Das Alter ist ein höflich Mann:

Einmal übers andre klopft er an;

Aber nun sagt niemand: Herein!

Und vor der Türe will er nicht sein.

Da klinkt er auf, tritt ein so schnell,

Und nun heißts, er sei ein grober Gesell.

(Johann Wolfgang von Goethe)

Alterung und Seneszenz des Phloems und des Blattes von *Ricinus communis* L.

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Dipl. Biol.

Udo Jongebloed

aus Fürstenau

2003

Die vorliegende Arbeit wurde von August 1997 bis Januar 2003 am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth unter der Leitung von Prof. Dr. E. Komor angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.01.2003

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 17.06.2003

Erstgutachter: Prof. Dr. E. Komor

Zweitgutachter: Prof. Dr. D. Kleiner

1 Einleitung 1
1.1 Alterung 1
1.2 Seneszenz bei Pflanzen 3
1.3 Das Entwicklungsprogramm Seneszenz 4
1.4 Blattseneszenz und Transportprozesse in der Pflanze 6
1.5 Das *Ricinus communis* L. –System 8

2 Material und Methoden.....11
2.1 Pflanzenanzucht 11
2.2 Exsudatentnahme an Petiolen von *Ricinus communis* L.-Pflanzen 11
2.3 Mikroskopische Untersuchung von Siebröhren in den Mittelrippen von Rizinusblättern 12
2.4 Nitratbestimmung in Blattgewebe und Siebröhrenexsudat 12
2.5 Nitratreduktase Aktivität 13
2.6 Glutaminsynthetase Aktivität 13
2.6.1 Photometrische Analyse 13
2.6.2 Glutaminsynthetase Aktivitätsgelelektrophorese 14
2.7 Aminosäureanalyse 15
2.8 Askorbatbestimmung 18
2.8.1 Askorbatextraktion aus Pflanzengewebe 18
2.8.2 Reduktion des Askorbats 18
2.8.3 Oxidation des Askorbats 19
2.8.4 Quantifizierung des Askorbats 19
2.9 Proteinbestimmung nach Bradford 19
2.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 20
2.10.1 Nicht denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese 20
2.10.2 SDS-PAGE 20
2.10.3 2D-Gelelektrophorese 21
2.10.4 Proteindetektion im SDS-Polyacrylamidgel 23
2.10.4.1 Coomassie Brillant Blau-Färbung 23
2.10.4.2 Silberfärbung 23
2.11 Inkubation von Rizinuskeimlingen mit Polyaminen 24
2.12 Aminosäuresequenzierung der isolierten Proteine 24
2.12.1 Proteolytische Spaltung von Polypeptiden im Gel 24
2.12.2 Auftrennung der Spaltpeptide durch HPLC 25
2.12.3 N-terminale Aminosäuresequenzbestimmung 25
2.13 „Western Blotting“ 26

2.13.1 Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf PVDF-Membranen 26
2.13.2 Immunodetektion von Proteinen im Western Blot 27
2.14 Bestimmung oxidativ veränderter Proteine 28
2.15 Messung der Nettophotosynthese 30
2.16 Zuckeranalyse 30
2.16.1 Extraktion der löslichen Zucker und der Stärke 30
2.16.2 Bestimmung des Gehaltes löslicher Zucker 31
2.16.3 Bestimmung des Stärkegehaltes 32
2.17 Elementanalyse 33
2.17.1 Kohlenstoff und Stickstoffanalyse 33
2.17.2 Bestimmung von Anionen und Kationen 34

3 Ergebnisse 35
3.1 Photosynthese 35
3.1.1 Die Nettophotosyntheserate in alternden Rizinusblättern 35
3.1.2 Die Transpiration des Ricinus communis Blattes 36
3.1.3 Die Stickstoffnutzungseffizienz der Photosynthese 37
3.2 Stickstoff in Blättern von *Ricinus communis* L. 39
3.2.1 Stickstoffgehalt in Rizinusblättern 39
3.2.2 Nitrat-Analyse 40
3.2.2.1 Nitratgehalt im Blattgewebe 40
3.2.2.2 Nitratkonzentration im Siebröhrenexsudat 41
3.2.3 Nitratreduktase-Aktivität in Rizinusblättern 42
3.2.4 Glutaminsynthetase-Aktivität in Rizinusblättern 43
3.2.5 Aminosäuren 44
3.2.5.1 Aminosäuregehalte im Blattgewebe 44
3.2.5.2 Aminosäurekonzentrationen im Siebröhrenexsudat 48
3.3 Untersuchungen zum Oxidationsstatus alternder Rizinuspflanzen 51
3.3.1 Askorbatkonzentration bzw. –gehalt in Blatt und Phloem von Ricinus communis 51
3.3.2 Oxidationsstatus löslicher Proteine im Blattextrakt 54
3.4 Elementanalysen alternder Blätter von *Ricinus communis* L. 55
3.4.1 Gehalte von Kalium, Phosphor, Schwefel, Kalzium und Magnesium im Blattgewebe 55
3.4.2 Kaliumkonzentration im Siebröhrenexsudat 58
3.5 Kohlenstoffanalyse in Blättern von *Ricinus communis* L. 59
3.5.1 Kohlenstoffgehalt in Rizinusblättern 59

3.5.2 Kohlenhydratgehalte im Blattgewebe von Rizinusblättern 60
3.5.2.1 Hexosen 60
3.5.2.2 Saccharose..... 62
3.5.2.3 Stärke 63
3.5.3 Zuckerkonzentrationen im Siebröhrenexsudat von Ricinus communis L..... 64
3.5.3.1 Hexosen 64
3.5.3.2 Saccharose..... 65
3.6 Altersbedingte Veränderungen von Blatt- und Siebröhrenexsudatproteinen 66
3.6.1 Proteinkonzentration im Siebröhrenexsudat 66
3.6.2 Altersabhängige Proteinzusammensetzung im Siebröhrenexsudat..... 67
3.6.3 Partielle Sequenz eines Siebröhrenexsudatproteins..... 69
3.6.4 Veränderung des Proteinmusters nach Inkubation mit Polyaminen 71
3.6.5 Proteingehalt und Proteinmuster der Extrakte aus Blattscheiben unterschiedlichen Alters..... 72
3.7 Siebröhrenexsudation unterschiedlich alter Blätter..... 74
3.8 Siebröhren in der Mittelrippe unterschiedlich alter Blätter..... 75

4 Diskussion.....78
4.1 Natürliche und künstlich hervorgerufene Seneszenz..... 78
4.2 Kohlenstoff im Blattgewebe 80
4.3 Stickstoff..... 83
4.3.1 Nitrat 83
4.3.2 Nitratreduktase..... 85
4.3.3 Glutaminsynthase 86
4.3.4 Aminosäuren..... 88
4.4 C:N-Balance 89
4.5 Phloem 90
4.6 Makroelemente 91
4.6.1 Kalium..... 91
4.6.2 Kalzium 92
4.6.3 Magnesium 93
4.6.4 Phosphor..... 93
4.6.5 Schwefel 93
4.7 Oxidativer Stress 95

4.7.1 Askorbat 95
4.7.2 Oxidierte Proteine 95
4.8 *Sink*/*source*-Verhältnis 96
4.9 Proteine im Siebröhrenexsudat 97

5 Zusammenfassung 99

6 Summary 101

7 Ausblick 103

8 Literaturverzeichnis 105

9 Anhang 116

ADP – Adenosindiphosphat
AS – Aminosäure
ATP – Adenosintriphosphat
BSA – engl.: bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
DMSO – Dimethylsulfat
DNA – Desoxyribonukleinsäure
DNPH – 2,4-Dinitrophenylhydrazin
DTT – Dithiothreitol
EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA – Ethylenglykol-bis-(β-aminoethyl)-N,N,N´,N´,-tetraessigsäure
FG – Frischgewicht
g – Erdbeschleunigung
GS – Glutaminsynthetase (cytosolische Form GS1 und plastidäre Form GS2)
GSH – reduzierte Form des Glutathion
$H_2O_{bidest.}$ – zweimal destilliertes Wasser
HPLC – engl.: high performance liquid chromatography (Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie)
HXK – Hexokinase
ICP-AES – engl.: inductively coupled plasma atomic emmision spectrometry
IEF – Isoelektrische Fokussierung
IPG – Immobilisierter pH-Gradient
IPT – Isopentenyltransferase
KOH – Kaliumhydroxid
mA – Milliampere (Stromstärke)
M, mM, µM, nM – Angabe der Molarität (x mol pro Liter Lösungsmittel) je nach Konzentration milli-, mikro-, oder nanomolar
MeOH – Methanol (CH_3OH)
MES – 2-Morpholinosulfonsäure
NADP/NADPH – Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form /reduzierte Form)
NP – Nettophotosyntheserate
PAG – Photosynthese assoziierte Gene
PAGE – Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF – Phenylmethylsulfonylfluorid
PS I/PS II – Photosystem I bzw. II
PVDF – Polyvinylidendifluorid
ROS/ROI – reaktive Sauerstoffspezies /reaktive Sauerstoffintermediate
RNA – Ribonukleinsäure
RT – Raumtemperatur
Rubisco – D-Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase

SAG – Seneszenz assoziierte Gene
SAP – Seneszenz assoziierte Proteine
SDG – engl.: senescence down regulated genes
SDS – engl.: sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat)
STEP – engl.: sieve tube exudate protein (Siebröhrenexsudatprotein)
TBS – engl.: tris buffered saline
TBST – TBS incl. 0,05% Tween 20
TCA – engl.: trichlor acetic acid (Trichloressigsäure)
TFA – Trifluoressigsäure
TG – Trockengewicht
THF – Tetrahydrofuran
Tricin – N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]glycin
Tris – Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U – engl.: unit (Einheit für enzymatischen Substratumsatz pro Zeiteinheit)
UV – Ultraviolettes Licht
V – Volt (Spannung)
v/v – Volumen pro Volumen
w/v – Gewicht pro Volumen
2D - Zweidimensional

1 Einleitung

1.1 Alterung

Das Interesse am Thema Alterung scheint beinahe so alt zu sein wie die Menschheit selbst und richtet sich vor allem auf eine mögliche Lebensverlängerung oder auf die Erhaltung der Jugend. Es findet seinen Ausdruck z.B. in mythischen Erzählungen, um einen Jungbrunnen, ein Lebenswasser oder -kraut, die man in allen Kulturkreisen antrifft. So sucht Gilgamesch (3. Jahrtausend v. u. Z.) nach dem lebenspendenden Kraut. Im Garten Eden steht der Lebensbaum und in der griechischen Mythologie finden sich die goldenen Äpfel der Hesperiden. Auch in der Sage um Alexander den Großen ist ein Lebenswasser enthalten und ein Jungbrunnen bzw. Jungborn wird in skandinavischen Sagen beschrieben.

Natürlich ist dieses Interesse nicht nur auf den literarisch-künstlerischen Bereich beschränkt, sondern schlägt sich auch in intensiver Forschungstätigkeit nieder. Wie schon die mythologischen Beispiele zeigen konzentriert sich auch die Forschung vorzugsweise auf medizinische Fragen, deren Ziel es ist, wenn nicht ewiges Leben, so doch eine höhere Lebensqualität bei höherer Lebenserwartung zu erreichen.

Obwohl eigentlich jeder Mensch ein Vorstellung davon hat, was Altern bedeutet, sind die wissenschaftlichen Erkenntnisse zu diesem Prozess immer noch unsicher. Die Alterungsforschung kennt viele unterschiedliche Theorien, die allgemein in zwei Kategorien eingeteilt werden (Gershon und Gershon 2000):

1. Programmiertes biologisches Altern.
Es gibt einen Selbstzerstörungsmechanismus, der im Genom des jeweiligen Lebewesens festgelegt ist.

2. Altern als Folge stochastischer Ereignisse.
Diese Theorien sehen die Ursache des Alterns in zufälligen Schädigungen, die sich während der Lebensspanne eines Organismus anhäufen. Diese Schädigungen beruhen auf umweltbedingten Einflüssen und beeinflussen notwendige Mechanismen des Metabolismus.

Die Forschung an Alterungsphänomenen in der Medizin und in der Zoologie haben zahlreiche Erkenntnisse über Tod und Überleben von Zellen gebracht. Der Mechanismus der Apoptose, wird auf zellbiologischer Ebene bis in Detail untersucht. Die Apoptose bzw. der programmierte Zelltod stellt einen regulierten, aktiven Prozess dar, der Proteinsynthese benötigt und durch den Zellkern gesteuert wird, allerdings sind nur einzelne Zellen bzw. Gewebe betroffen. Die Charakteristika der Apoptose sind Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und Proteinabbau durch sogenannte Caspasen. Haben Pflanzen ähnliche Mechanismen oder möglicherweise die Fähigkeit in diese Mechanismen einzugreifen? Ein großer Teil der für die Apoptose des zoologischen Systems beschriebenen Mechanismen scheint universell anwendbar zu sein. So beeinflussen Zelltodregulatorgene tierischer Herkunft auch den Zelltod von Pflanzen (Lam et al. 1999, Jabs 1999, Pennell und Lamb 1997). Beachtenswert ist außerdem, dass der programmierte Zelltod ebenfalls in einzelligen Eukaryonten eine Rolle spielt und dass sogar bei Prokaryonten primitive Formen des programmierten Zelltodes gefunden wurden (Ameisen 1996). Zellzykluskomponenten der Tiere, wie z.B. das Retinoblastomaprotein, das in Säugetierzellen den Übergang in die S-Phase verhindert, sind ebenso bei Pflanzen anzutreffen. Unterschiede zwischen tierischem und pflanzlichem Zellzyklus resultieren u.a. daraus, dass die Entwicklung der Pflanzen stärker von ihrer Umgebung bestimmt wird als es bei Tieren der Fall ist (den Boer und Murray 2000, Roach 2001).

In der pflanzlichen Entwicklung nimmt die Seneszenz eine herausragende Rolle ein. Die Seneszenz ist ein Prozess, der den Abbau und die Mobilisierung von Speicherstoffen ermöglicht. Im Unterschied zur rein passiven Alterung ist die Seneszenz ein abgeschlossenes Entwicklungsprogramm, das mit einer differentiellen Genexpression verbunden ist bzw. auf dieser beruht. Letztendlich mündet die Seneszenz in das Absterben des betreffenden Organs oder der ganzen Pflanze.

Im Pflanzenreich existieren verschiedenste Ausprägungen der Alterung und der Seneszenz. Es gibt Beispiele für kurzlebige Pflanzen, die nur ihren generativen Zyklus durchlaufen und dann absterben, aber es gibt auch Pflanzen, die tausende von Jahren als sind (Guarente et al. 1998), wie z.B. eine über 43000 Jahre alte Stechpalme *Lomatia tasmanica* (Lynch et al. 1998) oder eine 13000 Jahre alte Heidelbeerpflanze (Wherry 1972). Beide Pflanzen vermehren sich vegetativ und stellen Klone einer Population dar. Bei den generativ vermehrten Pflanzen findet sich als Beispiel die Bristlecon

Kiefer (*Pinus aristata*), die durch dendrochronologische Untersuchungen auf ein Alter von 4700 Jahren datiert wurde. Die Gemeinsamkeit dieser „alten“ pflanzlichen Organismen ist eigentlich die Vermeidung der Alterung. Die Alterung als rein passive Verwitterung spielt bei Pflanzen kaum eine Rolle. Die Stechpalme stellt zwar einen 43000 Jahre alten Klon dar, allerdings gibt es kein 43000 Jahre altes, lebendes Individuum. Die Kiefer wiederum besitzt sehr alte Zellen, die jedoch tot sind und der Stabilität des Baumes (Holz) dienen, während neue, funktionstüchtige Leitgewebe immer wieder neu durch sekundäres Dickenwachstum entstehen. Die Gewebe dieser Pflanzen sterben durch aktive Prozesse ab und unterliegen somit nicht der Alterung im gerontologischen Sinne (Thomas 2002).

1.2 Seneszenz bei Pflanzen

Die Ausprägung alterungsspezifischer Symptome stellt sich bei Pflanzen als sehr inhomogen dar. Im Wesentlichen findet man drei verschiedene Arten der Seneszenz.

1. Die annuelle Seneszenz (das Laub abwerfende Bäume), die von den Jahreszeiten abhängt,
2. Das monokarpische Absterben und
3. Die sequentielle Blattseneszenz.

Bei der annuellen Seneszenz, die in unseren Breiten alle Laubbäume zeigen, beginnen die Bäume bei verkürzten Tageslängen ihre Nährstoffe von den Blättern in den Stamm zu transportieren um in der Folge die Blätter abzuwerfen. Dies ist vor allem ein Schutz vor Austrocknung, da der hiesige Winter eine Trockenzeit für die Pflanzen darstellt. Des weiteren bestünde die Gefahr von Frostschäden durch gefrierendes Wasser in den Blättern. Auf diese Weise geschädigte Blätter würden für die Pflanze einen Nährstoffverlust bedeuten. Im Herbst sterben alle Blätter gleichzeitig ab. Vom monokarpischen Absterben hingegen ist die ganze Pflanze betroffen. Die Nährstoffe werden in die Früchte transportiert. Die Pflanze investiert in ihre Verbreitung durch die nächste Generation. Bei *Arabidopsis* ist dieses monokarpische Absterben in zwei Prozesse unterteilt. Der erste Prozess umfasst das Absterben der Rosettenblätter und anderer Organe, während der zweite Prozess das Sprosswachstum arretiert und somit letztendlich zum Absterben der gesamten Pflanze führt. Diese Prozesse finden auch in Arabidopsispflanzen statt, die keine Früchte tragen (Hensel et al. 1993). Ein

rein altersabhängiges Absterben von Pflanzenteilen ist hauptsächlich bei Pflanzen anzutreffen, die mehrjährig sind, und keinen jahreszeitlichen Blattwurf oder ähnliche synchrone Absterbevorgängen aufweisen. (z.B. immergrüne Nadelbäume und tropische Pflanzen). Bei diesen Pflanzen sterben die Blätter altersgemäß in der Sequenz ihrer Entstehung wieder ab.

1.3 Das Entwicklungsprogramm Seneszenz

Die Blattseneszenz ist ein aktiver Prozess, der den Pflanzen die Remobilisierung von Reservestoffen und die Mobilisierung von Metaboliten vor dem Absterben des Blattes ermöglicht (Bleecker und Patterson 1997). Das Absterben alter Blätter ist notwendig, um Stickstoff und andere Nährstoffe für die Entwicklung und das Wachstum neuer Organe zur Verfügung zu stellen (Wittenbach 1979). Möglicherweise zwingen während Wachstum und Lebensspanne angereichterte Ballastionen (Ca^{2+}) und Stoffwechselschlacken die Pflanze zum Abwurf der Blattes (Molisch 1929). Allgemeine Charakteristika der Seneszenz sind die Abnahme der photosynthetischen Kapazität und Verluste an löslichen Proteinen (Friedrich und Huffacker 1980). Die Seneszenz kann z.B. durch das Entfernen des Zellkerns oder die Gabe von Hemmstoffen der Proteinbiosynthese verlangsamt werden (Noodén et al. 1997). Dies unterscheidet die Seneszenz von der Alterung, die durch rein passives Fortschreiten charakterisiert wird. Seneszenz betrifft ganze Pflanzen, oder Organe wie im Falle der Blattseneszenz bzw. Gewebe wie im Falle der Endospermseneszenz während der Keimung. Die Wirkung auf so komplexe Strukturen verlangt einen hohen Grad an Koordination und Regulation und unterscheidet die Seneszenz damit auch von der Apoptose, die in Pflanzen z.B. bei der Pathogenabwehr sowie bei der Bildung der Wurzelhaube und der Tracheenelemente vorkommt (Pennell und Lamb 1997). Es erfolgt kein kontrollierter Abbau der Reservestoffe, sondern ein rigoroser und lokaler Abbruch der Zellstrukturen auf Kosten von Stoff- und Energieverlusten (Pontier et al. 1999). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, das apoptotische Vorgänge bei der Seneszenz von Pflanzen beteiligt sind.

Abb. 1: Expression Seneszenz-assoziierter Gene. Es gibt hier grundsätzlich Gene, die während der Seneszenz nicht mehr exprimiert werden (SDG =senescence down regulated) sowie Gene die während der Seneszenz stärker exprimiert werden (Klasse II Seneszenz-assoziierte Gene - SAG) und Seneszenz spezifische Gene (Klasse I SAG) (nach Gan und Amasino 1997).

Zur kontrollierten Seneszenz gehört vor allem die Synthese spezieller Proteine. Diese sogenannten Seneszenz-assoziierten-Proteine (SAP) und die sie kodierenden Gene (SAG) (Abb. 1) wurden bereits teilweise identifiziert. Beispiele für solche „Seneszenzgene“ sind bestimmte Cysteinproteasen, RNasen, eine Phospholipase D, Metallothionine und die cytosolische Form der Glutaminsynthetase (Weaver et al. 1997, Buchanan-Wollaston 1997). Diese Proteine dienen entweder dem Abbau von Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden oder sie unterstützen den Transport von Nährstoffen und Elementen aus dem seneszierenden Blatt durch Entgiftung bzw. durch Bildung von phloemmobilen Transportformen der Abbauprodukte. Die Symptome der Seneszenz können also durch Veränderungen im Nährstoffhaushalt und der Genexpression beschrieben werden. Das Verständnis von Mechanismen der Initiation und der Regulation der Seneszenz ist jedoch noch lückenhaft (Chandlee 2001). In Fällen, in denen direkt benachbarte Zellen nicht von der Apoptose betroffen sind, stellt sich

zum Beispiel die Frage nach einem speziellen Schutz. Es wird vermutet, dass Zellen, die Überleben sollen, Signale bekommen, die das Absterben verhindern (Raff 1992). Bei pflanzlichen Zellkulturen wurden Oligosaccharide als „Überlebensfaktoren“ entdeckt, die den Zellen das Überleben in ansonsten tödlichen Zellverdünnungen ermöglichen (Schröder und Knoop 1995) und in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen bewirkt die Mutation des Hys1-Proteins (Hyperseneszenz1) einen frühen Seneszenz Phänotyp. Besonders nach Applikation exogener Zucker wurden Seneszenzsymptome bei dieser Mutante sichtbar. Dies deutet auf die seneszenzverzögernde Funktion des Wildtypgens hin (Yoshida et al. 2002). Weiterhin ist auch die suprazelluläre Produktion von ROS (Reaktive-Oxygen-Spezies) und von antioxidativen Enzymen als Gegenspielern denkbar, wie es in humanen Zellkulturen beobachtet wurde (Sandstrom und Buttke 1993).

1.4 Blattseneszenz und Transportprozesse in der Pflanze

Die Blattseneszenz wird häufig als Prozess definiert, der die Mobilisierung von Speicherstoffen vor dem Absterben des Blattes ermöglichen soll. Vor diesem Hintergrund ist es wahrscheinlich, dass die Funktion der Transportbahnen während der Pflanzenentwicklung einen wichtigen Aspekt für das Verständnis der Seneszenzvorgänge darstellt (Feller und Fischer 1994).

Die verschiedenen Organe einer Pflanze, wie Wurzel, Blätter oder Stamm, sind durch Leitungsbahnen verbunden. Im Xylem wird hauptsächlich Wasser und darin gelöste Stoffe (Ionen, Nitrat, etc.) transportiert. Die treibende Kraft ist die Transpiration an den Spaltöffnungen. Der Nährstofftransport (Kohlenhydrate, Aminosäuren, Proteine) findet im Phloem statt. Dabei werden vereinfacht ausgedrückt Nährstoffe von Orten mit hohem Nährstoffgehalt (*source*) zu Orten niedrigen Nährstoffgehaltes (*sink*) transportiert. Photosynthetisch aktive Gewebe laden Kohlenhydrate in die Siebröhren des Phloems und erzeugen dadurch dort ein niedriges osmotisches Potential, das zu einem Wassereinstrom und einem hohen Druck führt. In den *sink*-Organen (z.B. wachsende Meristeme, Blüten und Früchte) werden die Siebröhren entladen, das osmotische Potential steigt, es kommt zum Wasserausstrom und somit zu einem niedrigeren Druck in der Siebröhre. Entlang dieses Druckgradienten fließt der Assimilatstrom von

source zu *sink*. Um diese Aufgabe zu bewältigen hat das Phloem eine besondere Anatomie (Abb. 2).

Abb. 2: Schematische Darstellung eines Siebelement-Geleitzellen-Komplexes.

Die Siebröhre und die Geleitzelle gehen aus einer gemeinsamen Ursprungszelle hervor. Durch massive Veränderungen der jungen Siebröhre, wie z.B. dem Abbau der Ribosomen, des Golgi-Apparates und der Vakuole sowie der Umwandlung des endoplasmatischen Retikulums reift sie zu einer funktionellen Siebröhre heran. Je nach Pflanzenart fehlt der reifen Siebröhre auch der Zellkern bzw. ist er degeneriert (van Bel et al. 2002). Da für den oben genannten Assimilatstrom regulierte osmotische Bedingungen vorliegen müssen, ist die Zellmembran ein wichtiger Bestandteil der Siebröhre. Die Siebröhren müssen also anders als die Xylemgefäße am Leben bleiben um ihre Funktion zu erfüllen. Regulative Prozesse müssen, da kein intakter Zellkern mehr vorhanden ist, von außen gesteuert werden. Zu diesem Zweck bilden die Siebröhren und Geleitzellen, die über Plasmodesmen miteinander verbunden sind, eine funktionelle Einheit.

Das Phloem spielt eine besondere Rolle bei der Seneszenz, indem es mobilisierte Nährstoffe des seneszenten Organs für die Pflanze verfügbar macht. Daher muss das Phloem als eines der letzten Gewebe angesehen werden, die der Seneszenz unterworfen werden (Matile 1992, Feller und Fischer 1994). Die Leitbündel sind die letzten Blattgewebe, die noch grün sind, wenn andere bereits gelb sind (Abb. 3).

Abb. 3: Seneszentes Rizinusblatt. Das Blatt vergilbt von den Rändern nach innen und bleibt an den Blattadern am längsten grün.

1.5 Das *Ricinus communis* L. –System

Um Untersuchungen zum Thema Phloemtransport durchzuführen, ist es notwendig, die Inhaltsstoffe des Phloemstromes zu analysieren. Dies bedeutet, dass zuallererst die Möglichkeit gegeben sein muss, möglichst reinen Siebröhreninhalt einer Pflanze zu erhalten. Da die Siebröhren einen hohen Turgordruck haben, kann der Inhalt durch Anritzen oder Anschneiden der Siebröhren austreten. Fast alle Pflanzen schützen sich jedoch vor dem Verlust von Nährstoffen, indem sie die verwundete Siebröhre an den Siebplatten durch P-Proteine und die Auflagerung von Wundkallose effizient verschließen. Eine der wenigen Ausnahmen ist *Ricinus communis* L. (Milburn, 1970, Hall und Baker, 1972). Besonders die Keimlinge wurden in der Vergangenheit zur Aufklärung von Transportvorgängen und der Ernährungssituation des Keimlings genutzt (Kallarakal et al. 1989). Rizinuskeimlinge exsudieren den Siebröhreninhalt, der vom Keimblatt entspringt. Nach völliger Durchtrennung des Hypokotyls exsudiert der Keimling über den gesamten Hypokotylquerschnitt. Es kann also eine

Aussage über den gesamten Transport aus den Keimblättern gemacht werden. Bei den Folgeblättern kann mittels Durchtrennung der Petiolen kein Siebröhrenexsudat mehr gewonnen werden. Nach Anritzen einzelner Siebröhren kann jedoch auch aus erwachsenen Pflanzen das Siebröhrenexsudat aufgefangen werden. *Ricinus communis* L. ist also eine Pflanze, bei der man den Transportstrom direkt untersuchen kann und ist somit eine der wichtigsten Modellpflanzen auf diesem Gebiet. Die Rizinuspflanze wächst, indem im Abstand von ungefähr sieben Tagen ein neues Blatt erscheint. Bei einem Blattalter von 58 Tagen waren etwa 50 % der Blätter abgeworfen worden (Széderkenyi 1998). Dieses lineare Wachstumsverhalten, mit seiner zeitabhängigen Blattseneszenz macht Rizinus für die Alterungsforschung interessant. Insbesondere Transportvorgänge während der Blattalterung können auf diese Weise verfolgt werden.

Zielsetzung:

Diese Arbeit ist ein Teilprojekt der von der DFG geförderten Forschergruppe „Alterungsprozesse bei Pflanzen“ Im Mittelpunkt des Interesses steht die Erarbeitung grundlegender Seneszenzprinzipien. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Beschreibung der Alterung und natürlichen Blattseneszenz bei *Ricinus communis* unter besonderer Berücksichtigung des Phloems.

Ein Aspekt der Seneszenz ist die Remobilisierung von Speicherstoffen aus dem alternden Blatt und somit die Bereitstellung von Nährstoffen für die Wachstumsregionen und Speicherorgane der Pflanze. Das Gewebe, das den Export von Nährstoffen aus dem Blatt bewerkstelligt, ist das Phloem. Sicher ist, dass das Phloem mit dem Blatt abstirbt. Könnte es aber auch mitverantwortlich für die Initiation der Blattseneszenz sein? Eine Blockade des Phloems könnte sich über die Akkumulation von Metaboliten auf den Blattmetabolismus auswirken. Möglicherweise wird das Entwicklungsprogramm „Seneszenz“ dadurch beeinflusst oder sogar ausgelöst. Umgekehrt sollten sich seneszenzbedingte Änderungen im Blattgewebe auch auf das Phloem auswirken. Diese Veränderungen spiegeln sich in der Zusammensetzung des Siebröhrenexsudates wider. Da auch die Genexpression seneszenzspezifische Veränderungen zeigt, soll dementsprechend auch die Zusammensetzung der Siebröhrenexsudatproteine untersucht werden.

Die Betrachtung der Blattseneszenz aus dem Blickwinkel des Phloemtransportes soll verschiedene Parameter des Blattmetabolismus, wie z.B. den Kohlenstoff- und Stickstoffhaushalt, mit einschließen. Die Unterschiede in der Assimilation und der Remobilisierung von Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen in verschieden alten Blättern, sollten ihre Entsprechung in der Zusammensetzung des Siebröhrenexsudates finden. Ein Vergleich des Blattmetabolismus mit dem Transportverhalten des Phloems soll der weiteren Charakterisierung der Blattseneszenz von *Ricinus communis* dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenanzucht

Für die Experimente wurden Pflanzen der Art *Ricinus communis* L. var. Sanguineus verwendet (Florensis, Freiburg bzw. Benary, Hannoversch-Münden). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte auf feuchtem Vermiculite™ in Anzuchtschalen. In einer geschlossenen Kammer wurden die Samen unter Sprühnebel bei 30° C inkubiert, bis die Keimblätter entfaltet waren. Wegen der Gefahr von Pilzinfektionen musste das Endosperm nach ca. einer Woche entfernt werden. Nach einer weiteren Woche konnten die Pflanzen in den Anzuchtschalen in das Gewächshaus überführt werden. Nach einer zweitägigen Akklimatisation wurden sie in Erde (Lauberde, Torfsubstrat, Bimskies und Langzeitdünger) gepflanzt. Die Gewächshausbedingungen für die *Ricinus communis* L.-Anzucht waren 12 Stunden Licht, bei 25° C und 20° C in der Dunkelphase. Die Luftfeuchtigkeit konnte im Gewächshaus nicht reguliert werden.

2.2 Exsudatentnahme an Petiolen von *Ricinus communis* L.-Pflanzen

Die Untersuchung von Inhaltsstoffen des Phloems setzt die Gewinnung reinen Phloemexsudats voraus. Das Versuchsobjekt *Ricinus communis* L. bietet diese Möglichkeit. Verletzte Siebröhren, werden bei Rizinus nicht verschlossen, so dass der Assimilatstrom durch den Schnitt austreten kann (Milburn 1970). Im Gegensatz zu Rizinus-Keimlingen, bei denen das Hypokotyl mittels einer Rasierklinge ganz durchtrennt wurde, durften adulte Pflanzen nur angeritzt werden. Um sicherzustellen, dass das Siebröhrenexsudat nur aus dem Blatt kam, dessen Blattstiel angeritzt wurde, wurde vorab ein sogenannter Sperrschnitt gesetzt. Dieser Sperrschnitt war stängelnah. Sein Exsudat wurde verworfen. Nach ca. 5 Minuten wurde ein zweiter Schnitt ungefähr 2-3 cm näher zum Blatt gesetzt, aus dem nach Verwerfen der ersten 5 µl das Exsudat gesammelt wurde.

2.3 Mikroskopische Untersuchung von Siebröhren in den Mittelrippen von Rizinusblättern

Die mikroskopischen Schnitte zur Untersuchung von Siebröhren wurden anhand der Färbung der Siebplatten mit Anilinblau durchgeführt (Milde, 1996). Die Präparate wurden im Exsikkator mit einer Fixierlösung (4% (w/v) Paraformaldehyd in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5) infiltriert. Die fixierten Gewebestücke wurden eingebettet (Tissue-TEK O.C.T. compound, Sakura Finetek, U.S.A) und mit einem Gefriermikrotom (Frigocut 2800-N, Reichert-Jung, Heidelberg) bei –20° C geschnitten. Die Schnitte waren 60 µm stark und wurden in 100 mM Natriumhydrogenphosphat auf einem Objektträger platziert. Auf dem Objektträger erfolgte die Färbung mit 0,01% (w/v) Anilinblau in 1 mM Natriumhydrogenphosphat für 5 Minuten bei RT. In einem Auflichtfluoreszenzmikroskop (Zeiss, Typ Standard WL) konnte unter Verwendung eines Anregungsfilters 400-440 nm, eines Farbteilers 460 nm und eines Sperrfilters 470 nm die UV-Fluoreszenz der Siebplatten wahrgenommen werden. Die Arbeiten wurden im Zuge ihres Laborpraktikums von Katja Hartig durchgeführt.

2.4 Nitratbestimmung in Blattgewebe und Siebröhren-exsudat

Der Nitratgehalt in den Rizinusblättern wurde mit HPLC bestimmt (Thayer und Huffaker 1980). Dazu wurde ein Blattextrakt aus den Rizinusblättern gewonnen, indem je 100 mg getrocknetes und gemahlenes Blattmaterial zweimal mit 1 ml $H_2O_{bidest.}$ bei 95° C für 10 Minuten inkubiert wurden. Im Anschluss an jede Inkubation wurden die Reaktionsgefäße in einer Tischzentrifuge bei 15000*x* g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Überstände beider Inkubationen wurden vereinigt und nach geeigneter Verdünnung durch HPLC analysiert. Siebröhrenexsudat wurde mit $H_2O_{bidest.}$ verdünnt und der Nitratgehalt direkt durch HPLC bestimmt.

Für die HPLC-Analyse wurde ein Kontronsystem (Biotek, Neufahrn) verwendet. Die HPLC bestand aus einer HPLC-Pumpe Kontron 414 mit automatischem Probengeber (Kontron 360). Die Trennung erfolgte isokratisch bei einer Flussrate von 2 ml/min über eine Ionenaustauschersäule Vydac Typ 302 I.C. (Vydac, CA, USA) mit 0,02 molarem KH_2PO_4-Puffer, pH 2,7. Die Daten des UV-Detektors bei 210 nm (Kontron 432) wurden auf einem PC mit der Software Kontron D450 ausgewertet.

2.5 Nitratreduktase Aktivität

Die Nitratreduktase-Aktivität in Blättern von *Ricinus communis* L. wurde in einem *in vivo* Test bestimmt (Gebauer et al. 1984). Für diesen Test wurden mit einem Korkbohrer aus den zu untersuchenden Blättern 10 Blattscheiben mit einem Durchmesser von 0,75 cm ausgestanzt und in lichtundurchlässige Gefäße gegeben. Die Inkubationsgefäße enthielten je 10 Blattscheiben und 5 ml der Inkubationslösung (0,25 M Kaliumdihydrogenphosphat, 1,5 % 1-Propanol, 0,08 M Kaliumnitrat, pH 7,5 [KOH]), die mit einer Vakuumpumpe infiltriert wurde. Anschließend wurde das Vakuum durch Stickstoffgas ersetzt. Dies war unerläßlich, da sowohl Licht als auch Sauerstoff den Test negativ beeinflussen würden. Die Testgefäße wurden nun für zwei Stunden bei 30° C im Dunkeln geschüttelt. Nach der Inkubation wurden 500 µl der Inkubationslösung entnommen und mit 300 µl 5%iger Sulfanilamid-Lösung (in 3N HCl), 300 µl 0,1%iger N-Naphtylethylendiamin-Lösung (in $H_2O_{bidest.}$) und 400 µl $H_2O_{bidest.}$ gemischt. Die Farbentwicklung war nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT abgeschlossen und konnte im Fotometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden. Als Blindwert fungierte ein Ansatz mit Inkubationslösung.

2.6 Glutaminsynthetase Aktivität

2.6.1 Photometrische Analyse

Die Glutaminsynthetase-Aktivität wurde anhand der Übertragung von Natriumglutamat auf Hydroxylamin gemessen. Diese Reaktion führt zu dem Endprodukt γ-Glutamylhydroxamat, welches bei 540 nm photometrisch bestimmt werden kann. Zur Bestimmung der Glutaminsynthetase Aktivität wurde zuerst ein Proteinextrakt aus frischem Pflanzenmaterial hergestellt. Eine Blattscheibe von 2,5 cm Durchmesser wurde gewogen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben, und nach Zugabe des vierfachen Volumens (w/v) an Extraktionspuffer (s.u.) in einem Ultraturrax homogenisiert. Die Extrakte wurden mit 15000*x* g bei RT zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden mit jeweils 250 µl Reaktionspuffer (s.u.) in einer Blindprobe und einem Reaktionsansatz eingesetzt und 20 min bei RT geschüttelt. Die Blindprobe wurde direkt mit 500 µl der Stopplösung (s.u.) versetzt, so dass keine GS-katalysierte Reaktion stattfinden konnte. Dies war notwendig, da sich durch Hydroxylamin färbbare Substanzen im Extrakt befanden. Nach 20 Minuten wurden zum Reaktionsansatz ebenfalls 500 µl der Stopplösung hinzugegeben. Blindprobe und Reaktionsansatz wurden in der

Tischzentrifuge bei 15000*x* g zentrifugiert und die optische Dichte der Überstände wurde im Photometer bei 540 nm gemessen.

Extraktionspuffer:

200 mM Tris-HCl, pH 7,5
2 mM Na-EDTA
3 mM DTT
1 mM Glutathion reduziert
10 % Glycerol
0,2 mM PMSF

Reaktionspuffer:

50 mM Imidazol, pH 7,2
18 mM ATP
45 mM $MgCl_2$
25 mM Hydroxylamin
92 mM L-Natriumglutamat

Stopplösung:

370 mM $FeCl_3$
20 % TCA
in 1 M HCl

2.6.2 Glutaminsynthetase Aktivitätsgelelektrophorese

Um die Glutaminsynthetase-Aktivität von Glutaminsynthetase 1 (GS1) und Glutaminsynthetase 2 (GS2) unabhängig voneinander zu untersuchen, wurde die Aktivitätsfärbung nach Trennung der Proteine des Blattextraktes im nativen Polyacrylamidgel nach Rhodes (1975) durchgeführt. Die Extraktion von 1 g frischem Blattmaterial erfolgte durch Mörsern in 2 ml Extraktionslösung mit etwas Seesand. Der Extrakt wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 Minuten lang bei 15000*x* g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bis zur Gelelektrophorese auf Eis gelagert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.9) wurde ein Gel mit Proben beladen, die den gleichen Proteingehalt aufwiesen. Ein weiteres Gel wurde mit Extrakten gleichen Volumens beladen. Die Gele wurden, wie in Kapitel 2.10.1 beschrieben, hergestellt und wiesen einen Polyacrylamidgehalt von 6,5% im Trenngel und 4% im Sammelgel auf. Der Laufpuffer bestand aus 192 mM Glyzin und 25 mM Tris mit einem pH von 8,3. Die Elektrophorese wurde mit 25 mA durchgeführt und dauerte 3 Stunden. Um Überhitzung und damit eine Schädigung der Enzymaktivität zu vermeiden, wurde der Laufpuffer jeweils nach einer Stunde durch frischen gekühlten Laufpuffer ersetzt. Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele mit dem

Equilibrierungspuffer (Reaktionspuffer ohne Substrate) in Kunstoffbeutel eingeschweißt und 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde der Equilibrierungspuffer durch den Reaktionspuffer ersetzt und weitere 30 Minuten auf dieselbe Weise inkubiert. Nach der Hälfte der Zeit wurden die Gele gewendet. Nach dem möglichst vollständigen Entfernen des Reaktionspuffers wurde die Farbreaktion durch Zugabe der Stopplösung ausgelöst. Unmittelbar nach dem Erscheinen der Aktivitätsbanden wurde die Stopplösung entfernt und das Gel mit einem Flachbettscanner digitalisiert. Dies war notwendig, da die gefärbten Proteinbanden nur kurze Zeit sichtbar waren und danach verblassten.

2.7 Aminosäureanalyse

Die Bestimmung von Aminosäuren im Blattgewebe und im Siebröhrenexsudat von *Ricinus communis* L. wurde nach Schurr und Gebauer (1989) durchgeführt. Frisches Blattmaterial wurde bei Raumtemperatur in 80 % Aceton (Verhältnis 1 ml zu 150 mg Blattgewebe) gemörsert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30 Minuten zur Präzipitation der Proteine auf Eis inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 15000*x* g wurde der Überstand in ein frisches, gewogenes Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde auf die gleiche Weise noch ein zweites Mal extrahiert und beide Extrakte vereinigt. Das Aceton wurde unter einem Luft bzw. N_2-Strom abgedampft, bis nur noch die wässrige Phase übrigblieb. Das Restvolumen wurde durch Wiegen bestimmt und ein Teil daraus in einer anfänglichen Verdünnung von 1:20 durch HPLC analysiert. Um die Aminosäuren detektieren zu können, mussten sie derivatisiert werden. Die Derivatisierung beruht auf Umsetzung der primären Aminogruppe einer Aminosäure mit o-Phtalsäuredialdehyd zu einem fluoreszierenden Derivat.

Abb. 4: Derivatisierung von Aminosäuren durch o-Phtalsäuredialdehyd und Mercaptoethanol.

Diese Reaktion erfolgte durch einen automatischen Probengeber (Autosampler 460, Kontron) direkt vor der Auftrennung der Aminosäuren über eine Hypersil 120 ODSII, 5 µm Säule (Muder und Wochele, Berlin). In den Probengefäßen, befanden sich 40 µl der zu analysierenden Probe. Nach Zugabe von 80 µl des Derivatisierungsreagenz (siehe Tab. 3) und Durchmischung wurde eine Reaktionszeit von 2 Minuten eingehalten, bevor die nun derivatisierte Probe im HPLC-System aufgetrennt wurde. Der Gradient und die Lösungsmittel der Aminosäuretrennung setzten sich, wie in den Tab. 1 und Tab. 2 beschrieben, zusammen. Die Auswertung der Peaks erfolgte auf einem Computer mit dem Datensystem D450 (Kontron); die Peakflächen der Aminosäuren wurden dabei gegen die Peakflächen von Aminosäurestandards kalibriert. Die Aminosäuren des Standardgemisches lagen in einer Konzentration von 40 µM vor.

Tab. 1: Für die Aminosäure-HPLC benutzte Lösungsmittel

Pumpe A:	50 mM Na-Acetat (pH 6,8 mit H_3PO_4), 1,5% Tetrahydrofuran
Pumpe B:	97% Methanol (MeOH), 3% Tetrahydrofuran

Tab. 2: Zeitlicher Verlauf des Lösungsmittelgradienten der Aminosäureauftrennung

Zeit	Fluss [ml/min]	A [%]	B[%]	Kurvenverlauf
0	1	100	0	*
12,5	1	85	15	linear
65	1	50	50	linear
67	1	0	100	linear
69	1	90	10	linear
70	1	100	0	linear

Tab. 3: Das Derivatisierungsreagenz setzte sich aus 50 Teilen Reagenz A und 3 Teilen Reagenz B zusammen.

Reagenz A:	99 g Borsäure, 52 g KOH, 2 ml Brij 35 ad 1 Liter pH 10,5
Reagenz B:	800 mg o-Phtalsäuredialehyd in 10 ml Ethanol + 2 ml Mercaptoethanol

2.8 Askorbatbestimmung

Die Askorbatkonzentration einer Probe wurde mittels HPLC-Auftrennung und photometrischer Detektion bei 265 nm bestimmt. Dabei wurde der reduzierte Anteil des Askorbats gemessen, nicht aber der oxidierte Anteil. Durch die Reduktion des Askorbats in einer Probe wurde der Gesamtgehalt dieser Probe bestimmt. Die Bestimmung des Askorbats ohne Reduktion im Vergleich mit der reduzierten Probe spiegelt den Reduktionsgrad des Askorbats wider. Zur Qualitätskontrolle wurde einem parallelen Ansatz die Askorbat-Oxidase zugegeben. Dieser Ansatz enthielt kein messbares Askorbat mehr und spiegelt die Grundlinie des Chromatogramms wieder.

2.8.1 Askorbatextraktion aus Pflanzengewebe

Zur Extraktion von Askorbat aus Pflanzengewebe, wurden 50-100 mg frisches Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zermahlen und anschließend mit 1500 µl 0,1 M HCl vermischt. Durch Zentrifugation bei 15000*x*g und 4° C erfolgte die Abtrennung der festen Zellbestandteile. Der Überstand, der das Askorbat enthielt, wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur HPLC-Analyse kühl gelagert.

2.8.2 Reduktion des Askorbats

Ein Teil des extrahierten Volumens wurde zur Bestimmung des Askorbatgesamtgehaltes reduziert. Dazu wurden

100 µl des HCl-Extraktes mit

200 µl 200 mM CHES-Puffer, pH 9,3 und

120 µl 120 mM DTT

bei RT inkubiert.

Nach 30 Minuten wurden 30 µl 1 M HCl zugegeben und die Proben in der HPLC analysiert.

2.8.3 Oxidation des Askorbats

Ein Volumen von 50 µl des HCl-Extraktes wurde mit 50 µl einer 200 mM Natriumacetat-Lösung, pH 8 und 10 µl der Askorbat-Oxidase (170 U/ml) versetzt und 30 Minuten bei 37° C inkubiert; nach Zugabe von 10 µl 3,7 M Natriumacetat fand die HPLC-Analyse statt.

2.8.4 Quantifizierung des Askorbats

Der Blattextrakt bzw. das Siebröhrenexsudat wurden mittels HPLC fraktioniert und der Askorbatanteil wurde quantifiziert. Die Chromatographie der Proben wurde über eine Hypersil 120 ODSII, 5 µm Säule (Muder und Wochele, Berlin) mit einer HPLC-Pumpe (Kontron 414) und einem automatischen Probengeber (Kontron 360) durchgeführt. Das Laufmittel war 1,5 % (w/v) $NH_4H_2PO_4$, pH 2,8 und wies eine Flussrate von 1 ml/min auf. Das Signal der UV-Detektors bei 265 nm wurde mit dem HPLC-Programm Kontron D450 quantifiziert. Die Sensitivität des Systems war groß genug, um die Proben stark verdünnt (mindestens 1:20) einzusetzen.

2.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinbestimmungen wurden nach dem Prinzip von Bradford (1976) durchgeführt. Dafür wurde das „Bradford-Reagenz“ von BioRad (München) verwendet. Die Proteinbestimmung wurde als „Microassay Procedure“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 800 µl der Probe in der geeigneten Verdünnung mit 200 µl des konzentrierten Bradford-Reagenz versetzt und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurden die Proben in Halbmikroküvetten (Sarstedt, Nümbrecht) bei 595 nm im Photometer gegen einen Referenzwert ohne Protein gemessen. Aus einer Eichreihe mit BSA (Rinderserumalbumin, Sigma, Deisenhofen) konnten die ermittelten Extinktionen einer bestimmten Proteinkonzentration zugeordnet werden.

2.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.10.1 Nicht denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die nicht denaturiende Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in einem kontinuierlichen Puffersystem durchgeführt (Laemmli et al. 1970). Für die Elektrophorese wurde die Elektrophoresekammer Mini-Protean-II (BioRad, München) verwendet. Das Trenngel wurde aus einer 6,5%igen (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1; Applichem, Darmstadt) in 475 mM Tris-HCl pH 8,8 hergestellt. Das Sammelgel hingegen wurde mit einer 4%igen Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung in 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 angefertigt. Der Tris-Glyzin Laufpuffer wurde sowohl auf der Anoden-, als auch auf der Kathodenseite eingesetzt und bestand aus 25 mM Tris und 192 mM Glyzin (ICN, Eschwege). Der pH-Wert des Laufpuffers lag bei 8,3 und brauchte nicht eingestellt zu werden. Zur Beladung der Gele wurden die Proben im Verhältnis 10:1 mit einem Beladungspuffer versetzt, so dass eine Endkonzentration von 4 % (w/v) Saccharose und 50 mM Tris pH 6,8, sowie 0,001 % (w/v) Bromphenolblau erreicht wurde.

2.10.2 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Anders als bei der oben beschriebenen nicht denaturierenden PAGE wurde hier ein diskontinuierliches Puffersystem eingesetzt. Das heißt an Kathode und Anode befanden sich verschiedene Puffer (Schägger und von Jagow 1987). Es wurden, wenn nicht anders erwähnt, 10%ige Trenngele mit 4%igem Sammelgel für eine BioRad MiniProtean™ Gelelektrophoresekammer angefertigt und ein elektrisches Feld mit maximal 100 V und 50 mA angelegt. Die Auftrennung wurde gestoppt, wenn der blaue Farbstoff des Beladungspuffers (RotiLoad, Roth, Karlsruhe) das Ende des Gels erreicht hatte. Zur Kontrolle des Molekulargewichtes wurde der Proteinstandard Mark12™ (Invitrogen, Groningen) benutzt. Sollten die Proteine auf eine Membran geblottet werden, so wurde stattdessen der mehrfarbige Proteinstandard MultiMark™ (Invitrogen, Groningen) eingesetzt.

2.10.3 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Auftrennung von Proteinen erfolgte in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung, die in IPG-Streifen (Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt wurde und in der zweiten Dimension durch SDS-Gelelektrophorese, die kein Sammelgel benötigte, aber sonst wie oben beschrieben durchgeführt wurde.

Extraktion von Blattgewebe zur zweidimensionalen Auftrennung:

Die Proteinextraktion aus Blattgewebe wurde nach Görg et al. (1988) mit einigen Änderungen durchgeführt. Das Blattmaterial wurde zuerst in flüssigem Stickstoff gemörsert, in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit eiskalter (-18° C) 10% TCA in Aceton incl. 0,07% 2-Mercaptoethanol für 45 min präzipitiert. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 4° C wurde das Pellet mit eiskaltem Aceton incl. 0,07% 2-Mercaptoethanol gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde getrocknet. Die Extraktion der Proteine erfolgte, indem das Pellet mit Lysispuffer (9,5 M Harnstoff, 2% (w/w) Triton X-100, 0,8% (w/v) Pharmalyte pH 3-10, 1% (w/w) DTT and 5 mM Pefabloc) im Verhältnis 100 mg Pflanzenmaterial zu 1 ml Lysispuffer durchmischt wurde. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4° C befanden sich die löslichen Proteine im Überstand.

1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde in einer Multiphor-Gelapparatur mit „Immobiline Drystrips™" (beides Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die Drystrips genannten Gelstreifen enthalten Acrylamide, die entweder eine saure oder eine basisch puffernde Gruppe tragen. Unterschiedliche Anteile dieser speziellen Acrylamide in der Acrylamid-Bisacrylamid Mischung bauen den pH-Gradienten auf. Für die Auftrennung von Rizinusproteinen aus Blattgewebe und Siebröhrenexsudat wurden Drystrips mit einem nichtlinearen pH-Gradienten von pH 3 bis pH 10 verwendet. Vor der Elektrophorese mussten die getrockneten Gelstreifen rehydratisiert werden. Mit Hilfe des sogenannten „Reswelling Trays™" wurde diese Rehydratisierung an die Beladung mit Protein gekoppelt, indem die Proteine in dem Rehydratisierungspuffer aufgenommen wurden und die Gele

in ein bestimmtes Volumen dieser Lösung gelegt wurden. Bei der Prozedur wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers verfahren. Die Proteine wurden in folgendem Rehydratisierungspuffer aufgenommen:

9 M	Harnstoff
0,5% (v/v)	Triton X-100
3% (w/v)	Dithiothreitol (ICN, Eschwege)
1%	Ampholyte (pI 3-10 Sigma, Deisenhofen)
einige Mikrogramm	Bromphenolblau bzw. Orange G (Merck, Darmstadt)

2. Dimension: SDS-PAGE

Um die Gelstreifen in der 2. Dimension aufzutrennen, war es erforderlich, eine Reduktion und Alkylierung der Proteine durchzuführen. Die Gelstreifen wurden dazu einzeln in ein 13 ml Reaktionsgefäß überführt, das im ersten Schritt 5 ml der Reduktionslösung und im zweiten Schritt 5 ml der Alkylierungslösung und den Farbstoff Bromphenolblau enthielt. In diesen Lösungen wurden die Streifen mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

Reduktionslösung :

50 mM	Tris-HCl pH 6,8
6 M	Harnstoff
30 %	Glyzerin
2 % (w/v)	SDS
0,5 % (w/v)	DTT

Alkylierungslösung :

50 mM	Tris-HCl pH 6,8
6 M	Harnstoff
30 %	Glyzerin
2 % (w/v)	SDS
4,5 % (w/v)	Iodacetamid

Nach der Vorbehandlung wurden die Gelstreifen auf die gut getrocknete Oberfläche eines SDS-Gels platziert und mit einer 1 %igen Agaroselösung versiegelt. Die weitere Prozedur wurde wie oben beschrieben durchgeführt (siehe 2.10.2).

2.10.4 Proteindetektion im SDS-Polyacrylamidgel

Um die in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen, wurden die Proteine entweder mit Coomassie Brillant Blau gefärbt oder einer Silberfärbung unterzogen.

2.10.4.1 Coomassie Brillant Blau-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde ohne vorherige Fixierung durchgeführt. Die Färbelösung bestand aus: 0,2 % Coomassie Brillant Blau R250 (Serva, Heidelberg) in 50 % Methanol inclusive 5 % Essigsäure (Shevchenko et al. 1996). Die Färbung wurde unter leichtem Schütteln bei RT für mindestens eine Stunde durchgeführt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde die gleiche Lösung ohne den Farbstoff eingesetzt.

2.10.4.2 Silberfärbung

Für die Silberfärbung von Proteinen im Polyacrylamidgel wurde zuerst ein Fixierungsschritt durchgeführt, bei dem das Gel 20 min bei RT in 50 % MeOH (v/v) mit 5 % (v/v) Essigsäure inkubiert wurde. Falls der Silberfärbung eine Coomassie-Färbung vorausgegangen ist, wurde dieser Schritt übergangen. Danach wurde das Gel jeweils 10 Minuten gewaschen. Einmal mit 50 % (v/v) MeOH und danach mit $H_2O_{bidest.}$. Eine einminütige Inkubation mit 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat sollte den Hintergrund des Gels möglichst transparent erhalten. Dann erfolgte die Inkubation mit 0,1 % Silbernitrat-Lösung, die 20 Minuten lang bei RT vollzogen wurde. Nach Entfernung der Silbernitrat-Lösung wurde das Gel zweimal eine Minute in $H_2O_{bidest.}$ gewaschen und dann entwickelt. Die Entwicklung wurde mit 5 % (v/v) Essigsäure gestoppt, bevor die Transparenz des Gels beeinflusst wurde. Die Entwickler-Lösung bestand aus 2 % (w/v) Natriumcarbonat mit 0,04 % (v/v) Formaldehyd.

2.11 Inkubation von Rizinuskeimlingen mit Polyaminen

Die Anzucht von Keimlingen erfolgte durch Quellung der Samen über Nacht und anschließende Oberflächensterilisierung in 0,3 % Chinosol-Lösung. Die gequollenen Samen wurden anschließend auf sterile Petrischalen mit 2 % Agar transferiert und darin zwei Tage im Dunkeln bei 28° C inkubiert. Nach Transfer auf spezielle Anzuchtstöpfe wurden die Keimlinge weitere drei Tage im Dunkeln bei 28° C kultiviert, indem die Wurzeln in 0,5 mM $CaCl_2$ mit Luft versorgt wurden. An Tag 6 wurden die Keimlinge für die Experimente verwendet. Das Endosperm wurde von den Keimlingen entfernt und die Keimblätter für drei Stunden bei 28° C im Wasserbad in die Inkubationslösung getaucht. Die Kontrollen wurden in 0,5 mM $CaCl_2$ inkubiert während in den Polyaminansätzen entweder 1 mM Putrescin oder jeweils 0,5 mM Spermin und 0,5 mM Spermidin in $CaCl_2$ gelöst waren. Nach der Inkubation wurde der Keimling am Hypokotylhaken durchtrennt und die Keimblätter bei 28° C in feuchtem Vermiculite inkubiert. An der Schnittstelle konnte nun für mehrere Stunden Siebröhrenexsudat gesammelt werden. Die Exsudate wurden in Centricons konzentriert und je 100 bis 150 µg Protein (nach Bradford) wurden auf ein 2D-Gel appliziert.

2.12 Aminosäuresequenzierung der isolierten Proteine

Die in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinflecken wurden aus dem Gel ausgeschnitten und sollten der N-terminalen Aminosäuresequenzierung nach Edman unterworfen werden. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. C. Horstmann am Institut für Kulturpflanzenforschung in Gatersleben durchgeführt.

2.12.1 Proteolytische Spaltung von Polypeptiden im Gel

Die Erfahrung mit Siebröhrenexsudatproteinen wies auf einen hohen Anteil N-terminal modifizierter Proteine hin, die dem Edman-Abbau abträglich waren. Um die gewonnenen Gelstückchen direkt einem proteolytischen Verdau zu unterziehen, wurden die von Jenö et al. (1995) und Hellman et al. (1995) beschriebenen Methoden leicht verändert. Die ausgeschnittenen Proteinstücke wurden zunächst dreimal mit 40 %iger (v/v) 1-Propanol-Lösung gewaschen, indem 250 µl des 40 %igen 1-Propanol zu dem ausgeschnittenen Coomassie Brillant Blau gefärbten Gelstück gegeben wurden. Das Gelstück wurde 10 Minuten bei 30° C unter Schütteln inkubiert.

Danach wurde die Lösung jeweils abgesaugt und verworfen. Nach weiterem zweimaligen Waschen für jeweils 5 Minuten in 250 µl 0,2 M NH_4HCO_3 / 50 % (v/v) Acetonitril wurde die Waschlösung entfernt und das Gelstück in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Durch Zugabe von 5 µl 0,2 M NH_4HCO_3 wurde die Rehydrierung der ledrigen weißen Gelstückchen initiiert, so dass die danach zugefügten 5 µl Trypsinlösung (0,1 µg Trypsin / µl 0,2 M NH_4HCO_3) sofort aufgesaugt wurden. Eine vollständige Rehydrierung wurde durch die Zugabe von zweimal 25 µl einer 0,2 M NH_4HCO_3-Lösung im Abstand von 3 Minuten erreicht. Nach kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei RT wurde dieser Ansatz für 20 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde der Überstand kurz zentrifugiert, abgenommen und aufbewahrt. Die sedimentierten Gelstückchen wurden mit 10 µl Trifluoressigsäure (TFA) versetzt, 5 Minuten mit 15000*x* g bei RT zentrifugiert und zweimal mit 200 µl 60 % (v/v) Acetonitril / 0,05 % TFA für 40 min bei RT unter Schütteln extrahiert. Sämtliche Überstände wurden vereint und mittels Vakuumzentrifugation bis zur Trockenheit eingeengt.

2.12.2 Auftrennung der Spaltpeptide durch HPLC

Die aus tryptischem Verdau stammenden Peptide wurden durch eine „*reverse phase*“ HPLC aufgetrennt und die den Peptidspitzen entsprechenden Eluate wurden in Fraktionen gesammelt. Die Detektion der Peptide beruht auf der Lichtabsorption bei 215 nm Wellenlänge. Die chromatographische Auftrennung der Peptide fand mit einem HPLC-System (Hewlett-Packard, Waldbronn) statt. Als Chromatographiesäule wurde eine Supelco-Säule Hypersil ODS 5 um 4,6 x 250 mm benutzt. Das Chromatogramm dauerte 90 Minuten und verlief über einen 82 minütigen, linearen Gradienten von 0,1 % (v/v) TFA bis 0,1 % TFA / 60 % (v/v) Acetonitril. In weiteren 5 Minuten wurde der Acetonitrilanteil des Laufmittels auf 80 % gesteigert und verblieb 2 Minuten auf diesem Niveau bis zum Ende des Chromatogramms. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mittels Vakuumzentrifugation getrocknet.

2.12.3 N-terminale Aminosäuresequenzbestimmung

Für die Ermittlung der Aminosäuresequenz wurden die Peptide in 0,1 % (v/v) TFA /60 % Acetonitril gelöst, auf einen „Peptid-Support“ (PVDF-Membran)

appliziert und getrocknet. Der „Peptid Support“ wurde in einer Sequenzieranlage (LF3000 Serie) der Firma Beckman verwertet und die darauf befindlichen Peptide wurden mittels Edman-Abbau N-terminal ansequenziert.

2.13 „Western Blotting“

Die immunologische Erkennung bestimmter Proteine mit Antikörpern wurde mit der Western-Blotting-Methode durchgeführt. Hierbei wurden Proteine zuerst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF) transferiert. Diese Membranen wurden danach mit den entsprechenden Antikörperlösungen behandelt. Für den Transfer von Proteinen aus dem Gel auf die Membran wurde die Nass-Transfermethode (Towbin et al. 1979) verwendet.

2.13.1 Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf PVDF-Membranen

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden in einem kontinuierlichen Puffersystem (Towbin et al. 1979) in einer Nass-Transferkammer (BioRad, MiniProtean II) auf PVDF-Membranen (Immobilon P, Porengröße 0,45 µm, Millipore, München) übertragen. Zur Vorbereitung mussten die PVDF-Membranen auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und durch kurzes Schwenken in Methanol benetzbar gemacht werden. Danach wurden sie mit Transferpuffer (20 % MeOH, 25 mM Tris, 192 mM Glycine, pH 8,3) gewaschen. Das Proteingel wurde für 5 Minuten in dem Transferpuffer equilibriert. Zwei auf Gelgröße geschnittene Chromatographiepapiere Whatman 3MM (Maidstone, UK) wurden mit Transferpuffer getränkt und alle Komponenten wurden, wie in Abb. 5 dargestellt, in einer Transferkassette (BioRad, München) zusammengesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten befanden.

Abb. 5: Anordnung der Komponenten für den Elektrotransfer von Proteinen im Nass-Transferverfahren.

Der Elektrotransfer wurde nach Herstellerangaben (BioRad, München) eine Stunde lang bei einer maximalen Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 350 mA durchgeführt. Lokalen Überhitzungen wurde durch Einsetzen des Kühlelementes entgegengewirkt. Nach dem Transfer wurde der Blot direkt für die Immundetektion von Proteinen verwendet.

2.13.2 Immunodetektion von Proteinen im Western Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten (2.10.2) und auf PVDF-Membran immobilisierten Proteine (2.13.1) wurden mit spezifischen primären Antikörpern markiert, welche wiederum von sekundären Antikörpern erkannt wurden, die an ein Enzym gekoppelt waren, dessen Aktivität mit der Bildung eines Farbstoffs verbunden war.

Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran für 15 Sekunden in Methanol gewaschen und danach über Nacht in Blockierungslösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in „Tris buffered saline“ (TBS), 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl) inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal 10 Minuten mit TBS gewaschen. Der erste Antikörper wurde in Blockierungslösung verdünnt, auf die Membran gegeben und für ca. 2 Stunden inkubiert. Nach Entfernen der Antikörperlösung mussten die unspezifisch gebundenen Antikörper durch Waschen entfernt werden. Dazu wurden einmal 10 Minuten in TBST (TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20) und zweimal 10 Minuten in TBS unter Schütteln inkubiert. Der zweite Antikörper wurden ebenfalls in Blockierungslösung verdünnt auf den Blot gegeben, 2 Stunden inkubiert und

entsprechend gewaschen. Der sekundäre Antikörper war an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, die zur Entwicklung von Chemielumineszenz genutzt wurde. Die Bestandteile der Chemielumineszenz-Lösung ist in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Chemilumineszenz-Reagenz

Substanz	Hersteller	Stammlösung	Endkonzentration
Luminol	Roth, Karlsruhe	250 mM in DMSO	2,5 mM
p-Cumarsäure	Roth, Karlsruhe	90 mM in DMSO	0,4 mM
Tris	Roth, Karlsruhe	1 M, pH 8,5	100 mM
H_2O_2	Hedinger, Stuttgart	30 %	0,009 %

Wasserstoffperoxid wurde kurz vor der Benutzung zu der Lösung gegeben, um eine Aktivierung für die Peroxidase des sekundären Antikörpers zu bewirken. Die Inkubation der Membran wurde möglichst vom Licht abgeschirmt durchgeführt und dauert 30 Sekunden bei RT. Danach wurde die Membran abgetropft, in Klarsichtfolie eingeschlagen und in einer Filmkassette auf einem Film (Biomax light-1, Kodak) für wenige Sekunden bis maximal eine Stunde exponiert.

2.14 Bestimmung oxidativ veränderter Proteine

Wenn freie Sauerstoffradikale in Erscheinung treten, besteht die Möglichkeit, dass Proteine von ihnen angegriffen und modifiziert werden. Als eine Folge dieses Angriffs können z.B. Carbonyle (Ketone und Aldehyde) in die Proteinstruktur eingeführt werden. Ein Nachweis dieser Carbonylgruppen kann mittels der Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin geführt werden (Levine et al. 1994).

Abb. 6: Derivatisierung von Carbonylen mit dem Reagenz 2,4-Dinitrophenylhydrazin (Hanna, 1966) R1 und R2 stellen hier die Aminosäuren dar.

Für die Extraktion der Proteine, wurde der Extraktionspuffer aus Kapitel 2.6.1 verwendet, nur wurde hier, um oxidative Prozesse während der Aufarbeitung zu verhindern, 50 mM DTT eingesetzt. Das eingesetzte Blattmaterial wurde mit dem Extraktionspuffer (Verhältnis 1:2 w/v) und ein wenig Seesand bei RT gemörsert und sofort auf Eis gestellt. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 4° C und 15000*x* g wurden die Überstände in ein neues Gefäß überführt und ein Teil daraus für die Proteinbestimmung nach Bradford benutzt (Kap. 2.9). Identische Proteinmengen wurden nun zur Derivatisierung und Gelelektrophorese eingesetzt.

In je einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden folgende Reagenzien für maximal 30 Minuten bei RT geschüttelt:

1 Volumen Proteinextrakt

1 Volumen 12% SDS

2 Volumina DNPH- bzw. Kontroll-Lösung (10 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 M HCl bzw. 2 M HCl)

Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit 1,5 Volumina der Neutralisierungslösung (2 M Tris incl. 30% Glyzerin) gestoppt und die Gefäße wurden auf Eis gestellt. Die Neutralisierungslösung diente gleichzeitig als Beladungspuffer für das SDS-Gel. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel nicht wie üblich erhitzt, ansonsten wurde die Gelelektrophorese, wie in Kap. 2.10.2 beschrieben, durchgeführt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese geblottet (Kap. 2.13.1) und die derivatisierten Proteine wurden durch Immunodetektion (Kap. 2.13.2) mit Antikörpern gegen DNP nachgewiesen. Der primäre Antikörper (Sigma, Deisenhofen) war aus Kaninchen und wurde in der Verdünnung 1:300

eingesetzt. Der sekundäre Antikörper war ein aus Ziege gewonnener Anti-Kaninchen Antikörper der mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war und wurde in der Verdünnung 1:5000 eingesetzt.

2.15 Messung der Nettophotosynthese

Die Nettophotosynthese wurde durch Gaswechselmessungen mit dem tragbaren Photosynthese System HCM-1000 (Walz, Effeltrich) bestimmt. Die Pflanzen wurden dazu durch die integrierte Lichtquelle mit 500 µmol m^{-2} s^{-1} bestrahlt. Die Photosynthesemessungen wurden in der Mitte der Lichtperiode durchgeführt, da eine Abstimmung mit Phloemexsudatnahmen gewährleistet werden sollte, die eine starke Lichtabhängigkeit aufwiesen. Das System bestimmte während der Messung den Wasser und CO_2-Gehalt der Luft. Die in die Messküvette strömende Außenluft und die wieder herausströmende Luft wurden separat gemessen und verglichen. Mit der durch die Küvette begrenzten Blattfläche, der Zeit und den Gaswechselmessungen wurde die Nettophotosynthese sowie die Transpiration des Blattes berechnet.

2.16 Zuckeranalyse

2.16.1 Extraktion der löslichen Zucker und der Stärke

Die Konzentration löslicher Zucker bzw. der Stärkegehalt wurde mit einem enzymatischen Test (Bergmeyer und Bernt, 1974) bestimmt. Siebröhrenexsudat konnte dafür direkt eingesetzt werden, während die Zucker im Blattgewebe von *Ricinus communis* L. erst extrahiert wurden und die Stärke zusätzlich aufgeschlossen werden musste.

Ein Blattextrakt wurde erstellt, indem das gefriergetrocknete Blattmaterial (ca. 5 mg TG) vorsichtig in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemahlen und anschließend mit 500 µl Extraktionspuffer versetzt wurde. Die Proben wurden 75 Minuten bei 70° C inkubiert, wobei nach 45 Mnuten eine kurze Durchmischung mit einem Vortex erfolgte. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge für 15 Minuten bei 15000*x* g wurde der Überstand abgenommen. Der Überstand enthielt die löslichen Zucker des Blattes und konnte bis zur Analyse bei –20° C gelagert werden.

Die Stärkekörner des jeweiligen Gewebes befanden sich im Pellet und wurden wie folgt aufgearbeitet. Zuerst wurde das Pellet gewaschen, indem der Ansatz nach Zugabe einer Waschlösung gevortext und anschließend 15 Minuten bei 15000*x* g zentrifugiert wurde. Die Waschlösung wurde jeweils verworfen. Der erste Waschschritt wurde mit 750 µl 80%igem Ethanol durchgeführt. Die beiden folgenden Waschschritte mit je 1 ml $H_2O_{bidest.}$. Das Reaktionsgefäß mit dem Pellet wurde nun gewogen, mit 1 ml $H_2O_{bidest.}$ versetzt und 4 Stunden bei 120° C inkubiert. Die Stärkekörner sollten auf diese Weise aufgeschlossen werden, so dass eine vollständige Degradation durch die Enzyme Amylase und Amyloglucosidase gewährleistet werden konnte. Nach der Hitzebehandlung wurden Reaktionsgefäß und Probe ein weiteres Mal gewogen. Die Differenz ergab das Extraktionsvolumen. Sicherheitshalber wurde das Pellet im Extrakt behalten und in der Hydrolyse der Stärke eingesetzt.

2.16.2 Bestimmung des Gehaltes löslicher Zucker

Die löslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose konnten in einem gekoppelten enzymatischen Test quantifiziert werden, der die Reduktion von NADP zu NADPH zur Folge hatte. Das Auftreten von NADPH in der Reaktionslösung führte zu einer Extinktionsänderung bei 340 nm, die in einem Spektralphotometer gemessen wurde.

Die enzymatische Reaktion zur Bestimmung der Zuckergehalte wurde in Einweg-Halbmikroküvetten durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 500 µl Reaktionspuffer (100 mMTricin-KOH, pH 8 mit 10 mM $MgCl_2$) sowie je 20 µl 50 mM ATP und 25 mM NADP. Mit einigen Mikrolitern Extrakt und H_2O_{bidest}. wurde der Reaktionsansatz auf 1 ml gebracht. Nach Zugabe von 5 µl Hexokinase (0,14 U/µl) wurde der Nullwert im Spektralphotometer bestimmt. Die Ermittlung des Glukosegehaltes erfolgte durch das Hinzupipettieren von 5 µl Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (0,07 U/µl). Nach ca. 15 Minuten erreichten die Extinktionen einen konstanten Wert, der protokolliert wurde. Aus der Differenz zum Nullwert wurde der Glukosegehalt bestimmt. Diese Reaktion verbrauchte die gesamte Glukose im Ansatz, so dass durch die Zugabe von 5 µl Phosphoglukose-Isomerase (0,07 U/µl) eine weitere Extinkionsänderung eintrat, die allein durch den Fruktosegehalt bewirkt wurde.

Die beschriebenen Reaktionen sind in Abb. 7 schematisch dargestellt:

Abb. 7: Wenn die Enzyme in der Reihenfolge Hexokinase, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Phosphoglukose-Isomerase zum Reaktionsansatz zugegeben und die Extiktionsänderungen verfolgt wurden, konnten Glukose und Fruktose in einem Ansatz gemeinsam gemessen werden.

Der Saccharosegehalt des Extraktes wurde in einem parallelen Ansatz auf die gleiche Weise ermittelt, nur dass dem in Abb. 7 beschriebenen Reaktionsverlauf noch die Spaltung der Saccharose in Glukose und Fruktose vorgeschaltet war. Bei Einsatz von 30 µl des Extraktes in der Saccharosespaltung führten 10 µl Invertase (0,5 U/µl) in 100 µl 20 mM MES-KOH, pH 5,5 nach 15 Minuten bei Raumtemperatur zu einer vollständigen Spaltung. Als Kontrolle diente eine Saccharoselösung bekannter Konzentration. Der gesamte Ansatz wurde nun der oben beschriebenen Hexosebestimmung unterworfen. Die Gehalte der löslichen Hexosen aus den Parallelansätzen mussten von dem erhaltenen Wert subtrahiert werden, um den Gehalt der aus Saccharose freigesetzten Hexosen zu errechnen.

2.16.3 Bestimmung des Stärkegehaltes

Die Stärke des in Kap 2.16.1 gewonnenen Extraktes musste ebenso wie die Saccharose durch eine Vorinkubation in Hexosen gespalten werden. Durch die Waschschritte bei der Extraktion waren jedoch keine störenden freien Hexosen mehr im Extrakt. Der Extrakt mit dem Pellet (maximal 1 ml) wurde mit 500 µl 100 mM Natrium-Acetat-Puffer, pH 4,8 versetzt und gemischt. Danach wurden je 10 µl der Enzyme Amyloglukosidase (0,2 U/µl) und alpha-

Amylase (0,7 U/µl) (Roche, Mannheim) zugegeben. Während der Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Stärke vollständig in Glukosemoleküle gespalten. Die Bestimmung der Glukose erfolgte wie oben beschrieben.

Die Berechnung des gebildeten NADPH erfolgte nach dem Lambert-Beer´schen Gesetz.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Mit dem Extinktionskoeffizienten (ε bei 340 nm Lichtwellenlänge) von 6,3 mM^{-1} cm^{-1}, einer Schichtdicke (d) von 1 cm und der photometrisch bestimmten Extinktion (E) ergibt sich nach folgender Rechnung die Konzentration (c):

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} = \frac{E}{6{,}3} \quad [mM]$$

2.17 Elementanalyse

Um eine Beschreibung alterungsspezifischer Änderungen in der Blattzusammensetzung geben zu können, sollten auch die Gehalte verschiedener Elemente bestimmt werden. Dazu gehören auch die für den Metabolismus und den Stoffaustausch über das Phloem wichtigen Elemente Kohlenstoff und Stickstoff.

2.17.1 Kohlenstoff und Stickstoffanalyse

Das Pflanzenmaterial für die Bestimmung von Kohlenstoff und Stickstoff wurde von unterschiedlich alten Blättern ungefähr drei Monate alter Rizinuspflanzen genommen. Die Probennahme erfolgte durch Ausstechen von Blattscheiben mit einem Korkbohrer von 1 cm Durchmesser. Die Blattscheiben wurden im Trockenschrank bei 80° C getrocknet und gemahlen. Nach dem Mahlen wurden sie ein weiteres Mal für einige Stunden im Trockenschrank getrocknet und zur Analyse gegeben. Die Kohlenstoff und Stickstoffanalyse wurde von Frau Wartinger im Lehrstuhl für

Pflanzenökologie durchgeführt. Es wurde ein CN-Analysator (NA 1500, Carlo Erba, Mailand, Italien) verwendet.

2.17.2 Bestimmung von Anionen und Kationen

Die Entnahme des Pflanzenmaterials erfolgte wie oben beschrieben mit dem Korkbohrer. Die getrockneten Blattscheiben wurden für die Analyse in das Bayreuther Institut für Ökosystemforschung (BITÖK) gegeben. Dort wurde das Blattmaterial mittels Hochdruckverascher (HPA-S, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) aufgeschlossen und der Gehalt der Elemente Kalium, Kalzium, Magnesium, Phosphor und Schwefel im ICP-AES-System (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Photosynthese

Das auffälligste Anzeichen der Blattseneszenz ist der Abbau des Chlorophylls. In alternden Rizinusblättern sank der Chlorophyllgehalt mit einem Alter von 40 Tagen deutlich ab. Das Chlorophyll a/b-Verhältnis als Indikator für die Anteile von Photosystem I und II sank bereits ab dem 15. bis 20. Tag und weist auf den Abbau des PS I und der Stromathylakoide hin (Széderkenyi 1998). Die Veränderung des Chlorophyllgehaltes wirkt sich auf die Photosyntheseleistung des Blattes aus. Aus diesem Grund sollten verschiedene Parameter der Photosynthese durch Gaswechselmessungen an unterschiedlich alten Rizinusblättern bestimmt werden:

- die Nettophotosyntheserate (um den Betrag der Atmungsintensität geminderte Photosyntheserate)
- die Transpirationsrate
- die Stickstoffnutzungseffizienz der Photosynthese

3.1.1 Die Nettophotosyntheserate in alternden Rizinusblättern

Die Nettophotosyntheseraten in unterschiedlich alten Rizinusblättern waren zwar starken Schwankungen unterworfen, zeigten jedoch einen eindeutigen Trend zur Abnahme schon ab einem Blattalter von 20 Tagen (Abb. 8). Zu diesem Zeitpunkt waren die Blätter bei vorliegenden Anzuchtsbedingungen gerade ausgewachsen und zeigten keine Flächenzunahme mehr.

Abb. 8: Nettophotosyntheserate [µmol/m²s] der Blätter von vier verschiedenen Rizinuspflanzen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Die Nettophotosyntheserate wurde mittels Gaswechselmessung bestimmt.

3.1.2 Die Transpiration des Ricinus communis Blattes

Die Transpiration beschreibt die Wasserabgabe des Blattes, die überwiegend über die Spaltöffnungen stattfindet. Durch die Transpiration wird unter anderem der Öffnungsstatus der Stomata beschrieben. Somit ist die Transpiration also auch ein Wert für die Erreichbarkeit von CO_2, wenn nicht andere Gründe, wie z.B. eine unterschiedliche Wasseraufnahme der Blätter die Transpiration beeinflussen.

Die Transpirationrate älterer Rizinusblätter war wesentlich geringer als die Transpirationrate der jungen Blätter (Abb. 9). Auffällig war vor allem das Absinken der Transpiration, nachdem das Blatt im Alter von 20 bis 25 Tagen seine endgültige Fläche erreicht hatte.

Abb. 9: Transpirationrate [mmol/m²s] der Blätter vier gleich alter Rizinuspflanzen. Die Transpirationsrate wurde im Rahmen der Gaswechselmessungen bestimmt.

3.1.3 Die Stickstoffnutzungseffizienz der Photosynthese

In natürlicher Umgebung limitiert Stickstoff häufig das Wachstum von Pflanzen (Marschner 1995). Der Rubisco-Anteil macht bis zu 45 % des löslichen Proteins einer Zelle aus und hat somit einen großen Anteil am Gesamtstickstoffgehalt des Blattes (Wittenbach 1979). Es gibt also einen direkten Verknüpfungspunkt der Stickstoffversorgung der Pflanze mit der photosynthetischen Kapazität der Pflanze, die als Stickstoffnutzungseffizienz bezeichnet wird (Hirose 1984). Die Stickstoffnutzungseffizienz der Photosynthese in Rizinusblättern sank mit zunehmendem Alter deutlich ab (Abb. 10). Mit dem im Alter abnehmenden Stickstoffgehalt im Rizinusblatt (Abb. 11) sank auch die Nettophotosyntheserate (Abb. 8). Der Verlust der Photosyntheseaktivität war jedoch nicht proportional zum Stickstoffverlust des Blattes, sondern sank stärker ab. Die Nettophotosyntheserate nahm um den Faktor 4 ab, während der Stickstoffgehalt des Blattes im Alter um den Faktor 2 erniedrigt war.

Abb. 10: Stickstoffnutzungseffizienz der Photosynthese. Die Nettophotosyntheserate aus den Gaswechselmessungen wurde gegen den Stickstoffgehalt des Blattes aufgetragen. Die Blattproben wurden in Intervallen von jeweils 10 Tagen in Kategorien zusammengefasst.

3.2 Stickstoff in Blättern von *Ricinus communis* L.

3.2.1 Stickstoffgehalt in Rizinusblättern

Stickstoff ist eines der häufigsten Nährelemente der pflanzlichen Zelle, das in wichtigen Verbindungen, wie Aminosäuren, Proteinen und Nukleinsäuren vorkommt. Stickstoffmangel führt zu einer Hemmung des Wachstums. Einige der Stickstoffverbindungen sind für den Transport von Stickstoff innerhalb der Pflanze von Bedeutung (Glutamin und Asparagin Kap. 3.2.5), andere haben Einfluss auf den Metabolismus (Kap. 3.1.3).

In der Rizinuspflanze veränderte sich mit dem Alter auch die stoffliche Zusammensetzung ihrer Blätter. Assimilation und Export von Stickstoff aus dem Rizinusblatt verändern den Stickstoffgehalt. In Abb. 11 ist der abnehmende Stickstoffgehalt von Rizinusblättern mit zunehmendem Alter dargestellt. Der kontinuierliche Verlust von Stickstoff aus dem Blatt machte bei den vorliegenden Anzuchtbedingungen bis zu 50 % des Blattstickstoffes aus.

Abb. 11: Stickstoffgehalt [mmol/g TG] in Rizinusblättern. Von drei gleich alten Pflanzen wurden jeweils fünf unterschiedlich alte Blätter untersucht. Die getrockneten Blattproben wurden im CN-Analysator untersucht.

3.2.2 Nitrat-Analyse

3.2.2.1 Nitratgehalt im Blattgewebe

Die Remobilisierung von Stickstoffverbindungen ist eine wesentliche Aufgabe des alternden Blattes. Einmal assimilierter Stickstoff soll nicht durch den Blattabwurf verloren gehen. *Ricinus communis* nimmt den Stickstoff in Form von Ammonium und Nitrat auf und transportiert ihn mit dem Xylemstrom in die gesamte Pflanze. In der Wurzel, und in sehr starkem Maße auch im Blatt, wird dieser Stickstoff durch die Aktivität der Nitratreduktase zu Nitrit reduziert. Das durch Nitritreduktion entstandene Ammonium wird von der Glutaminsynthetase letztendlich zu Glutamin umgewandelt. Die intrazelluläre Nitratkonzentration ergibt sich aus der Bilanz von Nitrataufnahme und –reduktion (Quilleré et al. 1994).

In Rizinusblättern sank der Nitratgehalt mit zunehmendem Alter drastisch ab, war schon an Tag 20 nur noch marginal und blieb dann auf einem sehr niedrigem Niveau (Abb. 12).

Abb. 12: Nitratgehalt im Blattgewebe von *Ricinus communis.* Blattproben verschieden alter Blätter aus parallel angezogenen Pflanzen (n=4) wurden extrahiert und mittels UV-Detektion in der HPLC auf den Nitratgehalt hin untersucht.

3.2.2.2 Nitratkonzentration im Siebröhrenexsudat

Die Phloemmobilität von Nitrat wird als gering eingeschätzt (Peuke et al. 1996). Ein Teil des in der Wurzel aufgenommenen Nitrats wird vor Ort bereits reduziert. Der Langstreckentransport von der Wurzel in die Blätter findet im Xylem statt. Verglichen mit der Konzentration der Aminosäuren im Siebröhrenexsudat (Abb. 21) ist die Nitratkonzentration sehr gering. In den Siebröhren wird Stickstoff vorrangig in reduzierter Form transportiert.

Mit ihrer Abnahme in Exsudaten älterer Blätter korrelierte die Nitratkonzentration im prinzipiell mit dem Verlauf des Nitratgehaltes im Blattgewebe (Abb. 13). Möglicherweise handelt es sich um einen passiven Transport mit dem Assimilatstrom, der durch die Akkumulation des Nitrats im Blattgewebe hervorgerufen wurde.

Abb. 13: Nitratkonzentration im Siebröhrenexsudat von *Ricinus communis* L. Die Siebröhrenexsudate wurden durch Anritzen der Petiolen verschieden alter Blätter gewonnen (n = 3 Pflanzen). Nitrat wurde durch UV-Detektion in der HPLC nachgewiesen.

3.2.3 Nitratreduktase-Aktivität in Rizinusblättern

Der Nitratstoffwechsel findet sowohl in der Wurzel als auch im Spross und dort vor allem in den Blättern statt. Der Anteil von Wurzel und Spross an der Nitratassimilation ist von der Pflanzenart und dem Nitratangebot abhängig (Lambers 1986, Marschner 1995).

Der größte Teil des Nitrates wird bei *Ricinus communis* L. in den Blättern reduziert. Hier war auch die Nitratreduktase-Aktivität (NRA) der Rizinuspflanzen, bezogen auf das Trockengewicht, am höchsten. Wurzeln wiesen eine deutlich geringere Aktivität auf (siehe Anhang). Die in Abb. 14 aufgetragene *in-vivo* Aktivität der Nitratreduktase des Blattes, zeigte den stärksten Nitratumsatz in jungen s*ource*-Blättern (ca. 20 Tage). Mit zunehmendem Blattalter nahm die Nitratreduktaseaktivität drastisch ab. Bei andauerndem Export von Stickstoff aus dem Blatt führte dies zu dem bereits beschriebenen Nettostickstoffverlust im Blatt, wie er in Abb. 11 dargestellt ist. In sehr jungen Blättern war die Nitratreduktaseaktivität ebenfalls sehr gering. Diese Blätter wurden über das Phloem mit reduzierten Stickstoffverbindungen versorgt.

Abb. 14: *In-vivo* Nitratreduktase-Aktivität [µmol NO_2^-/h*g TG] in *Ricinus communis* Blättern. Durchgeführt nach der Prozedur von Gebauer et al. 1984.

3.2.4 Glutaminsynthetase-Aktivität in Rizinusblättern

Die Glutaminsynthetase (GS) ist ein oktameres Enzym, das den Transfer von Stickstoff aus Ammoniumionen auf Glutamat katalysiert. Mit dieser Aufgabe spielt es eine wichtige Rolle im Stickstoffhaushalt der Pflanze und unterliegt einer vielschichtigen Regulation. Eine der Hauptaufgaben der Glutaminsynthetase ist die Reassimilierung des durch Photorespiration freiwerdenden Ammoniums (Heldt 1996). Diese Aufgabe, sowie die Assimilierung des über das Xylem angelieferten Stickstoffs, findet hauptsächlich in den Chloroplasten statt und wird durch die GS2 katalysiert. Im Zuge der Seneszenz wird der Rückgang von GS2-Expression und GS2-Aktivität und das verstärkte Auftreten der cytosolischen Glutaminsynthetase GS1 beobachtet (Kamachi et al. 1991). Die Glutaminsynthetase-Aktivität in Rizinusblättern wurde mit Hilfe von nativen Aktivitätsgelen untersucht. Bei gleicher Proteinmenge der Blattextrakte zeigte sich ein qualitativer Unterschied in der Aktivität der beiden GS-Formen. In Blättern mittleren Alters (25 und 32 Tage) gab es ausschließlich GS2 Aktivität. Im Blattextrakt alter Blätter (41 und 48 Tage) hingegen, war zusätzlich die Aktivitätsbande der GS1 zu sehen (Abb. 15). Die unterschiedliche Lage der GS2-Banden beruhte auf dem Laufverhalten der Proteinextrakte (siehe Auftragskontrolle).

Abb. 15: GS-Aktivitätsfärbung (nach Rhodes et al. 1975) eines mittels nativer Gelelektrophorese aufgetrennten Blattextraktes aus *Ricinus communis* L. Darunter das gleiche Gel mit Coomassie Brillant Blau gefärbt. (In den 12 und 18 Tage alten Blättern war die Proteinkonzentration sehr gering.)

3.2.5 Aminosäuren

3.2.5.1 Aminosäuregehalte im Blattgewebe

Der assimilierte Stickstoff kann ausgehend von Glutamat bzw. Glutamin in verschiedene Aminosäuren umgewandelt und so für die Proteinbiosynthese nutzbar gemacht werden. Die Untersuchung der freien Aminosäuren des Blattes kann Aufschlüsse über den physiologischen Zustand des Blattes und dessen Stickstoffversorgung liefern. So geben z.B. die Mengenverhältnisse verschiedener Aminosäuren zueinander Auskunft über die Stickstoffversorgung, die Photorespiration des Blattes oder den Transport von Stickstoff in der Pflanze. Bei der Betrachtung der Verhältnisse einzelner Aminosäuren zueinander ist der absolute Gehalt der Aminosäuren jedoch nicht zu vernachlässigen.

Die Rizinuspflanzen wiesen in den jüngsten Blättern den höchsten Gehalt an Aminosäuren (AS) auf (Abb. 16). Mit zunehmendem Blattalter sank der Aminosäuregehalt der Blätter nahezu linear ab. Die Werte für die AS-Gehalte in unterschiedlichen Pflanzen waren sehr verschieden, alle untersuchten Pflanzen wiesen jedoch die gleiche altersbedingt abnehmende Tendenz in den AS-Gehalten ihrer Blätter auf.

Abb. 16: Gesamtaminosäuregehalte [µmol/g FG] im Gewebe unterschiedlich alter Rizinusblätter aus vier gleich alten Pflanzen. Die Aminosäuregehalte wurden nach Derivatisierung mit o-Phtalsäuredialdehyd in der HPLC mit Fluoreszenz-Detektor ermittelt.

Neben dem Gesamtgehalt der freien Aminosäuren ist auch deren Zusammensetzung interessant. Zum Beispiel lässt das Verhältnis von Serin zu Glyzin auf den Einfluss der Photorespiration schließen. Während der photorespiratorischen Regeneration des in 2-Phosphoglyzerat festgelegten Kohlenstoffs kommt es zu verschiedenen katabolischen und anabolischen Prozessen der Aminosäuren Glyzin und Serin in den Peroxisomen und in den Mitochondrien. Die Photorespiration übt auf diese Weise einen Einfluss auf die Aminosäuregehalte im Blattgewebe aus.

Im Falle von *Ricinus communis* war im jungen Blatt ein deutlicher Unterschied zwischen dem Serin- und dem Glyzingehalt festzustellen (Abb. 17). Mit zunehmendem Alter gleichen sich die Gehalte dieser beiden Aminosäuren mehr und mehr an. Der Seringehalt glich im Verlauf der altersabhängigen Abnahme der Nettophotosynthese (Abb. 8), könnte also durchaus durch den Photosyntheseapparat beeinflusst sein. Die Aminosäure Glyzin hingegen war in allen unterschiedlich alten Blättern in dem gleichen Gehalt vorzufinden.

Abb. 17: Serin- und Glyzingehalt [µmol/g FG] im Gewebe unterschiedlich alter Rizinusblätter aus vier gleich alten Pflanzen. Die Aminosäuregehalte wurden nach Derivatisierung mit o-Phtalsäuredialdehyd in der HPLC mit Fluoreszenz-Detektor ermittelt.

Nach der Assimilation von Stickstoff in Glutamin und Glutamat folgen Transaminierungsschritte zur Synthese weiterer Aminosäuren. Durch das Verhältnis der zwei-Aminogruppen-tragenden Aminosäuren Glutamin und Asparagin zu ihren korrespondierenden Aminosäuren mit nur einer Aminogruppe (Aspartat und Glutamat) lässt sich die Stickstoffversorgung des betreffenden Gewebes ablesen. Bei hohem N-Angebot dominieren Asparagin und Glutamin, während Aspartat und Glutamat bei N-Mangel überwiegen.

Im Blattgewebe von Rizinuspflanzen blieb das Verhältnis von Glutamin zu Glutamat stets unter dem Wert eins. Im sehr jungen Blättern gab es große Schwankungen im Glutamin/Glutamat-Verhältnis. Ab einem Blattalter von 20 Tagen blieb das Glutamin/Glutamat-Verhältnis in den unterschiedlich alten Blättern bei einem Wert von 0,1 bis 0,2 annähernd gleich.

Abb. 18: Verhältnis von Glutamin zu Glutamat im Blattgewebe von Rizinuspflanzen (n=4). Die Aminosäuregehalte wurden nach Derivatisierung mit o-Phtalsäuredialdehyd in der HPLC mit Fluoreszenz-Detektor ermittelt.

Das Amid Asparagin hat mit nur 4 C-Atomen ein günstigeres Kohlenstoff zu Stickstoffverhältnis als Glutamin und wird bei vielen Pflanzen gebildet, wenn eine gute Stickstoffversorgung vorliegt.

Bei *Ricinus communis* L. ist Asparagin als Stickstofftransportform von geringer Bedeutung. Das Verhältnis von Asparagin zu Aspartat im Blattgewebe war noch niedriger als das Glutamin/Glutamat-Verhältnis. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Asparagin/Aspartat-Verhältnis mit zunehmendem Blattalter eine steigende Tendenz. Der Asparagingehalt der Blätter überstieg aber nie den Aspartatgehalt (Abb. 19). Der Gehalt von Asparagin und Aspartat im Blattgewebe sank mit zunehmendem Alter ab (siehe Anhang). Im Vergleich mit dem Glutamingehalt unterschiedlich alter Blätter kam Asparagin in Rizinus nur in geringen Mengen vor. Durch die starke Abnahme des Glutamingehaltes in älteren Blättern kam es mit höherem Blattalter zu einer Angleichung auf niedrigem Niveau (siehe Anhang). Der Aspartat- und Glutamatgehalt in Rizinusblättern nahm mit zunehmendem Blattalter ab. Der Glutamatgehalt war in jüngeren Blättern etwas höher als der Aspartatgehalt.

Abb. 19: Verhältnis von Asparagin zu Aspartat im Blattgewebe unterschiedlich alter Blätter von Rizinuspflanzen (n=4). Die Aminosäuregehalte wurden nach Derivatisierung mit o-Phtalsäuredialdehyd in der HPLC mit Fluoreszenz-Detektor ermittelt.

3.2.5.2 Aminosäurekonzentrationen im Siebröhrenexsudat

Nach der Assimilation von Stickstoff ist die Aminogruppe des Glutamins der Ausgangspunkt für die Synthese vieler weiterer Aminosäuren (AS). Im Phloem werden alle Aminosäuren transportiert. Die Haupttransportform von reduziertem Stickstoff im *Ricinus communis* L.-Keimling ist jedoch das Glutamin (Schobert und Komor 1989). Asparagin, das bei anderen Pflanzen eine wichtige Rolle im Stickstofftransport spielt, ist für *Ricinus communis* L. weniger bedeutend.

Auch bei erwachsenen Rizinuspflanzen war das Glutamin die vorherrschende Aminosäure im Siebröhrenexsudat (Abb. 20). Die Verteilung der Aminosäuren im Siebröhrenexsudat stimmte nicht mit den Aminosäuregehalten im Blattgewebe überein. Im Blattgewebe lag ein niedriger Glutamingehalt vor, während Glutamat immer stärker vertreten war (Abb. 18). Der Glutamingehalt des Blattgewebes, umgerechnet in eine Konzentration, war ungefähr 10fach niedriger als die Glutaminkonzentration des Siebröhrenexsudats aus Petiolen. Glutamin wurde also aktiv gegen das Konzentrationsgefälle in die Siebröhren beladen.

Abb. 20: Aminosäuren im Siebröhrenexsudat unterschiedlich alter Blätter. Die Auftragung der Aminosäuren wurde entsprechend ihres Elutionsprofils in der HPLC durchgeführt. Exsudate verschiedener Pflanzen wurden für die Analyse vereinigt.

Die Konzentrationen von Glutamin und Glutamat in den Siebröhren verhielten sich mit steigendem Alter gegenläufig. Während die Konzentration des Glutamats leicht anstieg, nahm die Glutaminkonzentration im Siebröhrenexsudat deutlich ab. Das Verhältnis von Glutamin zu Glutamat nahm um den Faktor 6 ab (Tab. 5 und Abb. 20).

Tab. 5: Verhältnis von Glutamin zu Glutamat (± Mittelabweichung) im Siebröhrenexsudat verschieden alter Blätter. Die Exsudate verschiedener Pflanzen wurden nach Alterskategorien vereinigt. Die Aminosäuregehalte wurden nach Derivatisierung mit o-Phtalsäuredialdehyd in der HPLC mit Fluoreszenz-Detektor ermittelt.

Blattkategorie	Glutamin/Glutamat Verhältnis
Jung (~10 Tage)	16,22 ± 6,70
Mittel (~20 Tage)	5,77± 1,63
Alt (~35 Tage)	2,72 ± 0,60

Die Summe der Konzentration aller übrigen Aminosäuren im Siebröhrenexsudat, blieb relativ konstant. Die Abnahme des Aminosäurestickstoff im Siebröhrenexsudat war letztlich allein auf den Rückgang des Glutamins zurückzuführen. Glutamin blieb zwar die mengenmäßig vorherrschende Aminosäure im Siebröhrenexsudat, das Verhältnis der Glutaminkonzentration zur Summe der übrigen Aminosäurekonzentrationen kehrte sich jedoch im Verlauf der Blattentwicklung um (Abb. 21).

Abb. 21: Anteil des Glutamins an den Gesamtaminosäuren im Siebröhrenexsudat unterschiedlich alter Blätter (± Mittelabweichung). Die Blattkategorien setzen sich aus vereinigten Blattexsudaten junger (ca. 10 Tage), mittlerer (ca. 20 Tage) und alter Blätter (ca. 35 Tage) zusammen. Die Aminosäuregehalte wurden nach Derivatisierung mit o-Phtalsäuredialdehyd in der HPLC mit Fluoreszenz-Detektor ermittelt.

3.3 Untersuchungen zum Oxidationsstatus alternder Rizinuspflanzen

Der bei tierischen Systemen beschriebene, mit der Alterung einhergehende, oxidative Stress und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen während des programmierten Zelltodes, wurde im pflanzlichen System bei der Pathogenabwehr beobachtet (Pennell und Lamb, 1997). Reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) werden als Auslöser von Seneszenzvorgängen diskutiert, da sie durch ihre zerstörerische Wirkung auf lebensnotwendige Zellbestandteile, wie z. B. Enzyme, DNA oder RNA, die Lebensspanne einer Zelle bzw. eines Gewebes oder Organs mitbestimmen. Aus diesem Grund sollte der oxidative Zustand in unterschiedlich alten Blättern anhand verschiedener Untersuchungen aufgeklärt werden. Zum einen ist hier eine Erfassung des antioxidativen Potentials der Blätter sinnvoll und zum anderen sollten die Modifikationen, die möglicherweise durch oxidative Prozesse während der Seneszenz entstehen, beobachtet werden. Die Verfügbarkeit von Antioxidantien wirkt sich auf den oxidativen Zustand eines Blattes aus. Durch die Mehler-Reaktion der Photosynthese entsteht in den Chloroplasten das Peroxidradikal und daraus letztendlich Wasserstoffperoxid. Peroxisomen und Mitochondrien sind weitere Quellen für reaktive Sauerstoffspezies (Jiminez et al. 1998). Zum Abfangen solcher Radikale dienen Antioxidantien, wie Glutathion, Askorbat und Tocopherole.

3.3.1 Askorbatkonzentration bzw. –gehalt in Blatt und Phloem von Ricinus communis

Das quantitativ dominierende Antioxidant der pflanzlichen Zelle ist das Askorbat. Es kommt in allen subzellulären Kompartimenten, einschließlich des Apoplasten, vor (Smirnoff 2000). Als wasserlösliche Substanz kann das Askorbat im Phloem transportiert werden und auf diese Weise sowohl auf das Redoxpotential in den Siebröhren, wie auch im s*ink*-Gewebe wirken.

Zuerst wurde der Askorbatgehalt im Blattgewebe bestimmt. Die Auslösung der Seneszenz durch eine Veränderung des oxidativen Status des Blattgewebes würde eine Änderung im Gehalt und dem Reduktionsgrad der Antioxidantien in dem jeweiligen Organ erwarten lassen. In den Blättern von *Ricinus communis* L. zeigten sich jedoch keine dramatischen Änderungen in Abhängigkeit vom Alter (Abb. 22). Allerdings war ein geringer Anstieg des Askorbatgehaltes mit zunehmendem Blattalter zu verzeichnen. Der Reduktionsgrad lag bei 90 % und wurde nicht durch das Blattalter beeinflusst.

Abb. 22: Gehalt an reduziert vorliegendem Askorbat [µmol/g FG] im Blattgewebe unterschiedlich alter Blätter (n = 3 Pflanzen). Reduziertes Askorbat wurde durch UV-Detektion bei 265 nm in der HPLC gemessen.

Ausgehend von diesem Ergebnis sollte der Gehalt an reduziertem Askorbat im Siebröhrenexsudat unterschiedlich alter Blätter bestimmt werden, da dieses wasserlösliche Antioxidanz auch im Assimilatstrom des Phloems eine Rolle spielen könnte. Die höchste Konzentration des Askorbats im Siebröhrenexsudat aus Petiolen von Rizinusblättern war bei sehr jungen *sink*-Blättern zu finden (Abb. 23). Aus *source*-Blättern gewonnenes Siebröhrenexsudat enthielt geringere Konzentrationen, die sich mit zunehmendem Alter kaum noch änderten beziehungsweise leicht abnahmen.

Abb. 23: Konzentration an reduziertem Askorbat [mM] im Siebröhrenexsudat unterschiedlich alter Blätter. Siebröhrenexsudate wurden auf reduziert vorliegendes Askorbat untersucht (n = 4 Pflanzen). Das reduzierte Askorbat wurde durch UV-Detektion bei 265 nm in der HPLC gemessen.

3.3.2 Oxidationsstatus löslicher Proteine im Blattextrakt

Die Folge des Vorkommens reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle kann beispielsweise die oxidative Modifizierung von Proteinen sein. Solche carbonylierten Proteine werden von der Zelle in der Regel erkannt und bevorzugt abgebaut (Merker und Grune 2000). Zur Untersuchung oxidierter Proteine bedient man sich der Derivatisierung der Aldehyd- und Ketogruppen in den betroffenen Aminosäuren des Proteingrundgerüstes. Die Immunodetektion des Derivatisierungsreagenzes Dinitrophenylhydrazin (DNPH) im Westernblot ermöglicht danach die Erkennung von oxidierten Proteinbanden. Die Proteine in unterschiedlich alten Blättern von *Ricinus communis* L. zeigten einen homogenen Oxidationsgrad. Signalstärke sowie Proteinmuster ähnelten sich vom jüngsten bis zum ältesten Blatt (Abb. 24 A). Es wurden, abgesehen von Spur 1, gleiche Proteinmengen aufgetragen (siehe Abb. 24 B). Das Signal für die DNPH derivatisierten Proteincarbonyle ist ausschließlich von der aufgetragenen Proteinmenge abhängig.

Abb. 24: Nachweis von Proteincarbonylen in Proteinextrakten unterschiedlich alter *Ricinus communis* L. Blätter. A) Westernblot mit DNPH derivatisierten Proteinen, B) Coomassie Brillant Blau gefärbtes parallel angefertigtes SDS-Gel.

3.4 Elementanalysen alternder Blätter von *Ricinus communis* L.

3.4.1 Gehalte von Kalium, Phosphor, Schwefel, Kalzium und Magnesium im Blattgewebe

Für das Wachstum der Pflanzen spielt die Mineralstoffversorgung eine wichtige Rolle. Ein zu niedriger Mineralgehalt führt zu Mangelerscheinungen, aber auch ein Mineralstoffüberschuss begrenzt das Pflanzenwachstum. Elementanalysen sind hinsichtlich der Blattseneszenz aus zweierlei Gründen interessant. Zum einen können Elemente der älteren Blätter mobilisiert und in jüngere Blätter umverteilt werden. Andererseits wird seit langem diskutiert, ob der Abwurf des Blattes im Zuge der Alterung eine unvermeidliche Folge der Akkumulation nicht phloemmobiler Stoffe ist (Molisch, 1929). Daher sollte im Folgenden gezeigt werden, ob es während der Lebensspanne eines Rizinusblattes entweder zu einem solchen Verlust von Nährstoffen aus dem Blatt, oder zu einer Akkumulation, kommt. Beispielhaft wurden die Elemente Kalium, Kalzium, Schwefel, Phosphor und Magnesium untersucht.

Blattproben von *Ricinus communis* L.-Pflanzen wurden getrocknet und auf ihren Elementgehalt hin untersucht. Das nicht bzw. wenig phloemmobile Element Kalzium zeigte im Verlauf der Alterung einen steigenden Gehalt im Blattgewebe (Abb. 25 C). Schwefel kann in Form von organischen Verbindungen (z.B. Aminosäuren und Proteine) im Phloem transportiert werden. Trotzdem war ein deutlicher Anstieg des Schwefelgehaltes im alternden Blatt zu verzeichnen (Abb. 25 B). In gleicher Weise stieg auch der Magnesiumgehalt mit zunehmendem Blattalter an (Abb. 25 A), obwohl Magnesium als Ion eine hohe Phloemmobilität aufweist (Marschner 1995).

A)

B)

C)

Abb. 25: Gehalte [mg/g FG] an A) Calcium, B) Schwefel, C) Magnesium in unterschiedlich alten Rizinusblättern. Die Gehalte wurden mittels Atomemmissionsspektrometrie (AES) bestimmt.

Bei den phloemmobilen Elementen Kalium und Phosphor kam es zu keiner Nettoakkumulation im Blattgewebe (Abb. 26). Der höchste Gehalt dieser Elemente wurde nach Ende des Expansionswachstums erreicht (ca. 20 Tage). Danach sanken Kalium und Phosphorgehalte wieder ab und pendelten sich auf einem bestimmten Niveau ein. Es wurde also die gleiche Menge dieser Elemente, die in das Blatt aufgenommen wurde auch wieder in Form von organischen Verbindungen, oder als Ionen aus dem Blatt exportiert.

Abb. 26: Gehalt [mg/g FG] der Elemente A) Phosphor und B) Kalium in unterschiedlich alten Rizinusblättern. Die Gehalte wurden mittels Atomemmissionsspektrometrie (AES) bestimmt.

3.4.2 Kaliumkonzentration im Siebröhrenexsudat

Kalium ist ein wichtiges Element, das die Saccharosebeladung ins Phloem positiv beeinflusst und auch den Aminosäuretransport stimuliert (Marschner 1995). Bei der Stickstoffversorgung der Pflanze dient Kalium als Gegenion für den Transport von Nitrat im Xylem und wird im Phloem mit organischen Anionen zurück in die Wurzel befördert (Ben-Zioni et al. 1971).

Die Kaliumkonzentration im Siebröhrenexsudat liegt zwischen 60 und 80 mM und zeigte nur eine geringfügige Veränderung im Verlauf der Alterung der Blätter (Abb. 27). Diese Annahme entspricht prinzipiell den Kaliumgehalten im Blattgewebe (Abb. 26).

Abb. 27: Kaliumkonzentration [mM] im Siebröhrenexsudat verschieden alter Rizinusblätter. Kalium wurde mittels Atomemmissionsspektrometrie (AES) bestimmt.

3.5 Kohlenstoffanalyse in Blättern von *Ricinus communis* L.

Der Kohlenstoffgehalt der Blätter ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. Zum einen spielt natürlich die Photosyntheserate eine wichtige Rolle. Andererseits gehen Kohlenhydrate durch Atmung und durch Photorespiration als Kohlendioxid verloren. Überdies exportieren ausgewachsene Blätter Kohlenhydrate in nicht photosynthetisch aktive Gewebe und in Wachstumsbereiche der Pflanze, wie die Wurzel, junge Blätter, Stängel, Blüten und Samen.

Die durch die Photosyntheseleistung eines Blattes gewonnenen Kohlenhydrate werden durch das Phloem des *source*-Blattes exportiert. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, sank die Photosyntheserate mit zunehmendem Alter ab. Diese Tatsache sollte sich auch im Gehalt der Zucker und der Stärke des alternden Blattes widerspiegeln. Wenn im Gewebe Kohlenhydrate verbleiben und dort akkumulieren, sind sie imstande den Photosyntheseapparat zu beeinflussen und z.B. die Nettophotosynthese zu erniedrigen. Es wird sogar diskutiert, ob die Akkumulation von Zuckern und Stärke die Blattseneszenz beschleunigt (Paul und Foyer 2001).

3.5.1 Kohlenstoffgehalt in Rizinusblättern

Zuerst wurde der Gesamtkohlenstoffgehalt unterschiedlich alter Rizinusblätter bestimmt. Kohlenstoff ist für Photosynthese treibende Pflanzen nicht limitierend und ist mit bis zu 50% des Blatttrockengewichtes das dominierende Element im Blattgewebe. Wie in Abb. 28 dargestellt, blieb bei *Ricinus communis* der Kohlenstoffgehalt unterschiedlich alter Blätter nahezu gleich. Allerdings ist eine leichte altersabhängige Abnahme im Kohlenstoffgehalt zu verzeichnen, die allerdings im Vergleich zur Abnahme des Stickstoffgehaltes sehr gering ausfiel (vgl. Abb. 11).

Abb. 28: Kohlenstoffgehalt [mmol/g TG] in Rizinusblättern. Von drei Pflanzen wurden jeweils fünf unterschiedlich alte Blätter untersucht. Der Kohlenstoffgehalt wurde mittels CN-Analysator bestimmt.

3.5.2 Kohlenhydratgehalte im Blattgewebe von Rizinusblättern

Mittels eines gekoppelt-enzymatischen Tests wurden die Gehalte der wasserlöslichen Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose, sowie der Stärke im Blattgewebe bestimmt.

3.5.2.1 Hexosen

Der Einfluss der Kohlenhydrate auf den Metabolismus der Pflanze, sofern er nicht osmotisch bedingt ist, muss mit einem sensorischen System und Signaltransduktion einhergehen. Die Erfassung der Kohlenhydratgehalte könnte auf Ebene der Hexosen durch die Aktivität der Hexokinase erfolgen (Sheen 1990, Hensel et al. 1993). Im Folgenden wurde untersucht, ob altersabhängige Veränderung der Hexosegehalte in Rizinusblättern vorlagen.

Die im Gewebe von Rizinusblättern gemessenen freien Hexosen Glukose und Fruktose lagen dort in annähernd gleichen Gehalten vor (vgl. Abb. 29 A und B) Dieses 1:1 Verhältnis von Glukose und Fruktose war bei allen

unterschiedlich alten Blättern der erwachsenen Pflanze gleich. Die absoluten Gehalte von Glukose und Fruktose stiegen in den untersuchten Blättern mit zunehmendem Alter in gleicher Weise an. In den ältesten Blättern fand sich also eine Akkumulation der Hexosen.

A)

B)

Abb. 29: Glukose- und Fruktosegehalt [µmol/g TG] (inklusive der Hexosephosphate) in unterschiedlich alten Rizinusblättern (n = 4 Pflanzen). Die Bestimmung der Zucker erfolgte im NADPH-gekoppelten enzymatischen Test.

3.5.2.2 Saccharose

Der Transport von Kohlenhydraten aus dem Photosynthese treibenden Blatt wird bei *Ricinus communis* L. fast ausschließlich durch den Export von Saccharose bewerkstelligt. Die Transportsaccharose wird im Cytoplasma aus UDP- bzw. ADP-Glukose und Fruktose gebildet. Im Blattgewebe von *Ricinus communis* L. zeigte der Saccharosegehalt mit zunehmendem Alter eine ähnliche Entwicklung wie die freien Hexosen. Es kam zu einem Ansteigen des Saccharosegehaltes mit dem Alter des Blattes. Der Saccharosegehalt stieg mit dem Alter jedoch etwas steiler an, als der Gehalt freier Hexosen. In Hexoseeinheiten gesehen entwickelte sich das Verhältnis der freien Hexosen zur Saccharose von 1:1 im jungen Blatt bis zu 1:3 im ausgewachsenen Blatt. Ein großer Teil der akkumulierten Hexosen wurde also in Saccharose festgelegt.

Abb. 30: Saccharosegehalt [µmol/g TG] im Blattgewebe unterschiedlich alter Rizinusblätter. Die Saccharose wurde nach Spaltung in Form der Hexosen Glukose und Fruktose im NADPH-gekoppelten enzymatischen Test bestimmt (n = 4 Pflanzen).

3.5.2.3 Stärke

Kohlenhydrate, die nicht direkt aus dem Blatt transportiert werden, können in Form von Stärke in den Chloroplasten gespeichert werden. Im Allgemeinen wird ein solcher Speicher jedoch im Verlauf der Dunkelphase wieder abgebaut. Kommt es zu einer Anreicherung von Stärke, so kann dies zu einer Hemmung der Photosyntheseleistung des Blattes führen (Paul und Foyer 2001). Eine Freisetzung der festgelegten Stärke hingegen kann zu einem erhöhten Gehalt an Hexosen und an Saccharose führen.

Bis zum Tag 35 blieb der Stärkegehalt im Blatt konstant. Erst in älteren Blättern kam es zur Stärkeakkumulation. Der Anstieg des Stärkegehaltes wies also im Vergleich mit den löslichen Zuckern einen verzögerten Verlauf auf (Abb. 31).

Abb. 31: Stärkegehalt [µmol/g TG] in Abhängigkeit vom Blattalter. Gemessen wurden die in Stärke festgelegten Hexosen mittels NADPH-gekoppelten enzymatischen Test (n = 4 Pflanzen).

3.5.3 Zuckerkonzentrationen im Siebröhrenexsudat von Ricinus communis L.

3.5.3.1 Hexosen

Die Hexosen Glukose und Fruktose spielen für den Transport von Kohlenhydraten quantitativ eine untergeordnete Rolle. Sie dienen im Blattgewebe als Substrate für die Synthese der Saccharose, kommen im Siebröhrenexsudat jedoch nur in geringen Konzentrationen vor. Im Siebröhrenexsudat aus jungen Rizinusblättern war die Konzentration sowohl der Fruktose als auch der Glukose doppelt so hoch wie in ausgewachsenen Blättern. Im Siebröhrenexsudat aus den Petiolen ausgewachsener Blätter änderte sich die Konzentration der Hexosen mit ansteigendem Alter nicht mehr (Abb. 32). Ähnlich wie im Blattgewebe sind die Konzentrationen von Glukose und Fruktose im Siebröhrenexsudat nahezu gleich. Hier lag jedoch die Konzentration der Glukose immer etwas höher als die Fruktosekonzentration. Aussagen über den Volumenfluss und somit über die direkte Transportkapazität des Phloems waren nicht möglich.

Abb. 32: Konzentrationen von Glukose und Fruktose im Siebröhrenexsudat verschieden alter Rizinusblätter. Die Glukosekonzentrationen (●) lagen in der Regel höher als die Fruktosekonzentrationen (■). Die Bestimmung der Hexosen fand im NADPH-gekoppelten enzymatischen Test statt.

3.5.3.2 Saccharose

Saccharose ist bei *Ricinus communis* die wichtigste Kohlenstofftransportform im Phloem. Im Gegensatz zum Blattgewebe, in dem der Saccharosegehalt nur etwa den doppelten Wert der freien Hexosen aufwies, war die Saccharose im Siebröhrenexsudat das vorherrschende Kohlenhydrat. Die Saccharosekonzentration betrug mindestens das 40fache der freien Hexosen im Siebröhrenexsudat (vgl. Abb. 32 und Abb. 33). Die Saccharosekonzentration in den Siebröhren von *Ricinus communis* zeigte große Schwankungen zwischen den einzelnen Blättern, aber keine altersabhängige Veränderung. Die Konzentration von Zuckern im Siebröhrenexsudat war also unabhängig vom Alter des *source*-Blattes. Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass aus alten Blättern deutlich schwieriger Siebröhrenexsudat zu gewinnen war und die gesammelten Volumina aus alten Blättern geringer waren (Abb. 39) . Es ist also möglich, dass zwar die Siebröhrenkonzentration gleich bleibt, der Export aber trotzdem abnimmt, so dass es während der Alterung zur Akkumulation von Saccharose im Blatt kommt (vgl. Abb. 30). Unterschiede im Saccharose/Hexosen-Verhältnis waren demnach vorrangig auf die Veränderung der Hexosenkonzentration zurückzuführen.

Abb. 33: Saccharosekonzentration im Siebröhrenexsudat aus den Petiolen von fünf gleich alten Rizinuspflanzen. Die Bestimmung der Saccharose erfolgt nach Invertasespaltung im NADPH-gekoppelten enzymatischen Test.

3.6 Altersbedingte Veränderungen von Blatt- und Siebröhrenexsudatproteinen

3.6.1 Proteinkonzentration im Siebröhrenexsudat

Im Siebröhrenexsudat von *Ricinus communis* L. konnten auch Proteine nachgewiesen werden (Sakuth et al. 1993). Im Gegensatz zu Kürbis, der eine sehr hohe Proteinkonzentration aufweist, war die Proteinkonzentration im Exsudat von *Ricinus communis* nur sehr gering. Da nach dem Anschneiden der Siebröhren einer Petiole noch ca. eine Stunde lang Exsudat mit einheitlich hoher Proteinkonzentration gesammelt werden konnte, war eine durch den Anschnitt verursachte Verunreinigung mit Zellsaft auszuschließen. Zusätzlich wurden die ersten 5 µl jeden Anschnitts verworfen. Das Siebröhrenexsudat des Rizinuskeimlings enthält pro Mikroliter ca. 0,2 µg Protein. Im Siebröhrenexsudat aus Petiolen erwachsener Pflanzen war die Proteinkonzentration alters- bzw. entwicklungsabhängig (Abb. 34). Exsudat, das von Petiolen junger *sink*-Blätter genommen wurde, enthielt mit bis zu 0,4 µg/µl die höchste Proteinkonzentration. An Petiolen von *source*-Blättern wurden noch 0,1 µg/µl gewonnen und im Siebröhrenexsudat aus seneszenten Blättern sank dieser Wert bis auf 0,05 µg/µl.

Abb. 34: Proteinkonzentration [µg/µl] der Siebröhrenexsudate, die an Petiolen unterschiedlich alter Rizinusblätter entnommen wurden. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford 1976 durchgeführt.

3.6.2 Altersabhängige Proteinzusammensetzung im Siebröhren-exsudat

Mit der altersabhängigen Konzentrationsabnahme von Proteinen im Siebröhrenexsudat wäre auch eine qualitative Änderung in der Zusammensetzung der Siebröhrenproteine vorstellbar. Beispiele für seneszenzspezifische Proteine bzw. der entsprechenden Gene im Blattgewebe wurden identifiziert (Buchanan-Wollaston 1997, Weaver et al. 1997).

In dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob es zu altersabhängigen Veränderungen im Proteinspektrum des Siebröhrenexsudates kommt. Aufgrund der vorhergehenden Analysen (Széderenyi 1998), die altersbedingten Veränderungen ab einem Blattalter von 20 Tagen erwarten lassen, wurden aus verschiedenen Blättern vereinigte Exsudate auf ihre Proteinzusammensetzung hin untersucht, die im Durchschnitt 20 bzw. 40 Tage alt waren. Das Proteinmuster nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese wies charakteristische Merkmale auf (Abb. 35). Die meisten Protein hatten ein Molekulargewicht unter 20 kDa. Der Vergleich der Proteinmuster zeigte, dass es Proteine im Siebröhrenexsudat gibt, die

1. in allen Altersstufen gleichbleibend vertreten waren (Keimling und junges Blatt nicht gezeigt),

2. mengenmäßig mit höherem Blattalter abnehmen,

3. in alten Blättern verschwinden,

4. in alten Blättern erscheinen.

Abb. 35: Zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung von vereinigten und konzentrierten Siebröhrenexsudaten aus unterschiedlich alten Rizinusblättern. A) ca. 20 Tage alte Blätter und B) ca. 40 Tage alte, seneszente Blätter. Die Proteine wurden mit Coomassie Brillant Blau angefärbt. Die Nummern weisen auf die o.g. Proteintypen hin.

3.6.3 Partielle Sequenz eines Siebröhrenexsudatproteins

Die Proteinkonzentration in den Siebröhren sank mit dem Alter der Blätter (Kap. 3.6.1). In verschiedenen Veröffentlichungen wurden Seneszenz assoziierte Proteine (SAP) beschrieben, die bei künstlich induzierter und natürlicher Seneszenz auftraten. Die Anwesenheit solcher Proteine im Siebröhrenexsudat von *Ricinus communis* wurde bereits ab einem Blattalter von 22 Tagen gezeigt (Széderkenyi 1998) und konnte im Rahmen dieser Untersuchungen bestätigt werden (Abb. 35). Diese Siebröhrenexsudatproteine von seneszenten Rizinusblättern sollten isoliert und identifiziert werden. Um die für die Aminosäuresequenzierung notwendigen Proteinkonzentrationen aus seneszenten Blättern zu erhalten, wurden die Exsudate gleich alter Blätter aus verschiedenen Pflanzen vereinigt. Trotz der Veränderungen im Proteinspektrum des Siebröhrenexsudates von unterschiedlich alten Rizinusblättern (Abb. 35) erwies sich die eindeutige Zuordnung mengenmäßig zunehmender Proteine zu den SAPs als schwierig. Da diese Proteine in sehr geringen Konzentrationen vorlagen, konnten keine Sequenzinformationen über sie erhalten werden. Stattdessen wurde für die Aminosäuresequenzierung der stärkste Proteinspot nach zweidimensionaler Auftrennung des Siebröhrenexsudates aus alten Blättern ausgewählt (Abb. 36 A). Die tryptische Spaltung dieses Proteins ergab vier Peptide (Abb. 36 B), die der Aminosäuresequenzierung unterworfen wurden. Für zwei dieser Peptide konnte die Aminosäuresequenz bestimmt werden.

Tab. 6: Durch Edmann-Abbau erhaltene Peptidsequenzen eines Siebröhrenexsudatproteins. Die Peptidnummern beziehen sich auf Abb. 36. Ein X bedeutet, dass an dieser Position keine eindeutige Aminosäure zugeordnet werden konnte. Unsichere Aminosäuren sind in Klammern dargestellt, bzw. die Variante in der nächsten Zeile wiedergegeben.

Peptid	Sequenz
1	FEXYLPS
2	VSETVG(T) M
3	Keine Sequenz erhalten
4	Keine Sequenz erhalten

Abb. 36: Coomassie Brillant Blau gefärbtes 2D-Gel von Siebröhrenexsudatproteinen aus seneszenten Rizinusblättern (A) und Elutionsprofil der RP-HPLC nach tryptischem Verdau des markierten Spots (B).

Die Datenbanksuche (Swissprot) mit den oben angegebenen Peptidsequenzen ergab keine Hinweise auf ein bekanntes Protein, in dem beide Sequenzen enthalten waren.

3.6.4 Veränderung des Proteinmusters nach Inkubation mit Polyaminen

Die Polyamine sind ubiquitär verbreitete Zellkomponenten und greifen sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten in grundlegende Stoffwechselvorgänge ein. In Pflanzen haben sie Phytohormoncharakter und beeinflussen verschiedene Wachstums- und Entwicklungsprozesse, wie z.B. Zellteilung, Wurzelbildung, Blühinduktion oder Fruchtentwicklung und -reifung. Darüberhinaus spielen die Polyamine auch bei der Reaktion von Pflanzen auf Stress-Belastungen eine Rolle. Möglicherweise gibt es auch eine Beteiligung der Polyamine an der Seneszenz (Lester 2000).

Nach Inkubation mit Polyaminen änderte sich die Zusammensetzung der Proteine im Siebröhrenexsudat aus Rizinuskeimlingen (Abb. 37). Es konnte ein neues Protein, welches im Siebröhrenexsudat mit Wasser inkubierter Kontrollpflanzen nicht auftrat, gefunden werden. Dieses Protein trat sowohl bei Behandlung mit Putrescin (Abb. 37 C), als auch mit Spermin und Spermidin auf (Abb. 37 D).

Abb. 37: 2D-Gelelektrophoretische Auftrennung von Siebröhrenexsudatproteinen aus Polyamin-behandelten Rizinuskeimlingen. Pro Gel wurden 100 bis 150 µg Protein aufgetragen und nach der Auftrennung mit Coomassie Brillant Blau gefärbt. A) und B) Kontrolle (in Wasser inkubierte Keimlinge) C) mit Putrescin inkubierte Keimlinge und D) mit Kombination aus Spermin und Spermidin inkubierte Keimlinge.

3.6.5 Proteingehalt und Proteinmuster der Extrakte aus Blattscheiben unterschiedlichen Alters.

Die Seneszenz als ein regulierter, aktiver Prozess geht mit der Expression von Genen einher, die als Seneszenz-spezifisch beschrieben wurden (Smart, 1994, Gan und Amasino, 1997). Bezüglich des Blattgewebes von Rizinuspflanzen sollte untersucht werden, ob und welche Veränderungen des Proteinspektrums im Verlaufe des Blattalters eintreten. Dazu wurden Proteinextrakte aus unterschiedlich alten Blättern hergestellt (Kapitel 2.10.3) und einer zweidimensionalen Gelelektrophorese unterworfen. Es wurden Blattscheiben gleicher Fläche verwendet und in den Coomassie Brillant Blau gefärbten Gelen auch auf die Veränderung des Proteingehaltes geachtet. Der Proteingehalt sank während der natürlichen Seneszenz in Rizinusblättern deutlich ab. In dem Blattextrakt des jüngsten Blattes wurde die höchste Proteinkonzentration gefunden. Der Blattextrakt des ältesten Blattes hingegen (Abb. 38 D) enthielt keine für die Coomassie Brillant Blau Färbung ausreichende Proteinkonzentration mehr. Das Proteinmuster in den Extrakten verschieden alter Blätter zeigte keine dramatischen Änderungen. Vor allem war jedoch kein neu auftretendes, mengenmäßig dominierendes Seneszenz-spezifisches Protein bei der natürlichen Seneszenz der Rizinusblätter zu erkennen.

Abb. 38: Zweidimensionale Auftrennung von Proteinextrakten aus A) 16 Tage, B) 24 Tage, C) 32 Tage, D) 40 Tage alten Rizinusblättern. Es wurden gleiche Blattflächen geerntet und die Proteine daraus extrahiert.

3.7 Siebröhrenexsudation unterschiedlich alter Blätter

Der Phloemtransport von Assimilaten wird nicht allein durch die Konzentration der Assimilate, sondern auch durch die Transportgeschwindigkeit und die Siebröhrenanzahl des Blattes bestimmt. Eine Abschätzung der Exsudationsrate wurde vorgenommen, indem das Exsudatvolumen einer einstündigen Exsudation notiert wurde. Auch wenn aus einem Blattstiel kein Exsudat zu gewinnen war, wurde dies protokolliert. Die Exsudationsraten aus Siebröhren von Rizinusblättern wiesen eine hohe Schwankungsbreite auf (Abb. 39). Besonders waren jüngere Blätter betroffen, da die Blattstiele junger Blätter weicher und empfindlicher sind als die der älteren Blätter (> 15 Tage). An Blattstielen seneszenter Blätter konnten nur geringe Volumina gesammelt werden. Ein mehrmaliges Anritzen der Blattstiele war hier oft notwendig. Prinzipiell scheint die Exsudationsrate im Verlauf der Alterung von Rizinusblättern leicht abzunehmen.

Abb. 39: Siebröhrenexsudationsraten [µl/h] aus Blattstielen unterschiedlich alter Rizinusblätter. Das Volumen einer einstündigen Exsudation wurde für jedes Blattalter notiert.

3.8 Siebröhren in der Mittelrippe unterschiedlich alter Blätter

Die Anzahl der Siebröhren im Mittelrippenquerschnitt variierte mit der Position im Blatt. In den Randbereichen des Blattes war naturgemäß die geringste Anzahl vorhanden. An der Blattbasis dagegen bündelten sich die Phloemstränge. Dort wurde die größte Anzahl an Siebröhren gefunden. Die Anzahl der Siebröhren in der Mittelrippe variierte jedoch nicht nur nach ortsspezifischen Gesichtspunkten, sondern auch altersabhänigig. Nach dem Anstieg der Siebröhrenzahl im Querschnitt der Mittelrippe, nahm dieser Wert ab Tag 20 bis 25 der Blattentwicklung wieder ab (Abb. 40).

Abb. 40: Siebröhrenanzahl im Querschnitt der Mittelrippe unterschiedlich alter Rizinusblätter. 60 µm starke Querschnitte wurden mit Anilinblau gefärbt und die Siebröhren anhand der Kallosefluoreszenz der Siebplatten identifiziert und gezählt.

Die Gesamtzahl, der in der Mittelrippe enthaltenen Siebröhren, wurde durch Einbeziehung der Siebröhrenlänge, der Siebröhrenanzahl im Querschnitt und der Länge der Mittelrippe berechnet. Dieser Wert zeigte eine deutliche Altersabhängigkeit (Abb. 41). Anfänglich stieg die Siebröhrenzahl in der Mittelrippe des wachsenden Blattes an. Nach Abschluss des Längenwachstums der Mittelrippe sank die Zahl der Siebröhren dann mit zunehmendem Blattalter wieder deutlich ab.

Abb. 41: Gesamtzahl der Siebröhren in der Mittelrippe von Rizinusblättern. Hochgerechnet nach Auswertung von Quer- und Längsschnitten der Mittelrippe nach Anilinblaufärbung und mikroskopischer Auswertung.

Zusätzlich zur Abnahme der Siebröhren waren in Längsschnitten der Mittelrippen älterer Blätter vermehrt starke Kalloseablagerungen zu beobachten (Abb. 42). Dies weist auf eine mögliche Verringerung der Transportkapazität durch Blockierung des Phloems oder zumindest einer stärkeren Wundkallosebildung mit zunehmendem Alter hin.

Abb. 42: Mit Anilinblau gefärbter Längsschnitt der Mittelrippe eines 15 Tage alten Blattes (A) und eines 35 Tage alten Blattes (B). Die Fluoreszenz der Kalloseauflagerungen wurden im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4 Diskussion

Die Blattseneszenz ist eine Sequenz von biochemischen und physiologischen Prozessen, die die letzte Stufe der Blattentwicklung vom reifen, vollständig expandierten Blatt, bis zum Tod umfasst (Smart 1994). Das Phloem spielt bei der Blattseneszenz eine herausragende Rolle. Die Mobilisierung von Nährstoffen des Blattes dient in mehrjährigen Pflanzen unter anderem dem Wachstum von Spross und Wurzel. Einjährige Pflanzen benötigen die Nährstoffe aus ihren vegetativen Teilen für die Bildung von Blüte und Samen (Feller und Erismann 1978, Sanetra et al. 1998). Auf der einen Seite wird also ein funktionstüchtiges Phloemsystem während der Blattseneszenz gefordert und auch durch indirekte Messungen bestätigt (Feller und Fischer 1994). Auf der anderen Seite werden durch die Unterbrechung des Phloems bei intaktem Xylem seneszenzähnliche Symptome ausgelöst (Fröhlich und Feller 1991). Die Funktion des Phloemtransports während der Blattseneszenz spielt für die Seneszenz und die Entwicklung der Pflanze eine entscheidende Rolle. Die vorliegende Arbeit soll zur Charakterisierung physiologischer Parameter der natürlichen Blattseneszenz von *Ricinus communis* beitragen und vor allem Aufschlüsse zur Rolle des Phloems während dieses Entwicklungsabschnittes des Blattes erbringen.

4.1 Natürliche und künstlich hervorgerufene Seneszenz

Seneszenzvorgänge werden häufig in artifiziellen Systemen untersucht. Die Wirkung bestimmter seneszenzverzögernder und –induzierender Faktoren (Licht, Nährstoffe, Hormone, etc.) wird in diesen Systemen genutzt, um Veränderungen in Entwicklung und Seneszenz entweder hervorzurufen oder zu hemmen und schließlich zu untersuchen. Es werden z.B. pflanzliche Zellkulturen verwendet, um entwicklungsphysiologische Parameter zu beschreiben (z.B. Zellzykluskomponenten bzw. die Expression bestimmter Gene bei bestimmten Bedingungen). Einige Systeme setzen auf abgeschnittene Blätter bzw. Blattscheiben, die unter den entsprechenden Bedingungen inkubiert werden. Weiterhin werden Pflanzen untersucht, die durch Transformation oder Mutation einen seneszenzverzögerten oder –beschleunigten Phänotyp aufweisen. (Thomas und Smart 1993, Gan und Amasino 1997, Guiamet und Giannibelli 1996, Dai et al. 1999, Yoshida et al.

2002). Diese Mutationen betreffen Gene des Primärmetabolismus, der Signaltransduktionswege und auch des Katabolismus. Eine Mutation, die die natürliche Seneszenz komplett verhindert, wurde bisher nicht entdeckt. Bei der Seneszenz der Pflanzen sind vermutlich unterschiedliche Regulationsmechanismen beteiligt, deren Beeinflussung die Seneszenz in ihrem zeitlichen Ablauf verändern, aber nicht verhindern kann (Thomas und Smart 1993, Weaver et al. 1998). Die Übertragbarkeit auf die natürliche Seneszenz ist bei all diesen Systemen nur begrenzt möglich. Bei diesen Untersuchungen werden einzelne Mechanismen der Blattseneszenz aufgeklärt. Ob jedoch unter natürlichen Bedingungen genau diese Mechanismen wirken, oder ob durch die Transformation von Pflanzen auch noch andere, zusätzliche Veränderungen auftreten, ist nicht klar.

Auffallend ist die unterschiedliche Ausprägung von Seneszenzvorgängen in artifiziellen und natürlichen Systemen. Abgetrennte Getreideblätter seneszieren simultan über die gesamte Blattfläche, während in natürlich seneszierenden Blättern ein Gradient von der Blattspitze zur Basis verläuft (Feller und Erismann 1978). Unterschiede zwischen natürlicher Seneszenz und der Seneszenz in hormonbehandelten, abgetrennten Blättern spiegeln sich auch in der Genexpression wieder. Gene, die bei natürlicher Seneszenz in *Hordeum vulgare* exprimiert wurden, zeigten bei Abszisinsäuregabe, osmotischem Stress und Verwundung keine Expression und umgekehrt (Becker und Apel 1993). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Blattseneszenz in *Arabidopsis thaliana* gefunden. SAG (Seneszenz-assoziierte Gene) zeigen je nach Behandlung (ABA, Ethylen, Zytokinin, Licht, Dunkelheit und Austrocknung an abgetrennten sowie noch verbundenen jungen und alten Blättern) unterschiedliche Expressionsmuster (Weaver et al. 1998).

Bei der Blattseneszenz von *Ricinus communis* handelt es sich um eine sogenannte sequentielle Seneszenz, die auch unabhängig von der Blütenbildung stattfindet und mit dem Abwurf des Blattes bei einem bestimmten Blattalter endet. Veränderungen des Blattes und des Phloems sollten daher für diese Arbeit auf rein altersbedingte Kriterien untersucht werden. Auf eine Veränderung des Metabolismus durch die Induktion künstlicher Seneszenz (Dunkelheit, Hormone, Stress) wurde daher verzichtet. Für die Betrachtung der Transportvorgänge in der Pflanze ist es geradezu notwendig, mehr als nur das einzelne (möglicherweise abgetrennte) Blatt zu betrachten. An Arabidopsispflanzen wurde ein gravierender Unterschied in der Seneszenzinduktion zwischen

Dunkelinkubation einzelner Blätter und der gesamten Pflanze beobachtet. Der Transfer ganzer Pflanzen in Dunkelheit führt bei diesen Pflanzen zu verzögerter Blattseneszenz, während bei den abgedeckten Blättern eine vorzeitige Seneszenz eintritt (Weaver und Amasino 2001).

Das visuell deutlichste Anzeichen der Seneszenz ist der Chlorophyllabbau. In Rizinuspflanzen findet man drei Phasen, die den Chlorophyllgehalt der Blätter beschreiben. Die Phase zunehmender Chlorophyllakkumulation, die Phase des konstanten Chlorophyllgehaltes und die des Chlorophyllabbaus nehmen jeweils ein Drittel der Lebensspanne des Blattes ein (Széderkenyi 1998). Bezüglich des Ernährungszustandes des Blattes lassen sich im Gegensatz dazu nur zwei ausgeprägte Phasen unterscheiden. Das erste Drittel der Lebensspanne eines Blattes dient dem Aufbau und der Expansion. Hier liegen maximale Nährstoffkonzentrationen vor. Bereits ab der vollständigen Expansion des Blattes nach 20 von insgesamt 60 Tagen beginnt der Abbau von Nährstoffen, insbesondere von Stickstoffverbindungen (Abb. 16). Parallel steigen die Gehalte von Zuckern (Abb. 29 und Abb. 30) und wenig phloemmobilen Elementen (Abb. 25) im Blattgewebe an. In der vorliegenden Arbeit wurden die Blätter einer Rizinuspflanze untersucht und die Ergebnisse ohne Rücksicht auf die Blattposition gegen das Blattalter aufgetragen. Die Blattposition kann sich durch unterschiedliche Belichtung und den Abstand zum Apex bzw. zur Wurzel auf den Blattmetabolismus auswirken. Hierdurch könnten die Variationen in manchen Datensätzen zu erklären sein. Der Vorteil dieser Aufarbeitung ist die Möglichkeit, an derselben Pflanze Siebröhrenexsudate aus verschieden alten Blättern zu sammeln. Die Alternative, sich auf ein bestimmtes Blatt festzulegen, wäre im Falle von *Ricinus communis* keine geeignete Lösung, da diese Rizinuspflanzen nur sieben Blätter bis zur Blüte produzierten. Sowohl die Pflanze, als auch das Blatt unterliegen während des benötigten Beobachtungszeitraumes starken Veränderungen.

4.2 Kohlenstoff im Blattgewebe

Kohlenhydratgehalte im Blattgewebe von *Ricinus communis* steigen mit dem Blattalter an. Diese Kohlenhydratakkumulation betrifft sowohl Saccharose, als auch Fruktose und Glukose (Abb. 29, Abb. 30). Die älteren Blätter einer

Rizinuspflanze weisen die höchsten Kohlenhydratgehalte auf. Gleichzeitig sinkt jedoch der Kohlenstoffanteil am Blatttrockengewicht (Abb. 28).

Die Akkumulation von Kohlenhydraten im Blatt hat einen Einfluss auf die Photosyntheseleistung des Blattes (Sheen 1990, Krapp et al. 1991). In verschiedenen Arbeitsgruppen wurden Versuche zur Wirkung von Kohlenhydraten auf die Photosynthese durchgeführt. Die Änderung des endogenen Kohlenhydratgehaltes wurde zum Beispiel durch Entfernen der s*ink*-Organe (Crafts-Brandner et al. 1984), durch Unterbrechung des Phloems (Fröhlich und Feller 1991), durch Zugabe externer Zucker zu abgeschnittenen Blättern (Krapp et al. 1991) oder zu Protoplasten hervorgerufen (Sheen 1990). Mittels Überexpression einer Invertase im Blattapoplasten kann die Beladung des Phloems mit Saccharose verhindert werden. Saccharose, die in den Blattapoplasten gelangt, wird von der Invertase gespalten und die Hexosen werden wieder in den Symplasten aufgenommen (von Schaewen et al. 1990). Eine weitere Möglichkeit ist die Erhöhung der externen CO_2-Konzentration (van Oosten und Besford 1995 und 1996, Sicher und Bunce 1998, Ludewig und Sonnewald 2000). Unter erhöhtem CO_2 angezogene Pflanzen zeigen eine höhere Kohlenstoffassimilationsrate als die Kontrollpflanzen. Auch hier kann es zur Akkumulation von Zuckern im Blattgewebe kommen. Kohlenstoffakkumulation tritt des weiteren bei Mg^{2+}-Mangel auf. Mg^{2+}-ATP ist ein Kofaktor der Protonenpumpen und somit an der Saccharosebeladung des Phloems beteiligt. Solche Mangelpflanzen weisen ein hohes Trockengewicht in den *source*-Blättern und ein niedriges Trockengewicht in den *sink*-Blättern auf (Marschner 1995). Bei der natürlichen Seneszenz von Rizinusblättern bleibt das Trockengewicht pro Flächeneinheit dagegen nahezu gleich (Szederkenyi 1998). Der Magnesiumgehalt in Rizinusblättern steigt mit zunehmendem Blattalter (Abb. 25). Magnesiummangel durch Mobilisierung des Magnesiums und Transport in *sink*-Gewebe kann also als Grund für die Kohlenstoffakkumulation ausgeschlossen werden. Phosphormangel kann zur Akkumulation von Kohlenhydraten führen, da der Export von Triosen aus den Chloroplasten in das Cytosol Phosphat benötigt. In Phosphormangelpflanzen kommt es daher zu einer Akkumulation von Kohlenhydraten im Chloroplasten und somit vorrangig zu Stärkeakkumulation. Zucker können unter Phosphormangel akkumulieren, wenn nicht genügend ATP für die Phloembeladung zur Verfügung steht (Marschner 1995). In den untersuchten Rizinuspflanzen zeigten unterschiedlich alte Blättern voneinander abweichende Phosphorgehalte (Abb. 26). Eine Kohlenstoffakkumulation aufgrund von Phosphormangel ist

dennoch eher unwahrscheinlich. Dafür spricht auch die Sequenz der Kohlenstoffakkumulation, da zuerst Saccharose, Glukose und Fruktose akkumulieren und die Stärkeakkumulation erst spät auftritt. Bei Phosphormangel sollte sich zuerst die Stärke anhäufen. Außerdem zeigen die Zuckerakkumulation und die Veränderung des Phosphorgehaltes mit zunehmendem Alter keine Korrelation bezüglich ihrer Kinetik.

In Pflanzen, die Kohlenhydrate in ihren Blättern akkumulieren, wird eine Regulation des Photosyntheseapparates beobachtet. In Untersuchungen mit erhöhtem Gehalt endogener Zucker in Blättern wird die Erniedrigung der Photosyntheseleistung und eine erniedrigte Transkription der Photosynthese-assoziierten Gene (PAG) verzeichnet (Sheen 1990, van Oosten und Besford 1995). Die Aktivität der Enzyme des Calvin-Zyklus nimmt ab (Krapp et al. 1991). Aus den oben genannten Versuchen mit exogenen Zuckern wird angenommen, dass die endogene Akkumulation von Kohlenhydraten während der Blattentwicklung die Photosyntheseleistung eines Blattes negativ beeinflussen kann. In Pflanzen, die unter erhöhtem CO_2 angezogen wurden, sinkt der Chlorophyllgehalt nicht frühzeitig ab, wenn der endogene Zytokiningehalt durch Transformation mit dem Gen für die Isopentenyltransferase (Ipt) unter Kontrolle des SAG12-Promotors altersabhängig erhöht ist. Die Hexosegehalte sind dabei wie in nicht transformierten Pflanzen deutlich höher, als in Niedrig-CO_2 Pflanzen (Ludewig und Sonnewald 2000).

Parallel mit dem Ansteigen der Kohlenhydrate in alternden Rizinusblättern sinkt die Nettophotosynthese (Abb. 8). Es ist möglich, dass die Akkumulation der Zucker in den Blättern erst zur Verminderung der Nettophotosynthese und dadurch zur Seneszenz führt. Eine solche Initiation der Seneszenz wurde bereits für *Arabidopsis thaliana* postuliert, nur dass dort die Abnahme photosynthetischer Metaboliten zur Derepression der SAG führen soll (Hensel et al. 1993). Der Zuckergehalt eines Blattes spiegelt die *source/sink*-Beziehungen innerhalb der Pflanze wieder. Die Zuckerakkumulation ist ein möglicher Auslöser der natürlichen Blattseneszenz (Wingler et al. 1998, Fröhlich und Feller 1991).

Um eine Reaktion auf den Kohlenhydratgehalt des Blattes zu gewährleisten, könnte ein sensorisches System notwendig sein. Ein Enzym, das als Kandidat für die Kohlenhydratmessung der Pflanze vorgeschlagen wurde, ist die Hexokinase (HXK) (Jang und Sheen 1994). Zusätzlich wurden bereits Indizien für eine Beteiligung der HXK an der Seneszenzinitiation gefunden.

Die Überexpression eines HXK-Gens in *Arabidopsis thaliana* bewirkte einen Chlorophyllabbau und die Expression von SAG (Dai et al. 1999, Xiao et al. 2000).

Der Kohlenhydratgehalt eines Blattes hat nicht nur Auswirkungen auf die Photosynthese des Blattes, sondern auch auf die Assimilation von Stickstoff. Kohlenhydrate dienen als Aminogruppenakzeptoren bei der Stickstoffassimilation (z.B. 2-Oxoglutarat).

Der im Blattgewebe beobachtete parallele Anstieg der Hexosen Glukose und Fruktose (Abb. 29) hängt mit dem Transport von Saccharose in die Vakuole und der dortigen Spaltung in die Hexosen durch die Saure Invertase zusammen (Huber und Hanson 1992). In Arabidopsispflanzen wurde ein Monosaccharidtransporter entdeckt, der spezifisch für die späte Seneszenz zu sein scheint und möglicherweise den Transport von Hexosen zwischen Zytosol und Vakuole bewirkt (Quirino et al. 2001).

4.3 Stickstoff

Im Gewebe von Rizinusblättern nahm Stickstoffgehalt bezogen auf das Trockengewicht nach der vollständigen Expansion der Blätter ab. Viele Autoren, die sich mit der Blattseneszenz befassen, benennen die Remobilisierung von Stickstoffkomponenten als ein Charakteristikum der Seneszenz (Wittenbach 1979, Friedrich und Huffaker 1980, Feller und Keist 1986, Weaver et al. 1997, Crafts-Brandner et al. 1998, Sanetra et al. 1998).

4.3.1 Nitrat

Nitrat ist die überwiegende Form des für Pflanzen erreichbaren Bodenstickstoffs (Cheng et al. 1992). Die Nitratreduktion findet im Cytosol von Wurzel und Blatt statt. Je nach Spezies ist der Anteil der Wurzel oder des Sprosses an der Nitratreduktion unterschiedlich (Marschner, 1995, Andrews 1986). Die Erreichbarkeit von Nitrat hat einen Einfluss auf die Blattexpansion (McDonald und Davies 1996). Im expandierten Rizinusblatt war der Nitratgehalt folgerichtig am geringsten (Abb. 12).

Außer der Funktion als wichtiger Nährstoff spielt Nitrat auch eine Rolle im Ionenhaushalt der Pflanze. Der Transport des Nitratanions im Xylem verlangt auch den Transport von Gegenionen um die Ionenbalance zu erhalten.

Durch Erhöhung der externen NaCl-Konzentration kann der Nitrattransport im Xylem zugunsten des Chloridtransports verringert werden. Die Verringerung des Nitrattransportes im Xylem verschiebt die Nitratassimilation vom Spross zur Wurzel (Peuke et al. 1996). Nitrat ist das primäre Signal in der Regulation der Nitratassimilation, jedoch haben auch andere regulierende Elemente einen Einfluss auf die Nitratassimilation wie z.B. Licht, Glutamin, Saccharose, Zytokinin, CO_2 und zirkadiane Rhythmen (Crawford 1995).

Im Blatt wirkt sich Nitrat auf zwei Arten aus:

- als Osmotikum ermöglicht es die Wasseraufnahme in das Gewebe
- als Nährstoff bewirkt es den Aufbau des Photosyntheseapparates und das Wachstum der Pflanze.

Der Einfluss von Nitrat auf Seneszenzvorgänge liegt nach McIntyre (1997) in dem Zusammenspiel zwischen dem Stickstoffgehalt des Blattes und der Wasseraufnahme in das Blattgewebe. Stickstoffreiche Gewebe haben demzufolge eine erhöhte Kapazität, um Wasser aufzunehmen. Der erniedrigte Stickstoffgehalt als Folge des Stickstoffexports eines *source*-Blattes spielt eine tragende Rolle für die Initiation der Seneszenz, indem er das Wasserpotential des Gewebes erhöht. Das erhöhte Wasserpotential führt dann zu einer geringeren Wasseraufnahme und letztlich zur Seneszenz.

Abb. 43: Schematische Darstellung des Stickstoffeinflusses auf die pflanzliche Entwicklung (nach McIntyre 1997).

4.3.2 Nitratreduktase

Die NR ist sowohl transkriptionell, als auch posttranskriptionell reguliert. Die Transkription des Gens für die Nitratreduktase (NR) wird durch Nitrat, Zucker und Licht induziert (Cheng et al. 1992) und durch Glutamin reprimiert. In Tabak wird die Transkription des NIA-Gens (Nitratreduktase) durch Malat gehemmt, nicht aber die Aktivität der NR (Müller et al. 2001). Auf posttranslationaler Ebene wird die NR in Anwesenheit divalenter Kationen durch Phosphorylierung und die Bindung an 14-3-3 Proteine inaktiviert bzw. durch Dephosphorylierung aktiviert. Bedingungen, die den Aktivierungsstatus der NR beeinflussen sind Licht, Kohlendioxid- und Sauerstoffangebot, sowie der zelluläre pH-Wert (Kaiser et al. 1999, Kandlbinder et al. 2000). Das Verhältnis von Nitratreduktase-Aktivität (NRA) im Spross, verglichen mit der Wurzel, gibt Auskünfte über die Nitratversorgung der Pflanze (Peuke et al. 1996). Je höher das Nitratangebot, umso mehr Nitrat wird in den Spross transportiert, um dort reduziert zu werden. Eine weitere Wachstumsbedingung, die das Verhältnis der Nitratreduktion zwischen Wurzel und Spross beeinflusst, ist der Kaliumgehalt der Pflanze. Durch Kaliummangel hervorgerufen findet eine erhöhte Nitratreduktion in den Wurzeln statt (Peuke et al. 2002). Das Verhältnis der NRA des Sprosses und der Wurzel (bezogen auf das Trockengewicht) bei den vorliegenden

Anzuchtsbedingungen spricht für eine ausreichende Versorgung der Versuchspflanzen sowohl mit Nitrat, als auch mit Kalium.

Die höchste NRA wird in Rizinusblättern am Ende des Expansionswachstums erreicht (Abb. 14). Ab diesem Zeitpunkt ist davon auszugehen, dass der zu assimilierende Stickstoff nur noch über das Xylem das Blatt erreicht, statt wie im *sink*-Blatt auch über das Phloem (Simpson 1986). In diesen Blättern ist der Nitratgehalt niedrig (Abb. 12) und die NR, deren Genexpression durch Nitrat induziert wird, entsprechend wenig aktiv. In Blättern zwergwüchsiger Bohnen wurde eine solche Erniedrigung der NR-Aktivität nach der Blattexpansion beschrieben. Die niedrigsten NR-Aktivitäten wurden in seneszenten Blättern gefunden (Streit und Feller, 1982).

4.3.3 Glutaminsynthase

Die metabolischen Veränderungen während der Alterung des Blattes spiegelt sich unter anderem in der unterschiedlichen Expression der Glutaminsynthetase Isoenzyme wieder (Habash et al. 2001). Auch die Lokalisation der GS spielt eine wichtige Rolle. Die GS1 dient während der Seneszenz der Mobilisierung des Stickstoffs, indem es Glutamin bildet, welches im Phloem exportiert werden kann. Die Expression und Aktivität der GS2 nimmt im Allgemeinen mit zunehmendem Alter ab. Sie ist zum größten Teil für die Reassimilation des Ammoniums aus der Photorespiration zuständig (Kamachi et al. 1991 und 1992). Die Wichtigkeit dieses Enzyms wird deutlich, wenn man sich vor Augen führt, dass während der Photorespiration zehnmal mehr Ammonium entsteht, als durch die assimilatorische Stickstoffaufnahme über die Wurzel bereitgestellt wird (Keys et al. 1978). Das in der Photorespiration durch die Glyzinoxidation in den Mitochondrien entstandene Ammonium wird durch die GS2 in den Chloroplasten auf Glutamat übertragen. Durch Überexpression einer cytosolischen Glutaminsynthetase (GS1) im Mesophyll von Tabakpflanzen konnte jedoch gezeigt werden, dass die GS1 ebenfalls in der Lage ist, dieses Ammonium zu nutzen. Gleichzeitig stiegen Photorespiration und Photosyntheserate in diesen transgenen Pflanzen an (Oliveira et al. 2002). In Rizinusblättern zeigte sich eine Abnahme der Gesamtaktivität der Glutaminsynthetase. Dabei findet jedoch eine Verschiebung zu Gunsten der cytosolischen GS1 statt (Abb. 15). Die Veränderung in Menge und Zusammensetzung der GS könnte zum einen auf die Notwendigkeit der Remobilisierung von Stickstoff zurückzuführen sein. Andererseits legen die

Untersuchungen an Mutanten mit defekter GS und an Transgenen mit überexprimierter GS nahe, dass unter anderem auch eine Verbindung zu Photosynthese und Photorespiration und somit ein direkter Einfluss auf altersbedingte Veränderungen möglich ist. In diesem Fall wäre die Expression und Aktivität der GS nicht nur die Folge der Seneszenz, sondern auch ursächlich an der Seneszenz beteiligt. Die Immunlokalisation von GS in Tabakpflanzen lässt auf eine Verschiebung von der photorespirativen Ammoniumassimilation des Chloroplasten zur Reassimilation von Ammonium aus der Proteindegradation im Cytosol der Mesophyllzellen während der Alterung schließen (Brugière et al. 2000). Nach diesen Befunden ist die verstärkte Expression der GS1 im Zuge der Seneszenz im Tabak nicht auf die Leitbündel bezogen. In seneszierenden Reisblättern hingegen wurde ausschließlich die vaskuläre GS1 detektiert (Sakurai et al. 1996). Es gibt also unterschiedliche Aussagen zur Rolle der cytosolischen GS in der Seneszenz. Auf der einen Seite wird der direkte Zusammenhang der GS mit dem Stickstofftransport verneint (Brugière et al. 1999). Andererseits ist Glutamin in vielen Pflanzen die Hauptform des transportierten organischen Stickstoffs. In Radieschenkotyledonen zum Beispiel wird die GS1 bei dunkelinduzierter Seneszenz nur in älteren Geweben exprimiert, während in jüngeren Kotyledonen nach Dunkelinduktion die Asparaginsynthetase exprimiert wird. Daraufhin akkumuliert Asparagin in den Kotyledonen. Auf diese Weise wird der Stickstoff bei niedriger Kohlenstoffversorgung mit einem günstigen C/N-Verhältnis gespeichert. Ältere Keimblätter mit erhöhter GS1 Expression zeigen hingegen eine erhöhte Konzentration an Aminosäuren u.a. Glutamin im Phloemexsudat (Nozawa et al. 1999). Die Veränderungen in Menge und Zusammensetzung der GS in der Pflanze könnten auf transkriptionelle, posttranskriptionelle oder posttranslationale Weise zustande kommen. Versuche mit metallkatalysierter Oxidation an der Wurzel-GS aus Soja zeigen einen Verlust der Enzymaktivität und einen damit verbundenen proteolytischen Abbau des Proteins. Durch Ammoniumnitratgabe wurde die Aktivität der Soja-GS erhöht. Diese Erhöhung beruhte neben der Transkription auch auf der höheren Stabilität der Polypeptide (Ortega et al. 1999). Auf der transkriptionellen Ebene kann die GS durch Kohlenhydrate induziert werden. In dunkeladaptierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen kann der Mangel in der GS2 Transkription gegebenüber belichteten Pflanzen durch Saccharose im Wurzelmedium ausgeglichen werden. Den gleichen Effekt haben auch Glukose und Fruktose, während 2-Oxoglutarat ausschließlich die Transkription der GS1 induziert (Oliveira und Coruzzi 1999). Der Verlust der GS-Aktivität in alternden Rizinusblättern geht mit einem Anstieg in den

Kohlenhydratgehalten des Blattgewebes einher. Eine Beschattung der älteren Blätter, als Ursache für den Verlust der GS-Aktivität, ist also nach den o.g. Befunden nicht anzunehmen.

4.3.4 Aminosäuren

In Pflanzen, die eine cytosolische Glutaminsynthetase (GS1) im Blattmesophyll überexprimieren, ist das Serin/Glyzin-Verhältnis gegenüber den Wildtyppflanzen um das 3,5fache erhöht (Oliveira et al. 2002). Bei Mutanten mit reduzierter GS2-Aktivität findet sich eine Abnahme des Serin/Glyzin-Verhältnisses. Die GS beeinflussen die Photorespiration (Kap. 4.3.3) und es scheint, als ob eine Korrelation zwischen der CO_2-Entwicklung während der Photorespiration und dem Serin/Glyzin-Verhältnis in diesen Pflanzen besteht (Häusler et al. 1994). Im Zuge der Alterung einer Rizinuspflanze sank dieses Verhältnis vor allem durch die Abnahme des Serinanteils (Abb. 17). Trotz des gleichbleibenden Chlorophyllgehaltes im expandierten Blatt sank die Nettophotosynthese und vermutlich auch die photorespirative CO_2-Bildung. In Radieschenkotyledonen steigt mit zunehmendem Alter der Glyzingehalt bei gleichzeitiger Abnahme des Seringehaltes (Nozawa et al. 1999).

Die Glutaminkonzentration in Rizinusblättern ist zwischen Blattgewebe und Phloemexsudat deutlich zu unterscheiden. Die dominierende Rolle im Phloem wird mit niedrigen Konzentrationen im Blattgewebe erkauft. Im Blattgewebe ist das Glutamin/Glutamat-Verhältnis fast ausschließlich kleiner als eins. Neu gebildetes Glutamin wird augenscheinlich effizient in die Siebröhren geladen. Mit dem Alter sank das Glutamin/Glutamat-Verhältnis im Siebröhrenexsudat jedoch stark ab (Tab. 5), während das Verhältnis im Blattgewebe annähernd unverändert blieb. Allerdings sanken der Stickstoffanteil des Blattes (Abb. 11) und auch der Gehalt an freien Aminosäuren im Blattgewebe (Abb. 16). Ähnliche Ergebnisse bezüglich des Verhältnisses von Glutamin zu Glutamat in Blatt, Zellsaft und Siebröhrenexsudat wurden an Rizinuspflanzen erzielt, die in 12 mM Nitrat angezogen wurden (Allen und Smith 1986). Das Amid Asparagin spielt bei Rizinus nur eine untergeordnete Rolle. Das Verhältnis von Asparagin zu Aspartat steigt in sehr alten Blättern noch einmal an, Aspartat überwiegt jedoch auch in der späten Phase der Blattentwicklung (Abb. 19). Ein deutlicherer Anstieg wäre zu erwarten, wenn das Blatt an Kohlenhydraten verarmt. In diesem Fall würde das günstigere C:N Verhältnis des Asparagins

(4:2 gegenüber 5:2 bei Glutamin) eine Einsparung von Kohlenstoff bewirken um so Stickstoff zu speichern bzw. den Export von Stickstoff aufrechtzuerhalten (Lam et al. 1996). Dazu gibt es jedoch bei den festgestellten hohen Zuckerkonzentrationen im senszenten Rizinusblatt keine Veranlassung. Weder im Blattgewebe, noch im Siebröhrenexsudat ändern sich die Konzentrationen von Asparagin und Asparaginsäure grundlegend.

4.4 C:N-Balance

Stickstoff ist für die Pflanze das wichtigste Makroelement. Daher wird ein großer Anteil des Stickstoffs im Zuge der Seneszenz aus dem Blatt transportiert. Unterschiede werden aber sichtbar, wenn es z.B. um die Herkunft dieses Stickstoffs geht. Chlorophyllstickstoff verbleibt in Form von Abbauprodukten in der Vakuole der jeweiligen Zelle erhalten (Hörtensteiner und Feller 2002), während Proteinstickstoff mobilisiert und in Form von Aminosäuren über das Phloem exportiert wird (Feller und Fischer 1994). In Rizinuspflanzen ist dies hauptsächlich Glutamin (Abb. 20), andere Pflanzen hingegen nutzen auch Asparagin als Stickstofftransportmolekül. Die Konzentration des Glutamins im Siebröhrenexsudat nimmt mit zunehmendem Blattalter ab und das Verhältnis von Glutamin zu Glutamat sinkt deutlich (Tab. 5). Im Siebröhrenexsudat des jungen Blattes macht Glutamin den größten Teil des Aminostickstoffs aus und nimmt mit dem Alter dann immer mehr ab. Es scheint, als ob die Abnahme des Aminostickstoffs im Siebröhrenexsudat allein auf den Rückgang des Glutamins zurückzuführen ist.

Der Export beschränkt sich jedoch nicht ausschießlich auf Stickstoffverbindungen, sondern es kommt auch zu einem Nettoexport von Kohlenstoff (Abb. 28). Der Kohlenstoffgehalt der Blätter nimmt allerdings langsamer ab als der Stickstoffgehalt und das führt zu einer Veränderung des C:N-Verhältnisses (Abb. 44). Diese Veränderung des C:N-Verhältnisses im Blatt könnte neben anderen Auswirkungen auch die Seneszenz auslösen. Eine Verknüpfung des Kohlenstoff- und des Stickstoffmetabolismus findet auf verschiedenen Ebenen statt. Durch Saccharosegabe wird zum Beispiel die NR-Aktivität erhöht und auch die Ammoniumassimilation wird stimuliert (Morcuende et al. 1998). Andererseits moduliert die Nitratkonzentration im Nährmedium den Anteil von Karbonsäure- und Stärkemetabolismus (Scheible et al. 1997). Das C/N Verhältnis spielt möglicherweise eine entscheidende Rolle für die Auslösung der Seneszenz (Wingler et al. 1998).

In Tabakpflanzen konnte nachgewiesen werden, dass die Zuckerrepression der Photosynthese von der Stickstoffversorgung der Pflanzen abhängig war (Paul und Driscoll 1997).

Neben dem für Pflanzen postulierten Zuckersenorsystem muss demnach auch ein Sensorsystem für Stickstoff existieren. Für *Escherichia coli* wurde ein solches Stickstoffsensorsystem beschrieben. Im Mittelpunkt dieses Systems steht das PII-Protein, für das inzwischen ein pflanzliches Homolog (GLB1) entdeckt wurde. Es wurde gezeigt, dass die Expression dieses Gens in Arabidopsis durch Licht und Saccharose induziert werden kann, während Aminosäuren die Expression unterdrücken (Hsieh et al. 1998). Obwohl in Pflanzen, die GLB1 überexprimieren, eine Reaktion auf die Versorgung mit Kohlenhydraten und Stickstoff vorliegt, die sich von Wildtyppflanzen unterscheidet, ist die Wirkungsweise und die Funktion dieses mutmaßlichen Sensors nicht geklärt.

Abb. 44: C/N Verhältnis in Blättern unterschiedlichen Alters von *Ricinus communis.* Gebildet aus Abb. 11 und Abb. 28 (n = 3 Pflanzen).

4.5 Phloem

Das Phloemgewebe, als ein Teil des Blattes, ist der Alterung ebenso unterworfen wie andere Gewebe. Es scheint jedoch langsamer zu altern als die umgebenden Gewebe. Das Rizinusblatt wird von außen nach innen gelb

und zeigt kurz vor dem Abwurf nur noch im Bereich um die Leitbahnen grünes Gewebe (Abb. 3). Das Seneszenzprogramm der Pflanzen beinhaltet vor allem die Rettung wichtiger Nährstoffe. Daher hat das Phloem eine zentrale Bedeutung für die Seneszenz des Blattes (Buchanan-Wollaston 1997). Nährstoffe werden ausschließlich über das Phloem aus dem Blatt transportiert. Die Pflanzen benötigen eine Koordination zwischen Seneszenz und Phloemtransport. Demzufolge stirbt das Phloem erst in der späten Phase der Seneszenz (Feller und Fischer 1994, Gan und Amasino 1997).

Einerseits wiesen Rizinusblätter mit zunehmendem Alter immer geringere Konzentrationen einzelner Bestandteile des Siebröhrenexsudates auf (Abb. 13, Abb. 20; Abb. 34). Auch wurden die beobachteten Kalloseauflagerungen der Siebplatten mit dem Alter stärker und die Flussrate nahm ab (Abb. 39). Gleichzeitig stieg der Zuckergehalt im Blattgewebe an (Abb. 29 und Abb. 30). Diese Zeichen deuten auf einen geringer werdenden Export mit zunehmendem Blattalter hin. Andererseits sank trotz niedrig konzentrierten Siebröhrenexsudats der Blattstickstoffgehalt stetig ab (Abb. 11). Dies deutet darauf hin, dass die Mobilisierung des Stickstoffs aus dem Blatt, ungeachtet der reduzierten Exportkapazität, nicht behindert wurde. Für einen ungestörten Phloemtransport sprechen die sinkenden C- und N-Gehalte des Blattes sowie die nahezu gleichbleibenden Saccharose- und Kaliumkonzentrationen im Siebröhrenexsudat (Abb. 27 und Abb. 33).

4.6 Makroelemente

Der Ionenhaushalt der Pflanzen besteht in der Absorption der in der Bodenlösung vorliegenden anorganischen Elemente und deren Verteilung in der Pflanze. Einige dieser Ionen können bei Nährstoffmangel remobilisiert werden (Kalium, Magnesium, Phosphor), während andere als immobil gelten (Kalzium, Schwefel). Mit zunehmendem Blattalter könnten solche immobilen Elemente im Blatt akkumulieren und den Metabolismus des Blattes beeinflussen. Möglicherweise ist der Abwurf alter Blätter als eine Art Abfallentsorgung notwendig (Molisch 1929).

4.6.1 Kalium

Kalium liegt in der Pflanze als Kation (K^+) vor. Der Entzug von Kalium aus dem Wurzelmedium wirkt sich auf die NR-Aktivität in der Wurzel von *Ricinus communis* aus. Die NR-Aktivität steigt gegenüber den unveränderten

Kontrollpflanzen, während bei weiterer Kaliumgabe und Stickstoffentzug die Aktivität sinkt (Förster und Jeschke 1993). Kalium wird für den Transport von Nitrat im Xylem als Gegenion benötigt und muss im Phloem wieder zurück zur Wurzel transportiert werden (Ben-Zioni et al. 1971). Da in *Ricinus communis* die Nitratreduktion hauptsächlich im Blattgewebe stattfindet (Andrews 1986), ist dieser Kaliumkreislauf bei Rizinuspflanzen besonders wichtig. Der Kaliumgehalt der untersuchten Blätter deutet darauf hin, dass dieser Kreislauf nahezu unverändert in jungen und alten Blättern stattfindet. Kalium akkumulierte nicht in den seneszenten Blättern (Abb. 26) und wurde in annähernd gleichbleibender Konzentration im Phloemexsudat verschieden alter Blätter gefunden (Abb. 27).

4.6.2 Kalzium

Kalzium ist ein wenig phloemmobiles Ion (Ca^{2+}) und dient u.a. in der Signaltransduktion als *second messenger* (Hepler und Wayne 1985). Erhöhte Kalziumgehalte im Zytosol wirken jedoch toxisch. Das Kalzium reagiert mit anorganischem Phosphat und bildet einen unlöslichen Niederschlag. Das Kalzium muss also aus dem Zytosol entfernt werden. Im Blattgewebe ist Kalzium hauptsächlich in der Vakuole und im Apoplasten lokalisiert. In Rizinuspflanzen wurden die höchsten Kalziumgehalte in den ältesten Blättern gefunden (Abb. 25). Brokkolipflanzen haben ebenfalls in alten Blättern deutlich mehr Kalzium als in jungen Blättern. Die Kalziumkonzentration des Xylemexsudates ist abhängig vom externen Kalziumangebot, wohingegen die Kalziumkonzentration des Phloemsaftes immer den gleichen niedrigen Wert aufweist. Somit kommt es zu einer zeitabhängigen Anhäufung von Kalzium im transpirierendem Blatt (Shelp 1987). Im Allgemeinen sinkt der Kalziumimport, wenn das Blatt nicht mehr expandiert, da die entstehenden Zellwände als „*sink*“ für das Kalzium ausfallen. Kalzium beeinflusst die Integrität der Zellmembran. Einerseits schützt Kalzium die Membranen von Peroxidation (Marschner 1995), aber andererseits ist Kalzium auch am Membranabbau beteiligt, indem es lipolytische Enzyme, wie z.B. die Phospholipase, stimuliert (Paliyath und Thompson 1987, Hills und Beevers 1987). Phospholipasen sind unter anderem am Abbau der Membranen während der Seneszenz beteiligt (Ryu und Wang 1995).

4.6.3 Magnesium

Magnesium ist das Zentralatom des Porphyrinringsystems im Chlorophyll und hat in der Pflanze weiterhin Anteil an der Aktivierung von Enzymen. In den untersuchten Rizinuspflanzen stieg der Magnesiumgehalt mit dem Blattalter an (Abb. 25). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für Brokkoli beschrieben, dessen alte Blätter höhere Mg^{2+}-Gehalte aufweisen als die jungen (Shelp 1987). In Rizinuspflanzen, die in Quarzsand angezogen und regelmäßig mit Nährlösung gegossen wurden, ist ebenfalls ein Anstieg des Magnesiumgehaltes zu erkennen (Jeschke und Pate 1991). In den ältesten Blättern ist der Magnesiumgehalt pro Blatt niedriger, aber dies könnte auf die geringere Blattfläche zurückgeführt werden (Jeschke und Pate 1991). Hohe Magnesiumgehalte können in Verbindung mit Trockenstress für das Wachstum kritisch sein. Photophosphorylierung und Photosynthese werden gehemmt (Rao et al. 1987).

4.6.4 Phosphor

Phosphor kommt in der Pflanze hauptsächlich als Phosphat vor. Dieses Phosphat wirkt an der Bildung von Nukleotiden, Lipiden und Stoffwechselzwischenprodukten mit. Symptome des Phosphormangels sind die Hemmung der Stickstoffassimilation und der bevorzugte Transport von Stickstoff vom Spross in die Wurzel (Jeschke et al. 1997). In den untersuchten Pflanzen veränderte sich der Phosphorgehalt während der Entwicklung von jungen zu alten Blättern, führte aber nicht zur Akkumulation dieses Elements (Abb. 26). Jeschke et al. (1997) fanden jedoch eine abnehmende Tendenz des Phosphorgehaltes von jungen zu älteren Rizinusblättern. Der Phophorverlust aus dem seneszenten Blatt war in diesen Untersuchungen von der Phosphatkonzentration im Medium abhängig. Es ist denkbar, dass bei hoher Phosphatkonzentration im Substrat nur geringfügige Veränderungen im Phosphorgehalt der Blätter auftreten.

4.6.5 Schwefel

Schwefel wird von Pflanzen als anorganisches Sulfat aufgenommen (Saito 2000). Es wird im Xylem als Sulfat transportiert und im Phloem auch noch in organischer Form z.B. in den Aminosäuren Cystein und Methionin (Allen und Raven 1987) sowie im S-Methylmethionin und Glutathion (Bourgis et al. 1999). In den unterschiedlichen Blättern einer Rizinuspflanze wurden die höchsten Schwefelgehalte in den ältesten Blättern und die geringsten in

jungen Blättern gefunden (Abb. 25). Dies kann mit der geringen Mobilität des Schwefels zusammenhängen.

Bei Spinat ist unter Schwefelmangel die Proteinbiosynthese erniedrigt, da die schwefelhaltigen Aminosäuren fehlen. Dies führt vor allem in jungen Blättern zu einem erhöhten Stickstoffgehalt und zu einer Erhöhung des Amid-Anteils an löslichen Stickstoffverbindungen. In älteren Spinatblättern sinkt der Schwefelgehalt nach dem Wechsel zu sulfatfreiem Wachstumsmedium deutlich langsamer als in jungen Blättern und Wurzeln (Prosser et al. 2001).

In Weizen sinkt das N/S-Verhältnis bei steigendem Schwefelangebot im Wachstumsmedium. Dieses Absinken ist nicht nur auf den steigenden Schwefelgehalt zurückzuführen, sondern auch auf einen geringeren Stickstoffgehalt. Insbesondere der Anteil der Amide am Gesamtstickstoff sinkt bei zunehmendem Schwefelgehalt (Freney et al. 1978). Während der natürlichen Blattseneszenz von Rizinuspflanzen trat ein vergleichbares Phänomen auf. Bei steigenden Schwefelgehalten sank der Stickstoffgehalt des Blattes kontinuierlich ab (Abb. 45). Besonders der Glutamingehalt sank mit zunehmendem Blattalter. Weiterhin war in den untersuchten Rizinusblättern war der Methioningehalt in jungen Blättern am höchsten und sank mit zunehmendem Alter ab (siehe Anhang).

Abb. 45: Verhältnis des Stickstoffgehaltes zum Schwefelgehalt unterschiedlich alter Blätter. Die Daten wurden den Abb. 11 und Abb. 25 entnommen**.**

4.7 Oxidativer Stress

4.7.1 Askorbat

Askorbat ist das vorherrschende Antioxidant in Pflanzenzellen (Smirnoff 2000). Es spielt eine wichtige Rolle als Schutzsubstanz bei oxidativem Stress. Oxidativer Stress wird durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hervorgerufen. Diese ROS werden während der Photosynthese generiert bzw. können durch Schwermetalle, redoxaktive Herbizide, UV-B Strahlung oder Ozon gebildet werden. Askorbat eliminiert verschiedene ROS entweder direkt (Singulet Sauerstoff, Superoxid und Hydroxyl Radikale) oder indirekt durch die Aktivität der Askorbatperoxidase (Wasserstoffperoxid). Außerdem wird das membrangebundene α-Tocopherol (Vitamin E) durch Askorbat reduziert (Padh 1990, Conklin 2001). Als Kofaktor verschiedener Enzyme hat Askorbat Einfluss auf das pflanzliche Wachstum. Die Prolylhydroxylase beispielsweise bildet hydroxyprolinreiche Glykoproteine, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind. Dies könnte ein möglicher Mechanismus für den positiven Effekt des Askorbats auf die Zellteilung sein (Smirnoff 2000). Der Beginn der Seneszenz ruft den Verlust von Askorbat hervor (Horemans et al. 2000). Der Askorbatgehalt war in den unterschiedlich alten Blättern der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pflanzen ungefähr gleich (Abb. 22). Eine Askorbatabnahme mit dem Einsetzen der natürlichen Seneszenz konnte nicht beobachtet werden, eher schien der Askorbatgehalt leicht anzuzsteigen. Im Siebröhrenexsudat konnte eine leichte Abnahme der Askorbatkonzentration mit zunehmendem Blattalter beobachtet werden. In jungen *sink*-Blättern (< 10 Tage) wurden die höchsten Askorbatkonzentrationen im Siebröhrenexsudat gemessen (Abb. 23). Die Zellteilung und Expansion der jungen Blättern ist möglicherweise auch durch die Anlieferung von Askorbat durch das Phloem abhängig.

4.7.2 Oxidierte Proteine

Oxidierte Proteine schaden dem Metabolismus durch die Bildung wasserunlöslicher Aggregate und werden bei Mammalia durch Proteinabbau beseitigt. Carbonylierte Proteine werden von dem Proteasom erkannt und abgebaut. Die Aktivität des proteolytischen Systems nimmt mit dem Alter ab und die Konzentration proteingebundener Carbonyle steigt (Merker und Grune 2000). Bei *Phaseolus vulgaris* wurde das Auftreten carbonylierter Proteine bei Ozonstress untersucht. In den ozonbehandelten Pflanzen treten zusätzliche oxidierte Proteine auf, die bei ambienten Ozonwerten nicht oxidiert vorliegen (Junqua et al. 2000). Untersuchungen an der

Glutaminsynthetase aus Sojabohnewurzeln zeigen, dass die Oxidation der GS vermutlich die Aminosäuren Cystein und Histidin betrifft und zur Inaktivierung des Enzyms führt. Die oxidierte GS ist anfälliger für proteolytischen Abbau als das nichtoxidierte Protein (Ortega et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde der Oxidationsstatus der Proteine aus den Extrakten unterschiedlich alter Rizinusblätter bestimmt. Es zeigte sich jedoch, dass die natürliche Blattseneszenz von *Ricinus communis* nicht mit einer stärkeren Oxidation von Proteinen einhergeht (Abb. 24). Es waren zumindest keine auffälligen Anzeichen oxidativer Schädigungen in älteren Blättern zu erkennen, die sich vom Zustand jüngerer Blätter unterschieden. Die jüngeren Blätter wiesen ein ähnliches Spektrum hinsichtlich der Oxidation ihrer Proteine auf. Auch in den Untersuchungen zum Ozonstress in Bohnen (Junqua et al. 2000) zeigten die Kontrollpflanzen bereits beträchtliche Proteinoxidation, die dort durch zusätzliche Ozonbegasung noch gesteigert wurde.

4.8 *Sink/source*-Verhältnis

Das Gleichgewicht zwischen *source* und *sink*-Geweben in der Pflanze ist wichtig für die Aufrechterhaltung des Nährstoffhaushaltes. Wenn dieses Gleichgewicht gestört wird, kann es zu einer Erniedrigung der Photosyntheserate und zu beschleunigter Seneszenz kommen (Paul und Foyer 2001). In Tabakpflanzen kann eine Auslenkung des *sink/source*-Gleichgewichts durch Stickstoffmangel herbeigeführt werden. In den Blättern reichern sich dann Zucker und Stärke an, gefolgt von der Abnahme der Photosyntheserate (Paul und Driscoll 1997). Für *Arabidopsis* wurde die Initiation altersbedingter Blattseneszenz durch die verminderte Photosyntheserate vorgeschlagen. Es wurde spekuliert, dass Metabolite der Photosynthese die Expression seneszenz spezifischer Gene reprimieren und dass es bei Erniedrigung der Photosyntheserate wegen mangelnder Metabolite zur Expression dieser Gene kommt (Hensel et al. 1993). Saccharose, Glukose und Fruktose kommen dafür nicht in Frage, da sie im seneszenten Blatt durch β-Oxidation entstehen und in hoher Konzentration vorkommen können (Gut und Matile 1988, DeBellis et al. 1990).

Rizinuspflanzen zeigten mit zunehmendem Blattalter einen Nettoverlust an Stickstoff (Abb. 11). Gleichzeitig stiegen in den älteren Blättern die Zuckergehalte an (Abb. 29 und Abb. 30). Ein Zusammenhang zwischen

Stickstoffverlust, Zunahme der Kohlenhydrate und Erniedrigung der Photosyntheserate (Abb. 8), wie es für Tabakpflanzen beschrieben wurde, wäre denkbar (Paul und Driscoll 1997). Möglicherweise ist der *sink/source* Übergang in den untersuchten Rizinuspflanzen auch gleichzeitig die Initiation der Seneszenz und kann davon nicht unterschieden werden. In Weizen wird das Einsetzen der Blattseneszenz mit dem Ende der Blattexpansion beschrieben (Crafts-Brandner et al. 1998). Nach Erreichen der assimilatorischen Höchstleistung des Blattes nimmt die Photosyntheserate parallel zur Seneszenz ab (Thomas und Smart 1993, Ludewig und Sonnewald 2000). In Reisblättern wird bereits in jungen expandierenden Geweben eine DNA-Fragmentierung dokumentiert, die auf eine Initiation der Seneszenz in einem jungen Blattstadium hinweist (Lee und Chen 2002).

4.9 Proteine im Siebröhrenexsudat

Siebröhrenexsudatproteine (STEP) sind Proteine, die zumindest größtenteils spezifisch im Siebröhrenexsudat vorkommen. Da die Siebröhren nach ihrer Ausdifferenzierung keinen Zellkern mehr besitzen, müssen die STEP in den Geleitzellen synthetisiert werden. Bei vielen STEP wurde die Fähigkeit nachgewiesen Plasmodesmen, die im Grundzustand eine Größenausschlussgrenze von ungefähr 1 kDa besitzen, zu erweitern. Auf diese Weise können auch Proteine ins Phloem gelangen, die größer als 1 kDa sind (Balachandran et al. 1997, Thompson und Schulz 1999).

Im Siebröhrenexsudat von Blättern wurden Proteinkonzentrationen zwischen 0,05 und 0,4 µg/µl gefunden (Abb. 34). Diese Proteinkonzentration ist vergleichbar mit den Proteinkonzentrationen des Rizinuskeimlings (Sakuth et al. 1993). Die Proteinkonzentration im Siebröhrenexsudat sank mit dem Alter des Blattes entsprechend der Proteinkonzentration (Abb. 38) und des Stickstoffgehaltes im Gewebe des Blattes (Abb. 11). Für die Suche nach SAP im Siebröhrenexsudat war es notwendig, die Exsudate aus Petiolen vergleichbarer Blätter zu vereinigen. Insbesondere bei alten Blättern war dies der Fall, da zusätzlich die Exsudatvolumina niedriger waren als bei jungen Blättern (Abb. 39). Die Vereinigung von Exsudaten verschiedener Pflanzen (ca. 30 Pflanzen) führte natürlich zu einem heterogenen Proteingemisch, in dem die Zuordnung von SAP nur eingeschränkt möglich war. In Übereinstimmung mit früheren Befunden (Széderkenyi 1998) konnten Proteine nachgewiesen werden, die mengenmäßig während der Alterung

zunahmen bzw. erst in Siebröhrenexsudaten relativ alter Blätter auftraten (Abb. 35). Außerdem gab es Proteine, deren Akkumulation mit zunehmendem Alter abnahm und die dann entweder in deutlich geringeren Mengen oder überhaupt nicht mehr vorlagen. Leider war die Menge an Proteinen, die erst in einem relativ späten Stadium der Blattentwicklung detektiert wurden, für eine Sequenzierung zu gering. Ein im Siebröhrenexsudat alter Blätter in relativ großen Mengen vorkommendes Protein (Abb. 36) wurde sequenziert. Die zwei Teilsequenz der zwei Peptide (Tab. 6) zeigten Homologien zu unterschiedlichen Proteinen, es gab jedoch kein bekanntes Protein, das beide Peptidsequenzen enthielt.

Eine weitere Möglichkeit, Seneszenz-assoziierte Proteine zu identifizieren, ist die Induktion der Proteinexpression durch Substanzen mit seneszenzfördernden bzw. seneszenzverzögernden Eigenschaften. Polyamine haben seneszenzverzögernde Eigenschaften (Lester 2000) und wurden in einem Experiment mit Rizinuskeimlingen eingesetzt. Keimlinge eignen sich für diese Untersuchung besser als erwachsene Pflanzen, da die gesamten Keimblätter inkubiert werden können und die Siebröhrenexsudation von Keimlingen im Allgemeinen verlässlicher ist. Das gefundene Protein konnte noch nicht identifiziert werden. Das Polyamin-induzierte Siebröhrenexsudatprotein ist möglicherweise an Seneszenzprozessen beteiligt. Dies muss aber noch durch weitere Untersuchungen, wie z.B. Sequenzierung des korrespondierenden Gens und dessen Expressionsverhalten belegt werden.

5 Zusammenfassung

Die Seneszenz beinhaltet den letzten Abschnitt im Leben eines Blattes und umfasst die Entwicklung vom voll entfalteten Blatt bis zu seinem Tod. Das Schicksal der Siebröhren ist untrennbar mit jenem des Blattes verbunden. Zum einen drückt es in seinen Inhaltsstoffen den metabolischen Status des Blattes aus und zum anderen ist seine Funktionsfähigkeit eine Voraussetzung, um die Aufrechterhaltung bestimmter physiologischer Leistungen im Blatt zu garantieren. In dieser Arbeit wurde das Seneszenzgeschehen in Rizinusblättern charakterisiert und der Inhalt der Siebröhren analysiert. Ein Seneszenzcharakteristikum ist der Chlorophyllabbau und die damit verbundene Reduktion der photosynthetischen Kapazität des Blattes. Nach der vollständigen Expansion des Blattes sank die Nettophotosyntheserate in Rizinusblättern altersabhängig ab. Auch der Kohlenstoffgehalt des Blattgewebes nahm leicht ab, während die Kohlenhydratgehalte im Blattgewebe anstiegen.

Der Stickstoffgehalt und alle gemessenen Stickstoffverbindungen nahmen mit zunehmendem Alter im Blattgewebe ab. Ursache könnte eine geringere Stickstoffassimilation des ausgewachsenen Blattes sein. Die Aktivität der Nitratreduktase deutet auf eine geringere Nitratassimilation im alten Blatt hin. Auch die Aktivität der Glutaminsynthetase sank mit steigendem Blattalter. Die niedrige Aktivität war auf den Verlust der chloroplastidären GS2 zurückzuführen, während das GS1-Protein erst im seneszenten Blatt eine verstärkte Aktivität zeigte. Die vermutliche Aufgabe der GS1 ist die Bereitstellung von Glutamin als wichtigste Verbindung für den Stickstoffexport aus dem alternden Blatt. Trotz dieser erhöhten GS1-Aktivität sank der Glutamingehalt im Siebröhrenexsudat mit dem Alter beträchtlich und schloss sich mit diesem Trend den sinkenden Aminosäuregehalten im Blatt an.

Neben dem Kohlenstoff- und dem Stickstoffmetabolismus wurden die Schwefel-, Magnesium- und Kalzium gemessen. Diese Elemente häuften sich im Blattgewebe an. Für Kalium und Phosphor konnte keine solche Akkumulation gezeigt werden. Ihre Gehalte waren im ausgewachsenen Blatt hoch und sanken asymptotisch auf einen bestimmten Wert ab.

Besonders der Stickstoffgehalt im Blattgewebe weist auf ein funktionstüchtiges Phloem im seneszenten Blatt hin. Aber auch die Elemente

Kalium und Phosphor müssten mit dem Alter im ausgewachsenen Blatt akkumulieren, wenn das Phloem blockiert wäre. Selbst der Kohlenstoffgehalt des Blattes sank in den Versuchspflanzen trotz der akkumulierenden Kohlenhydratgehalte mit zunehmendem Blattalter ab. Obwohl die Anzahl der funktionstüchtig erscheinenden Siebröhren in der Mittelrippe mit dem Alter abnahm, ist also davon auszugehen, dass das letzte grüne Gewebe des Blattes, das Phloem, auch in seneszenten Blättern noch funktioniert.

Im Siebröhrenexsudat sanken die Konzentrationen der Stickstoffverbindungen (vor allem Aminosäuren und z.T. Proteine) ab. Dies korrelierte mit den sinkenden Stickstoffgehalten im Blattgewebe. Die Saccharosekonzentration des Siebröhrenexsudates blieb mehr oder minder gleich. Saccharose stellt das Haupttransportmolekül des Kohlenstoffs in den Siebröhren dar. Glukose und Fruktose lagen in einer Konzentration von nur ungefähr 1 mM im Siebröhrenexsudat vor. Die Zusammensetzung der Proteine aus Siebröhrenexsudat seneszenter Blätter veränderte sich altersabhängig. Neben Proteinen, die zu jeder Zeit präsent waren, wurden Proteine gefunden, die in ihrer Menge zu- oder abnahmen und solche, die entweder im Siebröhrenexsudat alter Blätter neu auftauchten oder nicht mehr detektierbar waren.

Oxidative Prozesse, die für die Seneszenz verantwortlich gemacht werden, scheinen bei der natürlichen Blattseneszenz in Rizinuspflanzen keine herausragende Rolle zu spielen. Zwar lagen in jungen Blättern oxidierte Proteine vor, aber dies änderte sich auch mit steigendem Blattalter nicht. Die Askorbatgehalte der Blätter stiegen leicht an, während die Askorbatkonzentrationen im Siebröhrenexsudat leicht sanken. Alles in allem wurden also keine nennenswerten Veränderungen des oxidativen Zustandes während der Entwicklung zum seneszenten Blatt gefunden.

Die Hypothese, dass ein Verlust der Funktionsfähigkeit des Phloems möglicherweise der Auslöser der Blattseneszenz ist, wurde somit nicht als zutreffend erwiesen. Dennoch wurde ein partieller Verlust der Transportkapazität des Phloems durch die Akkumulation von Zuckern im Blattgewebe und der Abnahme funktionstüchtig erscheinender Siebröhren der Mittelrippe nachgewiesen. Eine wechselseitige Beeinflussung von Phloem und Blattgewebe hinsichtlich der Seneszenz, ist somit nicht auszuschließen.

6 Summary

Senescence covers the last section in the life of a leaf and the development of the fully expanded leaf to its death. The fate of the sieve tubes is inseparably connected to that one of the leaf. On one hand the content of its exudate represents the metabolic status of the leaf and on the other hand its operability is a prerequisite for the maintenance of certain physiological tasks of the leaf. In this work the events during senescence in castor bean leaves were characterized and the content of the sieve tubes was analysed. A characteristic of senescence is the dismantling of chlorophyll and the associated reduction of the photosynthetic capacity of the leaf. After complete expansion of the leaf the net photosynthetic rate dropped in castor bean leaves in an age-dependent manner. Carbon content of the leaf tissue also showed a faint decrease, while the carbohydrate contents in leaf tissue rose.

The nitrogen content and all measured nitrogen compounds decreased with increasing leaf age. A smaller nitrogen assimilation rate of the fully expanded leaf could be the reason for such a nitrogen loss. Nitrate reductase activity points towards a smaller nitrogen assimilation in old leaves. The activity of the glutamine synthetase also sank with rising leaf age. The low activity was due to the loss of chloroplastic GS2, while the GS1-protein showed an intensified activity only in the senescent leaf. The supposed task for GS1 is the supply of glutamine as the most important transport form for the nitrogen export from the aging leaf. However the glutamine content in the sieve tube exudates sank considerably with the age and followed the sinking trend of amino acid content of the leaf.

Beside carbon and nitrogen metabolism, the content of sulfur, magnesium and calcium was analysed. These elements accumulated with increasing age in leaf tissue. In addition the content of potassium and phosphorus was examined, for which no such accumulation could be shown. Their content was high in fully expanded leaves and dropped afterwards to a certain value.

Particularly the nitrogen content in the leaf tissue pointed to a functional phloem in the senescent leaf. Additionally, the elements potassium and phosphorus would have to accumulate with the age of the expanded leaf, if the phloem was blocked. Even the carbon content of the leaf dropped in the examined plants despite of accumulating carbohydrates with increasing leaf

age. The number of functional appearing sieve tubes in the midrib of the leaf decreases with age. But it has to be assumed, that the last green tissue of the leaf, the phloem, still functions in senescent leaves.

In sieve tube exudates the concentrations of nitrogen compounds (especially amino acids and proteins) dropped with increasing leaf age. This correlates to the sinking nitrogen contents in the leaf tissue. The sucrose concentration of the sieve tube exudates remained more or less the same. Sucrose represents the main transportation molecule of carbon in the sieve tubes. glucose and fructose were present in concentrations of approximately 1 mM in sieve tube exudates. The composition of the proteins from sieve tube exudates of senescent leaves changed in an age dependent manner. Some proteins were present in all stages of development, while others increased or decreased in their quantity. One group of proteins emerged in sieve tube exudates of old leaves, another group was not detectable any longer.

Oxidative processes, which were thought to be responsible for senescence, do not seem to play an outstanding role in the natural leaf senescence of castor bean plants. Oxidized proteins were present in young leaves but this did not change with rising leaf age. The ascorbate content of the leaves showed a minor increase, while the ascorbate concentration of the sieve tube exudates showed a minor decrease. Altogether no considerable changes in the oxidative state of the leaf could be measured during the progress of senescence.

The hypothesis that a loss of operability of the phloem possibly leads to the initiation of leaf senescence could not be proven as applicable. However a loss in transport capacity of the phloem was shown by the accumulating sugars in leaf tissue and the decrease of functional appearing sieve tubes. An interactive influence of phloem and leaf tissue concerning senescence can´t be excluded.

7 Ausblick

^{11}C-Untersuchungen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben auf indirekte Weise gezeigt, dass die Funktionalität des Phloems bis in späte Phasen der Seneszenz erhalten bleibt (siehe Zusammenfassung). Dieser Befund sollte durch direkte Messungen bestätigt und präzisiert bzw. erweitert werden. Direkte Aussagen zum Transport der Assimilate aus dem Blatt können durch Begasung mit ^{11}C-Tracern gewonnen werden. Diese Experimente ermöglichen es, die assimilierten ^{11}C-Moleküle auf dem Weg vom Blatt durch Petiole und Stängel mit Detektoren zu verfolgen und dabei die Geschwindigkeit des Transports zu ermitteln. Des Weiteren können auf diese Weise der Export (z.B. Blatt) und der Import (z.B. Apex und Wurzel) in oder aus verschiedenen Organen der Pflanze quantifiziert werden (Schurr 1991).

Sensorische Proteine

Die Initiation des Seneszenzprogrammes ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. Durch Phytohormongaben kann die Seneszenz beschleunigt oder verlangsamt werden. Der Einfluss von Licht bzw. Dunkelheit wird ebenso beobachtet. Bei der natürlichen Seneszenz sollte der Status quo des Blattes ausschlaggebend für die Initiation der Seneszenz sein. Der Zustand des Blattes beispielsweise in Bezug auf die Abnahme von Metaboliten durch *sink*-Gewebe oder des Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnisses, muss dementsprechend im Blatt überprüfbar sein. Sensorische Proteine, die die Gehalte von Blattinhaltsstoffen messen und auf Signaltransduktionswege einwirken, würden eine solche Aufgabe erfüllen. Bei der natürlichen Blattseneszenz von *Ricinus communis* nimmt der Stickstoffgehalt des Blattes im Verhältnis stärker ab, als der Kohlenstoffgehalt. Dieser altersabhängige Anstieg des C:N-Verhältnisses könnte eine Voraussetzung für die Expression Seneszenz-assoziierter Gene sein. Ein sensorisches Protein, das das C:N-Verhältnis messen kann, ist aus *Escherichia coli* bekannt. Ein Homolog dieses *pII*-Gens wurde in *Arabidopsis thaliana* und auch *Ricinus communis* gefunden (van de Loo et al. 1995). Die

Expression des pflanzlichen *pII*-Homologs *glb1* wurde in Arabidopsispflanzen untersucht (Hsieh et al. 1998). Es zeigte sich eine nicht osmotisch bedingte Induktion der *glb1*-Expression durch Saccharose und die teilweise Aufhebung dieser Induktion durch externe Applikation von Aminosäuren. Die Expression des *glb1*-Gens sollte ebenso auf die veränderten Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt unterschiedlich alter Blätter, wie sie in *Ricinus communis* beobachtet wurden (Abb. 44), ansprechen. Obwohl die Funktion des pflanzlichen *pII*-Homologs noch nicht geklärt ist, könnte die Expression dieses Gens an der Initiation der natürlichen Blattseneszenz beteiligt sein.

Die Analyse von Zuckercarriern im seneszenten Blatt

Der Export von Nährstoffen als zentrale Aufgabe des Phloems im seneszenten Blatt, setzt zunächst die Bereitstellung dieser Nährstoffe aus dem Blatt voraus. Bei den Kohlenhydraten sind es die Zuckertransportproteine, die eine Membranpassage der Zucker und so letztlich die Beladung des Phloems ermöglichen. In *Arabidopsis* wurde ein Gen gefunden, das homolog zu Monosaccharidtransportergenen ist und als Seneszenz-assoziiertes Gen beschrieben wurde (Quirino et al. 2001). Die Expression dieses Gens wurde mit dem GUS-Reportergen verfolgt. Eine ausgeprägte GUS-Färbung wurde dabei in Bereichen des seneszenten Blattes gefunden, die auch deutliche Vergilbung zeigten. Im Endosperm keimender Rizinussamen wurde ein Saccharosecarrier lokalisiert (Yan Shih-Long, persönliche Mitteilung), der möglicherweise Saccharose für die Unterhaltung des Embryos aus den intakten Endospermzellen in den Apoplasten freisetzt. Bei dem Endosperm keimender Samen handelt es sich um ein seneszentes Gewebe. In Rizinuspflanzen wurden verschiedene andere Gene gefunden, die Hexosecarrier codieren (Weig et al. 1994). Die Expression dieser Gene wurde bis dato noch nicht im Zusammenhang mit der Blattalterung und der Mobilisierung von Kohlenhydraten aus dem seneszenten Blatt untersucht. Möglicherweise können auch noch weitere Seneszenz-assoziierte Zuckercarrier identifiziert werden, da die bisher identifizierten Gene aus Keimlingen stammen.

8 Literaturverzeichnis

Allen S, Raven JA. Intracellular pH regulation in *Ricinus communis* grown with ammonium or nitrate as N source: The role of long distance transport. Journal of Experimental Botany 1987; 38 (189): 580-596.

Allen S, Smith JAC. Ammonium nutrition in *Ricinus communis* its effect on plant growth and the chemical composition of the whole plant xylem and phloem saps. Journal of Experimental Botany 1986; 37 (184): 1599-1610.

Ameisen JC. The origin of programmed cell death. Science 1996; 272: 1278-1279.

Andrews M. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. Plant Cell and Environment 1986; 9: 511-519.

Balachandran S, Xiang Y, Schobert C, Thompson GA, Lucas WJ. Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 1997; 94 (25): 14150-14155.

Becker W und Apel K. Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. Planta 1993; 189 (1): 74-79.

Ben-Zioni A, Vaadia Y, Herman Lips S. Nitrate uptake by roots as regulated by nitrate reduction products of the shoot. Physiologia Plantarum 1971; 24: 288-290.

Berger S, Weichert H, Porzel A, Wasternack C, Kühn H, Feussner I. Enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation in leaf development. Biochimica et Biophysica Acta 2001; 1533: 266-276.

Bergmeyer HU, Bernt E. Saccharose. Methoden der enyzmatischen Analyse II 1974, 1221-1224, Editor: Bergmeyer HU

Bleecker AB und Patterson SE. Last exit: Senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. Plant Cell 1997;9 (7):1169-79.

Bourgis F, Roje S, Nuccio ML, Fisher DB, Tarczynski MC, Li C, Herschbach C, Rennenberg H, Pimenta MJ, Shen TL, Gage DA, Hanson AD.
S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. The Plant Cell. 1999;11 (8): 1485-1498.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 1976; 72: 248-254.

Brugière N, Dubois F, Limami AM, Lelandais M, Roux Y, Sangwan RS, Hirel B.. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. Plant Cell 1999; 11 (10): 1995-2012.

Brugière N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS, Hirel B. Immunolocalization of glutamine synthase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. Planta 2000; 211: 519-527.

Buchanan-Wollaston V. The molecular biology of leaf senescence. Journal of Experimental Botany 1997; 48 (307): 181-199.

Chandlee JM. Current Molecular Understanding of the Genetically Programmed Process of Leaf Senescence. Physiologia Plantarum 2001 Sep;113(1):1-8.

Cheng CL, Acedo GN, Cristinsin M, Conkling MA. Sucrose mimics the light induction of Arabidopsis nitrate reductase gene transcription. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1992; 89: 1861-1864.

Conklin PL. Recent Advances in the Role and Biosynthesis of Ascorbic Acid in Plants. Plant Cell and Environment 2001; 24 (4): 383-394.

Crafts-Brandner SJ, Below FE, Wittenbach VA, Harper JE, Hageman RH. Differential senescence of maize hybrids following ear removal. II Selected leaf. Plant Physiology 1984; 74: 368-373.

Crafts-Brandner SJ, Holzer R, Feller U. Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. Physiologia Plantarum 1998; 102 (2): 192-200.

Crawford NM. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. Plant Cell 1995; 7 (7): 859-868.

Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, Levine A, Granot D. Overexpression of arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. Plant Cell 1999; 11 (7): 1253-1266.

DeBellis L, Picciarelli P, Pisteli L, Alpi A. Localization of glyoxylate-cycle marker enzymes in peroxisomes of senescent leaves and green cotyledons. Planta 1990; 180: 435-439.

den Boer BGW und Murray JAH. Triggering the cycle in plants. Trends in Cell Biology 2000; 10: 245-250.

Feller U und Erismann KH. Veränderungen des Gaswechsels und der Aktivitäten proteolytischer Enzyme während der Seneszenz von Weizenblättern (*Triticum aestivum* L.). Journal of Plant Physiology 1978; 90: 235-244.

Feller U und Fischer A. Nitrogen metabolism in senescing leaves. Critical Reviews in Plant Sciences 1994; 13 (3): 241-273.

Feller U und Keist M. Senescence and nitrogen metabolism in annual plants. In: Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants, Lambers H, Neeteson JJ, Stulen I (Eds.) Marinus Nejhoff, Dordrecht 1986; 219-234.

Förster JC und Jeschke WD. Effects of potassium withdrawal on nitrate transport and on the contribution of the root to nitrate reduction in the whole plant. Journal-of-Plant-Physiology 1993; 141 (3): 322-328.

Freney JR, Spencer K, Jones MB. The diagnosis of suphur deficiency in wheat. Australian Journal of Agricultural Research 1978; 29: 727-738.

Friedrich JW und Huffacker RC. Photosynthesis, leaf resistances, and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase degradation in senescing barley leaves. Plant Physiology 1980, 65: 1103-1107.

Fröhlich V und Feller U. Effect of phloem interruption on senescence and protein remobilization in the flag leaf of field-growth wheat. Biochemie und Physiologie der Pflanzen 1991; 187 (2):139-147.

Gan S, Amasino RM. Making sense of senescence: Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. Plant Physiology 1997; 113 (2): 313-319.

Gebauer G, Melzer A, Rehder H. Nitrate content and nitrate reductase activity in *Rumex obtusifolius* L. I. Differences in organs and diurnal changes. Oecologia 1984; 63: 136-142.

Gershon H und Gershon D. Paradigms in aging research: a critical review and assessment. Mechanisms of Ageing and Development 2000; 117: 21-28

Görg A, Postel W, Günther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis 1988; (9): 531-546.

Guarente L, Ruvkun G, Amasino R. Aging, life span, and senescence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1998; 95 (19):11034-11036.

Guiamet JJ und Giannibelli MC. Nuclear and cytoplasmic "Stay-Green" mutations of soybean alter the loss of leaf soluble proteins during senescence. Physiologia Plantarum 1996; 96 (4): 655-661.

Gut H und Matile P. Apparent induction of key enzymes of the glyoxylic acid cycle in senescent barley leaves. Planta 176: 548-550.

Habash DZ, Massiah AJ, Rong HL, Wallsgrove RM, Leigh RA. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. Annals of Applied-Biology 2001; 138 (1): 83-89.

Hall SM, Baker DA. The chemical composition of Ricinus phloem exsudate. Planta 1972; 106 (2): 131-140.

Hanna JG. Chemical and physical methods of analysis. In Patai S. (Ed) The chemistry of the carbonyl group 1966.

Häusler RE, Blackwell RD, Lea PJ, Leegood RC. Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase of glutamate synthase. Planta 1994; 194: 406-417.

Heldt HW. Pflanzenbiochemie. 2. Auflage, Heidelberg (Spektrum Akademischer Verlag) 1999

Hellman U, Wernstedt C, Gonez J und Heldin CH. Improvement of an “in-gel” digestion procedure for the mecroprparation of internal protein fragmend for amino acid sequencing. Analytical Biochemistry 1995; 224 (1): 451-455.

Hensel L, Grbic V, Baumgarten DA, Bleecker AB. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis. The Plant Cell 1997; 5: 553-564.

Hepler PK und Wayne RO. Calcium and plant development. Annual Review of Plant Physiology 1985; 36: 397-439.

Hills MJ, Beevers H. Calcium stimulated neutral lipase activity in castor bean lipid bodies. Plant Physiology 1987; 84 (2): 272-276.

Hirose T. Nitrogen use efficiency in growth of *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc. Annals of Botany 1984; 54: 695-704.

Horemans N, Foyer CH, Potters G, Asard H. Ascorbate function and associated transport systems in plants. Plant Physiological Biochemistry 2000; 38: 531-540.

Hörtensteiner S und Feller U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. Journal of Experimental Botany 2002; 53 (370): 927-937.

Hsieh MH, Lam HM, van de Loo FJ, Coruzzi G. A PII-like protein in Arabidopsis: Putative role in nitrogen sensing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1998; 95: 13965-13970.

Huber SC und Hanson KR. Carbon partitioning and growth of a starchless mutant of *Nicotiana sylvestris*. Plant Physiology 1992; 99: 1449-1454.

Jabs T. Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. Biochemical Pharmacology 1999; 57: 231-245.

Jang JC und Sheen J. Sugar sensing in higher plants. The Plant Cell 1994; 6: 1665-1679.

Jenö P, Mini T, Moes S, Hintermann E, Horst M. Internal sequences from proteins digested in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 1995; 224 (1): 75-82.

Jeschke WD, Kirkby EA, Peuke AD, Pate JS, Hartung W. Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). Journal of Experimental Botany 1997; 48 (306): 75-91.

Jeschke WD und Pate JS. Modelling of the partitioning assimilation and storage of nitrate within root and shoot organs of castor bean *Ricinus communis* L. Journal of Experimental Botany 1991; 42 (242): 1091-1104.

Jimenez A, Hernandez JA, Pastori G, Del Rio LA, Sevilla F. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria andperoxisomes in the senescence of pea leaves. Plant-Physiology 1998; 118 (4): 1327-1335.

Junqua M, Biolley JP, Pie S, Kanoun M, Duran R, Goulas P. In vivo occurence of carbonyl residues in *Phaseolus vulgaris* proteins as a direct consequence of a chronic ozone stress. Plant Physiology Biochemistry 2000; 38: 853-861.

Kaiser WM, Weiner H, Huber SC. Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic acivity. Physiologia Plantarum 1999; (105): 385-390.

Kallarackal J, Orlich G, Schobert C, Komor E. Sucrose transport into the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as measured by the analysis of sieve tube sap. Planta 1989; 177 (3): 327-335.

Kamachi K, Yamaya T, Mae T, Ojima K. A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. Plant Physiology 1991; 96: 411-417.

Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae T Ojima K. Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. Plant Physiology 1992; 99: 1481-1486.

Kandlbinder A, Weiner H, Kaiser WM. Nitrate reductases from leaves of ricinus (*Ricinus communis* L.) and spinach (S*pinacia oleracea* L.) have different regulatory properties. Journal of Experimental-Botany 2000; 51 (347): 1099-1105.

Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrove RM, Miflin BJ. Photorespiratory nitrogen cycle. Nature 1978, 275: 741-743.

Krapp A, Quick WP, Stitt M. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, other calvin-cycle enzymes, and chlorophyll decrease when glucose is supplied to mature spinach leaves via the transpiration stream. Planta 1991; 186: 58-69.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970, 227 (259): 680-685.

Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi GM. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology 1996; 47: 569-593.

Lam E, Pontier D, Del Pozo O. Die and Let Live - Programmed Cell Death in Plants. Current Opinion in Plant Biology 1999;2 (6): 502-507.

Lambers H. Respiration in intact plants and tissues. Its regulation and dependence on environmental factors , metabolism and invaded organisms. Douce R, Day DA. (Hrsg.) Higher Plant Cell Respiration (Encyclopedia of plant physiology 1985; 18: 418-473.

Lee RH, Chen SCG. Programmed cell death during leaf senescence is nonapoptotic. New Phytologist 2002; 155: 25-32.

Lester GE. Polyamines and der cellular anti-senescence properties in honey dew muskmelon fruit. Plant Science 2000; 160 (1): 105-112.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER , Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology 1994; 233: 346-357.

Ludewig F und Sonnewald U. High CO_2-mediated down-regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. FEBS Letters 2000; 479: 19-24.

Lynch AJJ, Barnes RW, Cabecèdes J, Vaillancourt RE. Genetic evidence that *Lomatia tasmanica* (Proteaceae) is an ancient clone. Australian Journal of Botany 1998; 46: 25-33

Marschner H. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2 Auflage (London) Academic Press 1995.

Matile P. Chloroplast Senescence. Crops Photosynthesis: Spatial and Temporal Determinants. Baker NR, Thomas H (Eds.) Elsevier Amsterdam 1992; 413-440.

McDonald AJS und Davies WJ. Keeping in touch: responses of the whole plant to deficits in water and nitrogen sypply. Advances in Botanical Research 1996; 22: 229-300.

McIntyre G I. The role of nitrate in the osmotic and nutritional control of plant development. Australian-Journal-of-Plant-Physiology 1997;24(2):103-118.

Merker K und Grune T. Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence Experimental Gerontology 2000; 35: 779-786.

Milburn JA. Phloem esxudation from castor bean: Induction by massage. Planta 1970; 95: 272-276.

Milde A. Die Quantifizierung und Regulation der Siebröhrenkallose im Rizinuskeimling. Diplomarbeit, Bayreuth1996

Molisch H. Die Lebensdauer der Pflanze. Jena: G.Fischer, 1929.

Morcuende R, Krapp A, Hurry V, Stitt M. Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of α-oxoglutarate synthesis, and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. Planta 1998; 206: 394-409.

Müller C, Scheible W R, Stitt M , Krapp A. Influence of malate and 2-oxoglutarate on the NIA transcript level and nitrate reductase activity in tobacco leaves. Plant Cell and Environment. 2001; 24 (2): 191-203.

Nooden LD, Guiamet JJ, John I. Senescence mechanisms. Physiologia Plantarum 1997; 101 (4): 746-753.

Nozawa A, Ito M, Hayashi H, Watanabe A. Dark-induced expression of genes for asparagine synthetase and cytosolic glutamine synthetase in radish cotyledons is dependent on the growth stage. Plant and Cell Physiology 1999; 40 (9): 942-948.

Oliveira IC, Brears T, Knight TJ, Clark A, Coruzzi GM. Overexpression of cytosolic glutamine synthetase. Relation to nitrogen, light, and photorespiration. Plant Physiology 2002; 129: 1170-1180.

Oliveira IC und Coruzzi GM. Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in Arabidopsis. Plant Physiology 1999; 121 (1): 301-309.

Ortega JL, Roche D, Sengupta-Gopalan C. Oxidative turnover of soybean root glutamine synthetase. In vitro and in vivo studies. Plant Physiology 1999; 119 (4): 1483-1496.

Padh H. Cellular functions of ascorbic acid. Biochemistry and Cell Biology 1990; 68: 1166-1173.

Paliyath G und Thompson JE. Calcium- and calmodulin-regulated breakdown of phosoholipid by microsomal membranes from bean cotyledons. Plant Physiology 1987; 83: 63-68.

Paul MJ und Driscoll SP. Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signalling nitrogen deficiency through source:sink imbalance. Plant, Cell and Environment 1997; 20: 110-116.

Paul M und Foyer C. Sink regulation of photosynthesis. Journal of Experimental Botany 2001; 52 (360): 1383-1400.

Pennell RI und Lamb C. Programmed cell death in plants. Plant Cell 1997; 9 (7): 1157-1168.

Peuke AD, Glaab J, Kaiser WM, Jeschke WD. The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L.: IV. Flow and metabolism of inorganic nitrogen and malate depending on nitrogen nutrition and salt treatment. Journal of Experimental Botany 1996; 47 (296): 377-85.

Peuke AD, Jeschke WD, Hartung W. Flows of elements, ions and abscisic acid in *Ricinus communis* and site of nitrate reduction under potassium limitation. Journal of Experimental Botany 2002; 53 (367): 241-250.

Pontier D, Gan S, Amasino RM, Roby D, Lam E. Markers for Hypersensitive Response and Senescence Show Distinct Patterns of Expression. Plant Molecular Biology 1999; 39 (6):1243-1255.

Prosser IM, Purves JV, Saker LR, Clarkson DT. Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. Journal of Experimental Botany 2001; 52 (354): 113-121.

Quilleré I, Dufossé C, Roux Y, Foyer CH, Caboche M Morot-Gaudry JF. The effect of deregulation of NR gene expression on growth and nitrogen metabolism of *Nicotiana plumbaginifolia* plants. Journal of Experimental Botany 1994; 45 (278): 1205-1211.

Quirino BF, Reiter WD, Amasino RD. One of two tandem *Arabidopsis* genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. Plant Molecular Biology 2001; 46: 447-457.

Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. Nature 1992; 356: 397-400.

Rao IM, Sharp RE, Boyer JS. Leaf magnesium alters photosynthetic response to low water potentials in sunflower. Plant Physiology 1987; 84: 1214-1219.

Rhodes D, Rendon GA, Stewart GR. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* L. Planta 1975; 125: 201-211.

Roach DA. Environmental effects on age-dependent mortality: a test with a perennial plant species under natural and protected conditions. Experimental Gerontology 2001; 36 (4-6): 687-94.

Ryu SB, Wang X. Expression of Phospholipase D During Castor Bean Leaf Senescence. Plant-Physiology 1995; 108 (2): 713-719.

Saito K. Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. Current Opinion in Plant Biology 2000; 3 (3): 188-195.

Sakurai N, Hayakawa T, Nakamura T, Yamaya T. Changes in the cellular localization of cytosolic glutamine synthetase protein in vascular bundles of rice leaves at various stages of development. Planta 200: 306-311.

Sakuth T, Schobert C, Pecsvaradi A, Eichholz A, Komor E, Orlich G. Specific proteins in the sieve-tube exudate of *Ricinus communis* L. seedlings: Separation, characterization and in vivo labelling. Planta 1993; 191 (2): 207-213.

Sandstrom PA und Buttke TM. Autokrine production of extracellular catalase prevent apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993; 90: 4708-4712.

Sanetra CM, Ito O, Virmani SM, Vlek PLG. Remobilization of nitrogen from senescing leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.): Genotypic differences across maturity groups? Journal-of-Experimental-Botany 1998; 49 (322): 853-862.

Scheible WR, González-Fontes A, Lauerer M, Müller-Röber B, Caboch M, Stitt M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in Tobacco. The Plant Cell 1997; 9: 783-798

Schägger H und von Jagow G. Tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kda. Analytical Biochemistry 1987; 166 (2): 368-379.

Schobert C, Komor E. The differential transport of amino acids into the phloem of *Ricinus communis* L. seedlings as shown by the analysis of sieve tube sap. Planta 1989; 177 (3): 342-349.

Schröder R und Knoop B. An oligosaccharide growth factor in plant suspension cultures: a proposed structure. Journal of Plant Physiology 1995; 146: 139-147

Schurr U und Gebauer G. Aminosäurenanalyse mit OPA-Vorsäulenderivatisierung. Kontron Instruments: Applikation, Information, Kommunikation 1989; S. 6.

Schurr U. Die Wirkung von Bodentrockeheit auf den Xylem- und Phloemtransport von *Ricinus communis* und deren Bedeutung für die Interaktion zwischen Wurzel und Spross. Dissertation, Bayreuth 1991

Sheen J. Metabolic repression of transcription in higher plants. The Plant Cell 1990; 2: 1027-1038.

Shelp BJ. The composition of phloem exudate and xylem sap from broccoli *Brassica-oleracea*-var-italica supplied with ammonium, nitrate or ammoniumnitrate. Journal of Experimental Botany 1987; 38 (195): 1619-1636.

Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scaleidentification of yeast proteins from two dimensional gels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1996; 93 (25): 14440-14445.

Sicher RC und Bunce JA. Evidence that premature senescence affects photosynthetic decline of wheat flag leaves during growth in elevated carbon dioxide. International Journal of Plant Sciences 1998; 159 (5): 798-804.

Simpson RJ. Translocation and metabolism of nitrogen: whole plant aspects. In: Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants. Lambers H, Neeteson JJ, Stulen I (Eds.) Martinus Nijhoff, Dordrecht 1986; 71-96.

Smart CM. Tansley review no. 64 gene expression during leaf senescence. New Phytologist 1994;126 (3):419-448.

Smirnoff N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. Current Opinion in Plant Biology 2000; 3 (3): 229-235.

Streit L und Feller U. Changing activities of nitrogen-assimilating enzymes during growth and senescence of dwarf beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Plant Physiology 1982; 108: 273-281.

Széderkenyi J. Proteine im Siebröhrenexsudat von *Ricinus communis* L. und deren Bedeutung bei der Seneszenz. Dissertation, Bayreuth 1998

Thayer JR, Huffaker RC. Determination of nitrate and nitrite by high-pressure liquid chromatography: comparison with other methods for nitrate determination. Analytical Biochemistry 1980; 102 (1): 110-119.

Thomas H. Ageing in plants. Mechanisms of Ageing and Development 2002, 123: 747-753.

Thomas H und Smart CM. Crops that stay green. Annual applied Biology 1993; 123: 193-219.

Thompson GA und Schulz A. Macromolecular Trafficking in the Phloem. Trends in Plant Science 1999; 4 (9): 354-360.

Towbin H, Gordon J und Staehelin T. Electrophoretic transfer of proteins from poylacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 1979; 76 (9): 4350-4354.

van Bel AJE, Ehlers K, Knoblauch M. Sieve elements caught in the act. Trends in Plant Science 2002; 7 (3): 126-132.

van de Loo F, Turner S, Smerville C. Expressed Sequence Tags from developing castor seeds. Plant Physiology 1995; 108: 1141-1150.

Van Oosten JJ und Besford RT. Some relationships between the gas exchange, biochemistry and molecular biology of photosynthesis during leaf develoment of tomato plants after transfer to different cabon dioxide concentrations. Plant, Cell and Environment 1995; 18: 1253-1266.

Van Oosten JJ und Besford RT. Acclimation of photosynthesis to elevated CO_2 through feedback regulation of gene expression: Climate of opinion. Phtosynthesis Research 1996; 48: 353-365.

von Schaewen A, Stitt M, Schmidt R, Sonnewald U, Willmitzer L. Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. The EMBO Journal 1990; 9 (10): 3033-3044.

Weaver LM und Amasino RM. Senescence is induced in individually darkend Arabidopsis leaves, but inhibited in whole darkend plants. Plant Physiology 2001; 127: 876-886.

Weaver LM, Gan SS, Quirino B, Amasino RM. A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. Plant Molecular Biology 1998; 37 (3): 455-469.

Weaver LM, Himelblau E und Amasino RM. Leaf Senescence: Gene expression and regulation. Genetic Engineering 1997; 19: 215-33.

Weig A, Franz J, Sauer N, Komor E. Isolation of a family of cDNA clones from *Ricinus communis* L. with close homology to the hexose carriers. Journal of Plant Physiology 1994; 143: 178-183.

Wherry, ET Box-huckleberry as the oldest living protoplasm. Castanea 1972, 37, 94-95.

Wingler A, von Schaewen A, Leegood RC, Lea PJ, Quick WP. Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. Effects of NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. Plant Physiology 1998; 116 (1): 329-335.

Wittenbach VA. Ribulose bisphosphate carboxylase and proteolytic activity in wheat leaves from anthesis through senescence. Plant Physiology 1979, 64: 884-887.

Xiao WY, Sheen J, Jang JC. The Role of Hexokinase in Plant Sugar Signal Transduction and Growth and Development. Plant Molecular Biology 2000; 44 (4): 451-461.

Yoshida S, Ito M, Nishida I, Watanabe A. Identification of a novel gene HYS1/CPR5 that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal 2002; 29 (4): 427-437.

9 Anhang

Aminosäuren im Blattgewebe (Kapitel 3.2.5.1)

Pflanze 1							
Blattalter [Tage]	55	48	40	34	27	20	12
Blattnummer	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
Gsh	0,0223	0,0000	0,0251	0,0274	0,0428	0,0000	0,0000
Asp	0,4750	0,4594	1,2010	0,8567	1,4818	2,8928	2,8950
Glu	1,5108	1,7531	2,4247	1,7941	2,4373	2,4496	2,8862
Asn	0,1192	0,0501	0,1218	0,0745	0,1934	0,1524	0,2799
Ser	0,3019	0,1731	0,1903	0,1341	0,5309	0,3080	0,5287
Gln	0,2029	0,3328	0,6288	0,2056	0,2530	0,9205	1,6460
Gly	0,0980	0,1039	0,1078	0,0421	0,1832	0,1042	0,1392
Thr	0,0548	0,0597	0,1647	0,1119	0,1784	0,0981	0,1765
Arg	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Ala	0,1499	0,2325	0,3364	0,1131	0,4343	0,3658	0,6660
Gaba	0,1375	0,2105	0,3416	0,3096	0,5583	0,3717	0,9877
Tyr	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Phe	0,0376	0,0431	0,1067	0,0708	0,1369	0,0523	0,0534
met/val	0,1159	0,1200	0,3865	0,2825	0,6494	0,6253	0,7988
Trp	0,0716	0,0728	0,2086	0,1654	0,0000	0,0763	0,0944
Ile	0,0729	0,0720	0,1790	0,1160	0,3375	0,5639	0,5893
Leu	0,0657	0,0736	0,1520	0,0680	0,3469	0,0655	0,1131
Lys	0,0146	0,0000	0,0158	0,0227	0,1453	0,0000	0,1013

Pflanze 2							
Blattalter [Tage]	55	49	43	35	27	19	13
Blattnummer	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
Gsh	0	0	0,0147	0,0192	0,0522	0,0288	0,0194
Asp	0,0481	0,0863	0,0941	0,1448	0,7415	0,7899	0,9357
Glu	0,1617	0,2348	0,3059	0,3874	0,9446	1,0635	2,2652
Asn	0,0134	0,0108	0,0135	0,0138	0,0457	0,0344	0,0682
Ser	0,0919	0,0854	0,1019	0,0598	0,2043	0,2288	0,4759
Gln	0,0367	0,0153	0,0076	0,0164	0,0816	0,0895	0,5051
Gly	0,0751	0,0517	0,0578	0,0329	0,1260	0,1120	0,0981
Thr	0,0222	0,0324	0,0488	0,3876	0,1639	0,1177	0,3098
Arg	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Ala	0,0390	0,0800	0,1037	0,1293	0,4670	0,1907	0,3621
Gaba	0,0129	0,0496	0,0757	0,0957	0,3734	0,1178	0,2939
Tyr	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Phe	0,0060	0,0000	0,0116	0,0128	0,0209	0,0107	0,0114
Met/Val	0,0218	0,0237	0,0515	0,0598	0,1507	0,1329	0,1419
Trp	0,0195	0,0289	0,0468	0,0461	0,0966	0,0385	0,0343
Ile	0,0153	0,0131	0,0283	0,0322	0,0985	0,0742	0,0569
Leu	0,0186	0,0159	0,0318	0,0318	0,0882	0,0536	0,0367
Lys	0,0000	0,0000	0,0000	0,0336	0,0658	0,0556	0,0103

Pflanze 3						
Blattalter [Tage]	54	46	37	28	19	11
Blattnummer	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Gsh	0,0883	0,1154	0,0900	0,0358	0,0712	0,1216
Asp	0,4693	5,1069	0,3186	0,5052	0,5991	8,2545
Glu	1,8018	15,7570	0,5481	0,7867	0,8533	12,1778
Asn	0,0620	0,5723	0,0439	0,0353	0,0563	0,6382
Ser	0,4280	1,4601	0,2190	0,1610	0,3334	2,9049
Gln	0,1012	2,3805	0,0564	0,0289	0,0796	2,6450
Gly	0,0637	0,4613	0,0782	0,0311	0,0421	0,3763
Thr	0,1651	0,4170	0,1605	0,1129	0,1754	0,8601
Arg	0,0000	0,0000	0,0000	0,0045	0,0000	0,0000
Ala	0,2288	1,4127	0,2995	0,2139	0,3623	1,9044
Gaba	0,2038	1,5041	0,2185	0,2274	0,1983	2,1140
Tyr	0,0000	0,0000	0,0000	0,0162	0,0113	0,0000
Phe	0,0636	1,4204	0,0820	0,0495	0,0179	0,2258
met/val	0,1709	2,0715	0,1680	0,1711	0,1758	1,1651
Trp	0,1545	0,8834	0,1364	0,1145	0,0822	0,1033
Ile	0,0802	0,9565	0,0952	0,1141	0,1624	0,6095
Leu	0,0613	0,5327	0,0673	0,0683	0,0681	0,1164
Lys	0,0106	0,1604	0,0084	0,0207	0,0171	0,1081
Pflanze 4						
Blattalter [Tage]	44	35	28	21	12	
Blattnummer	B1	B2	B3	B4	B5	
Gsh	0,1631	0,2147	0,3650	0,2639	0,5395	
Asp	0,4774	0,9041	0,6085	1,0994	1,0234	
Glu	0,7483	1,4342	0,9591	1,5061	1,6219	
Asn	0,0145	0,0366	0,0447	0,0615	0,1689	
Ser	0,2848	0,4857	0,9416	1,2384	1,5093	
Gln	0,3255	0,5909	1,0756	2,3052	3,8450	
Gly	0,0888	0,1759	0,4298	0,3668	0,7231	
Thr	0,1107	0,2883	0,3715	0,4029	1,0056	
Ala	0,0037	0,0774	0,0281	0,1489	2,0123	
Arg	0,0668	0,1352	0,2586	0,3951	0,4092	
Gaba	0,0408	0,0104	0,2589	0,3168	0,4521	
Tyr	0,0000	0,0000	0,0239	0,0236	0,0528	
Phe	0,0763	0,5147	0,8131	0,6080	0,9331	
trp/met	0,0451	0,1357	0,0104	0,1780	0,2714	
Val	0,0101	0,1198	1,2146	0,0464	0,0916	
Ile	0,0275	0,0862	0,2586	0,0281	0,0488	
Leu	0,0153	0,0820	0,0684	0,0350	0,0605	
Lys	0,0791	0,1326	0,1977	0,0776	0,1331	

Nitratreduktaseaktivität (Abb. 14)

Pflanze	Blattalter [Tage]	Aktivität im Blatt [µmol NO_2^-/h*g TG]	Aktivität in der Wurzel [µmol NO_2^-/h*g TG]
A2	45	1,255369661	
	36	5,873493624	
	28	12,94158717	
	19	17,28707124	
	9	8,003223545	
A3	53	0,562354831	
	42	4,728609092	
	34	9,497351233	
	26	10,93135801	
	18	19,16610285	
	9	4,771840933	
A4	48	3,941019901	1,09280034
	39	6,896588918	0,75051115
	30	14,33746377	
	22	13,84776456	
	13	7,662447542	
A5	45	0,310669102	1,31628109
	37	2,555636659	
	28	4,010003801	
	22	11,87578049	
	14	12,03248062	
	6	3,584408429	
A6	44	4,299566029	0,71298559
	36	8,143045945	
	27	14,14241687	
	20	11,1859517	
	12	9,130615844	

Danksagung:

Den folgenden Personen möchte ich für die Hilfestellungen, Unterstützungen und Aufmunterungen während der Anfertigung dieser Arbeit danken:

- Prof. Dr. Ewald Komor für die Überlassung des Themas und für Anregungen und Kommentare

- Professor Dr. Erwin Beck als Sprecher und auch sämtlichen Mitgliedern der "Alterungsgruppe" für die interessanten Diskussionen zum Thema Alterung und die Einblicke in ihre Forschungsgebiete.

- Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Komor für die anregenden Diskussionen inner- und außerhalb des Laborseminars.

- Dr. Gerhard Gebauer für die Bereitstellung der HPLC-Anlagen, mit denen ich die Messungen der Aminosäuren, des Askorbats und des Nitrats durchgeführt habe.

- Margarete Wartinger für die freundliche und sachverständige Hilfestellung, wenn es mal Probleme mit der HPLC gab und für die unproblematische Zusammenarbeit, sowie für die Analyse der C- und N-Gehalte aus Rizinusblättern.

- Dr. Attila Pécsváradi für die Unterstützung bei der Durchführung einiger Experimente, vor allem bei dem Glutaminsynthetase-Aktivitätstest. Aber auch für die interessanten Gespräche, sowie für die Einladung an das Institut für Pflanzenphysiologie in Szeged, Ungarn.

- Katja Hartig für ihre Fleißarbeit und ihre Begeisterung bei den Analysen des Wachstums von Blatt und Siebröhren, während ihres Großpraktikums II.

- Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für die gute Atmosphäre und die angenehme Zusammenarbeit.

- Meinen fleißigen Korrekturlesern, Maren Klaukien, Frank Keller, Armin Zülch, Shih-Long Yan, Daniel Eisenbarth und Christiane Reinbothe für die wertvolle Kritik und die hervorragenden Kommentare.

- Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, durch deren Förderung diese Arbeit ermöglicht wurde.

Erklärung

Ich habe die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Ferner habe ich nicht anderweitig versucht eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den 08.01.2003

.....

Udo Jongebloed