KATHOLIEKE UNIVERSITEIT
LEUVEN

Ellen De Sutter
Masterstage Biologie
Academiejaar 2012-2013

Koudetolerantie bij *Miscanthus* genotypen

Stageverantwoordelijke: Prof. Dr. Olivier Honnay
Promotor: Prof. Dr. Wim Van den Ende
Stagebegeleiders: Dr. Peter Lootens,
Dr. Tom De Swaef en Simon Fonteyne
Bedrijf: Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek

ILVO
Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek

Inhoudsopgave

Inleiding 1
1 Het Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek 2
1.1 Algemeen 2
1.2 Het project 2
2 Stagedoelstellingen 3
3 Het gewas *Miscanthus* 4
4 Korte probleemstelling 5
5 Fotosynthese- en chlorofylfluorescentie 7
6 Materiaal en methoden 11
6.1 *In vitro* vermeerdering 11
6.2 Fotosynthese en chlorofylfluorescentie metingen 12
6.3 Bepaling groeicurve *Miscanthus* 15
6.4 Veldwaarnemingen 16
6.5 Suikeranalyse 16
7 Resultaten 17
7.1 Fotosynthese en chlorofylfluorescentie metingen 17
7.1.1 Bepaling meetprocedure 17
7.1.2 Vergelijking *Miscanthus* x *giganteus* en *Miscanthus sinensis* Goliath bij 12 en 20 °C 19
7.1.3 Vergelijking OPTIMISC genotypen 24
7.2 Bepaling groeicurve *Miscanthus* 28
7.3 Veldwaarnemingen 29
7.4 Suikeranalyse 30
8 Discussie 31
8.1 Fotosynthese metingen 31
8.2 Chlorofyl fluorecentie metingen 31
8.3 Suikeranalyse 32
Dankwoord 33
Referentielijst 34
Bijlagen 36

Inleiding

In het kader van mijn opleiding, 1ste master Biologie aan de KULeuven kreeg ik binnen de optie professionalisering de mogelijkheid stage te volgen. Ik wilde graag ervaringen opdoen op de werkvloer omdat ik van mening ben dat ik door deze ervaring later mijn beroep beter kan uitoefenen. Ik heb stage gevolgd in het onderzoeksinstituut "Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek" te Melle. Mijn stage vond plaats op de afdeling Groei en Ontwikkeling waarbij de aandacht voornamelijk uitgaat naar de fysiologische processen aan de basis van de groei en ontwikkeling bij planten.

In dit verslag begin ik met een korte beschrijving te geven van het bedrijf en hoe het bedrijf georganiseerd is. Vervolgens wordt het OPTIMISC project waarbinnen mijn stage kadert meer in detail aangehaald. Daarna worden de verschillende stagedoelstellingen opgesomd. Tevens zal ik in de paragraaf "Materiaal en Methoden" uitgebreid ingaan op de werkzaamheden die ik gedurende mijn stage heb verricht, gevolgd door de bekomen "Resultaten". Deze worden verder besproken in de "Discussie". Hoe deze stage is verlopen zal ik in mijn "Conclusie" vertellen.

Ik wens de lezer alvast veel leesplezier.

1 Het Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek

1.1 Algemeen

Het Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO) is een onafhankelijk onderzoeksinstituut, gefinancierd door de Vlaamse Overheid met als missie de uitvoering en coördinatie van beleid onderbouwend wetenschappelijk onderzoek en de daaraan verbonden dienstverlening met het oog op een duurzame landbouw en visserij in economisch, ecologisch en maatschappelijk perspectief.

Voortbouwend op meer dan 75 jaar ervaring in fundamenteel en toegepast onderzoek, kan ILVO beroep doen op de uitgebreide kennis en expertise van circa 570 medewerkers, waarvan ongeveer de helft in statutair verband en de andere helft via het eigen vermogen; meer dan een derde van de personeelsleden zijn onderzoekers. ILVO beschikt over een groot patrimonium met onder meer 200 ha proefvelden, 15.000 m² serres en meer dan 20.000 m² proefstallen. Bovendien beschikt ILVO over testbanken, een proefmelkinstallatie en proeffabriek, een zaadontvangst-verwerkingseenheid en zijn er diverse analyse- en detectielabo's, een diagnosecentrum en geaccrediteerde labo's voor planten, veevoeders, spuittechnieken, voeding en GGO's.

De onderzoeksactiviteiten worden aangestuurd via vier eenheden: Plant, Dier, Technologie & Voeding en Landbouw & Maatschappij. Elke eenheid is onderverdeeld in onderzoeksdomeinen.

Bij de Eenheid Plant bestudeert en identificeert men in het kader van de gewasbescherming de bacteriën, schimmels, virussen, insecten, mijten en aaltjes die planten kunnen teisteren en de manieren waarop men deze duurzaam kan bestrijden. Verder wordt er op toegepaste genetica en veredeling gewerkt, ontrafelen de onderzoekers de fundamentele processen van de groei en ontwikkeling van een gewas, en vergelijkt men teeltsystemen en hun effect op het gewas, de bodemkwaliteit en het milieu.

Het onderzoeksdomein Groei en Ontwikkeling, waar mijn stage zal plaatsvinden heeft als doel het ontrafelen van de moleculaire mechanismen en de fysiologische processen die aan de basis liggen van de groei, de ontwikkeling en wisselwerking van gewassen met hun omgeving.

1.2 Het project

Mijn stage kadert binnen een studie waarbij ILVO de fysiologische mechanismen aan de basis van kilte- en vorsttolerantie onderzoeken. De bedoeling hierbij is bij te dragen aan de ontwikkeling van nieuwe kilte- en vorsttolerante rassen. Deze ILVO-studie maakt deel uit van het bredere OPTIMISC project, een internationale samenwerking van het FP7 met als doel de belangrijkste productielimiterende factoren te doorgronden, nieuwe rassen uit te testen op verschillende locaties in Europa en nieuwe hoogwaardige toepassingen te ontwikkelen. ILVO zal 100 *Miscanthus* genotypen testen op hun kilte- en vorsttolerantie.

2 Stagedoelstellingen

Het doel van de stage is preliminaire experimenten uit te voeren om de jeugdgroei van *Miscanthus* genotypen bij lage temperaturen (12 °C) in te schatten (*Bijlage 1*).

Een eerste experiment dat kadert in mijn stage is het opvolgen van 10 planten van 2 genotypen, namelijk *Miscanthus* x *giganteus* en *Miscanthus sinensis* Goliath. Hierbij is de doelstelling na te gaan of de groeicurve van de plant tot het 5de blad lineair is. Indien dit het geval is kunnen arbeidsintensievere bladmetingen van planten die opgroeien bij twee temperaturen vervangen worden door de planten gedurende korte perioden te laten groeien bij verschillende temperaturen tussen 20 en 6 °C. De bekomen groeisnelheden van de bladeren bij de verschillende temperaturen laat toe een basistemperatuur voor de groei te bepalen voor verschillende genotypen.

Een tweede taak in het kader van mijn stage bestaat erin de chlorofylfluorescentie metingen te vergelijken. Hierbij is het de bedoeling na te gaan of we met de CFImager dezelfde resultaten bekomen als via het fotosynthese-apparaat LI-6400 (toestel dat de zowel de fotosynthese als chlorofylfluorescentie kan opmeten). Het is hierbij ook van belang de variabiliteit te kunnen inschatten. Indien via de CFImager dezelfde resultaten kunnen bekomen worden als met de LI-6400 zou dit betekenen dat er 96 bladstalen tegelijkertijd kunnen worden opgemeten, terwijl met de LI-6400 maar 1 blad tegelijkertijd kan opgemeten worden. Naar de praktijk toe zou dit dan betekenen dat via een bladstaal kan bepaald worden welk genotype van *Miscanthus* meer kiltetolerant is. Als er op termijn een goede correlatie te vinden is tussen de jeugdgroei bij lage temperaturen en de chlorofylfluorescentie parameters, kan deze techniek gebruikt worden voor een snelle screening van verschillende genotypen in het kader van veredeling. Dit zou in de toekomst een grote vooruitgang betekenen voor vele veredelaars.

Volgend experiment dat ik zal uitvoeren tijdens mijn stage met betrekking op de groei van *Miscanthus* is de opmeting van het 4de blad bij 2 genotypen van *Miscanthus*. Hierbij zal ik opnieuw gebruik maken van *Miscanthus* x *giganteus* en *Miscanthus sinensis* Goliath. Er zal gewerkt worden bij twee temperaturen nl. 12 °C in de groeikamers en 20 °C in de serres. Hierbij zal de lengte van het 4de en 5de blad steeds opgemeten worden vanaf de vorming van een scheut tot de plant volgroeid is. Dit gebeurt op 10 planten per behandeling en zal een 4 tal weken in beslag nemen bij 20 °C en een 8 tal weken bij 12 °C. We verwachten dat de groei langer zal duren bij een temperatuur van 12 °C voor beide fenotypen en dat *M. giganteus* meer kiltetolerant is dan *M.* Goliath. De bedoeling hierbij is om bevestiging te krijgen over eerder bekomen resultaten.

Aangezien recente studies suggereren dat er links zijn tussen suikersignalering en koudetolerantie is het interessant bijkomende suikermetingen uit te voeren. Suikers zijn niet alleen primaire metabolieten maar ook belangrijke signaalmoleculen. Het doel van deze stage is het opsporen van mogelijke suikervariaties binnen *Miscanthus*variëteiten en tijdens kiltebehandelingen en het leggen van links met andere fysiologische parameters zoals groei en fotosynthese. De suikeranalyses zullen plaatsvinden aan de KU Leuven in de laatste weken van mijn stage. Hiervoor zullen eerst stalen van verschillende genotypen van *Miscanthus* van ILVO-experimenten verzameld worden. Nadien zullen deze stalen overgebracht worden naar het Lab Moleculaire Plantenbiologie voor verdere verwerking. Voor de suikeranalyses worden er eerst waterextracten bereid die dan verder gezuiverd worden. Deze stalen worden dan geanalyseerd met HPAEC-PAD. Op die manier kunnen we glucose, fructose, sucrose en raffinose concentraties kwantificeren.

Ik zal ook meewerken met de *in vitro* vermeerdering van de proefplanten voor de experimenten in de groeikamers en de veldproeven. Hierbij zal gewerkt worden met twee soorten groeimedium. Het proliferatiemedium dat gebruikt wordt om scheuten te ontwikkelen en het 'rooting'-medium dat gebruikt wordt voor de ontwikkeling van wortels. Deze worden geautoclaveerd om contaminatie te vermijden. Door de ontwikkeling van de wortels kunnen de planten dan uitgeplant worden in potten of later op het veld.

Tijdens mijn stage zal ik ook meehelpen met veldwaarnemingen. Hierbij zullen we in het voorjaar wekelijks de lengte van scheuten van planten op het veld opvolgen. Deze data zullen gerelateerd worden aan klimaatgegevens.

3 Het gewas *Miscanthus*

Miscanthus is een meerjarige C4 plant en behoort tot de monocotylen familie *Poaceae*. Het geslacht *Miscanthus* bestaat uit 14 tot 20 overblijvende soorten en is afkomstig van de subtropische en tropische regio's van Azië en Afrika (Heaton *et al.*, 2010). Het gras is in staat om zonlicht op een efficiënte manier om te zetten in biomassa bij hoge temperatuur en met een minimum aan water (Snauwaert, 2012). *Miscanthus*soorten werden lang gebruikt als weidegras en structureel materiaal in China en Japan en zijn recent interessant voor energieproductie. Ze worden nu ook gevonden en genaturaliseerd in Noord- en Zuid-Amerika als in Europa (Heaton *et al.*, 2010). In Europa wordt *Miscanthus* al sinds 1930 geteeld als een siergewas afkomstig uit Japan. Eind de jaren '60 werd in Denemarken het opbrengstpotentieel van *Miscanthus* voor de cellulosevezelproductie onderzocht. In 1983 werden proeven aangelegd voor de bio-energieproductie, waarna het gewas ook in Duitsland en de rest van Europa belangstelling kreeg (Scurlock, 1999). *Miscanthus* x *giganteus* werd vooreerst geïntroduceerd in Europa door Aksel Olsen in 1930 (Linde-Laursen, 1993) en wordt ook wel "olifantsgras" genoemd. Deze soort is van groot belang omdat hiermee de hoogste biomassaproductie gerealiseerd wordt en veelal beschouwd wordt als de meest geschikte onder de *Miscanthus* species voor energietoepassingen. De plant kan gemakkelijk meer dan 3,5 meter hoog worden en tot 20 ton droge stof/ha produceren. Het is een steriele triploïde hybride van *M. sinensis* en *M. sacchariflorus* die groeit door middel van ondergrondse rhizomen (Scurlock, 1999). Vegetatieve vermeerdering kan door het scheuren van rhizomen. Generatieve vermeerdering is vooralsnog niet mogelijk omdat *Miscanthus* x *giganteus* enkel steriel zaad produceert.

Miscanthus wordt in het voorjaar geplant en heeft een productieve levensduur van 15-20 jaar. Het eerste jaar bereiken de stengels tegen het einde van augustus een hoogte van één tot twee meter. Door de lagere temperaturen in de herfst vallen de bladeren af en worden de reserves van de plant opgeslagen in de rhizomen. In februari blijft enkel het opgedroogde bladloze stengeldeel over. Na de oogst (maart-begin april) lopen de rhizomen onder invloed van temperatuur weer uit en vormen opnieuw een gewas. De afgevallen bladeren composteren waardoor de vrijkomende voedingsstoffen opnieuw gebruikt kunnen worden. Het bladerdek onderdrukt de onkruidgroei in het voorjaar. Het eerste jaar is de opbrengst beperkt en daarom wordt meestal niet geoogst. Vanaf het tweede jaar kan het gewas jaarlijks worden geoogst. *Miscanthus* groeit vrijwel overal maar zoals elke plant groeit deze het best in een goed doorlaatbare, humusrijke grond, met een goede waterhuishouding, die snel opwarmt in het voorjaar zodat een lang groeiseizoen bereikt kan worden (Snauwaert, 2012). Voor energieproductie mikt men voornamelijk op marginale gronden om niet of zo weinig mogelijk in concurrentie te komen met de voedselproductie.

Miscanthus is op meerdere vlakken toepasbaar, door zijn kwalitatieve eigenschappen maar ook wegens zijn kwantitatieve eigenschappen is het een zeer interessant gewas. Het kan zijn weg vinden in uiteenlopende toepassingen. In de eerste plaats kan *Miscanthus* gebruikt worden voor de productie van biobrandstof, bio-ethanol en biodiesel. Als energiegewas kan het ook gebruikt worden als brandstof voor verbranding of vergassing (Novem, 1999) voor productie van warmte of elektriciteit. Dit kan onder de vorm van briketten, pallets of snippers. *Miscanthus* heeft een zeer gunstige koolstofbalans omdat een deel van de koolstof gestockeerd kan worden in de rhizomen (Le Syndicat Agricole, 2010). De sterkte van de vezel en de isolerende werking ervan maakt *Miscanthus* ook geschikt als grondstof voor bouw- of constructiematerialen zoals spaanplaten, isolatieblokken en binnenwanden (Novem, 1999). Verder wordt *Miscanthus* gebruikt in composieten als vezelversterkend materiaal. Door zijn sterk absorberend vermogen kan *Miscanthus* ook als strooisel in stallen van pluimvee, runderen en paarden of voor kleine huisdieren gebruikt worden. Het materiaal droogt snel en klit niet aan elkaar. Dit zorgt ervoor dat minder snippers nodig zijn in vergelijking met houtsnippers of stro (Novabiom, 2010). Daarnaast is het een grote ligninebron. Recentelijk is ook de toepassing in de papierindustrie daaraan toegevoegd.

4 Korte probleemstelling

Gevoeligheid voor lage temperaturen is één van de grootste knelpunten bij de teelt van *Miscanthus* en bijgevolg biomassa-accumulatie in onze gematigde streken. Deze lage temperaturen (boven 0 °C) beperken vroeg in het seizoen de groeisnelheid van jonge scheuten en hebben dus een directe invloed op de fotosynthetische capaciteit en uiteindelijk de jeugdgroei van de planten. Het zijn de fysiologische mechanismen aan de basis van de kilte- en vorsttolerantie, die de opbrengst van het biomassagewas *Miscanthus* nog limiteren in Europa. De bedoeling is om bij te dragen aan de ontwikkeling van nieuwe kilte- en vorsttolerante rassen. Tegenwoordig wordt in Europa nog maar één kloon commercieel aangeplant. Nieuwe rassen zijn nodig om *Miscanthus* als gewas te doen doorbreken.

Planten worden gedurende hun groei en ontwikkeling blootgesteld aan talrijke biotische en abiotische stressfactoren. Hoewel sommige rendementsverminderingen worden toegeschreven aan biotische factoren zoals ziekte, plagen en onkruid is het grootste verlies in opbrengst het gevolg van abiotische stress, waaronder vooral droogte en suboptimale temperaturen (McKersie en Leshem, 1994). Van de verschillende milieu-invloeden is lage temperatuur één van de meest belangrijke factoren die de productiviteit en verspreiding van de planten limiteert. Onder lage temperaturen verstaan we wel degelijk lage en geen vorsttemperaturen (0-15 °C). Deze temperaturen kunnen heel wat schade veroorzaken vandaar dat heel wat plantensoorten de mogelijkheid hebben om de mate van kiltetolerantie te doen toenemen als reactie op lage temperatuur. Dit fenomeen wordt ook wel koude-acclimatisatie genoemd (Hsieh *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007).

Wanneer planten blootgesteld worden aan lage temperaturen zullen veel van de fysiologische en biochemische celfuncties gecorreleerd zijn met zichtbare symptomen (verwelken, verkleuren of necrose) (Ruelland en Zachowski, 2010). Vaak gaan deze nadelige effecten gepaard met veranderingen in de structuur van het celmembraan en de lipidesamenstelling (Uemura en Steponkus, 1999; Matteucci *et al.*, 2011), lekkage van elektrolyten en aminozuren uit cellen, verplaatsen van de elektronenstroom naar alternatieve wegen (Seo *et al.*, 2010), wijzigingen in protoplasmische stroming en een herverdeling van de intracellulaire calciumionen (Knight *et al.*,

1998). Ze hebben ook betrekking op veranderingen in het eiwitgehalte en enzymactiviteit (Ruelland en Zachowski, 2010), alsook op structurele veranderingen in vele celcomponenten waaronder plastiden, thylakoid membranen en de fosforylatie van thylakoideiwitten en mitochondriën (Zhang *et al.*, 2011). Kortstondige blootstellingen aan lage temperaturen kan alleen maar leiden tot voorbijgaande veranderingen en over het algemeen overleven de planten. Echter langdurige blootstellingen aan stress veroorzaakt afsterven en dood van de planten.

Wanneer poikilothermische organismen zoals bacteriën (Russel, 1984), schimmels (Miller en Baran, 1984), protozoa (Nozawa en Umeki, 1988; Thompson, 1989), planten (Somerville en Browse, 1991; Nishida en Murata, 1996) en dieren (Stubbs en Smith, 1984) worden blootgesteld aan temperaturen onder deze van hun optimale groeicondities zal de graad van onverzadigde vetzuren in hun membraan toenemen. De mate waarin de lipiden van de membraan verzadigd worden is de belangrijkste factor die de vloeibaarheid van de membraan beïnvloedt (Kates *et al.*, 1984; Cossins, 1994). Een daling in temperatuur leidt tot een verminderde vloeibaarheid van de membraan. Dit resulteert in een verbeterde expressie van de genen voor vetzuurdesaturatie. Deze enzymen zorgen voor een dubbele binding in de vetzuurketen van de membraanlipiden en op die manier compenseren ze voor de daling in membraanvloeibaarheid (Murata en Wada, 1995). Verscheidene studies hebben reeds aangetoond dat versteviging van de membraan in combinatie met herschikking van het cytoskelet, calciuminstroom en activatie van MAPK-cascades de lage temperatuurrespons induceren (Uemura en Steponkus, 1999; Orvar *et al.*, 2000, Xin en Browse, 2000; Sangwan *et al.*, 2002). Het proces van koude acclimatisatie bevordert de stabilisatie van de membranen wat schade voorkomt die leidt tot celdood. Het acclimatisatieproces activeert ook mechanismen die de vloeibaarheid van de membraan beschermen door te zorgen voor optimale activiteit van geassocieerde enzymen (Matteucci *et al.*, 2011).

Op fysiologisch niveau wordt de fotosynthese sterk beïnvloed door blootstelling aan koude. Het beëindigen van de groei van de plant als gevolg van koudestress veroorzaakt veranderingen in het energiegebruik en veroorzaakt bijgevolg inhibitie van de fotosynthese (Ruelland en Zachowski, 2010).

Planten accumuleren een waaier van compatibele opgeloste stoffen als reactie op koude en andere osmotische stress (Hekneby *et al.*, 2006; Patton *et al.*, 2007; Ruelland en Zachowski, 2010). Het koolhydraatmetabolisme zou gevoeliger zijn voor lage temperatuur dan andere componenten van de fotosynthese (Fernandez *et al.*, 2012). De accumulatie in koude geacclimatiseerde planten suggereert dat deze suikers de functie van osmoregulatoren vervullen, hoewel de precieze functie van oplosbare suikers nog moet worden bepaald (Welling en Palva, 2006). Suikers spelen een veelzijdige rol in lage temperatuur tolerantie. Zij dragen als typische compatibele osmolyt bij aan het behoud van het water binnen plantencellen en kunnen de celmembranen beschermen tijdens de koude-geïnduceerde uitdroging (Uemura en Steponkus, 1999; Uemura *et al.*, 2003; Ruelland *et al.*, 2009). Bovendien kunnen koolhydraten fungeren als vangers van reactieve zuurstofradicalen. Zuurstofradicalen zijn een integraal onderdeel van het aërobe leven en kunnen zowel oxidatieve stress in planten veroorzaken als verspreiden (Elstner en Osswald, 1994). Zowel *in vitro* (Nishizawa *et al.*, 2008; Stoyanova *et al.*, 2011) als *in vivo* (Nishizawa *et al.*, 2008) experimenten suggereren dat suikercomponenten oxidatieve stress tegengaan door te reageren als echte vangers van reactieve zuurstofradicalen. Verder voorspelt een theoretische benadering (Hernandez-Martin en Martinez, 2012) dat sommige suikers fungeren als antioxidanten. Nishizawa *et al.* (2008) en Schneider en Keller (2009) suggereren de rol van raffinose oligosacchariden die plantencellen beschermt tegen

oxidatieve schade als deel van het chloroplast antioxidant systeem (Foyer en Shigeoka, 2011). Bovendien kunnen de suikers en suikerachtige verbindingen opgeslagen worden in de vacuole waar ze samenwerken met de fenolische componenten en antioxidant mechanismen aanwezig in de vacuole (Van den Ende en Valluru, 2009; Peshev en Van den Ende, 2013). Suiker signalering is nauw geassocieerd met hormoonsignalering, ter controle van groei, ontwikkeling en stressresponsen in planten (Zeng *et al.*, 2011). Afhankelijk van de plantensoort zullen verschillende vormen van oplosbare suikers betrokken zijn bij de fysiologische reacties van koude stress. Glucose fungeert als belangrijke voedingsstof maar ook als regulerende metaboliet dat genexpressie moduleert in gist, dieren en planten. In planten spelen suikers zowel een rol als voedingsstoffen en als signaalmoleculen. Zowel glucose, sucrose als fructose worden erkend als centrale integratie regulerende moleculen die genexpressie gerelateerd aan plantmetabolisme, stressresistentie, groei en ontwikkeling controleren (Pego *et al.*,2000; Rolland *et al.*, 2006; Ramon *et al.*, 2008; Cho and Yoo, 2011).

Fructanen, een klasse van wateroplosbare fructosepolymeren gebaseerd op sucrose accumuleren in vele plantensoorten (Pollock en Cairns, 1991). Ze zijn betrokken bij de bescherming van planten tegen watertekort veroorzaakt door lage waterpotentiaal, zoutgehalte, of lage temperaturen (Pontis, 1989; Hendry, 1993; Spollen en Nelson, 1994). De oligosacchariden raffinose en stachyose zijn vooral geassocieerd met winterhardheid, lage temperaturen en ruststadia (Aït Barka en Audran, 1996; Couee *et al.*, 2006). Bovendien verhoogt de concentratie van sucrose, het meest gemakkelijk detecteerbaar suiker tijdens blootstelling aan lagere temperatuur (Bohnert en Sheveleva, 1998; Tabaei-Aghdaei *et al.*, 2003). Trehalose is een niet reducerend disaccharide van glucose dat gevonden wordt in verscheidene organismen zoals bacteriën, gisten, schimmels, insecten en ongewervelden waar het als stress beschermend en/of als reservekoolhydraat dient (Penna, 2003). Hoewel een verhoogde trehalose samenhangt met abiotische stresstolerantie in transgene planten blijft de functie van endogene trehalose in hogere planten onduidelijk (Fernandez *et al.*, 2010).

5 Fotosynthese- en chlorofylfluorescentie

De bladeren zijn de voornaamste plaatsen waar de fotosynthese-reacties verlopen. Gewoonlijk wordt de fotosynthese beschreven in termen van de CO_2 fluxen in en uit de bladeren. Fotosynthese is een proces waarbij lichtenergie wordt gebruikt om koolstofdioxide samen met water om te zetten in glucose.

$$6CO_2 + 6H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2$$

Planten nemen het water op uit de bodem met hun wortels. De koolstofdioxide en de zuurstof worden via huidmondjes in het blad met de lucht uitgewisseld. De gevormde glucose wordt omgezet in andere verbindingen zoals cellulose en zetmeel.

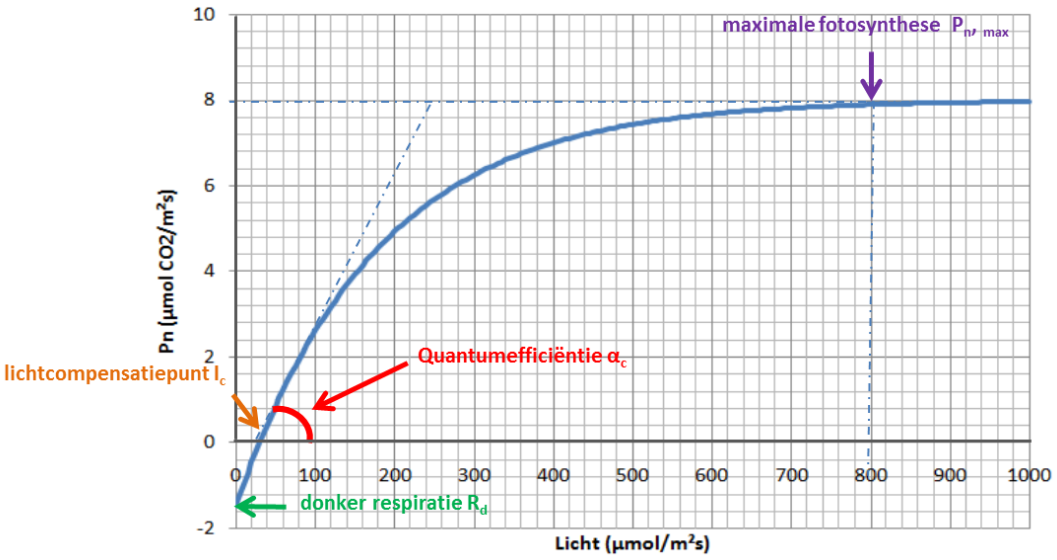
Fotosynthese is een ingewikkeld biochemisch proces dat bestaat uit twee delen: de lichtreacties en de donkerreacties. Fotosynthese begint als zonlicht valt op een chlorofyl-molecuul. Deze molecule kan de energie uit zonlicht opvangen. Hierbij komen twee elektronen vrij. De energie van de elektronen tijdens het transport doorheen de elektronentransportketen wordt gebruikt om adenosinetrifosfaat (ATP) te vormen. ATP wordt in cellen gebruikt voor de opslag van energie. Aan het einde van de elektronentransportketen worden de elektronen gebruikt voor de vorming van NADPH. NADPH is de belangrijkste reductor in cellen en levert een bron van elektronen voor diverse

andere reacties. Tijdens de lichtreactie is de energie van het zonlicht omgezet in chemische energie en 'opgeslagen' in de moleculen ATP en NADPH. De donkerreactie gebruikt deze energie om koolstofdioxide om te zetten in glucose via de Calvincyclus.

In een lichtresponsiecurve- of kromme wordt de netto fotosynthesesnelheid (P_n) uitgezet in functie van de lichtintensiteit (I), uitgedrukt in µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}. De P_n geeft het verschil weer tussen de bruto fotosynthesesnelheid en de respiratiesnelheid. Deze worden beide uitgedrukt in µmol CO_2/m^2s. De respiratiesnelheid gemeten in het donker wordt donkerrespiratie genoemd (R_d) en kan als maat beschouwd worden voor de metabolische (niet fotosynthese) activiteit van de plant. Het opstellen van de lichtresponsiecurve gebeurt door het fitten van een niet lineaire regressiecurve per blad aangepast aan de data. De gefitte regressiecurve wordt weergegeven in onderstaande vergelijking.

$$P_n = P_{n,max}(1 - exp^{\frac{-\alpha_c(I-I_c)}{P_{n,max}}})$$

De parameter I_c staat voor het lichtcompensatiepunt, dit is de lichtsterkte waarbij P_n nul wordt. Bij lichtintensiteiten lager dan dit punt zal CO_2 vrijgegeven worden uit het blad. $P_{n,\ max}$ staat voor de maximale fotosynthesesnelheid die biofysisch mogelijk is. De parameter α_c is de kwantumefficiëntie bij het lichtcompensatiepunt (I_c), dit is de helling van de raaklijn aan de curve die door dit punt gaat en wordt uitgedrukt in µmol CO_2 /µmol PAR. Het is een maat voor de CO_2 opname per eenheid van lichtintensiteit (*Figuur 1*).



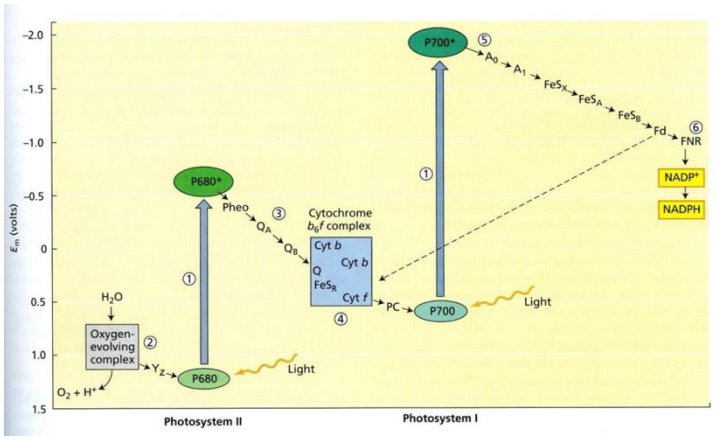
Figuur 1 De lichtresponsiecurve- of kromme met de netto fotosynthesesnelheid (Pn) in functie van de lichtintensiteit voor een individueel blad.

Chlorofyl fluorescentie wordt op grote schaal gebruikt om allerlei stressfactoren te onderzoeken. Het laat toe zowel dag- als seizoensgebonden fotosynthetische responsen te bestuderen. Verder kan het ook gebruikt worden voor fotosynthetische modellering en voor de groei te voorspellen (DeEll en Toivonen, 2003).

In alle fotosynthetisch actieve organismen, speelt chlorofyl een centrale actieve rol in de absorptie en fotochemische transformatie van lichtenergie. De lichtenergie die geabsorbeerd wordt door chlorofyl moleculen in een blad kunnen gebruikt worden voor het aansturen van de fotosynthese. Ze functioneren als antennen die lichtdeeltjes of fotonen opvangen. De overmaat aan energie kan

afgegeven worden als warmte of het kan terug uitgezonden worden als licht met langere golflengte (Maxwell en Johnson, 2000). Veel fluorescentie wijst op een groot energieverlies voor de plant, wat nadelig is voor de groei.

Bij de fotosynthese is er een reactiecentrum nodig waar de energie van de geëxciteerde elektronen naartoe wordt getransporteerd. Er zijn twee types fotosystemen nl. fotosysteem II (PSII) die golflengtes van 680 nm absorbeert en fotosysteem I (PSI) die het rood licht absorbeert met golflengtes van 700 nm. Beide bevatten chlorofyl a moleculen. In PSII beginnen de lichtreacties van de fotosynthese. Fotosynthese begint wanneer in PSII een chlorofyl pigment een foton absorbeert. De energie van het foton wordt door het pigment opgenomen en als gevolg daarvan raakt een elektron in aangeslagen toestand. Normaal gesproken gaat een pigment als het in een aangeslagen toestand is binnen een nanoseconde weer terug naar zijn grondtoestand. De energie van het aangeslagen elektron gaat dan verloren in warmte. In PSII is een chlorofyl molecuul (P680) dat als het in aangeslagen toestand komt zijn elektronen afgeeft aan een elektronen acceptor. Deze elektronen met een hoog energieniveau komen in een keten van redoxreacties terecht. Deze keten wordt ook wel de elektronentransportketen (ETC) genoemd. Deze ETC begint bij PSII, gaat dan naar cytochroom b_6f en komt uiteindelijk uit in PSI. In fotosysteem I worden deze elektronen gebruikt om NADPH te vormen (*Figuur 2*).



Figuur 2 Het Z-diagram van fotosysteem I en II.

Enkele belangrijke basisvariabelen van de fluorescentiemetingen worden weergegeven in tabel 1 (Van Kooten en Snel, 1990)

Tabel 1 De voornaamste basisvariabelen van de fluorescentiemetingen.

F_0	Minimale fluorescentie bij donker geadapteerde bladeren. Alle PSII zijn open.	$q_P = 1$	$q_N = 0$
F_m	Maximale fluorescentie in donker geadapteerde bladeren. Alle PSII zijn gesloten	$q_P = 0$	$q_N = 0$
F_v	Verschil in fluorescentie in donker geadapteerde bladeren, $F_V = F_m - F_0$, veroorzaakt door het sluiten van PSII door een saturatiepuls.	$q_P = 1 \rightarrow 0$	$q_N = 0$
F_m'	Maximale fluorescentie bij licht geadapteerde bladeren. Alle PSII zijn gesloten	$q_P = 0$	$0 < q_N \leq 1$
F_0'	Minimale fluorescentie bij licht geadapteerde bladeren. Alle PSII zijn open.	$q_P = 1$	$0 < q_N \leq 0$
F_v'	Verschil in fluorescentie in licht geadapteerde bladeren, $F_V' = F_m' - F_0'$, veroorzaakt door het sluiten van PSII in het licht.	$q_P = x \rightarrow 0$	$0 < q_N \leq 1$

Met deze fluorescentievariabelen uit tabel 1 kunnen enkele belangrijke kwalitatieve karakteristieken van de fotosynthese bij plantenbladeren berekend worden.

De maximale fotochemische efficiëntie van PSII, $\boldsymbol{\phi}_{PSII,max}$, geeft de fractie aan geabsorbeerde PAR-fotonen weer die gebruikt worden in de lichtreacties bij een donker geadapteerd blad. Het is met andere woorden een maat voor de beschadiging van het PSII complex. Voor verschillende soorten varieert deze waarde tussen de 0,79 en 0,84 (Björkman en Demmig, 1987).

$$\phi_{PSII,max} = \frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

Het werkelijk absorptierendement van het open PSII reactiecentrum wordt gegeven door volgende vergelijking:

$$\frac{F_V{}'}{F_M{}'} = \frac{F_M{}' - F_0}{F_M{}'}$$

De vermenigvuldiging van de F_M'/F_M' ratio met de fractie van de open reactiecentrums (q_P) geeft de parameter weer voor de effectieve fotochemische efficiëntie van PSII, $\boldsymbol{\phi}_{PSII}$, voor een aan licht geadapteerd blad. Deze geeft de fractie van de door de invallende PAR-fotonen aangeslagen elektronen weer die effectief de fotochemische elektronentransportketen doorlopen. Deze fractie is nuttig voor de groei van de plant en beschrijft kwalitatief de prestaties van het fotosyntheseapparaat van een plant.

$$\phi_{PSII} = \frac{F_V{}'}{F_M{}'} \times q_P$$

De parameter ETR wordt verkregen wanneer we rekening houden met de omgevings-omstandigheden zoals bijvoorbeeld de lichtintensiteit. De ETR-parameter geeft het werkelijke snelheid van het elektrontransport weer :

$$ETR = \phi_{PSII} \times 0.84 \times PAR \times 0.5$$

Waarbij verondersteld wordt dat 84 % van de fotonen door het blad geabsorbeerd worden. De factor 0,5 verwijst naar het feit dat het transport van één elektron, de absorptie van twee fotonen vereist.

We hebben gebruik gemaakt van fluorescentiemetingen om de fotosynthese te beoordelen en om dus na te gaan of de plant onderworpen is aan stress.

Onder quenching verstaan we de onderdrukking van de uitgestraalde fluorescente straling. Quenching kan opgesplitst worden in fotochemische- (qP) en niet-fotochemische quenching (qN). Fotochemische quenching is gerelateerd aan de proportie excitatie-energie die gevangen wordt door open reactiecentra en omgezet wordt in chemische energie. De fotochemische quenching is maximaal wanneer een blad gedurende enkele minuten in het donker wordt gehouden. Deze donkere periode zorgt ervoor dat alle elektron acceptors in de geoxideerde toestand zijn. Dus alle reactiecentra van het PSII zullen open zijn. Wanneer planten blootgesteld worden aan warmte, koude of droogte stress zal de fotochemische quenching dalen en de fluorescentie toenemen door het blokkeren van het elektronentransport doorheen de elektonenacceptors.

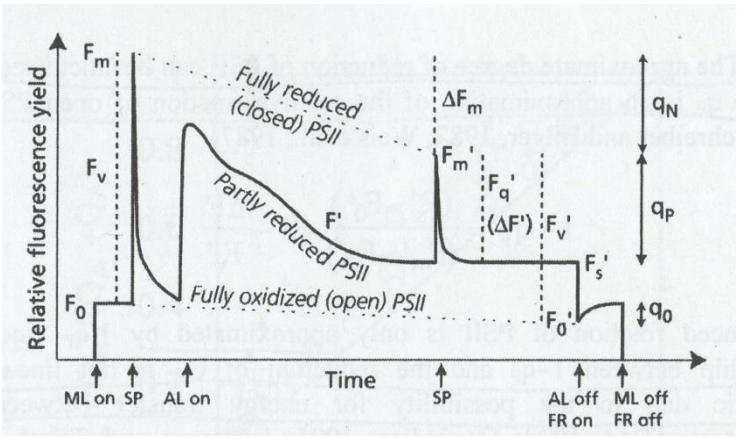
De proportie van de PSII reactiecentrums die geoxideerd of open zijn:

$$q_P = \frac{F_M{}' - F_T}{F_M{}' - F_0}$$

Niet-fotochemische quenching zijn alle processen die geabsorbeerde energie wegdissiperen als warmte om schade te voorkomen (Schreiber *et al.*, 1994)

$$q_N = \frac{F_M - F_M{}'}{F_M - F_0}$$

Een Kautsky curve (*Figuur 3*) is de fluorescentie inductiecurve bij belichting van een donker geadapteerd blad.



Figuur 3 Fluorescentie in functie van de tijd volgens de quenching analyse. ML = meetlicht, SP = saturatie puls, AL = actinisch licht, FR = ver rood PSI licht (van Kooten en Snel, 1990).

De curve vertoont een snelle initiële fase gevolgd door een trage fase. Door een periode van donkeradaptatie wordt er een toestand gecreëerd waarin alle reactiecentra open zijn, alle Q_A (Quinon A) bevinden zich in geoxideerde vorm. Na een donker adaptatie periode wordt eerst een meetlicht aangezet. Bij belichting is er eerst een stijging van de fluorescentie naar een minimaal niveau (F_0). Het meetlicht is te zwak om ladingen te scheiden van het PSII. Op die manier wordt alle energie omgezet in een minimaal of initieel fluorescentie niveau (F_0). Daarna volgt een korte puls van saturatie licht die onmiddellijk alle PSII reactiecentrums reduceert, de fluorescentie zal tot een maximaal niveau ($P=F_m$) stijgen. In P zijn alle reactiecentra gesloten (quinon A en B zijn volledig gereduceerd), er wordt geen excitatie-energie meer weggevangen door fotochemische processen.

6 Materiaal en methoden

6.1 *In vitro* vermeerdering

Zoals eerder vermeld is *Miscanthus giganteus* een steriel gewas, met andere woorden het levert geen zaad. Nieuwe gewassen moeten daarom verkregen worden via vegetatieve vermeerdering door het stekken van wortelstokken (rhizomen) of *in vitro* vermeerdering tot plugplantjes (microplanten).

De planten werden *in vitro* vermeerderd onder 'laminaire flows' zodat de vermeerdering onder steriele omstandigheden plaatsvond. Meerdere scheuten van een vorige kweek werden gescheiden onder steriele omstandigheden en daarna op een kweekmedium (proliferatiemedium) of op 'rooting' medium geplaatst, indien we wensen dat de plant wortels aanmaakt. Beide media werden op

voorhand geautoclaveerd om contaminatie te vermijden. Plantenhormonen worden toegevoegd aan het kweekmedium om de ontwikkeling van vele nieuwe scheuten te stimuleren.

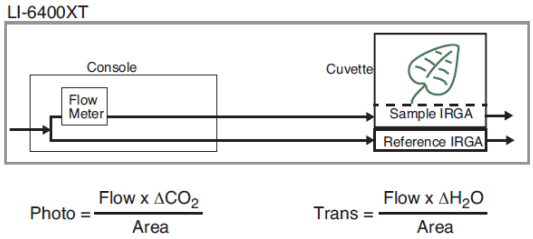
Planten die gedurende drie weken op 'rooting' medium stonden werden uitgeplant in potgrond en vervolgens gedurende drie weken onder plastiek folie geplaatst aangezien de stomata van de planten uit *in vitro* nog niet functioneel zijn. Om de relatieve vochtigheid te verlagen werden deze planten opnieuw na drie weken onder een plastiek met gaatjes gebracht. De planten werden tenslotte verder afgehard in de serre bij 20 °C.

6.2 Fotosynthese en chlorofylfluorescentie metingen

De LI-6400 (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) (*Figuur 4*) is een draagbaar fotosynthese apparaat met een open gasuitwisselingssysteem.

Figuur 4 Het LI-6400 draagbaar fotosynthese systeem (links) en een fotosynthese-en chlorofylfluorescentie meting op een *Miscanthus* genotype met de LI-6400 (rechts).

De metingen voor fotosynthese en transpiratie zijn hierbij gebaseerd op de verschillen in CO_2- en H_2O-concentraties tussen een ingestelde referentiewaarde en het geanalyseerde staal (*Figuur 5*). Bovendien zijn de gasanalyzers (IRGA = infrared gas analyser) in het sensorhoofd gesitueerd, waardoor tijdsvertragingen geëlimineerd worden en er een snelle reactie kan gemeten worden op veranderingen in de bladeren.



Figuur 5 Een schematische weergave van een open differentieel gasuitwisselingssysteem met bijhorende formules voor het berekenen van de transpiratie- en fotosynthesesnelheden.

Een plotselinge verandering in lichtniveau zal leiden tot een directe verandering in fotosynthesesnelheid. Deze wordt gedetecteerd als een verandering in CO_2 concentratie. De snelheid van detectie is in tegenstelling tot de traditionele systemen geen functie van de stroomsnelheid van het systeem.

Een bijkomende sterkte van het toestel is dat de inkomende luchtstroom kan geconditioneerd worden. De LI-6400 beschikt over mechanismen voor het wijzigen van de inkomende lucht van de CO_2 en H_2O concentraties. Er zijn chemische buizen voor het scrubben van CO_2 en H_2O waarbij de lucht in de gewenste verhouding kan worden omgeleid via deze buizen.

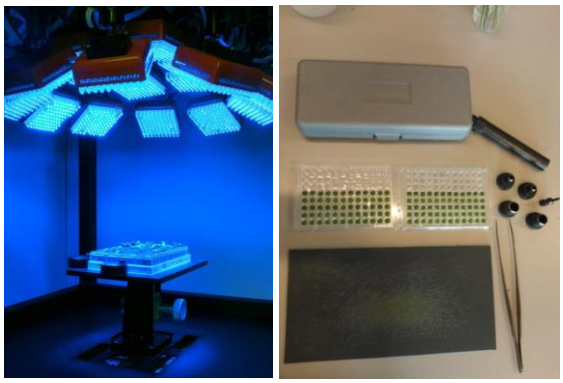
De LI-6400 beschikt over verschillende autoprogramma's, dit zijn kleine applicaties die automatisch gegevens loggen mits controle over één of meer condities in de cuvette. Een aantal autoprogramma's worden in tabel 2 beschreven. Wij hebben enkel gebruik gemaakt van AutoLog2 (*Bijlage 2*) en LightCurve2 (*Bijlage 3*).

Tabel 2 De autoprogramma's van de LI-6400 met korte beschrijving.

Name	Description
A-CiCurve2	Generates a CO_2 response curve.
AutoLog2	Logs data at regular intervals.
LightCurve2	Generates a light response curve.
TimedLamp2	User selects LED source values, logging frequencies, and time intervals. Useful for sunfleck simulations.
CO2Curve_MultipleLight	Does CO_2 response curves at several light values.
LightCurve_MultipleCO2	Does light curves at several CO_2 values.

Voor de instelling van het autoprogramma hebben we gebruik gemaakt van de handleiding van de LI-6400 (*Bijlage 4*). Hierbij was het voornamelijk van belang de CO_2-concentratie van de referentielucht ("CO_2R_µml") te controleren en te sturen naar circa 400 µmol CO_2/mol dit deden we door de luchtstroom deels over een CO_2 scrubber te sturen. Naar analogie van de CO_2-concentratie was het ook van belang de H_2O-concentratie van de referentielucht ("H_2OR_mml") te regelen door middel van de relatieve vochtigheid ("RH_S%") te sturen naar 60 %. Hierbij stelden we vooraf de dauwpunt temperatuur in op 13 °C via de LI-610 Portable dew point generator (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) wat overeenkomt met een relatieve luchtvochtigheid van 60 % (zie Mollier diagrama). Het debiet van de luchtstroom ("Flow_µml") werd afgesteld op 150 µmol/s en de bladtemperatuur op 20 °C (*Bijlage 5*). Aangezien de opening van de cuvette niet volledig bedekt was met bladmassa moesten we steeds de breedte van het blad opmeten om deze later in rekening te brengen voor het berekenen van de bladoppervlakte.

De CFImager (Technologica, Houston, Texas, USA) meet de chlorofyl fluorescentie maar niet alle gemiddelde waarden van één blad. Door middel van een camera wordt een chlorfyl fluorescentiebeeld bepaald. Hierdoor kunnen veel bladstalen tegelijkertijd worden geanalyseerd. Met behulp van 1600 LEDs georganiseerd in 16 blokken wordt licht uitgezonden naar de bladstalen aanwezig in de 96-well plaat. De CFImager meet de relatieve hoeveelheid door een blad teruggekaatst licht in de vorm van fluorescentielicht.



Figuur 6 De CFImager (links), staalname *Miscanthus* door ponsen van bladeren en aanbrengen in 96-well plaat (rechts).

Voorafgaand aan de chlorofylfluorescentiemetingen met de LI-6400 en de CFImager is het belangrijk de procedures voor het opstellen van een lichtresponsiecurve op punt te stellen. Daarom hebben we in de eerste weken van de stage voornamelijk verschillende procedures laten lopen om op die manier te bepalen welke methode ons een representatieve weergave konden geven van de lichtresponsiecurve op een relatief korte tijd. Hiervoor hebben we via geautomatiseerde procedures gekeken naar de wachttijd tot stabilisatie bij verschillende lichtintensiteiten. Vervolgens lieten we het programma een gemiddelde van de metingen nemen over een range van 20 seconden en enkel over de laatste seconde. De metingen gebeurden steeds op planten van het genotype *Miscanthus* x *giganteus* waarbij we het vierde blad gebruikten. De verschillende procedures en hun resultaten zullen niet allemaal beschreven worden in dit verslag.

Eens we beschikken over een goede procedure konden we lichtresponsiecurven opstellen waarbij we metingen voor de chlorofylfluorescentie integreerden. Het programma van de LI-6400 werd zo ingesteld dat het blad eerst gedurende 20 minuten donkeradaptatie kreeg. Donkeradaptatie is vereist omdat dan alle Q_A volledig geoxideerd zijn en alle niet-fotochemische quenching processen gerelaxeerd zijn. Nadien werd er een saturatiepuls gegeven door het aansteken van het rood licht (634nm) waarbij de maximale fluorescentie werd bepaald (Fm). Vervolgens werd het actinische licht (fotosynthetisch actief licht) aangestoken (ca 10 % blauw licht, 464 nm, en 90 % rood licht, 634 nm). De fotosynthese en de fluorescentieparameters werden gemeten bij de volgende lichtniveau's 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 en 0 µmol m^{-2} s^{-1}.

Voor de vergelijking van chlorofylfluorescentiemetingen van beide toestellen hebben we 7 planten van de genotypen *Miscanthus* x *giganteus* en *Miscanthus sinensis* Goliath gebruikt. We merkten vooraf steeds het blad waarop de metingen uitgevoerd werden. Dit blad van elke plant zullen we eerst met de LI-6400 meten om dan nadien diezelfde bladeren te gebruiken voor metingen uit te voeren met de CFImager. Voor de metingen met de CFImager worden de vooraf gemerkte bladeren afgeknipt en gesponsd. Hierbij kunnen alle planten van beide genotypen met behulp van 5 platen geanalyseerd worden aangezien er steeds 96 stalen tegelijkertijd mogelijk zijn met de CFImager. Voor de fotosynthese- en fluorescentiemeting met de LI-6400 van de genotypen *Miscanthus* x *giganteus* en *Miscanthus sinensis* Goliath hebben we gewerkt bij twee temperaturen nl. 12 °C in de groeikamers en 20 °C in de serres. Eerst hebben we de planten die uit de serre (20 °C) kwamen gemeten met de LI-6400 bij 20 °C in de groeikamer. Dit deden we voor beide genotypen. Nadien hebben we bij dezelfde planten, afkomstig uit de serre (20 °C) de fotosynthese- en fluorescentiemetingen met de LI-6400 uitgevoerd maar deze keer in een groeikamer bij 12 °C. Hierbij

werden onze lichtintensiteiten opgelegd in toenemende volgorde (25 -1000 µmol m^{-2} s^{-1}). Hetzelfde deden we voor het opmeten van fotosynthese en chlorofylfluorescentie bij de verschillende genotypen OPM 13, 17, 37, 43, 45 en 49. Hierbij werden steeds 6 planten van ieder genotype gemeten bij 12 en 20 °C met relatieve vochtigheid van 60 %. De planten die met de LI-6400 gemeten werden bij 20 °C groeiden op in een groeikamer bij 20 °C en de planten die gemeten werden bij 12 °C groeiden op in een groeikamer bij 12 °C. Voor de metingen werd steeds het bovenste volgroeide blad gebruikt.

Voor het instellen van onze temperaturen in de groeikamer alsook voor de bladtemperatuur van de LI-6400 hebben we steeds gebruik gemaakt van onze eerder bekomen kalibratie van de temperatuur. De kalibratie voerden we uit door de temperatuur binnenin de groeikamer te meten met een ijkthermometer en deze te vergelijken met de temperatuur gemeten door het toestel. Dit deden we bij verschillende temperaturen. Aan de hand van die resultaten konden we een ijklijn bepalen en op die manier konden we voor elke gewenste temperatuur de juiste “set” temperatuur bepalen voor de verschillende toestellen.

6.3 Bepaling groeicurve *Miscanthus*

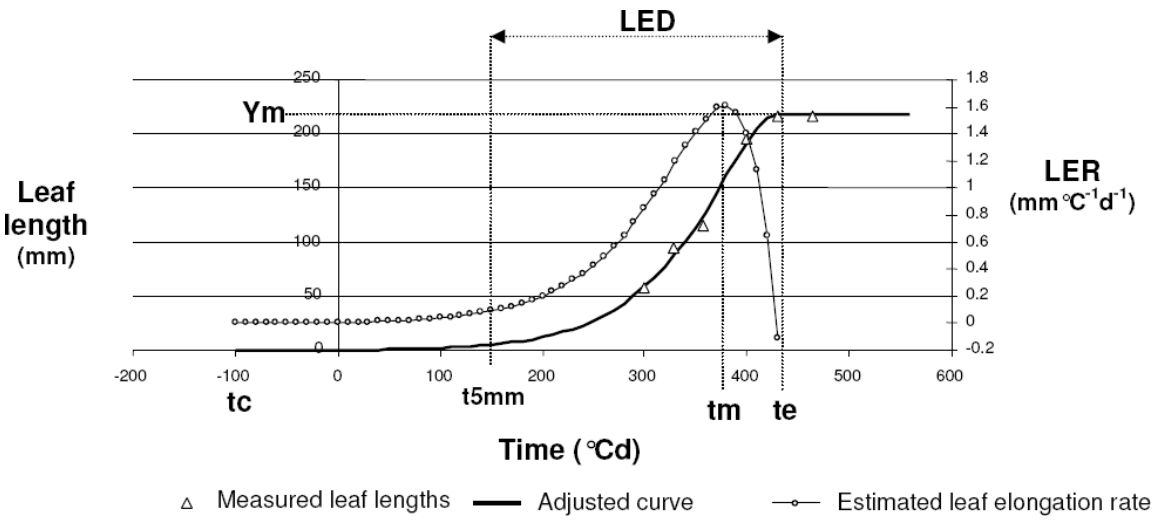
Voor het opstellen van een groeicurve werd de groei van 10 planten van elk genotype (*Miscanthus* x *giganteus* en *Miscanthus sinensis* Goliath) opgevolgd. Driewekelijks werd een gemerkte scheut opgemeten tot deze volgroeid was. Dit gebeurde met behulp van een vouwmeter. Beide genotypen werden gedurende het gehele meetproces in een serre geplaatst bij een temperatuur van 20 °C.

De groei in functie van de tijd van planten of organen is dikwijls te omschrijven met de typische S-vormige curve. Deze bestaat uit een logaritmische fase, met exponentiële groei die in verhouding is met de grootte van het organisme (hoe groter, hoe snellere groei), een min of meer lineaire fase waarin de groei toeneemt met constante (meestal maximale) snelheid, en een senescente fase waarin de groeisnelheid afneemt. De groeisnelheid zelf vertoont dikwijls een klokvormige curve (Taiz en Zeiger, 2006).

Voor de opmeting van het vierde blad bij 12 °C en 20 °C hebben we telkens 10 planten van de genotypen *Miscanthus* x *giganteus* en *Miscanthus sinensis* Goliath genomen. Onze data werden nadien gefit op basis van volgende functie:

$$Y = Y_m * \left(1 + \frac{t_e - t}{t_e - t_m}\right) * \left(\frac{t - t_c}{t_e - t_c}\right)^{\frac{t_e - t_c}{t_e - t_m}}$$

waarbij Y(mm) de bladlengte gemeten op elk tijdstip, Y_m (mm) de uiteindelijke bladlengte, t_c het tijdstip waarop de groei van het blad aanvangt (°Cd), t_m de tijd waarbij de maximale groeisnelheid van het blad is bereikt (°Cd) en t_e de tijd waarbij de bladgroei stopt (°Cd) weergeeft. Deze functie werd eerder beschreven door Auzanneau *et al.* (2011) waarbij het derde en vierde blad opgemeten werd in *Lolium perenne* (Engels raaigras) om de associatie na te gaan tussen gibberellinezuur en de bladlengte (*Figuur 7*).



Figuur 7 Voorbeeld van een gefitte curve op basis van de functie beschreven in Auzanneau *et al.* (2011) waarbij de bladlengte weergegeven wordt in functie van de tijd in daggraden. De groeisnelheid van het blad wordt weergegeven door de afgeleide te nemen van de functie. Ym: de maximale bladlengte, tc: de starttijd van verlenging met een bladlengte van 5 mm, tm: te tijd waarbij de groeisnelheid maximaal is, te: de tijd waarbij het blad volgroeid is, LED: de duur van de bladverlenging.

6.4 Veldwaarnemingen

Tijdens een veldproef hebben we de voorjaarsgroei bij verschillende *Miscanthus* genotypen nl. *M. sacchariflorus*, *M. sinensis* Goliath, *M. sinensis* Silberfeder, *M. sinensis* Silbertum, *M. sinensis* Gracimillus, *M.* x *giganteus* opgemeten. De waarnemingen gebeurden driemaal per week (maandag, woensdag en vrijdag) op de middelste plant van elke herhaling aan de zuidoostkant van de plot. Hiervoor werd een plot van 50 op 50 cm afgebakend. In deze plots werd het aantal aanwezige scheuten steeds geteld en er werden 5 scheuten gemerkt waarvan de lengte van de grond tot top van de scheut werd opgemeten.

Naar het einde van mijn stage toe werden er miniplots aangeplant van 100 verschillende genotypes waarop de komende jaren verder onderzoek zal gebeuren naar opbrengst en kwaliteit.

6.5 Suikeranalyse

Voor de suikeranalyse hebben we gebruik gemaakt van *Miscanthus* planten van het genotype OPM 13 en OPM 17. Deze genotypen werden eerder opgevolgd in groei experimenten van ILVO. Uit deze experimenten konden we vaststellen dat het genotype OPM 13 kiltetolerant was en dat het genotype OPM 17 eerder kiltegevoelig was. Voor de opzet van het experiment werden er per genotype 30 planten gebruikt. Er waren twee behandelingen die telkens 2 weken in beslag namen. Beide behandelingen vonden plaats in de groeikamers, waarbij de temperatuur voor de eerste behandeling ingesteld werd op 20 °C en voor de tweede behandeling werd de temperatuur ingesteld op 12 °C. De relatieve vochtigheid werd steeds ingesteld op 70 % en de lichtintensiteit was voor beide behandelingen steeds dezelfde. De staalname gebeurde in een herhaling van 3 op 0, 1, 3, 7 en 14 dagen na de opzet van het experiment. Hierbij werden steeds de volgroeide bladeren afgeknipt en ingevroren op -80 °C. Elke plant werd hierbij maar eenmaal bemonsterd. Na 14 dagen werden alle stalen gevriesdroogd in een lyofilisator. Deze stalen werden dan naar het Lab Moleculaire Planten Biologie in Leuven gebracht. Daar werden de stalen vermalen tot een fijn poeder door middel van een microdismembrator Retsch MM 200 (Retsch, Haan, Duitsland). Na toevoegen van 5 ml water aan 100 mg poeder werden de stalen gedurende 30 minuten in een warm waterbad geplaatst bij 100 °C.

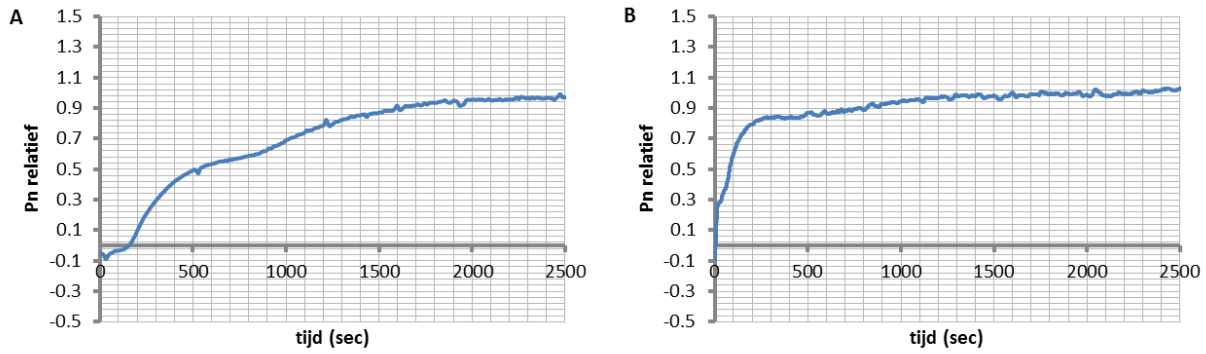
De stalen werden vervolgens na het afkoelen gevortext. Nadien werd er 200 µl van het extract gepipetteerd doorheen een 'mixed bed' Dowex kolom, bestaande uit Dowex Ac^- en Dowex H^+. Op die manier zullen alle geladen componenten vastgehouden worden in de kolom waardoor de suikers doorheen de kolom lopen en opgevangen worden in een microcentrifugeerbuisje. De kolom werd nog zes maal nagespoeld met 200 µl gedemineraliseerd water. Vervolgens werden deze microcentrifugeerbuisjes geschud en in een centrifuge (5415 D) geplaatst op 15000x g gedurende 5 minuten. Van deze stalen werd telkens 200 µl in een vail gebracht. Deze vails werden vervolgens geanalyseerd via 'High performance anion exchange chromatografie' (HPAEC) en gedetecteerd via Integrated Pulsed Amperometric Detection (iPAD) op suikersamenstelling. Als referentie hebben we volgende suikers genomen: mannitol, glucose, fructose, sucrose en raffinose.

7 Resultaten

7.1 Fotosynthese en chlorofylfluorescentie metingen

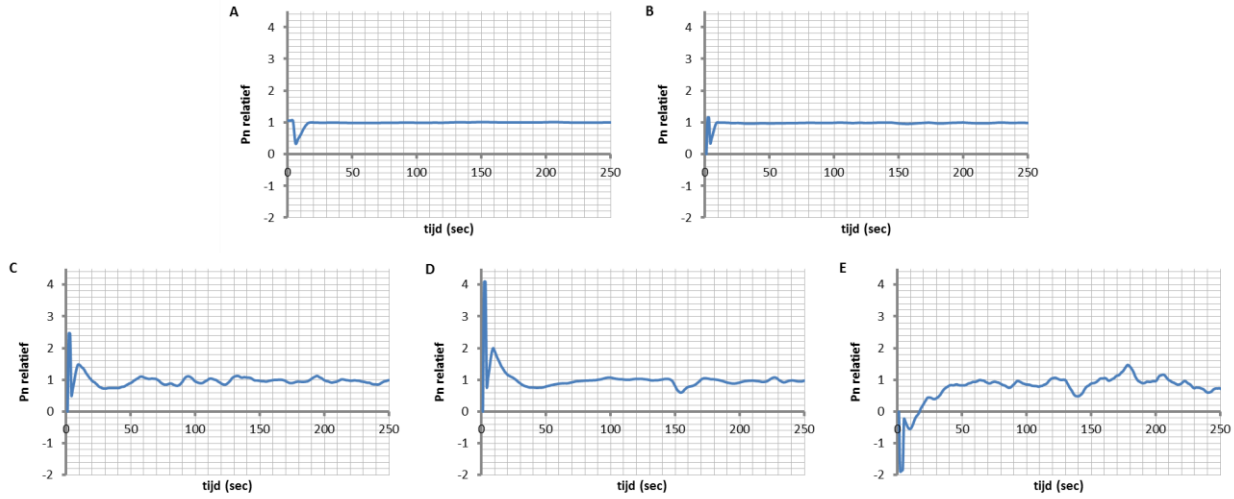
7.1.1 Bepaling meetprocedure

Door verwerking van de data bekomen via het AutoLog2 programma van de LI-6400 kon de fotosynthese uitgezet worden in functie van de tijd. Deze curve werden bepaald voor de verschillende lichtintensiteiten: 1000, 800, 500, 100, 50 en 0 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} (*Figuur 8-9*). Uit de bekomen grafieken konden we het moment waarop stabilisatie van de curve optrad bepalen, dit is het moment waarbij de bladfotosynthese stabiliseerde, $P_{n,\ max}$ bereikt wordt. We konden vaststellen uit figuur 8 A en B dat de stabilisatie bij een lichtintensiteit van 1000 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} sterk varieerde van plant tot plant.



Figuur 8 A-B Relatieve fotosynthese weergegeven in functie van de tijd in seconden bij een lichtintensiteit van 1000 µmol/m²s gemeten bij plant 01 (A) en bij plant 02 (B) van het genotype *M. giganteus*.

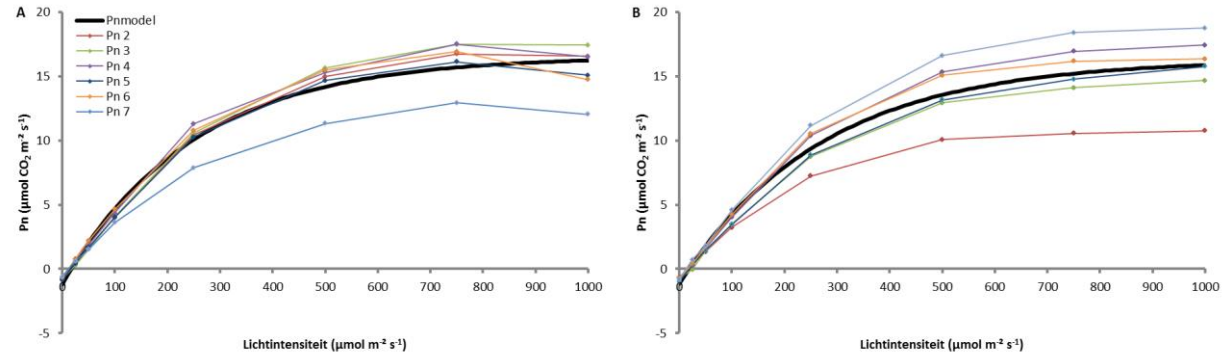
Bij een lichtintensiteit van 800, 500, 100 en 50 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} zagen we een relatief snelle stabilisatie van de curven (F*iguur 9 A-D*). Dit is te verklaren doordat de fotosynthese reeds op gang gekomen is bij de hogere lichtintensiteiten. In figuur 9 E zien we dat bij een lichtintensiteit van 0 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} de stabilisatie opnieuw een langere periode in beslag neemt.



Figuur 9 A-E Relatieve fotosynthese weergegeven in functie van de tijd gemeten bij plant 01 van het genotype *M. giganteus* bij een lichtintensiteit van 800 (A), 500 (B), 100 (C) 50 (D) en 0 µmol/m²s (E).

Aan de hand van bovenstaande resultaten konden we bepalen op welk moment er een overgang naar een volgende lichtstap op een correcte manier mag gebeuren. Deze wachttijd tot stabilisatie hebben we vervolgens gebruikt voor het instellen van het programma PPLightCurve van de LI-6400.

Lichtresponsiecurven van de netto fotosynthese van het 4de blad voor *M. giganteus* (n=7) werden bepaald via twee methoden. Metingen werden uitgevoerd met het autoprogramma 'PPLightCurve'. Hierbij werd de fotosynthese berekend op basis van 1 meetpunt (*Figuur 10A*) en op basis van een waarde over de laatste 20 seconden (*Figuur 10B*). Voor de verschillende metingen werd steeds met dezelfde bladeren gewerkt.

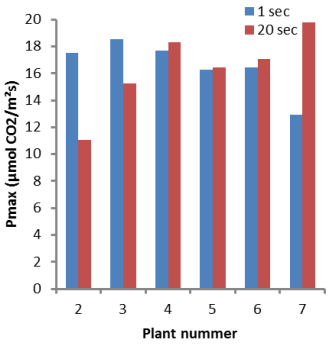


Figuur 10 Gemeten netto fotosynthesesnelheden bij verschillende intensiteiten van de PAR- straling met bijhorende gefitte lichtresponsiecurve voor het genotype *Miscanthus* x *giganteus* bij metingen gemeten over een gemiddelde van 1 seconde (A) en bij metingen gemiddeld genomen over de laatste 20 seconden (B).

Hierbij viel onmiddellijk op dat de hoogste waarde voor de netto fotosynthese bereikt werd bij een lichtintensiteit van 1000 µmol m^{-2} s^{-1}. Deze vertoonde stabielere metingen wanneer we gebruik maakten van een gemiddelde van de metingen over de laatste 20 seconden. In tegenstelling tot wat we verwachten was er meer variatie waar te nemen wanneer we een gemiddelde namen over de laatste 20 seconden dan wanneer we een gemiddelde namen over 1 seconde. Verder werden er verschillende Pn waarden gemeten voor hetzelfde blad met de verschillende methoden. We konden ook vaststellen dat de planten die het laatst gemeten werden op de dag steeds de hoogste

fotosynthese bereikten. Vermoedelijk waren deze planten al wat geacclimatiseerd aan het licht aanwezig in de serre.

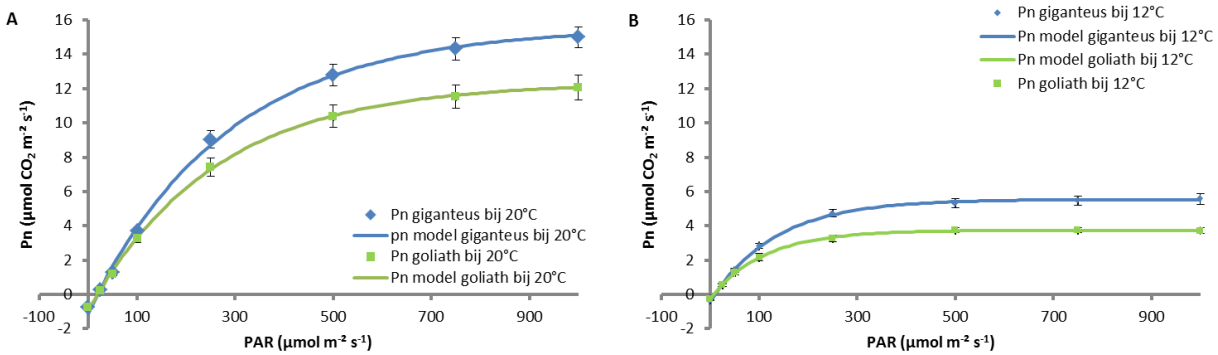
Voor de statistische verwerking werd een niet lineaire regressiecurve (model) per blad aangepast aan de data. Hierbij hebben we eerst de parameters P_{max}, α_c en I_c geschat. Via de oplosser van Excel wordt de curve aangepast aan de data. Hierbij werd R^2 gemaximaliseerd. In figuur 11 zijn de resultaten van de statistische verwerking voor P_{max} weergegeven. Hierbij konden we opmerkelijke verschillen waarnemen voor de parameter P_{max} tussen beide methoden voor de planten 2, 3 en 7. Deze verschillen in P_{max} konden we eerder ook al waarnemen in figuur 10.



Figuur 11 Staafdiagram van de parameter P_{max}.

7.1.2 Vergelijking *Miscanthus* x *giganteus* en *Miscanthus sinensis* Goliath bij 12 en 20 °C

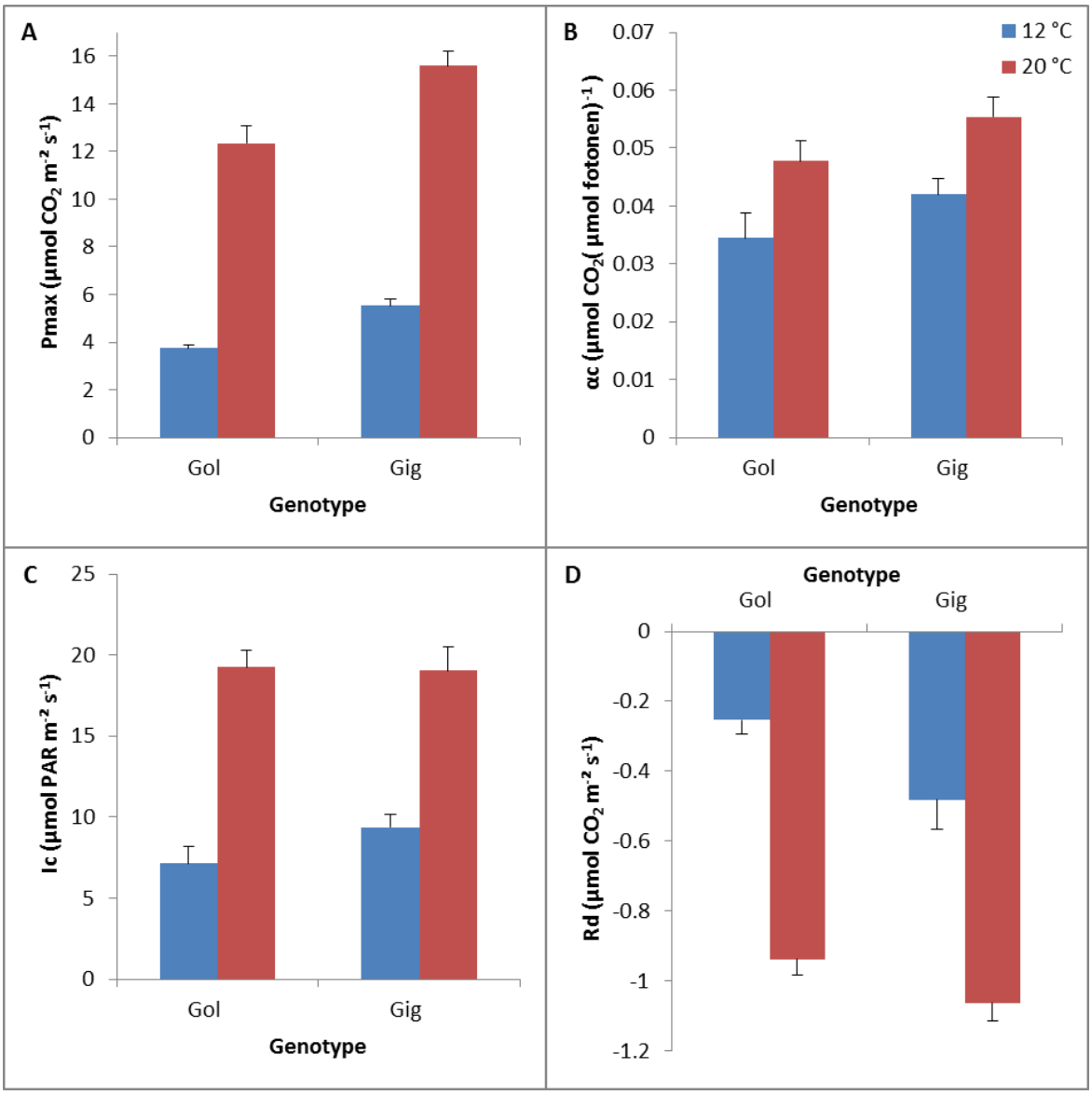
De resultaten van de fotosynthese- en fluorescentiemetingen voor 7 planten van beide genotypen *Miscanthus* x *giganteus* en *Miscanthus sinensis* Goliath uit de serre (20 °C) gemeten bij twee temperaturen 12 °C en 20 °C met Li-6400 zijn weergegeven in figuur 12.



Figuur 12 Lichtresponsiecurve waarbij de netto fotosynthesesnelheid (P_n) uitgezet wordt in functie van de fotosynthetische actieve straling (PAR) door het nemen van een gemiddelde over metingen van 7 planten van het genotype *Miscanthus* x *giganteus* (blauwe punten) en het genotype *Miscanthus sinensis* Goliath (groene punten) bij een temperatuur van 20 °C (A) en bij een temperatuur van 12 °C (B).

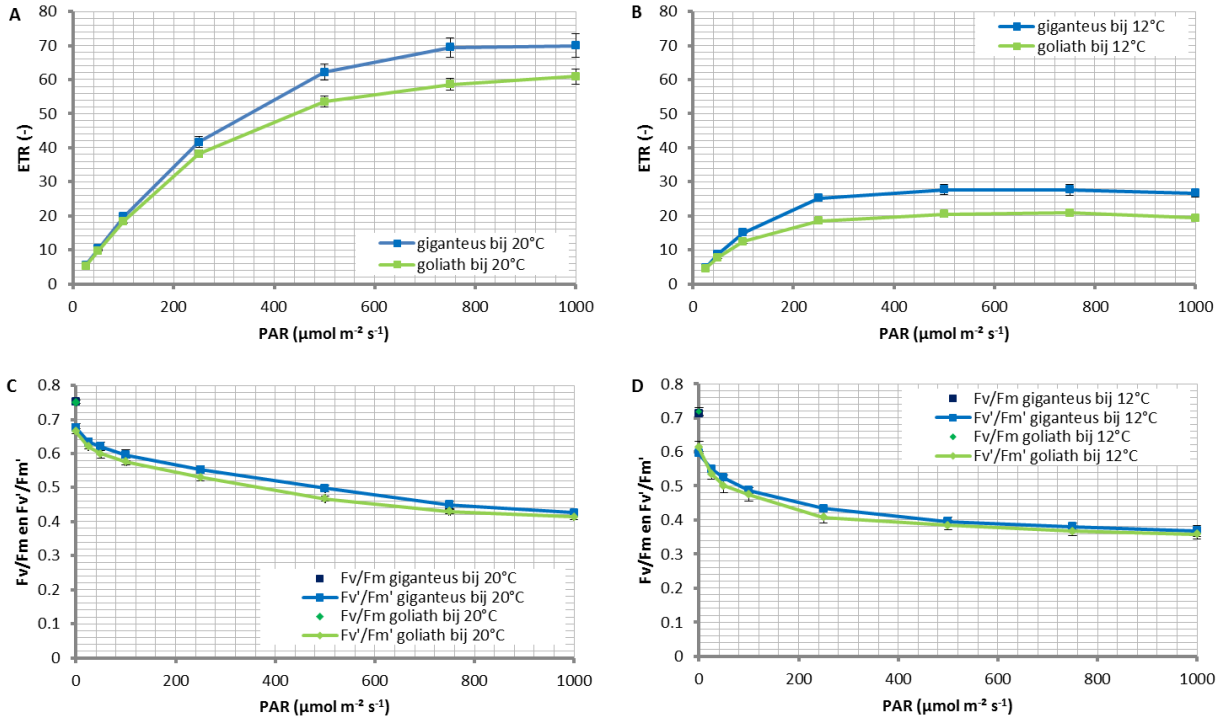
In figuur 12 A en B zijn de lichtresponsiecurven weergegeven voor beide genotypen gemeten bij 20 °C (A) en bij 12 °C (B). Voor beide genotypen kunnen we vaststellen dat een lagere temperatuur nl. 12 °C een impact heeft op de netto fotosynthesesnelheid (P_n). Bij een temperatuur van 20 °C is de $P_{n, max}$ gelegen tussen de 10 en 16 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} voor beide genotypen terwijl de $P_{n, max}$ bij 12 °C een stuk lager ligt met waarden tussen de 3-6 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}. De planten gemeten bij 12 °C zijn met andere woorden minder metabolisch actief dan deze gemeten bij 20 °C. Verder valt op dat het genotype *Miscanthus* x *giganteus* steeds de overhand neemt zowel bij een temperatuur van 12 °C als bij 20 °C kunnen we een hogere fotosynthese waarnemen dan voor het genotype *Miscanthus sinensis* Goliath.

In figuur 13 worden de parameters P_{max}, α_c, I_c en R_d van de lichtresponsiecurves weergegeven voor de planten van het genotype *M.* x *giganteus* en *M. sinensis* Goliath zowel bij een temperatuur van 12 °C en 20 °C. Voor deze parameters hebben we een factoriële ANOVA uitgevoerd waarbij we getest hebben voor temperatuur, genotype en de mogelijke interactie. Voor alle parameters konden we geen significante interactie-effecten waarnemen tussen temperatuur en genotype. De parameter P_{max} was zeer significant zowel voor temperatuur als genotype. Bij een afname in temperatuur van 20 °C naar 12 °C konden we een zeer significante daling van 69,7 % waarnemen voor het genotype *M. sinensis* Goliath en 64,4 % voor het genotype *M.* x *giganteus*. Verder stellen we vast dat *M.* x *giganteus* steeds de hoogste P_{max} bereikt bij beide temperaturen. De kwantumefficiëntie α_c is zeer significant voor temperatuur en significant voor genotype. Wanneer de temperatuur afneemt stellen we een daling van α_c van 27,9 % voor *M. sinensis* Goliath en een daling van 24,1 % voor *M.* x *giganteus* vast. Voor de parameter I_c vonden we enkel een zeer significant effect van temperatuur gemiddeld over beide genotypen. Het genotype *M. sinensis* Goliath daalde zeer significant met 63 % wanneer de temperatuur verlaagd werd van 20 °C naar 12 °C en het genotype *M.* x *giganteus* daalde met 50,7 % bij verlaagde temperatuur. Bij de donkerrespiratie R_d waren zowel temperatuur als genotype zeer significant. Bij een afname in temperatuur was er een daling van 72,9 % waar te nemen voor *M. sinensis* Goliath en een daling van 54,7 % voor *M.* x *giganteus*. Voor de statistische verwerking hebben we onze gegevens normaal verondersteld ondanks het feit dat we over te weinig data beschikten om te voldoen aan de vooropgestelde assumpties rond normaliteit en constante varianties.



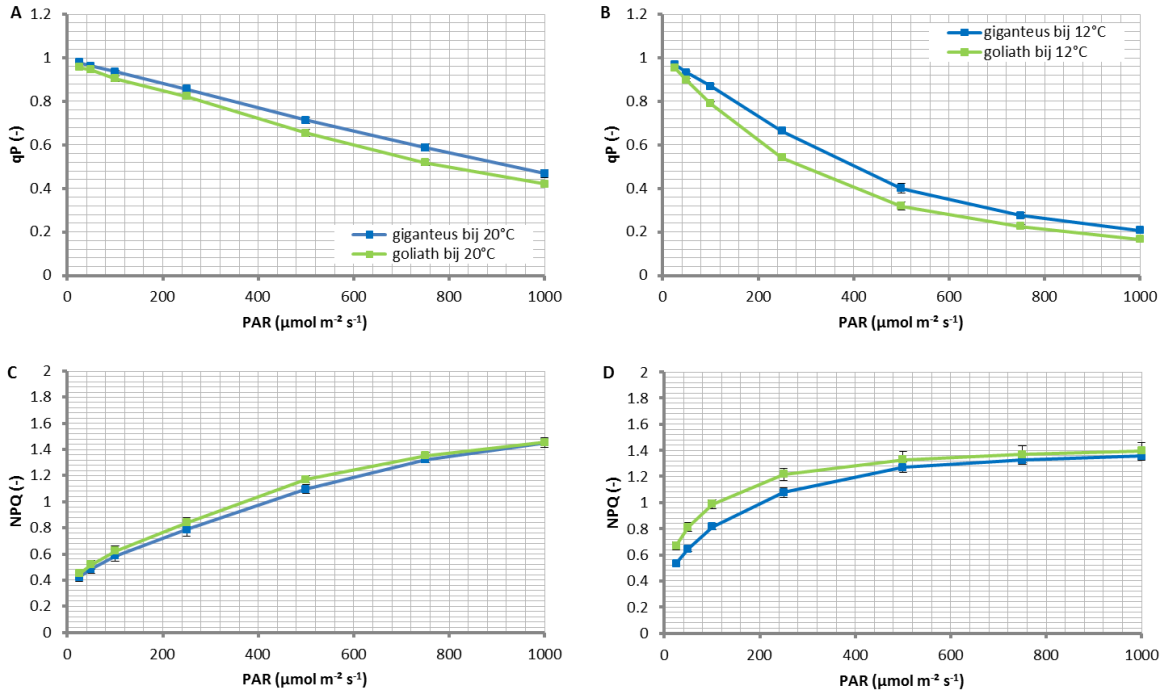
Figuur 13 Staafdiagram van de verschillende parameters P_{max} (A), I_c (B), α_c (C) en R_d (D) uitgezet ten opzichte van de genotype M. *goliath* en M. *giganteus* voor 12 en 20 °C.

In figuur 14 is de snelheid van het elektronentransport (ETR = electron transfer rate) weergegeven voor 20 °C (A) en 12 °C (B). Hierbij kunnen we een relatie met de netto fotosynthese vaststellen. In figuur 14 C en D is de maximale fotochemische efficiëntie van PSII (F_v/F_M) en het werkelijk absorptie rendement van het open PSII reactiecentrum (F_V'/F_M') voor beide temperaturen weergegeven. Voor beide behandelingen, zowel bij 20 °C als bij 12 °C stellen we een daling vast in F_V'/F_M'. De $\Phi_{PSII,max}$ neemt een waarde aan tussen de 0,7 en 0,8 wat we ook verwacht hadden. We konden vaststellen dat de fotochemische efficiëntie hoger gelegen is bij de planten die gemeten werden bij een temperatuur van 20 °C dan planten gemeten bij een temperatuur van 12 °C. Verder konden we waarnemen dat de curve van *M. sinensis* Goliath steeds lager gelegen is dan deze van *M.* x *giganteus*.



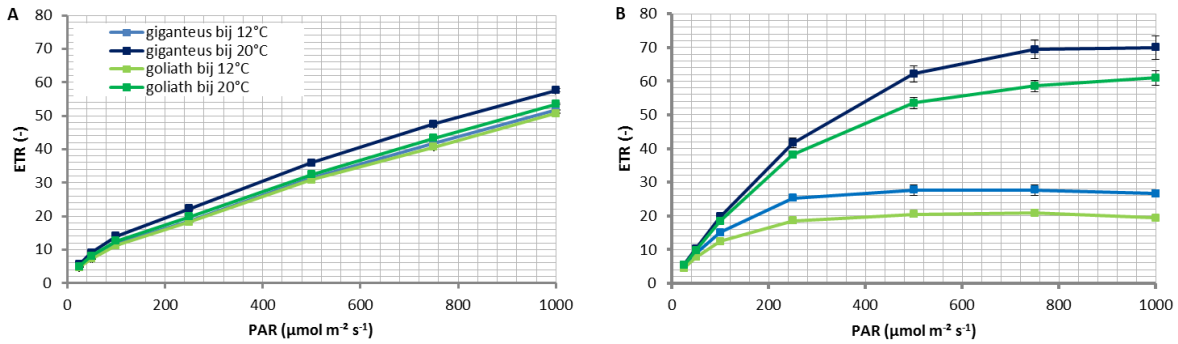
Figuur 14 ETR (electron transfer rate) (A en B) en F_v/F_M en F_v'/F_M' (C en D) voor beide genotypen *Miscanthus* x *giganteus* (blauw) en *Miscanthus sinensis* Goliath (groen) in functie van de fotosynthetische actieve straling (PAR) bij 20 °C (A en C) en bij 12 °C (B en D).

In figuur 15 zijn de resultaten voor de fotochemische- (qP) (A,B) en niet-fotochemische quenching (NPQ) (C,D) weergegeven voor beide genotypen bij een temperatuur van 20 °C en 12 °C. Bij een temperatuur van 12 °C zal qP lagere waarden bereiken dan bij een temperatuur van 20 °C. Deze daling in fotochemische quenching is waarschijnlijk het gevolg van de blootstelling van het blad aan een koudere temperatuur nl. 12 °C. In tegenstelling tot de qP kunnen we voor NPQ vaststellen dat de beginwaarde eerder rond 0 gelegen is. Hierbij nemen we een hogere waarde voor NPQ waar bij een lagere temperatuur van 12 °C.



Figuur 15 qP of fotochemische quenching (A en B) en NPQ of niet fotochemische efficiëntie (C en D) in functie van de lichtintensiteit (PAR) voor de genotypen *Miscanthus* x giganteus (blauw) en *Miscanthus sinensis* Goliath (groen) bij 20 °C (A en C) en 12 °C (B en D).

Ondanks het hanteren van dezelfde procedure met beide toestellen verschillen de resultaten bekomen met de LI-6400 met deze van de CFImager. In figuur 16 zijn de resultaten voor ETR weergegeven gemeten met de CFImager (*Figuur 16 A*) en de LI-6400 (*Figuur 16 B*).

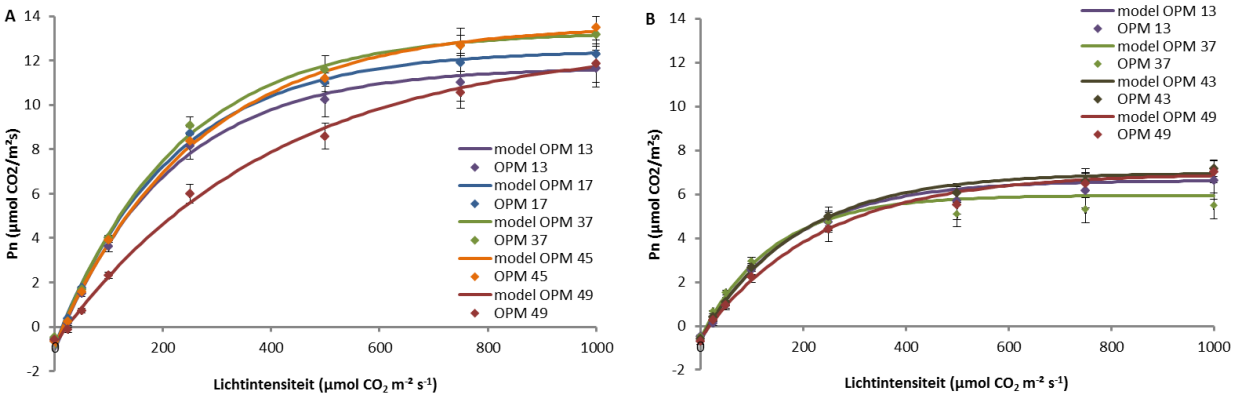


Figuur 16 ETR voor beide genotypen *Miscanthus giganteus* en *Miscanthus goliath* in functie van de fotosynthetische actieve straling (PAR) bij 20 °C en bij 12 °C gemeten met de CFImager (A) en de LI-6400 (B).

Hierbij stellen we bij figuur 16 A bijna geen verschil vast tussen beide condities van 12 °C en 20 °C terwijl dit wel het geval is in figuur 16 B. Bijkomend lijken de curven in figuur 16 A te blijven stijgen terwijl deze afvlakken in figuur 16 B. We kunnen wel vaststellen dat beide figuren eenzelfde 'ranking' vertonen. De curve met genotype *M.* x *giganteus* bij 20 °C ligt steeds bovenaan bij beide figuren, gevolgd door *M. sinensis* Goliath bij 20 °C en *M.* x *giganteus* bij 12 °C en onderaan is steeds het genotype *M. sinensis* Goliath bij 12 °C gelegen.

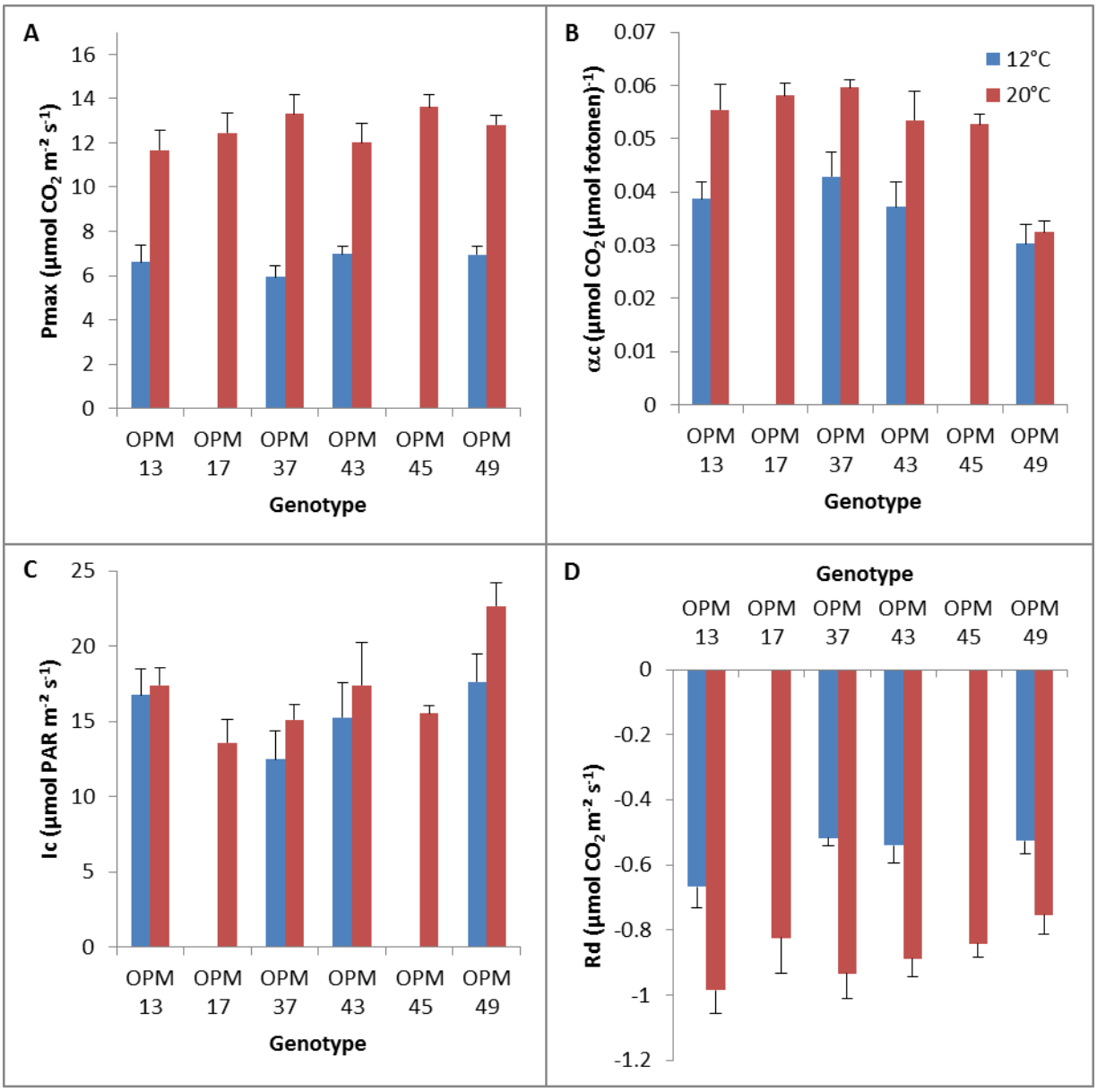
7.1.3 Vergelijking OPTIMISC genotypen

In figuur 17 zijn de resultaten van de lichtresponsiecurven van verschillende genotypen OPM 13, OPM 17, OPM 37, OPM 43, OPM 45 en OPM 49 gemeten bij 20 °C (*Figuur 17 A*) en bij 12 °C (*Figuur 17 B*) weergegeven. De data van de genotypen OPM 17 en OPM 45 ontbreken bij 12 °C aangezien deze genotypen het niet overleefd hebben bij deze lage temperatuur in de groeikamer.



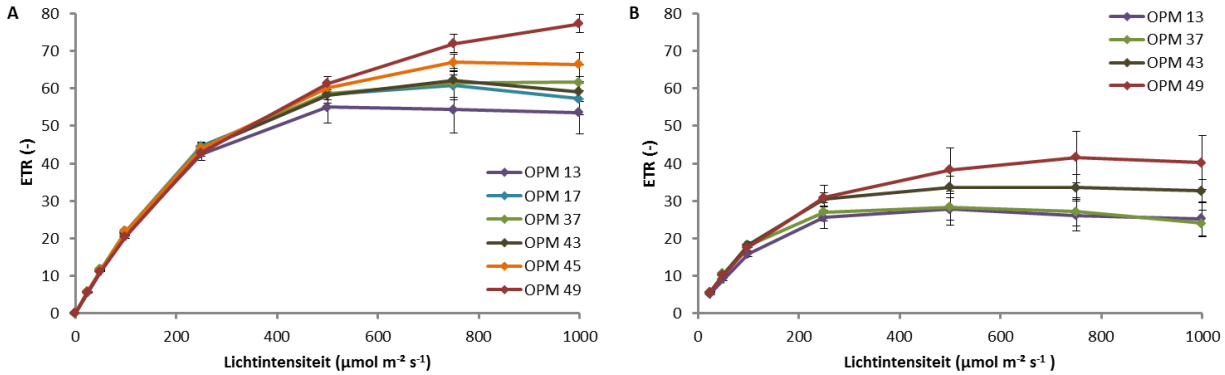
Figuur 17 Lichtresponsiecurven van de netto fotosynthesesnelheid (P_n) in functie van de fotosynthetische actieve straling (PAR) bij een groei- en meettemperatuur van 20 (A) en 12 °C (B). (n=6)

Aangezien de genotypen OPM 17 en OPM 45 niet overleefden bij 12 °C hebben we een factoriële ANOVA uitgevoerd met de overige genotypen OPM 13, 37,43 en 49. De parameters P_{max}, I_c, α_c en R_d hebben we getest voor temperatuur, genotype en de mogelijke interactie. Hierbij konden we voor de vier parameters geen interactie-effect tussen genotype en temperatuur vaststellen. Voor P_{max} werden er geen significante verschillen gevonden tussen de genotypen. Door een lagere temperatuur daalde P_{max} significant met 46.8 % gemiddeld voor alle genotypen (*figuur 18 A*). Bij genotype OPM 37 zien we de sterkste daling in P_{max} bij 12 °C (F*iguur 18 B*). Deze bedraagt 55.31 % . Het omgekeerde kunnen we vaststellen bij de genotypen OPM 13 en OPM 49, deze bereiken eerder een lage P_{max} bij 20 °C en een relatief hoge P_{max} bij 12 °C. Hieruit kunnen we afleiden dat het niet per se deze genotypen zijn die een hoge netto fotosynthese vertonen bij 20 °C ook een hoge netto fotosynthese vertonen bij lagere temperaturen. Voor parameter α_c zijn zeer significante verschillen gevonden zowel voor genotype als voor temperatuur (*Figuur 18 B*). Bij een lagere temperatuur stellen we een significante daling van 25.82 % vast gemiddeld voor alle genotypen. Het genotype OPM 49 is 38.83 % significant gedaald ten opzichte van de andere drie genotypen OPM 13, 37 en 43. Voor I_c is er enkel een significant verschil in genotype gevonden waarbij het genotype OPM 37 31.75 % daalt ten opzichte van genotype OPM 49 (*Figuur 18 C*). De genotypen OPM 43 en OPM 13 vertonen geen significante verschillen voor de parameter I_c. Voor R_d vonden we zowel significante verschillen voor temperatuur als genotype. Hierbij werd een significante toename in van 36.75 % waargenomen bij 12 °C gemiddeld voor alle genotypen. Tussen de genotypen OPM 13 en OPM 49 was er een significant verschil waar te nemen van 22.59 % (*Figuur 18 D*).



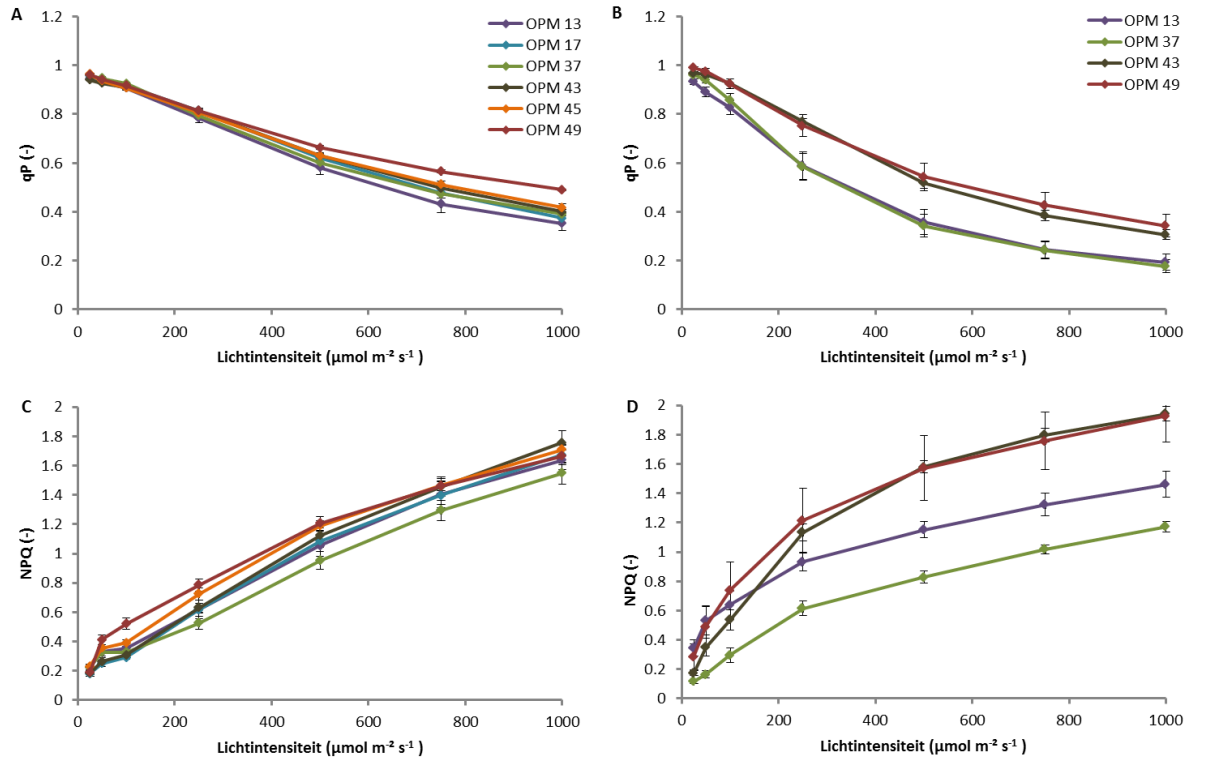
Figuur 18 Staafdiagram van de verschillende parameters P_{max} (A), I_c (B), α_c (C) en R_d (D) uitgezet ten opzichte van de genotype OPM 13, 17, 37, 43, 45 en 49 voor 12 en 20 °C.

In figuur 19 zijn de ETR weergegeven voor de genotypen OPM 13, 17, 37, 43, 45 en 49 bij 12 °C (*Figuur 19 A*) en OPM 13, 37,43 en 49 bij 20 °C (*Figuur 19 B*). We kunnen vaststellen dat de ETR hogere waarden aanneemt bij 20 °C voor dezelfde genotypen dan bij 12 °C. Verder merken we ook op dat de ETR voor genotype OPM 49 niet dezelfde ranking volgt als eerder bekomen bij de netto fotosynthese. In figuur 19 A bereikt genotype OPM 49 de hoogste ETR waarde terwijl OPM 49 in figuur 17 de laagste waarden in P_n bereikt.



Figuur 19 ETR (electron transfer rate) in functie van de lichtintensiteit voor genotypen OPM 13, 17, 37, 43, 45 en 49 in functie van de fotosynthetische actieve straling (PAR) gemeten bij 20 °C (A) en gemeten voor genotypen OPM 13, 37, 43 en 49 bij 12 °C (B).

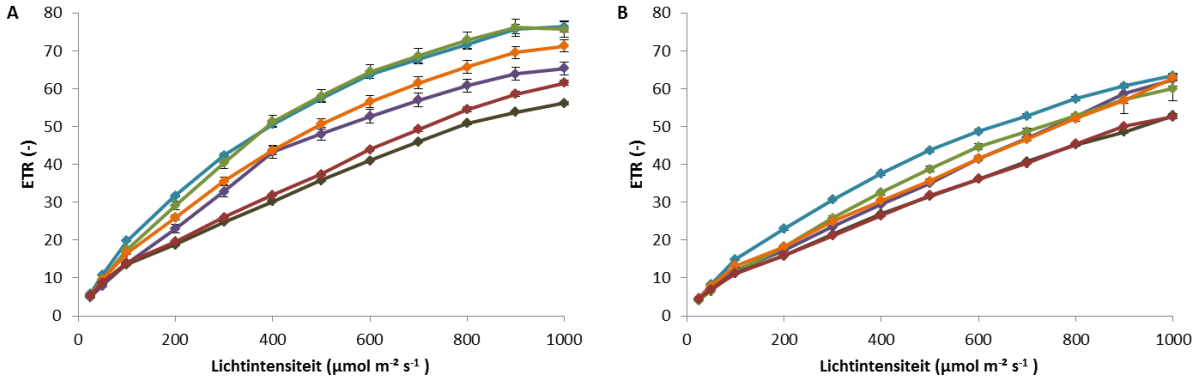
In figuur 20 zijn de resultaten weergegeven van de fotochemische- (qP), niet-fotochemische quenching (qN) voor de verschillende genotypen bij 20 °C (*Figuur 20 A en C*) en bij 12 °C (*Figuur 20 B en D*). Voor de grafieken bij 12 °C kunnen we een grotere spreiding waarnemen. De fotochemische quenching valt tot een lagere waarde terug voor de genotypen OPM 13 en OPM 37 bij 12 °C dan bij 20 °C. Voor de NPQ stellen we voor de genotype OPM 43 en OPM 49 de hoogste waarden vast bij een lichtintensiteit van 1000 µmol/m²s gemeten bij 12 °C. Er gaat met andere woorden energie verloren aan niet fotochemische processen wat op zijn beurt de lagere waarden in netto fotosynthese bij 12 °C verklaart. Het feit dat OPM 37 en OPM 13 lagere waarden in NPQ bereiken is moeilijk te verklaren.



Figuur 20 Verschillende parameters bekomen van chlorofyl fluorescentie bekomen via metingen uitgevoerd op de bladeren van telkens 6 planten voor de genotypen OPM 13, 17, 37, 43, 45 en 49 bij verschillende temperatuur. qP of

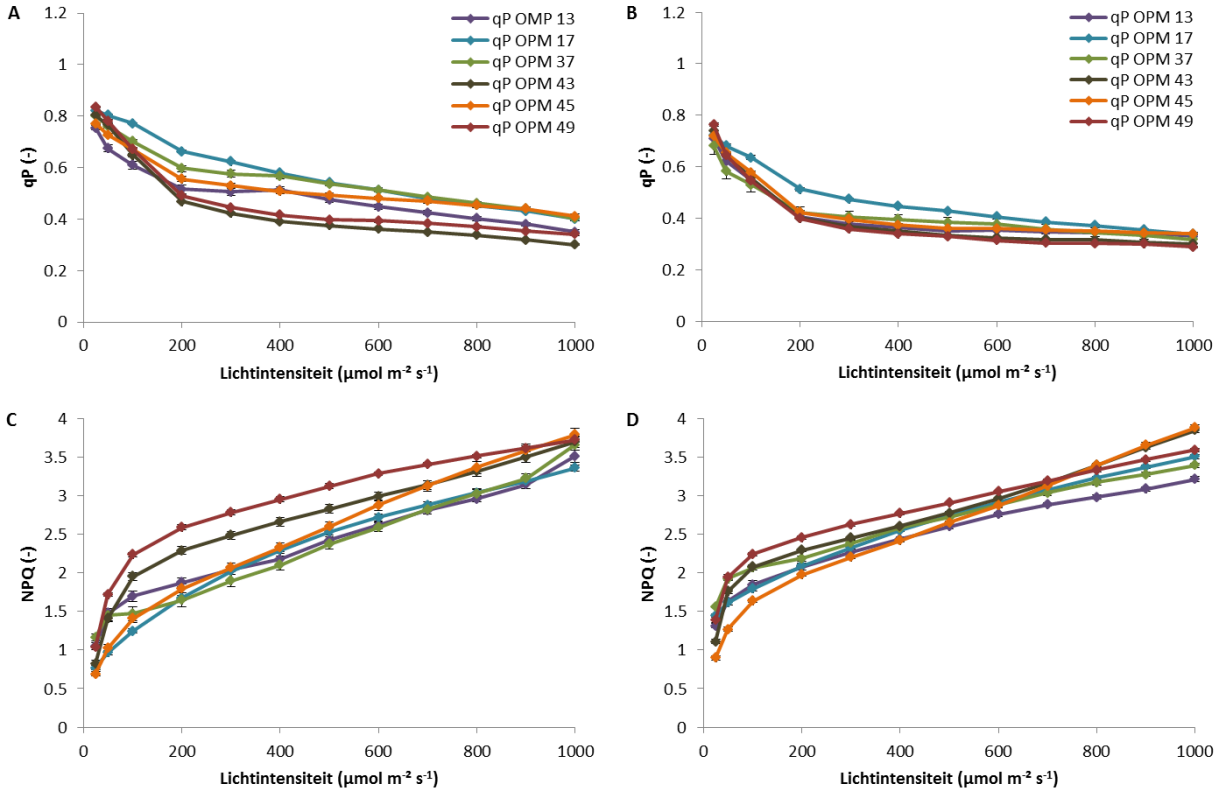
fotochemische quenching (A en B) en NPQ of niet fotochemische quenching (C en D) in functie van de lichtintensiteit (PAR) bij 20 °C (A en C) en bij 12 °C (B en D).

De resultaten voor de verschillende genotypen OPM 13, OPM 17, OPM 37, OPM 43, OPM 45 en OPM 49 gemeten bij 20 °C (*Figuur 21 A*) en bij 12 °C (*Figuur 21 B*) gemeten met de CFImager zijn weergegeven in figuur 19. Hierbij stellen we geen gelijkenissen vast met eerder bekomen resultaten van de LI-6400. De resultaten van de CFImager lijken zelf het omkeerde aan te tonen als we kijken naar het genotype OPM 49. Dit genotype bereikt een ETR van ongeveer 60 bij een lichtintensiteit van 1000 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} terwijl de eerder bekomen ETR via de LI-6400 voor genotype OPM 49 een waarde van 80 bedroeg. Hier kunnen we vaststellen dat er geen gelijke ranking werd gevonden voor ETR bij beide toestellen.



Figuur 21 ETR (electron transfer rate) in functie van de lichtintensiteit voor genotypen OPM 13, 17, 37, 43, 45 en 49 in functie van de fotosynthetische actieve straling (PAR) gemeten bij 20 °C (A) en 12 °C (B).

De resultaten bekomen met de CFImager van de fotochemische- (qP), niet-fotochemische quenching (qN) voor de verschillende genotypen bij 20 °C (*Figuur 22 A en C*) en 12 °C (*Figuur 22 B en D*).

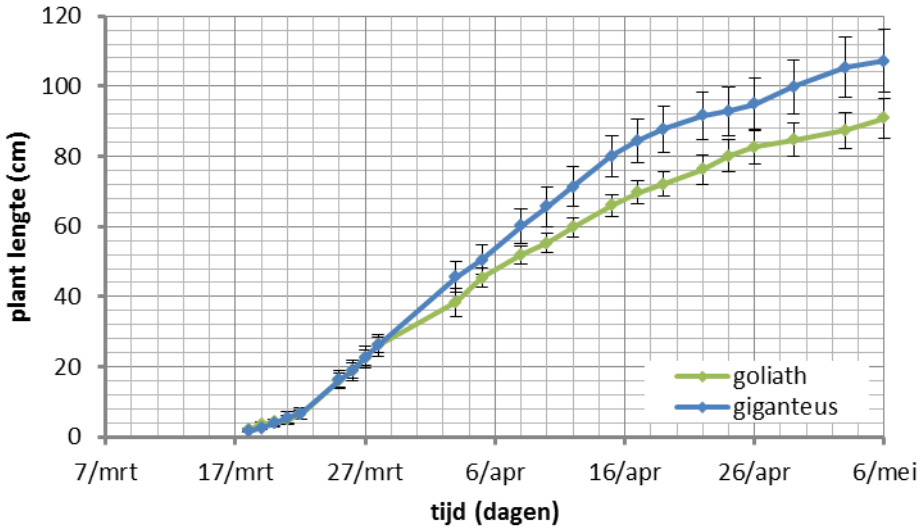


Figuur 22 qP of fotochemische quenching (A en B) en NPQ of niet fotochemische quenching (C en D) in functie van de lichtintensiteit (PAR) voor genotypen OPM 13, 17, 37, 43, 45 en 49 bij 20 °C (A en C) en bij 12 °C (B en D).

Opnieuw kunnen we weinig gelijkenis terugvinden tussen deze resultaten van de CFImager en de eerder bekomen resultaten van de LI-6400. Voor de parameter qP zien we een omgekeerde ranking van de verschillende genotypen. Voor de parameter NPQ kunnen we een min of meer gelijke ranking waarnemen tussen de resultaten van beide toestellen maar er zijn wel enorme verschillen in grote orde.

7.2 Bepaling groeicurve *Miscanthus*

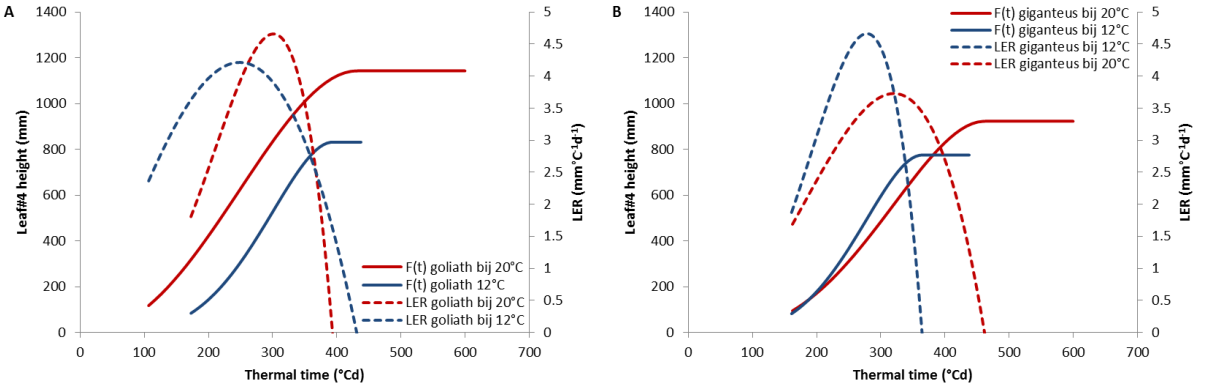
Het opmeten van de lengtegroei van 10 opkomende planten van het genotype *M.* x *giganteus* en *M. sinensis* Goliath werd in een eerste experiment opgevolgd gedurende een maand. Aangezien nog maar weinig scheuten opkwamen werd dit experiment opnieuw gestart met andere planten afkomstig van rizomen. Deze bleken sneller scheuten te vertonen die we verder konden opvolgen naar lengtegroei van de scheut. De bekomen resultaten voor de lengtegroei van de scheuten zijn weergegeven in figuur 23. Deze resultaten geven geen volledige groeicurve weer aangezien het experiment nog liep bij het beëindigen van mijn stage.



Figuur 23 Lengte van de plant uitgezet in functie van de tijd.

We kunnen afleiden uit figuur 23 dat het genotype *M.* x *giganteus* een snellere groei vertoont ten opzichte van *M. sinensis* Goliath. We kunnen verder vaststellen dat gedurende week één beide genotypen een gelijke groei vertonen aangezien de curven samenvallen.

Door een vertraagde installatie van de nieuwe groeikamers liep ons experiment voor de opmeting van het vierde blad vertraging op. Hierdoor beschikken we nagenoeg over te weinig resultaten voor een volledige verwerking. Aangezien dit experiment reeds uitgevoerd werd in ILVO zijn hiervan deze eerder bekomen resultaten weergegeven in figuur 24.

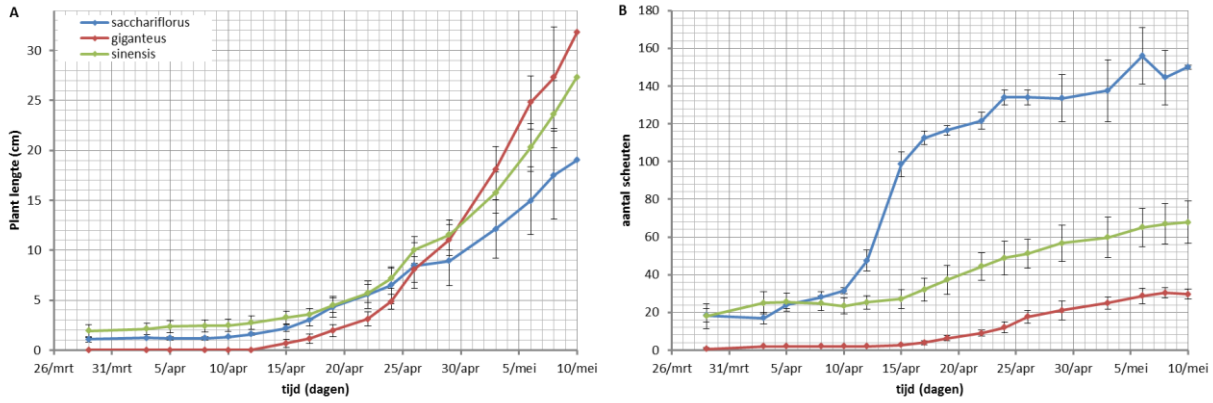


Figuur 24 De gefitte curve waarbij de bladlengte van het 4de blad weergegeven wordt in functie van de tijd voor het genotype *M. sinensis* Goliath (A) en *M.* x *giganteus* (B) bij 12 °C en 20 °C.

7.3 Veldwaarnemingen

In figuur 25 zijn zowel de plant lengte (A) als het aantal scheuten (B) van de genotypen *M. sacchariflorus*, *M.* x *giganteus* en *M. sinensis* weergegeven in functie van de tijd. We kunnen vaststellen dat *M. sacchariflorus* en *M. sinensis* een sterkere voorjaarsgroei vertonen gedurende de eerste weken van april ten opzichte van het genotype *M.* x *giganteus.* Wanneer dit genotype echter begint te groeien (eind april) kunnen we waarnemen dat deze veel hogere waarden bereikt in plant lengte dan beide andere genotypen. Bij de vorming van de scheuten kunnen we vaststellen dat *M. sachariflorus* het meeste scheuten vormt ten opzichte van de andere twee genotypen.

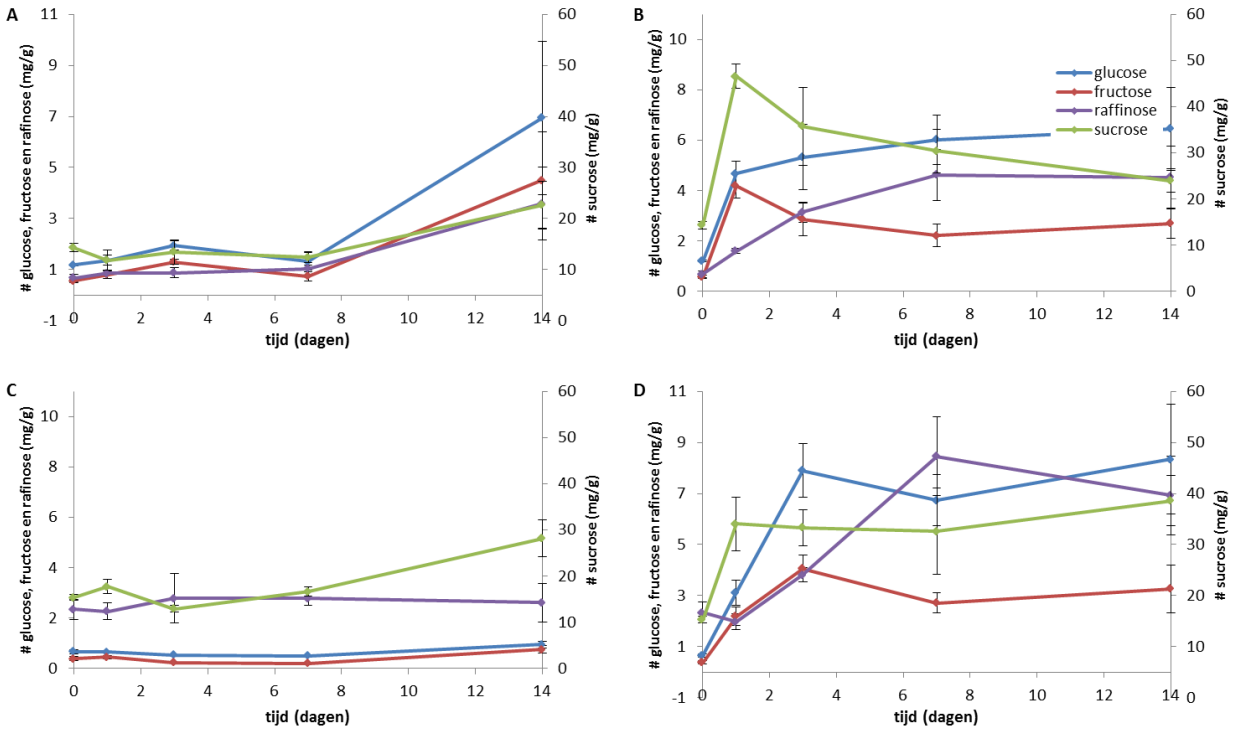
b



Figuur 25 De plant lengte (A) en het aantal scheuten (B) van de genotypen *M. sacchariflorus*, *M.* x *giganteus* en *M. sinensis* weergegeven in functie van de tijd.

7.4 Suikeranalyse

De resultaten van de suikeranalyses voor genotype OPM 13 bij 20 °C (A) en bij 12 °C (B) en het genotype OPM 17 bij 20 °C (C) en bij 12 °C (D) zijn weergegeven in figuur 26.



Figuur 26 Hoeveelheid suikers (glucose, fructose, raffinose en sucrose) weergegeven in functie van de tijd bij de genotype OPM 13 bij 20 °C (A) en bi12 °C (B) en bij genotype OPM 17 bij 20 °C (C) en bij 12 °C (D).

In figuur 26 B kunnen we op dag 1 een onmiddellijke stijging in aantal suikers vaststellen. Voor de suikers glucose en raffinose neemt deze stijging in aantal suikers verder toe terwijl voor sucrose en fructose we een afname in suiker krijgen na dag 1. In figuur 26 A kunnen we pas een stijging in aantal suikers waarnemen tussen dag 7 en dag 14. In figuur 26 D zien we na dag 1 een stijging in glucose, fuctose en sucrose. Verder kunnen we waarnemen dat de suikers glucose en fructose pieken op dag

3 terwijl raffinose een piek bereikt op dag 7. In figuur 26 C blijven de suikergehalten redelijk constant, met uitzondering van een stijging van sucrose tussen dag 7 endag 14.

Wanneer we voor beide behandelingen kijken naar het aantal suikers geaccumuleerd op dag 14 dan zien we dat voor het genotype OPM 13 deze ongeveer hetzelfde zijn voor 12 °C en 20 °C. Dit is nogal een vreemde ontdekking aangezien we verwachten dat er minder suikers accumuleren bij optimale temperatuur. Voor het genotype OPM 17 merken we op dat totale suikergehalten op dag 14 veel lager zijn bij 20 °C dan bij 12 °C.

Tenslotte stellen we ook vast dat bij 12 °C sucrose beduidend hogere waarden aanneemt bij het genotype OPM 17 dan bij het genotype OPM 13.

8 Discussie

8.1 Fotosynthese metingen

Uit al onze resultaten van de verschillende *Miscanthus* genotypen kunnen we afleiden dat de P_{max} bij 12 °C lager gelegen is dan bij 20 °C. De grote verschillen in P_{max} tussen beide temperaturen kunnen we verklaren door het feit dat P_{max} deel uitmaakt van de chemische donkerreacties en bijgevolg temperatuur afhankelijk is. Eveneens de respiratie gemeten in het donker R_d wordt beschouwd als een maat voor de metabolische activiteit van de plant. Hoe hoger de temperatuur, hoe meer de plant zal respireren. Aangezien het genotype *M.* x *giganteus* bij beide temperaturen steeds de bovenste lichtresponsiecurve aanneemt verklaart zijn belang voor bio-energieproductie. Het bovenaan liggen van de lichtresponsie curve voor genotype OPM 13 bij 12 °C is te verklaren door het feit dat genotype OPM 13 kiltetolerant is. Dit werd reeds aangetoond in eerder uitgevoerde experimenten.

Het lichtcompensatiepunt I_c maakt geen deel uit van de donkerreacties bij de fotosynthese. Het feit dat het lichtcompensatiepunt bij 20 °C hoger gelegen is betekent dat de planten gemeten bij 20 °C meer licht moesten percipiëren vooraleer de respiratie door de fotosynthese werd gecompenseerd.

Aangezien de grootste verschillen in netto fotosynthese of P_{max} bij beide temperaturen voornamelijk gelegen zijn bij hogere lichtintensiteit (*Figuur 16*). In het voorjaar zijn deze hoge lichtintensiteiten echter minder belangrijk aangezien de gemiddelde PAR dan ongeveer 400-500 µmol/m^2s bedraagt. De parameter die dan belangrijker wordt is α_c. We kunnen dus stellen dat niet noodzakelijk de P_{max} bepalend is voor een koude toleranter genotype in het voorjaar.

8.2 Chlorofyl fluorecentie metingen

De relatie tussen de bruto fotosynthese en ETR is te verklaren doordat ETR de werkelijke snelheid van de fotonen weergeeft met andere woorden de elektronen die effectief de fotochemische elektonentransportketen doorlopen. Vandaar dat deze curven net zoals de curven van P_n lager gelegen zijn bij 12 °C dan bij 20 °C.

De lagere waarde van Fv/Fm bij 12 °C is te verklaren door het feit dat bij deze temperatuur het PSII complex meer beschadigd wordt dan bij een temperatuur van 20 °C. Hetzelfde geldt voor Fv'/Fm' waarbij het werkelijk absorptierendement van het open PSII reactiecentrum lager gelegen is bij 12 °C.

Aangezien de fotosynthese afneemt wanneer planten blootgesteld worden aan koude zal de fotochemische quenching ook afnemen. Dit is te verklaren door het feit dat er minder van de excitatie-energie omgezet wordt in chemische energie en op die manier minder energie beschikbaar is voor de fotosynthese. Hierbij zal de fluorescentie toenemen wat gepaard gaat met een toename in niet-fotochemische quenching bij 12 °C.

Het feit dat we uit de resultaten van beide toestellen niet altijd dezelfde conclusies kunnen trekken is misschien te verklaren door het feit dat de CFImager en de LI-6400 in een aantal zaken verschillen. Beide toestellen beschikken over ander licht. De LI-6400 bevat 90 % rood en 10 % blauw licht terwijl de CFImager over 100 % bauw licht beschikt. Verder wordt bij de LI-6400 een volledig blad in de cuvette gemeten terwijl de CFImager zijn licht stuurt op een ponsing van een blad. Daarbovenop drijft dit blad nog eens op water wat bij het blad in de cuvette helemaal niet het geval is. Bij de CFImager kon de heterogeniteit van de belichting een effect gehad hebben aangezien er 5 % variabiliteit is. Verder werd er hiervoor niet in blokken gewerkt. De CFImager biedt heel wat voordelen door zijn beeldanalyse van 96 stalen tegelijkertijd maar er moet nog heel wat op punt gesteld worden inzake de uniformiteit van het licht. Hierbij zou het een oplossing zijn meer te standaardiseren en in blokken te werken.

8.3 Suikeranalyse

De sterkere toename in bladsuikers bij het genotype OPM 13 bij 12 °C duidt er op dat dit genotype zich beter kan aanpassen aan koudere omstandigheden. De plant zorgt ervoor dat er meer suikers aangemaakt worden en/of minder suikers geexporteerd worden en dit zou kunnen bijdragen tot kiltetolerantie via hoger vermelde mechanismen. Het omgekeerde kunnen we waarnemen bij genotype OPM 17 waarbij de suikerconcentraties veel minder varieren tussen beide en mogelijks is dit gerelateerd aan kiltegevoeligheid.

Dankwoord

Na een uiterst leerzame stage en een onvergetelijke ervaring bij ILVO wil ik graag Prof. Van den Ende Wim als promotor en Lootens Peter als stagebegeleider in het bijzonder bedanken voor de kansen die ze me gegeven hebben.

ILVO was een uitstekende stageplaats waar ik werd behandeld als medewerker en niet als stagiair. Ik heb zelf heel wat opgestoken tijdens deze stage. Ik weet nu hoe belangrijk het is koude tolerantie te bestuderen in een vroeg stadium en op welke manier gezocht wordt naar snelle screeningsmethoden van verschillende genotypen in het kader van veredeling.

Ook heb ik nu aan den lijve ondervonden dat je wetenschappelijk onderzoek niet mag onderschatten. Het gaat dikwijls gepaard met heel wat geduld en een tegenslag is zeker en vast niet uitgesloten.

Referentielijst

Aït Barka E., Audran J. C. (1996). Réponse des vignes champenoises aux témperatures négatives: effet d'un refroidissement contrôlé sur les réserves glucidiques du complexe gemmaire avant et au cours du débourrement. Can. J. Bot. **74**: 492-505.

Auzanneau J., Huyghe C., Escobar-Gutiérrez J. A., Julier B., Gastal F., Barre P. (2011). Association study between the gibberellic acid intensitive gene and leaf lenght in a Lolium perenne L. synthetic variety. BMC Plant Biology **11**: 183.

Björkman O., and Demmig B. (1987). Photon yield of O2 evolution and chlorofyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plant of diverse origins. Planta **170**: 489-504.

Bohnert H. J., Sheveleva E. (1998). Plant stress adaptations—making metabolism move. Curr Opin Plant Biol **1**: 267–274.

Cossins A. R. (1994). Homeoviscous adaptation of biological membranes and its functional significance. In AR Cossins, ed, Temperature adaptation of biological membranes. Portland Press,London, p. 63-76.

Couee I., Sulmon C., Gouesbet G., El Amrani A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. J Exp. Bot. **57**: 449-459.

DeEll J. R. and Toivonen P. (2003). Springer p. 259.

Elstner E. F., Osswald W. (1994). Mechanisms of oxygen activation during plant stress. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B: Biological Sciences **102**: 131-154.

Fernandez O., Bethencourt L., Quero A., Sangwan R. S., Clement C. (2010). Trehalose and plant stress responses: friend or foe? Trends Plant Sci **15**: 409-417.

Fernandez O., Theocharis A., Bordiec S., Feil R., Jacquens L., Clément C., Fontaine F., Ait Barka E. (2012). Burkholderia phytofirmans strain PsJN acclimates grapevine to cold by modulating carbohydrates metabolism. Mol. Plant Microbe Interact. **25**: 496-504.

Foyer C. H., Shigeoka S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. Plant Physiology **155**: 93-100.

Heaton, E. A., Boesma, N. N., Caveny, J. D., Voigt, T. B. and Dohleman, F. G. (2010). *Miscanthus* for biofuel production. Extension bioenergy feedstock community of practice http://www.extension.org/pages/Miscanthus_for_Biofuel_Production.

Hekneby M., Antolin M. C., Sanchez-Diaz M. (2006). Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. Environ Exp. Bot. **55**: 305–314.

Hendry G. A. F. (1993). Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biographic and mechanistic appraisal. New Phytologist **123**: 3-14.

Hernandez-Martin E., Martinez A. (2012). Carbohydrates and their free radical scavenging capability: a theoretical study. Journal of Ohysical Chemistry B **116**: 9668-9675.

Hsieh T. H., Lee J. T., Yang P. T., Chiu L. H., Charng Y.Y., Wang Y.C., Chan M. T. (2004). Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. Plant Physiol **135**: 1145-1155.

Kates M., Pugh E.L., Ferrante G. (1984). Regulation of membrane fluidity by lipid desaturases. Biomembranes **12**: 379-395.

Knight H., Brandt S., Knight M.R. (1998). A history of stress alters drought calcium signalling pathways in Arabidopsis. Plant J **16**: 681-687.

Le Syndicat Agricole (2010). Le miscanthus, une resource pour fabriquer de la biomasse et des biomatériaux. 16.

Linde-Laursen, I. (1993). Cytogenetis analysis of *Miscanthus* 'Giganteus', an interspecific hybrid. Hereditas **119**: 297-300.

Matteucci M., D'Angeli S., Errico S., Lamanna R., Perrotta G., Altamura M. M. (2011). Cold affects the transcription of fatty acid desaturases and oil quality in the fruit of Olea europaea L. genotypes with different cold hardiness. J Exp Bot **62**:3403–3420.

Maxwell K. and Johnson G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. Journal of experimental botany **51**: 659-668.

McKersie, B. D. and Leshem, Y. Y. (1994). "Chilling Stress. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants" Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Miller R. W., Baran L. R. (1984). Control of membrane fluidity in *Physarum*. Biomembranes **12**: 433-449.

Murata N., Wada H. (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. Biochemical Journal **308**: 1-8.

Nishida I., Murata N. (1996). Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. Annual review Plant Physiology and Plant Molecular Biology **47**: 541-568.

Nishizawa A., Yabuta Y., Shigeoka S. (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. Plant Physiology **147**: 1251-1263.

Novabiom (2010). Le miscanthus. http://www.novabiom.com/.

Novem (1999). Geteelde biomassa voor energieopwekking in Nederland. Identificatie van de meest veelbelovende mogelijkheden tot kostenreductie in vier ketens. Petten.

Nozawa Y., Umeki S. (1988). Regulation of membrane fluidity in unicellular organisms. In RC Aloia, CC Curtain, LM Gordon, eds, Advances in Membrane Fluidity, Vol III. Alan R. Liss, New York, p. 239-257.

Orvar B. L., Sangwan V., Omann F., Dhindsa R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. Plant J **23**:785–794.

Patton A. J., Cunningham S. M., Volenec J. J., Reicher Z. J. (2007). Differences in freeze tolerance of zoysiagrasses: II. Carbohydrates and proline accumulation. Crop Science Society of America, Madison.

Pego J. V., Kortstee A. J., Huijser C., Smeekens S. C. M. (2000). Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. J Exp Bot **51:** 407-416.

Penna S. (2003). Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. Trends Plant Sci **8**: 355-357.

Peshev D., Van den Ende W. (2012). Sugars as antioxidants in plants. In: Tuteja N, Gill SS, eds. Crop improvement under adverse conditions. New York: Sprinter Science + Business Media, 285-308.

Pollock C. J. , Cairns A. J. (1991). Fructan metabolism in grasses and cereals. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **42**:77-101.

Pontis H. G. (1989). Fructan and cold stress. Journal of Plant Physiology **134**:148-150.

Ramon M., Rolland F., Sheen J. (2008). Sugar sensing and signaling. The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists. **10**: 1199.

Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annual Review Plant Biology **57**:675-709.

Ruelland E., Vaultier M. N., Zachowski A., Hurry V., Kader J.C, Delseny M. (2009). Cold signalling and cold acclimation in plants. Adv Bot Res **49**:35–150.

Ruelland E., Zachowski A. (2010). How plants sense temperature. Environ Exp Bot **69**:225–232.

Russel N. J. (1984). Mechanisms for thermal adaptation in bacteria; blueprint for survival. Trends Biochemical Science **9**: 108-112.

Sangwan V., Orvar B. L., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R. S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. Plant J **31**:629–638.

Schneider T., keller F. (2009). Reffinose in chloroplast is synthesized in the cytosol and transported across the chloroplast envelope. Plant and cell physiology **50**: 2174-2182.

Schreiber, U., Bilger W., Neubauer, C. (1994). Chlorofyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. Ecophysiology of Photosynthesis. Spinger-Verlag, Berlin. 49-70.

Scurlock, J. M. O. (1999). Miscanthus: a review of European experience with a novel energy crop. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee. p. 26.

Seo P. J., Kim M. J., Park J. Y., Kim S. Y., Jeon J., Lee Y. H., Kim J., Park C. M. (2010). Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in Arabidopsis. Plant J **61**:661–671.

Snauwaert E. (2012). Groene grondstoffen: Miscanthus. Inagro vzw, afdeling maatschappij en leefomgeving, p. 1-20.

Somerville C. R., Browse J. (1991). Plant lipis: metabolism, mutants, and membranes. Science **252**: 80-87.

Spollen W. G., Nelson C. J. (1994). Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. Plant Physiology **106**: 329–334.

Stoyanova S., Geuns J., Hideg E., Van den Ende W. (2011). The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. International Journal of Food Sciences and Nutrition **62**: 207-214.

Stubbs C., Smith A. D. (1984). The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. Biochim. Biophys. Acta. **779**: 89-137.

Tabaei-Aghdaei S. R., Pearce R. S., Harrison P. (2003). Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing-tolerance in barley cell cultures. J Exp Bot **54**: 1565-1575.

Taiz L., Zeiger E. (2006). Plant Physiology, 4th edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, p. 782.

Thompson G. A. (1989). Membrane acclimation by unicellular organisms in response to temperature change. Journal Bioenergy Biomembranes **21**: 43-60.

Uemura M., Steponkus P. L. (1999). Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. J Plant Res **112**: 245–254.

Uemura M., Warren G., Steponkus P. L. (2003). Freezing sensitivity in the sfr4 mutant of Arabidopsis is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness. Plant Physiol **131**: 1800–1807.

Van den Ende W., Walluru R. (2009). Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? Journal of Experimental Botany **60**: 9-18.

Van Kooten O., Snel J.F.H. (1990). The use of chlorofyll fluorescence nomenclature in plants stress physiology. Photosynth. Res. **25**: 147-150.

Welling A., Palva E. T. (2006). Molecular control of cold acclimation in trees. Physiology Plant **127**: 167–181.

Xin Z., Browse J. (2000). Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. Plant Cell Environ **23**: 893–902.

Zeng Y., Yu J., Cang J., Liu L., Mu Y., Wang J., Zhang D. (2011). Detection of sugar accumulation and expression levels of correlative key enzymes in winter wheat (Triticum aestivum) at low temperatures. Biosci Biotechnol Biochem **75**: 681-687.

Zhang S., Jiang H., Peng S., Korpelainen H., Li C. (2011). Sex-related differences in morphological, physiological, and ultrastructural responses of Populus cathayana to chilling. J Exp Bot **62**: 675-686.

Zhu J. H., Dong C. H., Zhu J. K. (2007). Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism ans RNA processing during plant cold acclimation. Curr Opin Plant Biol **10**: 290-295.

Bijlagen