Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 80 (1970)

Artikel: Zum Stoffwechsel der aufblühenden und welkenden Korolle der Prunkwinde Ipomoea purpurea : II. Funktion und de novo Synthese lysosomaler Enzyme beim Welken

Autor: Winkenbach, Felix

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-56313

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Siehe Rechtliche Hinweise.

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. Voir Informations légales.

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. See Legal notice.

Download PDF: 06.05.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Zum Stoffwechsel der aufblühenden und welkenden Korolle der Prunkwinde Ipomoea purpurea

II. Funktion und de novo Synthese lysosomaler Enzyme beim Welken

Von *Felix Winkenbach*
(Institut für Allgemeine Botanik der ETH, Zürich)

Manuskript eingegangen am 12. Januar 1970

A. Einleitung und Problemstellung

Schumacher (1932) schreibt zum Stoffwechsel der Phyllocactusblüte:

«Der Eiweissaufbau ist beim Aufblühen schon beendet, die Maschine wird umgeschaltet, und während wir uns an der wundervollen Pracht der sich erschliessenden Blüte erfreuen, läuft im Innern das geheime tödliche Spiel der Eiweissspaltung ab, das, wenn ein gewisser Punkt erreicht ist, nur mit der Katastrophe des Zusammenbruchs enden kann.»

Aus neuern Experimenten wurde die Einsicht gewonnen, dass in Pflanzenzellen die Spaltung und Bildung von Eiweissen und Nukleinsäuren nebeneinander abläuft (Bidwell et al., 1964; Sampson et al., 1963). Die räumliche Trennung dieser Prozesse wurde bei tierischen Zellen durch de Duve et al. (1955) entdeckt: sie bezeichneten Hydrolasen enthaltende Organelle mit einfacher Membran als Lysosomen. Im Lichte dieser Erkenntnisse bedeutet Stoffabnahme in einer Zelle oder in einem Organ, dass mehr Stoffe mit den Verdauungsenzymen der Lysosomen in Berührung kommen und abgebaut werden, als das Protoplasma bildet.

Angesichts der grossen Stoffabnahme in der welkenden Korolle von *Ipomoea* (Winkenbach, 1970) wurde versucht, die Frage der Funktion und Lokalisation von lysosomalen Enzymen abzuklären. Zu diesem Zweck wurde die Gesamtaktivität verschiedener Hydrolasen dem Gehalt an zelleigenem Substrat während des Blühverlaufs gegenübergestellt. Ferner wurden Experimente zur subzellulären Lokalisation lysosomaler Enzyme ausgeführt.

Schliesslich wurde die de novo Synthese einiger Hydrolasen während des Welkens abgeklärt und die morphologischen Veränderungen des Protoplasmas im Elektronenmikroskop beobachtet.

B. Material und Methoden

Einzelheiten über Objekt und Kultur, Sammeln und Extraktion der Korollen, Stoffbestimmungen, Bestimmung der Invertaseaktivität und die Bestimmung von strukturgebundener Enzymaktivität mit der Ultrazentrifugation wurden in der vorangehenden Arbeit beschrieben (Winkenbach, 1970). Der Versuch mit Korollentrichtern (Methode III) wurde in analoger Weise durchgeführt wie der Versuch mit ganzen Korollen (Methode I, vgl. Winkenbach, 1970). Bei beiden Versuchen wurden ähnliche Resultate erhalten.

1. Bestimmung der Aktivität saurer Hydrolasen

Jeder Enzymansatz enthielt 0,1 ml Enzymprobe und wurde bei 37 °C inkubiert.

Natürliche Substrate

a) Nukleasen: Als Substrat dienten 0,4 ml 0,2 % native Thymus-DNS und denaturierte Hefen-RNS in 0,1 M Acetatpuffer. Die Reaktion wurde mit einem Fällungsmittel (50 % Äthanol, 0,01 M Magnesiumacetat, 0,8 mM Lanthannitrat, 0,05 M Acetatpuffer pH 5,5) unterbrochen (Ambellon et al., 1966). Die löslichen Spaltprodukte bestimmte man spektrophotometrisch bei 260 nm.

b) Protease: Als Substrat wurden 0,3 ml 1 % säuredenaturiertes Hämoglobin in 0,1 M Acetatpuffer verwendet. Die Reaktion wurde mit 0,2 ml 1 N Perchlorsäure unterbrochen und die säurelöslichen Spaltprodukte mit der Folinphenolmethode bestimmt (Greenberg, 1961, modifiziert von Matile, 1964).

c) α-Amylase: Als Substrat dienten 0,7 ml 0,03 % «Analar»-Stärke in 1/15 M Phosphatpuffer, und die Abnahme des Jod-Stärke-Komplexes wurde spektrophotometrisch bei 590 nm bestimmt (Street et al., 1956). Da der Komplex nicht stabil war, wurde das Jod-Kaliumjodid-Reagens unmittelbar vor dem Messen zum Reaktionsprodukt gegeben.

Synthetische Substrate

Die Enzymproben wurden mit 0,2 ml in Puffer gelöstem Substrat inkubiert und die Reaktion mit 0,2 ml 1 N Perchlorsäure unterbrochen. Nach Zugabe von 2,5 ml 0,2 M Natriumcarbonat wurde das Endprodukt bei 400 nm spektrophotometrisch bestimmt.

d) α-Glukosidase: 2 mg/ml p-Nitrophenyl-α-D-glukopyranosid wurden in 0,1 M Citratpuffer gelöst.

e) β-Glukosidase: 1 mg/ml p-Nitrophenyl-β-D-glukopyranosid wurden in 0,1 M Acetatpuffer gelöst.

f) Phosphatase: 2 mg/ml p-Nitrophenylphosphat wurden in 0,1 M Citratpuffer gelöst.

g) Acetatesterase: 5 mg p-Nitrophenylacetat wurden in 1 ml salzsaurem Methanol bei 0 °C gelöst und mit 5 ml 0,1 M Citratpuffer versetzt.

h) L-Leucinaminopeptidase: 0,75 mg/ml L-Leucyl-4-nitro-anilid wurden in 0,05 M Carbonatpuffer gelöst. Das Substrat wurde zuerst mit zwei Tropfen 1 N Salzsäure versetzt, zerrieben, mit Wasser auf das halbe Endvolumen verdünnt und 0,1 M Carbonatpuffer zugegeben.

2. Experimente mit isolierten Korollenscheiben

Aus der Randzone der Trichterfläche wurden mit einem Korkbohrer Scheiben von 1 cm Durchmesser ausgestanzt. Diese wurden mit der Innenseite nach unten (Spaltöffnungen nach oben!) in Petrischalen, auf einer Lösung oder auf dest. Wasser schwimmend, inkubiert (Zimmertemperatur, Tageslicht). Die Scheiben aus einer Blüte wurden gleichmässig auf alle Ansätze verteilt. Ein Ansatz enthielt in der Regel 20 Scheiben. Diese wurden in einer Reibschale in 2 ml 0,05 M TRIS-Puffer pH 7,5 mit dem Pistill zerrieben, das Homogenat durch einen Faltenfilter filtriert und das klare Filtrat für die Bestimmungen verwendet.

3. Elektronenmikroskopie

Korollenstücklein von ca. 2 mm Kantenlänge wurden aus der Randzone der Trichterfläche geschnitten und fixiert (1,5 % Glutaraldehyd, 0,4 % Formalin, 0,025 M Cacodylatpuffer pH 7,2, 0 °C). Mit 1 % Osmiumtetroxyd wurde nachfixiert. Die Waschlösungen und das Nachfixiermittel enthielten ebenfalls 0,025 M Cacodylatpuffer und so viel Saccharose, dass diese Lösungen und das Fixiermittel äquimolar (0,33 M) waren. Die Gewebestücklein wurden in 2 % Uranylacetat kontrastiert (10 Stunden), in einer aufsteigenden Alkoholreihe sowie in Aceton entwässert und in Eponharz eingebettet (Mollenhauer, 1964). Alle Lösungen waren in Eiswasser gekühlt. Die Dünnschnitte (LKB Ultramikrotom) wurden nach Reynolds (1963) nachkontrastiert und im Siemens-«Elmiskop I» untersucht.

C. Resultate

1. pH-Optimum der Hydrolasen

Lysosomale Enzyme aus tierischen und pflanzlichen Zellen haben im allgemeinen ein saures pH-Optimum. Im Einklang damit liegt das Optimum der meisten in Homogenaten von Korollen untersuchten Hydrolasen zwischen pH5 und pH6

(Tab. 1). Die Protease ist unterhalb pH 5 optimal aktiv, die α-Amylase oberhalb pH 6. Nur das pH-Optimum der L-Leucinaminopeptidase liegt im basischen Bereich.

Pressäfte von Korollen sind in der Streckungsphase und in der Welkphase sauer, in der Blühphase neutral (Winkenbach, 1970). Wahrscheinlich ist auch der Zellsaft in der Korolle mit Ausnahme der Blühphase sauer und somit im Bereich des pH-Optimums der meisten hydrolytischen Enzyme. Die Zentralvakuole scheint deshalb als Raum lysosomaler Aktivität geeignet zu sein.

Tabelle 1

Festgestelltes pH-Optimum von Hydrolasen in Homogenaten von Korollen

Enzym	pH-Optimum
Protease	3–5
Ribonuklease (RN-ase)	4,5–5,5
Desoxyribonuklease (DN-ase)	5,0–5,7
α-Amylase	5,5–7,5
α-Glukosidase	5–6
β-Glukosidase	4–5,5
Phosphatase	5–6,5
Esterase	5,5–ca. 6,5
L-Leucinaminopeptidase	8,5–10

2. *Zur Lokalisation der Hydrolasen*

a) Intrazelluläre Lokalisation: Die Ansicht, Vakuolen seien Lysosomen, konnte im vorliegenden Fall nicht experimentell geprüft werden, da die Isolation dieser verletzlichen Organelle nicht gelang.

Nach der Homogenisation von Korollen mit Sand oder mit rotierenden Messern sind nur vereinzelte Vakuolen vorhanden, die zudem wesentlich kleiner sind als die Zentralvakuolen in intakten Zellen. Es scheint, dass kleinere Vakuolen nicht zerstört werden und dass sich bei der Homogenisation einige Vakuolen und Protoplasten in kleinere Vesikel aufspalten. Nach der Homogenisation mit Sand in der Reibschale und einer Vorzentrifugation (5 Min., 500 g) waren 28% der RN-ase und 22% der β-Glukosidase sedimentierbar (30 Min., 150000 g). Nach dem Aufschluss im Homogenisator mit rotierenden Messern waren es nur 19% der RN-ase und 15% der β-Glukosidase. Die mildere Homogenisation in der Reibschale scheint weniger hydrolasenhaltige Strukturen zu zerstören und die Bildung sedimentierbarer Bruchstücke zu begünstigen.

Beim Welken nimmt die relative sedimentierbare Aktivität der RN-ase und der β-Glukosidase ab (Tab. 2). In diesem Zusammenhang dürfte die Beobachtung aufschlussreich sein, dass beim Welken die Mehrzahl der Mesophyllzellen in Auflösung begriffen ist (Tab. 5) und dass der Tonoplast dabei zu zerfallen scheint (Abb. 5E). Dieser Zusammenhang kann als Hinweis gewertet werden, dass ein Teil der RN-ase und der β-Glukosidase im Zellsaft enthalten ist und beim Zerfall der Vakuole befreit wird.

Tabelle 2

Sedimentierbare Aktivität (30 Min., 150000 g) saurer Hydrolasen in verschiedenen Stadien des Welkens. Homogenisation mit Sand in der Reibschale. Aktivität von Sediment und Überstand zusammen = 100 %

Einrollen des Trichters Zeitpunkt	Beginn 13.00	zur Hälfte 17.00	vollständig 9.00 + 1 Tag
RN-ase	29 %	32 %	16 %
β-Glukosidase	45 %	19 %	11 %
Phosphatase	14 %	15 %	—

Die RN-ase und die β-Glukosidase unterscheiden sich zum Teil in ihrer Lokalisation. Während in der Mitochondrienfraktion (15 Min., 20000 g) der sedimentierbare Anteil der beiden Enzyme gleich gross ist, enthält die Mikrosomenfraktion (30 Min., 150000 g) bei beginnendem Welken mehr β-Glukosidase-Aktivität (Tab. 2). Beim Welken nimmt die strukturgebundene Aktivität der β-Glukosidase stärker ab als jene der RN-ase.

b) Extrazelluläre Lokalisation: Gewaschene Stücklein (wenige mm² Oberfläche) waren aktiver in bezug auf angebotenes p-Nitrophenylphosphat als ein Homogenat unter entsprechenden Bedingungen. In einem solchen Homogenat hemmt ein dialysierbarer Stoff die Phosphataseaktivität. Die hohe Aktivität gewaschener Korollenstücklein und die geringe sedimentierbare Aktivität (Tab. 2) weisen auf eine extrazelluläre Lokalisation von Phosphatase hin.

Im Folgenden wird der Gehalt an protoplasmatischen Makromolekülen in den Korollen den Aktivitäten hydrolytischer Enzyme gegenübergestellt und untersucht, ob der einsetzenden Mobilisation von Stoffen eine erhöhte Hydrolasenaktivität entspricht.

3. Aktivität hydrolytischer Enzyme in der aufblühenden und welkenden Korolle

In den Abbildungen 1a und 1b sind die Veränderungen der Gehalte verschiedener makromolekularer Stoffe den Aktivitäten mehrerer Hydrolasen gegenübergestellt. Es ist interessant, dass der RNS-Gehalt bereits in der späten Streckungsphase langsam, während der Blüh- und Welkezeit beschleunigt abnimmt. Die Proteine und die DNS nehmen demgegenüber erst in der Welkphase ab. Die Mobilisation der Nukleinsäuren kommt in einer gesteigerten Aktivität der Nukleasen zum Ausdruck. Ihrer erhöhten Aktivität entspricht keine Aktivitätszunahme einer unspezifischen Phosphodiesterase (Substrat: Bis-[p-Nitrophenyl-]phosphat, pH 5,5). Deshalb scheint die DN-ase- und RN-aseaktivität hauptsächlich durch spezifische Nukleasen bewirkt zu werden.

Beim Vergleich von DNS-Gehalt und DN-aseaktivität springt eine Beziehung zwischen erhöhter Enzymaktivität und beschleunigter Auflösung in die Augen. Die DN-ase scheint neu gebildet zu werden (Abb. 3b) und unmittelbar mit der DNS in Berührung zu kommen. Die Aktivität der Protease ändert in der Welkphase wenig,

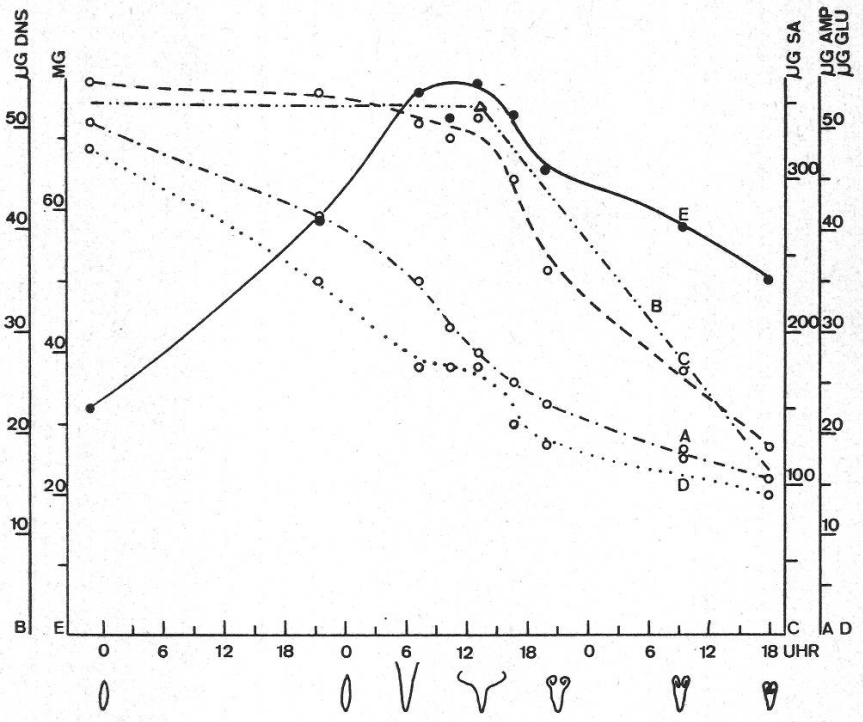


Abbildung 1a

Gehalt an (A) RNS (µg Adenosinmonophosphat), (C) Protein (µg Serumalbumin), (D) Stärke (µg Glukose) und (E) Frischgewicht je $^1/_{10}$ Korolle (Methode I). Zum Vergleich Gehalt an (B) DNS (µg DNS) je Korolle (Methode II, Winkenbach, 1970)

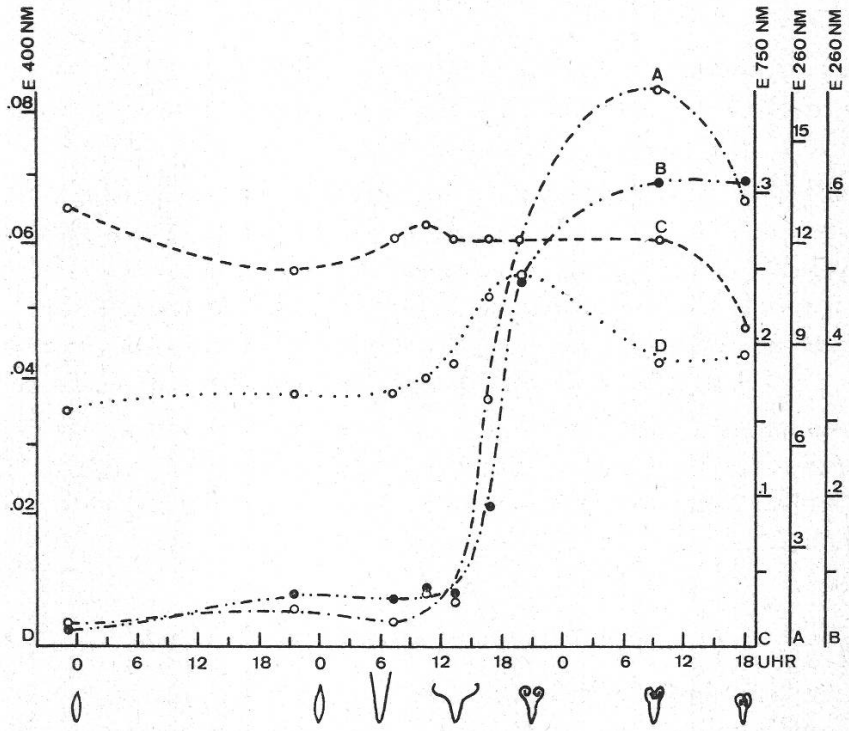


Abbildung 1b

Relative Aktivitäten saurer Hydrolasen je Korolle: (A) RN-ase, (B) DN-ase, (C) Protease, (D) α-Glukosidase (Methode I)

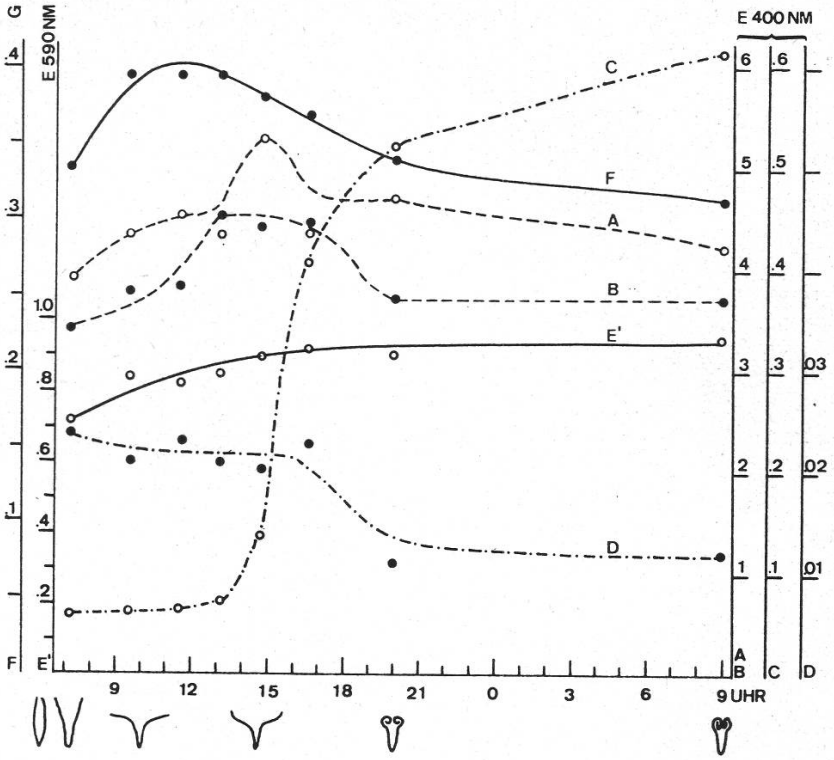


Abbildung 2

Frischgewicht (F) und Aktivitäten einer alkalischen Aminopeptidase (D) und von sauren Hydrolasen je Korollentrichter: (A) Phosphatase, (B) Esterase, (C) β-Glukosidase, (E') α-Amylase (Methode III)

während der Proteingehalt beschleunigt abnimmt. Ebenso kann zwischen der Abnahme der Stärke und der Aktivität der α-Glukosidase und der α-Amylase keine Korrelation festgestellt werden (Abb. 1 a, b, 2).

Zu den aktivsten Hydrolasen in Korollentrichtern gehören die saure Phosphatase und die saure Esterase, die beide zu Beginn des Einrollens ein Aktivitätsmaximum besitzen (Abb. 2). Etwa zehnmal weniger aktiv als diese beiden Enzyme ist die β-Glukosidase, deren Aktivität ähnlich wie bei den Nukleasen in der Welkphase um das Zehnfache ansteigt. Die alkalische L-Leucinaminopeptidase verliert beim Welken die halbe Aktivität; sie ist etwa 200mal weniger aktiv als die saure Esterase.

Die sprunghafte Zunahme der Aktivität gewisser Hydrolasen beim Welken kann auf Aktivierung oder Neubildung der Enzyme beruhen. Zur Abklärung dieser Frage wurde der Welkprozess in vitro unter dem Einfluss von Hemmstoffen der Proteinsynthese untersucht.

4. Proteinsynthese während des Welkens

In isolierten Scheiben frisch entfalteter Korollen nimmt die RN-aseaktivität innerhalb weniger Stunden um ein Vielfaches zu, während die Zunahme der β-Glukosidase verzögert und jene der Phosphatase gering ist (Tab. 3). In Scheiben aus Blütenknospen steigt lediglich die RN-aseaktivität stark an. Sie verhält sich in beiden Versuchen ähnlich wie in welkenden Korollen, und ihre Zunahme dürfte, falls sie

Tabelle 3

Aktivitätsänderung saurer Hydrolasen in isolierten, auf Wasser schwimmenden Scheiben aus *Ipomoea*-Korollen. Aktivitäten in willkürlichen Einheiten/60 Min./Scheibe. Die Scheiben aus Knospen (Streckungsphase) wurden am Vortag des Aufblühens um 10 Uhr, jene aus entfalteten Korollen (Blühphase) um 9 Uhr ausgestanzt und inkubiert (Zeit 0)

Scheiben isoliert während		Streckungsphase			Blühphase		
Inkubationszeit Std.		0	5	10	0	5	10
RN-ase	E 260 nm	0,50	2,0	6,8	0,1	2,0	6,3
β-Glukosidase	E 400 nm	0,01	0,03	0,08	0,03	0,05	0,25
Phosphatase	E 400 nm	2,4	2,4	2,4	1,4	1,45	1,55

Tabelle 4

Veränderung der RN-aseaktivität in isolierten Korollenscheiben verschiedener Form und Grösse unter dem Einfluss von Cycloheximid und verschiedener Konzentrationen von Actinomycin D. RN-aseaktivität bezogen auf die ohne Hemmstoff nach 7½ Std. vorliegende Aktivität (100 %)

	Beginn	nach 7½ Stunden				
a Cycloheximid μg/ml	0	0	12			
Runde Scheiben D = 10 mm	5 %	100 %	5 %			
b Actinomycin D μg/ml	0	0	20	50	100	200
Runde Scheiben D = 10 mm	5 %	100 %	89 %	77 %	—	—
Rechteckige Scheiben 2×10 mm	5 %	100 %	74 %	57 %	—	—
Quadratische Scheiben 3×3 mm	4 %	100 %	—	67 %	51 %	26 %

auf Proteinsynthese beruht, durch entsprechende Inhibitoren empfindlich gehemmt werden. Tatsächlich verhindert Cycloheximid – ein Inhibitor der Proteinsynthese auf der Translationsstufe (Morris, 1966, 1967) – die Zunahme der RN-aseaktivität (Tab. 4a). Auch Actinomycin D, ein Hemmstoff auf der Transkriptionsstufe, vermag ihre Zunahme zu verringern (Tab. 4b). Der de novo Synthese von RN-ase scheint folglich die Synthese von Messenger-RNS vorauszugehen. Im Fall des Actinomycins D hängt der Effekt jedoch stark von der Inhibitorkonzentration sowie der Form und Grösse der Scheiben ab, und es scheint, dass dieser Hemmstoff nur langsam durch die Schnittfläche ins Gewebe eindringt und an seinen Wirkungsort in den Zellkernen gelangt.

Cycloheximid verhindert ebenfalls die Aktivitätszunahme der DN-ase und der β-Glukosidase vollständig und verringert die geringe Erhöhung der Phosphataseaktivität (Abb. 3 a, b). Hieraus geht hervor, dass auch diese Enzyme de novo gebildet werden.

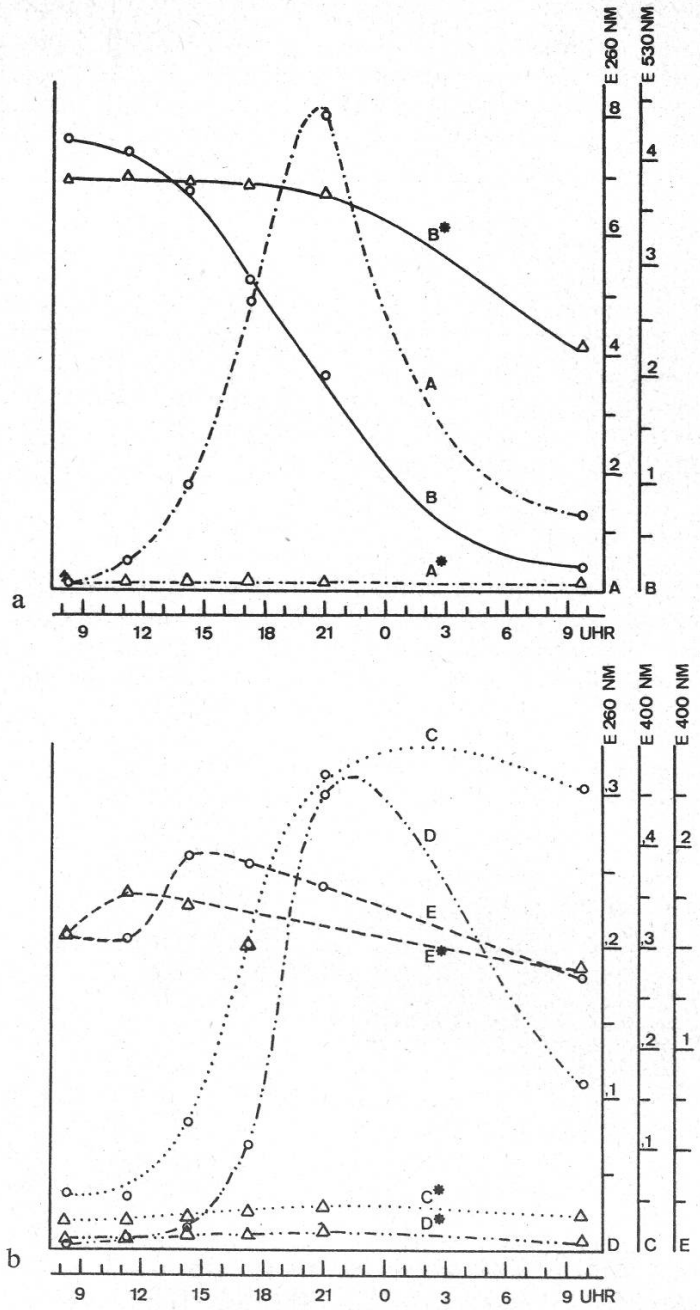
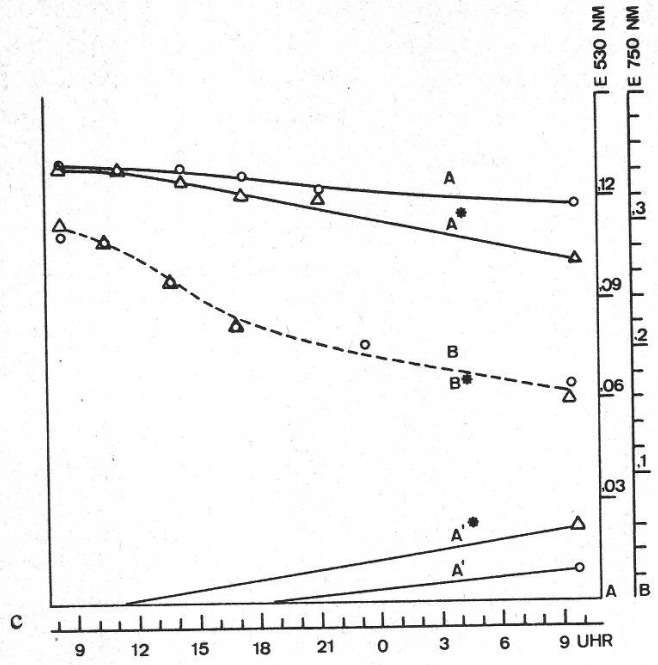


Abbildung 3

Scheiben aus dem frisch entfalteten Korollentrichter, die auf dest. Wasser oder auf Cycloheximidlösung* (12 μg/ml) schwimmen. Beginn des Experiments um 8.20 Uhr

a und b: Relative Aktivitäten saurer Hydrolasen je Scheibe: RN-ase (A, A*), Invertase (B, B*), β-Glukosidase (C, C*), DN-ase (D, D*) und Phosphatase (E, E*)

Die Invertaseaktivität bleibt unter dem Einfluss von Cycloheximid längere Zeit konstant, während sie in den Kontrollen auf die Hälfte absinkt (Abb. 3a). Die Bildung eines Inhibitors der Invertase scheint bei gehemmter Proteinsynthese zu unterbleiben. In welkenden Korollen bewirkt der gebildete Inhibitor die Abnahme der Invertaseaktivität (vgl. Winkenbach, 1970).



c: Relativer Gehalt an Anthocyan (A, A*) und Protein (B, B*) in einer Scheibe sowie Anthocyan, das ins Medium sezerniert ist (A', A'*)

In welkenden Korollenscheiben hat Cycloheximid nur einen geringen Einfluss auf den Proteingehalt (Abb. 3c). Folglich scheint die Synthese von Protein und von Protease den Proteingehalt wenig zu beeinflussen (vgl. Abb. 1b).

In Scheiben auf Wasser sind die Membranen stabiler als in Scheiben auf Cycloheximidlösung. Dies zeigt sich besonders nach längerer Inkubationszeit (mehr als 12 Stunden) an einer erhöhten Konzentration von Anthocyan in der Cycloheximidlösung (Abb. 3c). Auf die schädigende Wirkung des Cycloheximids könnte auch die Abnahme der extrazellulären Invertase nach 12stündiger Inkubation zurückzuführen sein (Abb. 3a).

Scheiben auf Cycloheximidlösung verfärben sich langsamer von Blau zu Weinrot-Rosa als Scheiben auf Wasser. Ebenso füllen sich die Interzellularen später mit Flüssigkeit. Es scheint, dass bei gehemmter Proteinsynthese durch Cycloheximid das Welken der Scheiben verzögert ist.

Nach 24stündiger Inkubation sind in beiden Ansätzen zirka 90% und mehr der Epidermisprotoplasten noch intakt, plasmolysieren jedoch stärker als zu Beginn des Versuchs. Ihr osmotischer Wert nimmt wie in welkenden Korollen ab.

Welkenden Korollen und alternden Korollenscheiben auf Wasser sind die Verfärbung und die Abnahme des osmotischen Wertes der Epidermiszellen sowie die Infiltration der Interzellularen gemeinsam. Ausserdem verlaufen die Aktivitäten der Hydrolasen in beiden Systemen ähnlich (vgl. Abb. 1 b und 2 mit Abb. 3 a und b). Der Unterschied scheint lediglich darin zu bestehen, dass die Hydrolasenaktivität in den kleinen Scheiben schneller und stärker ändert als in ganzen Korollen.

Im Lichtmikroskop kann beobachtet werden, wie benachbarte Epidermiszellen beim Welken sich unterschiedlich schnell verfärben. Grössere Unterschiede beim Altern sind zwischen Zellen verschiedener Gewebe zu erwarten. Im Elektronenmi-

Tabelle 5

Das unterschiedliche Einsetzen der Auflösung von Zellen verschiedener Gewebe in der Randzone der Trichterfläche; eine Zusammenfassung elektronenmikroskopischer Beobachtungen

Zeitpunkt	Epidermiszellen	Mesophyllzellen	Phloemzellen (Parenchym)
1. Zellstreckungsphase 11.15 Uhr – 2 Tage	Keine in Auflösung begriffen, Cytoplasma kompakt, nicht plasmolysiert, kein Anthocyan im Fixiermittel	Vereinzelte in Auflösung begriffen	Vereinzelte in Auflösung begriffen
2. Blühphase 10.00 Uhr (Verblühstreifen 13.30 Uhr)	—	Einige in Auflösung begriffen	Einige in Auflösung begriffen
3. Einrollphase 17.00 Uhr	—	Viele in Auflösung begriffen	—
4. Einrollphase 23.00 Uhr	Vereinzelte in Auflösung begriffen, Zellen mit kompaktem Cytoplasma, stark plasmolysiert, wenig Anthocyan im Fixiermittel	Vereinzelte intakt	Intakte und in Auflösung begriffene
5. Einrollphase 7.30 Uhr + 1 Tag 11.00 Uhr + 1 Tag	Intakte und viele in Auflösung begriffene, viel Anthocyan im Fixiermittel	Keine intakten beobachtet	Intakte und in Auflösung begriffene

Abbildung 4

Ausschnitt aus dem Phloem und dem Mesophyll in der Zellstreckungsphase der Korolle (11.15 Uhr–2 Tage). Intakte Zellen in der Nachbarschaft sich auflösender Zellen weisen auf ein unterschiedliches physiologisches Alter hin

Abbildung 5

Charakteristische Phasen des Alterns von Zellen bis zur Autolyse. (A) Phloemzellen, (B), (C), (D) Mesophyllzellen und (E) Epidermiszelle. (A) Intrazelluläre Verdauung protoplasmatischer Fragmente in der Zentralvakuole (Autophagie). (B) In der untern Zelle erscheint das Cytoplasma lokker, und das ER bildet Vesikel. (C) Der Kern weist eine lockere Struktur auf, während die Mitochondrien kompakt sind. (D) Mit dem Zerfall des Tonoplasten vermischen sich Zellsaft und Cytoplasma, die Autolyse ist im Gang. (E) Die an kleinen Vakuolen reichen Protoplasten der Epidermiszellen schrumpfen bei der Fixation und weisen auch nach starkem Turgorverlust in der welkenden Korolle ein kompaktes Cytoplasma auf

MP: Mesophyllzellen, PP: Phloemparenchymzellen, SR: Siebröhren, M: Mitochondrien, N: Zellkern, P: Plasmalemma, T: Tonoplast, ER: endoplasmatisches Retikulum, IV: intravakuoläre Vesikel

Tafel I

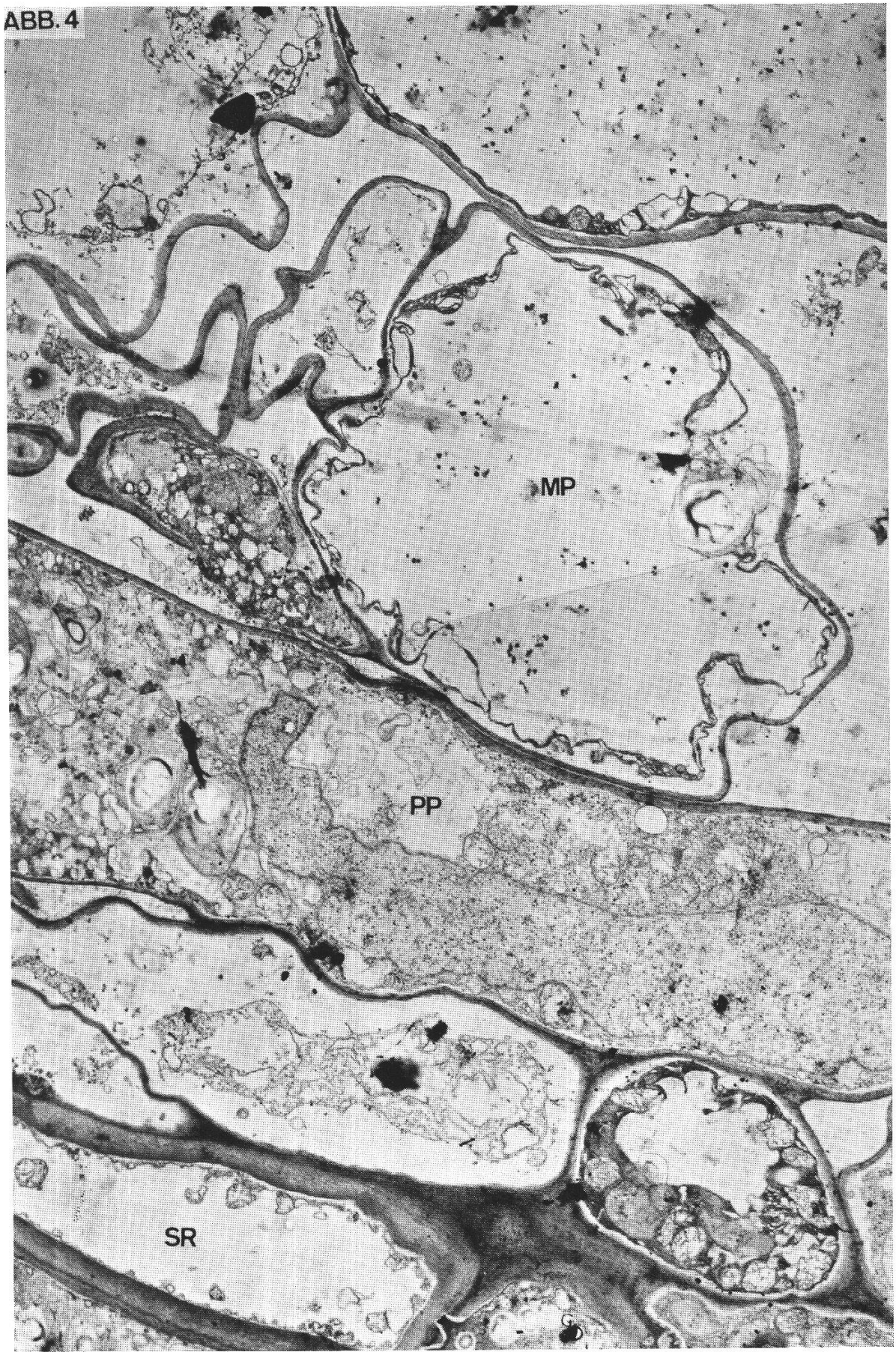


Abbildung 4

Tafel II

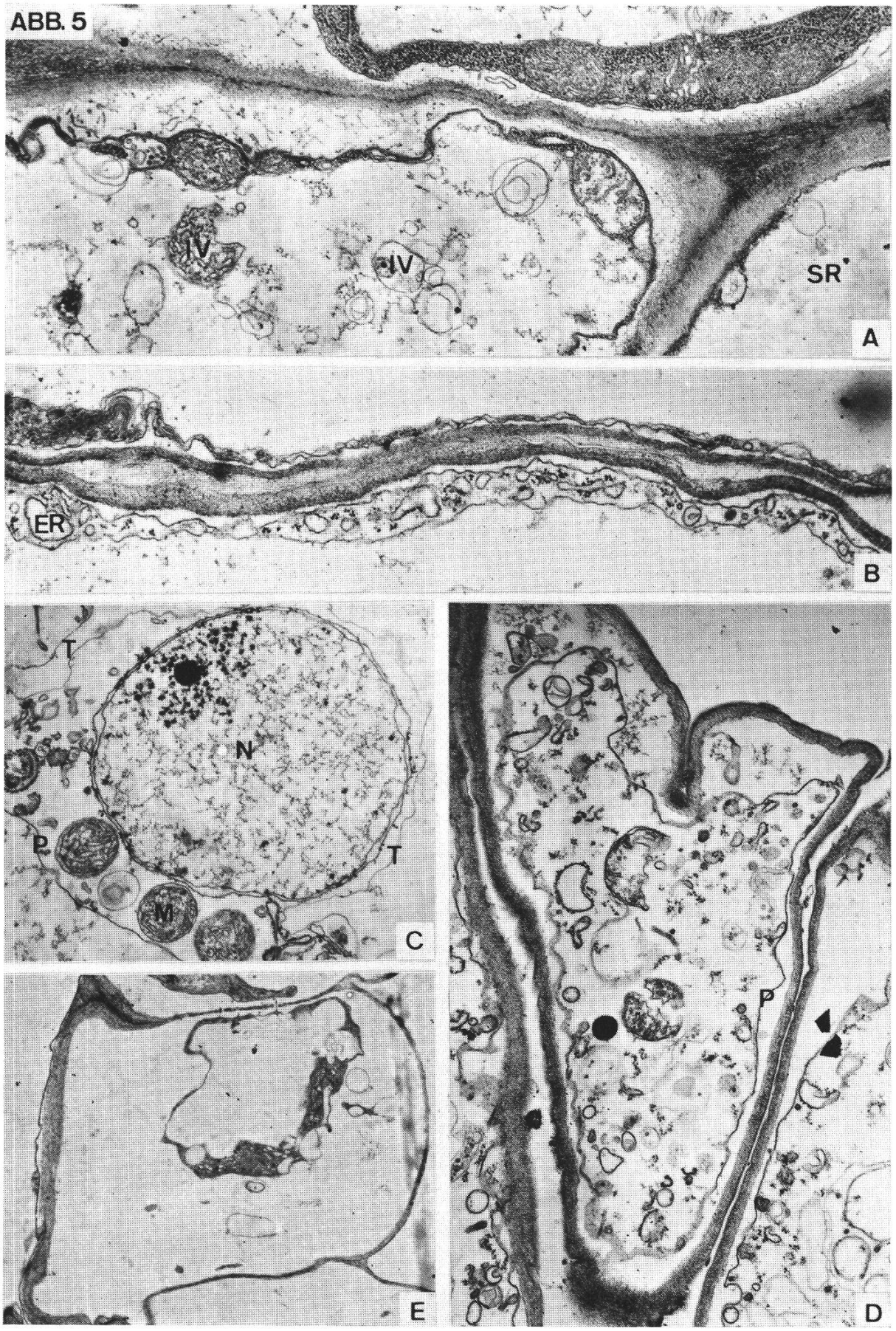


Abbildung 5

kroskop wurde dieses unterschiedliche Verhalten der Zellen beobachtet und die morphologischen Veränderungen beim Altern der Zellen bis zur Autolyse untersucht.

5. *Elektronenmikroskopische Beobachtungen*

Ein Übersichtsbild aus der Randzone einer Korolle in der Streckungsphase zeigt dass einige Zellen im Phloem und im Mesophyll sich in Auflösung befinden, während andere intakt sind (Abb. 4). Weitere Beobachtungen in dieser Zone ergeben, dass sich die Mehrzahl der Zellen des Phloemparenchyms, des Mesophylls und der Epidermis zu verschiedenen Zeitpunkten aufzulösen beginnen (Tab. 5). In der Einrollphase sind einige Zellen der Epidermis und fast alle Zellen des Mesophylls in Auflösung begriffen. Im Phloem erscheinen am Tage nach dem Blühen noch viele plasma- und mitochondrienreiche Zellen vollkommen intakt.

In der intakten Zelle sind das Cytoplasma und die Organelle kompakt, und in der Vakuole können manchmal lockere Fragmente des Protoplasmas beobachtet werden, die sich auflösen (Abb. 5 A, 6 A). Diese Fragmente gelangen durch Phagocytose des Tonoplasten in die Vakuole. Als erstes Anzeichen der Auflösung einer Zelle weisen das Cytoplasma und das Karyoplasma eine lockere Struktur auf. Die Cisternen des ER blähen sich auf, und das ER gliedert sich in Vesikel, während die Mitochondrien kompakt bleiben. Der Tonoplast ist schlaff, passt sich der Form der gedehnten Vesikel an und bildet Ein- und Ausstülpungen (Abb. 5 B, C, 6 B). In der

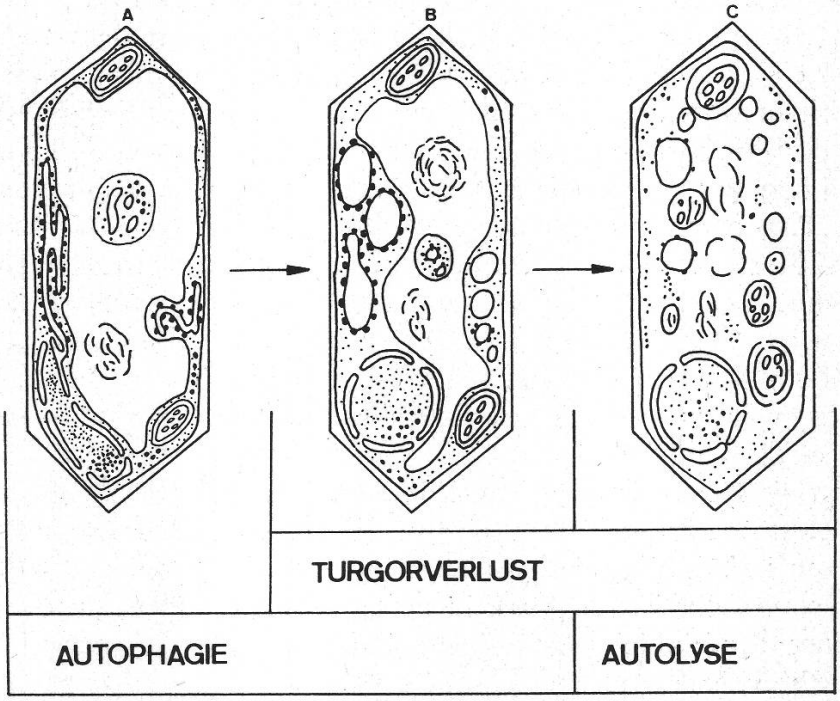


Abbildung 6

Schematische Darstellung des Alterns von Mesophyllzellen. (A) In die Vakuole werden Fragmente des Protoplasmas eingeschleust und verdaut. (B) Der Tonoplast verliert seine Fähigkeit zur Akkumulation von Mikromolekülen und schrumpft. (C) Der Tonoplast zerfällt, Zellsaft und Cytoplasma vermischen sich

Folge scheint der Tonoplast labil zu werden und in Bläschen zu zerfallen. Damit scheint die Autolyse einzusetzen: Cytoplasma und Zellsaft vermischen sich, und das Chaos sich auflösender Organellen und Membranen wird nur noch durch das Plasmalemma begrenzt (Abb. 5D, 6B).

Die Epidermiszellen, die in der späten Einrollphase nur noch einen geringen osmotischen Wert besitzen, plasmolysieren im Fixierungsmittel stark (Abb. 5E). Im Gegensatz zu den nicht mehr turgeszenten Mesophyllzellen ist das mit kleinen Vakuolen durchsetzte Cytoplasma kompakt.

In der Einrollphase setzt bei der überwiegenden Zahl der Zellen die Auflösung ein. Gleichzeitig nimmt die Aktivität der Nukleasen und der β-Glukosidase sprunghaft zu. Zwischen der beginnenden Auflösung und der Synthese von Hydrolasen dürfte folglich ein Zusammenhang bestehen.

D. Diskussion

1. Zur Funktion hydrolytischer Enzyme in alternden Korollen

Die sprunghafte Neubildung der Nukleasen in der welkenden Korolle äussert sich besonders eindrücklich in isolierten Korollenscheiben auf Wasser, wo ihre Aktivität in 12 Stunden auf den 40- bis 50fachen Betrag ansteigt. Während zwischen der RN-aseaktivität und dem RNS-Gehalt keine Korrelation besteht, entspricht dem gewaltigen Anstieg der DN-aseaktivität eine schnelle Abnahme des DNS-Gehalts, das heisst, das Enzym scheint nach seiner Bildung sofort zum Substrat zu gelangen. Erfahrungsgemäss ist der Gehalt an cytoplasmatischer DNS viel geringer als an Kern-DNS (Sampson et al., 1963), und es scheint daher, dass auch diese in die Mobilisation einbezogen wird. Das würde bedeuten, dass die DN-ase entweder im Zellkern gebildet wird oder dass nach der Neubildung des Enzyms die Kompartimentierung der Hydrolasen zusammenbricht (vgl. Srivastava, 1968).

Die Erhöhung der Nukleasenaktivität in alternden Pflanzenorganen scheint ein allgemeines Phänomen darzustellen: In vergilbenden Tabakblättern nimmt die RN-aseaktivität stark zu (Balz, 1966), ältere Tomatenblätter haben eine höhere RN-aseaktivität als junge (McHale et al., 1968), und in isolierten Gerstenblättern auf Wasser verstärkt sich beim Altern die mit dem Chromatin isolierte Aktivität der RN-ase und DN-ase um ein Vielfaches (Srivastava, 1968). Auch in isolierten Haferblättern wurde die de novo Synthese von saurer RN-ase beobachtet (Udvardy et al., 1969).

Welches ist die Funktion der gewaltigen Neubildung von Nukleasen in welkenden Korollen? Zerstören die vor der Autolyse gebildeten Nukleasen, nachdem sie von den Schranken befreit sind, sofort alle noch aktiven Matrizen und Werkzeuge der Proteinsynthese? Oder ist die Funktion eher darin zu sehen, dass die Pflanze mit den Bausteinen der Nukleinsäuren (Phosphate) besonders sparsam haushaltet (vgl. Winkenbach, 1970)?

Im Gegensatz zur Aktivität der Nukleasen verändert sich die Aktivität der Protease in alternden Organen von Pflanzen wenig. Dies zeigen Versuche an vergilbenden Tabakblättern (Balz, 1966), an Scheiben junger und alter Tabakblätter sowie an alternden Blattscheiben auf Wasser (Anderson et al., 1965) und an aufblühenden und welkenden Korollen von *Ipomoea*. Die plötzliche Abnahme des Proteinge-

halts in welkenden Korollen scheint deshalb nur dadurch erklärbar, dass mehr Protein mit der Protease in Berührung kommt.

2. *Zur Identität des lysosomalen Kompartiments*

In pflanzlichen Zellen wurden lysosomale Enzyme in den Sphärosomen (Walek-Czernecka, 1962, 1965; Matile et al., 1965, u.a.) und in meristematischen Vakuolen (Matile, 1966, 1968) lokalisiert. In Homogenaten aus parenchymatischen Geweben hängt der Anteil der strukturgebundenen Hydrolasenaktivität stark von der Homogenisationsart ab (vgl. Matile, 1969, Literaturzusammenfassung).

Bei *Ipomoea* herrscht keine absolute Gewissheit über die Identität der Lysosomen, da ihre Isolation nicht gelungen ist. Jedoch weisen mehrere Ergebnisse darauf hin, dass die Zentralvakuole lysosomale Funktion besitzt:

1. Das pH-Optimum der meisten Hydrolasen und das pH des Zellsaftes scheinen weitgehend übereinzustimmen. 2. Mildere Homogenisation bewirkt eine Erhöhung der strukturgebundenen Aktivität. 3. In intakten Zentralvakuolen können in Auflösung begriffene Cytoplasmafragmente beobachtet werden. 4. Bei der Autolyse scheint der Tonoplast zu zerfallen, das Cytoplasma sich mit dem Zellsaft zu vermischen und sich aufzulösen. 5. Während des Welkens autolysiert die Mehrzahl der Korollenzellen. Parallel dazu nimmt die relative strukturgebundene Aktivität von lysosomalen Enzymen ab. 6. Ebenso nimmt der Proteingehalt plötzlich stark ab, ohne dass sich die Aktivität der Protease ändert.

Auch extrazellulär wurden lysosomale Enzyme lokalisiert (Chang et al., 1964; Poux, 1967; McLean et al., 1968, u.a.). Bei *Ipomoea* scheinen mindestens die Invertase und ein Teil der Phosphatase extrazellulär vorzuliegen.

Nach de Duve (1969) stehen alle membranbegrenzten Räume einer Zelle – intrazellulär und extrazellulär – mit Ausnahme der Mitochondrien und Plastiden miteinander in Verbindung und bilden eine Gesamtheit, die er in Anlehnung an Dangeard als Vakuom bezeichnet. Der Hydrolasen enthaltende Teil des Vakuoms sind Lysosomen.

Die schnelle de novo Synthese von Nukleasen und von β-Glukosidase in welkenden Korollen wirft die Frage auf, in welchem Teil des Vakuoms diese Enzyme gebildet werden. In Bauchspeicheldrüsen werden die Hydrolasen im rauhen ER gebildet, in glatten ER-Vesikeln zum Golgi-Apparat befördert und als reife Zymogengranula ausgeschieden (Jamieson et al., 1967 a, b). In Wurzeln vermuten McLean et al. (1968) eine analoge Sekretion von Esterase. Wiemken (1969) nimmt an, dass bei Hefezellen die Synthese von Hydrolasen an den Ribosomen der Tonoplasten erfolgt. In welkenden *Ipomoea*-Korollen ist die relative Abnahme der strukturgebundenen RN-ase- und β-Glukosidase-Aktivität lediglich ein Beweis dafür, dass die gebildeten Enzyme nicht in stabilen Vesikeln gespeichert werden.

3. *Katabolismus und Autolyse*

Beim Aufblühen der *Ipomoea*-Korolle dürfte hauptsächlich die Autolyse von Mesophyll- und Phloemzellen die deutliche Abnahme der RNS und die geringe Verminderung des Proteingehalts bewirken. Schumacher (1932), der eine Proteinabnahme in aufgeblühten Korollen mehrerer Arten beobachtet hat, spricht von einem frühzeitig einsetzenden «geheimen tödlichen Spiel der Eiweissspaltung», das mit der Autolyse einzelner Zellen identisch sein dürfte. Die intakten Epidermen scheinen dieses «geheime Spiel» bis zum Beginn des Welkens zu verbergen, und die beim

Stoffrückzug wahrscheinlich aktiven Zellen des Phloems scheinen ihm am längsten zu widerstehen.

In der welkenden Korolle scheint der Autolyse einer Zelle die Neubildung von Nukleasen und der β-Glukosidase vorauszugehen. Falls die Neubildung dieser Enzyme ein Indiz für einsetzende Autolyse ist, setzt in isolierten Scheiben aus Knospen schon nach wenigen Stunden die Autolyse einer grossen Zahl von Zellen ein. Gegenüber der RN-ase ist die Neubildung der β-Glukosidase ähnlich verzögert wie die Autolyse der Epidermiszellen im Vergleich zu den Mesophyllzellen. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die β-Glukosidase hauptsächlich in den Epidermiszellen gebildet wird, wo sie ein Glykosid (evtl. Anthocyan) spaltet, das in den übrigen Zellen weniger angereichert ist. Die unterschiedliche Ausstattung an Hydrolasen in verschiedenen Geweben, in bestimmten Entwicklungsstadien einzelner Zellen und der Synthese- und Wirkungsort von hydrolytischen Enzymen ist wohl am ehesten mit cytochemischen Methoden (Licht- und Elektronenmikroskopie) erforschbar (vgl. Ziegler, 1956; Jamieson et al., 1967 a, b; McLean et al., 1968).

In den lebenden Korollenzellen, wo die Bildung und der Abbau von Stoffen nebeneinander ablaufen, werden durch Phagocytose Fragmente des Protoplasmas in die Vakuole geschleust und hydrolysiert. Die Vakuole dürfte folglich nicht nur als Aufenthaltsort von Exkreten, die mit dem Cytoplasma unvereinbar sind (Frey-Wyssling, 1953), sondern auch als ein Sammelbecken (Pool) von Bausteinen des Protoplasmas funktionieren (vgl. Indge, 1968). Innerhalb des Vakuoms von Parenchymzellen scheint die Zentralvakuole funktionell das bedeutendste Lysosom zu sein, bei dessen Zerfall die Autolyse einsetzt (vgl. Frey-Wyssling, 1943).

Zusammenfassung

Der Mobilisation von Nukleinsäuren in der welkenden Korolle von *Ipomoea* entspricht eine stark erhöhte Nukleasenaktivität. Demgegenüber ändert die Proteasenaktivität während der starken Abnahme von Proteinen wenig.

Die Aktivität der β-Glukosidase erhöht sich beim Welken um ein Vielfaches, während jene der α-Glukosidase, der α-Amylase, der Phosphatase und der Acetatesterase wenig ändert. Hemmstoffe der Eiweissynthese verhindern die Zunahme der Nukleasen- und der β-Glukosidase-Aktivität.

Lokalisationsversuche mit zellfreien Extrakten und Beobachtungen im EM weisen darauf hin, dass ein Grossteil der Verdauungsenzyme in der Zentralvakuole lokalisiert ist. Es scheint, dass mit dem Zerfall des Tonoplasten die Autolyse einsetzt.

Schon während des Streckungswachstums der Korolle autolysieren Zellen des Phloemparenchyms und des Mesophylls. In der Epidermis setzt die Autolyse erst während des Welkens ein.

Summary

The mobilization of nucleic acids in the senescing corolla of *Ipomoea* coincides with a greatly increased nuclease activity. In contrast the protease activity changes only slightly during the rapid mobilization of proteins.

The β-glucodidase activity increases greatly during senescence while the activities of α-glucosidase, α-amylase, phosphatase and acetylesterase show little change.

Inhibitors of protein synthesis block the increase of nucleases and β-glucosidase.

Attempts to localize lytic enzymes intracellularly and electron micrographs indicate their presence in the central vacuole. Autolysis seems to be initiated by the breakdown of the tonoplast.

Cells of the mesophyll and of the phloem parenchyma show signs of autolysis during expansion of the corolla. In contrast in the epidermal cells autolysis does not commence before senescence.

Meinem Lehrer Herrn Prof. Dr. Ph. Matile danke ich herzlich für die wertvollen Anregungen und Ratschläge beim Entstehen meiner Arbeiten, Herrn P. Frick, Obergärtner, für die Pflege der *Ipomoea*-Kulturen und Fräulein Ruth Rickenbacher für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Literatur

Ambellon E. und V.P. Hollander. 1966. A simplified assay for RN-ase activity in crude tissue extracts. Analyt. Biochem. **17**, 474–484.

Anderson J. W. und K.S. Rowan. 1965. Activity of peptidase in tobacco leaf tissue in relation to senescence. Biochem. J. **97**, 741–746.

Balz H.P. 1966. Intrazelluläre Lokalisation und Funktion von hydrolytischen Enzymen bei Tabak. Planta (Berl.) **70**, 207–236.

Bidwell R.G.S., R.A. Barr und F.C. Steward. 1964. Protein synthesis and turnover in cultured plant tissue: Sources of carbon for synthesis and the fate of protein break down products. Nature (Lond.) **203**, 367–373.

Chang C.W. und R.S. Bandurski. 1964. Exocellular enzymes of corn roots. Plant Physiol. **39**, 60–64.

de Duve C. 1969. The lysosome in retrospect. Lysosomes in Biology and Pathology, S. 3–40. North Holland Publishing Company, Amsterdam, London.

— B.C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux und F. Appelmans. 1955. Tissue fractionation studies. VI. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. Biochem. J. **60**, 604–617.

Frey-Wyssling A. 1943. Die Blattfermentation als Autolyse. Vjschr. Naturforsch. Ges. Zürich **88**, 176–185.

— 1953. In: Submicroscopic morphology of protoplasm. Elsevier Publ. Co., Amsterdam, Houston, London, New York.

Greenberg D.M. 1961. Plant proteolytic enzymes. Methods in Enzymology, Vol. II, 54–64. Acad. Press, New York.

Indge K.J. 1968. Polyphosphates of the yeast cell vacuole. J. gen. Microbiol. **51**, 447–455.

Jamieson D. und G.E. Palade. 1967 a, b. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. I. Role of the peripheral elements of the golgi complex. J. Cell Biology **34**, 577–596. II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. Ebenda **34**, 597–615.

Matile Ph. 1964. Die Funktion proteolytischer Enzyme bei der Proteinaufnahme durch *Neurospora crassa*. Naturwiss. **51**, 489–490.

— 1966. Enzyme der Vakuolen aus Wurzelzellen von Maiskeimlingen. Ein Beitrag zur funktionellen Bedeutung der Vakuole bei der intrazellulären Verdauung. Z. Naturforsch. **21b**, 871–878.

— 1968. Lysosomes of root tip cells in corn seedlings. Planta (Berl.) **79**, 181–196.

— 1969. Plant lysosomes. Lysosomes in Biology and Pathology, S. 406–430. Hrsg. Dingle und Fell. North Holland Publishing Company, Amsterdam, London.

— J.P. Balz, E. Semadeni und M. Jost. 1965. Isolation of spherosomes with (lysosome) characteristics from seedlings. Z. Naturforsch. **20b**, 693–698.

McHale J.S. und L.D.Dove. 1968. Ribonuclease activity in tomato leaves as related to development and senescence. New Phytol. **67**, 505–515.
McLean J. und P.B.Gahan. 1968. Hydrolase activities in differentiating plant tissues. Biochem. J. **111**, 34 S.
Mollenhauer H.H. 1964. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. Stain Technol. **39**, 111–114.
Morris I. 1966. Inhibition of protein synthesis by cycloheximide (actidione) in Chlorella. Nature (Lond.) **211**, 1190–1192.
— 1967. The effect of cycloheximide (actidione) on protein and nucleic acid synthesis. J. exp. Bot. **18**, 54–64.
Poux N. 1967. Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème radiculaire de *Cucumis sativus*. I. Activités phosphatasiques neutres dans les cellules du protoderme. J. Microscopie **6**, 1043–1058.
Reynolds E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. J. Cell Biol. **17**, 208–213.
Sampson M., A.Katoh, Y.Hotta und H.Stern. 1963. Metabolically labile deoxyribonucleic acid. Proc. Nat. Acad. Sci. **50**, 459–463.
Schumacher W. 1932. Über Eiweissumsetzungen in Blütenblättern. Jahrb. wiss. Bot. **75**, 581–608.
Srivastava B.I.S. 1968. Increase in chromatin associated nuclease activity of excised barley leaves during senescence and its suppression by kinetin. Biochem. Biophys. Res. Commun. **32**, 533–538.
Street H.V. 1956. Determination of amylase activity in biological fluids. Clin. Chim. Acta **1**, 256–268.
Udvardy J., G.L.Farkas und E.Marrè. 1969. On RN-ase and other hydrolytic enzymes in excised avena leaf tissues. Plant and Cell Physiol. **10**, 375–386.
Walek-Czernecka A. 1962. Mise en évidence de la phosphatase acide dans les sphérosomes des cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*. Acta Soc. Bot. Polonia **31**, 539–543.
— 1965. Histochemical demonstration of some hydrolytic enzymes in the spherosomes of plant cells. Acta Soc. Bot. Polonia **34**, 573–588.
Wiemken A. 1969. Eigenschaften der Hefevacuole. Diss. Nr.4340, ETH, Zürich.
Winkenbach F. 1970. Zum Stoffwechsel der aufblühenden und welkenden Korolle der Prunkwinde *Ipomoea purpurea*. I. Beziehungen zwischen Gestaltwandel, Stofftransport, Atmung und Invertaseaktivität. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **80**, 374–390.
Ziegler H. 1956. Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. Planta (Berl.) **47**, 447–500.