve (fig. 6.7) en inactieve (fig. 6.8) organen werd gevolgd bij 13 dagen oude intacte groene bonekiemplanten. Deze kinetiek werd uitgevoerd zoals beschreven bij de fotosynthetisch deficiënte planten (zie 6.2.1).

We bemerken bij de fotosynthetisch actieve organen (fig. 6.7) reeds na 1h belichting een gevoelige stimulering van de ethyleenproductie. Dit stimulerend lichteffect blijft bestaan gedurende de volledige lichtperiode. Na uitschakeling van het licht (24h licht), daalt de ethyleenproductie. Deze daling gebeurt weliswaar geleidelijker dan de stijging onder invloed van licht. In het donker blijft de ethyleenproductie min of meer constant; enkel na 40h wordt minder ethyleen vrijgesteld. De lichtbehandeling na 40h donker resulteert opnieuw in een stijging van de ethyleenproductie. Het ethyleenproductieniveau ligt lager dan dat bekomen bij de lichtbehandeling na 16h donker (de donkermeting is op dit tijdstip dan ook hoger).

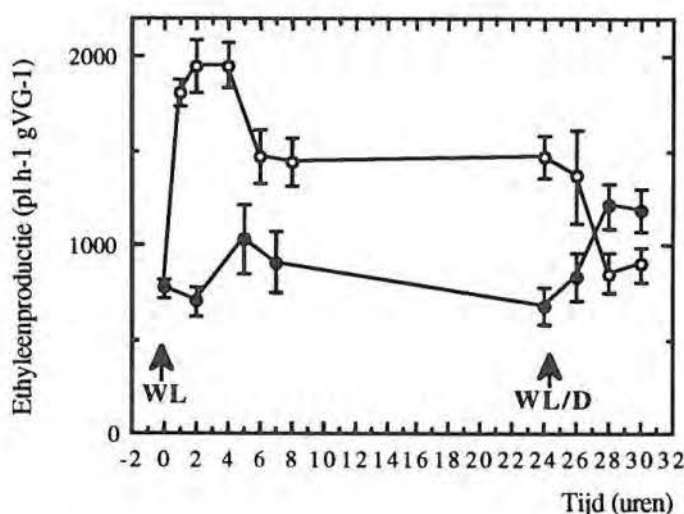
Fig. 6.7 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van fotosynthetisch actieve organen bij 13 dagen oude bonekiemplanten. Punt 0 geeft de meting na 16h donker (D) weer. Na de eerste pijl (W licht, WL) geven de open symbolen de lichtbehandelde delen weer en de gesloten symbolen de donkercontroles. Na de tweede pijl (WL/D) is de situatie omgekeerd : de open symbolen staan voor de lichtbehandelde delen, die in het donker worden gebracht en de gesloten symbolen voor de donkerplantedelen, die in WL worden geplaatst. Gegeven zijn gemiddelden van 5 metingen $\pm$ SD.



Enigszins tot onze verbazing, stelden we bij de fotosynthetisch inactieve organen eveneens na 1h belichting een significant gestegen ethyleenproductie vast (fig. 6.8). Na 6h licht neemt de ethyleenproductie af, maar het positief lichteffect blijft bestaan gedurende de volledige lichtperiode. De ethyleenproductie daalt bij het instellen van de donkercondities. Voor wat de donkercontroles betreft, gelden dezelfde waarnemingen als bij de fotosynthetisch actieve organen.

Uit fig. 6.7 en 6.8 blijkt bovendien dat wortels per eenheidsgewicht een hogere ethyleenproductie hebben dan de fotosynthetiserende delen in overeenkomstige omstandigheden.

Fig. 6.8 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\text{pl h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van fotosynthetisch inactieve organen bij 13 dagen oude bonenplanten. Punt 0 geeft de meting na 16h donker (D) weer. Na de eerste pijl (W licht, WL) geven de open symbolen de lichtbehandelde delen weer en de gesloten symbolen de donkercontroles. Na de tweede pijl (WL/D) is de situatie omgekeerd : de open symbolen staan voor de lichtbehandelde delen, die in het donker worden gebracht en de gesloten symbolen voor de donkerplantedelen, die in WL worden geplaatst. Gegeven zijn gemiddelden van 5 metingen $\pm$ SD.



W licht stimuleert dus de ethyleenproductie zowel van fotosynthetisch actieve als van inactieve organen. De gebruikte meetcuvetten laten zeker een nauwkeurige ethyleendosering toe. In beide deelkamers heerst dezelfde totaal druk, nl. die van het doorstromende gas. Indien de partiële druk van ethyleen in beide deelkamers zou verschillen, dan laat de gasdoorstroming toch geen significante diffusie tussen de deelkamers toe.

Experimenteel wordt de betrouwbaarheid van deze plantecuvetten uitgetest door het toedienen van paraquat aan de wortels van de bonekiemplanten. Paraquat werkt immers enkel in fotosynthetisch actief weefsel na belichting

(Farrington en med. 1973, Dodge 1975, Böger and Kunert 1978, Nanni en med. 1981, Halliwell 1984, Babbs en med. 1989). We weten reeds dat de ethyleenproductie o.i.v. paraquat bij intacte groene bonekiemplanten sterk toeneemt in licht (zie 5.3.1). We verwachten dat het toedienen van paraquat aan de wortels enkel een stijging van de ethyleenproductie veroorzaakt in de fotosynthetisch actieve organen.

6.3.3. Effect van paraquat op de ethyleenproductie van fotosynthetisch actieve en inactieve organen in licht en donker

Bonekiemplanten (10 dagen) werden met hun wortels in water of in een 1mM paraquatoplossing geplaatst. Een eerste ethyleenmeting van fotosynthetisch actieve en inactieve organen werd uitgevoerd na 16h equilibratie van de planten in het donker. Vervolgens werd 1 reeks planten gedurende 8h in licht gebracht, terwijl een andere reeks in het donker bleef. De ethyleenproductie werd bepaald op regelmatige tijdstippen.

Bij de fotosynthetisch actieve organen (fig. 6.9) kunnen we enkel in licht een sterke toename van de ethyleenproductie o.i.v. paraquat waarnemen. Dit bevestigt de resultaten bekomen bij 5.3.1. De fotosynthetisch inactieve organen (fig. 6.10) van controle en met paraquat behandelde planten vertonen hetzelfde verloop van de ethyleenproductie zowel in donker als in licht. Enkel na 8h belichting is de ethyleenproductie van de fotosynthetisch inactieve organen, behandeld met paraquat, hoger dan bij de controles. Op dit tijdstip maken uitblekingsverschijnselen ter hoogte van de bladnerven de fytotoxiciteit van paraquat zichtbaar.

Dit experiment bewijst ondubbelzinnig dat de aangewende meetcuvetten betrouwbare ethyleenmetingen verschaffen van fotosynthetisch actieve en inactieve organen.

Fig. 6.9 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van fotosynthetisch actieve organen bij 10 dagen oude bonekiemplanten met hun wortels geïncubeerd in water (●, ○) of in een 1 mM paraquatoplossing (▲, △). Punt 0 geeft de meting na 16h donker weer. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 5 metingen $\pm$ SD. Gesloten symbolen : donker; open symbolen : W licht (PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

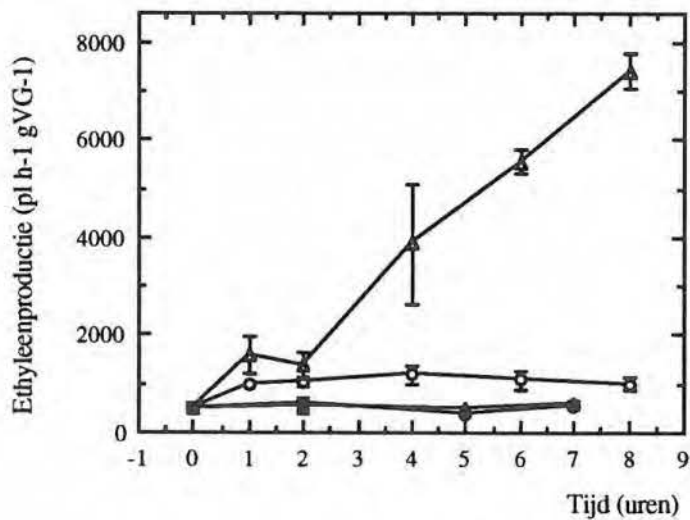
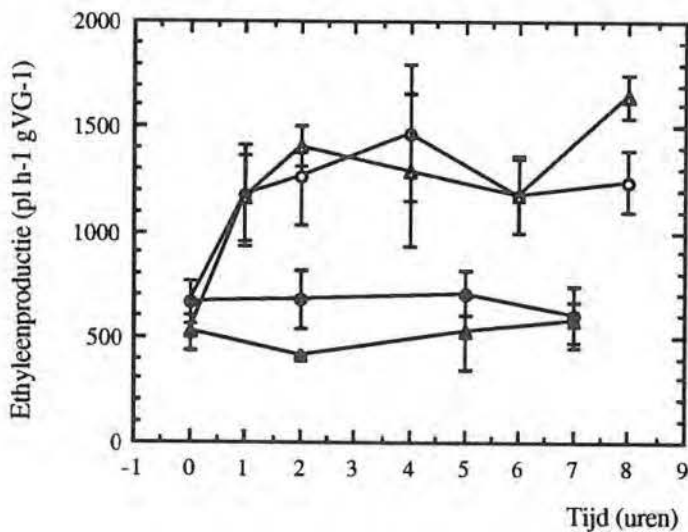


Fig. 6.10 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van fotosynthetisch inactieve organen bij 10 dagen oude bonekiemplanten geïncubeerd in water (●, ○) of in een 1 mM paraquatoplossing (▲, △). Punt 0 geeft de meting na 16h donker weer. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 4 metingen $\pm$ SD. Gesloten symbolen : donker; open symbolen : W licht (PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



6.3.4. Kinetisch verloop van de ethyleenproductie bij fotosynthetisch actieve organen in licht en donker en bij fotosynthetisch inactieve organen in continu donker

Wij onderzochten of het stimulerend effect van licht op de ethyleenproductie van fotosynthetisch inactieve organen een rechtstreeks effect is ofwel te wijten is aan een onrechtstreekse betrokkenheid van de fotosynthese. De bladeren vangen immers de lichtprikkels op; in de veronderstelling dat dit leidt tot een verhoging van het ACC gehalte zou hierdoor de lichtstimulering van de ethyleenproductie in de fotosynthetisch actieve organen kunnen verklaard worden. Wanneer nu een gedeelte van het lichtgeïnduceerde ACC getranspor-

teerd wordt naar de wortels, dan kan dit ook in deze organen aanleiding geven tot een verhoging van de ethyleenproductie. Dit veronderstelt een vlug basipetaal transport van ACC. Wij kunnen deze hypothese uittesten door de fotosynthetisch actieve organen te belichten terwijl de fotosynthetisch inactieve organen continu in het donker blijven. Dit experiment werd gerealiseerd door het basisdeel van de cuvet aan de buitenkant te spuiten met zwarte verf. Bovendien werd als extra afscherming tegen het licht nog een zwarte doek voorzien. De glazen plaat tussen top- en basisdeel werd langs boven afgedekt met een stuk karton. Zo kan men de fotosynthetisch actieve organen in het topdeel naar wens al dan niet belichten terwijl de fotosynthetisch inactieve organen in het basisdeel continu in het donker blijven. De ethyleenkinetiek werd op dezelfde wijze uitgevoerd als beschreven in 6.2.1.

Zoals verwacht vertoont de ethyleenproductie van de fotosynthetisch actieve delen in licht en donker precies hetzelfde patroon als bij het experiment beschreven onder 6.3.2. (vergelijk fig. 6.11 met 6.7). De ethyleensynthese van de fotosynthetisch inactieve delen vertoont echter onder alle omstandigheden een vergelijkbaar verloop (fig. 6.12). Belichting van enkel de fotosynthetisch actieve organen heeft dus niet tot gevolg dat de ethyleenproductie van de fotosynthetisch inactieve organen gestimuleerd wordt. Deze resultaten verwerpen de voorgestelde hypothese. Het lichteffect op de ethyleenproductie in fotosynthetisch inactief weefsel is dus een lokaal effect. Er zijn geen fysiologische interorgaancorrelaties waardoor de fotosynthese in de bebladerde stengel de ethyleenproductie van de wortel beïnvloedt.

Fig. 6.11 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van fotosynthetisch actieve organen bij 13 dagen oude bonekiemplanten. Punt 0 geeft de meting na 16h donker (D) weer. Na de eerste pijl (W licht, WL) geven de open symbolen de lichtbehandelde delen weer en de gesloten symbolen de donkercontroles. Na de tweede pijl (WL/D) is de situatie omgekeerd : de open symbolen staan voor de lichtbehandelde delen, die in het donker worden gebracht en de gesloten symbolen voor de donkerplantedelen, die in WL worden geplaatst. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 5 metingen $\pm$ SD.

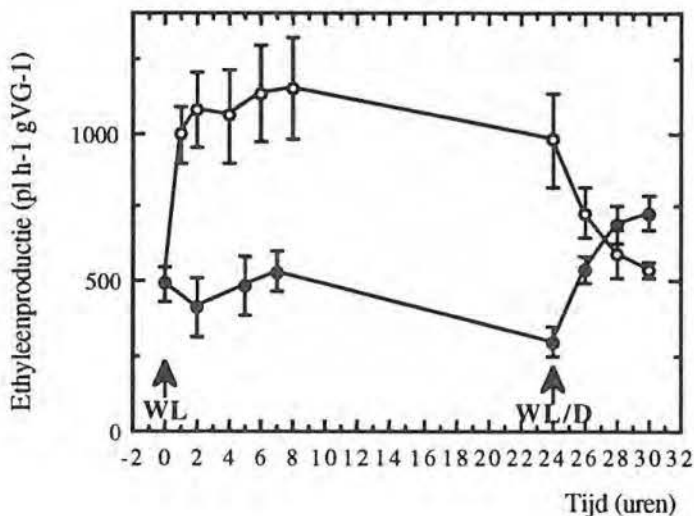
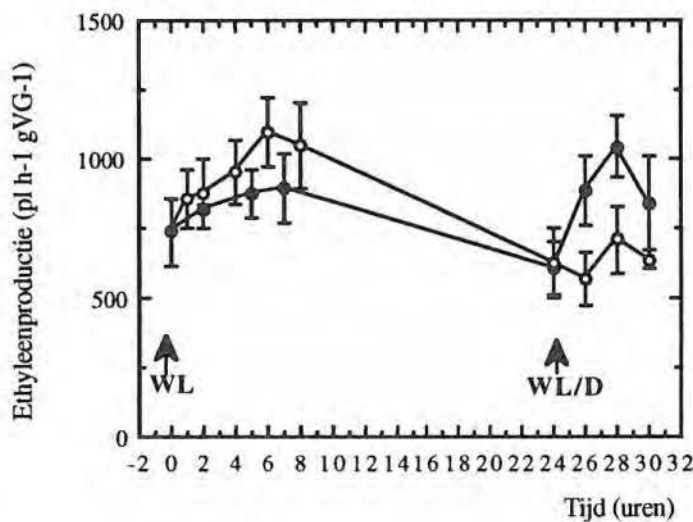


Fig. 6.12 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) in continu donker van fotosynthetisch inactieve organen bij 13 dagen oude bonekiemplanten. Punt 0 geeft de meting na 16h donker (D) weer. Na de eerste pijl (W licht, WL) geven de open symbolen weer dat de fotosynthetisch actieve plantedelen belicht worden terwijl de gesloten symbolen duiden op de overeenkomstige donkercontroles. Na de tweede pijl (WL/D) is de situatie omgekeerd : de open symbolen geven weer dat de fotosynthetisch actieve delen zich in het donker bevinden terwijl de gesloten symbolen duiden op belichte fotosynthetisch actieve delen. Zoals boven vermeld bevinden de fotosynthetisch inactieve plantedelen zich continu in donkeromstandigheden. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 5 metingen $\pm$ SD.



6.3.5. Kinetisch verloop van de ACC-afhankelijke ethyleenproductie bij fotosynthetisch actieve en inactieve organen in licht en donker

Wij weten reeds dat de ACC-afhankelijke ethyleenproductie wordt gestimuleerd door W licht (zie 4.2.1). Wij willen nagaan of de omzetting van ACC naar ethyleen zowel in fotosynthetisch actieve als inactieve plantedelen wordt bevorderd door W licht. In een eerste experiment dienden wij exogeen ACC toe aan de primaire bladeren en in een tweede experiment aan de wortels van de boneplanten. Zo kunnen wij eveneens bestuderen of ACC getransporteerd wordt tussen bladeren en wortels.

6.3.5.1. Toediening van ACC aan de primaire bladeren

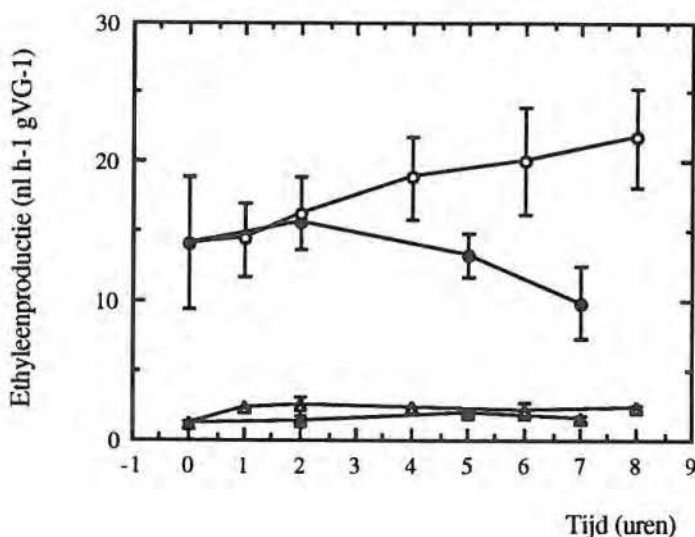
Dertien dagen oude bonekiemplanten werden met hun wortels in water geplaatst terwijl een 1 mM ACC oplossing (0,5 ml) d.m.v. een penseel werd uitgesmeerd op de primaire bladeren.

In fotosynthetisch actieve organen resulteert deze behandeling in een sterke verhoging van de ethyleenproductie (fig. 6.13). Na 16h donker produceren deze plantedelen ongeveer 15 nl ethyleen per uur en per gram vers gewicht (fig. 6.13) t.o.v. 0,5 nl wanneer er geen ACC wordt toegediend (fig. 6.7). Na 4h belichting manifesteert zich een verschil tussen de ACC-geïnduceerde ethyleenproductie in licht en donker. In licht neemt de synthese van ethyleen voortdurend toe, terwijl in donker een afname te bemerken valt, die echter niet significant is. Dit leidt tot een stimulatie-effect door W licht van circa 50% op de ACC-afhankelijke ethyleensynthese na 6h belichting.

De ethyleenproductie door de wortels is volledig vergelijkbaar met de resultaten, bekomen met planten, waarvan de bladeren geen ACC ontvingen (vergelijk fig. 6.13 met fig. 6.8). Licht stimuleert deze ethyleenproductie, maar zij wordt niet verhoogd door de toediening van ACC aan de bladeren. Deze resultaten tonen aan dat er geen basipetaal transport van ACC is van de bladeren naar de wortels.

Het toedienen van ACC aan de primaire bladeren verhoogt dus enkel de ethyleenproductie in fotosynthetisch actieve organen. Daarom kunnen we niet bestuderen of de omzetting van ACC naar ethyleen van de wortels al dan niet onderhevig is aan een positief lichteffect. Het experiment, beschreven in fig. 6.13, waarbij hoge ethyleengehalten worden gemeten bij fotosynthetisch actieve en lage ethyleengehalten bij fotosynthetisch inactieve organen, toont eens te meer aan (zie 6.3.3.) dat de gebruikte cuvetconstructie zeer betrouwbare analyseresultaten oplevert.

Fig. 6.13 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\text{nl h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van fotosynthetisch actieve ($\bullet$, $\circ$) en inactieve organen ($\blacktriangle$, $\triangle$) bij 13 dagen oude bonekiemplanten geïncubeerd met hun wortels in water en na toediening van 1 mM ACC oplossing aan de bladeren. Punt 0 geeft de meting na 16h donker weer. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 6 metingen $\pm$ SD. Gesloten symbolen : donker; open symbolen : W licht (PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



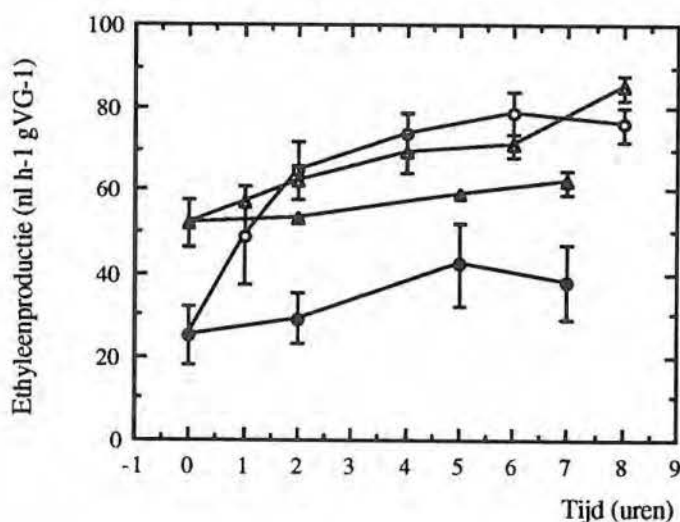
6.3.5.2. Toediening van ACC aan de wortels

Kiemplanten, 13 dagen oud, worden met hun wortels in glazen bekertjes geplaatst, die 100 ml van een 1 mM ACC oplossing bevatten.

In de niet-fotosynthetiserende delen wordt de ethyleenproductie door ACC sterk geïnduceerd : na 16h donker worden 50 nl per uur en per gram vers gewicht geproduceerd (fig. 6.14), tegenover ongeveer 1 nl, wanneer geen ACC werd toegediend (zie fig. 6.8 en fig. 6.13). Bovendien wordt de omzetting van ACC tot ethyleen ook in niet-fotosynthetiserende delen gestimuleerd door W licht; deze stimulering is reeds significant na 2h belichting.

Fotosynthetisch actieve delen produceren na 16h donker ook meer ethyleen als ACC aan de wortels wordt toegediend. Fig. 6.14 toont aan dat zij 25 nl ethyleen per uur en per gram vers gewicht afgeven, terwijl de ethyleenproductie van deze organen ongeveer 0,5 nl bedraagt, wanneer geen ACC aan de wortels wordt toegediend (fig. 6.7). In donker neemt deze ethyleenproductie lichtjes toe in functie van de tijd (fig. 6.14). Blijkbaar wordt ACC wel acropetaal van de wortels naar de bovengrondse organen getransporteerd. De omzetting van het in de fotosynthetiserende organen aangevoerde ACC tot ethyleen wordt ook gestimuleerd door W licht. Deze stimulering is reeds significant na 1h belichten en de ethyleenproductie neemt toe in functie van de tijd gedurende de volledige meetperiode.

Fig. 6.14 : Tijdsverloop van de ethyleenproductie ($\text{nl h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van fotosynthetisch actieve ($\bullet$, $\circ$) en inactieve organen ($\blacktriangle$, $\triangle$) bij 13 dagen oude bonekiemplanten geïncubeerd met hun wortels in een 1 mM ACC oplossing. Punt 0 geeft de meting na 16h donker weer. Gegeven zijn gemiddelden van tenminste 3 metingen $\pm$ SD. Gesloten symbolen : donker; open symbolen : W licht (PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



6.4. Bespreking

Wij onderzochten in dit hoofdstuk of de fotosynthese de stimulerende invloed van licht op de ethyleenproductie van intacte planten kan verklaren. Hiertoe vergeleken wij de ethyleenproductie, enerzijds bij fotosynthetisch normale en fotosynthetisch deficiënte planten, en anderzijds bij fotosynthetisch actieve en inactieve delen van eenzelfde plant.

De resultaten tonen aan dat de lichtstimulering van de ethyleenproductie niet via de fotosynthese gebeurt en dus onafhankelijk is van dit proces :

1. W licht stimuleert zowel de ethyleenproductie van normale (groene bladeren) als van fotosynthetisch inactieve (witte bladeren) kiemplanten

van *Zea mays* (fig. 6.2). Naar verwachting zijn de albino kiemplanten niet tot fotosynthese in staat (fig. 6.1) en kunnen wij aannemen dat de fotosynthese niet verantwoordelijk is voor het waargenomen lichteffect op de ethyleenproductie.

2. Er is een snel en vergelijkbaar stimulerend effect van W licht op de ethyleenproductie van fotosynthetische (fig. 6.7 en 6.11) en niet-fotosynthetische (fig. 6.8 en 6.12) delen bij *Phaseolus* kiemplanten. In beide plantedelen wordt eveneens een verhoging van de omzetting van ACC naar ethyleen onder invloed van W licht waargenomen (fig. 6.13 en 6.14). Een mogelijk effect van licht op de ACC en/of M-ACC vorming werd niet onderzocht. Het positief lichteffect op de ethyleenproductie in wortels is een tweede argument dat er geen automatisch verband bestaat tussen de lichtgestimuleerde ethyleenproductie en de fotosynthese. Daarmee wordt niet uitgesloten dat de lichtgestimuleerde ethyleenproductie in groene plantedelen wel rechtstreeks of onrechtstreeks mede van de fotosynthese afhangt.

Bij groene kiemplanten van *Glycine max.* is er tijdens de bestudeerde levensfase een verhoging van de ethyleenproductie in donker (fig. 6.4). Wij hebben hier geen sluitende verklaring voor. De ethyleenvrijzetting in W licht vertoont dezelfde stijging als die in donker; er is dus in dit materiaal geen stimulerend effect van W licht op de ethyleenproductie. Deze resultaten zijn in tegenspraak met de gegevens vermeld in tabel 3.1 (andere herkomst van zaden). Zij bevestigen wel de resultaten bekomen door Bassi en Spencer (1983) bij intacte soja in een vergelijkbaar meetsysteem.

Acht dagen oude normale, FS2-deficiënte (*vir-zd*⁶⁹) en FS1-deficiënte (*vir-zb*⁶³) kiemplanten van *Hordeum vulgare* vertonen een onregelmatig verloop van de ethyleenproductie in licht en donker (fig. 6.5 en 6.6). Pas na 24h belichting, de planten zijn dan 9 dagen oud, is de toestand gestabiliseerd: de 3 genotypen produceren meer ethyleen in licht dan in donker. Zij reageren eveneens op dezelfde wijze bij het uitschakelen van het licht, nl. hun ethyleenproductie daalt bij inzet van donker. Evenzo vertonen kiemplanten van normale, *vir-zd*⁶⁹ en *vir-zb*⁶³ gerst op ononderscheidbare wijze een

stimulering van de ethyleenproductie op de aanvang van het licht na 40h donker. De netto CO₂ evolutie van de FS-deficiënte mutanten toont aan dat beide genotypen minder fotosynthetiseren dan de wild type planten (resultaten niet vermeld). Toch blijkt de deficiëntie van zowel FS1 als van FS2 onvoldoende te zijn om verschillen te veroorzaken in de hoeveelheid vrijgezet ethyleen en in de reactie van de ethyleenproductie op licht- en donkeromstandigheden vergeleken met de fotosynthetisch normale gerstplanten. Zijn deze resultaten een mogelijke aanduiding dat de lichtgestimuleerde ethyleenproductie onafhankelijk is van de fotosynthese bij deze planten ?

Matheussen (1988) toonde aan dat in groene bonekiemplanten het merendeel van het totale ACC gehalte wordt aangetroffen in de wortels en het onderste deel van het hypocotyl. Men kan dan ook een transport van ACC vanuit deze lager gelegen plantedelen naar de bladeren veronderstellen. Deze auteur vermeldde enkele mogelijke aanwijzingen voor zowel opwaarts als neerwaarts transport van ACC en/of M-ACC bij geëtiolerde bonekiemplanten. Wij toonden aan dat bij intacte groene bonekiemplanten exogeen toegediend ACC acropetaal van de wortel naar de bovengrondse delen kan getransporteerd worden (fig. 6.14). Een basipetaal transport van bladeren naar wortel treedt niet op (fig. 6.13). De verhoogde ethyleenproductie door bladeren in licht kan dus ten dele het gevolg zijn van een verhoogde ACC toevoer uit medebelichte wortels.

HOOFDSTUK 7 : EFFECT VAN VERSCHILLENDE LICHT-KWALITEITEN OP DE ETHYLEENPRODUCTIE

7.1. Inleiding

De lichtgestimuleerde ethyleenproductie wordt niet noodzakelijk geregeld door de fotosynthese. Dit kunnen we afleiden uit de resultaten beschreven in hoofdstuk 6. Daarom onderzochten wij in enkele oriënterende proeven de mogelijke betrokkenheid van andere fotoreceptoren (fytochroom, cryptochroom).

7.2. Effect van wit, rood en blauw licht op de ethyleenproductie van intacte groene bonekiemplanten

Aan 13 dagen oude groene bonen werden verschillende lichtkwaliteiten toegediend. Naast wit licht (spectrum zie fig. 2.3) werd ook breedband rood (spectrum zie fig. 2.4) en breedband blauw (spectrum zie fig. 2.5) licht gebruikt. Het fotosynthetisch actief licht (PAR) uitgaande van de verschillende lichtkwaliteiten is niet gelijk (tabel 7.1). Na een duisternisperiode van 12h werden de planten gedurende 6h onder licht van de vermelde lichtkwaliteiten geplaatst. Dan worden ethyleenproductie en netto CO₂ evolutie gemeten (tabel 7.1). Op basis van de netto CO₂ fixatie kunnen we waarnemen dat het gebruikte rode licht geen effect heeft op de netto fotosynthese in deze proef. Blauw en wit licht beschikken over dezelfde efficiëntie m.b.t. de netto CO₂ assimilatie ondanks de hogere PAR van blauw t.o.v. wit licht. Rood licht stimuleert de ethyleenproductie niet. Blauw licht, daarentegen, veroorzaakt een grotere toename van de ethyleenproductie dan wit licht.

Tabel 7.1 : Ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) en netto CO_2 evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 13 dagen oude intacte groene bonekiemplanten onder verschillende lichtkwaliteiten. Metingen werden uitgevoerd na 6h belichting volgend op een 12h donkerperiode. Gegeven zijn gemiddelden $\pm$ SD; tussen haakjes worden het aantal herhalingen weergegeven. PAR = hoeveelheid fotosynthetisch actief licht in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Behandeling	Ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$)	netto CO_2 evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$)
Donker	481 ± 50 (14)	155 ± 10 (5)
Wit licht (PAR=150)	724 ± 45 (4)	-179 ± 43 (5)
Rood licht (PAR=15)	577 ± 75 (14)	94 ± 51 (6)
Blauw licht (PAR=200)	992 ± 82 (8)	-176 ± 7 (5)

7.3. Effect van wit, rood en blauw licht op de ethyleenproductie van intacte groene en albino maïskiemplanten

Wij herhaalden hetzelfde experiment voor 12 dagen oude fotosynthetisch actieve (groene) en inactieve (albino, zie 6.2.1) maïskiemplanten (tabel 7.2). Zoals te verwachten kan geen enkele lichtkwaliteit de witte kiemplantjes tot fotosynthese brengen. In onze proefomstandigheden is ook bij groene kiemplanten rood licht fotosynthetisch inactief; daarentegen veroorzaken wit en vooral blauw licht een duidelijk effect op de CO_2 assimilatie. In beide plantetypes heeft rood licht geen invloed op de ethyleenproductie. In groene en witte maïs wordt in wit licht dubbel zoveel ethyleen vrijgesteld dan in donkeromstandigheden; blauw licht veroorzaakt echter de hoogste stimulering. Dit experiment toont aan dat witte en groene kiemplanten zich inzake de lichteffecten op de ethyleenproductie niet significant onderscheiden, hoewel ze in hun fotosynthetische eigenschappen fundamenteel van elkaar verschillen.

Tabel 7.2 : Ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) en netto CO_2 evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$) van 12 dagen oude intacte groene en witte maïskiemplanten onder verschillende lichtkwaliteiten. Metingen werden uitgevoerd na 6h belichting volgend op een 12h donkerperiode. Gegeven zijn gemiddelden $\pm$ SD; tussen haakjes worden het aantal herhalingen weergegeven. PAR = hoeveelheid fotosynthetisch actief licht in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Behandeling	Ethyleenproductie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$)		netto CO_2 evolutie ($\mu\text{l h}^{-1} \text{gVG}^{-1}$)	
	groen	wit	groen	wit
Donker	275 $\pm$ 59 (8)	238 $\pm$ 44 (8)	218 $\pm$ 33 (8)	196 $\pm$ 14 (8)
Wit licht (PAR=150)	599 $\pm$ 86 (7)	538 $\pm$ 101(5)	- 105 $\pm$ 55 (4)	232 $\pm$ 43 (5)
Rood licht (PAR=15)	305 $\pm$ 41 (10)	239 $\pm$ 52 (9)	193 $\pm$ 28 (5)	221 $\pm$ 43 (4)
Blauw licht (PAR=200)	806 $\pm$ 22 (4)	1014 $\pm$ 230(4)	- 233 $\pm$ 39 (3)	255 $\pm$ 72 (3)

7.4. Bespreking

Aangezien de ethyleenproductie in licht niet geregeld wordt via de fotosynthese (zie hoofdstuk 6), rijst de vraag of andere fotoreceptoren betrokken zijn bij de lichtregulatie van de ethyleenbiosynthese.

Wij hebben in enkele oriënterende proeven de invloed van fytochroom en van cryptochroom onderzocht. De experimenten werden uitgevoerd met intacte groene bonekiemplanten (tabel 7.1) en intacte groen- of witbladige maïskiemplanten (tabel 7.2).

Zwak doch langdurig rood licht heeft in beide plantesoorten geen invloed op de ethyleenproductie. Vangronsveld (1990) toonde een invloed van rood licht aan op de ethyleenproductie bij intacte geëtiolerde kiemplanten van *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus* en *Helianthus annuus* en bewees dat dit effect gecontroleerd wordt door fytochroom. Het belangrijkste operationeel criterium voor fytochroom betrokkenheid, nl. R-DR reversibiliteit, is immers voldaan. In fotosynthetiserend plantemateriaal werd de regulatie van de

ethyleenbiosynthese door fytochroom waargenomen bij apices van *Prunus persica* (Erez 1977) en bij *Marchantia polymorpha* (Veroustraete en med. 1982, Veroustraete 1983). In tegenstelling tot onze resultaten, toonde Vangronsveld (1990) aan dat langdurig rood licht de ethyleenproductie bij groene bonen in beperkte mate stimuleert. De door hem gebruikte hoeveelheid fotosynthetisch actief licht (PAR) was hoger dan in onze proeven, nl. $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Daarnaast vond hij geen effect van een continue bestraling met donkerrood licht (laag, maar constant gehalte aan P_{fr}) op de ethyleenvrijstelling. Een 10 min durende donkerrood behandeling na een 8h W licht fotoperiode of tijdens een 16h durende duisternisperiode heeft een verlaging van de lichtstimulering van de ethyleenproductie tijdens de volgende lichtperiode tot gevolg; dit effect is reverseerbaar door R licht. Fytochroom heeft hoogstwaarschijnlijk een onrechtstreeks effect op de ethyleenbiosynthese in groene planten via zijn invloed op de morfogenetische ontwikkeling. Er bestaat immers geen direct effect van de verhoging van de P_r pool op de ethyleenvrijstelling (Vangronsveld 1990).

Blauw licht daarentegen bevordert de ethyleenproductie zeer duidelijk zowel in groene planten (boon, maïs) als in de albino maïs. Dit wijst er meteen op dat blauw licht deze invloed niet uitoefent via de fotosynthese. Cryptochroom zou dus betrokken kunnen zijn bij de regulatie van de ethyleensynthese. Flavinen zijn meest waarschijnlijk de fysiologisch actieve blauw licht fotoreceptoren. Zij vervullen deze functie na binding met een specifiek receptorproteïne, dat o.a. in de cytoplasmamembraan gelokaliseerd is. Deze pigmenten maken deel uit van een korte electronentransportketen (flavine-cytochroom complex) waarbij door lichtabsorptie redoxreacties worden gerealiseerd (Asard 1991). Hierbij kunnen vrije radicalen gevormd worden, die eventueel een rol spelen bij de stimulering van de ethyleenproductie door blauw licht. Dit zou kunnen gebeuren via een intensifiëring van de klassieke biosyntheseweg, maar tevens via de fotochemisch geïnduceerde afbraak van lipiden. Om deze hypothese te verifiëren is zeker nog heel wat verder onderzoek nodig.

HOOFDSTUK 8 : ALGEMENE CONCLUSIES

De beschikbare literatuurgegevens i.v.m. W lichteffecten op de ethyleenproductie van groene planten maken noch een eenduidige vergelijking noch een coherente interpretatie mogelijk. Daarom heeft dit werk als eerste doel de effecten van W licht op de ethyleenproductie te vergelijken bij groene kiemplanten van verschillende plantesoorten onder identieke groei-omstandigheden. De ethyleenproductie werd geanalyseerd met behulp van een gaschromatografisch doorstroomsysteem. Deze methode laat, in vergelijking met het klassieke accumulatiesysteem, een fysiologische benadering toe en doet also een aantal methodologische bezwaren vervallen. Bij alle onderzochte plantespecies (soja, komkommer, zonnebloem, boon, tarwe, haver, gerst en maïs) verhoogt licht met een voldoende hoge intensiteit de ethyleenproductiesnelheid (tabel 3.1 en fig. 3.1 tot 3.3). Deze W licht respons van de ethyleenproductie werd meer in detail onderzocht bij intacte groene bonekiemplanten. Tien dagen na zaai wordt in deze planten de ethyleenproductie duidelijk gestimuleerd door W licht (fig. 4.1). De biosynthese van ethyleen (methionine $\rightarrow$ SAM $\rightarrow$ ACC $\rightarrow$ ethyleen) kan op verschillende niveau's beïnvloed worden. Wij spitsten onze aandacht toe op de drie belangrijkste stappen volgend na SAM :

1. de synthese van ACC (ACC-S, volgens vele auteurs het "sleutelenzym" in de ethyleenbiosynthese),
2. de omzetting van ACC naar ethyleen, die gekatalyseerd kan worden door ACC-O,
3. de malonylering van ACC door het enzym N-malonyltransferase waardoor vrij ACC wordt geconjugeerd en bijgevolg aan de omzetting tot ethyleen wordt onttrokken.

Het positieve lichteffect op de ethyleenproductie is het gevolg van een verhoogde omzetting van ACC naar ethyleen (fig. 4.4) en van een toegenomen ACC vorming (fig. 4.5). Het is niet duidelijk of dit laatste het gevolg is van een stimulerend effect van licht op de genen die coderen voor ACC-S, of op de activiteit van dit enzym. Ook valt niet uit te maken of, en

zo ja hoe, deze beide mogelijkheden feedback effecten zijn van de verhoogde omzetting van ACC naar ethyleen.

De malonylering van ACC wordt bij groene boneplanten niet door licht beïnvloed (Fig. 4.5).

De stimulering van de ethyleenvrijstelling door W licht valt samen met de ontwikkeling van de fotosynthetische capaciteit van de bonekiemplanten. Deze coïncidentie op zichzelf laat niet toe te onderscheiden of beide verschijnsels gelijktijdige maar onderling onafhankelijke aspecten zijn van de differentiatie van de planten, dan wel of het eerste verschijnsel het snelle gevolg is van het tweede. Daarom bestudeerden wij of de fotosynthese een rol speelt in de door W licht gestimuleerde ethyleenproductie. De fotosynthese kan bijdragen tot de lichtrespons van de ethyleenproductie door ATP- en substratsvoorziening. Daarnaast suggereerden verscheidene auteurs (Apelbaum en med. 1981a, Legge en med. 1982, McRae en med. 1982, Van Genechten 1985) dat vrije zuurstofradicalen participeren bij de omzetting van ACC naar ethyleen. Tijdens het fotosynthetisch electronentransport, meer bepaald bij de fotolyse van water, worden actieve zuurstofspecies gevormd. Het waargenomen lichteffect op de ethyleenproductie zou dan ook het gevolg kunnen zijn van een stimulering van de oxidatie van ACC door deze radicalen. Wij onderzochten vooreerst deze hypothese door de effecten van zuurstofradicaalbindende chemicaliën (spermine, ascorbinezuur, n-propylgallaat en Na-benzoaat) op de ethyleenproductie in licht na te gaan.

Wij vinden geen effect terug van de onderzochte radicaalbindende chemicaliën op de ethyleenproductie (tabel 5.1 tot 5.4). De afwezigheid van enig effect van deze verbindingen op de ethyleensynthese in onze testplanten en experimentele condities kan op 2 manieren geïnterpreteerd worden :

1. door de voorgestelde hypothese te verwerpen,
2. door een moeilijke opname, transport, te geringe intracellulaire concentratie, ... van de radicaalbindende chemicaliën aan te nemen.

Vervolgens onderzochten wij het effect van de zuurstofradicaalgenererende verbinding paraquat op de ethyleenproductie in licht en donker. Dit herbicide vormt vrije zuurstofradicalen via een reactie tussen moleculaire zuurstof en

gereduceerde paraquatradicalen (fig. 5.1). Bovendien wordt deze verbinding vlug opgenomen door wortels en oefent een specifieke werking uit op het niveau van FS1. Het werkingsmechanisme van paraquat is dus gecorreleerd met de fotosynthese, licht en zuurstof. Zoals verwacht heeft paraquat in donker geen effect op de ethyleenproductie noch op de netto CO₂ evolutie (fig. 5.2). In licht, daarentegen, veroorzaakt paraquat een sterke toename van de ethyleenproductie samen met een inhibitie van de CO₂ assimilatie (fig. 5.2). De effecten van licht en paraquat op de biosyntheseweg van ethyleen verschillen duidelijk. Licht oefent een invloed uit op de omzetting van ACC naar ethyleen en op de ACC vorming zelf; paraquat heeft enkel een effect op de synthese van ACC (fig. 5.3 en tabel 5.6). Deze resultaten lijken op het eerste zicht moeilijk te interpreteren. Vrije zuurstofradicalen zouden immers de conversie van ACC naar ethyleen katalyseren (zie boven). Het zuurstofradicaalgenererend herbicide paraquat heeft echter geen invloed op deze omzettingstap in de ethyleenbiosynthese. Wij hebben goede argumenten om aan te nemen dat de stijging van de ethyleenproductie onder invloed van paraquat eerder kan beschouwd worden als een vorm van stressethyleen (zie 6.4).

We kunnen uit deze proeven concluderen dat toediening van chemicaliën allerlei neveneffecten veroorzaakt. Andere experimenten zijn aangewezen om de betrokkenheid van fotosynthetisch geproduceerde vrije zuurstofradicalen bij de lichtgestimuleerde ethyleenproductie van intacte groene planten te onderzoeken.

Verdere proeven naar de relatie fotosynthese-lichtgestimuleerde ethyleenproductie werden uitgevoerd zonder toevoegen van chemicaliën. De stimulering van de ethyleenproductie door licht werd vergeleken bij :

1. fotosynthetiserende planten en hun mutanten, die fotosynthetisch deficiënt zijn,
2. fotosynthetisch actieve (bladeren en stengel) en inactieve (wortel) delen van eenzelfde plant.

Deze experimenten toonden aan dat W licht de ethyleenproductie stimuleert zowel bij groene fotosynthetiserende als bij albino, niet-fotosynthetiserende

maïskiemplanten (fig. 6.1). Bij *Phaseolus vulgaris* kiemplanten verhoogt W licht de ethyleenproductie niet alleen bij de fotosynthetisch actieve organen (bladeren en stengel) (fig. 6.7 en fig. 6.11) maar ook bij de wortel (fig. 6.8 en fig. 6.12), die uiteraard niet fotosynthetiseert. In beide plantedelen wordt eveneens een verhoging van de omzetting van ACC naar ethyleen onder invloed van W licht waargenomen (fig. 6.13 en 6.14). Een mogelijk effect van licht op de ACC en/of M-ACC vorming werd niet onderzocht. Wij toonden ook aan dat bij intacte groene bonekiemplanten exogeen toegediend ACC acropetaal van de wortel naar de bovengrondse delen kan getransporteerd worden (fig. 6.14). Een basipetaal transport van bladeren naar wortel treedt niet op (fig. 6.13). De verhoogde ethyleenproductie door bladeren in licht kan dus ten dele het gevolg zijn van een verhoogde ACC toevoer uit medebelichte wortels. De resultaten bekomen bij de albino maïsplanten enerzijds, en bij de wortel van de boneplanten anderzijds, tonen aan dat de lichtstimulering van de ethyleenproductie niet via de fotosynthese gebeurt.

Andere fotoreceptoren dan de fotosynthesepigmenten zijn daarom betrokken bij de lichtregulatie van de ethyleenbiosynthese. Wij onderzochten in enkele oriënterende proeven de mogelijke invloed van fytochroom en cryptochroom. De experimenten werden uitgevoerd met intacte groene bonekiemplanten (tabel 7.1) en intacte groen- of witbladige maïskiemplanten (tabel 7.2). Rood licht (PAR : $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) heeft geen effect op de ethyleenproductie in beide plantesoorten. Blauw licht (PAR : $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), daarentegen, induceert zowel bij boon als bij maïs een sterkere verhoging van de ethyleenproductie dan W licht (PAR : $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Uit deze preliminaire resultaten samen met de resultaten bekomen door Vangronsveld (1990) (zie 7.4) kunnen we besluiten dat fytochroom wellicht geen rechtstreekse rol vervult bij het lichteffect op de ethyleenproductie. Een mogelijke rol van cryptochroom bij de ethyleensynthese is niet uitgesloten. Of deze conclusies terecht zijn, moeten verdere onderzoeken aantonen.

Referenties

- Abeles, F.B. 1966. Auxin stimulation of ethylene evolution. - *Plant Physiol.* 41, 585-588.
- Abeles, F.B. 1973. Ethylene in plant biology. - Academic Press, New York, p. 87-102.
- Acaster, M.A. and Kende, H. 1983. Properties and partial purification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. - *Plant Physiol.* 72, 139-145.
- Acosta, M., Arnao, M.B., Casas, J.L., Del Río, J.A., Vioque, B. and Fernández-Maculel, J.C. 1991a. Mechanism of ACC oxidation by peroxidase. - In : *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* (J. Lobarzewski, H. Greppin, C. Penel and Th. Gaspar, eds.). University of Geneva, p. 121-124.
- Acosta, M., Casas, J.L., Arnao, M.B. and Sabater, F. 1991b. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid as a substrate of peroxidase : conditions for oxygen consumption, hydroperoxide generation and ethylene production. - *Biochimica et Biophysica Acta* 1077, 273-280.
- Adams, D.O. and Yang, S.F. 1977. Methionine metabolism in apple tissue. Implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. - *Plant Physiol.* 60, 892-896.
- Adams, D.O. and Yang, S.F. 1979. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. - *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 170-174.
- Aharoni, N., Anderson, J.D. and Lieberman, M. 1979. Production and action of ethylene in senescing leaf discs. Effect of indoleacetic acid, kinetin, silver ion, and carbon dioxide. - *Plant Physiol.* 64, 805-809.
- Amrhein, N., Breuing, F., Eberle, J., Skorupka, H. and Tophof, S. 1982. The metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. - In : *Plant Growth Substances* (P. Wareing, ed.), Academic Press, p. 249-258.
- Amrhein, N., Forreiter, C., Kionka, C., Skorupka, H. and Tophof, S. 1987. Metabolism, and its compartmentation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant cells. - In :

- Proceedings of "The International Symposium Conjugated Plant Hormones - Structure, Metabolism and Function" (K. Schreiber, H.R. Schutte and G. Sembder, eds.). Gera, GDR, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, p. 102-109.
- Amrhein, N., Schneebeck, D., Skorupka, H., Stockigt, J. and Tophof, S. 1981. Identification of a major metabolite of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in higher plants. - *Naturwissenschaften* 68, 619-620.
- Apelbaum, A., Burgoon, A.C., Anderson, J.D. and Lieberman, M. Ben-Arie, R. and Mattoo, A.K. 1981c. Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher plant tissue and fruit protoplasts. - *Plant Physiol.* 68, 453-456.
- Apelbaum, A., Burgoon, A.C., Anderson, J.D., Solomos, T. and Lieberman, M. 1981a. Some characteristics of the system converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. - *Plant Physiol.* 67, 80-84.
- Apelbaum, A., Wang, S.Y., Burgoon, A.C., Baker, J.E. and Lieberman, M. 1981b. Inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by structural analogs, inhibitors of electron transport, uncouplers of oxidative phosphorylation, and free radical scavengers. - *Plant Physiol.* 67, 74-79.
- Asard, H. 1991. Blue light perception in higher plants. Studies on ATPase activities and redox components at the plasma membrane level. - Doctoraatsthesis, U.A., Antwerpen.
- Babbs, C.F., Pham, J.A. and Coolbaugh, R.C. 1989. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. - *Plant Physiol.* 90, 1267-1270.
- Baker, J.E., Lieberman, M. and Anderson, J.D. 1978. Inhibition of ethylene production in fruit slices by a rhizobitoxine analog and free radical scavengers. - *Plant Physiol.* 61, 886-888.
- Baker, J.E., Wang, C.Y., Lieberman, M. and Hardenburg, R. 1977. Delay of senescence in carnations by a rhizobitoxine analog and sodium benzoate. - *HortScience* 12, 38-39.
- Bassi, P.K. and Spencer, M.S. 1982. Effect of carbon dioxide and light on ethylene production in intact sunflower plants. - *Plant Physiol.* 69, 1222-1225.

- Bassi, P.K. and Spencer, M.S. 1983. Does light inhibit ethylene production in leaves ? - *Plant Physiol.* 73, 758-760.
- Baur, A.H., Yang, S.F., Pratt, H.K. and Biale, J.B. 1971. Ethylene biosynthesis in fruit tissues. - *Plant Physiol.* 47, 696-699.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1970. A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. - *The Journal of Biological Chemistry* 245(18), 4641-4646.
- Bengochea, T., Acaster, M.A., Dodds, J.H., Evans, D.E., Jerie, P.H. and Hall, M.A. 1980b. Studies on ethylene binding by cell-free preparations from cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. II. Effects of structural analogues of ethylene and of inhibitors. - *Planta* 148, 407-411.
- Bengochea, T., Dodds, J.H., Evans, D.E., Jerie, P.H., Niepel, B., Shaari, A.R. and Hall, M.A. 1980a. Studies on ethylene binding by cell-free preparations from cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. I. Separation and characterization. - *Planta* 148, 397-406.
- Beyer, E.M.Jr. 1973. Abscission : A support for a role of ethylene modification of auxin transport. - *Plant Physiol.* 52, 1-5.
- Beyer, E.M.Jr. 1975a. $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$: its incorporation and metabolism by pea seedlings under aseptic conditions. - *Plant Physiol.* 56, 275-278.
- Beyer, E.M.Jr. 1975b. Abscission: the initial effect of ethylene is in the leaf blade. - *Plant Physiol.* 64, 971-974.
- Beyer, E.M.Jr. 1976. A potent inhibitor of ethylene action in plants. - *Plant Physiol.* 58, 268-271.
- Beyer, E.M.Jr. 1977. $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$: its incorporation and oxidation to $^{14}\text{CO}_2$ by cut carnations. - *Plant Physiol.* 60, 203-206.
- Beyer, E.M.Jr. 1978. Rapid metabolism of propylene by pea seedlings. - *Plant Physiol.* 61, 893-895.
- Beyer, E.M.Jr. 1979a. Effects of silver ion, carbon dioxide and oxygen on ethylene action and metabolism. - *Plant Physiol.* 63, 169-173.

- Beyer, E.M. Jr. 1979b. (^{14}C)ethylene metabolism during leaf abscission in cotton. - *Plant Physiol.* 64, 971-974.
- Beyer, E.M.Jr. 1980. Recent advances in ethylene metabolism. - In : *Aspects and Prospects of Plant Growth Regulation*, Dutch Plant Growth Regulator Group/British Plant Growth Regulator Group, Monogr. 6 (B. Jeffcoat, ed.). Wessex Press, Wantage, UK, p. 35-69.
- Beyer, E.M.Jr. 1984. Why do plants metabolize ethylene ? - In : *Ethylene : Biochemical, Physiological and Applied Aspects* (Y. Fuchs and E. Chalutz, eds.). Dr. W. Junk Publishers, The Hague, p. 65-74.
- Beyer, E.M.Jr. and Blomstrom, D.C. 1980. Ethylene metabolism and possible physiological role in plants. - In : *Plant Growth Substances* (F. Skoog, ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 208-218.
- Beyer, E.M.Jr. and Morgan, P.W. 1969. Time sequence of the effect of ethylene on transport, uptake and decarboxylation of auxin. - *Plant Cell Physiol.* 10, 787-799.
- Beyer, E.M.Jr. and Sundin, O. 1978. $^{14}\text{C}_2\text{H}_4$ metabolism in morning glory flowers. - *Plant Physiol.* 61, 896-899.
- Biggs, M.S., Woodson, W.R. and Handa, A.K. 1988. Biochemical basis of high-temperature inhibition of ethylene biosynthesis in ripening tomato fruits. - *Physiol. Plant.* 72, 572-578.
- Bleecker, A.B., Kenyon, W.H., Somerville, S.C. and Kende, H. 1986. Use of monoclonal antibodies in the purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, an enzyme in ethylene biosynthesis. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7755-7759.
- Bleecker, A.B., Robinson, G. and Kende, H. 1988. Studies on the regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato using monoclonal antibodies. - *Planta* 173, 385-390.
- Böger, P. and Kunert, K.J. 1978. Phytotoxic action of paraquat on the photosynthetic apparatus. - *Z. Naturforsch.* 33c, 688-694.

- Boller, T. 1985. Time-dependent inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by its substrate, S-adenosylmethionine. - In : The 12th International Conference on Plant Growth Substances. Heidelberg. Book of abstracts, pp. 36.
- Boller, T., Herner, R.C. and Kende, H. 1979. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. - *Planta* 145, 293-303.
- Botella, J.R., Schlagnhauer, C.D., Arteca, R.N. and Phillips, A.T. 1992. Identification and characterization of three putative genes for 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase from etiolated mung bean hypocotyl segments. - *Plant Molecular Biology* 18, 793-797.
- Bousquet, J.F. and Thimann, K.V. 1984. Lipid peroxidation forms ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and may operate in leaf senescence. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1724-1727.
- Bouzayen, M., Cooper, W., Barry, C., Hamilton, A. and Grierson, D. 1993. EFE multigenes family in tomato plants : expression and characterization. - In : Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene (J.C. Pech, A. Latché and C. Balagué, eds.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands, p. 76-81.
- Bouzayen, M., Felix, G., Latché, A., Pech, J.C. and Boller, T. 1991. Iron : an essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. - *Planta* 184, 244-247.
- Bouzayen, M., Hamilton, A., Picton, S., Barton, S. and Grierson, D. 1992. Identification of genes for the ethylene-forming enzyme and inhibition of ethylene synthesis in transgenic plants using antisense genes. - *Biochemical Society Transactions* 20.
- Bouzayen, M., Latché, A., Alibert, G. and Pech, J.C. 1988. Intracellular sites of synthesis and storage of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in *Acer pseudoplatanus* cells. - *Plant Physiol.* 88, 613-614.
- Bouzayen, M., Latché, A., Pech, J.C. and Marigo, G. 1989. Carrier-mediated uptake of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in vacuoles isolated from *Catharanthus roseus* cells. - *Plant Physiol.* 91, 1317-1322.

Brown, J.H., Legge, R.L., Sisler, E.C., Baker, J.E. and Thompson, J.E. 1986. Ethylene binding to senescing carnation petals. - *Journal of Experimental Botany* 37(177), 526-534.

Buesher, R.W. 1979. Influence of carbon dioxide on postharvest ripening and deterioration of tomatoes. - *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104, 545-547.

Bufler, G. 1986. Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. - *Plant Physiol.* 80, 539-543.

Bühler, B., Drumm, H. and Mohr, H. 1978. Investigations on the role of ethylene in phytochrome-mediated photomorphogenesis. I. Anthocyanin synthesis. - *Planta* 142, 109-117.

Burg, S.P. 1962. The physiology of ethylene formation. - *Annu. Rev. Plant Physiol.* 13, 265-300.

Burg, S.P. 1973. Ethylene in plant growth. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 591-597.

Burg, S.P. and Burg, E.A. 1965. Ethylene action and the ripening of fruits. - *Science* 148, 1190-1196.

Burg, S.P. and Burg, E.A. 1966. The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55, 262-269.

Burg, S.P. and Burg, E.A. 1967. Molecular requirements for the biological activity of ethylene. - *Plant Physiol.* 42, 144-152.

Burg, S.P. and Burg, E.A. 1968. Ethylene formation in pea seedlings : its relation to the inhibition of bud growth caused by indole-3-acetic acid. - *Plant Physiol.* 43, 1069-1074.

Burg, S.P. and Burg, E.A. 1969. Interaction of ethylene, oxygen and carbon dioxide in the control of fruit ripening. - *Qual. Plant Mater. Veg.* 19, 185-200.

Burg, S.P. and Clagett C.O. 1967. Conversion of methionine to ethylene in vegetative tissue and fruits. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 125-130.

- Burg, S.P. and Stolwijk, J.A.J. 1959. A highly sensitive katharometer and its application to the measurement of ethylene and other gases of biological importance. - J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 1, 245-259.
- Burg, S.P. and Thimann, K.V. 1959. The physiology of ethylene in apples. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45, 335-344.
- Cameron, A.C., Fenton, C.A.C., Yu, Y., Adams, D.O. and Yang, S.F. 1979. Increased production of ethylene by plant tissues treated with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. - HortScience 14(2), 178-180.
- Chang, C., Bleecker, A.B., Kwok, S.F. and Meyerowitz, E.M. 1992. Molecular cloning approach for a putative ethylene receptor gene in *Arabidopsis*. - Plant Hormones and their Receptors, 73-75.
- Chaves, A.R. and Tomás, J.O. 1984. Effect of a brief CO₂ exposure on ethylene production. - Plant Physiol. 76, 88-91.
- Chen, C.T. and Kao, C.H. 1990. Comparative study of the metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and senescence of water-stressed and ABA-treated excised rice leaves. - Plant Cell Physiol. 31(4), 463-468.
- Chen, Y.M. and Wellburn, A.R. 1989. Enhanced ethylene emissions from red and Norway spruce exposed to acidic mists. - Plant Physiol. 91, 357-361.
- Cheverry, J.L., Sy, M.O., Pouliqueen, J. and Marcellin, P. 1988. Regulation by CO₂ of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conversion to ethylene in climacteric fruits. - Physiol. Plant. 73, 535-540.
- Christoffersen, R.E., McGarvey, D.J. and Savarese, P. 1993. Biochemical and molecular characterization of ethylene forming enzyme from avocado. - In : Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene (J.C. Pech, A. Latché and C. Balagué, eds.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands, p. 65-70.
- Chrominski, A., Khan, M.A., Weber, D.J. and Smith, B.N. 1986. Ethylene and ethane production in response to salinity stress. - Plant, Cell and Environment 9, 687-691.

- Cook, D., Rasche, M. and Eisinger, W. 1985. Regulation of ethylene biosynthesis and action in cut carnation flower senescence by cytokinins. - J. Am. Soc. Hortic. Sci. 110, 24-27.
- Cooper, W.C., Rasmussen, G.K. and Waldon, E.S. 1969. Ethylene evolution stimulated by chilling in citrus and *Persea* sp. - Plant Physiol. 44, 1194-1196.
- Cousins, H.H. 1910. III. Agricultural experiments. Citrus. - Ann. Rept. Jamaica Dept. Agric., p.7.
- Craker, L.G. and Abeles, F.B. 1969. Abscission : role of abscisic acid. - Plant Physiol. 44, 1144-1149.
- Craker, L.E., Abeles, F.B. and Shropshire, W. Jr. 1973. Light-induced ethylene production in *Sorghum*. - Plant Physiol. 51, 1082-1083.
- Crocker, W., Hitchcock, A.E. and Zimmerman, P.W. 1935. Similarities in the effects of ethylene and the plant auxins. - Contrib. Boyce Thompson Inst. 7, 231-248.
- Davies, K.M. and Grierson, D. 1989. Identification of cDNA clones for tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mRNAs that accumulate during fruit ripening and leaf senescence in response to ethylene. - Planta 179, 73-80.
- De Greef, J., De Proft, M. and De Winter, F. 1976. Gas chromatographic determination of ethylene in large air volumes at the fractional parts-per-billion level. - Analytical Chemistry 48(1), 38-41.
- De Greef, J.A. and De Proft, M. 1978. Kinetic-measurements of small ethylene changes in an open system designed for plant physiological studies. - Physiol. Plant. 42, 79-84.
- De Greef, J.A., Jacobs, L. and De Proft, M. 1980. Ethylene release of *Gusmania lingulata* var. minor influenced by environmental factors. - In : Aspects and Prospects of Plant Growth Regulators (B. Jeffcoat, ed.). Monograph no 6, British Plant Growth Regulator Group, London, pp. 20.
- Dei, M. 1981. Evidence that ethylene is not involved in red-light stimulation of chlorophyll formation in etiolated cucumber seedlings. - Plant Cell Physiol. 22, 699-707.

- de Laat, A.M.M., Brandenburg, D.C.C. and van Loon, L.C. 1981. The modulation of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by light. - *Planta* 153, 193-200.
- de Laat, A.M.M. and Van Loon, L.C. 1981. Regulation of ethylene biosynthesis in virus infected tobacco leaves. I. Determination of the role of methionine as a precursor of ethylene. - *Plant Physiol.* 68, 256-260.
- De Proft, M. P. 1983. Een nieuwe uiterst gevoelige ethyleendoserings-methode voor kinetische studies in de plantenfysiologie. - Doctoraatsthesis, UIA, Antwerpen.
- De Proft, M., Van Dijck, R., Jacobs, L. and De Greef, J.A. 1984. Higher accuracy of ACC measurements with adapted assay. - *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 92, pp. 29.
- Dhawan, K.R., Bassi, P.K. and Spencer, M.S. 1981. Effects of carbon dioxide on ethylene production and action in intact sunflower plants. - *Plant Physiol.* 68, 831-834.
- Dilley, D.R. and Kuai, J. 1993. Purification and characterization of ACC oxidase and its expression during ripening in apple fruit. - In : *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene* (J.C. Pech, A. Latché and C. Balagué, eds.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands, p. 46-52.
- Diolez, P., De Virville, J.D., Latché, A., Moreau, F., Pech, J.C. and Reid, M. 1986. Role of mitochondria in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in plant tissues. - *Plant Science* 43, 13-17.
- Dodge, A.D. 1975. Some mechanisms of herbicide action. - *Sci. Prog. Oxf.* 62, 447-466.
- Dollwet, H.H.A. 1978. Evidence for superoxide participation in ethylene formation. Superoxide generation from insoluble Cu(I). - *Science of Biology Journal*, January - February issue, 29-31.
- Dong, J.G., Kim, W.T., Yip, W.K., Thompson, G.A., Li, L., Bennett, A.B. and Yang, S.F. 1991b. Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. - *Planta* 185, 38-45.
- Dong, J.G., Yip, W.K. and Yang, S.F. 1991a. Monoclonal antibodies against apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. - *Plant Cell Physiol.* 32(1), 25-31.

- Drolet, G., Dumbroff, E.B., Legge, R.L. and Thompson, J.E. 1986. Radical scavenging properties of polyamines. - *Phytochemistry* 25(2), 367-371.
- Dunlop, J.R. and Morgan, P.W. 1977. Characterization of ethylene/ gibberellic acid control of germination in *Lactuca sativa* L. - *Plant and Cell Physiol.* 18, 561-568.
- Eklund, L. and Collin, A.K. 1991. Microdialysis, a new tool for sampling and manipulating internal ethylene concentration in apples. - *J. Plant Physiol.* 137, 375-377.
- Elstner, E.F. and Konze, J.R. 1976. Effect of point freezing on ethylene and ethane production by sugar beet leaf discs. - *Nature* 263, 351-352.
- Epstein, E. 1982. Level of free and conjugated indole-3-acetic acid in ethylene-treated leaves and callus of olive. - *Physiol. Plant.* 56, 371-373.
- Erez, A. 1977. The effect of different portions of the sunlight spectrum on ethylene evolution in peach (*Prunus persica*) apices. - *Physiol. Plant.* 39, 285-289.
- Ernest, L.C. and Valdovinos, J.G. 1971. Regulation of auxin levels in *Coleus blumei*. - *Plant Physiol.* 48, 402-406.
- Esashi, Y., Ooshima, Y., Abe, M., Kurota, A. and Satoh, S. 1986. CO₂-enhanced C₂H₄ production in tissues of imbibed cocklebur seeds. - *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 417-429.
- Etani, S. and Yoshida, S. 1987. Reversible and irreversible reduction of ACC-dependent ethylene formation in mungbean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek) hypocotyls caused by chilling. - *Plant Physiol.* 28(1), 83-91.
- Evans, D.E., Bengochea, T., Cairns, A.J., Dodds, J.H. and Hall, M.A. 1982. Studies on ethylene binding by cell-free preparations from cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. : subcellular location. - *Plant, Cell and Environment* 5, 101-107.
- Evans, D.E., Smith, A.R., Taylor, J.E. and Hall, M.A. 1984. Ethylene metabolism in *Pisum sativum* L. : kinetic parameters, the effects of propylene, silver and carbon dioxide and comparisons with other systems. - *Plant Growth Regul.* 2, 187-195.
- Farrington, J.A., Ebert, M., Land, E.J. and Fletcher, K. 1973. Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical

with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. - *Biochimica et Biophysica Acta* 314, 372-381.

Field, R.J. 1985. The effect of temperature on ethylene production by plant tissues. - In : *Ethylene and Plant Development* (J.A. Roberts and G.A. Tucker, eds.). Butterworths Publishing, Boston, p. 47-69.

Fuchs, Y. and Lieberman, M. 1968. Effects of kinetin, IAA and gibberellin on ethylene production and their interactions in growth of seedlings. - *Plant Physiol.* 43, 2029-2036.

Fuhrer, J. 1982. Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). - *Plant Physiol.* 70, 162-167.

Fuhrer, J. 1985. Production and release of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Lemna minor* L. in the dark and at different carbon dioxide compensation concentrations. - *J. Plant Physiol.* 117, 307-317.

Fukuda, H. and Ogawa, T. 1991. Microbial ethylene production. - In : *The Plant Hormone Ethylene* (A.K. Mattoo and J.C. Suttle, eds.), CRC Press, Ch. 15, p 279-292.

Gane, R. 1934. Production of ethylene by some ripening fruits. - *Nature* 134, 1008.

Gardner, H.W. and Newton, J.W. 1987. Lipid hydroperoxides in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. - *Phytochemistry* 26(3), 621-626.

Gepstein, S. and Thimann, K.V. 1980. The effect of light on the production of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by leaves. - *Planta* 149, 196-199.

Gertman, E. and Fuchs, V. 1972. Effect of abscisic acid and its interactions with other plant hormones on ethylene production in two plant systems. - *Plant Physiol.* 50, 194-195.

Gillham, D.J. and Dodge, A.D. 1986. Hydrogen-peroxide-scavenging systems within pea chloroplasts. A quantitative study. - *Planta* 167, 246-251.

Gillham, D.J. and Dodge, A.D. 1987. Chloroplast superoxide and hydrogen peroxide scavenging systems from pea leaves : seasonal variations. - *Plant Science* 50, 105-109.

- Goeschl, J.D. and Pratt, H.K. 1968. Regulatory roles of ethylene in the etiolated growth habit of *Pisum sativum*. - In : Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances (F. Wightman and G. Setterfield, eds.). The Runge Press, Ottawa.
- Goeschl, J.D., Pratt, H.K. and Bonner, B.A. 1967. An effect of light on the production of ethylene and the growth of the plumular portion of etiolated pea seedlings. - Plant Physiol. 42, 1077-1080.
- Goeschl, J.D., Rappaport, L. and Pratt, H.K. 1966. Ethylene as a factor regulating the growth of pea epicotyls subjected to physical stress. - Plant Physiol. 41, 877-884.
- Goldschmidt, E.E., Goren, R., Even-Chen, Z. and Bittner, S. 1973. Increase in free and bound abscisic acid during natural and ethylene-induced senescence of citrus fruits peel. - Plant Physiol. 51, 879-882.
- Gora, L. and Clijsters, H. 1989. Effect of copper and zinc on the ethylene metabolism in *Phaseolus vulgaris* L. - In : Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants (H. Clijsters et al., eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 219-228.
- Goren, R., Mattoo, A.K. and Anderson, J.D. 1984. Ethylene binding during leaf development and senescence and its inhibition by silver nitrate. - J. Plant Physiol. 117, 243-248.
- Grodzinski, B. 1984. Enhancement of ethylene release from leaf tissue during glycolate decarboxylation. A possible role for photorespiration. - Plant Physiol. 74, 871-876.
- Grodzinski, B., Boesel, I. and Horton, R.F. 1982a. Ethylene release from leaves of *Xanthium strumarium* L. and *Zea mays* L. - J. Exp. Bot. 33(133), 344-354.
- Grodzinski, B., Boesel, I. and Horton, R.F. 1982b. The effect of light intensity on the release of ethylene from leaves. - J. Exp. Bot. 33(137), 1185-1193.
- Grodzinsky, B., Boesel, I. and Horton, R.F. 1983. Light stimulation of ethylene release from leaves of *Gomphrena globosa* L. - Plant Physiol. 71, 588-593.
- Guy, M. and Kende, H. 1984. Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by isolated vacuoles of *Pisum sativum* L. - Planta 160, 281-287.

- Hall, M.A., Smith, A.R., Thomas, C.J.R. and Howarth, C.J. 1984. Binding sites for ethylene. - In : *Ethylene : Biochemical, Physiological and Applied Aspects* (Y. Fuchs and E. Chalutz, eds.). Dr. W. Junk Publishers, The Hague, p. 55-63.
- Halliwell, B. 1984. Toxic effects of oxygen on plant tissues. - In : *Chloroplast Metabolism : the structure and function of chloroplasts in green leaf cells* (B. Halliwell, ed.), Clarendon Press, Oxford, ISBN 0-19-854585-1, p. 180-207.
- Hamilton, A.J., Bouzayen, M. and Grierson, D. 1991. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7434-7437.
- Hamilton, A.J., Lycett, G.W. and Grierson, D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. - *Nature (London)* 346, 284-287.
- Hanley, K.M., Meir, S. and Bramlage, W.J. 1989. Activity of ageing carnation flower parts and the effects of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid-induced ethylene. - *Plant Physiol.* 91, 1126-1130.
- Hiller, R.G., Møller, B.L. and Høyer-Hansen, G. 1980. Characterization of six putative photosystem I mutants in barley. - *Carlsberg Res. Commun.* 45, 315-328.
- Hoffman, N.E., Liu, Y. and Yang, S.F. 1983. Changes in 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid content in wilted wheat leaves in relation to their ethylene production rates and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content. - *Planta* 157, 518-523.
- Hoffman, N.E. and Yang, S.F. 1982. Identification of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. - *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 104, 765-770.
- Hoffman, N.E., Yang, S.F., Ichihara, A. and Sakamura, S. 1982. Stereo-specific conversion of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid to ethylene by plant tissues. Conversion of stereoisomers of 1-amino-2-ethylcyclopropane-carboxylic acid to 1-butene. - *Plant Physiol.* 70, 195-199.
- Hogsett, W.E., Raba, R.M. and Tingey, D.T. 1981. Biosynthesis of stress ethylene in soybean seedlings: similarities to endogenous ethylene biosynthesis. - *Physiol. Plant.* 53, 307-314.

- Holdsworth, M.J., Bird, C.R., Ray, J., Schuch, W. and Grierson, D. 1987. Structure and expression of an ethylene-related mRNA from tomato. - *Nucleic Acids Res.* 15, 731-739.
- Horiuchi, Y. and Imaseki, H. 1986. High temperature sensitivity of auxin-induced ethylene production in mung bean hypocotyl sections. - *Plant Cell Physiol.* 27, 453-461.
- Horton, R.F. and Saville, B.J. 1984. Carbon dioxide enrichment, transpiration and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid - dependent ethylene release from oat leaves. - *Plant Science Letters* 36, 131-135.
- Huang, P.L., Parks, J.E., Rottmann, W.H. and Theologis, A. 1991. Two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in zucchini (*Cucurbita pepo*) are clustered and similar but differentially regulated. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7021-7025.
- Huelin, F.E. and Kennett, B.H. 1959. Nature of the olefines produced by apples. - *Nature* 184, 196-200.
- Hyodo, H. and Tanaka, K. 1986. Inhibition of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity by polyamines, their related compounds and metabolites of S-adenosyl-methionine. - *Plant Cell Physiol.* 27(3), 391-398.
- Hyodo, H., Tanaka, K. and Suzuki, T. 1991. Wound-induced ethylene synthesis and its involvement in enzyme induction in mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. - *Postharvest Biology and Technology* 1, 127-136.
- Ilag, L. and Curtis, R. 1968. Production of ethylene by fungi. - *Science* 159, 1357.
- Imaseki, H., Kondo, K. and Watanabe, A. 1975. Mechanism of cytokinin action on auxin-induced ethylene production. - *Plant Cell Physiol.* 16, 777-787.
- Imaseki, H., Pjon, C.J. and Furuya, M. 1971. Phytochrome action in *Oryza sativa* L. IV. Red and far-red reversible effect on the production of ethylene. - *Plant Physiol.* 48, 241-244.
- Imaseki, H. and Watanabe, A. 1978. Inhibition of ethylene production by osmotic shock. Further evidence for membrane control of ethylene production. - *Plant Cell Physiol.* 19, 345-348.

- Jerie, P.H. and Hall, M.A. 1978. The identification of ethylene oxide as a major metabolite of ethylene in *Vicia faba* L. - Proc. R. Soc. London Ser. B200, 87-94.
- Jiao, X.Z., Yip, W.K. and Yang, S.F. 1987. The effect of light and phytochrome on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid metabolism in etiolated wheat seedling leaves. - Plant Physiol. 85, 643-647.
- Jiao, X.Z., Philosoph-Hadas, S., Su, L.Y. and Yang, S.F. 1986. The conversion of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant tissues. - Plant Physiol. 81, 637-641.
- John, P., Porter, A.J.R. and Miller, A.J. 1985. Activity of the ethylene-forming enzyme measured *in vivo* at different cell potentials. - J. Plant Physiol. 121, 397-406.
- Jones, J.F. and Kende, H. 1979. Auxin-induced ethylene biosynthesis in subapical stem sections of etiolated seedlings of *Pisum sativum* L. - Planta 146, 649-656.
- Kacperska, A. and Kubacka-Zebalska, M. 1985. Is lipoxygenase involved in the formation of ethylene from ACC ? - Physiol. Plant. 64, 333-338.
- Kacperska, A. and Kubacka-Zebalska, M. 1989. Stress ethylene metabolism as related to degree of tissue injury. - In : Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants (H. Clijsters et al., eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 211-218.
- Kang, B.G. and Ray, P.M. 1969. Role of growth regulators in the bean hypocotyl hook opening response. - Planta 87, 193-205.
- Kao, C.H. and Yang, S.F. 1982. Light inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in leaves is mediated through carbon dioxide. - Planta 155, 261-266.
- Kende, H. and Boller, T. 1981. Wound ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in ripening tomato fruit. - Planta 151, 476-481.
- Ketring, D.L. and Morgan, P.W. 1969. Ethylene as a component of the emanations from germinating peanut seeds and its effect on dormant viginia-type seeds. - Plant Physiol. 44, 326-330.

- Kevers, C., Goldberg, R., Van Den Driessche, T. and Gaspar, T. 1992. A relationship between ascorbate peroxidase activity and the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene. - J. Plant Physiol. 139, 379-381.
- Kidd, F. and West, C. 1934. The influence of the composition of the atmosphere upon the incidence of the climacteric in apples. - GB Dept. Sci. Ind. Res. Rept. Food Invest. Board 1933, 51-57.
- Kimmerer, T.W. and Kozlowski, T. 1982. Ethylene, ethane, acetaldehyde and ethanol production by plants under stress. - Plant Physiol. 69, 840-847.
- Kionka, C. and Amrhein, N. 1984. The enzymatic malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of mungbean hypocotyls. - Planta 162, 226-235.
- Kobayashi, K., Fuchigami, L.H. and Brainerd, K.E. 1981. Ethylene and ethane production and electrolyte leakage of water-stressed 'Pixy' plum leaves. - HortScience 16(1), 57-59.
- Kondo, K., Watanabe, A. and Imaseki, H. 1975. Relationships in actions of indoleacetic acid, benzyladenine and abscisic acid in ethylene production. - Plant Cell Physiol. 16, 1001-1007.
- Konze, J.R., Jones, J.F., Boller, T. and Kende, H. 1980. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid on production of ethylene in senescing flowers of *Ipomoea tricolor*. - Plant Physiol. 66, 566-571.
- Konze, J.R. and Kende, H. 1979a. Interactions of methionine and seleno-methionine with methionine adenosyltransferase and ethylene-generating systems. - Plant Physiol. 63, 507-510.
- Konze, J.R. and Kende, H. 1979b. Ethylene formation from 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid in homogenates of etiolated pea seedlings. - Planta 146, 293-301.
- Konze, J.R. and Kwiatkowski, G.M.K. 1981. Rapidly induced ethylene formation after wounding is controlled by the regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. - Planta 151, 327-330.
- Konze, J.R., Schilling, N. and Kende, H. 1978. Enhancement of ethylene formation by selenoamino acids. - Plant Physiol. 62, 397-401.

- Latché, A., Dupille, E., Rombaldi, C., Cleyet-Marel, J.C., Lelièvre, J.M. and Pech, J.C. 1993. Purification, characterization and subcellular localization of ACC oxidase from fruits. - In : Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene (J.C. Pech, A. Latché and C. Balagué, eds.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands, p. 39-45.
- Lau, O.L. and Yang, S.F. 1974. Synergistic effect of calcium and kinetin on ethylene production by the mungbean hypocotyl. - *Planta* 118, 1-6.
- Legge, R.L. and Thompson, J.E. 1983. Involvement of hydroperoxides and an ACC-derived free radical in the formation of ethylene. - *Phytochemistry* 22(10), 2161-2166.
- Legge, R.L., Thompson, J.E. and Baker, J.E. 1982. Free radical-mediated formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid : a spin-trap study. - *Plant and Cell Physiol.* 23(2), 171-177.
- Li, N., Parsons, B.L., Liu, D. and Mattoo, A.K. 1992. Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. - *Plant Molecular Biology* 18, 477-487.
- Lieberman, M. 1979. Biosynthesis and action of ethylene. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30, 533-591.
- Lieberman, M. and Knecht, E. 1977. Influence of ethylene on indole-3-acetic acid concentration in etiolated pea epicotyl tissue. - *Plant Physiol.* 60, 475-477.
- Lieberman, M. and Kunishi, A. 1971. Abscissic acid and ethylene production. - *Plant Physiol. Ann. Suppl.* 47, 22.
- Lieberman, M. and Kunishi, A.T. 1975. Ethylene-forming systems in etiolated pea seedlings and apple tissue. - *Plant Physiol.* 55, 1074-1078.
- Lieberman, M. and Mapson, L.W. 1964. Genesis and biogenesis of ethylene. - *Nature* 204, 343-345.
- Lieberman, M., Kunishi, A., Mapson, L.W. and Wardale, D.A. 1966. Stimulation of ethylene production in apple tissue slices by methionine. - *Plant Physiol.* 41, 376-382.

- Liu, Y., Hoffman, N.E. and Yang, S.F. 1985a. Ethylene-promoted malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid participates in auto-inhibition of ethylene synthesis in grapefruit flavedo discs. - *Planta* 164, 565-568.
- Liu, Y., Hoffman, N.E. and Yang, S.F. 1985c. Promotion by ethylene of the capability to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in preclimacteric tomato and cantaloupe fruits. - *Plant Physiol.* 77, 407-411.
- Liu, Y., Su, L.Y. and Yang, S.F. 1984. Metabolism of α -aminoisobutyric acid in mungbean hypocotyls in relation to metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. - *Planta* 161, 439-443.
- Liu, Y., Su, L.Y. and Yang, S.F. 1985b. Ethylene promotes the capability to malonylate 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-amino acids in preclimacteric tomato fruits. - *Plant Physiol.* 77, 891-895.
- Lizada, M.C.C. and Yang, S.F. 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. - *Anal. Biochem.* 100, 140-145.
- Lürssen, K., Naumann, K. and Schroder, R. 1979. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid - an intermediate of the ethylene biosynthesis in higher plants. - *Z. Pflanzenphysiol.* 92, 285-294.
- Lynch, D.V., Scridhara, S. and Thompson, J.E. 1985. Lipxygenase-generated hydroperoxides account for the nonphysiological features of ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes of carnations. - *Planta* 164, 121-125.
- Matheussen, A. 1988. Ethyleen, ACC en M-ACC in het zaad en de jonge sporofyt van *Phaseolus vulgaris* L. - Doctoraatsthesis, U.I.A., Antwerpen.
- Mattoo, A.K., Baker, J.E. and Moline, H.E. 1986. Induction by copper ions of ethylene production in *Spirodela oligorrhiza* : evidence for a pathway independent of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. - *J. Plant Physiol.* 123, 193-202.
- Mattoo, A.K., Mehta, R.A. and Baker, J.E. 1992. Copper-induced ethylene biosynthesis in terrestrial (*Nicotiana tabacum*) and aquatic (*Spirodela oligorrhiza*) higher plants. - *Phytochemistry* 31(2), 405-409.

- Mayak, S. and Dilley, D.R. 1976. Regulation of senescence in carnation (*Dianthus caryophyllus*). Effect of abscisic acid and carbon dioxide on ethylene production. - *Plant Physiol.* 58, 663-665.
- Mayak, S., Legge, R.L. and Thompson, J.E. 1981. Ethylene formation from 1-amino-cyclo-propane-1-carboxylic acid by microsomal membranes from senescing carnation flowers. - *Planta* 153, 49-55.
- McKeon, T.A. and Yang, S.F. 1984. A comparison of the conversion of 1-amino-2-ethylcyclopropane-1-carboxylic acid stereoisomers to 1-butene by pea epicotyls and by a cell-free system. - *Planta* 160, 84-87.
- McMichael, B.L., Jordan, W.R. and Powell, R.D. 1972. An effect of water stress on ethylene production by intact cotton petioles. - *Plant Physiol.* 49, 658-660.
- McRae, D.G., Baker, J.E. and Thompson, J.E. 1982. Evidence for the involvement of the superoxide radical in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by pea microsomal membranes. - *Plant and Cell Physiol.* 23(3), 375-383.
- McRae, D.G., Coker, J.A., Legge, R.L. and Thompson, J.E. 1983. Bicarbonate/CO₂-facilitated conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in model systems and intact tissues. - *Plant Physiol.* 73, 784-790.
- Mehlhorn, H., O'Shea, J.M. and Wellburn, A.R. 1991. Atmospheric ozone interacts with stress ethylene formation by plants to cause visible plant injury. - *Journal of Experimental Botany* 42(234), 17-24.
- Mehta, A.M., Jordan, R.L., Anderson, J.D. and Mattoo, A.K. 1988. Identification of a unique isoform of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by monoclonal antibody. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8810-8814.
- Michener, M.D. 1938. The action of ethylene in plant growth. - *Amer. J. Bot.* 25, 711-720.
- Mor, Y., Spiegelstein, H. and Halevy, A.H. 1983. Inhibition of ethylene biosynthesis in carnation petals by cytokinin. - *Plant Physiol.* 71, 541-546.

- Morgan, P.W. and Durham, J.I. 1975. Ethylene induced leaf abscission is promoted by gibberellic acid. - *Plant Physiol.* 55, 308-311.
- Morgan, P.W., He, C.J., De Greef, J.A. and De Proft, M. 1990. Does water deficit stress promote ethylene synthesis by intact plants ? - *Plant Physiol.* 94, 1616-1624.
- Mori, H., Nakagawa, N., Ono, T., Yamagishi, N. and Imaseki, H. 1993. Structural characteristics of ACC synthase isozymes and differential expression of their genes. - In : *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene* (J.C. Pech, A. Latché and C. Balagué, eds.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands, p. 1-6.
- Murr, D.P. and Yang, S.F. 1975. Inhibition of *in vivo* conversion of methionine to ethylene by L-canaline and 2,4-dinitrofenol. - *Plant Physiol.* 55, 79-82.
- Nagahama, K., Ogawa, T., Fugii, T. and Fukuda, H. 1992. Classification of ethylene-producing bacteria in terms of biosynthetic pathways to ethylene. - *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73(1), 1-5.
- Nakagawa, N., Nakajima, N. and Imaseki, H. 1988. Immunochemical difference of wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from the auxin-induced enzyme. - *Plant Cell Physiol.* 29(7), 1255-1259.
- Nakajima, N. and Imaseki, H. 1986. Purification and properties of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase of mesocarp of *Cucurbita maxima* Duch. fruits. - *Plant Cell Physiol.* 27(6), 969-980.
- Nakajima, N., Mori, H., Yamazaki, K. and Imaseki, H. 1990. Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding. - *Plant Cell Physiol.* 31, 1021-1029.
- Nakajima, N., Nakagawa, N. and Imaseki, H. 1988. Molecular size of wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from *Cucurbita maxima* Duch. and change of translatable mRNA of the enzyme after wounding. - *Plant Cell Physiol.* 29(6), 989-998.
- Nakano, Y. and Edwards, G.E. 1987. Hill reaction, hydrogen peroxide scavenging, and ascorbate peroxidase activity of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of NADP-malic enzyme type C₄ species. - *Plant Physiol.* 85, 294-298.

- Nandi, A. and Chatterjee, I.B. 1987. Scavenging of superoxide radical by ascorbic acid. - J. Biosci. 11(1-4), 435-441.
- Nanni, E.J.Jr., Angelis, C.T., Dickson, J. and Sawyer, D.T. 1981. Oxygen activation by radical coupling between superoxide ion and reduced methyl viologen. - J. Am. Chem. Soc. 103, 4268-4270.
- Neljubov, D. 1901. Über die Horizontale Nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderen Pflanzen. - Beitr. Bot. Zentralbl. 103, 128-139.
- Neta, P. and Dorfman, L.M. 1968. Pulse radiolysis studies. XIII. Rate constants for the reaction of hydroxyl radicals with aromatic compounds in aqueous solutions. - Advan. Chem. Ser. 81, 222-230.
- Nilsen, H.G., Sagstuen, E. and Aarnes, H. 1988. A cell-free ethylene-forming system from barley roots. - J. Plant Physiol. 133, 73-78.
- Olson, D.C., White, J.A., Edelman, L., Harkins, R.N. and Kende, H. 1991. Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5340-5344.
- Osswald, W.F., Schütz, W. and Elstner, E.F. 1989. Indole-3-acetic acid and p-hydroxyacetophenone driven ethylene formation from 1-aminocyclopropanecarboxylic acid catalyzed by horseradish peroxidase. - J. Plant Physiol. 134, 510-513.
- Park, K.Y., Drory, A. and Woodson, W.R. 1992. Molecular cloning of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. - Plant Molecular Biology 18, 377-386.
- Parups, E.V. 1984. Free radical and free radical scavenger effects on indole-3-acetic acid levels and ethylene production. - Physiol. Plant. 60, 149-153.
- Paulin, A., Droillard, M.J. and Burceau, J.M. 1986. Effect of a free radical scavenger, 3,4,5-trichlorophenol, on ethylene production and on changes in lipids and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*). - Physiol. Plant. 67, 465-471.

- Peacock, B.C. 1972. Role of ethylene in the initiation of fruit ripening. - Queensl. J. Agric. Anim. Sci. 29, 137-145.
- Pedreño, M.A., Bouzayen, M., Pech, J.C., Marigo, G. and Latché, A. 1991. Vacuolar release of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid, the conjugated form of the ethylene precursor. - Plant Physiol. 97, 1483-1486.
- Peiser, G. 1989. Effect of 2,5-norbornadiene upon ethylene biosynthesis in midclimacteric carnation flowers. - Plant Physiol. 90, 21-24.
- Philosoph-Hadas, S., Aharoni, N. and Yang, S.F. 1986. Carbon dioxide enhances the development of the ethylene forming enzyme in tobacco leaf discs. - Plant Physiol. 82, 925-929.
- Philosoph-Hadas, S., Meir, S. and Aharoni, N. 1985. Autoinhibition of ethylene production in tobacco leaf discs : enhancement of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation. - Physiol. Plant. 63, 431-437.
- Philosoph-Hadas, S., Meir, S., Pesis, E., Reuveni, A. and Aharoni, N. 1989. Hormone-enhanced ethylene production in leaves. - In : Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants (H. Clijsters et al., eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 135-142.
- Pirrung, M.C. 1986. Mechanism of a lipoxygenase model for ethylene biosynthesis. - Biochemistry 25(1), 114-119.
- Preger, R. and Gepstein, S. 1984. Carbon dioxide-independent and -dependent components of light inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in oat leaves. - Physiol. Plant. 60, 187-191.
- Raskin, I. and Beyer, E.M.Jr. 1989. Role of ethylene metabolism in *Amaranthus retroflexus*. - Plant Physiol. 90, 1-5.
- Rickauer, M., Fournier, J., Pouénat, M.L., Berthelon, E., Bottin, A. and Esquerré-Tugayé, M.T. 1990. Early changes in ethylene synthesis and lipoxygenase activity during defense induction in tobacco cells. - Plant Physiol. Biochem. 28(5), 647-653.

- Riov, J. and Goren, R. 1979. Effects of ethylene on auxin transport and metabolism in midrib sections in relation to leaf abscission of woody plants. - *Plant, Cell Environ.* 2, 83-89.
- Riov, J. and Yang, S.F. 1982. Autoinhibition of ethylene production in citrus peel discs. Suppression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. - *Plant Physiol.* 69, 687-690.
- Riov, J., Dror, N. and Goren, R. 1982. Effects of ethylene on ^{14}C -indole-3-acetic acid metabolism in leaf tissues of woody plants. - *Plant Physiol.* 70, 1265-1270.
- Rodecap, K.D. and Tingey, D.T. 1983. The influence of light on ozone-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene production from intact plants. - *Z. Pflanzenphysiol.* 110, 419-427.
- Rodecap, K.D. and Tingey, D.T. 1986. Ozone-induced ethylene release from leaf surfaces. - *Plant Science* 44, 73-76.
- Rodecap, K.D., Tingey, D.T. and Tibbs, J.H. 1981. Cadmium-induced ethylene production in bean plants. - *Z. Pflanzenphysiol.* 105, 65-74.
- Rohwer, F. and Mäder, M. 1981. The role of peroxidase in ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. - *Z. Pflanzenphysiol.* 104, 363-372.
- Rohwer, F. and Schierle, J. 1982. Effect of light on ethylene production: red light enhancement of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid concentration in etiolated pea shoots. - *Z. Pflanzenphysiol.* 107, 295-300.
- Rohwer, F. and Schierle, J. 1984. Effect of red light on the synthesis of wound ethylene in etiolated pea shoots. - *J. Plant Physiol.* 116, 31-40.
- Rottmann, W.H., Peter, G.F., Oeller, P.W., Keller, J.A., Shen, N.F., Nagy, B.P., Taylor, L.P., Campbell, A.D. and Theologis, A. 1991. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. - *J. Mol. Biol.* 222, 937-961.
- Sagee, O., Goren, R. and Riov, J. 1989. Ethylene induced changes in auxin metabolism in citrus leaf tissues. - In : *Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in*

- Lower and Higher Plants (H. Clijsters et al., eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 157-163.
- Sakai, S. and Imaseki, H. 1971. Auxin-induced ethylene production by mungbean hypocotyl segments. - *Plant Cell Physiol.* 12, 349-359.
- Saltveit, M.E. and Pharr, D.M. 1980. Light-stimulated ethylene production by germinating cucumber seeds. - *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105(3), 364-367.
- Samimy, C. 1978. Effect of light on ethylene production and hypocotyl growth of soybean seedlings. - *Plant Physiol.* 61, 772-774.
- Sanders, I.O., Smith, A.R. and Hall, M.A. 1986. Ethylene metabolism and action. - *Physiol. Plant.* 66, 723-726.
- Sanders, I.O., Smith, A.R. and Hall, M.A. 1989a. The measurement of ethylene binding and metabolism in plant tissue. - *Planta* 179, 97-103.
- Sanders, I.O., Smith, A.R. and Hall, M.A. 1989b. Ethylene metabolism in *Pisum sativum* L. - *Planta* 179, 104-114.
- Sandmann, G. and Böger, P. 1980. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. - *Plant Physiol.* 66, 797-800.
- Sato, T. and Theologis, A. 1989. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6621-6625.
- Sato, T., Oeller, P.W. and Theologis, A. 1991. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase of *Cucurbita*: purification, properties, expression in *Escherichia coli*, and primary structure determination by DNA sequence analysis. - *J. Biol. Chem.* 266, 3752-3759.
- Satoh, S. and Esashi, Y. 1986. Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase of etiolated mung bean hypocotyl segments by its substrate, S-adenosyl-L-methionine. - *Plant Cell Physiol.* 27(2), 285-291.
- Satoh, S. and Yang, S.F. 1988. S-Adenosylmethionine-dependent inactivation and radiolabeling of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isolated from tomato fruits. - *Plant Physiol.* 88, 109-114.

- Scott, P.S. and Leopold, A.C. 1967. Opposing effects of gibberellin and ethylene. - *Plant Physiol.* 42, 1021-1022.
- Simpson, D.J. and von Wettstein, D. 1980. Macromolecular physiology of plastids. XIV. *Viridis* mutants in barley: genetic, fluoroscopic and ultrastructural characterisation. - *Carlsberg Res. Commun.* 45, 283-314.
- Simpson, D.J., Machold, O., Høyer-Hansen, G. and von Wettstein, D. 1985. *Chlorina* mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). - *Carlsberg Res. Commun.* 50, 223-238.
- Sisler, E.C. 1979. Measurement of ethylene binding in plant tissue. - *Plant Physiol.* 64, 538-542.
- Sisler, E.C. 1980. Partial purification of an ethylene-binding component from plant tissue. - *Ibid.* 66, 404-406.
- Sisler, E.C. 1984. Distribution and properties of ethylene-binding component from plant tissue. - In : *Ethylene : Biochemical, Physiological and Applied Aspects* (Y. Fuchs and E. Chalutz, eds.). Dr. W. Junk Publishers, The Hague, p. 45-54.
- Sisler, E.C., Blankenship, S.M., Fearn, J.C. and Hayes, R. 1993. Effect of diazocyclopentadiene (DACP) on cut carnations. - In : *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene* (J.C. Pech, A. Latché and C. Balagué, eds.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands, p. 182-187.
- Sisler, E.C. and Goren, R. 1981. Ethylene binding - the basis for hormone action in plants. - *What's New in Plant Physiol.* 12, 37-40.
- Sisler, E.C. and Wood, C. 1988. Interaction of ethylene and CO₂. - *Physiol. Plant.* 73, 440-444.
- Sisler, E.C. and Yang, S.F. 1984. Anti-ethylene effects of cis-2-butene and cyclic olefins. - *Phytochemistry* 23, 2765-2768.
- Slater, T.F. 1979. Mechanisms of protection against the damage produced in biological systems by oxygen-derived radicals. - In : *Oxygen free radicals and tissue damage*. Ciba Foundation Symposium 65, Excerpta Medica, 143-159.

- Smith, C.J.S., Slater, A. and Grierson, D. 1986. Rapid appearance of an mRNA correlated with ethylene synthesis encoding a protein of molecular weight 35.000. - *Planta* 168, 94-100.
- Smith, J.J. and John, P. 1993. Maximising the activity of the ethylene-forming enzyme. - In : *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene* (J.C. Pech, A. Latché and C. Balagué, eds.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands, p. 33-38.
- Smith, P.G., Venis, M.A. and Hall, M.A. 1985. Oxidation of ethylene by cotyledon extracts from *Vicia faba* L. Cofactor requirements and kinetics. - *Planta* 163, 97-104.
- Spanu, P. and Boller, T. 1989. Ethylene biosynthesis in tomato infected by *Phytophthora infestans*. - In : *Biochemical and Physiological Aspects of Ethylene Production in Lower and Higher Plants* (H. Clijsters et al., eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 255-260.
- Spanu, P., Felix, G. and Boller, T. 1990. Inactivation of stress induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase *in vivo* differs from substrate-dependent inactivation *in vitro*. - *Plant Physiol.* 93, 1482-1485.
- Spanu, P., Reinhardt, D. and Boller, T. 1991. Analysis and cloning of the ethylene-forming enzyme from tomato by functional expression of its mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. - *The EMBO Journal* 10(8), 2007-2013.
- Stewart, R.N., Lieberman, M. and Kunishi, A.T. 1974. Effects of ethylene and gibberellic acid on cellular growth and development in apical and subapical regions of etiolated pea seedlings. - *Plant Physiol.* 54, 1-5.
- Su, L.Y., Liu, Y. and Yang, S.F. 1985. Relationship between 1-aminocyclopropane-carboxylate malonyltransferase and D-amino acid malonyltransferase. - *Phytochemistry* 24(6), 1141-1145.
- Suttle, J.C. 1981. Effect of polyamines on ethylene production. - *Phytochemistry* 20(7), 1477-1480.
- Suttle, J.C. 1986. Cytokinin-induced ethylene biosynthesis in nonsenescent cotton leaves. - *Plant Physiol.* 82, 930-935.

- Taylor, G.E.Jr., Ross-Todd, B.M. and Gunderson, C.A. 1988. Action of ozone on foliar gas exchange in *Glycine max.* L. Merr : a potential role for endogenous stress ethylene. - *New Phytol.* 110, 301-307.
- Thomas, C.J.R., Smith, A.R. and Hall, M.A. 1985. Partial purification of an ethylene-binding site from *Phaseolus vulgaris* L. cotyledons. - *Planta* 164, 272-277.
- Thompson, J.E., Legge, R.L., McRae, D.G. and Covello, P.S. 1984. Model systems for the formation of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. - In : *Ethylene : Biochemical, Physiological and Applied Aspects* (Y. Fuchs and E. Chalutz, eds.). Dr. W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands, p. 21-32.
- Tingey, D.T. 1980. Stress ethylene production : A measure of plant response to stress. - *HortScience* 15, 630-633.
- Tsai, D.S., Arteca, R.N., Arteca, J.M. and Phillips, A.T. 1991. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase purified from mung bean hypocotyls. - *J. Plant Physiol.* 137, 301-306.
- Van Der Straeten, D., Van Wiemeersch, L., Goodman, H.M. and Van Montagu, M. 1989. Purification and partial characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from tomato pericarp. - *Eur. J. Biochem.* 182, 639-647.
- Van Der Straeten, D., Van Wiemeersch, L., Goodman, H.M. and Van Montagu, M. 1990. Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4859-4863.
- Van Genechten, A. 1985. De relatie tussen fotosynthese en de productie van ethyleen bij kiemplanten van *Phaseolus vulgaris* L. - Doctoraatsthesis K.U.L., Leuven.
- Vangronsveld, J. 1990. Lichteffecten op de ethyleen biosynthese bij geëtiolerde en groene *Phaseolus vulgaris* L. kiemplanten. Mogelijke rol tijdens de vroege morfogenese. - Doctoraatsthesis, U.I.A., Antwerpen.
- Vangronsveld, J., Clijsters, H. and Van Poucke, M. 1988. Phytochrome-controlled ethylene biosynthesis of intact etiolated bean seedlings. - *Planta* 174, 19-24.

- Veen, H. 1985. Antagonistic effect of silver thiosulphate or 2,5-norbornadiene on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-stimulated growth of pistils in carnation flowers. - *Physiol. Plant.* 65, 2-8.
- Vendrell, M. and McGlasson, W.B. 1971. Inhibition of ethylene production in banana fruit tissue by ethylene treatment. - *Aust. J. Biol. Sci.* 24, 885-895.
- Venis, M.A. 1984. Cell-free ethylene-forming systems lack stereochemical fidelity. - *Planta* 162, 85-88.
- Veroustraete, F. 1983. Fotobiologische studie van de ethyleenproductie bij *Marchantia polymorpha* L. met behulp van een nieuwe doseringsmethode. - Doctoraatsthesis, U.I.A., Antwerpen.
- Veroustraete, F., Fredericq, H., Van Wiemeersch, L. and De Greef, J. 1982. Specific photoregulation by phytochrome of epinasty and light-induced ethylene production in *Marchantia polymorpha*. - *Photochem. Photobiol.* 35, 261-264.
- Ververidis, P. and John, P. 1991. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. - *Phytochemistry* 30(3), 725-727.
- Wang, H. and Woodson, W.R. 1989. Reversible inhibition of ethylene action and interruption of petal senescence in carnation flowers by norbornadiene. - *Plant Physiol.* 89, 434-438.
- Wang, T.T. and Yang, S.F. 1987. The physiological role of lipoxygenase in ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in oat leaves. - *Planta* 170, 190-196.
- Watanabe, T. and Kondo, N. 1975. Ethylene evolution in marine algae and a proteinaceous inhibitor of ethylene biosynthesis from red algae. - *Plant Cell Physiol.* 17, 1159.
- Woltering, E., Harren, F. and Boerrigter, H.A.M. 1988. Use of a laser-driven photoacoustic detection system for measurement of ethylene production in *Cymbidium* flowers. - *Plant Physiol.* 88, 506-510.

- Wood, B.W. 1985. Effect of ethephon on IAA transport, IAA conjugation and antidotal action of NAA in relation to leaf abscission of pecan. - J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110, 340-343.
- Wright, S.T.C. 1980. The effect of plant growth regulator treatments on the levels of ethylene emanating from excised turgid and wilted wheat leaves. - *Planta* 148, 381-388.
- Wright, S.T.C. 1981. The effect of light and dark periods on the production of ethylene from water-stressed wheat leaves. - *Planta* 153, 172-180.
- Yang, S.F. 1974. The biochemistry of ethylene : biogenesis and metabolism. - *Recent Adv. Phytochem.* 7, 131-164.
- Yang, S.F. 1980. Regulation of ethylene biosynthesis. - *HortScience* 15(3), 238-243.
- Yang, S.F. and Hoffman, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. - *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 155-189.
- Yang, S.F., Dong, J.G., Fernandez-Maculet, J.C. and Olson, D.C. 1993. Apple ACC oxidase : purification and characterization of the enzyme and cloning of its cDNA. - In : *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene* (J.C. Pech, A. Latché and C. Balagué, eds.). Kluwer Academic Publ. Dordrecht, The Netherlands, p. 59-64.
- Yip, W.K., Dong, J.G. and Yang, S.F. 1991. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple fruits. - *Plant Physiol.* 95, 251-257.
- Yip, W.K., Jiao, X.Z. and Yang, S.F. 1988. Dependence of *in vivo* ethylene production rate on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content and oxygen concentrations. - *Plant Physiol.* 88, 553-558.
- Yip, W.K., Moore, T. and Yang, S.F. 1992. Differential accumulation of transcripts for four tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homologs under various conditions. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2475-2479.
- Yoshii, H. and Imaseki, H. 1981. Biosynthesis of auxin-induced ethylene. Effects of indole-3-acetic acid, benzyladenine and abscisic acid on endogenous levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase. - *Plant Cell Physiol.* 22, 369-379.

Yoshii, H. and Imaseki, H. 1982. Regulation of auxin-induced ethylene biosynthesis. Repression of inductive formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by ethylene. - *Plant Cell Physiol.* 23, 639-649.

Young, R.E., Pratt, H.K. and Biale, J.B. 1952. Manometric determination of low concentrations of ethylene. - *Anal. Chem.* 24(3), 551-555.

Yu, Y.B. and Yang, S.F. 1979. Auxin induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. - *Plant Physiol.* 64, 1074-1077.

Yu, Y.B. and Yang, S.F. 1980. Biosynthesis of wound ethylene. - *Plant Physiol.* 66, 281-285.

Yu, Y.B., Adams, D.O. and Yang, S.F. 1979. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase : a key enzyme in ethylene biosynthesis. - *Arch. Biochem. Biophys.* 198(1), 280-286.

Yu, Y.B., Adams, D.O. and Yang, S.F. 1980. Inhibition of ethylene production by 2,4-dinitrophenol and high temperature. - *Plant Physiol.* 66, 286-290.

Zeroni, M., Galil, J. and Ben-Yehoshua, S. 1976. Autoinhibition of ethylene formation in nonripening stages of the fruit of sycamore fig (*Ficus sycomorus* L.). - *Plant Physiol.* 57, 647-650.

Zimmerman, P.W. and Wilcoxon, F. 1935. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. - *Contr. Boyce Thompson Inst.* 7, 209-229.

Nawoord

HET IS AF !

Soms dacht ik deze woorden nooit te kunnen zeggen, laat staan te kunnen neerschrijven. Dit proefschrift is naast mijn eigen inzet mede tot stand gekomen door de steun van heel wat mensen.

Daarom, dank je wel

- Prof. Dr. M. Van Poucke om mijn promotor te willen zijn en zeker voor de talrijke raadgevingen die dit proefschrift ten goede kwamen.*
- Prof. Dr. H. Clijsters voor uw steun om dit proefschrift te schrijven tijdens het IWONL-project alsook voor de welgewaardeerde kritische suggesties betreffende dit werk.*
- Dr. J. Vangronsveld voor de goede samenwerking en de technische hulp wanneer de ethyleenapparatuur het weer eens liet afweten.*
- alle mensen van het labo plantenfysiologie, bijzonder Jef voor de hulp bij de ethyleenmetingen, Nelia voor het goede verloop van het IWONL-werk en ... last but not least... Brigitte voor "alles".*
- Adriana en Mieke voor de hulp en de goede raad bij de vormgeving van dit proefschrift.*

Mijn ouders wil ik bedanken voor de studiemogelijkheden die zij mij geboden hebben en voor het babysitten op Eline.

Onze vrienden en familie wil ik eveneens bedanken voor de interesse die zij betoonden voor mijn werk.

Tenslotte het laatste maar het GROOTSTE woord van dank aan Ronny en Eline : jullie liefde heeft mij doen volharden !

Bedankt,

Jo

