

DIE INVLOED VAN FENOLIESE VERBINDINGS OP
SOMMIGE ENSIEME EN METABOLIESE PROSESSE
IN LOOFBLARE VAN *PROTEA NERIIFOLIA* R. Br.

deur

CARIN HUYSER

Voorgelê ter vervulling van die vereistes
vir die graad Magister Scientiae in Plant=
kunde in die Fakulteit Natuurwetenskappe
aan die Potchefstroomse Universiteit vir
Christelike Hoër. onderwys

Promotor: Dr. C.S. Whitehead

POTCHEFSTROOM
November 1980

INHOUDSOPGAWE

1.	INLEIDING EN LITERATUUROORSIG	1
1.1	Inleiding	1
1.2	Literatuuroorsig	1
1.2.1	Algemeen	2
1.2.2	Flavonoïede	2
1.2.3	Membrane en membraanpermeabiliteit	7
1.2.4	Respirasie	15
1.2.5	Proteïene en ensieme	19
1.2.5.1	Lipase	23
1.2.5.2	Chlorofillase	25
1.2.5.3	Malaatdehidrogenase	28
2.	EKSPERIMENTEEL EN RESULTATE	
2.1	Materiaal en metode	31
2.1.1	Bron van plantmateriaal	31
2.1.2	Bepaling van die respirasietempo	31
2.1.3	Bepaling van die persentasie skynbare vrye ruimte (%SVR) in die loofblare van <i>Protea neriifolia</i> . 32	
2.1.3.1	Bepaling van die inkubasieperiode	32
2.1.3.2	Inkubasie van weefselkyfies	33
2.1.3.3	Radiometriese analise en berekening van persentasie skynbare vrye ruimte (%SVR)	33
2.1.4	Bepaling van die chlorofilinhoud van <i>Protea neriifolia</i> -loofblare... .. .	34
2.1.5	Bepaling van die ultrastrukturele veranderinge in die selle van <i>Protea neriifolia</i> -loofblare	35
2.1.6	Ekstraksie van die flavonoïede vanuit die loofblare van <i>Protea neriifolia</i>	36
2.1.6.1	Papierchromatografiese skeiding van die komponente van 'n flavonoïedekstrak uit loofblare van <i>Protea neriifolia</i>	37
2.1.6.2	Bepaling van die teenwoordigheid van leuko-antosianiene in die afsonderlike flavonoïedkomponente	37
2.1.7	Ekstraksie van die totale oplosbare proteïene vanuit die loofblare van <i>Protea neriifolia</i>	38

2.1.7.1	Kwantitatiewe bepaling van die totale oplosbare proteïene	39
2.1.7.2	Kwantitatiewe bepaling van die lipase-aktiwiteit.	39
2.1.7.3	Kwantitatiewe bepaling van chlorofillase-aktiwiteit.	40
2.1.7.3.1	Chromatografiese skeiding van chlorofilpigmente..	40
2.1.7.3.2	Bepaling van die inkubasieperiode en chlorofillase-aktiwiteit	41
2.1.7.4	Kwantitatiewe bepaling van die malaatdehidrogenase-aktiwiteit	42
2.1.8	Bepaling van die invloed van die flavonoïedekstrak op die ensiemekstrak	43
2.1.9	Bepaling van die invloed van die afsonderlike flavonoïedkomponente op die ensiemekstrak	43
2.2	Resultate	44
2.2.1	Verandering in die respirasietempo in loofblare van <i>Protea neriifolia</i> (Sien 2.1.2)	44
2.2.2	Duur van die inkubasieperiode tydens die bepaling van die persentasie skynbare vrye ruimte (%SVR) in die loofblare van <i>Protea neriifolia</i> (Sien 2.1.3.1)	44
2.2.3	Veranderinge in die persentasie skynbare vrye ruimte in loofblare van <i>Protea neriifolia</i> na oes (Sien 2.1.3)	47
2.2.4	Verandering in die chlorofilinhoud van <i>Protea neriifolia</i> -loofblare na pluk (Sien 2.1.4)... ..	47
2.2.5	Ultrastrukturele veranderinge in die selle van <i>Protea neriifolia</i> (Sien 2.1.5)	49
2.2.7	Bepaling van die teenwoordigheid van leuko-antosianiene in die flavonoïedekstrak uit loofblare van <i>Protea neriifolia</i> (Sien 2.1.6.2)... ..	51
2.2.8	Verandering in die totale oplosbare proteïeninhoud in die loofblare van <i>Protea neriifolia</i> na pluk (Sien 2.1.7)	51
2.2.9	Na-oesverandering in die lipase-aktiwiteit in loofblare van <i>Protea neriifolia</i> (Sien 2.1.7.2). ..	57
2.2.10	Duur van die inkubasieperiode gedurende bepaling van die chlorofillase-aktiwiteit (Sien 2.1.7.3.2)... ..	57

2.2.10.1	Kwantitatiewe bepaling van die chlorofillase-aktiwiteit in loofblare van <i>Protea neriifolia</i> na pluk (Sien 2.1.7.3)	62
2.2.11	Verandering in die malaatdehidrogenase-aktiwiteit in loofblare van <i>Protea neriifolia</i> na pluk (Sien 2.1.7.4)	62
2.2.12	Invloed van die flavonoïedekstrak op die lipase-aktiwiteit in loofblare van <i>Protea neriifolia</i> na pluk (Sien 2.1.8)	64
2.2.13	Invloed van die flavonoïedekstrak op die chlorofillase-aktiwiteit in loofblare van <i>Protea neriifolia</i> na pluk (Sien 2.1.8)	66
2.2.14	Invloed van die flavonoïedekstrak op die malaatdehidrogenase-aktiwiteit in loofblare van <i>Protea neriifolia</i> na pluk (Sien 2.1.8)	68
2.2.15	Invloed van die verskillende chromatografiesgeskeide flavonoïedkomponente op die lipase-, chlorofillase- en malaatdehidrogenase-aktiwiteit in loofblare van <i>Protea neriifolia</i> op verskillende dat na pluk (Sien 2.1.9)	70
3.	BESPREKING EN GEVOLGTREKKING	79
4.	OPSOMMING	102
5.	SUMMARY	105
6.	BEDANKINGS	108
7.	BIBLIOGRAFIE	109
8.	ILLUSTRASIES	127

1. INLEIDING EN LITERATUUROORSIG

1.1 Inleiding

Die suksesvolle bemerking van goeie gehalte snyblomme op plaaslike sowel as oorsese markte, het in toenemende mate van ekonomiese belang vir Suid-Afrika geword. Loofblaarverbruining is een van die kardinale knelpunte wat tans in die proteabedryf ondervind word. Die spoedige verbruining van die loofblare op die bloeistele van sommige proteaspesies soos *Protea neriifolia* R. Br. en *Protea compacta* R. Br. veroorsaak 'n afname in die hou vermoë en 'n gevolglike verlies aan die ekonomiese waarde van die blomme. Verbruining tree dikwels reeds in voordat die blomme die markte bereik, met die gevolg dat voornemende kopers dit onaanvaarbaar vind. Dit lei daartoe dat besendings dikwels afgekeur word, sodat kwekers daardeur groot ekonomiese verliese ly.

Aangesien proteas gesogte inheemse snyblomme is en in toenemende mate plaaslik sowel as buitelandse bemerk word, is die gehalte en hou vermoë van hierdie snyblomme dus van uiterste belang. Navorsing ten opsigte van biochemiese en fisiologiese faktore wat tot loofblaarverbruining aanleiding gee is dus noodsaaklik, ten einde die verbruiningsvraagstuk doeltreffend te bekamp. Meer kennis aangaande metaboliese prosesse van protealoofblare in die na-plukstadium kan uiteindelik lei tot die ontwikkeling van doeltreffende beheermiddels en beheermaatreëls om die verbruiningsprosesse te vertraag.

1.2 Literatuuroorsig

1.2.1 Algemeen

Die verbruining van protealoofblare word nie direk met fito-gerontologie geassosieer nie, aangesien verbruining onder sekere gunstige toestande binne enkele ure na pluk by sekere sensitiewe spesies kan intree. Vorige navorsingsondersoeke het getoon dat die verbruining wat in die loofblare van *Protea neriifolia* plaasvind, verwant is aan dié wat by sommige oorryp vrugte soos piesangs en avokadopere, aangetref word (De Swardt, 1977). Verbruining van plantweefsels word met die ensimatiese sowel as lugoksidase van sommige fenoliese verbindings geassosieer (Evelyn, Maihs & Roux, 1960). Meganiese beskadiging van plantweefsels wat aan lug blootgestel is, kan verbruining daarvan veroorsaak (Boswell, 1963), aangesien die vernietiging van inter- en intrasellulêre kompartementasie tydens beskadiging veroorsaak dat flavonoïede met suurstof in die lug in aanraking kom. Oksiderende ensieme kan egter ook die oksidasie van fenoliese verbindings tot bruingekleurde produkte kataliseer (Walker, 1975). Volgens Whitehead (1979) blyk dit dat lugoksidase van flavonoïede 'n groter bydrae as ensimatiese oksidasie tot die verbruining van *Protea neriifolia*-loofblare lewer.

1.2.2 Flavonoïede

Die flavonoïede is die grootste enkele groep fenoliese verbindings wat in plante aangetref word (Smith, 1976). Dit is wateroplosbare verbindings wat bestaan uit twee aromatiese ringe wat

deur middel van 'n C₃-alifatiese ketting verbind word. Klasfikasie van die flavonoïedaglikone geskied op grond van die oksidasietoestand van die C₃-eenheid en die teenwoordigheid van hidroksiel- en metoksigrroepe op die flavankern (Robinson, 1969).

Flavonoïede kom algemeen in die sel as glikosiede voor. Een of meer van die hidroksielgroepe word deur middel van 'n O-glikosiedband aan 'n suiker gekoppel, alhoewel C-glikosiede ook aangetref word (Gibbs, 1974). Dit het tot gevolg dat hul oplosbaarheid in die selsap verhoog, sodat akkumulاسie van die flavonoïede in die vakuool plaasvind en translokاسie daarvan vergemaklik word.

Flavonoïede word algemeen in die vakuool of in gespesialiseerde organelle, die chromoplaste, aangetref (Goodwin & Mercer, 1972). Volgens Faust, Chase en Massey (1967) is dit egter ook moontlik dat flavonoïede in die sitoplasma aangetref kan word. Die oksidasie van sodanige flavonoïedverbindings deur koperbevattende ensieme soos polifenoloksidases en katalases kan verbruining van plantweefsels tot gevolg hê (Bonner, 1957; Burgess, 1963; Sheen, 1969). Volgens Anderson (1968) is die vorming van kinone, gekondenseerde tanniene en bruin pigmente uit flavonoïede primêr by weefselverbruining betrokke.

Tanniene is polifenoliese verbindings met 'n hoë molekulêre massa. Dit is in staat om effektiewe wateronoplosbare kruisbindings met proteïene en ander polimere te vorm (Swain, 1965). Twee tipes tanniene word onderskei, naamlik hidroliseerbare

tanniene wat gedurende hidrolise gallussuur of 'n mengsel van gallus- en ellaginiensuur vorm (Ribereau-Gayon, 1972), en gekondenseerde tanniene wat polimere van katekiene (flavan-3-ole) (Creasy & Swain, 1965) of leuko-antosianiene (flavan-3;4-diole) is (Roux & Evelyn, 1958). Die vernaamste verskil tussen katekiene en leuko-antosianiene lê daarin dat katekiene hoofsaaklik geelbruin onoplosbare flobafene tydens verhitting in 'n suurmedium vorm, terwyl leuko-antosianiene rooi-bruin flobafene sowel as die ooreenstemmende antosianidiene vorm (Ribereau-Gayon, 1972, Robinson, 1969; Swain, 1965). Leuko-antosianiene word in die vrugte en bas van baie spesies aangetref, en staan algemeen as tanniene bekend. Volgens Bate-Smith en Lerner (1954) is tanniene polimere wat uit 2-10 monomeriese leuko-antosianieneenhede opgebou is. Leuko-antosianiene is in relatief hoë konsentrasies uit *Protea neriifolia* geïsoleer (De Swardt, 1977). Elsworth en Martin (1971) en Mulder (1977) het bevind dat *Protea neriifolia* die leuko-antosianien, leukosianidien bevat.

As gevolg van die vorming van aktiewe kruisbindings tussen proteïene en tanniene, vind presipitasie van proteïene in die teenwoordigheid van tanniene plaas (Swain, 1965). Tanniene kan met proteïene verbind deur middel van die vorming van waterstofbande tussen die fenoliese hidroksielgroepe van die tanniene en karbonielgroepe van die proteïenpeptiedbande, sowel as deur middel van die vorming van kovalentebande tussen kinoongroepe in die tanniene en reaktiewe groepe in die proteïenmolekule (Ribereau-Gayon, 1972; Swain, 1965). Presipitasie van proteïene in die teenwoordigheid van tanniene hang tot 'n groot mate af

van die wateroplosbaarheid en molekulêre grootte van die tanniene, asook van die aantal hidroksielgroepe wat in die tannienmolekule aanwesig is (Rhodes, 1977). Fenoliese verbindings met 'n lae molekulêre massa, soos leuko-antosianiene, is te klein om effektiewe kruisbindings met proteïene te vorm. Hoogs gepolimeriseerde polifenole daarenteen, sal as gevolg van hul onoplosbaarheid in water en hul molekulêre grootte moeilik met proteïene verbind (Haslam, 1975). Ensimatiese oksidasie van lae-molekulêre massa fenoliese verbindings in die sel veroorsaak die vorming van kinone (Rhodes, 1977), wat oksiderend van aard is en kovalente bindings met amiene, α -amino-, imino- en tiolgroepe in proteïene vorm (Loomis & Battaile, 1966; Van Sumere, Albrecht, Dedonder, De Pooter & Pe, 1975). Kinone ondergaan *in situ* ook nie-ensimatiese polimeriseringsreaksies om bruingekleurde polimere met tannienagtige kenmerke te vorm. Hierdie polimere kan met proteïene verbind om presipitasie daarvan te veroorsaak (Rhodes, 1977).

Tanniene wat met verbruining geassosieer word, word algemeen in 'n groot verskeidenheid plantweefsels aangetref. Hillis (1955; 1956) bevind dat leuko-antosianiene in die punte van jong groeiende blare van *Eucalyptus* spesies gesintetiseer word, waarna dit dan as glikosiede deur die sifvate na die stingel getranslokeer word. Volgens Roux en Evelyn (1958) is die kambium dié lokaliteit vir die sintese van polifenole wat as tannienvoorlopers dien. Die polifenole word hiervandaan deur middel van sentrifugale en sentripitale translokasie deur die vaatstrale versprei, waarna dit deur middel van twee afsonderlike en hoogs spesifieke ensiensisteme na bas- en kernhouttanniene

omgeskakel word. Kondensasie van tanniene vind eers plaas nadat translokasie van die tannienvoorlopers plaasgevind het (Roux & Evelyn, 1960), aangesien gekondenseerde tannien nie in die intakte plant vervoer kan word nie. Volgens Mulder (1977) en Roux en Evelyn (1960) beweeg tannienvoorlopers as gevolg van 'n konsentrasiegradiëntverskil deur die sifvate vanuit die blare na die stingel, waar dit in tanniene omgeskakel word. Whitehead (1979) het egter in die loofblare van *Protea neriifolia* gevind dat tanniene nie slegs met die vaatbondels geassosieer is nie, maar dat dit ook in geïsoleerde sponsparenchiemselle en in die selle net onder die epidermis op die blaarrand aangetref word. Dit is moontlik dat die selle wat tanniene bevat ook die aktiewe ensiensisteme bevat waardeur tannienvoorlopers na tanniene omgeskakel word. Volgens Maclean en Ivimey-Cook (1958) vind akkumulاسie van tanniene plaas in selle wat nie direk met die normale metaboliese prosesse in die plant geassosieer word nie. Tannienakkumulاسie vind plaas in gespesialiseerde selle, die tannienindioblaste, waarvan die grootste gedeelte van die selinhoud deur tanniene beslaan word (Swain, 1965). Baur en Walkinshaw (1974) beweer egter dat tanniensintese en tannienakkumulاسie in aktiefmetaboliserende selle kan plaasvind en dat tannienneerslae in die sel altyd deur ten minste een eenheidsmembraan omring word.

Tanniene word in die selwand en in die protoplasma van die sel aangetref (Esau, 1965). In die protoplasma kom tanniene in die vakuool (Chafe & Durzan, 1973; Harris, 1971) of verspreid in die sitoplasma voor (Esau, 1965; Harris, 1971).

Die vorm en grootte van tannienneerslae in selle wissel van elektrondigte neerslae van ongeveer 70 μm in klein vakuole, tot groot neerslae in hoogs gevakuoliseerde selle (Chafe & Durzan, 1973). Die sintese van sekere tipes tanniene mag tot afsterwe van die sel aanleiding gee. Akkumulاسie van groot hoeveelhede tanniene in die vakuool, is slegs nadelig vir die sel indien die vakuool die grootste gedeelte van die sel beslaan (Baur & Walkinshaw, 1974). Kleiner tannienbevattende vakuole wat in die sitoplasma voorkom en later met die sentrale vakuool verenig, ontstaan volgens Chafe en Durzan (1973) uit vergrote sisternums van die endoplasmiese retikulum. Uit die resultate van Chafe en Durzan (1973) en Wardrop en Cronshaw (1962) blyk dit dat daar 'n verwantskap tussen styselakkumulاسie en tannienvorming in die sel is.

1.2.3 Membrane en membraanpermeabiliteit

Selmembrane speel 'n belangrike rol in byna alle sellulêre aktiwiteite (Capaldi, 1974). Die interne omgewing van die sel (Theron, 1979) asook die in- en uitvloei van sellulêre metaboliete (Capaldi, 1974) word deur selmembrane (plasmalemma en tonoplas) gereguleer (Theron, 1979). Die sel kan as 'n komplekse membraansisteem beskou word aangesien die kern, chloroplas, mitochondrion, lisosome en protoplasma deur membrane omring word. Daarbenewens kom membraanstrukture soos die endoplasmiese retikulum en diktiosome ook in plantselle voor (De Swardt, 1974). Afgesien van die funksionele vermoëns van selmembrane soos aktiewe vervoer, selektiewe deurlaatbaarheid

(Morré, 1975) en oksidatiewe fosforilasie (Brandton, 1969), verrig selmembrane ook 'n verskeidenheid ander funksies soos die beheer van energie-oordrag (Korn, 1966) en effektiewe funksionering van multi-ensiemsisteme (Cook, 1971).

Die chemiese en strukturele samestelling van selmembrane speel 'n belangrike rol in die beheer van fundamentele metaboliese prosesse. Verskeie strukturele modelle van selmembrane is al voorgestel, ten einde die wyse waarop die lipied- en proteïenmolekule in selmembrane gerangskik is, te verklaar (Theron, 1979). Die lipied-proteïendubbellaagmodel is deur Danielli en Davson in 1935 voorgestel en is die eerste model wat algemeen deur bioloë aanvaar is (Danielli & Davson, 1956; Walker, 1976). Die vloeistof-mosaïekmodel van Singer en Nicolson (1972) word tans algemeen aanvaar en is op bevindings wat met behulp van die vries-etstegniek verkry is, gebaseer (Theron, 1979). Volgens hierdie model vorm lipiedmolekule 'n dubbellaag waarin integrale (intrinsieke) proteïene binne in die membraan en perifere (ekstrinsieke) proteïene aan die buite-oppervlak van die membraan voorkom (Capaldi, 1974). Die asimmetrie van membrane word bepaal deur die perifere proteïenmolekule wat meestal op die sitoplasmiese oppervlak van die selmembraan voorkom, terwyl koolhidrate op die buitenste oppervlak van die membrane aangetref word (Lodish & Rothman, 1979).

Proteïene beslaan sowat 60% en lipiede sowat 30%-50% van die totale droë massa van selmembrane (Benson, 1964; Bretscher, 1973). Koolhidrate beslaan ongeveer 1-10% van die totale massa van die membraan. Monosakkariede word met die ekster-

ne oppervlak van die plasmamembraan geassosieer, waar dit met proteïene en lipiede verbind om glikoproteïene en glikolipiede te vorm (Lodish & Rothman, 1979). Volgens Harrison en Lunt (1975) is die lipiedsamestelling van membrane kenmerkend van spesifieke organelle. Benson (1964), Kates (1970) en Lichtenthaler en Park (1963) het bevind dat daar in die chloroplaslamellae 'n hoër konsentrasie mono- en digalaktosiel-diglisieriede, asook fosfatidielgliserol as in ander sellulêre strukture aangetref word. Nie-polêre lipiede (isoprenoïede) naamlik chlorofille, karotenoïede en plastokinone kom ook in die chloroplasmembrane voor (Rosenberg, 1967). In ander sellulêre membrane is die fosfolipiede fosfatidielcholien (lesitien), fosfatidieletanolamien, fosfatidielinositol en fosfatidielgliserol die vernaamste lipiedkomponente (Ferguson & Simon, 1973; Kalra & Brooks, 1973; McKersie, Lepock, Kruuv & Thompson, 1978). β -Sitosterol, isofukosterol en stigmasterol is die vernaamste sterole wat in plantselmembrane voorkom (McKersie *et al.*, 1978).

Alhoewel daar nie 'n direkte verband tussen protealoofblaarverbruining in die na-oesstadium en fitogerontologie bestaan nie, kan sommige van die veranderinge in sellulêre organisasie wat tydens veroudering plaasvind direk tot weefselverbruining aanleiding gee. Veroudering gaan onder andere met veranderinge in intersellulêre organisasie en membraanpermeabiliteit gepaard (De Swardt, 1974). Veranderinge wat tot 'n onomkeerbare toename in permeabiliteit lei, speel 'n belangrike rol in weefselverbruining (Thomas, Ranson & Richardson, 1973). Die verlies van differensieel deurlaatbare eienskappe van membrane lei tot veranderinge in protoplasmiese

kompartementasie wat ensiem- en substraatverspreiding beïnvloed (Sacher, 1962), sodat fenoliese verbindings en oksiderende ensieme wat in die intakte sel van mekaar geskei is, met mekaar in aanraking kom, wat weer 'n toename in die oksidasie daarvan tot gevolg het.

Die sitoplasma word deur die plasmalemma en die tonoplas omring (Mercer, 1960). Op hierdie wyse word die georganiseerde sitoplasma deur middel van die tonoplas van die vakuool geskei (Matile, 1978). Afbraak van die tonoplas kan aanleiding gee, tot die vermenging van die vakuolêre inhoud met die sitoplasma (Shaw & Manocha, 1965). Hidrolitiese ensieme wat in die selsap voorkom, byvoorbeeld fosfadiesterase, RNAase (Nishimura & Beevers, 1978), nuklease, fosfatase en proteïenase (Boller & Kende, 1979), kan daardeur afbraak van sitoplasmiese komponente veroorsaak (Matile & Moor, 1968). Plantflavonoïede kan in die vakuool aangetref word, sodat dit as gevolg van 'n toename in die tonoplaspermeabiliteit uit die vakuool vrygestel word (Faust *et al.*, 1967), waarna dit as gevolg van ensimatiese en lugoksidase na bruingekleurde pigmente omgeskakel kan word (Whitehead, 1979). Volgens Platonova, Sal'kova en Metlitskii (1974) het 'n toename in membraanpermeabiliteit van die tonoplas intensiewe vakuolisering van die sitoplasma tot gevolg, as gevolg van die vrystelling van die water in die vakuool en die water wat met die membrane geassosieer word. Chafe en Durzan (1973) het gevind dat tannienbevattende sitoplasmiese vakuole tydens veroudering in die sel gevorm word. Platonova *et al.* (1974) het egter bevind dat die veroudering van appelweefsel met 'n afname in die polifenolkonsentrasie in die vakuole gepaard gaan,

terwyl toenemende hoeveelheid op die tonoplas neergeslaan word. Oksidasie van die polifenole word in hierdie geval aan 'n verskuiwing van die pH na 'n meer alkaliese waarde toegeskryf. Afbraak van die tonoplas is 'n kritieke kenmerk van veroudering, aangesien verbindings in die selsap soos polifenole en organiese sure in die sitoplasma vrygestel word en degradasie van ander organelle kan versnel (Shaw & Manocha, 1965). Dit blyk dat die plasmalemma meer stabiel as die tonoplas is (Bain & Mercer, 1964). Tydens veroudering ondergaan die plasmalemma heelwat later eers strukturele veranderinge, deurdad dit disintegreer en van die selwand wegbeweeg (Dodge, 1970). Dit lei uiteindelik tot die afsterwing van die sel (Butler & Simon, 1971).

Chloroplaste is die mees onstabiele organelle in die selle van verouderende plantweefsel (Platonova, *et al.*, 1974). Die vroegste fase van veroudering word deur afbraak van die endoplasmiese retikulum (Shaw & Manocha, 1965) en strukturele veranderinge in die chloroplaste (Barton, 1966) gekenmerk. Met die aanvang van veroudering word styselkorrels in die chloroplaste aangetref (Harnischfeger, 1973). Tydens veroudering vind daar egter akkumulاسie van osmiofiliese (lipied) globules in die chloroplaste plaas (Butler, 1967; Hurkman, 1979), die volume vergroot en die vorm daarvan verander (Dodge, 1970). Verouderende chloroplaste toon ook 'n verlies aan lamellêre struktuur (Platonova *et al.*, 1974), wat met 'n vermindering in die chlorofilinhoud gepaard gaan (Choe & Thimann, 1975). Die verlies aan lamellêre struktuur kan daartoe aanleiding gee dat polifenoloksidase wat in die chloroplastmembrane gelokaliseer is, vrygestel word, sodat oksid

sidase van polifenole in die sitoplasma versnel word (Platonova *et al.*, 1974).

Volgens Platonova *et al.* (1974) is mitochondrions meer stabiele en weerstandbiedende organelle as chloroplaste en sal slegs hul struktuur en membraanintegriteit verloor as verbruining van die sel reeds op 'n gevorderde stadium is.

Daar bestaan 'n direkte verwantskap tussen die struktuur en funksie van mitochondrion tydens veroudering (Varner, 1961), aangesien oksidatiewe fosforilasie op die kristas van die binneste membrane plaasvind (Lehninger, 1978) en 'n verlies aan strukturele geordenheid ook tot 'n verlies van funksionele doeltreffendheid lei (De Swardt, 1974). Volgens Bain en Mercer (1964) ondergaan mitochondrions min strukturele veranderinge tydens veroudering. Shaw en Manocha (1965) het egter bevind dat disorganisasie van die mitochondrions voor dié van die chloroplaste plaasvind. Geswolle kristas en 'n donkergekleurde matriks is die eerste tekens van mitochondriële desorganisasie (Öpik, 1965). Degradasie van die kristas is 'n aanduiding van 'n afname in respiratoriese aktiwiteite (Simon & Chapman, 1961).

Permeabiliteitsveranderinge in sellulêre membrane word deur 'n lekkasie van opgeloste stowwe en elektroliete, 'n toename in skynbare vrye ruimte (SVR) en vloeistofversadiging van intersellulêre ruimtes (Ben-Yehoshua, 1964; Hansen, 1966; Sacher, 1962; 1966) aangedui. Die persentasie skynbare vrye ruimte (% SVR) is daardie gedeelte van 'n sel of weefsel wat gereedelik toeganklik vir die penetrasie van opgeloste stowwe vanuit die eksterne oplossing is (Briggs & Robertson, 1957). 'n Toename in skynbare vrye ruimte gedurende die na-oesstadium

is in avokado's (Ben-Yehoshua, 1964; Sacher, 1962), piesangs (Baur & Workman, 1964; Brady, O'Connell, Smydzuk & Wade, 1970a), tamaties (De Swardt & Rousseau, 1973), ontkiemende komkommer saadlobbe (Ferguson & Simon, 1973) en blaarskyfies van *Mesembryanthemum* sp. en *Rhoeo discolor* (Sacher, 1959) gevind.

Die oorsaak van membraanpermeabiliteitsveranderinge tydens die na-oesstadium is nog onbekend (Sacher, 1973). Volgens McKersie en Thompson (1977) is die fisiese staat van membraanlipiede 'n belangrike faktor in die bepaling van belangrike membraanfunksies soos ensiemaktiwiteite en differensiële deurlaatbaarheid. Die verandering in lipiede van 'n vloeistof-kristallyne (vloeibare) na soliede (kristallyne) fase sal die permeabiliteit van membrane merkbaar beïnvloed (Papahadjopoulos, Jacobson, Nir & Isac, 1973; Raison, Lyons, Mehlhorn, Keith, 1971). Gedurende veroudering vind daar 'n algemene verandering na 'n kristallyne fase by normale fisiologiese temperature plaas (McKersie & Thompson, 1977). Verskeie faktore soos temperatuur (Raison *et al.*, 1971; Davidson & Song, 1975) en sterolinhoud kan die fisiese staat van membrane beïnvloed (Demel, Van Kessel, Van Deenen, 1972).

Tydens veroudering vind 'n verhoogde vrystelling van vrye vetsure (versadig en onversadigde vetsure) plaas (Constantopoulos & Kenyon, 1968). Siegenthaler (1972) het bevind dat die vrystelling van die C₁₈ onversadigde vetsure oleïen-, linolien- en linoleniensuur, volumeverandering van chloro-

plaste tydens veroudering in spinasieblare veroorsaak. Volgens Baddely en Hanson (1967) en Demel *et al.* (1972) toon 'n toename in onversadigde vetsure ook 'n toename in membraanpermeabiliteit. Draper (1969) het bevind dat 'n toename in linoliensuurkonsentrasie in die vrye vetsuurfraksie van verouderende komkommerkiemlinge aan 'n 60% verlies aan galaktolipiede toegeskryf kan word. Die toename in volume verandering van chloroplaste word deur Siegenthaler (1972) aan 'n toename in endogene onversadigde vetsure as gevolg van die hidrolise van lipiede in die membrane van verouderende chloroplaste toegeskryf. Packer, Deamer en Heath (1967) het bevind dat daar ook 'n verwantskap tussen die onversadigde vetsure, volume verandering en die degradasie van die mitochondriale membrane bestaan. Volgens Konze en Elstner (1978) word die vorming van etileen deur die vrystelling van α -linoleniensuur versnel. Draper en Simon (1971) het egter by verouderende komkommersaailinge 'n afname in vrye vetsure in die chloroplaste en 'n toename daarvan in die sitoplasma gevind. Dit is moontlik dat die hidrolise van membraanlipiede (Baddely & Simon, 1969; Draper, 1969; Draper & Simon, 1971; Ferguson & Simon, 1973; Galliard, 1968) 'n verandering in die membraanpermeabiliteit tot gevolg het. Die vermindering in membraanlipiede tydens veroudering (Ferguson & Simon, 1973) veroorsaak veranderinge in die lipoproteïenstruktuur, wat 'n verlies aan differensiële deurlaatbaarheid en 'n toename in die persentasie skynbare vrye ruimte kan veroorsaak (De Swardt & Rousseau, 1973).

Die invloed van monovalente katione op die instandhouding van die membraanpermeabiliteit is deur verskeie navorsers ondersoek. Marinos (1962) en Van Steveninck (1965) het bevind dat

'n gebrek aan kalsium die disintegrasië van die plasmalemma tot gevolg het. Volgens Rousseau, Haasbroek en Visser (1972) het kalsium wat op die skil van appelvrugte toegedien word, 'n stabiliserende invloed op die membraanpermeabiliteit. Poovaiah en Leopold (1973) het ook bevind dat 'n afname in die chlorofilinhoud en proteïenkonsentrasie, sowel as 'n toename in die % SVR, deur middel van kalsiumbehandeling by *Rumex*-blare teengewerk word.

1.2.4 Respirasie

Respirasie is 'n oksidasie-reduksieproses waartydens substraate na koolstofdiksied geoksideer word en suurstof geabsorbeer en gereduseer word om water te vorm. Stysel, sukrose, ander koolhidrate, vette, organiese sure en proteïene kan onder sekere omstandighede as respiratoriese substrate gebruik word. Oksidatiewe fosforilasie is die proses waartydens suurstof opgeneem word en ATP gevorm word (Salisbury & Ross, 1969). Respirasie kan dus as die oksidasie van sellulêre metaboliete met die oordraging van elektrone deur 'n reeks van sellulêre ensieme na molekulêre suurstof, gedefinieer word (Goddard & Meeuse, 1950).

Nadat sommige snyblomme by volwassenheid gepluk is, toon dit net soos klimakteriese vrugte 'n geleidelike verlaging in die respiratoriese tempo totdat 'n minimumwaarde, die preklimakteriese minimum, bereik word. Daarna volg 'n styging in respirasietempo om 'n piekwaarde, bekend as die klimakteriese maksimum te bereik. 'n Tweede verlaging in die respirasietempo vind plaas nadat onomkeerbare verouderingsverval inge-

tree het (De Swardt, 1974). Die verwantskap tussen die respiratoriese klimakterium en ander metaboliese prosesse gedurende veroudering is deur verskeie navorsers ondersoek. Blackman en Parija (1928) en Kidd en West (1930) het voorgestel dat die klimakterium as gevolg van 'n verlies aan protoplasmiese kompartementasie tydens veroudering ontstaan. Elektronmikroskopiese ondersoeke het getoon dat daar wel 'n korrelasie tussen strukturele degradasie van selmembrane en veranderinge in metaboliese prosesse soos respirasie, bestaan (Bain & Mercer, 1964; Butler & Simon, 1971; Rhodes & Woollorton, 1967). Volgens Sacher (1962, 1966) ontstaan die respiratoriese klimakterium as gevolg van veranderinge in membraanpermeabiliteit wat tydens verouderingsverval van klimakteriese vrugte plaasvind. Verlies aan membraanpermeabiliteit lei tot protoplasmiese dekompartementasie, met die gevolg dat ensiem- en substraatverspreiding verander word. Die respirasietempo en ander metaboliese prosesse wat met die klimakterium geassosieer word, word hierdeur beïnvloed (Bain & Mercer, 1964; Sacher, 1962, 1966). 'n Afname in respirasietempo nadat die klimakteriese maksimum bereik is, kan moontlik aan die algehele verlies van differensieeldeerlaatbare eienskappe van membrane sowel as toenemende kataboliese prosesse toegeskryf word (De Swardt, 1974; Sacher, 1962). Progressiewe degradasie van sellulêre membrane lei tot die vrystelling van membraangebode ensieme soos polifenoloksidase (Platonova *et al.*, 1974) wat in mitochondrië (Parish, 1972; Walker & Hulme, 1966) en chloroplaste (Arnon, 1949; Mayer, 1966; Parish, 1972; Satô, 1967) aangevond word. Indien polifenoloksidase met vakuolêre fenoliese verbindings in aanraking kom, word polimeriese verbindings gevorm

wat 'n inhiberende invloed op oksidatiewe fosforilasie in die mitochondrion het. Inhibering van oksidatiewe fosforilasie kan tot die afsterwing van die sel lei (Lieberman & Biale, 1956). Brady *et al.* (1970a) het egter bevind dat toenemende membraanpermeabiliteit nie noodwendig tot die ontwikkeling van die klimakterium aanleiding gee nie, aangesien 'n etileengeïnduseerde respiratoriese klimakterium ontwikkel sonder dat enige verandering in membraanpermeabiliteit plaasvind.

Inhibering van die mitochondriële aktiwiteite in die na-klimakteriese fase word deur Baddely en Simon (1969) aan die toenemende akkumulاسie van vrye vetsure toegeskryf. Draper en Simon (1971) het egter bevind dat die akkumulاسie van vrye vetsure in verouderende komkommersaailinge wel die aktiwiteit van die mitochondrion kan inhibeer, maar dat die akkumulاسie te laat gedurende die finale fase van veroudering voorkom om die afname in respirasietempo te verklaar.

Volgens Richmond en Biale (1966) het 'n styging in die inkorporasie van aminosure gedurende die aanvangs van die klimakterium die vorming van spesifieke ensieme tot gevolg, wat die klimakterium sowel as die finale degradasie van die sel kan inisieer. Verskeie navorsers (Frenkel, Klein & Dilley, 1968; McGlasson, Palmer, Vendrell & Brady, 1971) het egter bevind dat sikloheksimied rypwording by pere inhibeer maar geen invloed op die ontwikkeling van die klimakterium het nie. Die klimakteriese styging van respirasie is dus nie van proteïensintese afhanklik nie (Frenkel *et al.*, 1968). Aange-

sien ander metaboliese prosesse gedurende veroudering wel van proteïensintese afhanklik is, is dit moontlik dat die toename in respirasie nie as gevolg van *de nova* ensiensintese plaasvind nie, maar eerder as gevolg van die aktivering of regulering van die aktiwiteite van reeds bestaande ensieme (Sacher, 1973).

Mitochondrions is van die laaste organelle wat degradasie tydens veroudering ondergaan (Bain & Mercer, 1964). Varner (1961) beweer dat verouderingsverval energie benodig wat gedurende oksidatiewe fosforilasie vrygestel word. Volgens Beevers (1974), Hansen (1966), Hulme (1954) en Varner (1961) ontstaan 'n verlaagde ATP/ADP verhouding as gevolg van ATP verbruik tydens toenemende sintese reaksies. Reid en Pratt (1970) het egter getoon dat die energie wat vir kataboliese prosesse gedurende veroudering benodig word, baie klein is. Volgens Varner (1961) het die ontkoppeling van oksidatiewe fosforilasie 'n verhoogde respirasietempo tot gevolg. Linoënsuur beskik oor die vermoë om kalsiumgeaktiveerde fosfaatakkumulاسie in die mitochondrion te verhoed (Baddely & Hanson, 1967). Passam en Bird (1978) het beweer dat die aktiwiteit van die mitochondrion hoër gedurende die postklimakteriese fase is, al het die ATP/suurstof verhouding geen verandering getoon nie. Volgens Hulme, Jones en Wooltorton (1963) en Hulme, Rhodes en Wooltorton (1967) vind geen ontkoppeling van oksidatiewe fosforilasie tydens die klimakterium plaas nie. Hanson, Wilson, Chrispeels, Krueger en Swanson (1965) het bepaal dat ribonuklease fosforilase in die mitochondrion inhibeer aangesien *in vivo* akkumulاسie van ribonuklease gedurende ver-

oudering, suurstofopname sowel as ATP-vorming beïnvloed. Hulle is van mening dat ribonuklease onder andere tot die respiratoriese afname gedurende die na-klimakteriese fase bydra.

Yemm (1950) wys daarop dat die respirasietempo deur beskikbare substrate bepaal word. Snyblomme verouder vinnig indien die respiratoriese substrate uitgeput raak (Rogers, 1973). Die vaasleef tyd van sekere snyblomme kan dus verleng word deur aanvulling van respiratoriese substrate deur middel van die toediening van sukrosebevattende preserveermiddels in die vaasmedium (Nichols & Ho, 1975). Baur en Workman (1964) en De Swardt (1974) beweer dat verhoogde proteïensintese asook die sintese van ander verbindings tydens rypwording en veroudering, energie teen 'n verhoogde tempo vereis. Dit veroorsaak 'n gebrek aan genoegsame energie vir die behoud van differensieel deurlaatbare membrane (De Swardt, 1974) en het ook 'n verhoogde suurstofopname tot gevolg (Biale, 1964).

1.2.5 Proteïene en ensieme

Veroudering van blare word deur 'n progressiewe afname in chlorofil-, proteïen- en nukleïensuurinhoud gekenmerk (Beever, 1976; Phillips, Horton & Fletscher, 1969; Shaw, Bhattacharya & Quick, 1965). 'n Verandering van ensiemaktiwiteite en nukleïensure word ook met rypwording van klimakteriese vrugte geassosieer (De Swardt, Swanepoel & Duvenhage, 1973). 'n Toename in kataboliese ensieme is gedurende die klimakterium in appels (Hulme, 1954; Looney & Patterson, 1967), avokado's (Biale & Young, 1971), tamaties

(Rowan, Pratt & Robertson, 1958), piesangs (Brady, Palmer, O'Connell & Smillie, 1970b), hawerblare (Martin & Thimann, 1972) en koringblare (Sodek & Wright, 1969) gevind. Navorsing met klimakteriese vrugtipies het getoon dat die totale proteïeninhoud gedurende verouderingsverval nie toeneem nie, maar dat die aktiwiteit van verskeie ensieme verander (Hulme, 1972; Sacher, 1973).

Volgens Dilley (1970) en De Swardt *et al.* (1973) word spesifieke ensieme wat by rypwording en veroudering betrokke is, tydens 'n vroeë stadium van die rypwordingsproses gesintetiseer. 'n Toename in proteïensintese en 'n verandering in die patroon van nukleïensuursintese vroeg in die rypwordingsfase, dui daarop dat ten minste sommige van hierdie veranderinge op die vlak van transkripsie of translokasie van die genoombeheer word (De Swardt, 1974). Behalwe vir 'n paar uitsonderings toon hidrolitiese ensieme 'n toename in aktiwiteit gedurende die klimakterium (Sacher, 1973; Sodek & Wright, 1969), wat 'n toename in kataboliese teenoor anaboliese prosesse gedurende veroudering tot gevolg kan hê (Hansen, 1966; Kende, 1971). Daar bestaan nog geen duidelikheid of die toename in ensiemaktiwiteit gedurende verouderingsverval aan die aktivering van reeds bestaande ensieme, verdwyning van inhibeerders, artefakte gedurende ekstraksie as gevolg van die chemiese en fisiese eienskappe van die weefsel, of aan *de novo* sintese toegeskryf kan word nie (Dilley, 1970; Frenkel *et al.*, 1968; Pitt & Galpin, 1971; Tetley & Thimann, 1974; Varner, 1971). 'n Toename in ensiemaktiwiteit gedurende die na-oesleef tyd van snyblomme kan aan aktivering van die ensieme, wat as gevolg van die ontwikkeling van spanningstoestande in die weefsel ontstaan, toegeskryf word (Volk, Harel, Mayer & Ganzvi, 1977;

1978). Beskadiging van die stingels van snyblomme by die snyoppervlak veroorsaak dat tanniene in die vaasmedium uitgelooë word, waarna gepolimeriseerde onoplosbare tanniene na oksidasie in die vaasmedium gevorm word. Dit veroorsaak dat die houtvate van die xileem in die stingels as gevolg van die geoksideerde produkte van die tanniene geblokkeer word (Durkin, 1967; Jansen, 1977). As gevolg van die verstopping van stingels word watertoevoer belemmer (Mulder, 1977), wat kan veroorsaak dat 'n spanningstoestand in die loofblare ontwikkel. Die ontwikkeling van sodanige spanningstoestand kan moontlik een van die oorsake wees vir die toename in polifenoloksidase-, peroksidase- en katalase-aktiwiteit wat gedurende die eerste veertien dae na oes in *Protea neriifolia*-loofblare waargeneem is (Whitehead, 1979). Die waarskynlikheid dat sekere ensieme tydens hierdie periode afgebreek word, terwyl die oksiderende ensieme gelyktydig gesintetiseer word, kan egter nie buite rekening gelaat word nie. Whitehead (ongepubliseerde resultate) het bevind dat die toename in peroksidase-aktiwiteit in *P. neriifolia*-loofblare gedurende die eerste veertien dae na oes met die inkorporasie van radioaktiewe aminosure deur die verskillende peroksidase-isoëme gepaard gaan. Benewens aktivering van die ensiem as gevolg van die ontwikkeling van 'n spanningstoestand in die loofblare, kan toename in aktiwiteit moontlik ook aan 'n toename in die sintese daarvan toegeskryf word.

Die ruimtelike skeiding tussen ensieme en substrate word gedurende homogenisering van weefsels vernietig, sodat geoksideerde fenoliese verbindings met ensieme kan verbind, wat ver-

anderinge in die eienskappe van die ensiem tot gevolg het (Anderson, 1968; Bendall & Gregory, 1963). Die gebruik van polimeriese reduseermiddels en verbindings waaraan fenoliese verbindings adsorbeer is deur verskeie navorsers ondersoek, ten einde die ensieme teen inaktivering deur die oksidasie produkte te beskerm (Anderson, 1968; Bendall & Gregory, 1963; Goldstein & Swain, 1965; Pierpoint, 1966; Loomis, 1974; Loomis & Battaille, 1966).

'n Afname in die proteïeninhoud en RNA-inhoud gedurende veroudering word aan 'n afname in die sintese vermoë of aan 'n toenemende degradasie daarvan toegeskryf (Beevers, 1976). 'n Afname in die proteïeninhoud word met 'n afname in RNA-inhoud gekorreleer (Osborne, 1962). Fletscher en Osborne (1966), Osborne (1962) en Phillips *et al.* (1969) het bevind dat die afname in RNA-, proteïen- en chlorofilinhoud moontlik aan 'n afname in die sintese vermoë daarvan toegeskryf kan word en nie aan die aktiwiteite van spesifieke ensieme wat oor die vermoë beskik om die afbraak daarvan te kataliseer nie. Volgens Dove (1971) en Sodek en Wright (1969) bestaan daar egter 'n korrelasie tussen toenemende RNase sintese en toenemende proteïen degradasie in verouderende plantweefsels. Burger (1976) het bevind dat veranderinge in RNase-aktiwiteit met veranderinge in RNA-inhoud ooreenstem. Die toenemende sintese van proteolitiese ensieme in verouderende blare word onder andere deur kinetien geïnhibeer (Martin & Thimann, 1972). Daar is egter min bekend aangaande die rol wat inhibeerders as reguleerders van proteolitiese ensieme tydens veroudering speel (Thomas & Stoddart, 1980).

1.2.5.1 Lipase

Gedurende verouderingsverval vind 'n verandering in die lipoproteïenstruktuur van membrane plaas (De Swardt & Rousseau, 1973). 'n Beperkte watertoevoer as gevolg van stingelverstopping by snyblomme kan moontlik veroorsaak dat die tempo van waterverlies die tempo van wateropname oorskry (Durkin, 1967; Jansen, 1977). Aangesien die behoud van turgor noodsaaklik is vir die instandhouding van normale metaboliese aktiwiteite in die geplukte blom, kan 'n spanningstoestand as gevolg van 'n watertekort in die selle ontwikkel. 'n Spanningstoestand wat as gevolg van 'n watertekort ontstaan, kan moontlik veroorsaak dat membraanpermeabiliteit toeneem (Whitehead, 1979). Baddely en Simon (1969) en Draper en Simon (1971) skryf veranderinge in membraanintegriteit aan die hidrolise van membraanlipiede toe. Draper (1969) en Siegenthaler (1972) wys daarop dat die toename in endogene onversadigde vetsure moontlik as gevolg van die hidrolise van chloroplasmembraanlipiede plaasvind.

Die ensimatiëse degradasie van lipiede behels hidrolitiese en oksidatiewe prosesse (Galliard, 1975). Hitchcock en Nichols (1971) wys daarop dat die meganisme wat by die afname van sellulêre lipiede gedurende veroudering betrokke is, nog onbekend is. Dit is wel moontlik dat die eerste fase die degradasie van endogene lipiede deur lipases behels, met die gevolglike vrystelling van vrye vetsure en wateroplosbare komponente soos gliserol, gliserofosfate, glikosielgliserole

en vrye amiene (Galliard, 1975; Hitchcock & Nichols, 1971).

Die verskillende lipolitiese ensieme word onderverdeel in lipase (gliserolesterhidrolase), fosfolipase en glikolipiedhidrolase. Laasgenoemde kan weer in galaktosielgliseriedasielhidrolase en sulfokinovosiieldiglisieriedasielhidrolase onderverdeel word (Hitchcock & Nichols, 1971). Lipase (gliserolesterhidrolase, EC.3.1.1.3) kan beskryf word as 'n ensiem wat in staat is om geëmulsiëerde triasielgliseride tot vetsure en gliserol te hidroliseer (Börgström & Ory, 1970; Desnuelle & Savary, 1963). Aangesien triglisieriede die ver naamste lipiedkomponente in rustende opbergingsorgane is (Benson & Jokela, 1976; Desnuelle, 1972), is lipase-aktiwiteit hoofsaaklik in verskeie opbergingsorgane soos koring sade (Singer & Hofstee, 1948; Tavener & Laidman, 1972a; 1972b), grassade (Williams & Bowden, 1973) en kasteroliesade (Börgstrom & Ory, 1970) ondersoek.

Volgens Sodek en Wright (1969) vind 'n skerp afname in lipase-aktiwiteit in verouderende koringblare plaas. Dit blyk dat die afname in lipase-aktiwiteit deur eksterne kintentoediening voorkom kan word. Sodek en Wright (1969) beweer dat die behoud van membraanintegriteit deur kinetien nie deur die onderdrukking van lipase-aktiwiteit bemiddel word nie. Dit is moontlik dat die lipase-aktiwiteit deur lokalisering in die lisosome laag bly, totdat dié ensiem na die finale degradasie van membrane vrygestel en/of geaktiveer word (Burger, 1976). In teenstelling hiermee het Rhodes en Wooltorton (1967) egter bevind dat die lipase-aktiwiteit gedurende verouderingsverval van appelvrugte toeneem.

Volgens Matile (1975) kom hidrolitiese ensieme onder andere in lisosome voor. Lisosome is sitoplasmiese organelle wat hidrolitiese ensieme bevat en deur 'n enkele lipoproteïen= membraan omring word (Hall & Flowers & Roberts, 1974; Matile, 1975). Hidrolitiese ensieme is egter nie partikel= gebonde nie maar mag ook in die vakuool voorkom (Berjak & Villiers, 1970; Boller & Kende, 1979; Nishimura & Beevers, 1978). Dit is dus beter om lisosome in terme van 'n lisosomale sisteem of kompartement te definieer (Berjak, 1972). Volgens Matile (1975) vorm aleuronliggaampies, sferosome en plantvakuole deel van lisosomale kompartemente. In bergingsweefsel akkumuleer trigliseriede in sferosome (Matile, 1975). Matile (1975) en Spichiger (1969) wys daarop dat lipase met sferosome geassosieer word en vir die vrystelling van vetsure verantwoordelik is. Glioksisome toon 'n noue assosiasie met sferosome aangesien die monogliseriede en vrye vetsure wat as gevolg van lipase-aktiwiteit vrygestel word, verder in die glioksisome gehidroliseer en geoksideer word (Hall, *et al.*, 1974; Matile, 1975).

1.2.5.2 Chlorofillase

Die ensiem chlorofillase (chlorofil-chlorofillidohidrolase, E.C.3.1.1.14) is in die fotosintetiese membrane van hoër plante en alge teenwoordig (Looney & Patterson, 1967; McFeeters, Clinton, Chichester & Whitaker, 1971; Moll & de Witt, 1979; Terpstra, 1976; Terpstra & Goedheer, 1975). Chlorofillase is onlangs eers in 'n suiwer vorm geëkstraheer (Holden, 1961;

Klein & Vishniac, 1961; Shimizu & Tamaki, 1963). Dit is nie duidelik of die ensiem *in vivo* veresterings- en/of hidrolitiese reaksies kataliseer nie (Bacon & Holden, 1970). Böger (1965) beweer dat chlorofillase beide reaksies kan kataliseer. Chlorofillase is nie net spesifiek ten opsigte van chlorofil a en b nie, maar kan 'n verskeidenheid verwante fitolesters as substrate gebruik (Stobart & Thomas, 1968). Die ensiem reageer slegs met porfiriene waarin 'n karboksiemetielgroep op die tiende koolstofatoom en waterstofatome op die sewende en agste koolstofatome voorkom (Bacon & Holden, 1970; Stobart & Thomas, 1968). Dit sal dus chlorofil a en b, feofitiene, bakteriochlorofil en *Chlorobium*-chlorofil, maar nie protochlorofil nie, as substrate gebruik (Granick, 1967).

Chlorofillase word as membraangebode, wateroplosbare lipoproteïenkompleks in chloroplasmembrane aangetref (Ardao & Vennesland, 1960). Terpstra (1976; 1978) het bevind dat chlorofillase 'n integrale membraangebode proteïen is wat hoofsaaklik in stromamembrane en tot 'n mindere mate in granamembrane teenwoordig is. Die ensiem word hoofsaaklik op die sitoplasma ribosome gesintetiseer. 'n Proteïenfaktor wat op die ribosome van die chloroplas gesintetiseer word, dra egter tot die lokalisering van chlorofillase in die chloroplasmembrane by (Gonoza & McFeeters, 1976). Chlorofil in die lamellae word *in vivo* teen chlorofillase beskerm, aangesien chlorofillase slegs aktief is nadat sellulêre disintegrasië plaasgevind het (Terpstra, 1978; Terpstra & Goedheer, 1975).

Butler (1961) beweer dat chlorofillase 'n belangrike rol in die sintese van die chloroplasmembrane mag speel. Dit is dus belangrik om die lokaliteit van die ensiem gedurende die ontogenie van die chloroplas te bepaal. Volgens Klein en Vishniac (1961) is die gebonde vorm van chlorofillase in geëtiroleerde plastiede, moontlik 'n aanduiding dat dit met rùdimentêre lamellae en grana van chloroplaste geassosieer is. Volgens Stobart en Thomas (1968) word chlorofillase met die vorming van chloroplaslamellae geassosieer. Chlorofilase kan moontlik ook by die sintese van chlorofil betrokke wees, aangesien chlorofillase-aktiwiteit en chlorofilkonsentrasie gelyktydig 'n toename toon (Holden, 1967; Shimizu & Tamaki, 1963), en chlorofillase akkumuleer voordat chlorofil sintese in geëtiroleerde weefsels plaasvind (Moll, de Witt & Lutter, 1978), terwyl daar 'n afname in chlorofillase-aktiwiteit tydens degradasie van chloroplaste plaasvind (Chiba, Aiga, Idemori, Satoh, Matsushita & Sasa, 1967).

Holden (1961) en Rhodes en Woollorton (1967) beweer dat die verwydering van die fitolketting deur chlorofillase moontlik die eerste fase van ensimatiese degradasie van chlorofil *in vivo* is, aangesien chlorofillase in die meeste plante *in vitro* die verwydering en samevoeging van fitol en chlorofillide kataliseer. Sacher (1973) wys daarop dat die rypwording van vrugte met 'n afname in chlorofil en 'n toename in chlorofillase-aktiwiteit gepaard gaan. Rhodes en Woollorton (1967) het bevind dat die chlorofillase-aktiwiteit gedurende die klimakterium drievoudig toeneem terwyl die chlorofilinhoud afneem. Dit is algemeen bekend dat kinetien die degradasie

van chlorofil vertraag (Richmond & Lang, 1957). Volgens Sabater en Rodriguez (1978) het 'n kinetiese behandeling van afgesnyde gars- en hawerblare 'n verlaagde chlorofillase-aktiwiteit tot gevolg. Hulle kom tot die gevolgtrekking dat proteïensintese in beide die chloroplaste en sitoplasma benodig word om 'n hoë chlorofillase-konsentrasie te handhaaf.

1.2.5.3 Malaatdehidrogenase

Simon en Chapman (1961) en Varner (1961) beweer dat daar 'n noue verband tussen strukturele degradasie en funksionele doeltreffendheid van die mitochondrion bestaan, aangesien desorganisasie van die mitochondrion met respiratoriese veranderinge gepaard gaan. Baqui, Mattoo en Modi (1974) het egter 'n toename in die mitochondriële-aktiwiteit tydens veroudering gevind. Hulle skryf dit aan die oksidasie van die tussenprodukte van die Krebs siklus toe. Sacher (1973) beweer dat die aktivering of regulering van ensiemaktiwiteite 'n toename in respirasie tydens verouderingsverval tot gevolg het. Volgens Laties (1962; 1964) word respirasie deur 'n toename in die aktiwiteit van die Krebs siklus gestimuleer.

Tydens veroudering van klimakteriese vrugte word die aanvangs van die respiratoriese klimakterium met 'n verhoogde malaatensiemaktiwiteit en piruvaatkarboksilase-aktiwiteit geassosieer. Dit blyk dat 'n verhoogde malaatensiemaktiwiteit invloed het op malaatdehidrogenase-aktiwiteit, aangesien beide dieselfde substraat vereis. Die aktiwiteit van die malaatensiem neem toe gedurende rypwording van appel- en peervrugte, terwyl 'n gelyktydige afname in malaatdehidrogenase-aktiwiteit plaas-

vind (Frenkel *et al.*, 1968; Hartmann, 1962; Hulme, Rhodes, Galliard & Woollorton, 1968; Rubin & Gudalina, 1953).

Sacher (1973) wys daarop dat daar groot variasies in die resultate ten opsigte van veranderinge in die ensiemaktiwiteite tydens veroudering bestaan. Beide kwantitatiewe en kwalitatiewe verskille in malaatdehidrogenase-aktiwiteit is in verouderende appelweefsel gevind (Clements, 1970). Downton en Slatyer (1971) het bevind dat malaatdehidrogenase-aktiwiteit in blare van *Atriplex*-spesies verskil. In verouderende blare van *A. spongiosa* het 'n vinnige toename in ensiemaktiwiteit plaasgevind, terwyl die ensiemaktiwiteit in verouderende blare van *A. hasta* weer 'n skerp daling getoon het. Volgens Rubin en Gudalina (1953) en Rubin en Sal'kova (1955) neem die malaatdehidrogenase-aktiwiteit in appelvrugte gedurende veroudering af. De Swardt en Duvenage (1971) wys daarop dat malaatdehidrogenase in die perikarp van tamaties tydens die vroeë klimakteriese prosesse 'n vinnige afname in aktiwiteit toon, gevolg deur 'n geleidelike verlaging. In teenstelling hiermee het ander navorsers 'n toename in malaatdehidrogenase-aktiwiteit in appelvrugte en sultanadruiwe gevind (Hawker, 1969; Hulme, Jones & Woollorton, 1965).

Alhoewel dit bekend is dat daar verskeie isosieme van malaatdehidrogenase (L-malaat:NAD oksidoreduktase, E.C. 1.1.1.37) bestaan, is daar baie teenstrydige resultate ten opsigte van die lokalisering van isosieme wat nie met die mitochondrion geassosieer word nie (Yamazaki & Tolbert, 1969). Eksperimentele bevindings dui daarop dat isosieme van malaatdehidrogenase

ase in die sitoplasma (De Jong & Olsen, 1972; Yang & Scandalios, 1974) asook in subcellulêre organelle soos mitochondrions (Asahi & Nishimura, 1973; Benveniste & Munkres, 1970) en peroksisome (Yamazaki & Tolbert, 1969) aangetref word. Dit word algemeen aanvaar dat die oplosbare of sitoplasmiese isosieme vir die vervoer van NADH oor die mitochondriële membrane verantwoordelik is (Banaszak & Bradshaw, 1975; Lehninger, 1978). Die isosiem(e) wat in die mitochondria voorkom kataliseer die finale stap in die Krebs-siklus, naamlik die oksidasie malaat na oksaloasetaat (Banaszak & Bradshaw, 1975). Hierdie reaksie vind deur middel van die koënsiem NAD^+ plaas (Meyer, Anderson, Bohning & Frattianne, 1973; Scandalios, 1974). Die isosiem(e) wat in glioksisome voorkom neem aan die glioksilaatsiklus deel (Tolbert, 1971). Laasgenoemde siklus kom veral in ontkiemende sade voor, wanneer vette vinnig na koolhidrate omgeskakel word (Devlin, 1975). In die peroksisome speel malaatdehidrogenase isosieme moontlik tydens fotorespirasie 'n rol (Banaszak & Bradshaw, 1975; Yamazaki & Tolbert, 1969). Benveniste en Munkres (1970) en Walk en Hock (1977) het deur middel van inhibeerders van proteïensintese bevind dat die sintese van beide sitoplasmiese en mitochondriële isosieme op die sitoplasmiese ribosome, en nie op die mitochondriële ribosome nie, plaasvind.

2. EKSPERIMENTEEL EN RESULTATE

2.1 Materiaal en metodes

2.1.1 Bron van plantmateriaal

Bloeiwyses van *Protea neriifolia* R. Br. is vanaf 'n protea-
kweker te Hekpoort, Krugersdorpdistrik, verkry. Bloeiwyses
met homogene kleure is tydens die sogenaamde sagtepuntsta-
dium gepluk. Slegs reguit bloeistele sonder sylote is ge-
selekteer, terwyl daar ook op die uniforme groottes van loof-
blare en die afwesigheid van siektes, letsels en wonde ge-
let is. Die bloeiwyses is binne drie ure nadat dit in die
vroeë oggend gepluk is, in kraanwater geplaas. Die totale
lengte van die bloeiwyse en bloeistele was in alle gevalle
50 cm. Ongeveer twintig gesonde volwasse blare is op die
jongste streek van die bloeisteel gelaat, terwyl die oortol-
lige ouer blare aan die onderpunt van die bloeisteel met 'n
skerp skêr teenaan die stingel afgesny is, sodat die minimum
wonde veroorsaak is. Die bloeiwyses is vir die duur van die
eksperimente in 'n vertrek met normale dag- en naglengtes by
ongeveer 20°C geplaas.

2.1.2 Bepaling van die respirasietempo

Nadat 0,5 gram loofblaarweefsel akkuraat afgeweeg is, is
die respirasietempo met behulp van 'n Gilsonrespirasiemeter
bepaal.

Nadat 'n blaar in die hoofkompartement van die Gilsonflessie geplaas is, is 'n gevoude filtreerpapiertjie en 0,2 ml 20% KOH in die sentrale kolom van die respirasieflessie geplaas. Vervolgens is die flessie vir 10 minute by 25°C geëkwilibreer, waarna die respirasietempo vir 'n tydperk van 70 minute by 25°C bepaal is. Resultate is uitgedruk as die volume (μ l) koolsuurgas afgegee per een gram loofblaarweefsels per uur.

2.1.3 Bepaling van die persentasie skynbare vrye ruimte (%SVR) in die loofblare van *Protea neriifolia*

Die bepaling van die persentasie skynbare vrye ruimte is volgens die metode van De Swardt en Rousseau (1973) uitgevoer. Weefselskyfies is met behulp van 'n 5 mm kurkboor uit ooreenstemmende posisies langs die hoofare van loofblare gepons. Die massa van 'n weefselskyfie is bepaal en die volume daarvan bereken deur die digtheid as een te neem.

2.1.3.1 Bepaling van die inkubasieperiode

Vyf ooreenstemmende loofblaarmonsters, elk bestaande uit drie weefselskyfies, is geselekteer en vir 40, 60, 80, 100 en 120 minute by 0°C - 2°C geïnkubeer. As kontrole is 'n monster geneem wat geen weefselskyfies bevat het nie. Nadat die %SVR vir elke monster bereken is, is op die duur van die inkubasieperiode besluit.

2.1.3.2 Inkubasie van weefselskyfies

Een weefselskyfie is uit elk van vyf soortgelyke loofblare gepons. Die vyf weefselskyfies is gesamentlik in 2 ml 0,01 M Fosfaatbuffer (0,05 M met betrekking tot sukrose, pH 6,5) waarby 1μ Ci ($U^{14}C$)-sukrose gevoeg is, geïnkubeer. Die weefselskyfies is met behulp van 'n glasstafie en rubberproppie in die proefbuis onder die oppervlak van die inkubasiemedium gedompel, terwyl voorsorg getref is om kneusing van die blaarskyfies te vermy. Die inkubasie van die weefselskyfies is in 'n skudwaterbad by $0^{\circ}C - 2^{\circ}C$ uitgevoer, waarna die skyfies twee keer met 5 ml gedeïoniseerde water afgespoel is. Die waswater en inkubasiemedium is gekombineer en met gedeïoniseerde water na 50 ml opgemaak. Vervolgens is die weefselskyfies twee keer vir 6 uur periodes in 10 ml hoeveelhede 70% etanol geëkstraheer, waarna die twee ekstrakte saamgevoeg is en die volume na 50 ml opgemaak is. As kontrole is 'n monster wat geen ($U^{14}C$)-sukrose bevat het nie, gebruik.

2.1.3.3 Radiometriese analise en berekening van persentasie skynbare vrye ruimte (%SVR)

Een milliliter van die verdunde inkubasiemedium en etanol-ekstrak is afsonderlik saam met 10 ml "Instagel" in 'n sintillasieflessie gevoeg, waarna dit deeglik geskud is. Die teltempo's van die twee oplossings is met behulp van 'n Packard Tri-Carb vloeistofsintillasieteller oor 'n tydperk van 10 minute bepaal. Nadat daar deur middel van die kontrole vir agtergrond gekorrigeer is, is die %SVR as volg

bereken:

$$\%SVR = \frac{I_2}{I_1} \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{100}{1}$$

I_1 = teltempo van die inkubasiemedium na inkubasie

I_2 = teltempo van etanolekstrak vanuit weefselskyfies

V_1 = volume van die inkubasiemedium (2 ml)

V_2 = volume van die weefselskyfies (cm^3).

2.1.4 Bepaling van die chlorofilinhoud van *Protea neriifolia*-loofblare

Twee gram loofblare is vir 3 minute met 60 ml 80% asetoon teen volspoed in 'n Virtis "23" homogeniseerder gehomogeniseer. Die bovloeistof is daarna deur 'n Büchnertregter gefiltreer. Die residu is weer met 50 ml 80% asetoon vir 2 minute gehomogeniseer, waarna dit gefiltreer is. Die residu is vervolgens met 40 ml 80% asetoon gewas om te verseker dat alle chlorofil geëkstraheer is, waarna die filtraat met 80% asetoon na 200 ml opgemaak is.

Die optiese digtheid van die chlorofilekstrak is met behulp van 'n Spectronic 20 kolorimeter by 654-, 652- en 663 nm bepaal. Tagtig persent asetoon is as blanko gebruik. Die totale chlorofil-, chlorofila- en chlorofil b-inhoud is daarna volgens die metode van Arnon (1949) as volg bereken:

$$\text{mg totale chlorofil/g weefsel} \left\{ 20,2(D_{654}) - 8,02(D_{663}) \right\} \\ \times \frac{V}{1\ 000 \times M}$$

$$\text{mg chlorofil a/g weefsel } \{12,7(D663) - 2,69(D645)\} \\ \times \frac{V}{1\ 000 \times M}$$

$$\text{mg chlorofil b/g weefsel } \{22,9(D645) - 4,68(D663)\} \\ \times \frac{V}{1\ 000 \times M}$$

D = optiese digtheid

V = finale volume van chlorofilekstrak

M = massa van blare in gram.

2.1.5 Bepaling van die ultrastrukturele veranderinge in die selle van *Protea neriifolia*-loofblare

Een loofblaar is elke derde dag vanaf dieselfde bloeisteel geselekteer en vir fiksering voorberei. Klein stukkie (1 mm x 3 mm) loofblaarweefsel is direk na disseksie vir 12 uur in 6% glutaaraldehyd in 0,05 M fosfaatbuffer, pH 7,2, gefikseer. Die materiaal is daarna drie keer vir 10 minute in 10 ml 0,05 M fosfaatbuffer, pH 7,2, gewas. Na-fiksering is daarna uitgevoer deur die loofblaarweefsel vir 2 uur in 2% osmiumtetroksied in buffer te plaas. Vervolgens is die weefsel twee keer vir 5 minute in 0,05 M fosfaatbuffer, pH 7,2 gewas, waarna dehidrering deur middel van 'n asetonreeks uitgevoer is. Die blaarweefsel is daarna in 'n lae viskositeit epoksie/hars mengsel ingebed (Spurr, 1969) en vir 24 uur by 50°C gelaat om polimerisasie van die hars te bewerkstellig.

Met behulp van 'n Reichert Ultramikrotoom Um 2 is ultramikrotoomsneë gemaak, waarna die seksies met uranielasetaat en loodsitraat (Echlin, 1964) gekleur is. Die ultramikrotoom

sneë is daarna met behulp van 'n Elmiskop 101 transmissie elektronmikroskoop ondersoek.

2.1.6 Ekstraksie van die flavonoïede vanuit die loofblare van *Protea neriifolia*

Vyf gram loofblare is met 30 ml 80% metanol wat 100 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ bevat het (Vautaz, Brandenberger & Egli, 1959) in 'n Virtis "23" homogeniseerder vir 5 minute teen volspoed gehomogeniseer. Die homogenaat is daarna vir 30 minute teen 30 000 x g by 4°C in 'n MSE High Speed 18 sentrifuge gesentrifugeer.

Loodpresipitasie is volgens die metode van Whitehead (1979) uitgevoer. Die pH van die bovloeistof is met 0,1 N KOH tot by 7,0 gebring. Een volume 1,0 M loodasetaat is by die oplossing gevoeg terwyl dit op 'n magnetiese roerder aanhoudend geroer is. Die mengsel is vervolgens vir 30 minute teen 30 000 x g by 4°C gesentrifugeer, waarna die presipitaat in 10 ml gedeïoniseerde water, wat 25 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ bevat het, gesuspendeer. Die suspensie is geleidelik by 30 gram voorafgewaste Dowex 50 W - X8(H) hars gevoeg en vir 30 minute geroer. Daarna is die mengsel deur 'n sinterglas-tregter gefiltreer, waarna die hars met 10 ml gedeïoniseerde water gewas is. Die flavonoïedekstrak is in vloeibare stikstof bewaar totdat dit vir chromatografie aangewend is.

2.1.6.1 Papierchromatografiese skeiding van die komponente van 'n flavonoïedekstrak uit loofblare van *Protea neriifolia*

Nadat die flavonoïede geëkstraheer is soos onder 2.1.6 uiteengesit, is 2 ml metanol by 2 ml van die ekstrak gevoeg en by 35°C onder vakuum tot 1,0 ml ingedamp. Een milliliter van die ekstrak is in 'n strook op Whatman No. 3 MM chromatografiepapier (58 cm x 68 cm) aangewend en toegelaat om afwaarts in BAW (butanol:asynsuur:water, 4:1:5, v/v, boonste fase) in 'n chromatografiekabinet by kamertemperatuur te ontwikkel. Die chromatogram is na 12 uur in 'n Shandon chromatografie-oond gedroog, waarna dit onder ultravioletlig in die afwesigheid en daarna in die teenwoordigheid van ammoniakdampe ondersoek is. Vervolgens is die verskillende bande afgebaken sodat die R_f -waardes bereken kon word.

2.1.6.2 Bepaling van die teenwoordigheid van leuko-antosianiene in die afsonderlike flavonoïedbevattende bande

Nadat die chromatografiese skeiding van die komponente van die flavonoïedekstrak voltooi is (2.1.6.1), is die afsonderlike bande geëlueer deur dit stukkend te sny en vir 10 minute in 20 ml 50% metanol te skud. Vervolgens is die eluaat deur glaswol gefiltreer, waarna die onderskeie houers met aluminiumfoelie bedek is.

Die teenwoordigheid van leuko-antosianiene in die afsonderlike flavonoïedbevattende bande is kwantitatief volgens die metode van Swain en Hillis (1959) bepaal. Drie milliliter van elke

afsonderlike 50% metanolelmaat is onder vakuüm drooggedamp. Nadat die residu in 1 ml leuko-antosianienreagens (25 ml gekonsentreerde HCl verdun tot 500 ml met n-butanol) opgelos is, is dit in afsonderlike proefbuis, voorsien met proppe, gevoeg. Vervolgens is 10 ml leuko-antosianienreagens by elke proefbuis gevoeg, waarna die proefbuis in aluminiumfoelie toegedraai is en vir 40 minute in 'n kokende waterbad (96°C) geplaas is. As kontrole is 'n monster wat geen metanolelmaat bevat het nie, gebruik.

2.1.7 Ekstraksie van die totale oplosbare proteïene vanuit die loofblare van *Protea neriifolia*

Die proteïene is volgens die metode van Whitehead (1979) geëkstraheer. Tien gram loofblare, waarvan die hoofare verwyder is, is vir 2 minute teen maksimum snelheid in 'n Virtis "23" homogenseerder met 30 ml 0,1 M Tris-HCl buffer, pH 8,5 (7,0% met betrekking tot poli-etileenglikol 4 000 en 0,1% met betrekking tot sisteïen-HCl) gehomogeniseer. Vervolgens is die ekstrak vir 15 minute teen 15 000 x g en daarna vir 30 minute teen 30 000 x g in 'n voorafverkoelde MSE High Speed 18 by 4°C gesentrifugeer. Die bovloeistof is daarna vir 2,5 uur teen 170 000 x g by 4°C in 'n MSE Prepsin 50 sentrifuge gesentrifugeer. Nadat twee volumes koue aseton (-20°C) by die proteïenbevattende bovloeistof gevoeg is, is die mengsel vir 10 minute geroer. Hierna is die mengsel vir 30 minute teen 30 000 x g by 4°C gesentrifugeer, waarna die presipitaat in 10 ml koue 5 mM Tris-glisien buffer, pH 8,3 opgelos is. Die proteïene is weereens met twee volumes koue aseton gepresipiteer waarna die mengsel vir 30 minu-

te teen 30 000 x g gesentrifugeer is. Die presipitaat is daarna in 10 ml 5 mM Tris-glisien buffer, pH 8,3, hersuspendeer en in vloeibare stikstof bewaar.

2.1.7.1 Kwantitatiewe bepaling van die totale oplosbare proteïene

Die proteïeninhoud is volgens die Folin-Ciocalteu metode (Lowry, Rosebrough, Farr, Randall, 1951) bepaal. Vyf milliliter van Reagens D is by 0,5 ml van die proteïenekstrak gevoeg, waarna dit deeglik geskud en vir 10 minute gelaat is. Tien minute nadat 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagens by die mengsel gevoeg en weer geskud is, is die optiese digtheid van die reaksiemengsel by 'n golflengte van 660 nm met 'n Spectronic 20 kolorimeter bepaal. Die proteïenkonsentrasie van die monster is met behulp van 'n albumienstandaardkromme bereken en uitgedruk as mg proteïen per gram vars loofblaarweefsel.

2.1.7.2 Kwantitatiewe bepaling van die lipase-aktiwiteit

Die lipase-aktiwiteit is bepaal volgens die metode soos deur Burger (1976) beskryf. Twee milliliter 0,75M gliserientriasetaat en 2,0 ml 0,075 M natriumbikarbonaat is in die hoofkompartement van 'n Gilsonflessie gevoeg. In die sy-arm van die flessie is 1,0 ml verdunde ensiemekstrak (50 µl ensiemekstrak + 950 µl gedeïoniseerde water) gevoeg, waarna die flessie vir 10 minute by 37°C geëkwilibreer is

terwyl dit stadig teen ongeveer 120 ossilasies per minuut geskud is. Nadat die ensiemoplossing in die hoofkompartement gedekanteer is, is dit weereens vir 10 minute geëkwilibreer. Hierna is die kleppe van die Gilsonrespirasie-meter gesluit en die produksie van koolsuurgas oor 'n tydperk van 35 minute waargeneem. Die spesifieke aktiwiteit van lipase is as volg bereken:

$$\text{Ensiemeenhede (EE)/mg proteïen} = \frac{\mu\text{l CO}_2 \text{ per minuut}}{\text{mg ensiem gebruik}}$$

2.1.7.3 Kwantitatiewe bepaling van chlorofillase-aktiwiteit

2.1.7.3.1 Chromatografiese skeiding van chlorofilpigmente

'n Suikerkolom is as volg voorberei: Ongeveer 8 gram gepoeierde sukrose is met ongeveer 25 ml petroleumeter gemeng. Vervolgens is 'n proppe nie-absorberende watte onder in 'n glaskolom geplaas, waarna 'n hoeveelheid petroleumeter bygevoeg is. Die kolom is daarna gepak deur klein hoeveelhede van die suikersuspensie daarin oor te gooi en telkens die suiker onder druk stewig vas te pak. Hierna is 'n klein hoeveelheid Na_2SO_4 op die sukrose oppervlak geplaas.

Die chlorofilekstrak is volgens die metode van Machlis en Torrey (1956) berei. Twee gram loofblare is met 60 ml 80% asetoon in 'n Virtis "23" homogeniseerder teen volspoed vir 3 minute gehomogeniseer. Die ekstrak is vervolgens vir 10 minute teen 30 000 x g by 4°C in 'n MSE High Speed 18 sen-

trifuge gesentrifugeer. Nadat die bo-vloeistof in 'n skei-
 tregter gedekanteer is, is een volume petroleumeter asook een
 volume gedeïoniseerde water by die asetoonekstrak gevoeg.
 Nadat die waterfase afgetap is, is die petroleumeterfase
 verskeie male met gedeïoniseerde water gewas so dat alle ase-
 toon teenwoordig, verwyder is. 'n Hoeveelheid Na_2SO_4 is daar=
 na by die ekstrak gevoeg, waarna die ekstrak by 35°C onder
 vakuum tot 2 ml ingedamp is. Vervolgens is 1,5 - 2,0 ml van
 die ekstrak versigtig bo-op die sukrose-kolom gepipetteer.
 Net voor die pigmentekstrak byna heeltemal ingetrek het, is
 die res van die kolom met skoon petroleumeter gevul sonder
 om die kolomoppervlak te versteur. Voorsorg is getref dat
 die kolom nooit droog loop nie. Nadat die chlorofilbande so=
 ver moontlik geskei is, is die kolom toegelaat om droog te
 loop, waarna dit op 'n skoon droë teel uitgestoot is. Die
 chlorofil a-band is verwyder en in 30 ml 100% aseton ge=
 suspendeer. Hierna is die suspensie vir 5 minute teen 15 000
 x g gesentrifugeer om 'n helder oplossing te verkry.

2.1.7.3.2 Bepaling van die inkubasieperiode en chlorofillase- aktiwiteit

Die chlorofillase-aktiwiteit is volgens 'n gemodifiseerde
 metode van Weast en Mackinney (1940) bepaal. Nadat die chlo=
 rofil a-ekstrak berei is soos onder 2.1.7.3.1 uiteengesit, is
 dit tot 80% aseton opgemaak deur gedeïoniseerde water by te
 voeg. Nadat 4 ml van die chlorofilekstrak in twee afsonder=
 like proefbuis geplaas is, is 50 μl ensiemekstrak by slegs
 een proefbuis gevoeg. Die proefbuis is in die donker vir

60 minute geplaas. Dieselfde prosedure is herhaal vir 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 en 55 minute. Vervolgens is die optiese digtheid van die chlorofilekstrak, in die afwesigheid en teenwoordigheid van die ensiemekstrak, met behulp van 'n Spectronic 20 kolorimeter by 645 en 652 nm bepaal. Die hoeveelheid chlorofil a teenwoordig is verder soos onder 2.1.4 uiteengesit bepaal, waarna die spesifieke aktiwiteit van chlorofillase as volg bereken is:

$$\text{Eenhede/mg proteïen} = \frac{\Delta \text{ chlorofil a (mg)}}{\text{mg proteïen/ml reaksiemengsel}}$$

Nadat die chlorofillase-aktiwiteit vir elke monster bereken is, is op 'n geskikte duur vir die inkubasieperiode besluit.

2.1.7.4 Kwantitatiewe bepaling van die malaatdehidrogenase-aktiwiteit

Vir die bepaling van die malaatdehidrogenase-aktiwiteit is die metode van Mehler, Kornberg, Grisolia en Ochoa (1948) gebruik. Die verlaging in optiese digtheid by 340 nm, as gevolg van die oksidasie van NADH₂, is op die Spectronic 20 kolorimeter bepaal.

Die reaksiemengsel het uit die volgende bestaan:

Fosfaatbuffer (0,1 M, pH 7,4)	5,35 ml
NADH ₂ (0,00375 M, pH 7,4)	0,4 ml
Ensiemekstrak	0,05 ml
Oksaloasetaat (0,03 M, pH 7,4)	0,2 ml

As kontrole is 'n monster sonder enige oksaloasetaat gebruik.

Die spesifieke aktiwiteit van malaatdehidrogenase is as volg bereken:

$$\text{Eenhede/mg proteïen} = \frac{\Delta A/\text{min}}{6,2 \times \text{mg proteïen/ml reaksiemengsel}}$$

2.1.8 Bepaling van die invloed van die flavonoïedekstrak op die ensiemekstrak

Nadat die ekstraksie van die flavonoïede voltooi is (2.1.6), is toetsoplossings vir die bepaling van lipase-, chlorofilase- en malaatdehidrogenase-aktiwiteite (2.1.7.2, 2.1.7.3 en 2.1.7.4) berei. Tweehonderd mikroliter flavonoïedekstrak is by die afsonderlike toetsoplossings gevoeg, waarna die reaksie begin is deur 50 μl ensiemekstrak (2.1.7) by 'n toetsoplossing te voeg.

2.1.9 Bepaling van die invloed van die afsonderlike flavonoïedekomponente op die ensiemekstrak

Nadat die chromatografiese skeiding van die flavonoïedekstrak voltooi is (2.1.6.1) en die afsonderlike bande in 50% metanol geëlueer is (2.1.6.2), is 3 ml van elke afsonderlike eluaat by 35°C onder vakuum drooggedamp en die residu in 2 ml etanol opgelos. Toetsoplossings vir die bepaling van lipase-, chlorofilase- en malaatdehidrogenase-aktiwiteite (2.1.7.2,

2.1.7.3 en 2.1.7.4) is vervolgens berei. Tweehonderd mikro-liter van elke etanoloplossing is by die afsonderlike toetsoplossings gevoeg, waarna die reaksie begin is deur 50 μ l ensiemekstrak (2.1.7) by 'n toetsoplossing te voeg. Toetsoplossings sonder enige flavonoïedkomponente het as kontroles gedien.

2.2 Resultate

2.2.1 Verandering in die respirasietempo in loofblare van *Protea neriifolia* (Vergelyk 2.1.2)

Gedurende die eerste 10 dae na oes toon die loofblare van *Protea neriifolia* 'n tipiese klimakteriese respirasiepatroon soos wat algemeen by verouderende klimakteriese (klas A) vrugte aangetref word. Soos blyk uit Tabel 1 en Figuur 2 word die respirasiepatroon van die loofblare gekenmerk deur 'n geleidelike afname in die respirasietempo tot op die vierde dag na pluk wanneer die preklimakteriese minimum bereik word. Hierna neem die respirasietempo geleidelik tot op die sesde dag na pluk toe, waarna die respirasietempo vinnige toeneem om die klimakteriese maksimum op die negende dag na pluk te bereik. Tydens die na-klimakteriese fase is daar weereens 'n geleidelike afname in die respirasietempo.

2.2.2 Duur van die inkubasieperiode tydens die bepaling van die persentasie skynbare vrye ruimte (%SVR) in die loofblare van *Protea neriifolia* (Vergelyk 2.1.3.1)

Soos blyk uit Tabel 2 en Figuur 1 is 'n inkubasieperiode van 80 minute voldoende vir die doel van hierdie eksperiment, aan=

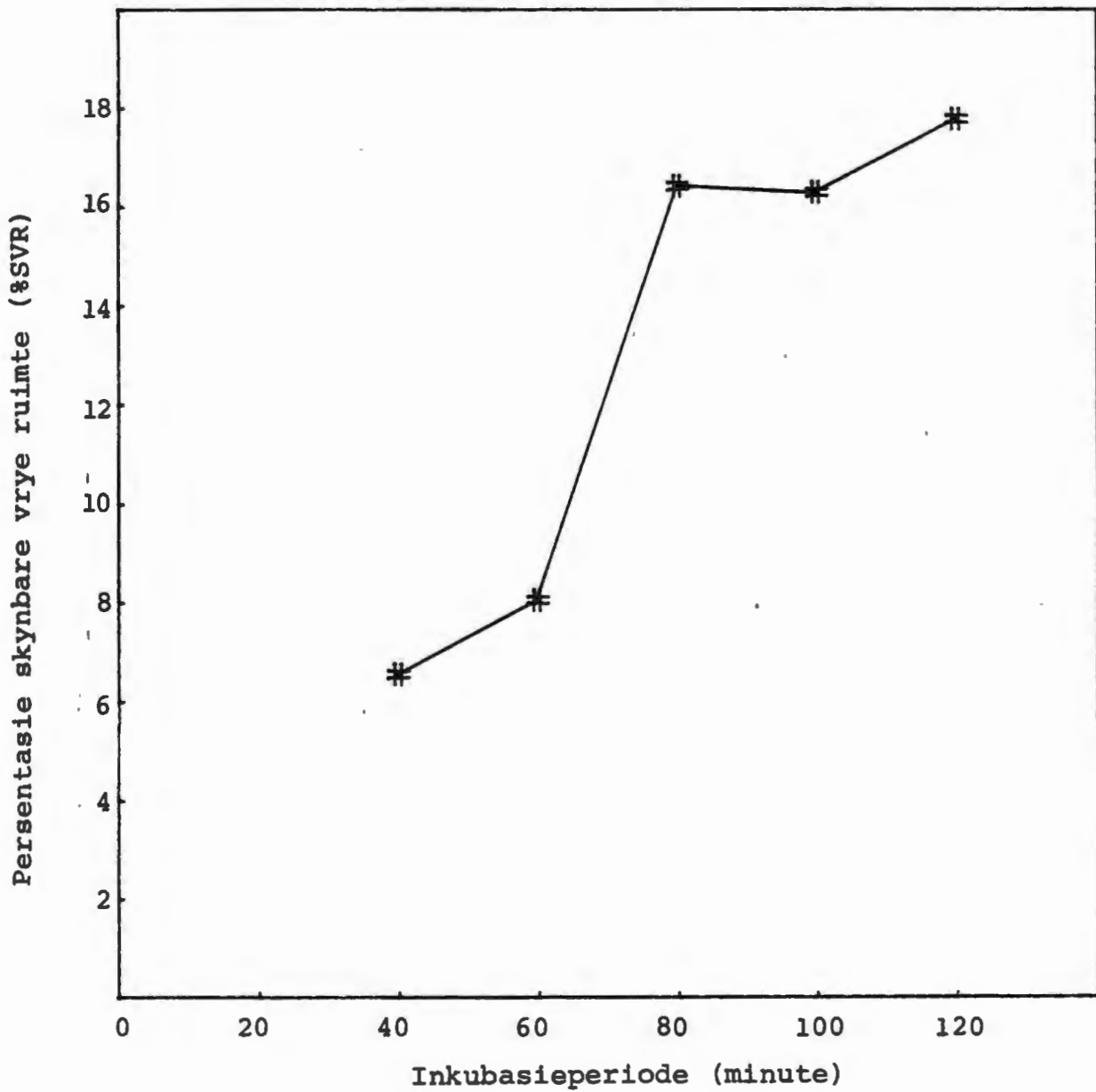
gesien 'n skerp toename in %SVR tot op 80 minute verkry word. Daarna vind min verandering in %SVR plaas.

TABEL 1: Verandering in die respirasietempo in loofblare van *Protea neriifolia* gedurende die eerste 10 dae na pluk

Dae na pluk	Respirasietempo ($\mu\text{l CO}_2$ afgegee/ gram varsweefsel/uur)
Direk	217,9
1	211,2
3	190,55
4	192,45
6	235,65
7	337,55
9	476,83
10	459,73

TABEL 2: Die persentasie skynbare vrye ruimte in ooreenstemmende loofblaarmonsters by verskillende inkubasieperiodes

Monster no.	Inkubasieperiode (minute)	Persentasie skynbare vrye ruimte (%SVR)
1	40	6,56
2	60	8,05
3	80	16,42
4	100	16,29
5	120	17,78



FIGUUR 1: Verandering in die persentasie skynbare vrye ruimtes in ooreenstemmende loofblaarmonsters geïnkubeer vir verskillende periodes

2.2.3 Veranderinge in die persentasie skynbare vrye ruimte in loofblare van *Protea neriifolia* na oes (Vergelyk 2.1.3)

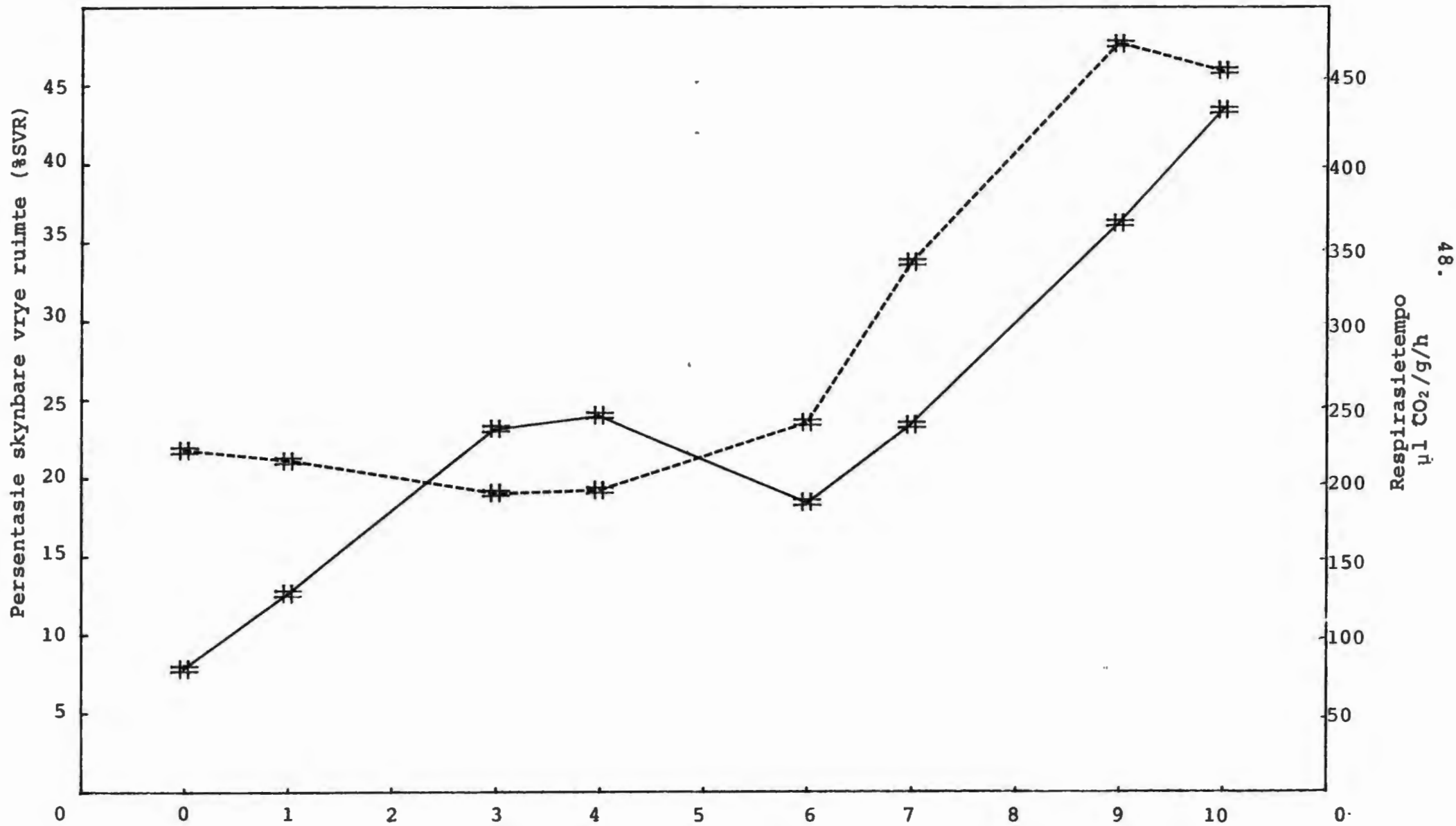
Tabel 3 en Figuur 2 toon dat die %SVR gedurende die preklimakteriese fase toeneem, gevolg deur 'n afname tot net voor die aanvangs van die respiratoriese klimakterium. Vervolgens vind daar 'n skerp toename in die %SVR tot na die postklimakteriese afname in die respirasietempo plaas.

TABEL 3: Na-oesverandering in die persentasie skynbare vrye ruimte (%SVR) in die loofblare van *Protea neriifolia*

Dae na pluk	Persentasie skynbare vrye ruimte (%SVR)
Direk	7,85
1	12,65
3	23,15
4	24,0
6	18,45
7	23,4
9	36,25
10	43,45

2.2.4 Verandering in die chlorofilinehoud van *Protea neriifolia*-loofblare na pluk (Vergelyk 2.1.4)

Soos aangetoon in Tabel 4 en Figuur 3 neem die totale chlorofil-, chlorofil a- en chlorofil b-inhoud tot op die derde



FIGUUR 2: Verandering in die %SVR teenoor die geleidelike verandering in die respirasietempo in loofblare van *Protea neriifolia* na pluk. (— %SVR; --- Respirasietempo)

dag na pluk toe. Hierna neem dit geleidelik af tot op die sesde dag na pluk, waarna 'n skerper afname tot op die negende dag na pluk plaasvind.

TABEL 4: Verandering in die chlorofilinehoud in die loofblare van *Protea neriifolia* na pluk

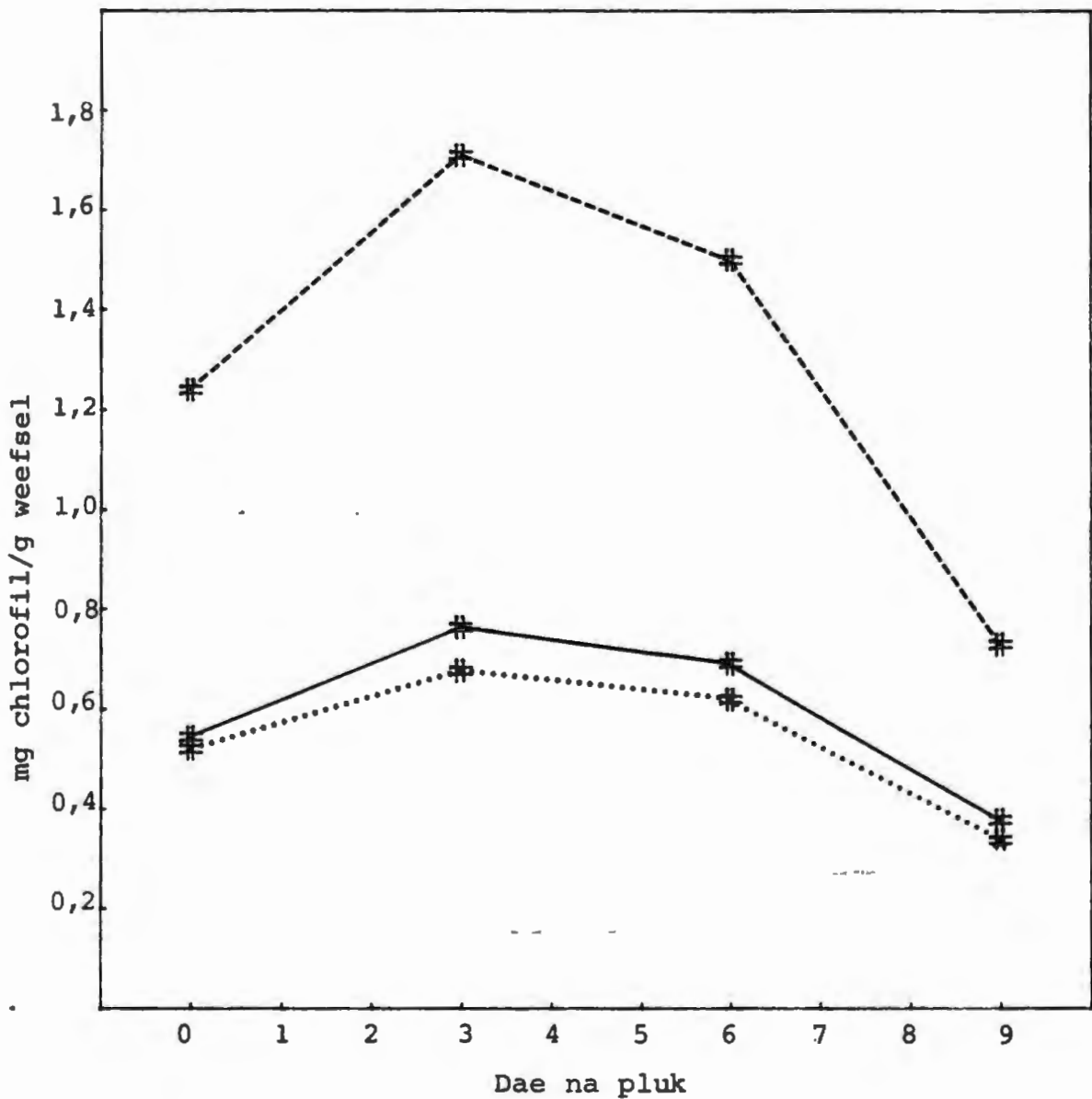
Dae na pluk	mg totale chlorofil/ g vars weefsel	mg chlorofil a/ g vars weefsel	mg chlorofil b/ g vars weefsel
Direk	1,24	0,546	0,521
3	1,71	0,765	0,678
6	1,50	0,693	0,621
9	0,73	0,380	0,338

2.2.5 Ultrastrukturele veranderinge in die selle van *Protea neriifolia*-loofblare (Vergelyk 2.1.5)

Ultrastrukturele veranderinge in die selle van verouderende loofblare word in Plate I - IV aangetoon.

2.2.6 Na-oesverandering in die flavonoïedkomponente in die loofblare van *Protea neriifolia* (Vergelyk 2.1.6)

Uit die resultate in Tabel 5 kan afgelei word dat die flavonoïedsamestelling oor 'n tydperk van 10 dae weinig verandering toon. Alhoewel die hoeveelheid flavonoïedkomponente (13) konstant bly, toon die verskillende flavonoïedkomponente ten opsigte van die R_f -waardes en kleure oor 'n tydperk van 10 dae wel veranderinge.



FIGUUR 3: Verandering in die chlorofilineinhoud van loofblare van *Protea neriifolia*
 (----- mg totale chlorofil/g vars weefsel;
 ——— mg chlorofil a/g vars weefsel;
 mg chlorofil b/g vars weefsel)

2.2.7 Bepaling van die teenwoordigheid van leuko-antosianiene in die flavonoïedekstrak uit loofblare van *Protea neriifolia* (Vergelyk 2.1.6.2)

Dit blyk uit Tabel 6 dat komponente 2, 4, 5, 6, 8, 9 en 10 respektiewelik positiewe leuko-antosianienreaksies toon, alhoewel die intensiteit daarvan ten opsigte van die verskillende komponente ook vir die verskillende dae waarop dit getoets is, verskil. Op die sewende dag na pluk toon komponent 4 die sterkste reaksie, gevolg deur komponente 2, 6, 8 en 9, terwyl komponente 5 slegs 'n geringe reaksie toon. Op die tiende dag na pluk is die sterkste reaksie met komponente 2, 4 en 8 verkry, gevolg deur komponente 6, 9 en 10, terwyl komponente 5 en 7 slegs 'n geringe reaksie toon.

2.2.8 Verandering in die totale oplosbare proteïeninhoud in die loofblare van *Protea neriifolia* na pluk (Vergelyk 2.1.7)

Volgens Tabel 7 en Figuur 4 blyk dit dat die totale oplosbare proteïeninhoud tot op die derde dag na pluk redelik konstant gebly het, waarna 'n maksimumwaarde op die vierde dag na pluk bereik word. Hierna vind 'n geleidelike afname tot op die sesde dag na pluk plaas, gevolg deur 'n skerper afname in die proteïeninhoud tot op die tiende dag na pluk.

TABEL 5: R_f -waardes en kleure van die verskillende flavonoïedkomponente in loofblare van *Protea neriifolia*

Dae na pluk	Komponent No.	R_f (x100) in BAW	Kleur		
			Sigbare lig	UV	UV + Ammoniak
Direk	1	3,3	Geen	ligte blougroen	ligte blougeel
	2	14,0	Geen	blou	ligte blougrys
	3	20,29	Geen	blou	blou
	4	23,9	Geen	blou	blougrys
	5	26,9	Geen	blougroen	blougeel
	6	29,7	Geen	blou	blougeel
	7	38,5	Geen	blou	vaalblou
	8	45,0	Geen	ligblou	ligblou
	9	49,0	Geen	-	pers
	10	54,8	Geen	donker blougrys	geel (bruin-blou)
	11	64,8	Geen	ligte blouwit	persblou
	12	66,3	Geen	ligblou	fluoriserend ligblou
	13	83,8	Geen	vaalblou	blougrys
1	1	1,64	Geen	ligte blougroen	ligte blougeel
	2	10,7	Geen	blou	blougrys
	3	19,5	Geen	blou	blou
	4	22,2	Geen	blou	blou
	5	24,9	Geen	ligblou	blou (geel)
	6	27,0	Geen	blou	blou
	7	28,2	Geen	blou	blou
	8	35,3	Geen	ligblou	blou
	9	43,7	Geen	-	pers
	10	49,6	Geen	blougrys	geel (bruin-blou)
	11	55,9	Geen	ligte blouwit	persblou
	12	62,5	Geen	ligblou	fluoriserend ligblou
	13	81,0	Geen	vaalblou	blougrys

TABEL 5: (vervolg)

Dae na pluk	Komponent No.	R _f (x100) in BAW	Kleur		
			Sigbare lig	UV	UV + Ammoniak
3	1	2,4	Geen	ligte blougroen	ligte blougeel
	2	11,26	Geen	blou	ligte blougrys
	3	20,0	Geen	blou	blou
	4	22,8	Geen	blou	blou
	5	25,0	Geen	blou	blou
	6	27,0	Geen	-	blougeel
	7	30,2	Geen	blou	blou
	8	37,5	Geen	ligblou	blou
	9	44,2	Geen	-	pers
	10	50,0	Geen	donker blougrys	geel
	11	57,7	Geen	ligblou	persblou
	12	64,6	Geen	ligte blouwit	fluoriserend ligblou
	13	84,2	Geen	vaalblou	blougrys
6	1	2,2	Geen	ligte blougroen	ligte blougeel
	2	6,5	Geen	blou	ligte blougrys
	3	8,3	Geen	blou	blou
	4	15,1	Geen	blou	blou
	5	21,6	Geen	blou	ligblou
	6	23,1	Geen	blou	blou
	7	23,8	Geen	blou	blou
	8	28,1	Geen	blou	blou
	9	38,8	Geen	-	pers
	10	50,9	Geen	donker blougrys	geel (bruin-blou)
	11	57,1	Geen	-	persblou
	12	63,0	Geen	ligte blouwit	fluoriserend ligblou
	13	84,6	Geen	vaalblou	blougrys

TABEL 5: (vervolg)

Dae na pluk	Komponent No.	R _f (x100) in BAW	Sigbare lig	Kleur	
				UV	UV + Ammoniak
7	1	1,5	Geen	ligte blougroen	ligte blougeel
	2	7,1	Geen	blou	blou
	3	12,2	Geen	blou	blou
	4	15,3	Geen	blou	blou
	5	18,4	Geen	ligblou	blou
	6	20,7	Geen	blou	blou
	7	22,7	Geen	ligblou	ligblou
	8	30,7	Geen	blou	blou
	9	39,3	Geen	-	pers
	10	46,0	Geen	donker blougrys	geel (bruin-blou)
	11	54,0	Geen	-	persblou
	12	61,1	Geen	ligte blouwit	fluoriserend witblou
	13	75,2	Geen	vaalblou	blougrys
9	1	1,6	Geen	ligte blougroen	ligte blougeel
	2	10,7	Geen	blou	blou
	3	19,6	Geen	blou	blou
	4	22,2	Geen	blou	blou
	5	25,0	Geen	ligblou	blougeel
	6	27,1	Geen	blou	blou
	7	28,2	Geen	ligblou	ligblou
	8	35,3	Geen	blou	blou
	9	43,6	Geen	-	pers
	10	49,6	Geen	donker blougrys	geel (bruin-blou)
	11	56,0	Geen	-	persblou
	12	62,5	Geen	ligte blouwit	fluoriserend ligblou
	13	81,0	Geen	vaalblou	blougrys

TABEL 5: (vervolg)

Dae na pluk	Komponent No.	R _f (x100) in BAW	Kleur		
			Sigbare lig	UV	UV + Ammoniak
10	1	2,5	Geen	ligte blougroen	ligte blougeel
	2	13,5	Geen	blou	blou
	3	24,2	Geen	blou	blou
	4	26,2	Geen	blou	blou
	5	29,0	Geen	ligblou	ligblou
	6	31,4	Geen	blou	blou
	7	34,0	Geen	blou	blou
	8	38,6	Geen	blou	blou
	9	43,8	Geen	-	persblou
	10	49,9	Geen	donker blougrys	geel (bruin-blou)
	11	56,9	Geen	-	pers
	12	62,7	Geen	ligte blouwit	fluoriserend ligblou
	13	82,7	Geen	vaalblou	blougrys

TABEL 6: Leuko-antosianienkomponente van die flavonoïed= ekstrak uit loofblare van *Protea neriifolia*

Dae na pluk	Komponent No.	Leuko-antosianienreaksie
7	1	-
	2	++
	3	(+)
	4	+++
	5	+
	6	++
	7	-
	8	++
	9	++
	10	(+)
	11	-
	12	-
	13	-
10	1	-
	2	+++
	3	(+)
	4	+++
	5	+
	6	++
	7	+
	8	+++
	9	++
	10	++
	11	-
	12	-
	13	-

TABEL 7: Verandering in die totale oplosbare proteïene in die loofblare van *Protea neriifolia* na pluk

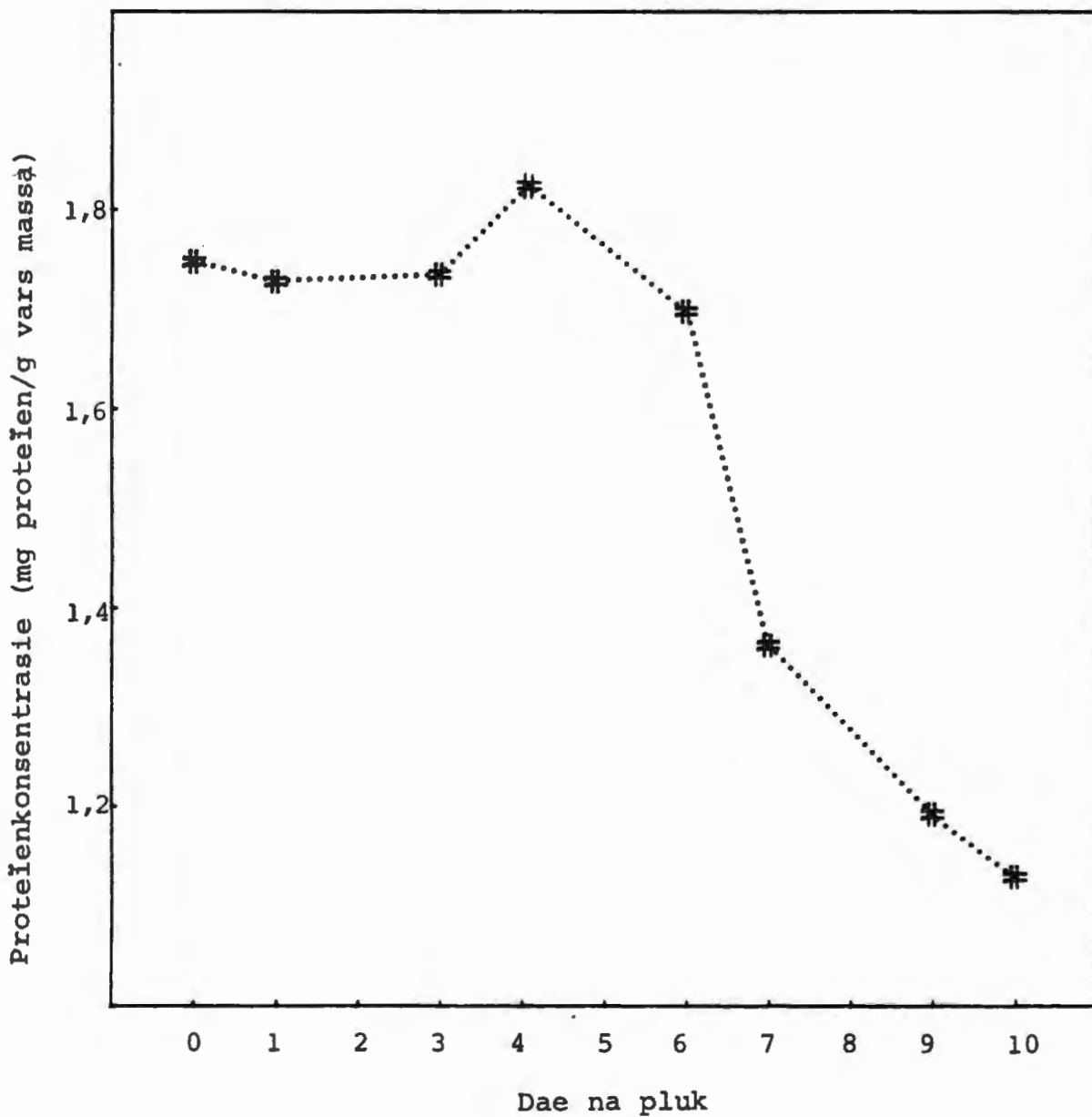
Dae na pluk	Proteïenkonsentrasie (mg proteïen/g vars loofblaarweefsel)
Direk	1,748
1	1,728
3	1,735
4	1,825
6	1,698
7	1,363
9	1,193
10	1,130

2.2.9 Na-oesverandering in die lipase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* (Vergelyk 2.1.7.2)

'n Redelike skerp toename in die lipase-aktiwiteit kom tot op die derde dag na pluk voor, waarna 'n geleidelike toename in aktiwiteit tot op die sesde dag na pluk, plaasvind (Tabel 8 en Figuur 5). Daarna vind 'n vinnige toename in die lipase-aktiwiteit tot op die tiende dag na pluk, plaas.

2.2.10 Duur van die inkubasieperiode gedurende bepaling van die chlorofillase-aktiwiteit (Vergelyk 2.1.7.3.2)

Na afloop van die inkubasie van die tien ooreenstemmende proewe vir verskillende periodes, is tot die gevolgtrekking gekom dat 'n inkubasieperiode van 50 minute die beste resultate tot gevolg het (Tabel 9 en Figuur 6).



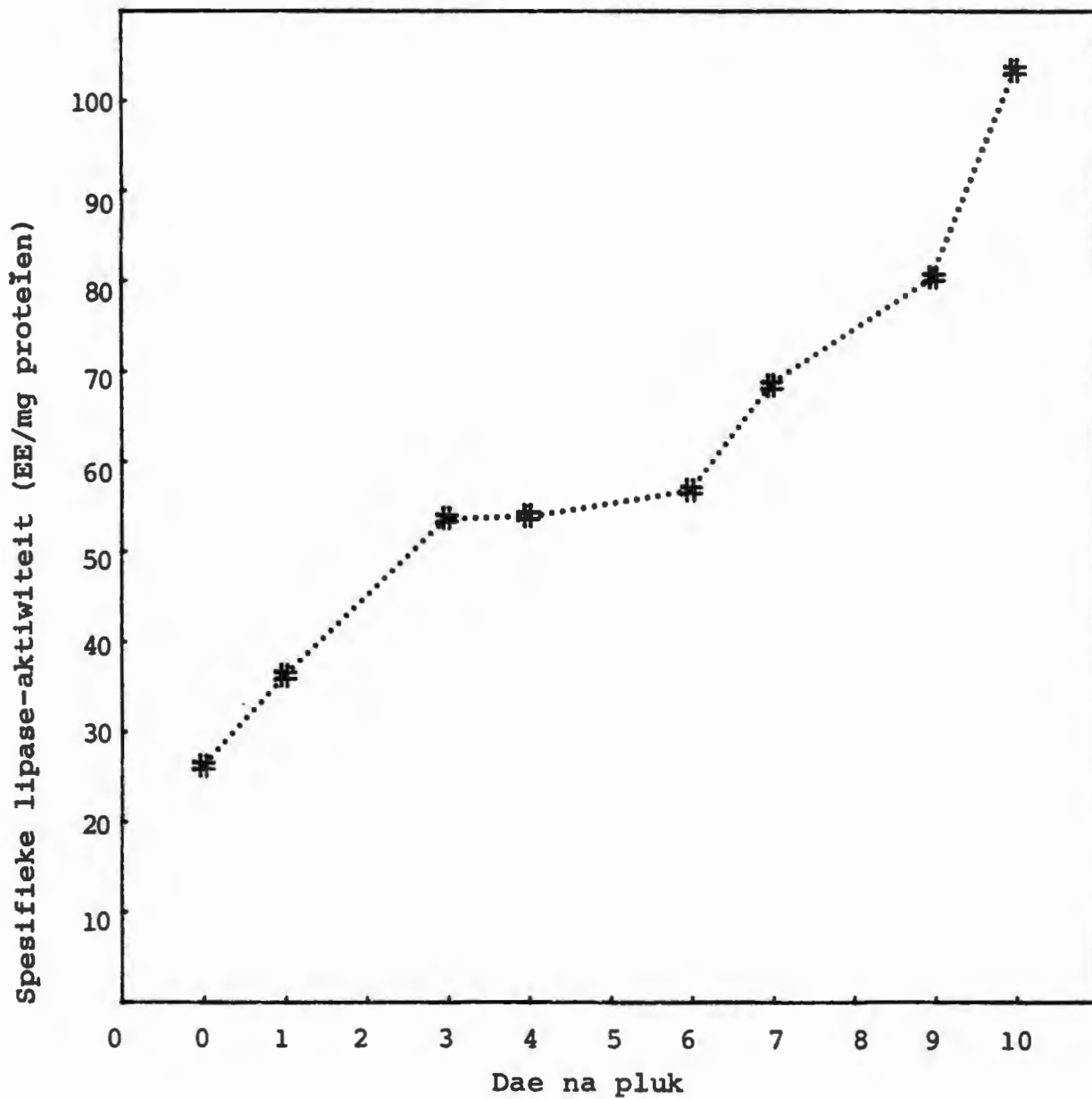
FIGUUR 4: Verandering in die totale oplosbare proteïene in loofblare van *Protea neriifolia* gedurende die eerste 10 dae na pluk

TABEL 8: Verandering in die lipase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* na oes

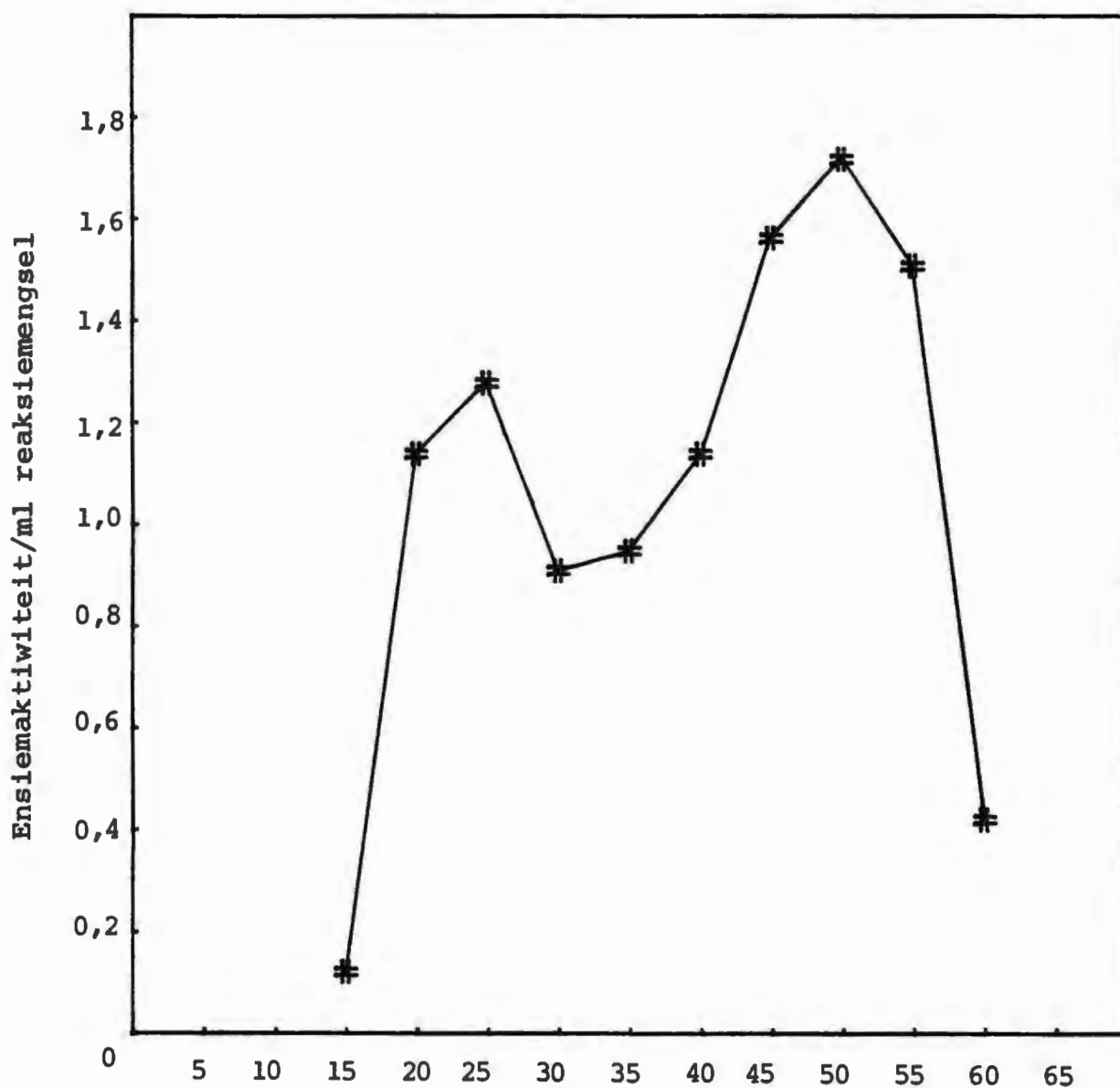
Dae na pluk	Spesifieke aktiwiteit (EE/mg proteïen)
Direk	26,252
1	36,289
3	53,765
4	54,084
6	56,900
7	68,486
9	80,420
10	103,450

TABEL 9: Die chlorofillase-aktiwiteit van tien ooreenstemmende proewe geïnkubeer vir verskillende periodes

Proef	Inkubasieperiode (minute)	Spesifieke aktiwiteit (EE/mg proteïen)
1	15	0,121
2	20	1,139
3	25	1,278
4	30	0,910
5	35	0,949
6	40	1,1397
7	45	1,563
8	50	1,717
9	55	1,510
10	60	0,422



FIGUUR 5: Verandering in die lipase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* gedurende die eerste 10 dae na pluk



FIGUUR 6: Verandering in die chlorofillase-aktiwiteit van ooreenstemmende proewe geïnkubeer vir verskillende periodes

2.2.10.1 Kwantitatiewe bepaling van die chlorofillase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* na pluk (Vergelyk 2.1.7.3)

Dit blyk uit Tabel 10 en Figuur 7 dat die chlorofillase-aktiwiteit, ten opsigte van die degradasie van chlorofil, tot op die sesde dag na pluk skerp toeneem. Vervolgens neem die chlorofillase-aktiwiteit ten opsigte van die degradasie van chlorofil af, met 'n moontlike sintese van chlorofil tot gevolg.

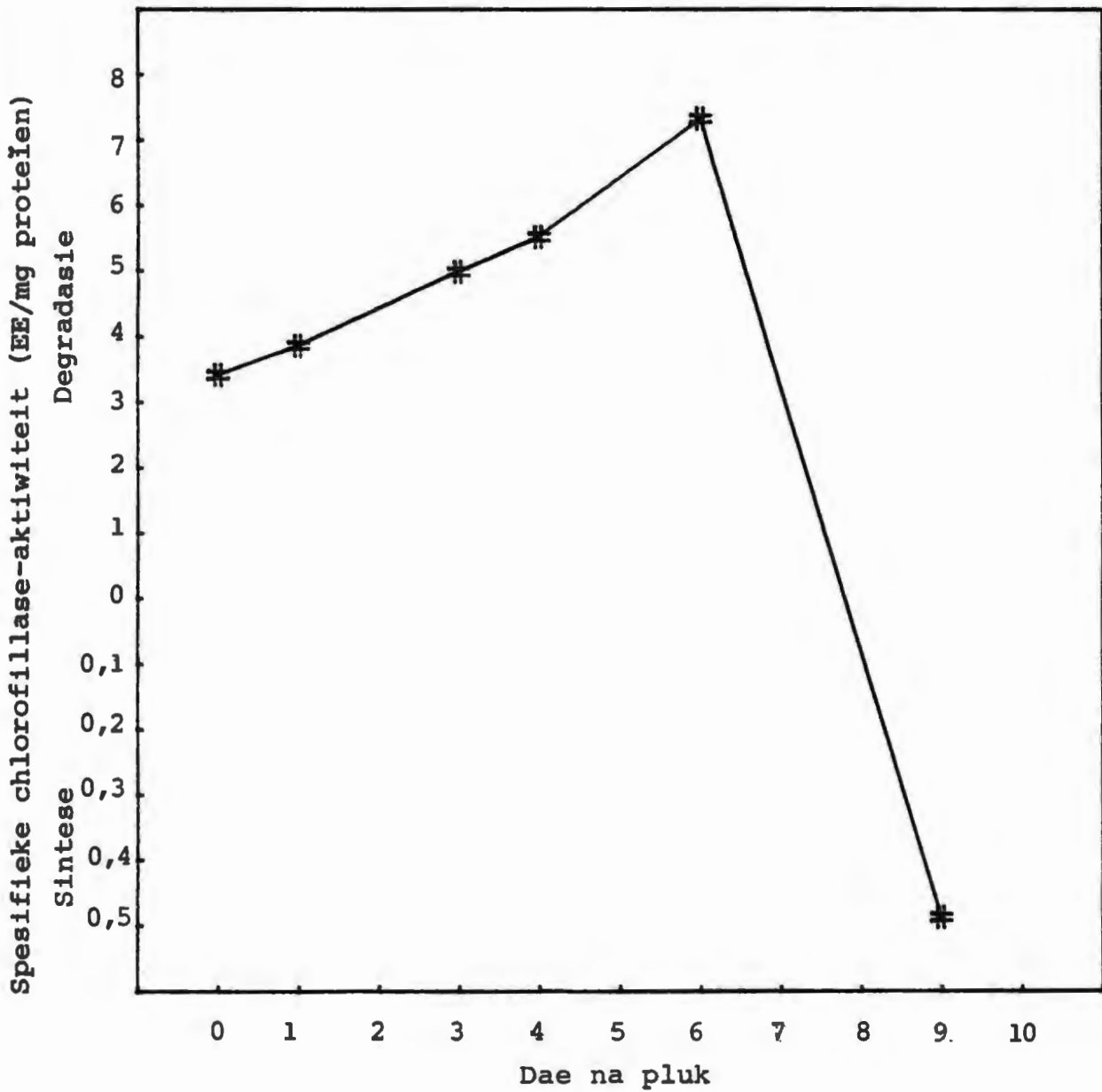
TABEL 10: Verandering in die chlorofillase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* na pluk

Dae na pluk	Spesifieke aktiwiteit (EE/mg proteïen)
Direk	0,342
1	0,386
3	0,498
4	0,551
6	0,732
9	*-0,487

* Negatiewe teken = moontlike sintese-aktiwiteit van chlorofillase

2.2.11 Verandering in die malaatdehidrogenase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* na pluk (Vergelyk 2.1.7.4)

'n Vinnige afname in die malaatdehidrogenase-aktiwiteit tot op die sesde dag na pluk word gevolg deur 'n geleidelike afname in aktiwiteit tot op die sewende dag na pluk (Tabel 11



FIGUUR 7: Verandering in die chlorofillase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* na pluk

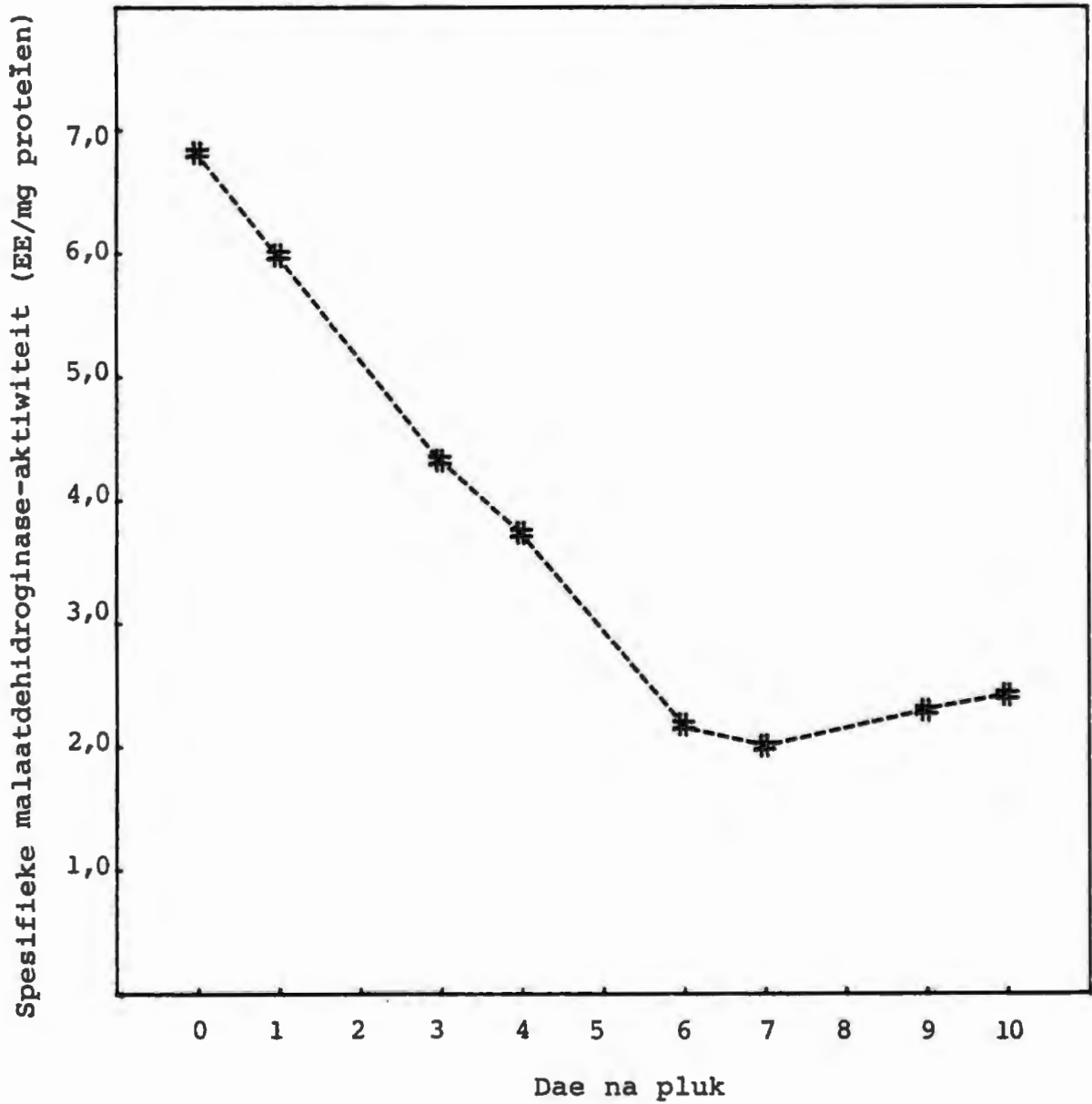
en Figuur 8). Daarna kom 'n geleidelike toename in malaatdehidrogenase-aktiwiteit tot op die tiende dag na pluk voor.

TABEL 11: Verandering in die malaatdehidrogenase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* na pluk

Dae na pluk	Spesifieke aktiwiteit (EE/mg proteïen)
Direk	6,819
1	5,990
3	4,329
4	3,738
6	2,181
7	2,008
9	2,295
10	2,421

2.2.12 Invloed van die flavonoïedekstrak op die lipase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* na pluk
(Vergelyk 2.1.8)

Die flavonoïedekstrak veroorsaak 'n verhoging in die lipase-aktiwiteit direk en op die eerste dag na pluk (Tabel 12 en Figuur 9). Die lipase-aktiwiteit word op die derde dag na pluk geensins beïnvloed nie. Hierna vind 'n verlaging in aktiwiteit op die vierde dag na pluk plaas, waarna 'n verhoging in lipase-aktiwiteit tot op die sesde dag na pluk plaasvind. Tot op die tiende dag na pluk word die lipase-aktiwiteit drasies verlaag (vergeelyk Tabel 8 en Figuur 5).



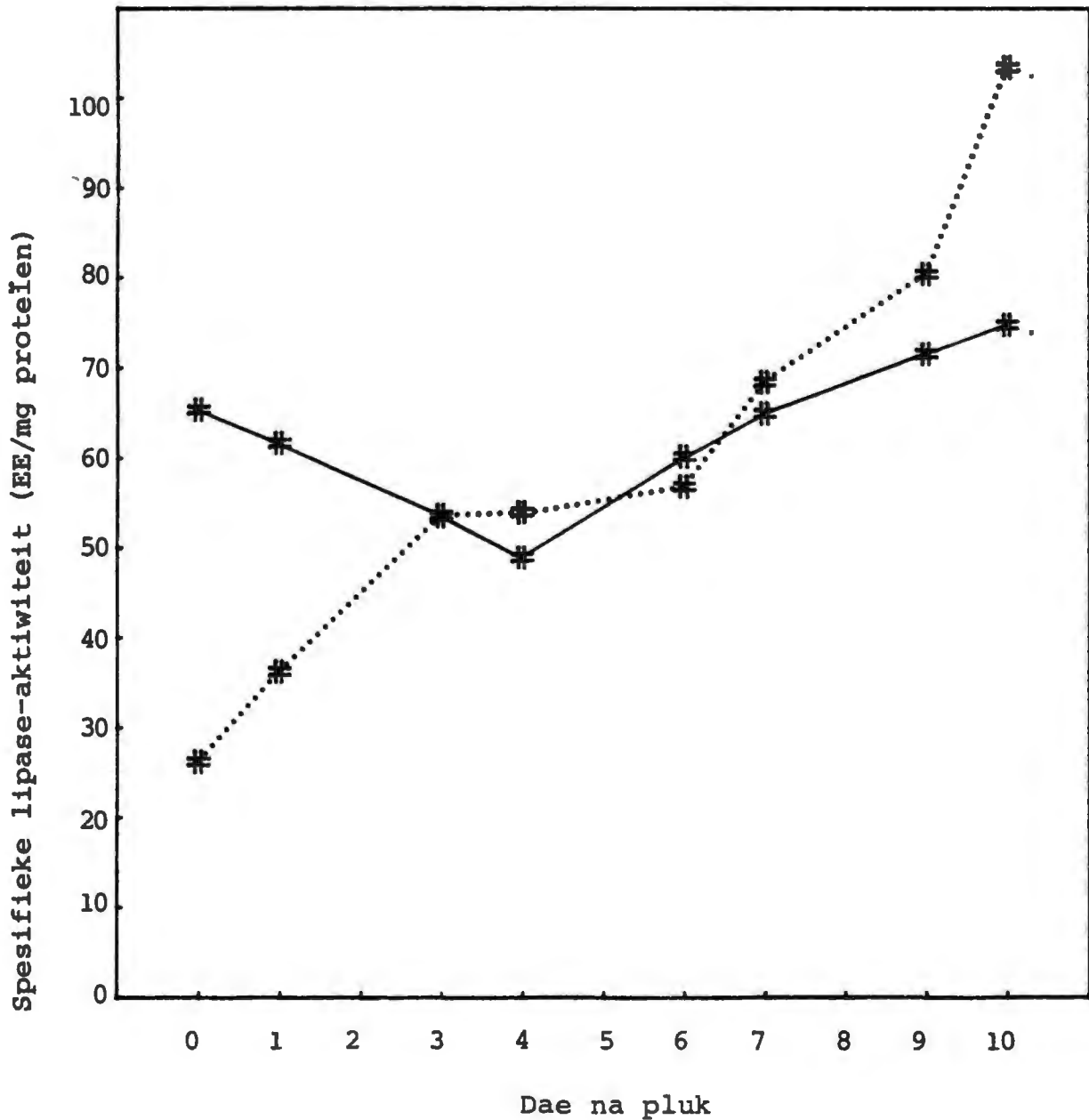
FIGUUR 8: Na-oesverandering in die malaatdehidrogenase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia*

TABEL 12: Invloed van die flavonoïedekstrak op die lipase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* na pluk

Dae na pluk	Ensiemaktiwiteit (EE/mg proteïen)
Direk	65,4
1	61,696
3	53,534
4	48,948
6	60,216
7	65,003
9	71,555
10	74,8

2.2.13 Invloed van die flavonoïedekstrak op die chlorofil-
lase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia*
na pluk (Vergelyk 2.1.8)

Die flavonoïedekstrak veroorsaak 'n verlaging in die degradatiewe aktiwiteit van chlorofillase tot op die sesde dag na pluk (Tabel 13 en Figuur 10). Vervolgens word die moontlike sintese-aktiwiteit van chlorofillase tot op die negende dag na pluk gerem (vergeelyk Tabel 10 en Figuur 7).



FIGUUR 9: Verandering in die lipase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* teenoor die verandering in lipase-aktiwiteit met toevoeging van flavonoïedekstrakte

(..... Lipase-aktiwiteit; — Lipase-aktiwiteit met flavonoïedekstrak)

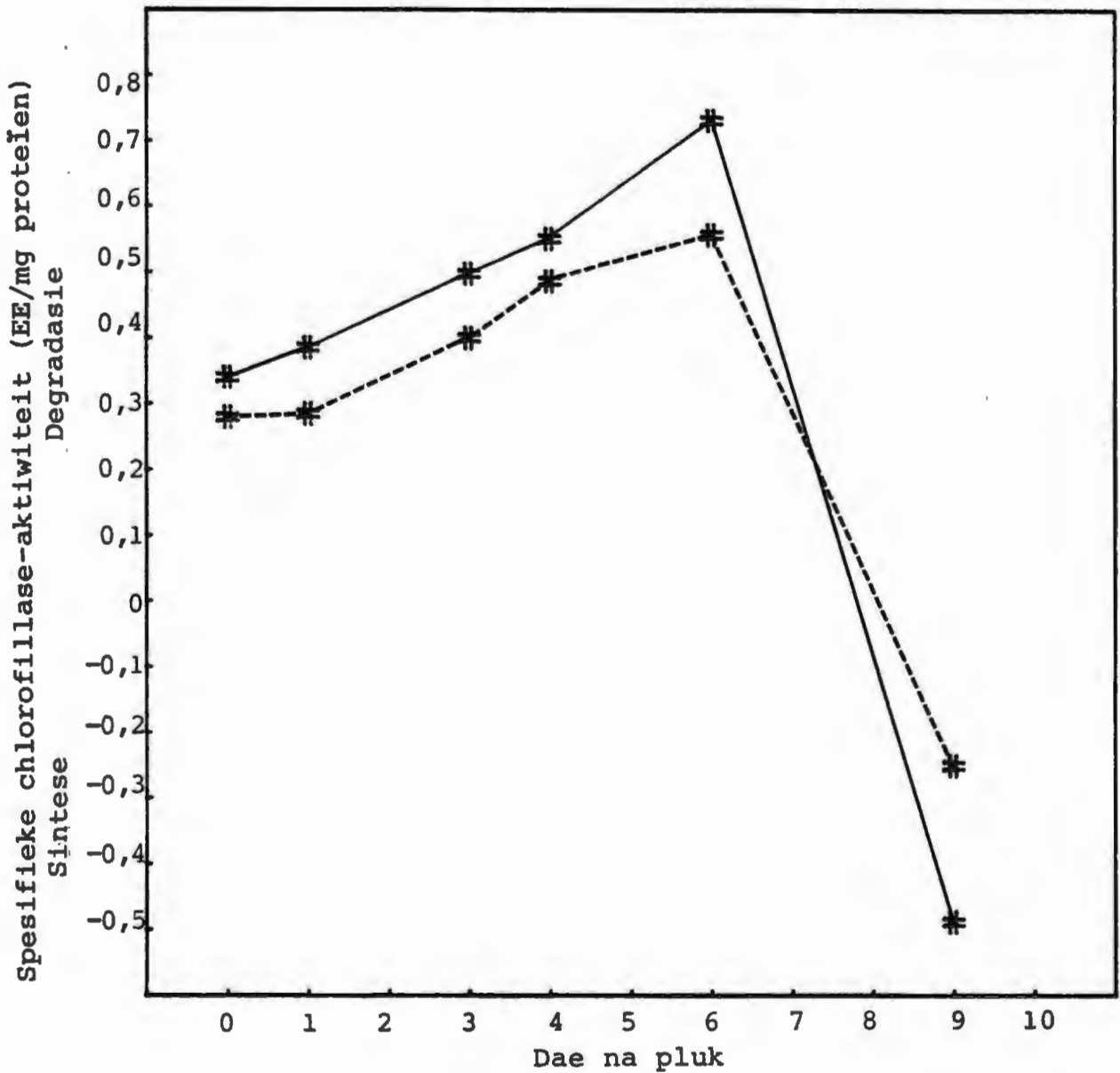
TABEL 13: Invloed van die flavonoïedekstrak op die chloro-
fillase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neri-*
folia na pluk

Dae na pluk	Ensiemaktiwiteit (EE/mg proteïen)
Direk	0,281
1	0,286
3	0,401
4	0,487
6	0,558
9	* -0,487

* Negatiewe teken = moontlike sintese-aktiwiteit van chloro-
fillase

2.2.14 Invloed van die flavonoïedekstrak op die malaatde-
hidrogenase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neri-*
folia na pluk (Vergelyk 2.1.8)

Die flavonoïedekstrak veroorsaak 'n verlaging in die malaatdehidrogenase-aktiwiteit tot op die vierde dag na pluk (Tabel 14 en Figuur 11). Hierna vind 'n verhoging in die aktiwiteit tot op die negende dag na pluk plaas, waarna die flavonoïedekstrak op die tiende dag na pluk bykans geen invloed op die malaatdehidrogenase-aktiwiteit uitoefen nie (Vergelyk Tabel 11 en Figuur 8).



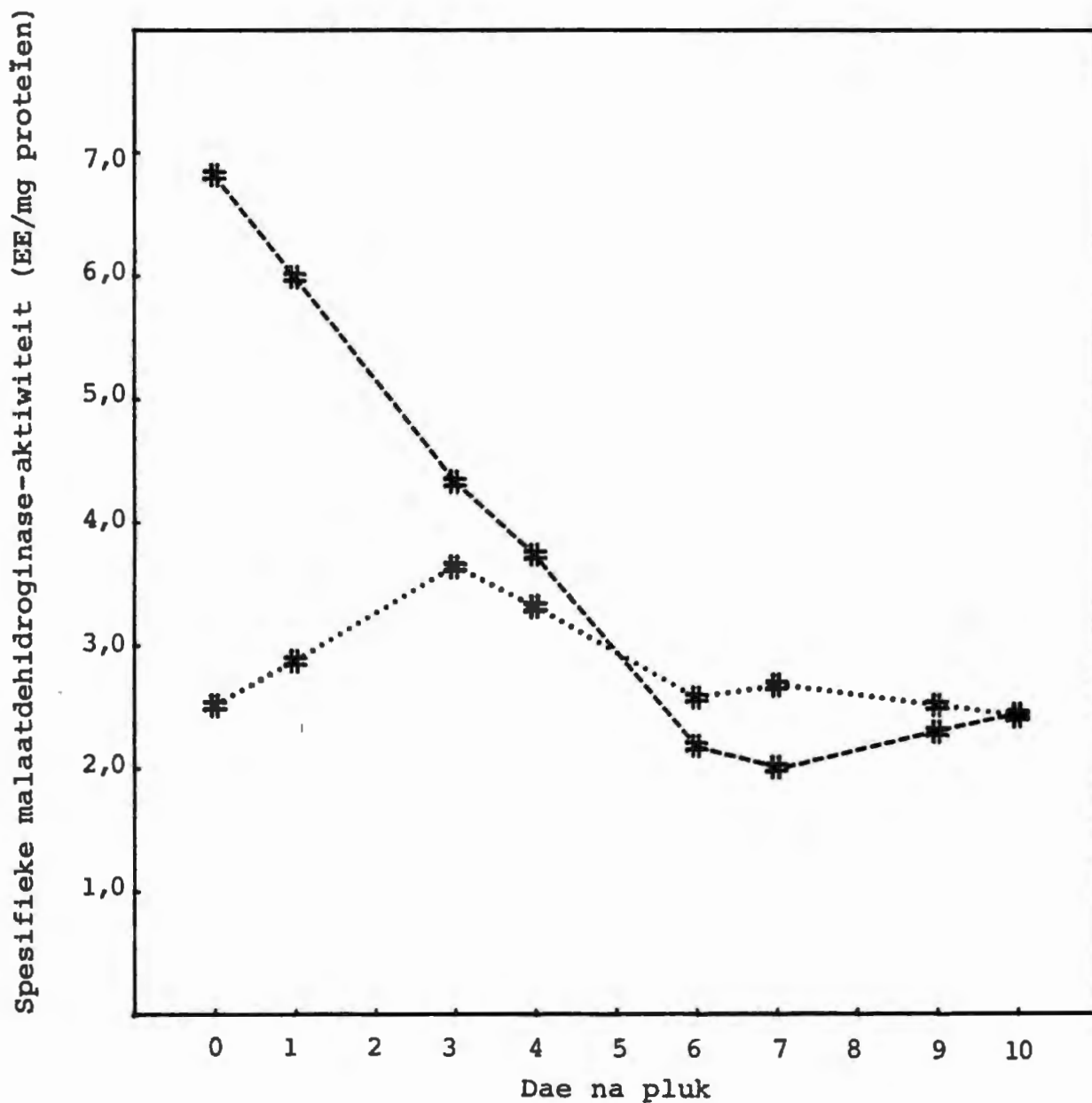
FIGUUR 10: Verandering in die chlorofillase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia*, teenoor die verandering in chlorofillase-aktiwiteit met die toevoeging van flavonoïedekstrak (— Chlorofillase-aktiwiteit; ---- Chlorofillase-aktiwiteit met flavonoïedekstrak)

TABEL 14: Invloed van die flavonoïedekstrak op die malaatdehidrogenase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* na pluk

Dae na pluk	Ensiemaktiwiteit (EE/mg proteïen)
Direk	2,513
1	2,875
3	3,637
4	3,314
6	2,576
7	2,676
9	2,511
10	2,448

2.2.15 Invloed van die verskillende chromatografiesgeskeide flavonoïedkomponente op die lipase-, chlorofillase- en malaatdehidrogenase-aktiwiteite in loofblare van *Protea neriifolia* op verskillende dae na pluk (Vergelyk 2.1.9)

Tabel 15 toon dat geeneen van die verskillende flavonoïedkomponente wat op die eerste dag na pluk uit die loofblare geëkstraheer is 'n inhiberende invloed op die lipase-aktiwiteit gehad het nie. Die mate van aktivering deur die verskillende flavonoïedkomponente was sodanig dat komponent 11 die grootste aktivering veroorsaak het, gevolg deur komponente 8, 13, 10 en 4 respektiewelik. Op die derde dag na pluk het komponent 5 die grootste aktivering veroorsaak, gevolg deur komponente 8, 7, 2 en 6. Komponente 10, 9, 1, 3



FIGUUR 11: Verandering in die malaatdehidrogenase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia*, teenoor die verandering in malaatdehidrogenase-aktiwiteit met toevoeging van die flavonoidekstrak (----- Malaatdehidrogenase-aktiwiteit;Malaatdehidrogenase-aktiwiteit met flavonoidekstrak)

en 13 het inhibering van die lipase-aktiwiteit tot gevolg gehad. Slegs komponente 9 en 7 het op die sesde dag na pluk inhibering tot gevolg gehad, terwyl komponent 11 die grootste aktivering tot gevolg gehad het, gevolg deur komponente 12, 13, 2 en 3 respektiewelik. In teenstelling hiermee het 7 komponente op die sewende dag inhibering tot gevolg gehad, naamlik komponente 5, 4, 10, 3, 12, 2 en 7. Komponent 1 het die grootste aktivering tot gevolg gehad, gevolg deur komponente 13, 9, 6 en 11.

Uit Tabel 16 blyk dit dat alle flavonoïedkomponente 'n inhiberende effek op die chlorofillase-aktiwiteit op die derde en vierde dag na pluk uitgeoefen het.

Op die eerste dag na pluk het vier komponente 'n inhiberende invloed op die malaatdehidrogenase-aktiwiteit gehad, naamlik komponente 2, 12, 5 en 3 (Tabel 17). Komponent 10 het die grootste aktivering tot gevolg gehad, gevolg deur komponente 6, 9, 13, 7, 8, 4, 11 en 1 respektiewelik. Op die derde dag na pluk het komponente 4, 2, 3, 13, 11, 8, 1 en 12 inhibering van die lipase-aktiwiteit tot gevolg gehad. Komponent 9 het die grootste aktivering tot gevolg gehad, gevolg deur komponente 5, 10, 7 en 6. Slegs drie komponente het op die vierde dag na pluk aktivering van die malaatdehidrogenase-aktiwiteit tot gevolg gehad, naamlik komponente 2, 7 en 12. Komponente 9, 4, 3, 6, 11, 10, 5, 1, 8 en 13 het respektiewelik inhibering van die malaatdehidrogenase-aktiwiteit tot gevolg gehad. Slegs vier komponente het op die sesde dag na pluk inhibering tot gevolg gehad, naamlik komponente 9, 13, 12 en 3,

terwyl komponente 11, 7, 8, 1, 2, 4, 6, 10 en 5 respektiewe-
lik 'n verhoging in die aktiwiteit veroorsaak het. Op die ne-
gende dag na pluk het slegs drie komponente inhibering van
die malaatdehidrogenase-aktiwiteit tot gevolg gehad, naamlik
komponente 9, 6 en 11 respektiewelik. Komponent 3 het die
grootste aktivering veroorsaak, gevolg deur komponente 5,
13, 1, 8, 10, 12, 4, 7 en 2 respektiewelik.

TABEL 15: Invloed van chromatografiesgeskeide flavonoïed-
komponente op die lipase-aktiwiteit in loof-
blare van *Protea neriifolia*

Dae na pluk	Band No.	Spesifieke aktiwiteit (EE/mg proteïen)
1	1	64,104
	2	52,156
	3	54,581
	4	68,764
	5	55,676
	6	68,299
	7	68,614
	8	72,550
	9	44,943
	10	71,465
	11	80,439
	12	67,181
	13	72,367
3	* Kontrole	36,289
	1	50,553
	2	98,204
	3	52,090
	4	72,734
	5	137,902
	6	94,660
	7	126,518
	8	136,129
	9	40,226

TABEL 15: (vervolg)

Dae na pluk	Band No.	Spesifieke aktiwiteit (EE/mg proteïen)
6	10	37,340
	11	76,758
	12	54,492
	13	50,581
	* Kontrole	53,764
	1	63,451
	2	89,887
	3	78,508
	4	72,086
	5	58,787
	6	63,770
	7	48,949
	8	70,495
	9	35,857
7	10	78,076
	11	103,839
	12	98,346
	13	94,531
	* Kontrole	56,899
	1	82,519
	2	63,283
	3	60,280
	4	54,927
	5	44,993
	6	71,577
	7	63,925
	8	67,179
	9	73,974
10	59,424	
11	68,561	
12	62,580	
13	75,100	
* Kontrole	65,003	

* Die kontrole het geen flavonoïedkomponente bevat nie.

TABEL 16: Invloed van die chromatografies geskeide flavonoidkomponente op die chlorofillase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia*

Dae na pluk	Band No.	Spesifieke aktiwiteit (EE/mg proteïen)
3	1	0,341
	2	0,320
	3	0,263
	4	0,212
	5	0,380
	6	0,271
	7	0,295
	8	0,210
	9	0,390
	10	0,250
	11	0,420
	12	0,400
	13	0,381
		*Kontrole
4	1	0,410
	2	0,357
	3	0,370
	4	0,485
	5	0,391
	6	0,460
	7	0,520
	8	0,443
	9	0,480
	10	0,310
	11	0,398
	12	0,470
	13	0,491
		*Kontrole

* Die kontrole het geen flavonoidkomponente bevat nie.

TABEL 17: Invloed van die chromatografiesgeskeide flavonoïedkomponente op die malaatdehidrogenase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia*

Dae na pluk	Band No.	Spesifieke aktiwiteit (EE/mg proteïen)
1	1	3,151
	2	2,745
	3	2,935
	4	3,216
	5	2,913
	6	3,795
	7	3,445
	8	3,333
	9	3,571
	10	4,201
	11	3,210
	12	2,871
	13	3,529
		*Kontrole
3	1	3,804
	2	3,107
	3	3,218
	4	2,987
	5	6,063
	6	4,668
	7	4,696
	8	3,804
	9	8,517
	10	5,338
	11	3,692
	12	3,888
	13	3,246
		*Kontrole

TABEL 17: (vervolg)

Dae na pluk	Band No.	Spesifieke aktiwiteit (EE/mg proteïen)
4	1	3,659
	2	4,547
	3	2,970
	4	1,286
	5	3,527
	6	2,771
	7	3,977
	8	3,738
	9	1,140
	10	3,208
	11	3,049
	12	3,951
	13	3,750
		*Kontrole
6	1	3,482
	2	3,368
	3	1,971
	4	3,226
	5	2,142
	6	3,083
	7	3,938
	8	3,739
	9	1,259
	10	2,598
	11	4,366
	12	1,572
	13	1,344
		*Kontrole

TABEL 17: (vervolg)

Dae na pluk	Band No.	Spesifieke aktiwiteit (EE/mg proteïen)
9	1	3,012
	2	2,565
	3	3,336
	4	2,687
	5	3,134
	6	2,119
	7	2,646
	8	2,849
	9	2,022
	10	2,768
	11	2,144
	12	2,687
	13	3,052
	*Kontrole	2,295

* Die kontrole het geen flavonoïedkomponente bevat nie.

3. BESPREKING EN GEVOLGTREKKING

Verskeie lokaliteitsvariante van *Protea neriifolia* wat aansienlik van mekaar verskil ten opsigte van hulle gevoeligheid vir loofblaarverbruining nadat die bloeistele van die plant verwyder is, word in die Republiek van Suid-Afrika aangetref. Vir die doel van hierdie studie is van die "Baviaanskloof" lokaliteitsvariant gebruik gemaak. In die eksperimentele ondersoeke wat uitgevoer is, is bloeistele met bloeiwyses van plante wat in dieselfde omgewing gegroei het, gebruik.

Verbruining van plantweefsels is oor die algemeen nie 'n onbekende verskynsel nie en word in verskillende oorryp vrugte aangetref. Alhoewel daar 'n korrelasie tussen die verbruingspotensiaal van vrugte en die totale konsentrasie fenoliese verbindings en polifenoloksidase-aktiwiteit bestaan (Golan, Kahn & Sadovski, 1977), blyk dit dat lugoksidase van flavonoïede 'n groter bydrae as ensimatiese oksidasie tot die verbruining van *Protea neriifolia*-loofblare lewer (Whitehead, 1979). Verbruining van die loofblare van *Protea neriifolia* na pluk gee uiteindelik aanleiding tot die algehele afsterwing daarvan. Dit blyk dus dat alle metabolismiese aktiwiteite in die loofblare op een of ander wyse deur verbruining beïnvloed word.

Die respirasiepatroon van die loofblare van *Protea neriifolia* stem ooreen met dié van rypwordende vrugte. Soos aangetoon in Tabel 1 en Figuur 2 het die respirasietempo aanvanklik 'n geleidelike daling ondergaan, sodat 'n minimum tussen

sen die derde en vierde dag na pluk bereik word. Daarna het die respirasietempo geleidelik tot op die sesde dag na pluk toegeneem, waarna 'n vinnige toename plaasgevind het. Die maksimum word op die negende dag na pluk bereik, waarna die respirasiepatroon 'n geleidelike daling getoon het. Aangesien die respirasiekromme 'n objektiewe maatstaf is om die fisiologiese status, dit wil sê rypheids stadium of verouderingsverval, van 'n vrug te bepaal (De Swardt, 1974), kan die respirasiepatroon van die loofblare van *Protea neriifolia* moontlik ook as 'n objektiewe maatstaf vir verouderingsverval gebruik word. Sommige navorsers het bevind dat die inhibering of aktivering van die rypwording van peervrugte, die respirasiepatroon geensins beïnvloed nie (Frenkel *et al.*, 1968; Wang & Hansen, 1970). Verskeie ander navorsers het egter deur middel van elektronmikroskopiese studies aangetoon dat strukturele degenerasie van verouderende selmembrane wel met veranderinge in metaboliese prosesse, soos respiratoriese veranderinge, geassosieer is (Bain & Mercer, 1964; Rhodes & Woollorton, 1967).

Subsellulêre organisasie is van fundamentele belang gedurende veroudering, aangesien protoplasmiese dekompartementasie die ensiem- en substraatverspreiding beïnvloed waardeur verskeie metaboliese prosesse geaffekteer word (De Swardt, 1974; Matile & Moor, 1968; Sacher, 1962 & 1966). Die persentasie skynbare vrye ruimte wat 'n aanduiding van veranderinge in die membraanpermeabiliteit is, toon in *Protea neriifolia*-loofblare 'n toename tot op die derde en vierde dag na pluk waartydens die preklimakteriese minimum voorkom (Tabel 3 en Figuur 2). Daarna neem die %SVR tot op die sesde dag na pluk

af, waarna 'n onomkeerbare toename in permeabiliteit plaasvind. 'n Inkubasieperiode van 80 minute blyk voldoende te wees vir die bepaling van die %SVR in loofblare van *Protea neriifolia* (Tabel 2 en Figuur 1). Die inisiële toename in membraanpermeabiliteit ontstaan moontlik as gevolg van veranderinge in die lipoproteïenstruktuur van membrane, wat 'n verlies in differensiële permeabiliteit en 'n toename in die %SVR tot gevolg het (De Swardt & Rousseau, 1973). Dit is moontlik dat hidrolise van membraanlipiede wel 'n verandering in die membraanpermeabiliteit tot gevolg kan hê (Baddeley & Simon, 1969; Draper, 1969; Ferguson & Simon, 1973; Galliard, 1968). Aangesien energie noodsaaklik vir die instandhouding van die membraanintegriteit is (Eilam, 1965), kan 'n tekort aan energie tydens die preklimakteriese minimum moontlik tot 'n toename in die %SVR aanleiding gee (Burger, 1976). Die afname in die %SVR tot op die sesde dag na pluk, wat op 'n tydelike herstel in die membraanpermeabiliteit dui, stem ooreen met die resultate van De Swardt en Rousseau (1973). Hulle is van mening dat die tydelike herstel in die differensiële permeabiliteit voorkom as gevolg van die abnormale kontak tussen ensieme en substrate. Vervolgens ontstaan hoë anaboliese reaksies en die valse indruk van 'n tydelike hoë metaboliese aktiwiteit en herstel van membraanstrukture word geskep. Die onomkeerbare toename in die %SVR gaan met die klimakteriese styging in respirasietempo en verouderingsverval in die loofblare van *Protea neriifolia* gepaard (Figuur 2). 'n Toename in onversadigde vetsure as gevolg van die hidrolise van lipiede in verouderende chloroplastmembrane het moontlik 'n afname in membraanpermeabiliteit tot gevolg (Baddeley & Hanson,

1967; Demel *et al.*, 1972; Siegenthaler, 1972). De Swardt en Rousseau (1973) wys daarop dat kataboliese reaksies wat as gevolg van dekompartementasie ontstaan, hoofsaaklik vir die onomkeerbare toename in permeabiliteit en verandering van metaboliese prosesse verantwoordelik is. Dit is nie duidelik of die pluk van die bloeiwyses moontlik tot die toename in %SVR aanleiding gegee het nie en of dit moontlik as gevolg van 'n vroeëre inisiërende stimulus, of miskien in opdrag van spesifieke genetiese kode ontstaan het nie. Dit is reeds in 1928 deur Blackman en Parija voorgestel dat die klimakterium as gevolg van 'n verlies van kompartementasie ontstaan. Volgens Figuur 2 is dit wel moontlik dat protoplasmiese dekompartementasie wel tot die aanname van die klimakterium kon aanleiding gee, aangesien die onomkeerbare toename in %SVR vanaf die sesde dag na pluk met die klimakteriese styging saamval. Volgens Bain en Mercer (1964) en Sacher (1962; 1966) het die verlies aan membraanpermeabiliteit 'n verandering in die ensiem- en substraatverspreiding tot gevolg en sal dit die respirasietempo, en ander metaboliese prosesse wat met die klimakterium geassosieer word, beïnvloed. Die verlies van strukturele geordenheid kan dus tot 'n verlies van funksionele doeltreffendheid lei.

Materiaal wat direk na pluk vir elektronmikroskopiese studies voorberei is, het 'n normale georganiseerde struktuur getoon (Plaat 1A en B). Die plasmalemma en tonoplas (Plaat 1A) het geen onderbrekings getoon nie en die styselkorrels wat in die sitoplasma voorgekom het (Plaat 1B), is moontlik 'n aanduiding dat die selle op daardie stadium aktief gefotosinteer het. Monsters wat op die derde dag na pluk geneem

is, het strukturele veranderinge in die membraansisteesem getoon (Plaat 1C en D). Tannienbevattende sitoplasmiiese vakuole het met die sentrale vakuool verenig, waarna die tanniene in die sentrale vakuool vrygestel is (Plaat 1D). Hierdie veranderinge in die tonoplas was moontlik vir die toename in die %SVR, tydens die preklimakteriese minimum, verantwoordelik. Die chloroplaste het normale georganiseerde strukture getoon (Plaat 1C).

Op die sesde dag na pluk het onderbrekings in die plasmalemma en tonoplas voorgekom (Plaat 2A). Tanniene is in sitoplasmiiese vakuole aangetref (Plaat 2B en C). Sitoplasmiiese vakuole kon moontlik as gevolg van intrasellulêre osmotiese veranderinge ontstaan het (Bain & Mercer, 1964; Sacher, 1962). Chafe en Durzan (1973) en Matile en Moor (1968) beweer dat die sitoplasmiiese vakuole moontlik vanuit vesikels vanaf die endoplasmiiese retikulum ontstaan het. Hierdie vesikels neem later toe in grootte en versmelt dan met die sentrale vakuool. Vakuole kan egter ook *de novo* ontstaan (Bain & Mercer, 1964; Platonova, *et al.*, 1974). Dit is ook moontlik dat die verlies aan membraanpermeabiliteit wat reeds tot op die sesde dag na pluk in *Protea neriifolia*-loofblare waargeneem is (Tabel 3 en Figuur 2) tot gevolg kan hê dat water in die vakuool en water wat met die membrane geassosieer is, in die sitoplasma vrygestel word. Hierdie verskynsel kan intensiewe vakuolisering van die sitoplasma veroorsaak (Platonova *et al.*, 1974). Die ontstaan van tannienbevattende sitoplasmiiese vakuole in die loofblare van *Protea neriifolia* stem ooreen met die resultate van Chafe en Durzan (1973). Tan-

niene kom as ronde of onreëlmatig gevormde amorfe liggame voor (Plaat 2). Volgens Chafe en Durzan (1973) kan die vorm en dimensie van tannienliggame baie varieer. Uit Plaat 2A blyk dit dat tanniene in assosiasie met styselkorrels aangetref word. Dit is moontlik dat daar 'n verband tussen die vermindering van die reserwe stysel en prosesse wat tot die vorming van fenoliese verbindings aanleiding gee, bestaan (Wardrop & Cronshaw, 1962). Tanniene kan ten koste van styselkorrels en/of amiloplaste op die omtrek van vesikels in styselkorrels en/of amiloplaste gevorm word (Swain, 1965; Wardrop & Cronshaw, 1962). Plaat 2D toon dat tanniene ook in chloroplaste aangetref word. Hierdie bevindings verskil met dié van Chafe en Durzan (1973) aangesien hulle geen tanniene in enige plastiede aangetref het nie.

Op die negende dag na pluk het drastiese veranderinge in die membraansisteam van selle in die loofblare van *Protea neriifolia* plaasgevind (Plaat 3). Die tonoplas is somtyds heeltemal afwesig en die grondplasma van die sitoplasma het gedesorganiseer voorgekom (Plaat 3A en D). Desintegrasië van die tonoplas het 'n vermenging van die vakuoolinhoud en sitoplasma tot gevolg, sodat hidrolitiese ensieme wat in die selsap voorkom, die degradasië van die sitoplasma kataliseer (Matile & Moor, 1968; Nishimura & Beevers, 1978; Shaw & Manocha, 1965). Die omhullingsmembrane van die mitochondrion (Plaat 3B) en chloroplaste (Plaat 3C en D) het ook onderbrekings getoon. Hierdie desintegrasië van membraansisteme het met die klimakterium en vinnige toename in die %SVR gepaard gegaan. Die chloroplaslamellae het van mekaar wegge-

trek en het gedesorganiseerd voorgekom (Plaat 3C en D).

Die sellulêre struktuur van loofblaarmonsters wat op die twaalfde dag na pluk geneem is, het geheel en al gedesorganiseerd voorgekom (Plaat 4). Die plasmalemma het heeltemal vanaf die selwand weggeraak (Plaat 4A) en organelle soos die mitochondrion (Plaat 4D) word in die vakuool aangetref. Tanniene het as ronde of amorge liggame in sitoplasmiese vakuole en in 'n chloroplas voorgekom (Plaat 4B en C). Hierdie sitoplasmiese vakuole het met die sentrale vakuool verenig, waarna die tanniene in die sentrale vakuool vrygestel is (Plaat 4B). Hierdie resultate stem ooreen met dié van Chafe en Durzan (1973). In ooreenstemming met die resultate van Platonova *et al.* (1974) het verouderende chloroplaste 'n verlies aan lamellêre struktuur getoon (Plaat 4C). Geen osmiofiliese globules is egter in verouderende chloroplaste aangetref, soos deur Bain en Mercer (1964), Butler en Simon (1971) en Hurkman (1979) waargeneem is nie. Die nakklimakteriese daling in die respirasietempo (Figuur 2) het moontlik as gevolg van die strukturele desintegrasie van die mitochondrion ontstaan (Plaat 4D), aangesien 'n verlies aan strukturele geordenheid tot 'n verlies aan funksionele doeltreffendheid aanleiding gee. Die desintegrasie van die selwand (Plaat 4A) het moontlik 'n verdere verhoging in die %SVR (Figuur 2) tot gevolg gehad.

Vesikels wat in die sentrale vakuool voorgekom het, is soms in assosiasie met membraanstrukture soos die tonoplas aangetref (Plate 1D, 3A, 3C en 4B). Mulder (1977) wys daarop dat daar slegs oor die ontstaan van die vesikels gespekuleer kan

word. Volgens ongepubliseerde resultate van Verhoefen toon die selle van plante wat spesifieke simptome van mineraalte= korte openbaar, 'n soortgelyke verskynsel. Dit is moontlik dat die vesikels as gevolg van terugvouing en aaneensluiting by onderbrekings in die tonoplas ontstaan het. Reid en Meier (1972) het bevind dat sitoplasmiese vakuole deur die invagina= sie van die tonoplas in die sentrale vakuool geïnkorporeer word. Volgens Plate 1D en 2B is die vesikels wel in asso= siasie met die binneste membrane van sitoplasmiese vakuole aangetref. Die vesikels het egter reeds in die selle van monsters wat direk na pluk geneem is en geen invaginasie van die tonoplas getoon het nie, voorgekom (Plaat 1A en B). Tan= nienmolekule is in assosiasie met die membrane van die vesikels aangetref (Plate 1B, 1D, 2B, 3A en 4B). Alhoewel hierdie vesikels in die vakuool aangetref word en duidelike membrane besit, stem die kenmerke daarvan met dié van sferosome oor= een (Frederick, Newcomb, Vigil & Wergin, 1968).

Dit word algemeen aanvaar dat verouderende blare deur 'n vinnige afname in chlorofil-, proteïen- en nukleïensuurin= houd gekenmerk word (Phillips *et al.*, 1969; Shaw *et al.*, 1965). Soos aangetoon in Tabel 7 en Figure 2 en 4 het die totale oplosbare proteïeninhoud tot op die derde dag na pluk redelik konstant gebly, waarna die proteïeninhoud gedurende die preklimakteriese minimum toegeneem het. Hierna het 'n geleidelike afname tot op die sesde dag na pluk plaasgevind, waarna 'n vinnige afname in die oplosbare proteïeninhoud tot op die tiende dag na pluk voorgekom het. Die skerp daling in die proteïeninhoud het met die klimakteriese styging en

toename in die %SVR gepaard gegaan (Figure 2 en 4). Die aanvanklike toename in die totale oplosbare proteïene kan moontlik aan die sintese van spesifieke ensieme wat verouderingsprosesse gekataliseer het, toegeskryf word. Dilley (1970) en De Swardt & Rousseau (1973) is van mening dat spesifieke ensieme wat by veroudering betrokke is, voor die aanvangs van die klimakterium gesintetiseer word. Die geleidelike en daarna vinnige afname in die oplosbare proteïene gedurende die klimakterium kan volgens Beevers (1976) aan 'n afname in sintese vermoë of aan 'n progressiewe degradasie van proteïene toegeskryf word.

Butler en Simon (1971) wys daarop dat 'n verlies aan chlorofil in verouderende blare altyd met 'n afname in die proteïeninhoud gepaard gaan. Aangesien meeste van die proteïene van fotosinterende blare in chloroplaste gelokaliseer is (Zuker & Stinson, 1962), sal 'n afname in die proteïeninhoud van 'n blaar 'n direkte skadelike invloed op chloroplaste uitoefen (Butler & Simon, 1971). Dit blyk uit Tabel 4 en Figuur 3 dat die chlorofilinhoud van die loofblare van *Protea neriifolia* tot op die derde dag na pluk toegeneem het, waarna dit geleidelik tot op die sesde dag na pluk afgeneem het. Vervolgens het 'n vinnige afname in die chlorofilinhoud tot op die negende dag na pluk plaasgevind. In koringblare en in kormommer saailinge gaan die afname in chlorofilinhoud met ultrastrukturele veranderinge gepaard (Butler, 1967; Lewington, Talbot & Simon, 1967; Shaw & Manocha, 1965). Lewington *et al.* (1967) beweer dat 'n afname in die proteïen- en

chlorofilinhoud as gevolg van die degenerasie van chloroplaste plaasvind. Dit blyk uit die resultate van hierdie studie (Figure 3 en 4) dat die inisiële toename in die chlorofilinhoud in *Protea neriifolia*-loofblare met 'n redelike konstante proteïeninhoud gekorreleer is. Verder toon Plaat 1C dat chloroplaste tot op die derde dag na pluk geen strukturele verandering getoon het nie. As gevolg van die omsetting van proteïene, met ander woorde sintese en degradasie wat gelyktydig plaasvind, sal daar geen netto verandering in die proteïeninhoud voorkom nie (Huffaker & Peterson, 1974). Vervolgens het 'n afname in die chlorofilinhoud tot op die sesde dag na pluk voorgekom en volgens Plaat 2D het ultrastrukturele veranderinge ook plaasgevind deurdat tannienmolekule in chloroplaste voorgekom het. Volgens Figuur 4 het 'n progressiewe afname in die oplosbare proteïeninhoud plaasgevind. Matile (1975) wys daarop dat die proteïenmetabolisme van 'n verouderende orgaan gekenmerk word deur 'n ongebalanseerde proteïenomsetting, deurdat katabolisme teenoor anabolisme toeneem (Hansen, 1966; Kende, 1971). Die progressiewe afname in die chlorofilinhoud tot op die negende dag na pluk (Figuur 3), het met 'n desintegrasie van die chloroplastomhullingsmembrane (Plaat 3C en D) gepaard gegaan. Verouderingsverval word gekenmerk deur 'n geleidelike afname van metaboliese aktiwiteite deur onder andere 'n verlies aan chlorofil en 'n degradasie van koolhidrate, proteïene en nukleïensure. Hierdie degradatiewe veranderinge word met 'n afname in fotosintese, respirasie en ander metaboliese prosesse gekorreleer (Gorter, 1972).

Behalwe vir 'n paar uitsonderings toon hidrolitiese ensie= me 'n toename in aktiwiteit gedurende die klimakterium, wat dan ook 'n toename van kataboliese teenoor anaboliese pro= sesse tot gevolg het (Hansen, 1966; Kende, 1971; Sacher, 1973; Sodek & Wright, 1969). 'n Progressiewe toename in die lipase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* het tot op die derde dag na pluk voorgekom, waarna die ak= tiwiteit 'n geleidelike toename tot op die sesde dag na pluk getoon het (Tabel 8 en Figuur 5). Vervolgens het die li= pase-aktiwiteit tot op die tiende dag na pluk vinnig toege= neem. Die inisiële toename in lipase-aktiwiteit het met 'n toename in die %SVR gepaard gegaan, waarna die lipase- aktiwiteit baie min toegeneem het en die %SVR geleidelik afgeneem het (Figure 2 en 5). Met die aanvangs van die kli= makterium, dit is vanaf die sesde dag na pluk, het 'n toe= name in lipase-aktiwiteit met 'n skerp toename in die %SVR gepaard gegaan. Dit stem ooreen met die resultate van Rhodes en Woollorton (1967), wie eksperimenteel bevind het dat die lipase-aktiwiteit gedurende die klimakterium toeneem. Dit kan nie met sekerheid afgelei word of die verhoogde lipase-ak= tiwiteit die finale toename in %SVR veroorsaak het en of die verlies aan kompartementasie tot die vinnige sintese of akti= vering van lipase aanleiding gegee het nie. Gressel en Avron (1965) het bevind dat lipase en fosfolipase A die fotoreduk= sie en fotofosforilasie aktiwiteit in geïsoleerde chloroplaste kan laat afneem. Mayer (1966) is egter van mening dat ko= ringkiemlipase nie die vrystelling van die chloroplasmem= braangebonde katesjoloksidase ('n polifenoloksidase), kan be= werkstellig nie. Hy het tot die gevolgtrekking gekom dat en=

sieme wat lipiede van chloroplasmembrane as substraat gebruik, nie hierdie ensiem in die sitoplasma kan vrystel nie.

Chlorofillase is 'n integrale membraangebonde wateroplosbare lipoproteïenkompleks wat hoofsaaklik in stromamembrane en tot 'n mindere mate in granamembrane van chloroplaste teenwoordig is (Ardao & Vennesland, 1960; Terpstra, 1976, 1978). Verskeie navorsers het al oor die spesifieke aktiwiteit van chlorofillase gespekuleer. Dit is nie duidelik of die ensiem *in vivo* die verestering en/of hidrolise van chlorofil kataliseer nie (Bacon & Holden, 1970). In *Protea neriifolia*-loofblare het 'n toenemende degradasie van chlorofil deur chlorofillase tot op die sesde dag na pluk voorgekom (Tabel 10 en Figuur 7). Hierna het die chlorofillase-aktiwiteit ten opsigte van die degradasie van chlorofil skerp afgeneem en het 'n moontlike sintese van chlorofil tot gevolg gehad. Volgens Figure 3 en 7 het die inisiële toename in chlorofillase, ten opsigte van die degradasie van chlorofil, met 'n geleidelike styging in die chlorofilinhoud gepaard gegaan. Hierna het die chlorofilinhoud geleidelik tot op die sesde dag na pluk afgeneem terwyl die chlorofillase-aktiwiteit ten opsigte van degradasie, skerp toegeneem het. Die vinnige afname in chlorofilinhoud het egter met 'n moontlike sintese van chlorofil deur chlorofillase gepaard gegaan. Hierdie bevindings verskil met die resultate van Sacher (1973) wie 'n afname in die chlorofilinhoud en 'n toename in chlorofillase gedurende die rypwording van vrugte beskryf het. Dit blyk uit hierdie ondersoek dat die degradasie en/of sintese van chlorofil deur middel van die ensiem chlorofillase nie noodwendig met 'n afname of toename

in chlorofilinhoud respektiewelik gepaard gegaan het nie. Böger (1965) stel voor dat chlorofillase beide sintese en degradasie van chlorofil tot gevolg het. Elsworth, Tsuk en Pierre (1976) en Tamai, Shioi en Sasa (1979) beweer dat twee verskillende ensieme verantwoordelik is vir aktiwiteite wat waargeneem is. Die een ensiem kataliseer die hidrolise van chlorofil a, terwyl die ander ensiem die omkeerbare trans-estriifikasie van chlorofil a kataliseer. 'n Inkubasie periode van 50 minute blyk voldoende te wees vir die bepaling van chlorofillase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia* (Tabel 9 en Figuur 6).

Veroudering word gekenmerk deur 'n toename in die aktiwiteit van die mitochondrion, aangesien die tussenprodukte van die Krebs siklus aktief geoksideer word (Baqui *et al.*, 1974; Ulrich, 1958). Laties (1962; 1964) en Sacher (1973) het voorgestel dat die aktivering of regulering van ensiemaktiwiteite van die Krebs siklus 'n toename in die respirasietempo tot gevolg het. Dit blyk uit Tabel 11 en Figuur 8 dat die malaatdehidrogenase-aktiwiteit in *Protea neriifolia*-loofblare aansienlik verminder het tot op die sesde dag na pluk, waarna 'n geleidelike daling tot op die sewende dag na pluk plaasgevind het. Vervolgens het 'n geleidelike toename in aktiwiteit tot op die tiende dag na pluk voorgekom. Dit stem ooreen met die resultate van Hartmann (1962), Rubin en Gudin (1953) en Rubin en Sal'kova (1955), wie bevind het dat die malaatdehidrogenase-aktiwiteit gedurende die veroudering van appelvrugte afgeneem het en ook geen ooreenkomste met die klimakteriese styging getoon het nie. De Swardt en Duvenhage (1971) wys daarop dat veroudering in sommige gevalle met verhoogde ensiemaktiwiteite gepaard gaan, terwyl die ak-

tiwiteite van ander ensieme afneem. Volgens Neal en Hulme (1958) vind daar gedurende die klimakterium 'n oorskakeling in metaboliese weë plaas sodat 'n gedeelte van die malaat van die Krebs-siklus onttrek word om as substraat vir die malaatensiem te dien. Aangesien dit wel bekend is dat veranderinge in metaboliese weë gedurende veroudering voorkom, is dit moontlik dat 'n verlaging in die malaatdehidrogenase-aktiwiteit op 'n oorskakeling in metaboliese weë dui (De Swardt & Duvenhage, 1971; Spencer, 1965). Verdere eksperimentele waarneming is egter nodig om vas te stel of die verlaagde ensiemaktiwiteit die gevolg van inhibisie of degradasie gedurende veroudering is.

Dit blyk uit die ondersoek van Elsworth en Martin (1971) dat leuko-antosianiene (flavan-3;4-diole) by 'n groot verskeidenheid *Protea*-spesies voorkom. Sodanige leuko-antosianiene is in 'n relatief hoë konsentrasie uit *Protea neriifolia* geïsoleer (De Swardt, 1977). Elsworth en Martin (1971) en Mulder (1977) het vasgestel dat *Protea neriifolia* die leuko-antosianiene, leukosianidien, bevat. In teenstelling met die resultate van Whitehead (1979) het die dertien verskillende flavonoïedekomponente van flavonoïedekstrakte uit loofblare van *Protea neriifolia*, wel onderlinge verandering gedurende die eerste tien dae na pluk (Tabel 5) getoon.

Leuko-antosianiene is verbindings wat gedurende verhitting in 'n suurmedium ooreenstemmende antosianidien vorm. Die reaksie is oksidatief en behels die verlies van waterstofatome sowel as 'n dehidrasie (Robinson, 1969). Die leuko-antosianienekomponente van die verskillende flavonoïedekstrakte

in weefselverbruining speel. Gedurende veroudering vind 'n desintegrasie van die tonoplas plaas, waarna die vakuolêre fenoliese verbindings deur middel van sitoplasmiese ensieme geoksideer word (Anderson, 1968; Shaw & Manocha, 1965). Hierdie koperbevattende ensieme kom onder andere in die chloroplaslamellae en chloroplasgrana (Arnon, 1949; Ardao & Vennesland, 1960; Mayer, 1966; Parish, 1972), in die mitochondrion (Mayer & Friend, 1960; Walker & Hulme, 1966), in peroksisome en "mikrosome" (Ruis, 1972), op die binneste oppervlak van klein sitoplasmiese vakuole en op die tonoplas (Parish, 1975) voor. Aangesien dit wel moontlik is dat flavonoïede in die sitoplasma aangetref kan word (Faust *et al.*, 1967; Kefeli & Kutacek, 1977), is dit moontlik dat 'n verlies van die lamellêre struktuur van die chloroplas daartoe aanleiding kan gee dat polifenoloksidase wat onder andere in die chloroplasmembrane gelokaliseer is, vrygestel word, waardeur die oksidasie van polifenole in die sitoplasma versnel word (Platonova *et al.*, 1974). In die selle van *Protea neriifolia*-loofblare het tannienmolekule in assosiasie met die sitoplasma (Plat 2B en 4A), sitoplasmiese vakuole en tonoplas (Plate 1C en 2C), membrane van vesikels in die vakuool (Plate 2B, 3A, 3C en 4B) en in chloroplaste (Plate 1D en 4C) voorgekom.

Die ekstraksie van ensieme uit tannienbevattende plantweefsels word bemoeilik deur die vorming van aktiewe kruisbindings tussen proteïene en tanniene (Swain, 1965; Young, 1965). Aangesien die ruimtelike skeiding tussen fenoliese verbindings en fenoloksidases deur middel van homogenise-

ring vernietig word, word endogene fenoliese verbindings vin-
 nig na kinone, gekondenseerde tanniene en bruin pigmente
 omvorm (Anderson, 1968). Bruin gekleurde polimere met tan-
 nienagtige kenmerke wat proteïene kan presipiteer word ook
 gevorm deurdat kinone nie-ensimatiese polimeriseringsreaksies
 ondergaan (Rhodes, 1977). Die gebruik van lae molekulêre
 massa reduceermiddels of middels wat koperbevattende okxi-
 derende ensieme inhibeer en ook polimeriese verbindings wat
 met fenole verbind gedurende ekstraksie, is reeds deur vele
 navorsers ondersoek (Anderson, 1968; Loomis, 1974; Loomis
 & Battaile, 1966; Rhodes, 1977). Die onaktivering of pre-
 sipitasie van proteïene deur tanniene is grootliks van die
 wateroplosbaarheid en molekulêre grootte van die tanniene,
 asook van die aantal hidroksielgroepe wat in die tannien-
 molekule teenwoordig is, afhanklik (Rhodes, 1977). Alhoewel
 Haslam (1975) bevind het dat lae molekulêre verbindings
 soos leuko-antosianiene te klein is om effektiewe kruisbin-
 dings met proteïene te vorm, het De Swardt *et al.* (1967)
 bevind dat leuko-antosianiene die enigste aktiewe fenoliese
 verbindings is wat spesifieke ensieme onaktiveer. Volgens
 Hulme en Jones (1963) is die monomere van fenoliese sure en
 flavonoïede opsigself inhiberend van aard. Hulle is van
 mening dat die oksidatiewe polimerisasie van die fenoliese
 verbindings nie essensieël is om inhibering of inaktivering
 van ensieme te veroorsaak nie. Stenlid (1963) is van mening
 dat die hidroksileringspatroon van die flavonoïedverbindings
 die aktiwiteit van flavonoïede bepaal. Volgens hom is die
 tipe flavonoïedverbinding van minder belang aangesien ver-
 skillende flavonoïedverbindings beide inhibering en aktiveer-

ring van verskillende prosesse en ensieme soos oksidatiewe fosforilase en indoolasynsuuroksidase veroorsaak.

Die interaksie tussen fenoliese verbindings en ensieme is drieledig van aard. Die fenoliese verbindings kan grootliks verander word terwyl die ensiemaktiwiteit na die interaksie onveranderd bly, die ensiem kan geïnhibeer word terwyl die meeste van die fenoliese verbindings na die reaksie onveranderd bly, of die ensiem kan met die fenoliese verbindings reageer om daarna deur die produk van die reaksie geïnhibeer te word (Williams, 1963). Dit blyk uit Tabelle 12 en 15 en Figuur 9 dat die totale flavonoïedekstrakte wat op verskillende dae na pluk verkry is, asook die chromatografiesgeskeide flavonoïedkomponente die lipase-aktiwiteit in loofblare van *Protea neriifolia*-loofblare geïnhibeer sowel as geaktiveer het. Volgens Figuur 9 het die flavonoïedekstrak direk na pluk tot op die eerste dag na pluk 'n verhoging in die lipase-aktiwiteit tot gevolg gehad, waarna die flavonoïedekstrak op die derde dag na pluk die lipase-aktiwiteit geensins beïnvloed het nie. Vervolgens het 'n inhibering van die lipase-aktiwiteit op die vierde dag na pluk voorgekom, waarna 'n geringe verhoging in aktiwiteit op die vyfde dag na pluk gevolg het. Hierna het die flavonoïedekstrak die lipase-aktiwiteit tot op die tiende dag na pluk geïnhibeer. Aangesien strukturele veranderinge in die membraanstruktuur sowel as 'n toename in die %SVR eers vanaf die derde dag na pluk voorgekom het (Plaat 1C en D en Figuur 2), is dit hoogsonwaarskynlik dat

'n werklike aktivering van die lipase-aktiwiteit *in vivo* plaasgevind het. Uit Tabel 15 is dit duidelik dat geen flavonoïedkomponent die lipase-aktiwiteit op die eerste dag na pluk geïnhibeer het nie. Die mate van aktivering van lipase-aktiwiteit deur die verskillende flavonoïedkomponente was sodanig dat komponent 11 die grootste aktivering veroorsaak het, gevolg deur komponente 8, 13, 10 en 4 respektiewelik. Op die derde dag na pluk het komponent 5 die grootste aktivering veroorsaak, gevolg deur komponente 8, 7, 2 en 6. Komponente 10, 9, 1, 13 en 3 het 'n inhibering van die lipase-aktiwiteit tot gevolg gehad. Slegs komponente 9 en 7 het op die sesde dag na pluk inhibering tot gevolg gehad, terwyl komponent 11 die grootste aktivering tot gevolg gehad het, gevolg deur komponente 12, 13, 2 en 3 respektiewelik. Op die sewende dag na pluk het sewe komponente inhibering tot gevolg gehad, naamlik komponente 5, 4, 10, 3, 12, 2 en 7. Komponent 1 het die grootste aktivering tot gevolg gehad, gevolg deur komponente 13, 9, 6 en 11. Geen vaste patroon ten opsigte van aktivering en/of inhibering kon verkry word nie. Volgens Pridham (1963) sal hidrolitiese ensieme met die gesubstitueerde fenoliese hidroksielgroepe en ander substituenten wat in die fenoliese verbinding teenwoordig is, reageer. Hy is van mening dat esterases, waarby lipase ingesluit is, geskikte fenoliese derivate as substrate kan gebruik.

Navorsing dui daarop dat die chloroplas betrokke mag wees tydens flavonoïedbiosintese, aangesien resultate daarop dui dat flavonoïede in plastiede voorkom (McClure, 1975; Saunders & McClure, 1972). Indien fenolases (polifenoloksidases)

hoofsaaklik in plastiede voorkom (Parish, 1972), kan die vrystelling van die membraangebode fenolases gedurende verouderingsverval of meganiese beskadiging, oksidasie van fenoliese verbindings veroorsaak en die vorming van kinone tot gevolg hê (McClure, 1975). Karanov (1972) het die invloed van verskeie fenoliese verbindings in die teenwoordigheid en afwesigheid van kinetien, op die degradasie van die chlorofil in blaarskyfies van *Raphanus sativus* ondersoek. Hy het tot die gevolgtrekking gekom dat die fenoliese verbindings 'n regulerende rol tydens veroudering van afgeplukte blare speel, aangesien die konsentrasie van die fenoliese verbindings sowel as die posisie van hidroksielgroepe op die ringstruktuur (orto > para > meta) die degradasie van chlorofil inhibeer of aktiveer.

Volgens Tabelle 13 en 16 en Figuur 10, blyk dit dat die chlorofillase-aktiwiteit tot 'n mindere of meerdere mate deur die verskillende totale flavonoïedekstrakte, asook deur die verskillende flavonoïedekomponente, geïnhibeer word. McClure (1975) het voorgestel dat die flavonoïede wat in die chloroplast voorkom, moontlik met elektronoordrag geassosieer is. Kefeli en Kutacek (1977) is van mening dat fotofosforilasie moontlik beïnvloed word deur die fenoliese verbindings wat in die chloroplast gelokaliseer is.

Volgens Stenlid (1963) veroorsaak flavonoïede, net soos sommige ander fenoliese verbindings, 'n ont koppeling van oksidatiewe fosforilasie in die mitochondriën. Die ont koppeling van oksidatiewe fosforilasie het 'n verhoogde respirasietem=

po tot gevolg (Varner, 1961). Boswell (1963) het bevind dat polifenoliese verbindings wel 'n stimulering van die respirasietempo tot gevolg het. Die inhibering van ATP-vorming, deur veral flavonoïedaglikone, het 'n verlaging in die fosfaat/suurstof verhouding tot gevolg (Stenlid, 1963; 1970).

Dit blyk uit Tabela 14 en 17 en Figuur 11 dat die totale flavonoïedekstrakte en chromatografies geskeide flavonoïedkomponente gedurende die eerste tien dae na pluk, die malaatdehidrogenase-aktiwiteit in die loofblare van *Protea neriifolia* geïnhibeer sowel as geaktiveer het. Volgens Figuur 11 het die totale flavonoïed ekstrakte die malaatdehidrogenase-aktiwiteit vanaf die dag direk na pluk tot op die vierde dag na pluk in 'n afnemende mate geïnhibeer. Vervolgens het 'n aktivering van die aktiwiteit vanaf die sesde dag na pluk tot op die negende dag na pluk voorgekom, waarna die flavonoïedekstrak die malaatdehidrogenase-aktiwiteit op die tiende dag na pluk geensins beïnvloed het nie. Op die eerste dag na pluk het komponent 10 die grootste aktivering van malaatdehidrogenase-aktiwiteit in *Protea neriifolia*-loofblare veroorsaak, gevolg deur komponente 6, 9, 13, 7, 8, 4, 11 en 1 (Tabel 17). Komponente 2, 12, 5 en 3 het inhibering van die malaatdehidrogenase-aktiwiteit tot gevolg gehad. Vervolgens het agt verskillende flavonoïedkomponente op die derde dag na pluk 'n inhiberende invloed op die malaatdehidrogenase-aktiwiteit gehad, naamlik komponente 4, 2, 3, 13, 11, 8, 1 en 12. Komponent 9 het die grootste aktivering tot gevolg gehad, gevolg deur komponente 5, 10, 7 en

6 respektiewelik. Op die vierde dag na pluk het tien verskillende komponente 'n inhiberende invloed op die malaatdehidrogenase-aktiwiteit gehad, naamlik komponente 9, 4, 3, 6, 11, 10, 5, 1 en 8. Slegs komponente 2, 7 en 12 het 'n verhoging in die malaatdehidrogenase-aktiwiteit tot gevolg gehad. Slegs vier komponente het op die sesde dag na pluk inhibering tot gevolg gehad, naamlik komponente 9, 13, 12 en 3, terwyl komponente 11, 7, 8, 1, 2, 4, 6, 10 en 5 respektiewelik 'n verhoging in die aktiwiteit veroorsaak het. Op die negende dag na pluk het slegs drie komponente inhibering van die malaatdehidrogenase-aktiwiteit tot gevolg gehad naamlik, komponente 9, 6 en 11 respektiewelik. Komponent 3 het die grootste aktivering veroorsaak, gevolg deur komponent 5, 13, 1, 8, 10, 12, 4, 7 en 2 respektiewelik.

Volgens Hiatt en Evans (1962) bestaan elke ensimatiesgekataliseerde proses uit verskeie gedeeltelike reaksies, naamlik die assosiasie van die ensiem met die substraat, die katalitiese proses en die dissosiasie van die ensiem vanaf die produk van die reaksie. Dit is wel moontlik dat die nie-spesifieke aktivering van die malaatdehidrogenase-aktiwiteit deur die totale flavonoïedekstrakte en verskillende flavonoïedkomponente, as gevolg van die invloed van hierdie fenoliese verbindings op die snelheid van die assosiasie en dissosiasie van die substraat en produk van die ensiem plaasvind. Volgens Pridham (1963) reageer hidrolases met substitusionele hidroksielgroepe wat in die fenoliese verbinding teenwoordig is. Hy meld ook dat geskikte fenoliese derivate as substrate vir esterases, sowel as lipases, en glikosidasies kan dien. De Swardt *et al.* (1967) het bevind dat 'n

verdunde leuko-antosianienfraksie die aktiwiteit van suiwer geëkstraheerde malaatdehidrogenase inhibeer.

Na aanleiding van die voorafgaande bespreking blyk dit dat die verbruining van *Protea neriifolia*-loofblare 'n komplekse verskynsel is, aangesien verskillende flavonoïedkomponente en flavonoïedekstrakte wat op verskillende dae na oes verkry is, metaboliese prosesse op verskillende wyses beïnvloed. Volgens die bevindings van Whitehead (1979) blyk dit dat lugoksidase van flavonoïede 'n groter bydrae as ensimatiese oksidasie tot die verbruining van *Protea neriifolia*-loofblare lewer. Verder blyk dit ook dat leuko-antosianiene, asook tanniene tot 'n mindere mate direk tot verbruining bydra. Die bevindings van hierdie studie bevestig hierdie waarnemings tot 'n groot mate, aangesien 'n verhoging in die %SVR soos wat hier waargeneem is moontlik kan veroorsaak dat flavonoïede met lug in aanraking kom, waarna oksidasie daarvan na bruingekleurde produkte vinniger sal plaasvind. Dit is ook duidelik dat verskillende flavonoïedkomponente en nie slegs leuko-antosianiene nie, 'n invloed op metaboliese prosesse in die sel het, wat moontlik verbruining versnel. Alhoewel vorige navorsers bevind het dat die verbruiningsverskynsels nie direk met fitogerontologie geassosieer word nie, is dit duidelik dat die voorkoms van tanniene in selle ultrastrukturele veranderinge teweegbring en sodoende verouderingsverval verhaas. Die verbruining van *Protea neriifolia*-loofblare is 'n komplekse proses en die interne en eksterne faktore wat tot die verbruining van die loofblare aanleiding gee, is ewe kompleks van aard.

4. OPSOMMING

Hierdie studie is onderneem ten einde die invloed van fenoliese verbindings op sommige ensieme en metaboliese prosesse in loofblare van *Protea neriifolia* R. Br., oor 'n periode van tien dae na pluk, vas te stel. Aangesien die verbruining van protealoofblare as 'n fisiologiese abnormaliteit beskou word, is daar gepoog om die verwantskap tussen die voorkoms van fenoliese verbindings en verouderingsverval vas te stel. As maatstaf vir die bepaling van interne veranderinge in die loofblare van *Protea neriifolia* R. Br. is kwantitatiewe veranderinge in die totale oplosbare proteïene, lipase-, chlorofillase-, malaatdehidrogenase-aktiwiteit, sowel as veranderinge in die chlorofilinhoud, differensiële deurlaatbaarheid en ultrastruktuur van selle bepaal. Veranderinge in die respirasietempo is as maatstaf vir die vasstelling van die graad van veroudering gebruik.

Die verouderende protealoofblare het 'n tipiese klimakteriese respirasiepatroon getoon. In die preklimakteriese fase het 'n redelike toename in die persentasie skynbare vrye ruimte (%SVR) voorgekom, waarna die %SVR afgeneem het en gelyktydig met die klimakteriese styging 'n onomkeerbare toename getoon het. Aangesien die totale oplosbare proteïenkonsentrasie 'n geringe toename gedurende die preklimakteriese fase getoon het, is dit moontlik dat die skynbare herstel van membraanpermeabiliteit as gevolg van tydelike sintetiese reaksies plaasvind wat die klimakteriese styging voorafgegaan het.

Dekompartementasie as gevolg van die degradasie van die tonoplas en omhullingsmembrane van verskeie organelle, het tydens die klimakterium voorgekom. Ultrastrukturele degradasie sowel as 'n omskakeling in metaboliese weë, wat biochemiese veranderinge te weeg bring, het moontlik tot die omkeerbare toename in SVR en respiratoriese klimakterium aanleiding gegee.

Alhoewel die totale oplosbare proteïenkonsentrasie ten tye van die respiratoriese styging 'n afname getoon het, is dit moontlik dat 'n toename in hidrolitiese aktiwiteite 'n toename in kataboliese teenoor anaboliese reaksies tot gevolg gehad het. Gedurende die veroudering van die loofblare van *Protea neriifolia* R. Br. het die lipase-aktiwiteit vinnig toegeneem. Alhoewel die chlorofil-inhoud van die loofblare onomkeerbaar afgeneem het, is die inisiële degradasie van chlorofil moontlik deur middel van chlorofillase bevorder waarna chlorofillase moontlik die sintese van chlorofil gedurende die na-klimakteriese fase bevorder het. Dit is dus wel moontlik dat twee verskillende ensieme verantwoordelik is vir die aktiwiteite wat waargeneem is. Die een ensiem kataliseer moontlik die hidrolise van chlorofil a terwyl die ander ensiem moontlik vir die transestrifikasie van metielchlorofil-liede a en fitol verantwoordelik is. Die afname in die malaatdehidrogenase-aktiwiteit is moontlik die gevolg van 'n skynbare oorskakeling in metaboliese weë wat tydens die veroudering van *Protea neriifolia*-loofblare ingetree het.

Tanniene, polimeriese verbindings wat verbruining in 'n verskeidenheid plantweefsels tot gevolg het, word hoofsaaklik in die selle van *Protea neriifolia*-loofblare in sitoplasmiese vakuole, plastiede en in membrane van vesikels wat in die vakuool voorgekom het, aangetref. Die sitoplasmiese vakuole het met die sentrale vakuool verenig waarna die tanniene in die sentrale vakuool vrygestel is. Aangesien tanniene moontlik in styselkorrels in chloroplaste voorgekom het, is dit moontlik dat daar 'n verband tussen die vermindering van die styselinhoud en vermeerdering van die tannieninhoud in die sel bestaan.

Flavonoïedekstrakte wat uit die loofblare van *Protea neriifolia* R. Br. berei is, het die chlorofillase-aktiwiteit deurentyd geïnhibeer terwyl dit die lipase- en malaatdehidrogenase-aktiwiteite onderling geïnhibeer sowel as geaktiveer het. Veranderinge in die R_f -waardes, chromatografiese kleurintensiteit, intensiteit van leuko-antosianienreaksies sowel as die verskillende inhiberings en of aktiverings reaksies van die verskillende flavonoïedkomponente, dui daarop dat die flavonoïed samestelling in die loofblare van *Protea neriifolia* R. Br. oor 'n tydperk van tien dae grootliks varieer.

Verbruining van protealoofblare is 'n komplekse proses waartydens verskillende flavonoïedkomponente metaboliese prosesse in die sel beïnvloed, wat moontlik verouderingsverval van die loofblare versnel. Alhoewel die verbruiningsverskynsel nie direk met fitogerontologie geassosieer word nie, is dit duidelik dat die voorkoms van tanniene in selle ultrastrukturele veranderinge teweegbring en sodoende verouderingsverval verhaas.

5. SUMMARY

The aim of this study was to determine the influence of phenolic compounds on selected enzymes and metabolic processes in the leaves of *Protea neriifolia* R. Br. over a period of 10 days after cutting the inflorescences. Although the phenolic browning of protea leaves is regarded as a physiological abnormality, an attempt has been made to determine the relationship between the appearance of phenolic compounds and senescence. As a criterium for the determination of internal changes in the foliage of *Protea neriifolia*, quantitative changes in the total soluble protein content, lipase, chlorophyllase, malate dehydrogenase activity, as well as changes in chlorophyll and differential permeability were determined. The respiration rate was used as a criterium for the determination of the degree of senescence.

Senescence of protea leaves was characterized by a typical climacteric sequence. A considerable increase in the percentage apparent free space (%AFS) occurred during the preclimacteric stage. This initial increase was followed by a decline. The final increase in permeability corresponded with the onset of the climacteric rise. Since there was a slight increase in the total soluble protein content during the preclimacteric stage, this temporary synthetic reaction which preceded the climacteric, probably caused the apparent recovery of the membrane permeability. Decompartmentation as a consequence of the degradation of the tonome-

plast and surrounding membranes of certain organelles occurred during the climacteric. Ultrastructural degradation as well as a changeover in metabolic pathways, which caused biochemical changes, may have been responsible for the increase in %AFS and respiration climacteric.

Although there was a decrease in the total soluble protein content during the climacteric rise, it is possible that an increase in hydrolytic activities may have been responsible for an increase in catabolic versus anabolic reactions. The activity of lipase increased during the senescence of the foliage of *Protea neriifolia*. Senescence of the foliage was characterized by an irreversible loss of chlorophyll, during which chlorophyllase seemed to have been responsible for the initial degradation of the chlorophyll. Subsequently the synthesis of chlorophyll was stimulated by chlorophyllase during the climacteric phase. It is possible that two different enzymes were responsible for this phenomenon. One enzyme probably catalysed the hydrolysis of chlorophyll a while the other enzyme probably catalysed the transesterification of methyl chlorophyllide and phytol. The decline in malate dehydrogenase activity probably resulted from an apparent changeover in metabolic pathways during the senescence of the foliage of *Protea neriifolia*.

Tannins, the polymeric compounds which cause browning of tissues of various plant species, were mainly found in cytoplasmic vacuoles, plastids and in membranes of vesicles which occurred in vacuoles of the cells of *P. neriifolia* leaves.

Tannin-containing cytoplasmic vacuoles fused with the central vacuole and deposited their contents in the central vacuole. It is possible that tannins occur in starch grains in chloroplasts. This indicates some relation between the dissolution of starch and the increase of tannins in cells.

Flavonoid containing extracts from the leaves of *Protea neriifolia* R. Br. inhibited the chlorophyllase activity while the lipase- and malate dehydrogenase activities were activated, as well as inhibited. Changes in the R_f -values, chromatographic colour intensities, intensity of leuco-anthocyanin reactions as well as the different activation and/or inhibition reactions of the different flavonoid compounds, suggest that the flavonoid composition of the leaves of *Protea neriifolia* changed considerably during the ten days after cutting.

Browning of protea leaves is a complex process during which flavonoid components affect metabolic processes, which probably accelerates senescence of the leaves. Although the browning phenomenon is not associated directly with phytogerontology, is it obvious that tannins in the cells cause ultrastructural changes which in turn results in accelerated senescence.

6. BEDANKINGS

Graag wens ek my opregte dank teenoor die volgende persone uit te spreek:

- † Dr. C.S. Whitehead vir sy positiewe leiding en belangstelling wat hierdie studie moontlik gemaak het.
- † Mnr. L. Tiedt van die Departement Mikrobiologie, P.U. vir C.H.O. vir sy hulp in verband met die transmissie elektromikroskopiese ondersoek.
- † My moeder en suster vir hul bemoediging en onderskraging.
- † Ek bedank ook graag alle persone wat behulpsaam was met die voltooiing van hierdie studie.

7. BIBLIOGRAFIE

- ANDERSON, J.W. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*, 7:1973-1988.
- ARDAO, CARMEN & VENNESLAND, B. 1960. Chlorophyllase activity of spinach chloroplastin. *Plant Physiol.*, 35:368-371.
- ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24:1-15.
- ASAHI, T. & NISHIMURA, M. 1973. Regulatory function of malate dehydrogenase isoenzymes in cotyledons of mung bean. *J. Biochem.*, 73:217-225.
- BACON, M.F. & HOLDON, MARGARET. 1970. Chlorophyllase of sugar-beet leaves. *Phytochemistry*, 9:115-125.
- BADDELY, SUSAN M. & HANSON, J.B. 1967. Uncoupling of energy-linked functions of corn mitochondria by linoleic acid and monomethyldecenylsuccinic acid. *Plant Physiol.*, 42:1702-1710.
- BADDELY, SUSAN M. & SIMON, E.W. 1969. An inhibitor of mitochondrial oxidations in extracts prepared from senescing leaves. *J. Exp. Bot.*, 20:94-99.
- BAIN, JOAN M. & MERCER, F.V. 1964. Organization resistance and the respiration climacteric. *Aust. J. Biol. Sci.*, 17:78-85.
- BANASZAK, L.J. & BRADSHAW, R.A. 1975. Malate dehydrogenases. (In Boyer, P.D. Ed. *The enzymes*. Vol. XI. Third edition. New York, Academic Press. p. 369-396).
- BAQUI, SALMA M., MATTOO, A.K. & MODI, V.V. 1974. Mitochondrial enzymes in mango fruit during ripening. *Phytochemistry*, 13:2049-2055.
- BARTON, R. 1966. Fine structure of mesophyll cells in senescing leaves of *Phaseolus*. *Planta*, 71:314-325.
- BATE-SMITH, E.C. & LERNER, N.H. 1954. Leuco-anthocyanins 2. Systematic distribution of leuco-anthocyanins in the leaves. *Biochem. J.*, 58:126-132.
- BAUR, J.R. & WORKMAN, M. 1964. Relationship between cell permeability and respiration in ripening banana fruit tissue. *Plant Physiol.*, 39:540-543.
- BAUR, P.S. & WALKINSHAW, C.H. 1974. Fine structure of tannin accumulations in callus cultures of *Pinus elliotti* (shash pine). *Can. J. Bot.*, 52:615-619.

- BEEVERS, H. 1974. Conceptual developments in metabolic control, 1924-1974. *Plant Physiol.*, 54:437-442.
- BEEVERS, L. 1976. Senescence. (In Bonner, J. & Varner, J.E. Eds. *Plant biochemistry*. Third edition. New York, Academic Press. p. 771-794).
- BENDALL, D.S. & GREGORY, R.P.F. 1963. Purification of phenol oxidases. (In Pridham, J.B. Ed. *Enzyme chemistry of phenolic compounds*. New York, Pergamon Press. p. 7-24).
- BENSON, A.A. 1964. Plant membrane lipids. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 15:1-16.
- BENSON, A.A. & JOKELA, ALICE T. 1976. Cell membranes. (In Bonner, J. & Varner, J.E. Eds. *Plant biochemistry*. Third edition. New York, Academic Press. p. 65-89).
- BENVENISTE, K. & MUNKRES, K.D. 1970. Cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenases of *Neurospora*. Regulatory and enzymic properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 220:161-177.
- BEN-YEHOSHUA, S. 1964. Respiration and ripening of discs of the avocado fruit. *Physiol. Plant.*, 17:71-80.
- BERJAK, PATRICIA. 1972. Lysosomal compartmentation: ultrastructural aspects of the origin, development, and function of vacuoles in root cells of *Lepidium sativum*. *Ann. Bot.*, 36:73-81.
- BERJAK, PATRICIA & VILLIERS, T.A. 1970. Ageing in plant embryos. I. The establishment of the sequence of development and senescence in the root cap during germination. *New Phytol.*, 69:929-938.
- BIALE, J.B. 1964. Growth, maturation and senescence in fruits. *Science*, 146:880-888.
- BIALE, J.B. & YOUNG, R.E. 1971. The avocado pear. (In Hulme, A.C. Ed. *The biochemistry of fruits and their products*. Vol. II. New York, Academic Press. p. 1-63).
- BLACKMAN, F.F. & PARIJA, P. 1928. Analytic studies in plant respiration. I. The respiration of a population of senescent ripening apples. *Proc. Roy. Soc. B.*, 103: 412-445.
- BÖGER, P. 1965. Chlorophyllase of *Chlorella vulgaris*. Beijerinck. *Phytochemistry*, 4:435-443.
- BOLLER, T. & KENDE, H. 1979. Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol.*, 63: 1123-1132.
- BONNER, W.D. 1957. Soluble oxidases and their functions. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 8:427-452.

- BORGSTRÖM, B. & ORY, R.L. 1970. Castor bean lipase: specificity of action. *Biochim. Biophys. Acta*, 212: 521-522.
- BOSWELL, J.G. 1963. Plant polyphenol oxidases and their relation to other oxidase systems in plants. (In Pridham, J.B. Ed. *Enzyme chemistry of phenolic compounds*. New York, Pergamon Press. p. 25-32).
- BRADY, C.J., O'CONNELL, P.B.H., SMYDZYK, J. & WADE, N.L. 1970a. Permeability, sugar accumulation, and respiration rate in ripening banana fruits. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23:1143-1152.
- BRADY, C.J., PALMER, J.K., O'CONNELL, P. B.H. & SMILLIE, R.M. 1970b. An increase in protein synthesis during ripening of the banana fruit. *Phytochemistry*, 9:1037-1047.
- BRANDTON, D. 1969. Membrane structure. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 20:209-238.
- BRETSCHER, M.S. 1973. Membrane structure: some general principles. *Science*, 181:622-629.
- BRIGGS, G.E. & ROBERTSON, R.N. 1957. Apparent free space. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 8:11-30.
- BURGER, L. 1976. Verwantskap tussen veranderinge in membraanpermeabiliteit asook verwante faktore en die respiratoriese klimakterium in verouderende angelierkroonblare. Ph.D.-Proefskrif. Randse Afrikaanse Universiteit, Johannesburg.
- BURGESS, N.A. 1963. Introductory address: enzymes associated with phenols. (In Pridham, J.B. Ed. *Enzyme chemistry of phenolic compounds*. New York, Pergamon Press. p. 1-6).
- BUTLER, R.D. 1967. The fine structure of senescing cotyledons of cucumber. *J. Exp. Bot.*, 18:535-543.
- BUTLER, R.D. & SIMON, E.W. 1971. Ultrastructural aspects of senescence in plants (In Strehler, B.L. Ed. *Advances in gerontological research*. Vol. 3. New York. Academic Press. p. 73-129).
- BUTLER, W.L. 1961. Chloroplast development: energy transfer and structure. *Arch. Biochem. Biophys.*, 92:287-295.
- CAPALDI, R.A. 1974. A dynamic model of cell membranes. *Sci. Amer.*, 130:27-30.
- CHAFE, S.C. & DURZAN, D.J. 1973. Tannin inclusions in cell suspension cultures of white spruce. *Planta*, 113:251-262.

- CHIBA, Y., AIGA, I., IDEMORI, M., SATOH, Y., MATSUSHITA, K. & SASA, T. 1967. Studies on chlorophyllase of *Chlorella protothecoides*. I. Enzymatic phytylation of methyl chlorophyllide. *Plant & Cell Physiol.*, 8: 623-635.
- CHOE, H.T. & THIMANN, K.V. 1975. The metabolism of oat leaves during senescence. III. The senescence of isolated chloroplasts. *Plant Physiol.*, 55:828-834.
- CLEMENTS, R.L. 1970. Protein patterns of fruits. (In Hulme, A.C. Ed. *The biochemistry of fruits and their products*. Vol. I. London, Academic Press. p. 159-177).
- CONSTANTOPOULOS, G. & KENYON, CHRISTINE N. 1968. Release of free fatty acids and loss of Hill activity by aging spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, 43:531-536.
- COOK, G.M.W. 1971. Membrane structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 22:97-120.
- CREASY, L.L. & SWAIN, T. 1965. Structure of condensed tannins. *Nature*, 208:151-153.
- DANIELLI, J.F. & DAVSON, H. 1956. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J. Cell. Physiol.*, 5:495-507.
- DAVIDSON, S.J. & SONG, SHEILA W. 1975. A thermally induced alteration in lysosome membranes: salt permeability at 0 and 37°C. *Biochim. Biophys. Acta*, 375:274-285.
- DE JONG, D.W. & OLSON, A.C. 1972. Electrophoretic migration and redox behavior of malate dehydrogenases from cell suspension cultures of tobacco. *Biochim. Biophys. Acta*, 276:53-62.
- DEMEL, R.A., VAN KESSEL, W.S.M.G. & VAN DEENEN, L.L.M. 1972. The properties of polyunsaturated lecithins in monolayers and liposomes and the interactions of these lecithins with cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*, 266:26-40.
- DESNUELLE, P. 1972. The lipases. (In Boyer, P.D. Ed. *The enzymes*. Vol. VII. Third edition. New York, Academic Press. p. 575-616).
- DESNUELLE, P. & SAVARY, P. 1963. Specificities of lipases. *J. Lipid. Res.*, 46:369-384.
- DE SWARDT, G.H. 1974. Verouderingsverval van plantweefsels. Publikasiereeks van die Randse Afrikaanse Universiteit A66. Johannesburg. 24p.
- DE SWARDT, G.H. 1977. Metodes om verbruining van proteablare te keer. *Landbouweekblad*, 30:30-33.

- DE SWARDT, G.H. & DUVENAGE, A.J. 1971. Malaatdehidrogenase in die rypwordende tamatie. *Agroplanta*, 3:69-72.
- DE SWARDT, G.H., MAXIE, E.C. & SINGLETON, V.L. 1967. Some relationships between enzyme activities and phenolic components in banana fruit tissues. *S. Afr. J. Agric. Sci.*, 10:641-650.
- DE SWARDT, G.H. & ROUSSEAU, G.G. 1973. Relationships between changes in membrane permeability and the respiration climacteric in pericarp tissue of tomatoes. *Planta*, 112:83-86.
- DE SWARDT, G.H., SWANEPOEL, J.H. & DUVENHAGE, A.J. 1973. Relationships between changes in ribosomal RNA and total protein synthesis, and the respiration climacteric in pericarp tissues of tomatoes. *Z. Pflanzenphysiol.*, 70:358-363.
- DEVLIN, R.M. 1975. Plant physiology. Third Edition. London, D. Von Nostrand Company. 600p.
- DILLEY, D.R. 1970. Enzymes. (In Hulme, A.C. Ed. The biochemistry of fruits and their products. Vol. I. London, Academic Press. p. 179-207).
- DODGE, J.D. 1970. Changes in chloroplast fine structure during the autumnal senescence of *Betula* leaves. *Ann. Bot.*, 34:817-824.
- DOVE, L.D. 1971. Short term responses and chemical control of ribonuclease activity in tomato leaflets. *New Phytol.*, 70:397-401.
- DOWNTON, JOY & SLATYER, R.O. 1971. Variation in levels of some leaf enzymes. *Planta*, 96:1-12.
- DRAPER, S.R. 1969. Lipid changes in senescing cucumber cotyledons. *Phytochemistry*, 8:1641-1647.
- DRAPER, S.R. & SIMON, E.W. 1971. Changes in free fatty-acid content and respiratory activity during the senescence of cotyledons of cucumber. *J. Exp. Bot.*, 22:481-486.
- DURKIN, D. 1967. The role of tannins in senescence of the cut rose flower. *Proc. 64th Ann. Meet. Amer. Soc. Hort. Sci.*
- ECHLIN, P. 1964. Intra-cytoplasmic membranous inclusions in the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *Arch. Mikrobiol.*, 49:267-274.
- EILAM, Y. 1965. Permeability changes in senescing tissue. *J. Exp. Bot.*, 16:614-627.
- ELSWORTH, J.F. & MARTIN, K.R. 1971. Flavonoids of the Proteaceae, Part I. A chemical contribution to studies on the evolutionary relationships in the South African Proteoideae. *J. S. Afr. Bot.*, 37:100-212.

- ELSWORTH, R.K., TSUK, R.M. & PIERRE, S.L.A. 1976. Studies on chlorophyllase. IV. Attribution of hydrolytic and esterifying "chlorophyllase" activities observed *in vitro* to two enzymes. *Photosynthetica*, 10:312-323.
- ESAU, K. Plant Anatomy. Second Edition. New York, Wiley. 1965. 767p.
- EVELYN, S.R., MAIHS, E.A. & ROUX, D.G. 1960. Condensed tannins. 5. The oxidative condensation of (+)-catechin. *Biochem. J.*, 76:23-27.
- FAUST, M., CHASE, B.R. & MASSEY, L.M. 1967. The effect of ionizing radiation and dephenylamine treatment of glucose metabolism and membrane permeability of Cartland apples. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 90: 25-32.
- FERGUSON, CLARE H.R. & SIMON, E.W. 1973. Membrane lipids in senescing green tissues. *J. Exp. Bot.*, 24:307-316.
- FLETSCHER, R.A. & OSBORNE, DAPHNE J. 1966. Gibberellin, as a regulator of protein and ribonucleic acid synthesis during senescence in leaf cells of *Taraxum officinale*. *Can. J. Bot.*, 44:739-745.
- FREDERICK, SUE E., NEWCOMB, E.H., VIGIL, E.L. & WERGIN, W.P. 1968. Fine-structural characterization of plant microbodies. *Planta*, 81:229-252.
- FRENKEL, C., KLEIN, I. & DILLEY, D.R. 1968. Protein synthesis in relation to ripening of pome fruits. *Plant Physiol.*, 43:1146-1153.
- GALLIARD, T. 1968. Aspects of lipid metabolism in higher plants II. The identification and quantitative analysis of lipids from the pulp of pre- and post-climacteric apples. *Phytochemistry*, 7:1915-1922.
- GALLIARD, T. 1975. Degredation of plant lipids by hydrolytic and oxidative enzymes. (In Galliard, T. & Mercer, E.I. Eds. Recent advances in the chemistry and biochemistry of plant lipids. Academic Press, London. p. 319-357).
- GIBBS, R.D. 1974. Chemotaxonomy of flowering plants. Vol. 1. London, McGill-Queen's University Press. 680p.
- GODDARD, D.R. & MEEUSE, B.J.D. 1950. Respiration of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1:207-232.
- GOLAN, A., KAHN, V. & SADOVSKI, A.Y. 1977. Relationship between polyphenols and browning in avocado mesocarp. Comparison between the Fuerte and Lerman cultivars. *J. Agr. Food Chem.*, 25:1253-1260.
- GOLDSTEIN, JUDITH L. & SWAIN, T. 1965. The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry*, 4:185-192.

- ELSWORTH, R.K., TSUK, R.M. & PIERRE, S.L.A. 1976. Studies on chlorophyllase. IV. Attribution of hydrolytic and esterifying "chlorophyllase" activities observed *in vitro* to two enzymes. *Photosynthetica*, 10:312-323.
- ESAU, K. 1965. Plant Anatomy. Second Edition. New York, Wiley. 767p.
- EVELYN, S.R., MAIHS, E.A. & ROUX, D.G. 1960. Condensed tannins. 5. The oxidative condensation of (+)-catechin. *Biochem. J.*, 76:23-27.
- FAUST, M., CHASE, B.R. & MASSEY, L.M. 1967. The effect of ionizing radiation and dephenylamine treatment of glucose metabolism and membrane permeability of Cartland apples. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 90: 25-32.
- FERGUSON, CLARE H.R. & SIMON, E.W. 1973. Membrane lipids in senescing green tissues. *J. Exp. Bot.*, 24:307-316.
- FLETSCHER, R.A. & OSBORNE, DAPHNE J. 1966. Gibberellin, as a regulator of protein and ribonucleic acid synthesis during senescence in leaf cells of *Taraxum officinale*. *Can. J. Bot.*, 44:739-745.
- FREDERICK, SUE E., NEWCOMB, E.H., VIGIL, E.L. & WERGIN, W.P. 1968. Fine-structural characterization of plant microbodies. *Planta*, 81:229-252.
- FRENKEL, C., KLEIN, I. & DILLEY, D.R. 1968. Protein synthesis in relation to ripening of pome fruits. *Plant Physiol.*, 43:1146-1153.
- GALLIARD, T. 1968. Aspects of lipid metabolism in higher plants II. The identification and quantitative analysis of lipids from the pulp of pre- and post-climacteric apples. *Phytochemistry*, 7:1915-1922.
- GALLIARD, T. 1975. Degredation of plant lipids by hydrolytic and oxidative enzymes. (In Galliard, T. & Mercer, E.I. Eds. Recent advances in the chemistry and biochemistry of plant lipids. Academic Press, London. p. 319-357).
- GIBBS, R.D. 1974. Chemotaxonomy of flowering plants. Vol. 1. London, McGill-Queen's University Press. 680p.
- GODDARD, D.R. & MEEUSE, B.J.D. 1950. Respiration of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 1:207-232.
- GOLAN, A., KAHN, V. & SADOVSKI, A.Y. 1977. Relationship between polyphenols and browning in avocado mesocarp. Comparison between the Fuerte and Lerman cultivars. *J. Agr. Food Chem.*, 25:1253-1260.
- GOLDSTEIN, JUDITH L. & SWAIN, T. 1965. The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry*, 4:185-192.

- HILLIS, W.E. 1956. Leuco-anthocyanins as the possible precursors of extractives in woody tissues. *Amer. J. Biol. Sci.*, 9:263-280.
- HITCHCOCK, C. & NICHOLS, B.W. 1971. Plant lipid biochemistry. New York, Academic Press. 387p.
- HOLDEN, MARGARET. 1961. The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase. *Biochem. J.*, 78:359-364.
- HOLDEN, MARGARET. 1967. Chlorophylls. (In Goodwin, T.W. Ed. Chemistry and biochemistry of plant pigments. Vol. II. New York, Academic Press. p. 1-37).
- HUFFAKER, R.C. & PETERSON, L.W. 1974. Protein turnover in plants and possible means of its regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 25:363-392.
- HULME, A.C. 1954. Studies in the nitrogen metabolism of apple fruits. The climacteric rise in respiration in relation to changes in the equilibrium between protein synthesis and breakdown. *J. Exp. Bot.*, 5:159-172.
- HULME, A.C. 1972. The proteins of fruits: their involvements as enzymes in ripening. *J. Food Technol.*, 7:343-371.
- HULME, A.C. & JONES, J.D. 1963. Tannin inhibition of plant mitochondria. (In Pridham, J.B. Enzyme chemistry of phenolic compounds. London, Pergamon Press. p. 97-120).
- HULME, A.C., JONES, J.D. & WOOLTORTON, L.S.C. 1963. The respiration climacteric in apple fruits. *Proc. Roy. Soc. B.*, 158:514-535.
- HULME, A.C., JONES, J.D. & WOOLTORTON, L.S.C. 1965. The respiration climacteric in apple fruits. Biochemical changes occurring during the development of the climacteric in fruit on the tree. *New Phytol.*, 64:152-157.
- HULME, A.C., RHODES, M.J.C., GALLIARD, T. & WOOLTORTON, L.S.C. 1968. Metabolic changes in excised fruit tissue. IV. Changes occurring in discs of apple peel during the development of the respiration climacteric. *Plant Physiol.*, 43:1154-1161.
- HULME, A.C., RHODES, M.J.C. & WOOLTORTON, L.S.C. 1967. The respiration climacteric in apple fruits: some possible regulatory mechanism. *Phytochemistry*, 6:1343-1351.
- HURKMAN, W.J. 1979. Ultrastructural changes of chloroplasts in attached and detached, aging primary wheat leaves. *Amer. J. Bot.*, 66:64-70.
- JANSEN, C.J. 1977. Beheermaatreëls vir die voorkoming van bruinwording van loofblare in *Protea neriifolia*. M.Sc.-Verhandeling. Randse Afrikaanse Universiteit, Johannesburg.

- KALRA, SUSHIL K. & BROOKS, J.L. 1973. Lipids of ripening tomato fruit and its mitochondrial fraction. *Phytochemistry*, 12:487-492.
- KARANOV, E.N. 1972. Effect of some indole and phenolic compounds on the ageing of detached leaves. (In Kaldewey, H. & Vardar, Y. Eds. Hormonal regulation in plant growth and development. Weinheim, Verlag Chemie. p. 467-472).
- KATES, M. 1970. Plant phospholipids and glycolipids. (In Paoletti, R. & Kritchevsky, D. Eds. Advances in lipid research. Vol. 8. London, Academic Press. p. 225-265).
- KEFELI, V.I. & KUTACEK, M. 1977. Phenolic substances and their possible role in plant growth regulation. (In Pilet, P.E. Ed. Plant growth regulation. New York, Springer-Verlag. p. 181-188).
- KENDE, H. 1971. The cytokinins. *Int. Rev. Cytol.*, 31: 301-338.
- KIDD, F. & WEST, C. 1930. Physiology of fruit. I. Changes in the respiratory activity of apples during their senescence at different temperatures. *Proc. Roy. Soc. B.*, 106:93-109.
- KLEIN, A.O. & VISHNIAC, W. 1961. Activity and partial purification of chlorophyllase in aqueous systems. *J. Biol. Chem.*, 236:2544-2547.
- KONZE, J.R. & ELSTNER, E.F. 1978. Ethane and ethylene formation by mitochondria as indication of aerobic lipid degradation in response to wounding of plant tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 528:213-221.
- KORN, E.D. 1966. Structure of biological membranes. *Science*, 153:1491-1498.
- LATIES, G.G. 1962. Controlling influence of thickness on development & type of respiratory activity in potato slices. *Plant Physiol.*, 37:679-690.
- LATIES, G.G. 1964. The onset of tricarboxylic acid cycle activity with aging in potato slices. *Plant Physiol.*, 39:654-663.
- LEHNINGER, A.L. 1978. Biochemistry. Second Edition. New York, Worth Publishers. Inc. 1104p.
- LEWINGTON, R.J., TALBOT, MARY & SIMON, E.W. 1967. The yellowing of attached and detached cucumber cotyledons. *J. Exp. Bot.*, 18:526-534.
- LICHTENTHALER, H.K. & PARK, R. B. 1963. Chemical composition of chloroplast lamellae from spinach. *Nature*, 198:1070-1072.

- LIEBERMAN, M. & BIALE, J.B. 1956. Oxidative phosphorylation by sweet potato mitochondria and its inhibition by polyphenols. *Plant Physiol.*, 31:420-424.
- LODISH, H.F. & ROTHMAN, J.E. 1979. The assembly of cell membranes. *Sci. Amer.*, 240:38-53.
- LOOMIS, W.D. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. (In Fletscher, S. & Packer, L. Eds. *Methods of enzymology*. Vol. 31. New York, Academic Press. p. 528-544).
- LOOMIS, W.D. & BATTAILE, J. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*, 5:423-438.
- LOONEY, N.E. & PATTERSON, M.E. 1967. Chlorophyllase activity in apples and bananas during the climacteric phase. *Nature*, 214:1245-1246.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- MACHLIS, L. & TORREY, J.G. 1956. *Plants in action. A laboratory manual of plant physiology*. San Francisco, Freeman & Company. 282p.
- MACLEAN, R.C. & IVIMEY-COOK, W.R. 1858. *Textbook of theoretical botany*. Vol. I. London, Longmans, Green & Company. 1958p.
- MARINOS, N.G. 1962. Studies on the submicroscopic aspects of mineral deficiencies. I. Calcium deficiency in the shoot apex of barley. *Amer. J. Bot.*, 49, 834-841.
- MARTIN, C. & THIMANN, K.V. 1972. The role of protein synthesis in the senescence of leaves. I. The formation of protease. *Plant Physiol.*, 49:64-71.
- MATILE, Ph. 1975. The lytic compartment of plant cells. *Cell biology monographs. Continuation of protoplasmatologia*. Vol. I. New York, Springer-Verlag. 183p.
- MATILE, Ph. 1978. Biochemistry and function of vacuoles. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 29:193-213.
- MATILE, Ph. & MOOR, H. 1968. Vacuolation: origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells. *Planta*, 80:159-175.
- MAYER, A.M. 1966. Catechol oxidase: enzymic liberation from sugar beet chloroplasts. *Phytochemistry*, 5: 1297-1301.
- MAYER, A.M. & FRIEND, J. 1960. Properties and solubility of phenolase in isolated chloroplasts. *Nature*, 185:464-465.

- McCLURE, J.W. 1975. Physiology and function of flavonoids (In Harborne, J.B., Mabry, T.J. & Mabry, Helga. Eds. The flavonoids. London, Chapman & Hall. p. 970-1055).
- McFEETERS, R.F., CHICHESTER, C.O. & WHITAKER, J.R. 1971. Purification and properties of chlorophyllase from *Ailanthus altissima* (tree-of-heaven). *Plant Physiol.*, 47:609-618.
- McGLASSON, W.B., PALMER, J.K., VENDRELL, M. & BRADY, C.J. 1971. Metabolic studies with banana fruit slices. II. Effects of inhibitors on respiration, ethylene production and ripening. *Aust. J. Biol. Sci.*, 24: 1103-1114.
- McKERSIE, B.D., LEPOCK, J.R., KRUV, J. & THOMPSON, J.E. 1978. The effects of cotyledon senescence on the composition and physical properties of membrane lipid. *Biochim. Biophys. Acta*, 508:197-212.
- McKERSIE, B.D. & THOMPSON, J.E. 1977. Lipid crystallization in senescent membranes from cotyledons. *Plant Physiol.*, 59:803-807.
- MEHLER, A.H., KORNBERG, A., GRISOLIA, S. & OCHOA, S. 1948. The enzymatic mechanism of oxidation-reductions between malate or isocitrate and pyruvate. *J. Biol. Chem.*, 174:961-977.
- MERCER, F. 1960. The submicroscopic structure of the cell. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 11:1-24.
- MEYER, B.S., ANDERSON, D.B., BOHNING, R.H. & FRATTIANNE, D.G. 1973. Introduction to plant physiology. Second Edition. London, D. Van Nostrand Company. 565p.
- MOLL, W.A.W. & DE WITT, BARBARA. 1979. Chlorophyllase activity in plastid membranes of bean leaves grown in darkness and in (intermittent) light. *Photosynthetic*, 13:146-154.
- MOLL, W.A.W., DE WITT, BARBARA & LUTTER, R. 1978. Chlorophyllase activity in developing leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 139:79-83.
- MORRÉ, D.J. 1975. Membrane biogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 26:441-481.
- MULDER, P.W.A. 1977. Primêre meganismes betrokke by die bruinwording van loofblare in *Protea neriifolia*. M.Sc.-Verhandeling. Randse Afrikaanse Universiteit, Johannesburg.
- NEAL, G.E. & HULME, A.C. 1958. The organic acid metabolism of Bramley's seedling apple peel. *J. Exp. Bot.*, 9: 142-157.

- NICHOLS, R. & HO, L. C. 1975. Effects of ethylene and sucrose on translocation of dry matter and ^{14}C -sucrose in the cut flower of the glasshouse carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Ann. Bot.*, 39:287-296.
- NISHIMURA, M. & BEEVERS, H. 1978. Hydrolases in vacuoles from castor bean endosperm. *Plant Physiol.*, 62: 44-48.
- ÖPIK, H. 1965. Respiration rate, mitochondrial activity and mitochondrial structure in the cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. during germination. *J. Exp. Bot.*, 16:667-682.
- OSBORNE, DAPHNE J. 1962. Effect of kinetin on protein and nucleic acid metabolism in *Xanthium* leaves during senescence. *Plant Physiol.*, 37:595-602.
- PACKER, L., DEAMER, D.W. & HEATH, R.L. 1967. Regulation and deterioration of structure in membranes. (In Strehler, B.L. Ed. *Advances in gerontological research*. Vol. 2. New York, Academic Press. p. 77-120).
- PAPAHADJOPOULOS, D., JACOBSON, K., NIR, S. & ISAC, T. 1973. Phase transition in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*, 311:330-348.
- PARISH, R.W. 1972. The intracellular location of phenol oxidases and peroxidases in stems of spinach beet (*Beta vulgaris*). *Z. Pflanzenphysiol.*, 66:176-188.
- PARISH, R.W. 1975. The lysosome-concept in plants. I. Peroxidases associated with subcellular and wall fractions in maize root tips. Implications for vacuole development. *Planta*, 123: 1-13.
- PASSAM, H.C. & BIRD, M.C. 1978. The respiratory activity of honeydew melons during the climacteric. *J. Exp. Bot.*, 29: 325-333.
- PHILLIPS, D.R. & HORTON, R.F. & FLETSCHER, R.A. 1969. Ribonuclease and chlorophyllase activities in senescing leaves. *Physiol. Plant.*, 22:1050-1054.
- PIERPOINT, W.S. 1966. The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reaction of the quinone produced. *Biochim. J.*, 98:597-580.
- PITT, D. & GALPIN, MARY. 1971. Increase in ribonuclease activity following mechanical damage to leaf and tuber tissues of *Solanum tuberosum* L. *Planta*, 101:317-332.
- PLATONOVA, T.A., SAL'KOVA, E.G. & METLITSKII, L.V. 1974. Ultrastructural changes in cells of apple pericarp during ripening and aging. *Soviet Plant Physiol.*, 21:758-762.

- POOVAIAH, B.W. & LEOPOLD, A.C. 1973. Deferral of leaf senescence with calcium. *Plant Physiol.*, 52:236-239.
- PRIDHAM, J.B. 1963. Hydrolytic enzymes. (In Pridham, J.B. Ed. *Enzyme chemistry of phenolic compounds*. London, Pergamon Press. p. 73-80).
- RAISON, J.K., LYONS, J.M., MEHLHORN, R.J. & KEITH, A.D. 1971. Temperature-induced phase changes in mitochondrial membranes detected by spin labeling. *J. Biol. Chem.*, 246:4036-4040.
- REID, J.S.G. & MEIER, H. 1972. The function of the aleurone layer during galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.) and lucerne (*Medicago sativa* L.): a correlative biochemical and ultrastructural study. *Planta*, 106:44-60.
- REID, M.S. & PRATT, H.K. 1970. Ethylene and the respiration climacteric. *Nature*, 226:976-977.
- RHODES, M.J.C. 1977. The extraction and purification of enzymes from plant tissues. (In Smith, H. Ed. *Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants*. New York, Academic Press. p. 245-269).
- RHODES, M.J.C. & WOOLTORTON, L.S.C. 1967. The respiration climacteric in apple fruits. The action of hydrolytic enzymes in peel tissue during the climacteric period in fruit detached from the tree. *Phytochemistry*, 6:1-12.
- RIBEREAU-GAYON, P. 1972. *Plant phenolics*. Edinburgh, Oliver & Boyd. 254p.
- RICHMOND, A. & BIALE, J.B. 1966. Protein and nucleic acid metabolism in fruits: I. Studies of amino acid incorporation during the climacteric rise in respiration of the avocado. *Plant Physiol.*, 41:1247-1253.
- RICHMOND, A.E. & LANG, A. 1957. Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science*, 125:650-651.
- ROBINSON, T. 1969. *The organic constituents of higher plants*. Second Edition. Mineapolis, Burgess Publishing Company. 319p.
- ROGERS, N. 1973. An historical and critical review of postharvest physiology research on cut flowers. *HortScience*, 8:189-194.
- ROSENBERG, A. 1967. Galactosyl diglycerides: their possible function in *Euglena* chloroplasts. *Science*, 157:1191-1196.

- ROUSSEAU, G.G., HAASBROEK, F.J. & VISSER, C.J. 1972. Bitter pit in apples: the effect of calcium on permeability changes in apple fruit tissue. *Agro-plantae*, 4:73-80.
- ROUX, D.G. & EVELYN, S.R. 1958. Condensed tannins. 2. Biogenesis of condensed tannins based on leucoanthocyanins. *Biochem. J.*, 70:344-349.
- ROUX, D.G. & EVELYN, S.R. 1960. Condensed tannins. 4. The distribution and deposition of tannins in the heartwoods of *Acacia mollissima* and *Schinopsis* spp. *Biochem. J.*, 76:17-27.
- ROWAN, K.S., PRATT, H.K. & ROBERTSON, R.N. 1958. The relationship of high-energy phosphate content, protein synthesis, and the climacteric rise in the respiration of ripening avocado and tomato fruits. *Aust. J. Biol. Sci.*, 11:329-335.
- RUBIN, B.A. & GUDALINA, E.G. 1953. Dehydrogenation activity of apple tissue during the development of the fruit. (In Russies). *Dokl. Akad. Nauk SSSR.*, 93:127-130.
- RUBIN, B.A. & SAL'KOVA, E.G. 1955. Dehydrogenases of apple tissue. (In Russies). *Dokl. Akad. Nauk SSSR.*, 102:571-573.
- RUIS, H. 1972. Particulate and soluble forms of o-diphenol oxidase from potato tubers. *Phytochemistry*, 11:53-58.
- SABATER, B. & RODRIGUEZ, M.T. 1978. Control of chlorophyll degradation in detached leaves of barley and oat through effect of kinetin on chlorophyllase levels. *Physiol. Plant.*, 43:274-276.
- SACHER, J.A. 1959. Studies on auxin-membrane permeability relations in fruit and leaf tissues. *Plant Physiol.*, 34:365-372.
- SACHER, J.A. 1962. Relations between changes in membrane permeability and the climacteric in banana and avocado. *Nature*, 195:577-578.
- SACHER, J.A. 1966. Permeability characteristics and amino acid incorporation during senescence (ripening) of banana tissue. *Plant Physiol.*, 41:701-708.
- SACHER, J.A. 1973. Senescence and postharvest physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 24:197-224.
- SALISBURY, J.B. & ROSS, C. 1969. Plant physiology. California, Wadsworth Publishing Company. 747p.
- SATŌ, M. 1967. Metabolism of phenolic substances by the chloroplasts. III. Phenolase as an enzyme concerning the formation of esculetin. *Phytochemistry*, 6:1363-1373.

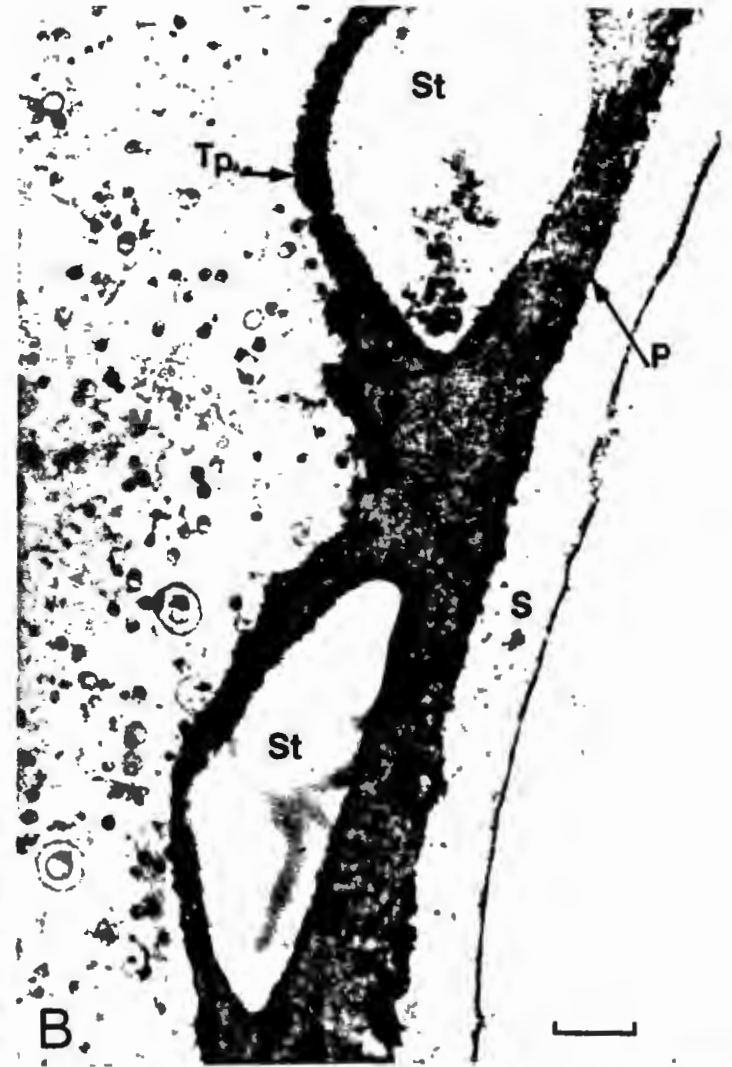
- SAUNDERS, J.A. & McCLURE, J.W. 1972. The localization of flavonoids and phenolic enzymes in barley plastids. *Amer. J. Bot.*, 59:673 (Abstr.).
- SCANDALIOS, J.G. 1974. Isozymes in development and differentiation. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 25:225-258.
- SHAW, M., BHATTACHARYA, P.K. & QUICK, W.A. 1965. Chlorophyll, protein and nucleic acid levels in detached, senescing wheat leaves. *Can. J. Bot.*, 43:739-746.
- SHAW, M. & MANOCHA, M.S. 1965. Fine structure in detached, senescing wheat leaves. *Can. J. Bot.*, 43:747-755.
- SHEEN, S.J. 1969. The distribution of polyphenols, chlorogenic acid oxidase and peroxidase in different plant parts of tobacco, *Nicotiana tabacum* L. *Phytochemistry*, 8:1839-1847.
- SHIMIZU, S. & TAMAKI, E. 1963. Chlorophyllase of tobacco plants. II. Enzymic phytylation of chlorophyllide and pheophorbide *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 102:152-158.
- SIEGENTHALER, P. 1972. Aging of the photosynthetic apparatus. IV. Similarity between the effects of aging and unsaturated fatty acids on isolated spinach chloroplasts as expressed by volume changes. *Biochim. Biophys. Acta*, 275:182-191.
- SIMON, E.W. & CHAPMAN, J.A. 1961. The development of mitochondria in *Arum spadix*. *J. Exp. Bot.*, 12:414-420.
- SINGER, S.J. & NICOLSON, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720-731.
- SINGER, T.P. & HOFSTEE, B.H.J. 1948. Studies on wheat germ lipase. II. Kinetics. *Arch. Biochem. Biophys.*, 18:245-259.
- SMITH, P.M. 1976. The chemotaxonomy of plants. London, Edward Arnold Publishers. 313p.
- SODEK, L. & WRIGHT, S.T.C. 1969. The effect of kinetin on ribonuclease, acid phosphatase, lipase and esterase levels in detached wheat leaves. *Phytochemistry*, 8:1629-1640.
- SPENCER, M. 1965. Fruit ripening. (In Bonner, J. & Varner, J.E. Eds. *Plant biochemistry*. New York, Academic Press. p. 793-825).
- SPICHIGER, J.U. 1969. Isolation und Charakterisierung von Sphärosomen und Glyoxisomen aus Tabakendosperm. *Planta*, 89, 56-57.
- SPURR, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 26:31-43.

- STENLID, G. 1963. The effects of flavonoid compounds on oxidative phosphorylation and on the enzymatic destruction of indoleacetic acid. *Physiol. Plant.*, 16:110-120.
- STENLID, G. 1970. Flavonoids as inhibitors of the formation of adenosine triphosphate in plant mitochondria. *Phytochemistry*, 9:2251-2256.
- STOBART, A.K. & THOMAS, D.R. 1968. Chlorophyllase in tissue cultures of *Kalanchoë crenata*. *Phytochemistry*, 7:1963-1972.
- SWAIN, T. 1960. Some interrelationships between leuco-anthocyanins and lignin in plants. (In Pridham, J.B. Ed. *Phenolics in plants in health and disease*. London, Pergamon Press, p. 45-55).
- SWAIN, T. 1965. The tannins. (In Bonner, J. & Varner, J.E. Eds. *Plant biochemistry*. New York, Academic Press. p. 552-580).
- SWAIN, T. & HILLIS, W.E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agr.*, 10:63-68.
- TAMAI, H., SHIOI, Y. & SASA, T. 1979. Studies on chlorophyllase of *Chlorella protothecoides*. IV. Some properties of the purified enzyme: *Plant & Cell Physiol.*, 20:1141-1145.
- TAVENER, R.J.A. & LAIDMAN, D.L. 1972a. The induction of lipase activity in the germinating wheat grain. *Phytochemistry*, 11:989-997.
- TAVENER, R.J.A. & LAIDMAN, D.L. 1972b. The induction of triglyceride metabolism in the germinating wheat grain. *Phytochemistry*, 11:981-987.
- TERPSTRA, W. 1976. Chlorophyllase and lamellar structure in *Phaeodactylum tricorutum*. III. Situation of chlorophyllase in pigmented membranes. *Z. Pflanzenphysiol.*, 80:117-188.
- TERPSTRA, W. 1978. Chlorophyllase in *Phaeodactylum tricorutum* photosynthetic membranes. Extractability, small-scale purification and molecular weight determination by SDS-gel-electrophoresis. *Physiol. Plant.*, 44:329-334.
- TERPSTRA, W. & GOEDHEER, J.C. 1975. Chlorophyllase and lamellar structure in *Phaeodactylum tricorutum*. I. Chlorophyll → chlorophyllide conversion within the lamellae. *Z. Pflanzenphysiol.*, 75:118-130.
- TETLEY, R.M. & THIMANN, K.V. 1974. The metabolism of oat leaves during senescence. I. Respiration, carbohydrate metabolism, and the action of cytokinins. *Plant Physiol.*, 54:294-303.

- THERON, J.J. 1979. Die ultrastruktuur van die sel. Massachusetts, Butterworth. 243p.
- THOMAS, H. & STODDART, J.L. 1980. Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31:83-111.
- THOMAS, M., RANSON, S.L. & RICHARDSON, J.A. 1973. Plant physiology. London, Longman, Green and Co. 1062p.
- TOLBERT, N.E. 1971. Microbodies-peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 22:45-74.
- ULRICH, R. 1958. Postharvest physiology of fruits. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 9:385-416.
- VAN STEVENINCK, R.F.M. 1965. The significance of calcium on the apparent permeability of cell membranes and the effects of substitution with other divalent ions. *Physiol. Plant.*, 18:54-69.
- VAN SUMERE, C.F., ALBRECHT, J., DEDONDER, A., DE POOTER, H. & PE, I. 1975. (In Harborne, J.B. & Van Sumere, C.F. Eds. The chemistry and biochemistry of plant proteins. New York, Academic Press. p. 211-264).
- VARNER, J.E. 1961. Biochemistry of senescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 12:245-264.
- VARNER, J.E. 1971. The control of enzyme formation in plants. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 25:197-207.
- VAUTAZ, L., BRANDENBERGER, H. & EGLI, R.H. 1959. Plant phenolics. I. Separation of tea leaf polyphenols by cellulose column chromatography. *J. Chromatogr.*, 2: 173-187.
- VOLK, R., HAREL, E., MAYER, A.M. & GAN-ZVI, E. 1977. Catechol oxidase in tissue culture of apple fruit. *J. Exp. Bot.*, 28:820-830.
- VOLK, R., HAREL, E., MAYER, A.M. & GAN-ZVI, E. 1978. Catechol oxidase in suspension cultures of apple fruit - the effects of growth regulators. *J. Exp. Bot.*, 29: 1099-1109.
- WALK, R.A. & HOCK, B. 1977. Glyoxysomal malate dehydrogenase of watermelon cotyledons: *de novo* synthesis on cytoplasmic ribosomes. *Planta*, 134:277-285.
- WALKER, J.R.L. 1975. The biology of plant phenolics. London, Edward Arnold Publishers. 57p.
- WALKER, J.R.L. & HULME, A.C. 1966. Studies on the enzymic browning of apples - III. Purification of apple phenolase. *Phytochemistry*, 5:259-262.
- WALKER, N.A. 1976. The structure of biological membranes. (In Lüttge, U. & Pitman, M.G. Transport in plants II. New York, Springer-Verlag. p.3-11).

- WANG, C.Y. & HANSEN, E. 1970. Differential response to ethylene in respiration and ripening of immature 'Anjou' pears. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 95:314-316.
- WARDROP, A.B. & CRONSHAW, J. 1962. Formation of phenolic substances in the ray parenchyma of angiosperms. *Nature*, 193:90-92.
- WEAST, C.A. & MACKINNEY, G. 1940. Chlorophyllase. *J. Biol. Chem.*, 133:551-558.
- WHITEHEAD, C.S. 1979. Die verband tussen fenoliese verbruining en sekere oksidatiewe ensieme in loofblare van *Protea neriifolia* R.Br. D.Sc.-Proefskrif. Randse Afrikaanse Universiteit, Johannesburg.
- WILLIAMS, A.H. 1963. Enzyme inhibition by phenolic compounds. (In Pridham, J.B. Ed. Enzyme chemistry of phenolic compounds. London, Pergamon Press. p. 87-95).
- WILLIAMS, P.M. & BOWDEN, B.N. 1973. Triglyceride metabolism in germinating *Andropogon gayanus* seeds. *Phytochemistry*, 12:2821-2827.
- YAMAZAKI, R.K. & TOLBERT, N.E. 1969. Malate dehydrogenase in leaf peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 178:11-20.
- YANG, N. & SCANDALIOS, J.G. 1974. Purification and biochemical properties of genetically defined malate dehydrogenase in maize. *Arch. Biochem. Biophys.*, 161:335-353.
- YEMM, E.W. 1950. Respiration of barley plants. IV. Protein catabolism and the formation of amides in starving leaves. *Proc. Roy. Soc. B.*, 136:632-649.
- YOUNG, R.E. 1965. Extraction of enzymes from tannin-bearing tissue. *Arch. Biochem. Biophys.*, 111:174-180.
- ZUKER, M. & STINSON, H.T. 1962. Chloroplasts as the major protein-bearing structures in *Oenothera* leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, 96:637-644.

8. ILLUSTRASIES



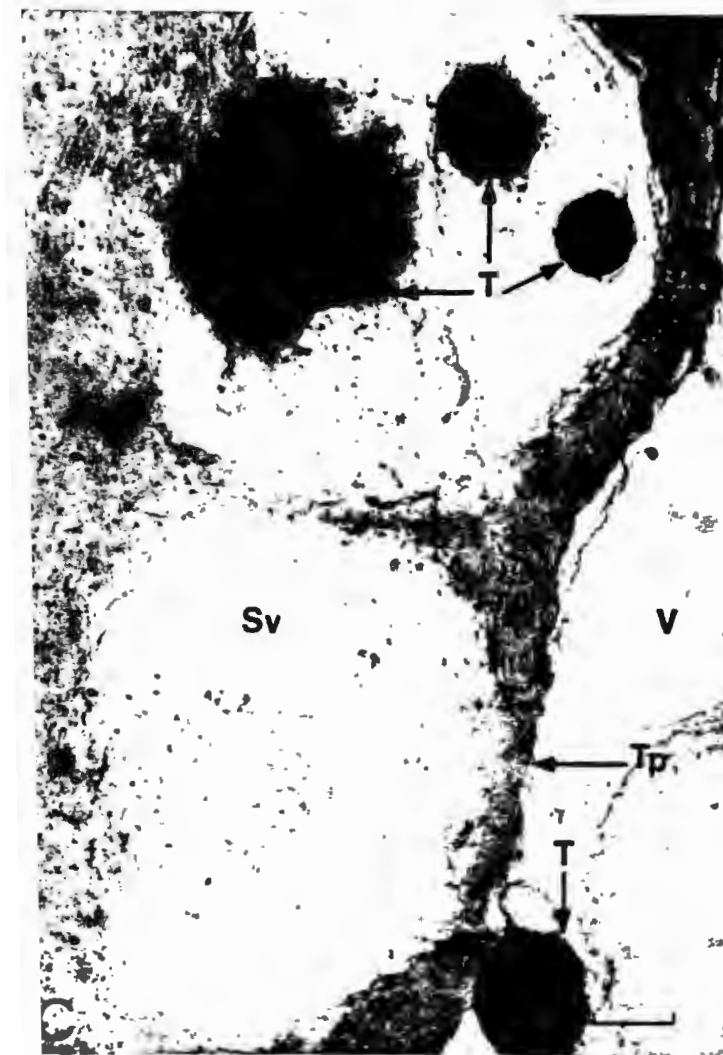
PLAAT I

1A en 1B Transmissie elektronmikrograwē van *Protea neriifolia*-loofblare direk na pluk.

Selle toon 'n normale georganiseerde struktuur. Styselkorrels (St) is in die sitoplasma (Si) aanwesig. (P = plasmalemma; S = selwand; Tp = tonoplas; V = sentrale vakuool; Ve = vesikels). IA Skaalmerker = 0,65 μm
IB Skaalmerker = 0,4 μm .

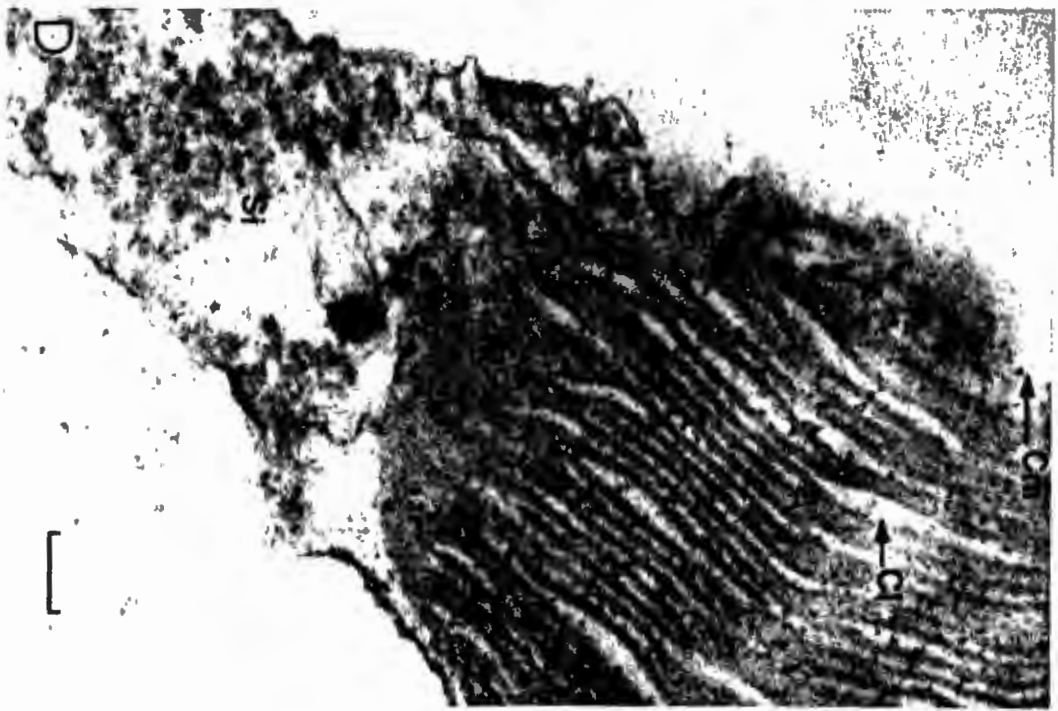
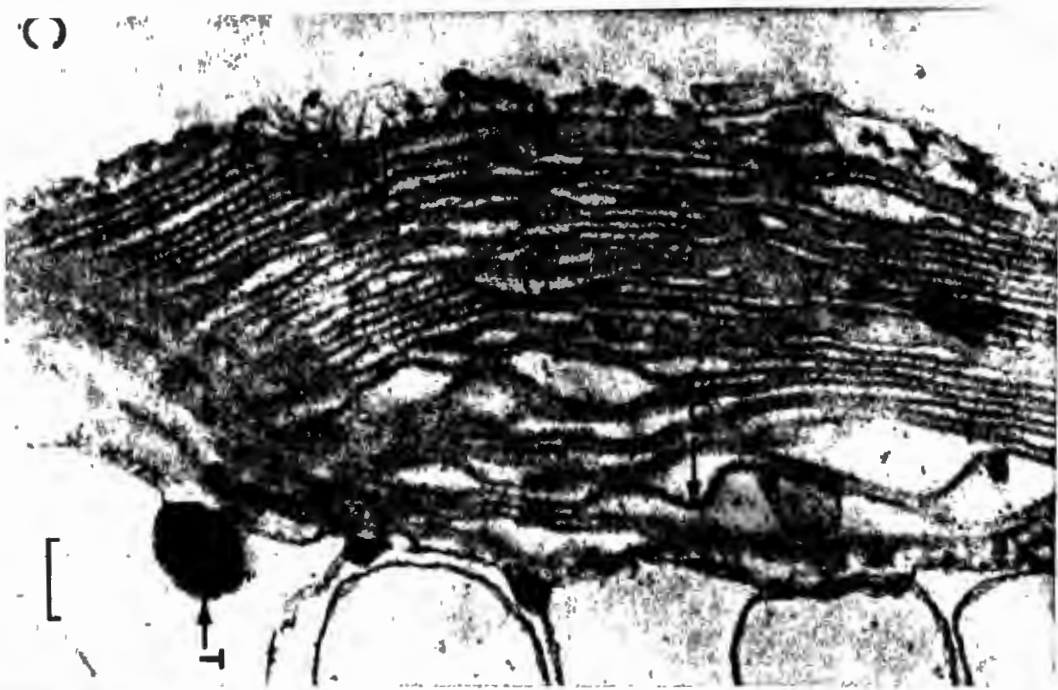
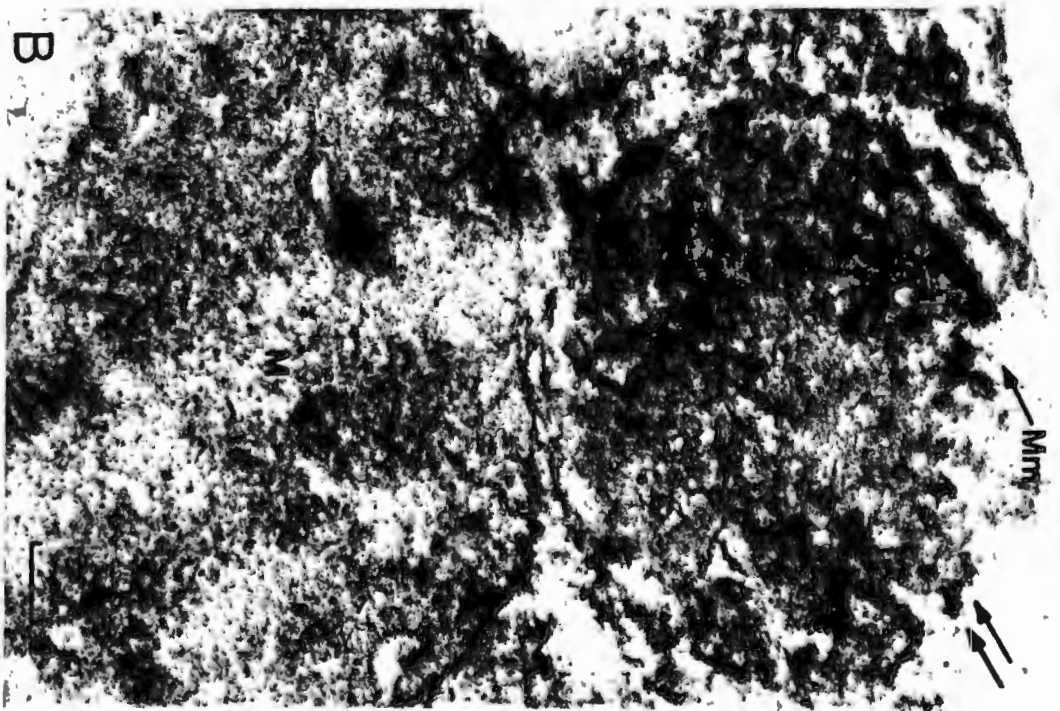
1C en 1D Transmissie elektronmikrograwē van *Protea neriifolia*-loofblare op die derde dag na pluk.

Selle toon onderbrekings in die tonoplast (Tp; pyle) en sitoplasmiese vakuole (Sv) verenig met die sentrale vakuool (V), met die daaropvolgende vrystelling van tanniene (T) vanuit die sitoplasmiese vakuole. Die chloroplas (C) toon 'n normale struktuur. IC Skaalmerker = 2 μm
1D Skaalmerker = 0,16 μm .



PLAAT 2 Transmissie elektronmikrograwe van *Prótea neriifolia*-
loofblare op die sesde dag na pluk

- 2A Die tonoplas toon onderbrekings (Tp; pyle), terwyl die styselkorrels (St), in die chloroplaste (C) moontlik met tanniene (T) geassosieer is. Die plasmalemma (P) toon onderbrekings en beweeg vanaf die selwand (S) weg. (V = vakuool). Skaalmerker = 1,2 μm . Inlas skaalmerker = 0,6 μm .
- 2B Sitoplasmiëse vakuole (Sv) verenig met die sentrale vakuole (V) terwyl die tonoplas (pyle) en plasmalemma (dubbel pyle) onderbrekings toon. Tanniene (T) kom in die sitoplasma (Si) voor. Skaalmerker = 0,2 μm .
- 2C Tanniene (T) kom in sitoplasmiëse vakuole (Sv) en in die sentrale vakuool (V) voor. Skaalmerker = 0,14 μm .
- 2D Tannienmolekule (T) kom in 'n chloroplast (C) voor. Skaalmerker = 0,1 μm .



PLAAT 3

3A en 3B Transmissie elektronmikrograwê van *Protea neriifolia*-loofblare op die negende dag na pluk. Die tonoplas (Tp; pyle) en omhullingsmembrane van die mitochondria (Mm; dubbele pyle) is soms heeltemal afwesig. Die grondplasma van die sitoplasma (S) is gedisorganiseerd, terwyl vesikels (Ve) die sentrale vakuool (V) vul. 3A Skaalmerker = 0,5 μm . 3B Skaalmerker = 0,1 μm .

3C en 3D Die chloroplas (C) toon strukturele disorganisasie aangesien die omhullingsmembraan (Cm) onderbrekings toon en die chloroplaslamellae (Cl) van mekaar skei. (Si = sitoplasma; T = tanniene). 3C = Skaalmerker = 0,1 μm . 3D Skaalmerker = 0,1 μm .



D



A



B



PLAAT 4

Transmissie elektronmikrograwe van *Protea neriifolia*-loofblare op die twaalfde dag na pluk.

- 4A Die sel is heeltemal gedisorganiseerd. Disintegrasie van die plasmalemma (P), tonoplas (Tp; dubbele pyle) en selwand (S; pyle) kom voor. Die sitoplasma (Si) het vanaf die selwand weggetrek en kom verspreid in die sentrale vakuool (V) voor. (T = tanniene). Skaalmerker = 1,2 μm . Inlas skaalmerker = 0,4 μm .
- 4B Sitoplasmiese vakuole (Sv) waarin tanniene (T) voorkom, verenig met die sentrale vakuool (V; pyl) en stel die tanniene vry. Skaalmerker = 0,2 μm .
- 4C Die chloroplas (C) toon disorganisasie sowel as disintegrasie (pyle) van die chloroplaslamellae (Cl). Tannienmolekule (T) kom in 'n vakuool in die plastied voor. Skaalmerker = 0,2 μm .
- 4D Die omhullingsmembrane van die mitochondrions (Mm) is afwesig en algehele strukturele disintegrasie (pyle) kom voor. Skaalmerker = 0,1 μm .