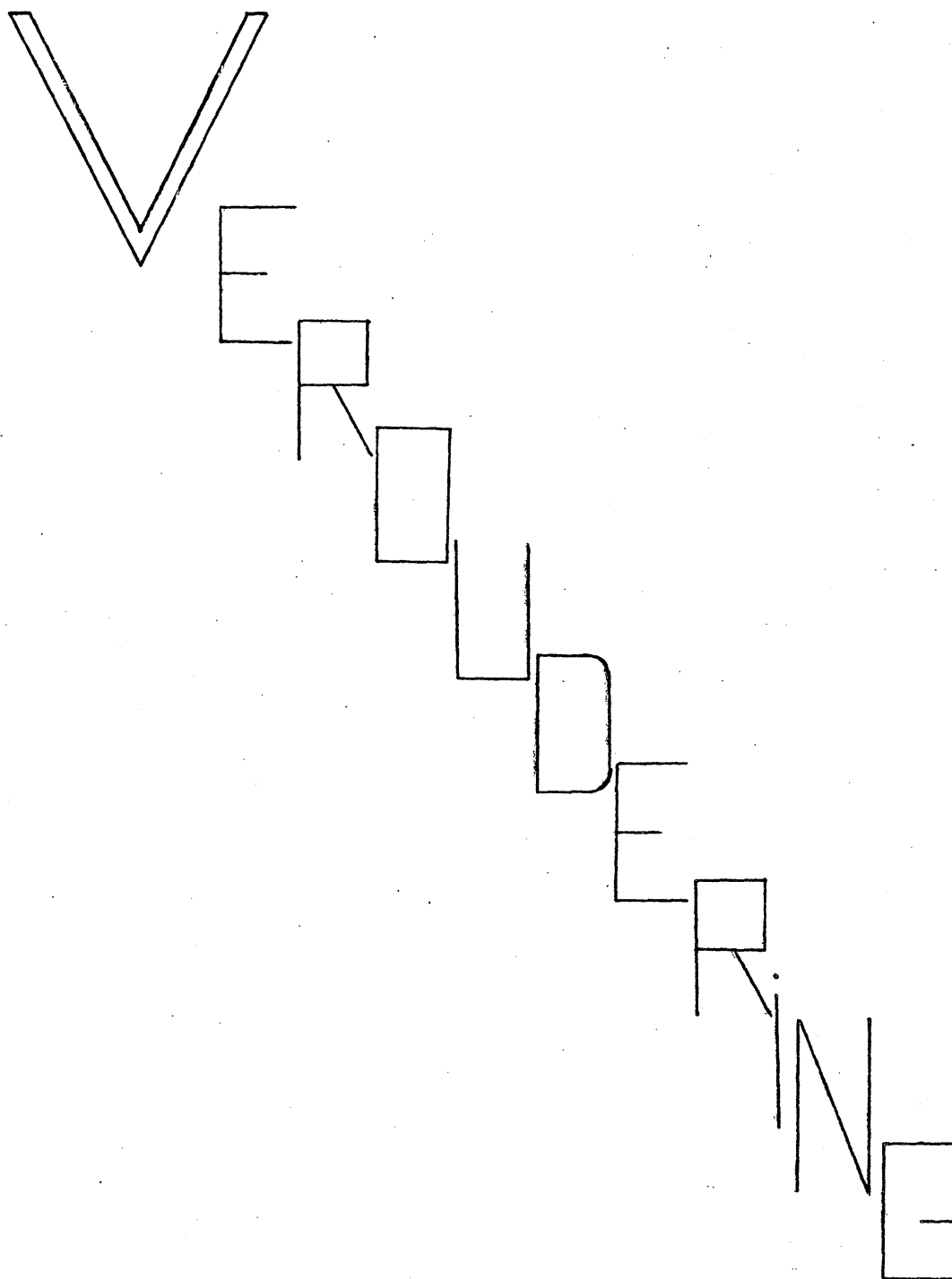




een scriptie gemaakt door Peter Geerts en Sjef van de Sande.

Inhoudsopgave

	Blz.
Inhoudsopgave	1
Algemene inleiding	2
Inleiding bladveroudering	6
Cytologische aspecten van de veroudering	10
-chloroplasten	10
-mitochondriën	11
-endoplasmatisch reticulum	11
-kern	11
-vacuole	11
Biochemische aspecten van de veroudering	16
-RNA	17
-Eiwitten	17
-Chlorofyll	20
Hormonale aspecten van de veroudering	22
-Cytokinininen	22
-Auxinen	24
-Gibberellinen	24
-Abscisinezuur	25
-Ethyleen	25
Veroudering planten - dieren	27
Literatuur	28

ALGEMENE INLEIDING.

Zoals alle meercellige organismen zijn ook de hogere planten sterfelijk. Voorafgaande aan de dood, spelen zich een aantal processen af, die wij onder de naam 'veroudering' samenvatten. Deze verouderingsprocessen kunnen het gehele organisme betreffen, waardoor de plant in zijn totaliteit afsterft. De één- en tweejarige planten zijn hier een voorbeeld van. Dergelijke planten die afsterven nadat ze vrucht hebben gezet (en dus slechts éénmaal bloeien), noemen we monocarp (Agave bijvoorbeeld is dus ook monocarp). De polycarpen zijn planten die meerdere malen vruchten kunnen geven. Ook deze (overjarige) planten vertonen voortdurend veroudering en daaropvolgend afsterving. Bij de loofbomen worden elk jaar in de herfst de bladeren afgestoten; maar ook de bladeren van de 'altijd groene' coniferen hebben een beperkte levensduur. De eerst aangelegde bladeren zullen ook het eerst verouderen. Tenslotte treffen we in de plant gedurende de gehele ontwikkeling differentiaties aan, waarbij we zeker kunnen spreken van een op elkaar volgende veroudering en afsterven van cellen (zoals bijvoorbeeld de differentiatie van een jonge meristematische cel tot een dood houtvat).

De natuurlijke veroudering is bij de hogere plant dan ook niet een catastrofaal gebeuren, maar verloopt veel meer via een regulatiepatroon hetgeen de ontwikkeling van het individu dan wel het in stand houden van de soort ten goede komt.

Hoewel de latere stadia van de veroudering duidelijk waarneembaar zijn, is het niet mogelijk het begin van het verouderingsproces in het organisme precies vast te leggen. Het eerste zichtbare teken van de veroudering is de verkleuring van het blad, veroorzaakt door een afbraak van chlorofyll, waardoor andere pigmenten zoals xanthofyllen en carotenoiden meer op de voorgrond treden.

Bij het onderzoek naar de oorzaken van veroudering bij planten wordt veelvuldig gebruik gemaakt van afgesneden bladeren. Bladeren gaan verouderen zodra zij worden afgesneden, ook wanneer zij daar nog lang niet aan toe geweest zouden zijn als zij aan de plant waren blijven zit-

ten. Dit proces wordt als ageing aangeduid, terwijl de natuurlijke veroudering met senescence wordt omschreven. De term ageing wordt echter ook nog in een ander verband gebruikt. Wanneer een boom toeneemt in omvang en complexiteit en een ingewikkeld takkensysteem opbouwt, vertoont hij een geleidelijke afname in de jaarlijkse groeitoename van de scheuten, en apicale dominantie en geotropische reacties gaan geleidelijk verloren. Deze veranderingen worden ook omschreven als 'ageing', om ze te onderscheiden van andere veranderingen die optreden tijdens het leven van de boom, die het best kunnen worden omschreven als 'maturation' of 'phase change'. Zoals bekend is vertonen zaailingen van houtige planten regelmatig vegetatieve verschillen ten opzichte van volwassen planten bv. bladvorm, fyllotaxis, bladval, wortelvormend vermogen. Bovendien zijn de zaailingen gedurende de juveniele fase niet in staat bloemen te produceren; zodoende maken we een verschil tussen juveniele en volwassen fase. De overgang van de ene fase naar de andere wordt 'phase change' genoemd. Het is belangrijk een onderscheid te maken tussen deze 'phase change' en 'ageing' bij houtige gewassen.

De oorzaken van de veroudering in het algemeen worden door Woolhouse (13) verdeeld in twee tegengestelde groepen van processen. De eerste groep, aangeduid als stochastische processen, bevat alle gebeurtenissen in de omgeving die van invloed zijn op de veroudering van de plant. De tweede groep, aangeduid als genetische processen, bevat die veranderingen welke plaatsvinden als gevolg van het in werking treden van genetisch bepaalde factoren.

Voor de veroudering van bladeren (waar we de meeste aandacht op zullen vestigen) geeft hij 3 groepen factoren;

1. Milieufactoren.

- Licht 1. Er is een effect beschreven nml. dat rood licht veroudering vertraagt, omkeerbaar m.b.v. infrarood licht (6).

- 2. Het optreden van veroudering kan vertraagd of uitgesteld worden door toepassing van korte of

lange dag op bepaalde gewassen (13). Als de korte-dag plant *Perilla frutescens*, die normaal éénjarig is, onder lange dag condities geplaatst wordt, dan kan de plant jarenlang vegetatief blijven.

- **Temperatuur**

Blootstellen aan ongunstige temperaturen, zowel hoge als lage, kan de veroudering op gang brengen, waarschijnlijk als gevolg van structurele of metabolische schade (6).

Als de veroudering reeds is ingezet dan is de snelheid van veroudering positief gecorreleerd met de temperatuur.

- **Beschikbaarheid van water**

De vochtigheidsgraad van de grond heeft ook invloed op de veroudering. Droogte induceert veroudering vooral bij oudere bladeren, terwijl jongere bladeren wel eens anders kunnen reageren (6).

- **Beschikbaarheid van mineralen**

Chlorose, necrose en bladveroudering zijn karakteristieke symptomen van gebrek aan mineralen in planten. Met betrekking tot de mobiele elementen heeft bladveroudering een belangrijke stabiliserende functie in de minerale voeding van de plant.

- **Optreden van pathogenen**

De aanwezigheid van pathogenen op of in een blad kan resulteren zowel in een vertraging (vb. *Erysiphe graminis*, *Uromyces phaseoli*) als een versnelling van de veroudering (6).

Het is niet uitgesloten dat factoren zoals licht, temperatuur e.d. hun invloed op de veroudering doen gelden d.m.v. het beïnvloeden van de niveaus van endogene hormonen in de bladeren (11).

2. **Endogene veroudering van cellen van het blad zelf.**

Zo'n proces kan verantwoordelijk zijn voor de langzame veroudering, gepaard gaande met een veel langere levensduur, in sommige coniferen, palmbomen en andere soorten.

Dit verschijnsel is echter nog niet erg diepgaand onderzocht en zijn geldigheid is nog onzeker.

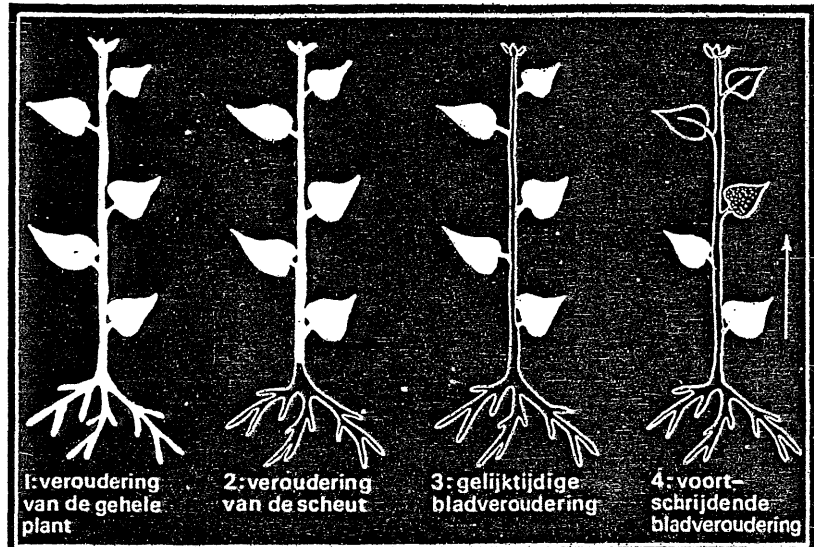
3. Bladveroudering welke correlatief is verbonden met ontwikkelingsprocessen die ergens anders in de plant optreden zoals vorming van bloemen, vruchten of jonge bladeren. Hier komen we later nog op terug.

In de laatste jaren is de interesse voor het probleem van de veroudering snel toegenomen. De hoeveelheid informatie die thans ter beschikking komt, heeft er toe geleid een aparte naam voor deze richting van de plantenfysiologie te creëren: de fytogerontologie.

INLEIDING BLADVEROUDERING.

De veroudering van bladeren kan in een viertal typen worden onderscheiden (fig.1).(4,12)

Fig. 1. Typen van veroudering bij planten (naar Wareing en Phillips, 1970).



Type 1 is de veroudering die we tegenkomen bij monocarpe planten. Bij dit soort planten wordt vaak gesproken van geprogrammeerde dood. Hieronder verstaan we dat de veroudering een genetisch gereguleerd proces is, inherent aan en consequentie van differentiatie, waardoor de cel of het organisme een vastgestelde levensduur is toegemeten. Een begrip dat we vaak tegenkomen vooral bij deze planten is mobilisatie. Mobilisatie wil zeggen dat celbestanddelen en reservestoffen worden afgebroken in de verouderende organen om te worden vervoerd naar jonge groeiende delen zoals bladeren, bloemen, vruchten en zaden of opslagorganen als bollen, knollen, wortels en wortelstokken. In dit geval (planten van type 1) zullen de stoffen vooral naar vruchten en zaden worden getransporteerd. Bij deze planten wordt alles wat eerder aan plantaardig materiaal gevormd is, opgeofferd om toch maar te zorgen voor zo goed mogelijk zaad voor het nageslacht.

Terwijl bij monocarpe planten zoals type 1, de gehele plant na de vorming van zaden afsterft, blijven bij de typen 2 en 3 wanneer de planten in de winter hun bovengrondse delen, resp. bladeren afstoten, de ondergrondse

delen, resp. stam over. Er zijn geen aanwijzingen dat deze wijze van overleven gebonden is aan een bepaalde tijds-spanne. Bomen bijvoorbeeld kunnen zeer oud worden: de 4600 jaar oude 'bristle cone pine' in Californië vormt het oudste levende wezen op aarde. De uiteindelijke levensduur van bomen lijkt daarom te berusten op toevallige factoren: klimaatswisselingen, infecties door pathogenen en mechanische problemen (4,8,10).

Het meest karakteristiek voor de veroudering van planten is de door mobilisatie en reversibiliteit (komen we later op terug) gekenmerkte veroudering van bladeren, zoals we die bv. in de herfst in de natuur waarnemen. Deze massale bladveroudering is het gevolg van een combinatie van korte dag en lage temperatuur, waardoor processen op gang worden gebracht die culminerend in snelle vergeling en tenslotte bladval (abscissie). Om dit verschijnsel experimenteel te bestuderen gebruikt men meestal eenjarige planten waarvan de eerstgevormde bladeren reeds sterke verouderingsverschijnselen vertonen terwijl aan de apex nog nieuwe bladeren gevormd worden (fig. 1, type 4). Aan dit soort planten met voortschrijdende bladveroudering is dan ook nog al wat onderzoek gepleegd. Enkele resultaten zullen hier worden vermeld.

Eén van de belangrijkste dingen, zoniet het belangrijkste, wat geconstateerd wordt, is dat veroudering gezien moet worden als een zogenaamd correlatieverschijnsel, d.w.z. dat de snelheid van veroudering van planteorganen bepaald wordt door de toestand van de hele plant en niet simpelweg door de intrinsieke eigenschappen van de cellen van dat orgaan zelf (8,10,11).

In de gehele plant wordt geconcentreerd om de aanwezige organische en anorganische voedingsstoffen. Jonge groeiende bladeren oefenen een sterke zuigkracht uit ('sink'), waarbij de volgroeide bladeren als bron ('source') kunnen functioneren voor de assimilatorische bouwstenen en de wortel als 'source' voor de anorganische. Hoge metabolische activiteit elders in de plant (bv. in de vruchten)

zou dan het afsterven van de overige organen tot gevolg hebben door het creëren van een extra 'sink'. Toch kan deze source-sink theorie het optreden van bladveroudering niet volledig verklaren bij bv. tweehuizige gewassen. De vrouwelijke planten (die vruchten dragen) moeten volgens deze theorie namelijk sneller verouderen dan de mannelijke planten door hun grotere sink-activiteit, terwijl dit in de praktijk niet gebeurt (6,7,8,10).

Een tweede aanwijzing dat veroudering een correlatieverschijnsel is, is de zogenaamde reversibiliteit. Indien we bij planten waarbij de onderste bladeren reeds vergelen, de jonge groeiende stengeltop verwijderen, kan de veroudering geremd worden en het is zelfs mogelijk dat de bladeren weer groen worden (fig.2). De bladeren worden meestal

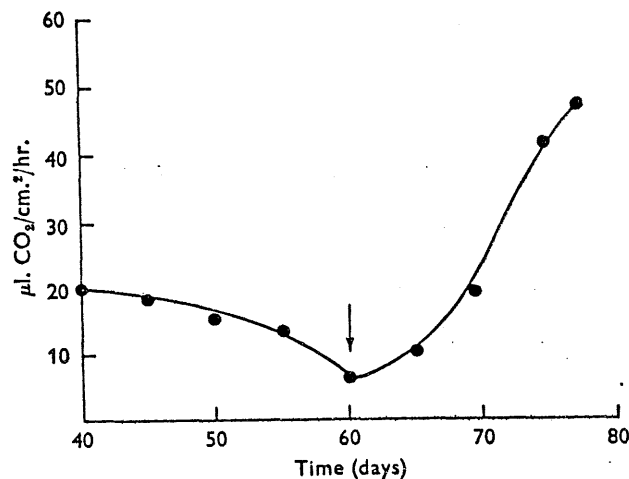


Fig.2 The influence of decapitation and subsequent re-greening on the rate of photosynthesis in the third pair of leaves of *Perilla*. Arrow indicates time of decapitation.

zelfs groter dan voordat de top verwijderd werd, en ook komt het voor dat ze dikker worden (5,6,8,12,13). Studies hieromtrent tonen aan dat er geen of weinig celdeling heeft plaatsgevonden maar dat de toename toe te schrijven is aan een grotere omvang van de cellen (6,13).

Als bladeren worden afgesneden van een plant dan verouderen ze tamelijk snel. Krijgen deze bladeren echter de kans om wortels te vormen op de bladsteel of bij de nerven, dan kunnen ze enkele maanden of in sommige gevallen zelf jarenlang groen blijven, terwijl ze aan de plant al verouderd

zouden zijn (fig.3). Bij soorten als *Begonia rex*, Saint-

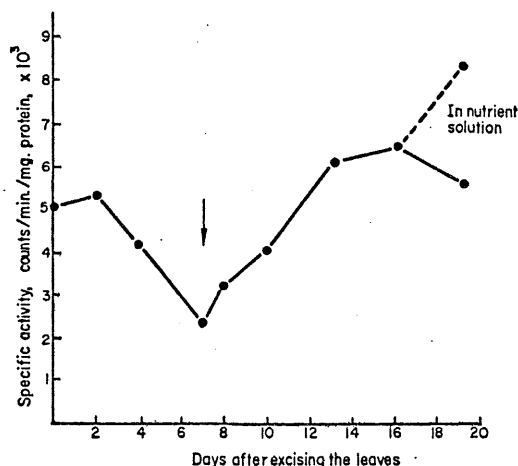


FIG. 3. Changes in capacity for protein synthesis (as measured by incorporation of ³⁵S-methionine into protein) in leaves of *Nicotiana rustica*. Note initial decline in capacity for protein synthesis, followed by recovery when roots appeared on petiole (indicated by arrow). (After von B. Parthier, *Flora, Jena*, 154, 230, 1964.)

paulia ionatha, Sinningia speciosa en Streptocarpus sp. gaat dit gemakkelijk. Dit effect van beworteling is toe te schrijven aan de produktie van bepaalde stoffen in de wortel, waar het blad anders van verstoken zou blijven (10, 12,13). Ook deze gebeurtenis geeft weer aan dat veroudering een correlatieverschijnsel is.

CYTOLOGISCHE ASPECTEN VAN DE VEROUDERING.

Zoals reeds eerder vermeld is het eerste zichtbare teken van bladveroudering de afbraak van chlorofyll, waardoor een verkleuring optreedt. Electronenmicroscopisch onderzoek laat zien, dat reeds in een vroeg stadium een degeneratie van het endoplasmatisch reticulum optreedt. De ribosomen verdwijnen geleidelijk, mitochondriën blijven langer intact maar verdwijnen eveneens aan het einde van het verouderingsproces. De afbraak van chloroplasten begint al wanneer de structuur van de mitochondriën nog volledig intact is (13). Cellen van volledig verouderde bladeren bezitten nog wel een intact plasmalemma, hoewel de tonoplast gedegenerieerd is.

chloroplasten

Wanneer men de chloroplasten tijdens de veroudering wat nader bestudeert dan krijgt men het volgende beeld.(9) De chloroplast is een organel ter grootte van 4 - 8 μ , omgeven door een membraan. De grondsubstantie van de chloroplast wordt het stroma genoemd. In dit stroma treffen we talrijke membranen aan, die thylakoiden genoemd worden. Bij de chloroplasten van hogere planten onderscheiden we grana-thylakoiden (de zgn. geldrolletjes) en de stromathylakoiden, membranen die langgerekt zijn. Electronenmicroscopie geeft ons de verschillende stadia van de chloroplastveroudering nauwkeurig aan. De dichte opeenpakking van de thylakoiden gaat verloren. De granathylakoiden oriënteren zich in de dwarsrichting van de chloroplast en de stromathylakoiden vertonen een golfachtige structuur. In de volledig verouderde chloroplast zijn lichaampjes te zien van grote optische dichtheid, die zich met osmiumzuur zichtbaar laten maken. Volgens Thomas en Stoddart (6) is een van de belangrijkste factoren bij de chloroplastveroudering het verloren gaan van de membraanstabiliteit waardoor binnen- en buitenmembraan van elkaar loslaten en allerlei vreemde stoffen de chloroplast kunnen binnendringen. Deze stoffen zorgen dan voor de afbraak van stromaenzymen en membraanproteïnen waardoor de aktiviteit van de beide fotosystemen I en II, welke een membraangebonden electronentransportketen bezit-

ten, sterk terugloopt.

Verder zorgen deze membraanveranderingen voor verlies van structurele integriteit welke karakteristiek is voor de veroudering.

mitochondriën

Verschillende studies hebben aangetoond dat de mitochondriën, afgezien van wat opzwellen en vervorming, nagenoeg intact blijven gedurende het afbraak- en verouderingsproces.

Dit wordt ondersteund door studies omtrent de respiratie en de aktiviteit van mitochondriale enzymen gedurende de veroudering.

endoplasmatisch reticulum

Ook hier treden gedurende de veroudering structuurveranderingen op wat o.a. blijkt uit de afname van de fosfolipidenfractie van het e.r. terwijl ook in de membranen meetbare structuurveranderingen plaatsvinden.

kern

Bladcellen bevatten intacte kernen zelfs wanneer de veroudering reeds in een vergevorderd stadium (vergeling van het blad) verkeert.

Nucleoli komen bij veroudering minder frequent voor.

vacuole

Naarmate een blad ouder wordt, neemt de vacuole in omvang toe zodat de organellen worden samengebracht in een steeds kleiner wordende hoeveelheid cytoplasma.

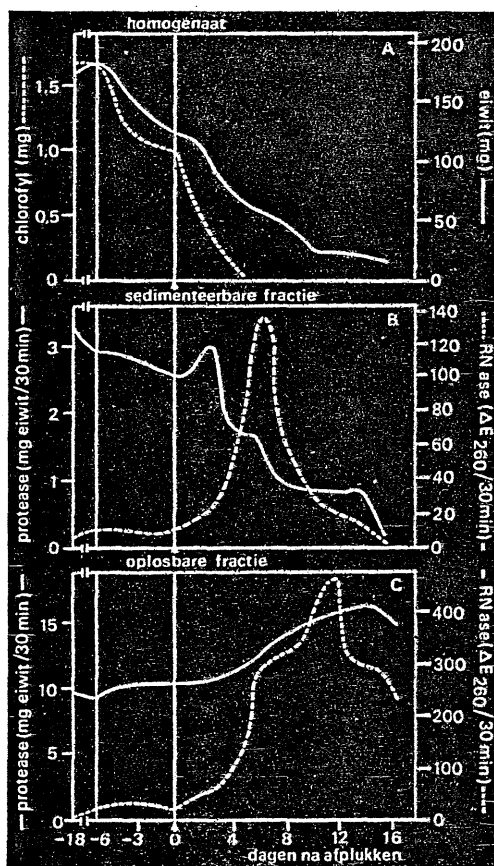
De permeabiliteit van de tonoplast verandert tijdens de veroudering, waardoor de pH van het cytoplasma lager wordt. Hierop komen we later terug.

Bij de meeste bladeren die verouderen treedt vlak vóór het afsterven uitdroging op. Bij de jonge bladcellen wordt de turgescentie behouden doordat de vacuole het water vasthoudt. Indien echter de integriteit van de celmembranen (vnl. tonoplast en plasmalemma) afneemt, waardoor deze

membranen hun semipermeabiliteit verliezen, zullen deze cellen door verdamping snel water verliezen en uitdrogen (7,8,9,10).

Door de afname van de structurele integriteit van de celmembranen, treedt 'lek' op van ionen en komt een decompartmentalisatie tot stand. Dit betekent dat bepaalde ruimtelijke scheidingen worden opgeheven. Aanwijzingen voor decompartmentalisatie zijn reeds eerder verkregen uit afgesneden bladeren van tabak. In het licht verouderen deze bladeren weinig sneller dan aan de plant; alleen chlorofyll wordt sneller afgebroken. De afbraak van eiwit ondergaat geen versnelling na afsnijden. Er treedt echter een lichte toename op van de protease-aktiviteit in de oplosbare fractie terwijl protease uit de sedimenteerbare fractie verdwijnt (fig.4). Een groot deel van de protease-akti-

Fig. 4 Verloop van de gehalten van chlorofyl (---) en eiwit (—) (A) en de activiteiten van protease (—) en RNase (---) in de sedimenteerbare fractie (1 uur 105.000 g) (B) en in de oplosbare eiwitfractie (C) van afgeplukte tabaksbladeren (naar Balz, 1966).



viteit op het moment van afsnijden bevond zich dus in een compartiment dat ruimtelijk gescheiden is van zijn sub-

straat: de oplosbare eiwitten. De RNase-aktiviteit was op het moment van afsnijden zeer laag. Daarna treedt er echter een zeer sterke toename op in zowel de sedimenteerbare als de oplosbare fractie. In de sedimenteerbare fractie verdwijnt zij weer even snel, terwijl nog enige tijd een toename optreedt in de oplosbare fractie. Dit suggereert dat RNase, dat nieuw gesynthetiseerd wordt, aanvankelijk opgesloten is in een compartiment waaruit het daarna geleidelijk vrijkomt.

Eiwitafbraak tijdens de bladveroudering berust dus niet op een toename van de protease-aktiviteit in zijn totaliteit, maar van de fractie die met de substraten in contact komen. Terwijl de totale protease-aktiviteit tijdens de normale ontwikkeling afneemt, neemt het percentage sedimenteerbare protease eveneens af, waardoor een voortschrijdende eiwitafbraak gegarandeerd wordt. Bij isopycische dichtheidscentrifugering in suikergradiënten bleek de protease gelokaliseerd te zijn in twee fracties met relatieve dichtheden van resp. 1,11 en 1,9 g/cm³. Met behulp van electronenmicroscopie werd vastgesteld dat de lichtste fractie bestond uit sferosomen, blaasjes, de zwaardere fractie uit prosferosomen, blaasjes waaraan nog delen van het e.r. te herkennen zijn. Men stelt zich thans voor dat de hydrolasen gevormd worden door membraangebonden ribosomen op het e.r. dat blaasjes vormt waarin de gevormde hydrolasen worden afgescheiden. Deze lossen de nog in de blaasjes aanwezige substraten op, waarna een echt sferosoom gevormd is. Deze blaasjes zouden tenslotte met elkaar en met de vacuole fuseren, waardoor in de vacuole een voorraad van hydrolytische enzymen wordt aangelegd en deze de functie krijgt van een lysosoom: een organel dat lysis, oplossing, teweege kan brengen. Wanneer bij veroudering van bladeren of verwelking van bloemen de permeabiliteitseigenschappen van de tonoplast veranderen, treedt verzuring van het cytoplasma op. Daardoor komen de uit de vacuole lekkende enzymen in een geschikte omgeving om hun werking uit te oefenen, zodat de celinhoud binnen een kort tijdsbestek kan worden gehydrolyseerd. De plasmalemma, de membraan die het plasma

omgeeft, blijft nog lange tijd ogenschijnlijk intact. Het is aannemelijk dat een massaal vrijkomen van in de vacuole aanwezige hydrolasen alleen optreedt in de laatste stadia van de veroudering, want een duidelijk zichtbare breuk van de vacuole treedt pas op wanneer de afbraak van de plastiden reeds in een ver gevorderd stadium verkeert. De geleidelijke afbraak van RNA en eiwitten die al in veel vroegere stadia op gang komt, zal daarom moeten berusten op een zeer geleidelijk vrijkomen van resp. ribonucleasen en proteasen. Hoe dit geleidelijk vrijkomen wordt gecontroleerd, is vooralsnog onbekend, al ligt het voor de hand de oorzaak te zoeken in veranderingen van de verschillende membraansystemen. (4)

De verslechtering in de kwaliteit van de membraan kan verder geïllustreerd worden door erop te wijzen dat ook de lipiden in het blad-een belangrijk onderdeel van membranen- in gehalte afnemen bij toenemende veroudering. In hoe verre peroxydatie van lipiden een rol speelt bij de desintegratie van plantaardige membranen blijft nog een open vraag. Bij dierlijke membranen zijn er zeker aanwijzingen dat peroxydatie de membraanpermeabiliteit doet toenemen. Electronenmicroscopie laat insluitsels zien -de zgn. lipofuscine korrels- waarvan men vermoedt dat ze, indien in voldoende mate aanwezig, de membraanstructuur kunnen aantasten. De samenhang tussen peroxydatie van lipiden en het optreden van lipofuscine is echter nog onzeker (9,10).

Sheldrake suggereert dat accumulatie in de cel van afbraakprodukten (waarbij hij wijst op de mogelijkheid van lipidenperoxydatie, maar andere mogelijkheden niet uitsluit) kan leiden tot een irreversibele schade aan de cel. Indien dergelijk materiaal niet meer kan worden afgebroken of kan worden afgescheiden, dan zal de cel op korte of lange termijn hieraan ten gronde gaan, tenzij de cel tot deling in staat is. Bij deze deling dient dan echter het grootste gedeelte of alles van het schadelijk produkt in één van de dochtercellen terecht te komen. Een symmetrische verdeling leidt binnen de populatie van cellen zeer snel tot een volledig uitsterven van de gehele celpopulatie. Indien echter één van de dochtercellen het grootste gedeelte van het af-

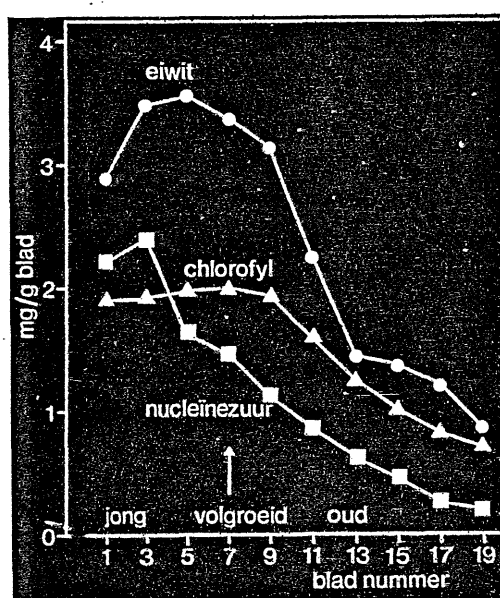
braakprodukt ontvangt en daardoor ook een zeer geringe levensduur heeft, zal de andere cel een grotere mate van levensvatbaarheid bezitten.

Binnen het plantenrijk zijn verschillende voorbeelden te noemen, welke de door Sheldrake gestelde hypothese ondersteunen. De levensduur van bomen is in principe onbeperkt, omdat het apicale topmeristeem voortdurend cellen blijft afsnoeren. Deze dochtercellen zullen vroeg of laat afsterven (reeds eerder werd de houtvatdifferentiatie als voorbeeld genoemd). De meristeemdochtercel blijft in leven en deelt zich opnieuw. De embryozakmoedercel ondergaat bij de geslachtelijke voortplanting een reductiedeling. Van de vier cellen die daarbij ontstaan gaan er drie ten gronde, terwijl zich uit de vierde cel de gametofyt ontwikkelt (9). Het is nog niet duidelijk in welke mate het verlies van integriteit van de membranen bijdraagt tot de verklaring van het mechanisme van de veroudering, maar wel is aangetoond dat het een symptoom is van het totale verouderingssyndroom.

BIOCHEMISCHE ASPECTEN VAN DE VEROUDERING.

Lang voordat de vergeling ons op de veroudering opmerkzaam maakt, kan in het blad een afname van verschillende assimilatorische processen, zoals DNA-, RNA- en eiwitsynthese worden geconstateerd. De dalingen die optreden in de gehalten van chlorofyll, eiwitten en nucleïnezuren tijdens de veroudering zijn weergegeven in fig.5 (4). Uit de gra-

Fig.5 Verloop van de gehalten van nucleïnezuren (■), eiwitten (●) en chlorofyl (▲) in opeenvolgende bladeren van tabak, gerekend van top naar basis.



fiek kan men aflezen dat het verlies van chlorofyll het laatst plaatsvindt, zodat men veroudering pas visueel waarneemt wanneer deze reeds in een vergevorderd stadium verkeert. De daling van het eiwitgehalte zet al in wanneer het blad ongeveer twee-derde van zijn totale afmetingen heeft bereikt en verlies van nucleïnezuur is in een nog eerder stadium te herkennen.

Aan de hand van bovenstaande figuur wordt verondersteld dat de vroege daling in het gehalte aan nucleïnezuren een daling in eiwitgehalte en uiteindelijk chlorofyllgehalte tot gevolg zal hebben.

Een soortgelijke afname van de verschillende componenten is ook door andere auteurs bevestigd (9,10,13).

In het nu volgende worden enkele van de componenten wat nader besproken, om te beginnen het RNA-gehalte.

RNA

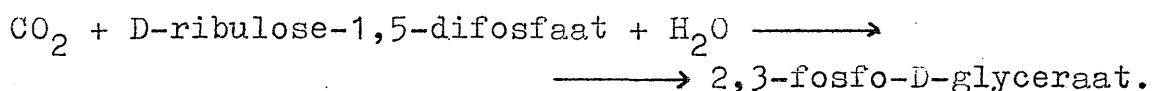
In de chloroplast treffen we DNA aan. Het gehalte hiervan bedraagt ongeveer 10^{-14} - 10^{-16} gram DNA per chloroplast. Het DNA kan functioneren als een matrijs voor een membraangebonden RNA-polymerase, welke in de chloroplast aanwezig is. Het gehalte aan ribosomaal RNA in de chloroplast wordt bepaald door de aktiviteit van het chloroplast-DNA.

Vele studies hebben aangetoond dat de synthese van chl. rRNA plaatsvindt gedurende de beginstadia van bladontwikkeling wanneer de synthese van de chloroplasten plaatsvindt, terwijl nauwelijks of geen aktiviteit valt waar te nemen wanneer het blad zijn maximale grootte bereikt heeft. Daarom oefent het chloroplastgenoom waarschijnlijk door zijn inaktiviteit invloed uit op de veroudering.

De oorzaak van het verminderd gehalte aan ribosomaal-RNA in de chloroplast lijkt te liggen in een verhoogde aktiviteit van de ribonucleasen, zodat de RNA afname hoofdzakelijk een gevolg is van de afname van chloroplast-RNA. Zo stijgt gedurende de veroudering van de bloemblaadjes van de driekleurige pronkwinde (*Ipomoea tricolor*) de aktiviteit van het ribonuclease (RNase) een vijftig maal.

Eiwitten

Meer dan 50% van het oplosbaar eiwit in bladextracten behoort tot een fractie die kan worden gekarakteriseerd door een hoog moleculair gewicht. Omdat dit eiwit als eerste fractie wordt geïsoleerd bij gelfiltratie, wordt het Fractie-I-eiwit genoemd. Fractie-I-eiwit kan identiek gesteld worden aan het enzym ribulose-difosfaat-carboxylase. Dit enzym kataliseert de volgende reactie, welke een onderdeel vormt van de donkerreactie in de chloroplasten;



De resterende oplosbare eiwitten met een lager moleculair gewicht worden samengevat onder de noemer 'Fractie-II-eiwit'. Uit verschillende publicaties (4,9,13) blijkt nu dat het grootste deel van het Fractie-I-eiwit gesynthetiseerd wordt

in de chloroplast, terwijl het overige deel gesynthetiseerd wordt in het cytoplasma, waarna het door het chloroplastmembraan heen dit organel moet binnendringen. Dit alles heeft men kunnen onderzoeken met remstoffen die specifiek eiwitsynthese remmen. Eiwitsynthese op cytoplasmatische ribosomen (van het type 80S) wordt bv. geremd door cycloheximide, terwijl 70S-ribosomen, welke voorkomen in de chloroplasten, geremd worden door bv. chlooramfenicol. Fractie-II-eiwit wordt grotendeels gesynthetiseerd op cytoplasmatische ribosomen.

Het gedrag van de twee fracties proteïnen tijdens de veroudering vertoont opvallende verschillen. De synthese van de Fractie-I-eiwitten neemt reeds af voordat de hoogste eiwitconcentratie in het blad is bereikt. Bovendien wordt het sneller afgebroken dan de overige eiwitten, waardoor al geen ribulosedifosfaatcarboxylase meer kan worden aangetoond als de totale hoeveelheid eiwit in het blad nog slechts tot de helft is afgenomen. Hetzelfde geldt ook voor andere op 70S-ribosomen gesynthetiseerde eiwitten en enzymen.

Dit verloop staat in tegenstelling tot dat der cytoplasmatisch gesynthetiseerde enzymen, die pas in de laatste stadia van de veroudering in aktiviteit verminderen (4,9,13). Voor het afnemen van de eiwitten en de verschillen in afbraak tussen Fractie-I- en Fractie-II-eiwit zijn een aantal verklaringen mogelijk.

Volgens van Loon (4) zorgt de relatieve vermindering van het aantal chloroplastribosomen en de hoeveelheid chl-tRNA reeds voor een vermindering van de capaciteit tot eiwitsynthese, terwijl bovendien blijkt dat de aanwezige chloroplastribosomen bij de veroudering minder betrokken raken bij de eiwitsynthese dan de cytoplasmatische, doordat zij minder en tevens kleinere polysomen vormen. Deze afname van de eiwitsynthese is waarschijnlijk terug te voeren op een geringer aanbod van mRNA.

Een andere hypothese is dat er een verandering plaatsvindt in de recyclingsnelheid van de eiwitten. Er vindt nml. een voortdurende afbraak en opbouw van enzymen en eiwitten

plaats, en wanneer nu ofwel de afbraak toeneemt of de opbouw afneemt dan zal de hoeveelheid eiwit afnemen. Volgens Wareing (11,12) vindt er een zodanige verschuiving plaats in de recyclingsnelheid van de eiwitten dat de eiwitsynthese afneemt, zodat de afbraak de opbouw gaat overheersen m.a.g. dat de hoeveelheid eiwitten afneemt.

Een ander punt betreffende Fractie-I-eiwit is dat het grotendeels geproduceerd wordt in de chloroplasten, een organel dat slechts semi-autonoom is. Tevens blijkt dat de fotosynthetische activiteit beter gehandhaafd blijft in geïsoleerde chloroplasten. De veroudering, zoals die zich uit in chlorofyll- en eiwitafbraak, blijkt dus niet geïnitieerd te worden in de chloroplast zelf, maar moet zijn oorzaak vinden in factoren in het cytoplasma. (4,6). Dit wordt bevestigd door experimenten met specifieke remmers van cytoplasmatische eiwitsynthese en synthese in de chloroplasten. De veroudering in licht en donker geeft een verschil te zien wat ook terug te voeren is op de recycling van eiwitten (fig.6). Wanneer men nml. bladeren laat verouderen in

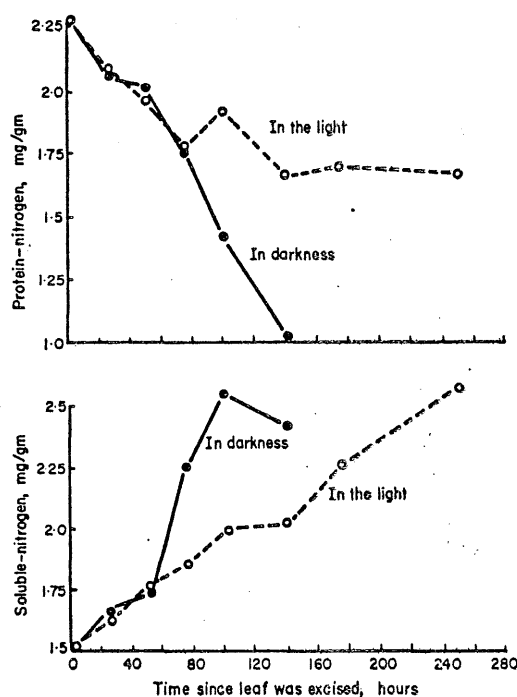


FIG. 6 Changes in protein and soluble nitrogen in detached tobacco leaves. Following excision, protein-N declines and soluble-N increases. Leaves kept in darkness show these changes more rapidly and are yellow and senescent after approximately 100 hours. (From H. B. Vickery et al., *Connecticut Agric. Exp. Sta. (New Haven) Bull.* 374, 557, 1935.)

het donker treedt al gauw een tekort op aan koolhydraten waardoor de eiwitsynthese afneemt zodat de veroudering in het donker sneller verloopt (12).

Tenslotte dient nog een laatste punt betreffende de eiwitafbraak vermeld te worden. Verschillende auteurs zijn nml. tot de ontdekking gekomen dat de hoeveelheid proteasen tijdens de veroudering nagenoeg konstant blijft. Om toch de grotere afbraak te kunnen verklaren neemt men aan dat vele proteasen ingesloten zitten in de vacuole en pas in toenemende mate werkzaam worden wanneer de integriteit van de tonoplast verloren gaat (4).

Chlorofyll

De derde en laatste in dit hoofdstuk te bespreken component betreft het chlorofyllgehalte.

De afname hiervan is visueel zichtbaar, maar zoals reeds uit figuur 5 is gebleken, treedt chlorofyllafbraak pas op wanneer de veroudering reeds in een vergevorderd stadium verkeert. Het precieze werkingsmechanisme van chlorofyllafbraak is nog grotendeels onbekend (13). Vele auteurs vragen zich af of het wel een enzymatisch bepaald proces is.

Zo zijn er studies bekend waarbij geen duidelijk verband gelegd kan worden tussen chlorofyllafbrekende enzymen (chlorofyllase) en het chlorofyllgehalte, terwijl soms zelfs een afname van dit enzym tijdens de veroudering werd geconstateerd.

Ondanks het feit dat het precieze werkingsmechanisme van de chlorofyllafbraak onbekend is, is het toch zeer goed bruikbaar als maatstaf voor veroudering (13). Het is nml. karakteristiek voor veroudering, kan op een redelijk brede genetische basis steunen en gedraagt zich redelijk konstant in experimenten met remstoffen.

Dat de variatie in chlorofyllgehaltenes toch nogal aanzienlijk is, bewezen Boyd en Walker (1) met hun experimenten, waarbij ze in een aantal tarwerassen chlorofyllgehaltenes vonden die tot een faktor 2,3 uiteenliepen.

Het gevolg van de chlorofyllafname is uiteindelijk een af-

name van de fotosynthese.

Onderstaande figuur (fig.7) wordt door enkele auteurs vermeld (8,13). Een meer geleidelijke afname van de fotosyn-

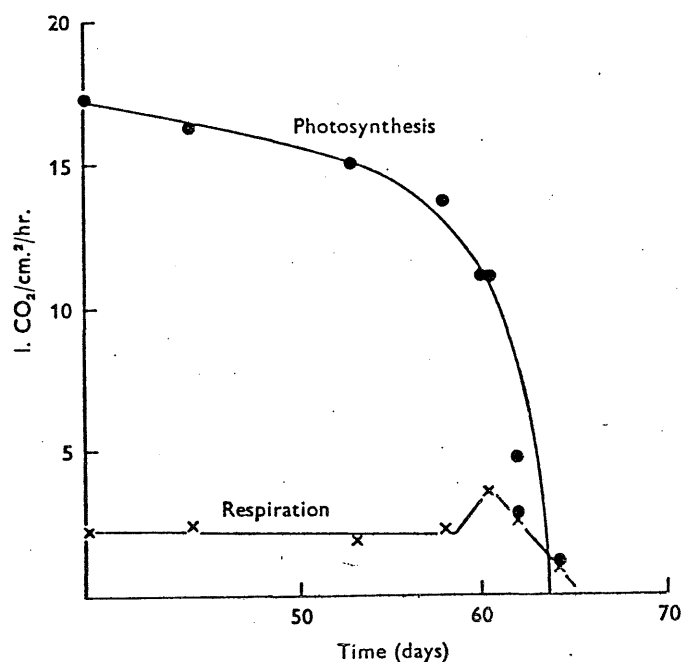


Fig. 7. Changes in rates of photosynthesis and respiration of the attached third pair of leaves of *Perilla frutescens* from the time of completion of leaf expansion to abscission.

these wordt echter ook vaak gevonden. De respiratie zoals weergegeven in de grafiek blijft lange tijd konstant en beleeft een kleine opleving (vgl. climacterium bij vruchten) alvorens snel af te nemen. Ook hiervoor vindt men vaak een ander verloop, zoals bv. een geleidelijke afname zonder 'climacterium'.

HORMONALE ASPECTEN VAN DE VEROUDERING.

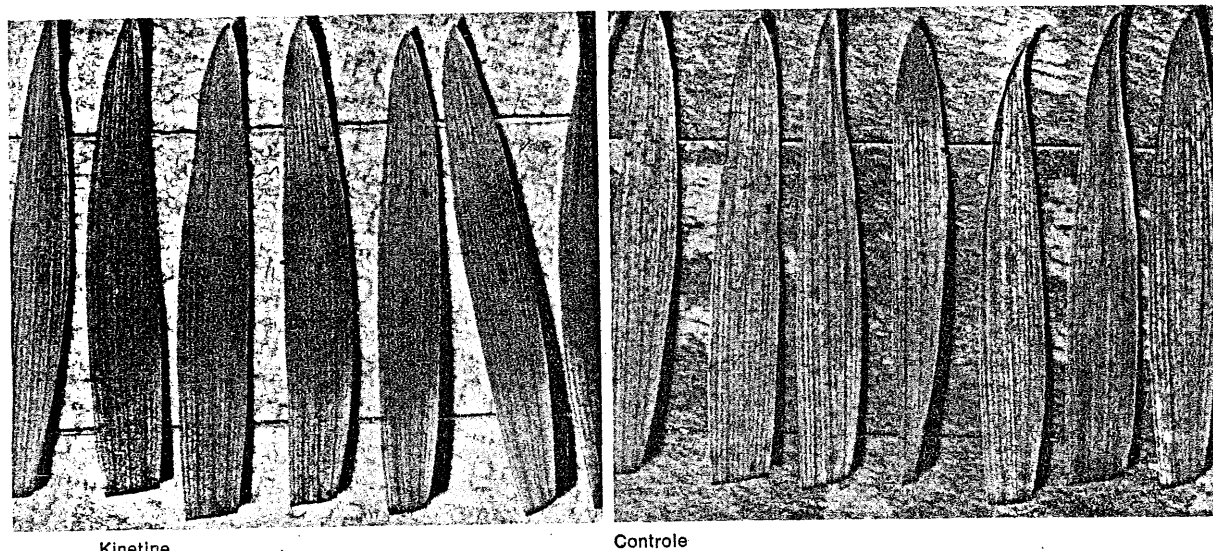
Zoals andere correlatieverschijnselen (bv. de apicale dominantie) wordt ook de veroudering hormonaal gereguleerd. Fytohormonen zijn stoffen die in zeer lage concentraties regulerend werken op de groei en ontwikkeling van de plant. Thans zijn vijf verschillende groepen hormonen bekend: auxinen, gibberellinen, cytokininen, abscisinezuur en ethyleen, welke alle op een of andere wijze betrokken zijn bij het verouderingsproces.

Erder werd reeds genoemd dat een terugdringen van de veroudering mogelijk is door het afsnijden van jonge actief groeiende delen of door het laten bewortelen van een blad. Hetzelfde bereikt men, indien men een verouderend blad een behandeling met een fytohormoon geeft. In dit verband zijn de cytokininen bijzonder werkzaam op kruidachtige gewassen, terwijl auxinen ditzelfde effect hebben op bladeren van houtige gewassen.

De massale bladval (voorafgegaan door een bladveroudering) in de herfst wordt waarschijnlijk eveneens hormonaal geregeld. Vele houtige gewassen vertonen lagere gehalten aan auxinen en gibberellinen en hogere gehalten aan abscisinezuur, indien ze onder korte-dag condities groeien t.o.v. lange-dag condities (8,9,11,12).

Cytokininen

Reeds in 1939 was gevonden dat indien men een afgesneden blad laat bewortelen, de veroudering wordt vertraagd. Dit effect van de beworteling is toe te schrijven aan de cytokinineproductie van de wortels. Brengt men een druppel van een cytokinine (bv. een synthetische regulator, het kine-tine) op een afgesneden haverblad, dan vergeelt het blad op de plaats waar kine-tine toegediend werd, niet. Zie foto, op de volgende bladzijde. Met behulp van experimenten met radioactieve stoffen is aangetoond dat cytokininen plaatselijk een 'sink' creëren, met als gevolg dat naar deze plaats van toediening allerlei bouwstenen worden getransporteerd. Behalve dit 'sink'-effect veroorzaken cytokininen een snelle toename in het RNA- en eiwitgehalte reeds enkele uren na toediening (fig. 8). Uit andere onderzoeken blijkt



Kinetine

Controle

Afgesneden haverblaadjes verouderen indien ze in het donker bij hoge luchtvochtigheid in een petrischaal bewaard worden. Wordt een druppel kinetine op het blad gebracht, dan vergeelt het blad op die plaats niet. Kinetine concentratie: 10^{-4} M.

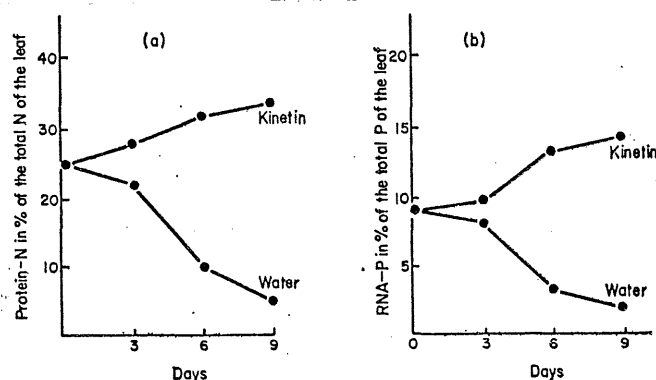


FIG. 8. Changes in (a) protein and (b) RNA content in kinetin- and water-treated halves of undivided leaves of *Nicotiana rustica*. (After R. Wollgiehn, *Flora, Jena*, 151, 411, 1961.)

dat de cytokininen niet de synthesesnelheid verhogen, maar dat ze de afbraaksnelheid remmen via remming van de proteasen.

Uit recent onderzoek is het duidelijk geworden dat de cytokininen op enigerlei wijze inspelen op het RNA-metabolisme, waardoor ze er zorg voor dragen dat met name de eiwitsynthese op niveau blijft. Het is echter nog onduidelijk of daarbij het hormoon de aktiviteit van de nucleasen in de

cel onderdrukt dan wel de RNA-synthese aktiveert door stimulatie van de RNA-polymeraseaktiviteit, maar het laatste wordt het meest waarschijnlijk geacht.

Een uitgebreide literatuur bestempelt de cytokininen als de meest effectieve remmers van de veroudering (1,3,5,6,8,9,10,12,13).

Auxinen

Reeds eerder werd gesteld dat auxinen op houtige gewassen de veroudering kunnen terugdringen. Zoals cytokininen zorgen voor het op peil houden van RNA- en eiwitsynthese bij kruidachtige gewassen, gebeurt dit bij houtige gewassen door auxinen. Woolhouse (13) vermeldt dat bij sommige gewassen behandeling met IAA en kinetine samen het optreden van veroudering sterker vertraagt dan één van de componenten alleen.

Onderzoek bij bladeren van *Rhoeo discolor* heeft aangetoond dat auxine de veroudering tegengaat door de biosynthese van RNase te remmen.

Echter, auxine kan ook verouderend werken. Dit is dan geen auxineeffect maar een ethyleeneffect. Dit ethyleen kan namelijk in het weefsel ontstaan onder invloed van hoge auxineconcentraties. Op dit ethyleeneffect berust waarschijnlijk de werking van auxinen als 2,4-D en 2,4,5-T, bv. wanneer ze voor militaire doeleinden als ontbladeringsmiddel worden gebruikt. Dit lukt alleen bij de zgn. evergreens. Bij onze loofbomen heeft 2,4-D geen effect, waarschijnlijk omdat er geen ethyleen vrijkomt (5,6,8,9,10,12).

Gibberellinen

Bij de meeste plantensoorten hebben gibberellinen geen invloed op de snelheid van bladveroudering, maar bij *Taraxacum*, *Rumex*, *Tropaeolum* en enkele andere soorten is GA_3 zelfs nog sterker in het vertragen van de veroudering dan kinetine.

Bij toediening van gibberellinezuur (GA_3) aan ponsstukjes van bladeren van *Taraxacum* blijkt dat de afbraak van zowel chlorofyll als van eiwit en RNA sterk vertraagd wordt,

indien men deze ponsstukjes kunstmatig laat verouderen. Via incubatieexperimenten met radioactief leucine blijkt dat GA_3 de synthese van nieuw eiwit stimuleert. Het blijkt dus dat evenals cytokininen en auxinen ook de gibberellinen veroudering kunnen tegengaan (5,6,8,9,10,12).

Abscisinezuur (ABA)

Abscisinezuur kan de veroudering versnellen indien het op geïsoleerde bladeren wordt toegepast; het is echter vaak inactief indien het op intacte planten wordt gebracht. Een duidelijk antagonerende werking ten opzichte van cytokininen is vastgesteld. Ook op moleculair niveau lijkt abscisinezuur het cytokinine-effekt te antagoneren. De RNA-synthese in bladschijfjes van de radijs wordt door ABA sterk geremd. Ook in planten waar een opeenvolgende bladveroudering plaatsvindt, wordt een verhoogde produktie van ABA geconstateerd.

Het blijkt dat ABA de biosynthese van RNase bevordert. Bovendien versterkt ABA de aktiviteit van enkele hydrolytische enzymen gedurende de bladveroudering en met betrekking tot dit laatste werkt ABA antagonistisch ten opzichte van auxinen, gibberellinen en cytokininen.

In een aantal gevallen is aangetoond dat een verhoogd abscisinezuurgehalte leidt tot een verhoging of een versnelling van het optreden van de ethyleenproduktie. Ook via dit verschijnsel kan ABA dus invloed uitoefenen op de veroudering (5,6,7,8,9,10,11,12).

Ethyleen (C_2H_4)

Bladveroudering wordt onder bepaalde omstandigheden bijzonder sterk gestimuleerd door ethyleen. Ook bij het afrijpen van fruit speelt dit hormoon een zeer grote rol. Het werkingsmechanisme is echter nog niet geheel duidelijk. Wel is het bekend dat ethyleen de permeabiliteit van de celmembraan kan verhogen. Het is dus niet uitgesloten dat de primaire werking van het ethyleen terug te voeren is naar invloeden op de permeabiliteit en eventuele structuurveranderingen van membranen, waardoor de structu-

rele integriteit van de cel afneemt en mogelijkserwijs een aktivering van enzymsystemen tot stand kan komen (6,8,9, 10,12).

Omdat bij experimenten met hormonen bijna altijd gebruik wordt gemaakt van bladschijfjes -waarvan bekend is dat de stofwisseling in velerlei opzichten afwijkt van die in het intacte blad- is het niet gerechtvaardigd de hierboven omschreven hormooneffekten ook voor de intacte plant geldig te verklaren.

Overigens behoeven eventuele wijzigingen in hormoonniveaus niet de oorzaak te zijn van het verouderingsproces, maar kunnen ze zeer wel het resultaat zijn van veroudering die door geheel andere oorzaken is ingezet.

Uit de veelheid van onderzoek over de invloeden van hormonen op de veroudering komt duidelijk naar voren dat alle tot nu toe bekende hormonen kunnen ingrijpen op het verouderingsproces, maar dat het regulatiemechanisme uiterst complex is, varieert voor de verschillende plantensoorten, waarbij verschillende hormonen in verschillende onderlinge verhoudingen tijdens de ontogenie van het blad hun invloed uitoefenen.

Al met al hebben deze experimenten met hormonen weinig licht doen schijnen op het mechanisme van de veroudering.

VEROUDERING PLANTEN - DIEREN.

Het is misschien nuttig om kort in te gaan op de verschillen in veroudering tussen planten en dieren.

Vaak wordt aangenomen dat bij dieren structuurveranderingen in het been en in het collageen mogelijke oorzaken zijn van de veroudering. Ook puntmutaties in het DNA, chromosoommutaties (11) en fouten bij de translatie kunnen het leven van het organisme verkorten. Tenslotte is het denkbaar dat in de informatie opgesloten in het DNA ook die informatie aanwezig is, die noodzakelijk is voor het optreden van de verouderingsprocessen.

In deze gedachtengang is het verouderingsproces een onlosmakelijk deel van de ontogenie, welke als de tijd daar rijp voor is, wordt ingezet door derepressie van het daarvoor noodzakelijk kernmateriaal.

Voorts bestaat de mogelijkheid van de produktie van vrije radicalen die enerzijds rechtstreeks de kwaliteiten van de membranen in negatieve zin beïnvloeden, anderzijds via de eerder genoemde peroxidatie van lipiden deze invloed kunnen uitoefenen.

Het voornaamste verschil tussen plantaardige en dierlijke veroudering is dat de eerste gereguleerd wordt vanuit de gehele plant, terwijl dierlijke veroudering meer bepaald wordt door de intrinsieke eigenschappen van het weefsel van de betreffende organen (8). Het gevolg is dat plantaardige veroudering vaak tot op zekere hoogte een omkeerbaar proces is, terwijl dit bij dieren nooit het geval is. Een essentiële faktor ter voorkoming van de veroudering is ook het behoud van het vermogen tot celdeling. Zo kunnen dierlijke organismen zoals sponzen en zeeanemonen dankzij een voortdurende vervanging van alle lichaamscellen hoge leeftijden bereiken (tot 90 jaar toe).

De hypothese van Sheldrake wint hierdoor in waarde en is een uitdaging voor de experimentator ter nadere verificatie.

Literatuur.

1. Boyd, W.J.R., Walker, M.G. 1972 Variation in chlorofyll A content and stability in wheat flag leaves Ann. Bot. 36: 87 - 92.
2. Dalling, M.J., Boland, G., Wilson, J.H. 1976 Relation between acid proteinase activity and redistribution of nitrogen during grain development in wheat. Aust. J. Plant Physiol. 3: 721 - 30.
3. Holden, M. 1966 The breakdown of chlorofyll. Rep. Rothamsted Exp. Sta., pp 310 - 19.
4. Loon, L.C. van 1980 Veroudering bij planten. Vakbl. Biol. 4, 60: 56 - 63.
5. Sacher, J.A. 1973 Senescence and post-harvest physiology Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 197 - 224.
6. Thomas, H., Stoddart, J.L. 1980 Leaf senescence. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 83 - 111.
7. Veen, H. 1970 Bladval, een verouderingsverschijnsel. Vakbl. Biol. 50: 136 - 141.
8. Veen, H. 1972 Hormonale regulatie van de bladveroudering. Landbouwk. Tijdschr. 84(5): 153 - 158.
9. Veen, H. 1977 Verouderingsprocessen in hogere planten. Natuur en Techniek 45(11): 740 - 759.
10. Veen, H. 1979 De hormonale regulatie van de veroudering. In Plantehormonen red. J. Bruinsma p 84 - 103 Pudoc, Wageningen.
11. Wareing, P.F., Seth, A.K. 1967 Ageing and senescence in the whole plant. Symp. Soc. Exp. Biol. 21: 543 - 58.
12. Wareing, P.F., Phillips, I.D.J. 1970. Senescence. In: The control of growth and differentiation of plants p 255 - 70 Pergamon Press.
13. Woolhouse, H.W. 1967 The nature of senescence in plants. Symp. Soc. Exp. Biol. 21: 179 - 214.