

Diss. ETH Nr. 7148

**ABBAU VON CHLOROPLASTEN IN ALTERNDEN
GERSTENMESOPHYLLZELLEN**

ABHANDLUNG

zur Erlangung

des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften

der

EIDGENOSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZURICH

vorgelegt von

ENRICO MARTINOIA

Diplomierter Naturwissenschaftler

geboren am 1. September 1951

von Köniz

Angenommen auf Antrag von

Referent: Prof. Dr. Ph. Matile

Koreferent: Prof. Dr. F. Ruch

1982

Z U S A M M E N F A S S U N G

=====

Es wurden verschiedene Aspekte der subzellulären Kompartimentierung von alterungsbedingten Abbauprozessen bei Primärblättern von Gerste untersucht. Im Vordergrund standen die Vakuolen als Sitz der Hydrolasen und die Chloroplasten als Sitz des Chlorophylls und grosser Anteile des Blattproteins.

Für die Primärblätter von Gerste, Hordeum vulgare wurde eine Methode zur experimentellen Alterung gesucht, wobei die Möglichkeit zur Gewinnung repräsentativer Protoplasten ein wichtiges Kriterium war. Als beste Lösung erwies sich das System der dunkelinduzierten Alterung in Anlehnung an Wittenbach (1977) in Verbindung mit der Protoplastiermethode von Haas et al. (1979).

In Mesophyllprotoplasten aus jungen und gealterten Blättern wurde die subzelluläre Lokalisation verschiedener Hydrolasen untersucht. Diese Enzyme, insbesondere die Endopeptidase, lagen in beiden Fällen zum grössten Teil in der Vakuole vor. In Chloroplasten aus gealterten Blättern sind im Vergleich zu jungen Blättern grössere Anteile an lytischen Enzymen vorhanden. Dies liegt aber wahrscheinlich nicht an einer Verlagerung der Hydrolasen in die Chloroplasten, sondern an einer grösseren Neigung der gealterten Organellen zur Kontamination.

In den Thylakoiden konnten zwei latente chlorophyllspaltende Enzymreaktionen nachgewiesen werden: eine peroxidative wird durch SDS oder Ultraschall, eine oxidative durch Ultraschall und Zugabe von Fettsäuren aktiviert. Langkettige, ungesättigte Fettsäuren aktivieren dabei die Reaktion stärker als kurzkettige und gesättigte Fettsäuren.

Mittels Cytofluorimetrie konnte direkt gezeigt werden, dass der Chlorophyllgehalt in alternden Chloroplasten abnimmt. Die Anzahl der Chloroplasten pro Protoplast nimmt im Verlauf der Alterung bedeutend langsamer ab als der Chlorophyllgehalt der Protoplasten bzw. der Chloroplasten. Auch der Gehalt der Chloroplasten an Protein fällt im Verlaufe der Alterung ab,, wobei die RdPC sowohl rascher als das Gesamtprotein als auch das Chlorophyll abgebaut wird.

Die Resultate lassen den Schluss zu, dass die Chloroplasten sich zumindest teilweise selbst verdauen. Die Hydrolasen der Vakuolen könnten aber in der Endphase der Alterung dennoch eine wichtige Rolle spielen, weil die Chloroplasten möglicherweise nicht das Potential zur vollständigen Selbstverdauung haben.

A B S T R A C T

=====

Catabolic processes in senescent primary leaves of barley (Hordeum vulgare) were investigated from the viewpoint of subcellular compartmentation. Special attention was paid to the central vacuoles of mesophyll cells, the seat of hydrolases, and to the chloroplasts, the seat of chlorophyll and of substantial proportions of leaf protein.

A scheme which allowed the preparation of representative protoplasts throughout the period of experimental senescence was developed. It comprised dark induced senescence following Wittenbach (1977) in conjunction with the method for preparing protoplasts described by Haas et al. (1979).

Vacuoles prepared from young and senescent leaves contain the bulk of hydrolytic activities present in the mesophyll protoplasts. Residual activities present in chloroplasts are higher in preparations from senesced leaves as compared with young leaves. This is probably not due to senescence associated transport of hydrolases into chloroplasts but rather to an increased tendency of aged chloroplasts to contaminate.

In thylakoids two latent chlorophyll-bleaching activities were demonstrated. Peroxidase bleaching is activated by ultrasonication or in the presence of detergents such as SDS or Triton. Oxidative bleaching depends on ultrasonication and on the addition of free fatty acids; long-chain, unsaturated fatty acids are much more potent activators than short-chain, saturated compounds.

Using cytofluorimetric assessment of chlorophyll in individual chloroplasts it was demonstrated that the content per organelle decreases in the course of senescence, whilst the number of chloroplasts per cell is not reduced before late senescence. In any case, the content of individual chloroplasts in chlorophyll, soluble proteins, and ribulosebisphosphate carboxylase-protein declines much faster than does the number of chloroplasts per individual mesophyll cell.

These results suggest that chloroplasts are capable of partially digesting or degrading important constituents of their own. As chloroplasts may not possess the potential for the complete autodigestion, the vacuoles and their set of hydrolytic enzymes may be involved in the final demolition of chloroplasts late in senescence.