

Aspetti cellulari, fisiologici e molecolari della senescenza nelle piante

Mirko Siragusa¹, Roberto De Michele², Angela Carra¹ e Francesco Carimi^{1*}

¹ CNR Istituto di Genetica Vegetale, Corso Calatafimi 414, 90128 Palermo

² Dipartimento di Biologia, Università di Padova, via U. Bassi 58/B, 35131 Padova

Data di ricezione: 24 maggio 2006; data di accettazione: 24 settembre 2006

Molecular, cellular and physiological aspects of senescence in plants

Abstract. Senescence is the final stage of development of an organ; in a leaf, this syndrome is characterized by a gradual yellowing, loss of protein content and change in the metabolism, which eventually lead to death. It is generally a slow degenerative process during which nutrients are mobilized and translocated to other parts of the plant. Senescence is under control of environmental and endogenous factors. In general, cytokinins produce a delay in leaf senescence and their levels have been observed to decline in senescing leaf tissues. In contrast, ethylene and abscisic acid can accelerate the onset of senescence. The study of plant senescence may help to clarify numerous general aspects of organ development and contribute to better understanding programmed cell death. Herein, we specifically explore senescence and its regulation.

Keywords: Nitril oxide, plant growth regulators, programmed cell death, senescence.

Introduzione

Nelle piante, la senescenza è la fase finale dello sviluppo dei suoi organi, inclusi foglie, fusto, radici e fiori; anche la maturazione dei frutti è considerata un tipo particolare di senescenza.

La senescenza può manifestarsi nelle piante in maniera estremamente diversa. Alcune piante annuali, come i cereali, mostrano una senescenza totale in cui radici, fusto e foglie muoiono contemporaneamente. Altre annuali posseggono, invece, una senescenza sequenziale in cui le foglie più basse ingialliscono e muoiono subito, mentre il resto della pianta morirà soltanto dopo la fioritura. Le piante erbacee perenni mostrano una senescenza apicale autunnale, in cui muore soltanto la parte superiore della pianta. Nelle altre perenni, la senescenza rimane invece limitata soltanto a pochi organi, come le infiorescenze o qualche

foglia (nelle sempreverdi), o può coinvolgere l'intero fogliame annuale (nelle specie decidue). Nelle piante bulbose, tutte le parti al di sopra del terreno muoiono ogni anno.

In ogni caso, la senescenza porta a una lenta degradazione dei tessuti della pianta e alla mobilitazione dei nutrienti dai tessuti senescenti a quelli giovani o agli organi riproduttivi (Zimmermann e Zentgraf, 2005). Questo processo presenta caratteristiche generali ben definite ed un ordine prestabilito nella successione temporale degli eventi e divisibile fondamentalmente in tre fasi: inizialmente eventi endogeni o ambientali innescano delle cascate di trasduzione del segnale che conducono all'attivazione e repressione di numerosi geni, in seguito, durante la fase di transizione, si verifica una ridifferenziazione controllata delle strutture cellulari e una mobilitazione dei nutrienti; infine, sopraggiunge la fase esecutiva di morte, nella quale si possono riconoscere molte delle caratteristiche tipiche della morte cellulare programmata (PCD, *Programmed Cell Death*), tra cui il tipico *laddering* del DNA.

La senescenza è un fenomeno adattativo che ha reso alcune specie capaci di sopravvivere a condizioni ambientali avverse. La rapida senescenza delle piante annuali e biennali, ad esempio, permette un cambiamento totale della popolazione ad intervalli frequenti, permettendo a cambiamenti genetici vantaggiosi di diffondersi (Leopold, 1961; Carr e Pate, 1967).

Senescenza e morte cellulare programmata

In natura, paradossalmente, la morte è un processo fondamentale nello sviluppo di un organismo. Può avvenire in diversi momenti durante la crescita ed a diversi livelli: in poche cellule, in un organo specifico o nell'organismo intero (Noodén, 1988). In alcuni casi può essere il risultato finale di un processo di degenerazione cellulare in cui sono finemente regolati l'inizio e l'esecuzione. Tale processo è definito, appunto, morte cellulare programmata. Nelle piante esistono diversi esempi di PCD, in cui la distruzione di alcune cellule è indotta per modellare specifici organi o tes-

*francesco.carimi@igv.cnr.it

suti durante lo sviluppo, per rimuovere cellule danneggiate, infette o, semplicemente, non più necessarie.

La senescenza e la PCD nelle piante sono associate nello sviluppo di alcuni organi (senescenza fogliare, appassimento dei petali, ecc.), sebbene la relazione tra i due processi non sia ben definita. Alcuni studiosi (van Doorn e Woltering, 2004) considerano la senescenza parte integrante del programma che conduce alla morte cellulare, altri autori invece (Thomas *et al.*, 2003) considerano i due processi non collegati. La PCD è stata descritta per la prima volta da Kerr e collaboratori (1972) ed è stata fundamentalmente ricondotta a due diverse forme: il tipo associato con l'attacco da patogeno (risposta ipersensibile: *hypersensitive response*, HR) e il tipo associato alla senescenza (Dangl *et al.*, 2000). Il primo tipo di morte deve necessariamente essere rapido per ostacolare la penetrazione del patogeno nel sito d'infezione. Invece, la senescenza è considerata generalmente un processo lento.

La senescenza può essere un processo reversibile anche a stadi avanzati. Ad esempio, la rimozione dei fiori in piante di soia ritarda la senescenza (Noodén, 1988; Miceli *et al.*, 1995), così come il taglio dello stelo determina il rinverdimento delle foglie più basse di *Alstroemeria* e la rimozione delle gemme fiorali prolunga il tempo di fioritura (Thomas e Smart, 1993). Di certo, durante la fase terminale si arriva ad un "punto di non ritorno", in cui la degenerazione tissutale ha raggiunto livelli tali da non poter più rendere possibile la reversibilità del processo (Noodén e Leopold, 1978; Brady, 1988). La possibilità di revertire un programma di morte già avviato è dovuta al mantenimento dell'integrità delle endomembrane ed alla funzionalità dei compartimenti cellulari fino alla fase conclusiva del processo, quando avviene la morte vera e propria della cellula.

Eventi cellulari associati alla senescenza

Durante il processo di senescenza, le cellule subiscono un gran numero di cambiamenti a livello strutturale, metabolico e di espressione genica che, nell'insieme, contribuiscono ad una redistribuzione dei nutrienti. Nelle foglie, questo processo è caratterizzato dalla fine della fotosintesi, dalla degradazione della clorofilla, proteine e macromolecole, e da un marcato aumento nella produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Prochazkova *et al.*, 2001).

La degradazione dei cloroplasti e delle loro componenti è uno dei primi eventi che si verificano durante la senescenza fogliare e, senza dubbio, uno dei più evidenti. Sebbene si ritenga che non rappresenti la causa principale della morte cellulare (Lawrol, 1993;

Noodén *et al.*, 1997), la degenerazione dei cloroplasti è comunque un evento fondamentale perché in questi è conservata gran parte delle risorse cellulari (es. l'azoto).

Generalmente le foglie senescenti ingialliscono e in alcuni casi la scomparsa della clorofilla rivela altri pigmenti (carotenoidi, antociani e flavonoidi) in realtà già presenti nei tessuti. Tuttavia, si è visto che lo stesso processo di senescenza regola la sintesi di tali pigmenti, attivandola o reprimendola. Il risultato è l'ampio spettro cromatico che si osserva nella frutta matura o in un bosco deciduo in autunno. Per quanto ancora la degradazione del cloroplasto non sia stata completamente compresa, sembra che, nella maggior parte dei casi, proceda attraverso una serie di fasi ben distinte. Il cloroplasto in fase di senescenza, chiamato anche "gerontoplasto" (Parthier, 1988), diventa più grande e sferico, i grana si separano e collassano, mentre si nota un aumento nel numero e nelle dimensioni dei globuli osmofili che sembrano gemmare dalle membrane tilacoidee (Barton, 1966; Dennis *et al.*, 1967). Infine, il cloroplasto si rimpicciolisce, la membrana esterna si rompe e il suo contenuto viene rilasciato nel citoplasma (Shaw e Manocha, 1965). Di contro, in alcune cellule senescenti è stata riscontrata anche una fagocitosi vacuolare delle componenti cellulari (Noodén, 1988). In realtà, è possibile che entrambi i meccanismi avvengano in concomitanza (Gepstein, 1988).

Per quanto riguarda gli enzimi responsabili della degradazione delle componenti cloroplastidiali c'è ancora molta incertezza. Alcune serino-proteasi sembrano coinvolte nella degradazione di alcune proteine tilacoidee, per esempio il complesso LHCII (Kawasaki e Takeuchi, 1989; Yoshida e Minamikawa, 1996). Molti enzimi capaci di degradare alcune componenti fondamentali (come la clorofilla) sono però localizzati sulla membrana esterna del cloroplasto, nel citoplasma o nei vacuoli (Matile *et al.*, 1996). Inoltre, gli enzimi litici che aumentano durante la senescenza e che sembrano coinvolti nella degradazione del cloroplasto non sono specifici per le sue componenti (Buchanan-Wollaston, 1997; Gan e Amasino, 1997; Nam, 1997). L'ipotesi più accreditata è che i globuli osmofili rappresentino le componenti del cloroplasto in transito verso i siti di degradazione, il citoplasma o il vacuolo (Noodén *et al.*, 1997). D'altronde, nei globuli osmofili di cloroplasti senescenti sono stati rintracciati non soltanto componenti lipidiche (Bailey *et al.*, 1966), ma anche clorofilla o una simile sostanza fluorescente (Guamet *et al.*, 1997). Inoltre ed il vacuolo sembra assimilare i prodotti finali della degradazione della clorofilla (Matile *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2001). L'ordine degli eventi di degra-

dazione cloroplastica sembra essere regolato a livello nucleare (Noodén, 1988), sebbene in soia sia stato identificato un gene responsabile, *cyt G*, localizzato nel cloroplasto (Guamet *et al.*, 1990).

Attualmente si è propensi a ritenere che il cloroplasto possa giocare un ruolo di regolazione chiave durante la senescenza, simile a quello svolto dai mitocondri durante i processi apoptotici negli animali (Thomson e Platt-Aloia, 1987; Zapata *et al.*, 2005).

I mitocondri, che giocano un ruolo fondamentale nella regolazione della apoptosi negli animali e che sembrano in grado di indurre processi di morte programmata in seguito a lesioni della loro membrana (Jones, 2000), mantengono fino a fasi piuttosto tardive della senescenza le loro capacità funzionali (Thomas e Stoddart, 1980). D'altronde, è essenziale per la cellula che la sintesi di ATP sia mantenuta costante per mandare avanti l'intero processo di senescenza. Soltanto nelle fasi tardive, i mitocondri rimpiccioliscono e perdono le creste, probabile effetto di una riduzione del contenuto enzimatico della membrana interna e di una conseguente riduzione dell'attività ossidativa (Simon e Chapman, 1961).

Anche il nucleo non mostra sostanziali cambiamenti strutturali fino alle fasi più tardive, sebbene, in alcune monocotiledoni, una condensazione cromatinica e qualche altro cambiamento siano stati osservati anche in fasi precoci (Kuran, 1993; Biradar e Rayburn, 1994). Il contenuto in DNA rimane pressoché costante durante l'intero processo e la sua degradazione può essere osservata solamente verso gli ultimi stadi (Orzaez e Granell, 1997). La durata presenza del nucleo in cellule senescenti è estremamente importante, dal momento che lo smantellamento della cellula richiede l'espressione di geni nucleari sino alle ultime fasi del processo (Gan e Amasino, 1997; Noodén, 1988).

Il rilascio dei contenuti vacuolari e dei lisosomi (principalmente enzimi con basso grado di specificità) nel citosol segna la fase finale della senescenza (Thomas e Stoddart, 1980). La morte cellulare sopraggiunge con la perdita dell'integrità della membrana plasmatica e l'incapacità del mantenimento dell'omeostasi cellulare.

Geni espressi durante la senescenza

Una regolare successione di cambiamenti a livello tissutale e cellulare, come quella elencata precedentemente, implica un ben preciso programma genetico. Allo stesso modo della xilogenesi e del differenziamento cellulare, la senescenza può essere considerata una fase dello sviluppo della pianta ed è quindi rego-

lata geneticamente. Da questo punto di vista, la senescenza appare un processo estremamente complesso. In una recente analisi del trascrittoma di foglie senescenti di *Arabidopsis thaliana* sono stati identificati circa 2.500 geni attivi (circa il 10% del totale dei geni in questa specie), tra cui 134 regolatori di trascrizione, alcuni dei quali appartenenti ai gruppi NAC e WRKY (Guo *et al.*, 2004).

I geni la cui espressione aumenta durante la senescenza sono comunemente chiamati *SAG* (*Senescence Associated Gene*) (Gan e Amasino, 1997). Diversi *SAG* sono già stati identificati (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003) e comprendono prevalentemente geni che codificano per enzimi litici, come RNasi (Taylor *et al.*, 1993), proteasi (Lohman *et al.*, 1994; Hensel *et al.*, 1993; Drake *et al.*, 1996) e lipasi (Ryu e Wang, 1995), e geni per proteine di trasporto (Guo *et al.*, 2004). Un tipico gene della senescenza (non indotto da altri tipi di stress) è *SAG12* (Gan, 1995), che codifica per una cistein-proteasi espressa nei tessuti senescenti e che viene comunemente utilizzato come marcatore molecolare (Weaver *et al.*, 1998). Inoltre, Chen e collaboratori (2002) hanno identificato attraverso analisi microarray 43 diversi fattori di trascrizione associati alla senescenza.

L'analisi dei promotori dei vari *SAGs* non ha permesso di trovare nessun elemento regolatore comune, per cui la loro espressione appare regolata in maniera complessa e coinvolge sicuramente numerosi *pathways*. Alcuni *SAGs* presentano, però, sequenze di risposta all'etilene, altri all'acido abscissico (ABA) e al buio, tutti noti induttori di senescenza.

Alcuni geni, al contrario dei *SAGs*, sono invece repressi durante la senescenza e sono chiamati *SDGs* (*Senescence-Downregulated Genes*). Si ritiene che la repressione di questi geni non possa di per sé determinare l'induzione della senescenza, ma che possa essere necessaria per prevenire la rigenerazione delle componenti cellulari degradate. Tra questi geni possiamo citare quelli codificanti molte proteine correlate con la fotosintesi, come la CAB (*chlorophyll-a/b-binding protein*) (Hensel *et al.*, 1993; Gan e Amasino, 1997).

Gli attuali studi di biologia molecolare nelle piante sono principalmente focalizzati a stabilire le funzioni e le relazioni dei geni coinvolti nei programmi di senescenza. Tale scopo appare particolarmente difficile vista l'ampiezza mostrata dal trascrittoma di cellule senescenti e l'ampia gamma di stimoli capaci di indurre senescenza. Come già accennato, un ruolo determinante per questo scopo può essere giocato dai mutanti. Sono state identificate diverse mutazioni che influenzano la senescenza (Thomas, 1987; Thomas e Smart,

1993), alcune delle quali rallentano il processo (come le mutazioni *non-yellowing* e le *stay-green*), altre invece che lo accelerano. Ad eccezione di casi sporadici (come la proteina G che inibisce l'ingiallimento del seme di soia; Guamet *et al.*, 1990), la maggior parte di queste mutazioni sono recessive, ma posseggono il vantaggio di inibire soltanto un *range* particolarmente ristretto di cambiamenti tipici della senescenza. Questo li rende particolarmente utili nella identificazione dei principali geni coinvolti nella induzione del processo. Vista la grande quantità di stimoli ambientali capaci di indurre senescenza e la vastità di tessuti e modi in cui essa si manifesta, quello che si sta cercando di capire è anche se i diversi processi di senescenza siano determinati da un programma genetico pressoché unico, differenziato soltanto nelle prime reazioni, o se essi siano effettivamente processi diversi determinati da *pathways* genici differenti (Buchanan-Wollaston, 1997; Gan e Amasino, 1997). Diverse considerazioni hanno indotto a ritenere che i differenti processi di senescenza posseggano comunque dei *pathways* comuni, determinati dal ruolo chiave svolto da alcuni geni. Tra questi possiamo citare ORE9, un gene di *Arabidopsis* mutato in piante che mostrano una senescenza ritardata sia in condizioni naturali che indotte da buio e fitormoni (Oh *et al.*, 1997). ORE9 codifica per una proteina F-box, una componente del complesso Skp1-cullin/CDC53-SCF (F-box protein complex) (Woo *et al.*, 2001), che agisce come una ligasi di E3 nella proteolisi ubiquitina-dipendente (Glickman e Ciechanover, 2002). Il complesso SCF sembra coinvolto in numerosi pathways di traduzione del segnale nelle piante superiori, quali luce e fitormoni (Hellmann e Estelle, 2002). ORE9 potrebbe agire nel complesso SCF e potrebbe mediare la degradazione delle proteine che regolano negativamente la senescenza (Yoshida, 2003). Similmente, il mutante di *Arabidopsis* *dls1* (*delayed leaf senescence 1*) mostra senescenza ritardata in condizioni naturali ed indotte dal buio ma possiede il gene *AtATE1* mutato (Yoshida *et al.*, 2002a). Il gene *AtATE1* codifica una arginil-tRNA:protein-arginil-trasferasi (R-trasferasi) (Yoshida *et al.*, 2002a). Questo enzima ha la funzione di trasferire una arginina nelle porzioni N-terminali di proteine che terminano con acido aspartico o glutammico, rendendole bersaglio della proteolisi ubiquitina-dipendente (Varshavsky, 1997). Questi ultimi due esempi suggeriscono un ruolo di regolazione determinante svolto dal *pathway* di degradazione delle proteine ubiquitina-dipendente nella progressione della senescenza indotta da diversi fattori.

L'identificazioni delle proteine coinvolte nella traduzione del segnale di senescenza è tuttora in corso

ed appare estremamente complessa. La senescenza può, infatti, essere indotta da numerosi stimoli esterni e da diversi fattori interni, quali temperature estreme, stress idrici, fotoperiodo, mancanza di nutrienti, patogeni, ormoni ed invecchiamento. In foglie senescenti di *Arabidopsis*, sono state identificate 363 ESTs, corrispondenti a circa 182 geni che codificano per possibili componenti dei pathways di percezione e traduzione del segnale (Guo *et al.*, 2004). Diversi recettori-chinasi, una classe di proteine-chinasi transmembrana coinvolte nella ricezione dello stimolo, sono stati identificati: 44 in *Arabidopsis* (Shiu e Bleecker, 2001), mentre in foglie di fagiolo era già nota SARK (Hajouj *et al.*, 2000). Numerosi altri fattori appartenenti alla cascata delle MAP chinasi sono stati recentemente isolati (Ichimura *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2004). I bersagli delle cascate fosforilative delle MAP chinasi sono stati identificati prevalentemente in fattori trascrizionali (tra cui alcuni WRKY), enzimi come fosfatasi e fosfolipasi e proteine del citoscheletro (Guo *et al.*, 2004).

Ruolo della luce e degli zuccheri nella senescenza

Anche se i meccanismi coinvolti non sono del tutto chiari, la luce gioca un ruolo determinante nella regolazione/induzione della senescenza (Ono *et al.*, 2001). Come la continua esposizione ad una illuminazione di elevata intensità può causare un danno fotossidativo, quindi indurre senescenza fogliare (Prochazkova e Wilhelmova, 2004), così il buio può provocare senescenza quando applicato su foglie individuali, ma la inibisce quando l'intera pianta è sottoposta a mancanza di luce (Weaver e Amasino, 2001).

La risposta alla luce dei tessuti vegetali varia a seconda della lunghezza d'onda. È stato dimostrato infatti che un aumento all'esposizione di luce "*far-red*" induce senescenza fogliare in alcune specie. Questo effetto può essere invertito dall'esposizione alla luce rossa (Rousseaux *et al.*, 1996). Un aumento dell'esposizione alla luce "*far-red*" induce in foglie di tabacco una riduzione nel contenuto di clorofilla, una diminuzione del peso fresco e un aumento dell'attività dell'enzima nitrato-riduttasi. Questa situazione viene invertita dalla iper-espressione del cDNA del fitocromo A, suggerendo un coinvolgimento del fitocromo nel processo di senescenza (Rousseaux *et al.*, 1997).

Recentemente è stato dimostrato che una diminuzione della intensità luminosa non è sufficiente per indurre la senescenza fogliare; al contrario, cambiamenti nello spettro della luce utilizzata possono influenzare il metabolismo ossidativo delle foglie. In questo contesto, la luce blu può contribuire a ridurre il

danno ossidativo mantenendo elevata l'attività catalasica (Causin *et al.*, 2006).

Nelle foglie si è trovata una correlazione tra efficienza del processo fotosintetico e senescenza, probabilmente legata alla concentrazione di zuccheri, per cui foglie vecchie non più produttive vengono eliminate (Rousseaux *et al.*, 1996).

Poiché la senescenza è spesso associata con lo sviluppo degli organi riproduttivi della pianta ed i nutrienti sono spesso redistribuiti dalle parti vegetative ai tessuti riproduttivi in via di sviluppo, la mancanza di nutrienti (*starvation*), in particolare di zuccheri, è stata considerata come possibile causa della senescenza nei tessuti vegetativi (Thimann *et al.*, 1977). Foglie di *Arabidopsis* tenute al buio inducono pure diversi SAGs, probabilmente per i bassi livelli di carboidrati (Hensel *et al.*, 1993; Quirino *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2001). L'espressione di alcuni SAGs è inoltre repressa dalla presenza di elevati livelli di zuccheri (Noh e Amasino, 1999; Fujiki *et al.*, 2000; Fujiki *et al.*, 2001). L'applicazione di zuccheri su fiori recisi rallenta l'induzione della senescenza ed i cambiamenti fisiologici in cellule private di zuccheri sono simili a quelli mostrati da cellule senescenti (van Doorn, 2004).

Altri esperimenti supportano la tesi opposta. Ad esempio, in tabacco trattamenti con zuccheri accelerano la senescenza in dischi fogliari (Yoshida, 2003). Peraltro, in diverse specie (tra cui *Nicotiana tabacum* ed *Arabidopsis thaliana*) si è notato che la concentrazione degli zuccheri solubili aumenta nei tessuti senescenti, come foglie, petali e frutti freschi (Noodén e Leopold, 1978; van Doorn, 2004).

L'ipotesi che l'elevata concentrazione di zuccheri possa causare la senescenza (Lazan *et al.*, 1983; Wilson, 1997) ha trovato ulteriori prove in esperimenti di transgenosi. Pomodori transgenici che esprimono il gene dell'esochinasi (HXK, un recettore degli zuccheri) aumentano la loro sensibilità ai carboidrati e mostrano un accelerato fenotipo senescente (Dai *et al.*, 1999). Piante transgeniche di *Arabidopsis* che esprimono HXK senso e antisenso mostrano, rispettivamente, una senescenza accelerata e rallentata, fatte crescere in un mezzo di coltura contenente 30 g/l di glucosio (Xiao *et al.*, 2000). Da questi esperimenti sembra che, almeno in alcune specie, l'accumulo degli zuccheri potrebbe effettivamente partecipare nell'induzione della senescenza, probabilmente attraverso la funzione esochinasica. Peraltro, è già noto da tempo che la fotosintesi è regolata secondo un *feedback* negativo (Noodén e Guimmet, 1989) e che proprio l'accumulo di zuccheri nelle foglie reprime l'espressione di alcuni geni correlati alla fotosintesi, uno dei

primi segnali che si riscontrano in cellule senescenti (Jang *et al.*, 1997; Gan e Amasio, 1997).

Il modo in cui la concentrazione degli zuccheri possa indurre la senescenza nelle foglie non è comunque ancora chiaro. Uno sbilanciamento nelle riserve di zuccheri della pianta potrebbe essere una possibile spiegazione. Le giovani foglie servono infatti come organi di riserva fino alla maturazione, mentre quelle mature, dotate di apparati fotosintetici completi, producono gli zuccheri. Appena le giovani foglie maturano e sviluppano un loro macchinario fotosintetico, la loro domanda di zuccheri diminuisce e questi si accumulano nelle foglie più vecchie, inducendone la senescenza. Quando le nuove foglie sono ombreggiate, e quindi incapaci di produrre zuccheri, le più vecchie non accumulano zuccheri e la loro senescenza è ritardata (Ono *et al.*, 2001).

La concentrazione degli zuccheri nei diversi tessuti è influenzata da diversi fattori, tra i quali la presenza di azoto, la luce e lo stadio di sviluppo (Yoshida *et al.*, 2002b; Weaver e Amasino, 2001; Jordi *et al.*, 2000; Paul e Foyer, 2001), e l'integrazione ed il bilanciamento dei fattori esterni ed interni potrebbero giocare un ruolo determinante nell'induzione della senescenza fogliare.

Regolatori di crescita e senescenza

Tra i fattori interni, i fitoregolatori sembrano essere particolarmente importanti nella regolazione della senescenza, sebbene non tutte le specie rispondano allo stesso modo ad uno stimolo ormonale (Gan e Amasino, 1996, 1997; Buchanan-Wollaston, 1997). In riso, trattamenti con acido abscissico, metil-jasmonato (MeJA) e acqua ossigenata (H₂O₂) risultano in un'induzione della sindrome di senescenza (Hung e Kao, 2003, 2004, 2005). Ad oggi, comunque, l'etilene e le citochinine sono gli ormoni vegetali considerati i principali regolatori della senescenza.

Etilene

L'etilene si comporta nella maggior parte dei sistemi studiati come un acceleratore della senescenza. Questa sua capacità è nota da tempo ed è stata sfruttata commercialmente per controllare la maturazione di molti frutti. Durante la senescenza, i tessuti aumentano la produzione endogena di etilene. In alcuni fiori l'incremento della concentrazione di etilene segue immediatamente l'impollinazione e si riflette nella senescenza dei petali (Borochoy e Woodson, 1989). L'analisi di mutanti e piante transgeniche ha confermato il ruolo centrale dell'etilene nell'induzione della senescenza. Mutanti *etr1* (*ethylene resistant 1*) di

Arabidopsis e *never ripe* di pomodoro, che mancano di un recettore funzionale dell'etilene, presentano infatti una senescenza ritardata (Grbic e Bleecker, 1995; Picton *et al.*, 1993). Queste mutazioni appartengono alla più ampia classe di mutazioni *stay green*, che comprende anche mutazioni negli enzimi del processo di degradazione della clorofilla e che sono caratterizzate da un fenotipo con senescenza ritardata.

Piante di pomodoro transgeniche che esprimono geni antisenso che inibiscono l'espressione di uno di due enzimi del processo biosintetico dell'etilene, ACC-sintasi o ACC-ossidasi, producono frutti con maturazione alterata (Hamilton *et al.*, 1990; Oeller *et al.*, 1991).

Oltre a sottostare ai piani autonomi di sviluppo della pianta, alcuni ormoni servono da mediatori tra stimolo ambientale e risposta molecolare. La risposta alle lesioni, ad esempio, che può risultare in un'induzione di senescenza, prevede anche la produzione di etilene. La luce, invece, inibisce la senescenza apparentemente bloccando la conversione di ACC in etilene.

Citochinine

Tra i regolatori di crescita, le citochinine sono ritenute le maggiori responsabili nell'inibizione della senescenza (Smart, 1994). Diversi studi di fisiologia hanno dimostrato che, sia nelle monocotiledoni che nelle dicotiledoni, trattamenti con citochinina esogena ritardano la senescenza fogliare (Richmond e Lang, 1957), che i livelli di citochinina endogena decrescono con l'avanzare della senescenza (Gan e Amasino, 1996) e che le differenze visibili e riscontrabili nelle foglie senescenti di tabacco sono correlate a differenze nel contenuto endogeno di citochinine (Singh *et al.*, 1992a, 1992b).

L'utilizzo di piante trasformate ha inoltre permesso di analizzare il ruolo delle citochinine nei vari stadi di sviluppo della pianta, inclusa la senescenza. Il gene *ipt* di *Agrobacterium tumefaciens* codifica per l'enzima isopentenil-transferasi (enzima chiave nella via biosintetica delle citochinine). Questo gene è stato utilizzato per trasformare piante in modo da aumentare i livelli delle citochinine nei tessuti vegetali. In alcuni esperimenti, il gene *ipt* è stato posto sotto il controllo del promotore del gene *SAG12* in modo da indurre una elevata produzione dell'ormone solo nei tessuti senescenti. Si è osservato che l'espressione del gene *ipt* sotto il controllo del promotore del gene *SAG12* in piante di tabacco si concretizza in un ritardo della senescenza delle foglie adulte (Gan e Amasino, 1995). Quando la foglia entra in senescenza si esprime il gene *ipt* innalzando il livello di citochinine. Questo accumulo inibisce il processo di senescenza.

È noto inoltre che le chitochinine ritardano l'ossidazione dei lipidi in quanto inducono l'attività del sistema antiossidativo. Le chitochinine aumentano anche la sintesi dei carotenoidi, sostanze in grado di proteggere i centri di reazione dall'azione negativa di luce e ossigeno (Chernyad'ev, 2000).

Nonostante le citochinine siano responsabili di un ritardo nella senescenza, non sono ancora del tutto chiare le basi molecolari che sottendono questo processo. Recentemente è stato dimostrato che il recettore per le chitochinine AHK3 è coinvolto nel controllo della senescenza fogliare. Il segnale citochinico viene percepito dal recettore AHK3 e questo provoca la specifica fosforilazione del regolatore ARR2. ARR2 fosforilato induce a valle una attivazione di una serie di geni citochino-inducibili e, direttamente o indirettamente, determina l'induzione o la repressione di una serie di geni responsabili della regolazione della senescenza fogliare, con il risultato finale di un aumento della longevità fogliare (Hyo *et al.*, 2006).

Una spiegazione possibile dell'effetto delle citochinine risiede nella capacità di questi fitoregolatori di mobilitare le sostanze dai compartimenti della pianta detti *sink*. Il ritardo della senescenza sembra quindi mediato da un effetto *source-sink*, ipotesi supportata anche dal fatto che in piante transgeniche di tabacco con produzione di citochinine autoregolata si ha anche una elevata attività extracellulare dell'enzima invertasi, responsabile della mobilitazione floematica dei nutrienti (Balibrea Lara *et al.*, 2004).

Le citochinine agiscono quindi probabilmente a due livelli nel ritardare la senescenza: promuovono la mobilitazione dai compartimenti *sink* della pianta e, a livello delle cellule senescenti, ritardano l'inizio dei programmi di senescenza (Keith *et al.*, 2005).

L'azione delle citochinine, tuttavia, non sempre ritarda la senescenza. È stato dimostrato che dosi elevate di chitochinine inducono PCD in colture cellulari; effetti simili sono stati osservati anche *in planta*, dove l'ingiallimento fogliare e la riduzione della massa radicale sono accompagnate dalla frammentazione del DNA. Sembra quindi possibile che l'azione di elevate dosi di chitochinine possa accelerare la senescenza sia in colture cellulari che nella pianta intera (Carimi *et al.*, 2003; 2004).

Ossido nitrico e senescenza

La scoperta del coinvolgimento del radicale gassoso ossido nitrico (ON) nel processo di senescenza deriva dall'osservazione che trattamenti con sostanze che rilasciano ON ritardano la senescenza di fiori e frutti; inoltre, i livelli endogeni di ON diminuiscono

con il progredire della senescenza (Leshem *et al.*, 1998). Il contemporaneo aumento dei livelli di etilene suggerisce che l'ON e l'etilene sono legati da un rapporto stechiometrico inverso e che, infine, fosse l'etilene la molecola responsabile dell'induzione di senescenza (Leshem *et al.*, 1998; Leshem e Pinchasov, 2000). Tuttavia i rapporti tra ON ed etilene non sono chiari visto che Magalhães *et al.* (2000) hanno osservato in *Arabidopsis* che trattamenti a base di ON inducono un aumento dei livelli endogeni di etilene, e che l'inibizione della sintesi di ON endogeno non ha effetti sulla produzione di etilene.

L'ipotesi che l'ON possa avere un'attività antisenescente è supportata dalla scoperta che trattamenti con sostanze che rilasciano ON possono contrastare la senescenza indotta in riso da ABA, MeJA e H₂O₂ (Hung e Kao 2003; 2004 e 2005). Inoltre, in *Arabidopsis* il mutante AtNOS1, caratterizzato da una minore produzione di ON, va incontro a senescenza precoce se l'ON non è somministrato dall'esterno (Guo e Crawford, 2005). L'ON potrebbe agire come antisenescente in quanto è in grado di eliminare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) che in genere promuovono i processi degenerativi. L'ON ha una doppia natura, agendo sia da antiossidante che da ossidante, a seconda della sua concentrazione e delle condizioni ambientali. Un ruolo protettivo è stato osservato nell'aleurone di orzo dove trattamenti con acido gibberellico inducono ROS e promuovono PCD; trattamenti con ON sono in grado di contrastare questo processo riducendo i livelli di ROS (Beligni *et al.*, 2002). Tuttavia, se presente ad elevate concentrazioni, l'ON può promuovere la formazione di ROS ed indurre la PCD. Questo è il caso della risposta ipersensibile ma anche della senescenza indotta da alte concentrazioni di citochinine (Carimi *et al.*, 2005)

Conclusioni

Da quanto detto finora, appare piuttosto chiaro che ancora molti dubbi rimangono irrisolti riguardo il processo della senescenza. Soprattutto negli ultimi anni, i numerosi studi condotti hanno chiarito alcune delle cause e degli eventi coinvolti, mentre il profilo dei geni implicati nella induzione e nella regolazione del processo inizia lentamente a delinearsi. Particolarmente promettente per l'identificazione dei geni indotti, potrebbe essere l'analisi dei profili di espressione genica in mutanti inducibili di tipo *gain-of-function* e/o *loss-of-function* dei fattori di trascrizione finora identificati. Una migliore comprensione della senescenza potrebbe favorire i programmi di miglioramento genetico, permettendo di ottenere

nuovi genotipi caratterizzati da livelli di produttività più elevata e da una maggiore resistenza alla conservazione.

Riassunto

La senescenza è lo stadio finale di sviluppo di un organo; nella foglia, questo processo è caratterizzato da un progressivo ingiallimento, perdita del contenuto proteico e cambiamenti metabolici, che si concludono con la morte tissutale. E' generalmente un processo degenerativo lento, durante il quale i nutrienti sono mobilizzati e traslocati ad altri organi della pianta. La senescenza è regolata da fattori ambientali ed endogeni. In generale, le citochinine determinano un ritardo nella senescenza, e le loro concentrazioni diminuiscono nei tessuti senescenti. Al contrario, l'etilene e l'acido abscissico sono in grado di anticipare l'inizio della senescenza. Lo studio della senescenza può aiutare a comprendere numerosi aspetti generali dello sviluppo della pianta, compresa la morte cellulare programmata. In questo lavoro verrà descritta la senescenza e la sua regolazione.

Parole chiave: morte cellulare programmata, ossido nitrico, regolatori di crescita, senescenza.

Bibliografia

- BAILEY J.L., THORNER J.P., WHYBORN A.G., 1966. In: The Biochemistry of Chloroplast (Goodwin T.W., ed.). Academic Press, New York, Vol. I, pp. 243-255.
- BALIBREA LARA M.E., GONZALEZ GARCIA M.C., FATIMA T., EHNEB R., KYUN LEE T., PROELS R., TANNER W., ROITSCH T., 2004. *Extracellular Invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence*. Plant Cell 16: 1276-1287.
- BARTON R., 1966. *Fine structure of mesophyll cells in senescing leaves of Phaseolus*. Planta 71: 314-325.
- BELIGNI M.V., FATH A., BETHKE P.C., LAMATTINA L., JONES R.L., 2002. *Nitric oxide acts as an antioxidant and delays program-med cell death in barley aleurone layers*. Plant Physiol. 129: 1642-1650.
- BIRADAR D.P., RAYBURN A.L., 1994. *Flow cytometric probing of chromatin condensation in maize diploid nuclei*. New Phytol. 126: 31-35.
- BOROCHOV A., WOODSON W.R. 1989. *Physiology and biochemistry of flower petal senescence*. Hort. Rev. 11:15-43.
- BRADY C.J., 1988. *Nucleic acid and protein synthesis*. In: Senescence and Aging in Plants (L.D. Noodén and C. Leopold eds), pp. 147-149. Academic Press, San Diego.
- BUCHANAN-WOLLASTON V., 1997. *The molecular biology of leaf senescence*. J. Exp. Bot. 48: 181-199.
- BUCHANAN-WOLLASTON V., EARL S., HARRISON E., MATHAS E., NAVABPOUR S., PAGE T., PINK D., 2003. *The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach*. Plant Biotech. J. 1(1): 3-22.
- CARIMI F., ZOTTINI M., FORMENTIN E., TERZI M., LO SCHIAVO F., 2003. *Cytokinins: new apoptotic inducers in plants*. Planta 216: 413-421.
- CARIMI F., TERZI M., DE MICHELE R., ZOTTINI M., LO SCHIAVO F., 2004. *High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence*. Plant Sci. 166: 963-969.
- CARIMI F., ZOTTINI M., COSTA A., CATTELAN I., DE MICHELE R.,

- LO SCHIAVO F., 2005. *NO signalling in cytokinin-induced programmed cell death*. *Plant Cell Environ.* 28: 1171-1178.
- CARR D.J., PATE J.S., 1967. *Ageing in the whole plant*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 21: 559-599.
- CAUSIN H.F., JAUREGUI R.N., BARNEIX A.J., 2006. *The effect of light spectral quality on leaf senescence and oxidative stress in wheat*. *Plant Sci.* In press.
- CHEN W., PROVART N.J., GLAZEBROOK J., KATAGIRI F., CHANG H.S., EULGEM T., MAUCH F., LUAN S., ZOU G., WHITHAM S.A., BUDWORTH P.R., TAO Y., XIE Z., CHEN X., LAM S., KREPS J.A., HARPER J.F., SI-AMMOUR A., MAUCH-MANI B., HEINLEIN M., KOBAYASHI K., HOHN T., DANGL J.L., WANG X., TONG ZHU T., 2002. *Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses*. *Plant Cell* 14: 559-574.
- CHERNYAD'EV I.I., 2000. *Ontogenetic changes in the photosynthetic apparatus and effects of cytokinins*. *App. Biochem. Microbiol.* 36: 611-625.
- DAI N., SCHAFFER A., PETREIKOV M., SHAHAK Y., GILLER Y., RATNER K., LEVINE A., GRANOT D., 1999. *Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence*. *Plant Cell* 11: 1253-1266.
- DANGL J.L., DIETRICH R.A., THOMAS H., 2000. *Senescence and Programmed Cell Death*. In: *Biochemistry & Molecular Biology in Plants*. Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. American Society of Plant Physiologist. Rockville, Maryland.
- DENNIS D.T., STUBBS M., COULTATE T.P., 1967. *The inhibition of Brussels sprout leaf senescence by kinins*. *Can. J. Bot.* 45: 1019-1024.
- DRAKE R., JOHN I., FARRELL A., COOPER W., SCHUCH W., GRIERSON D., 1996. *Isolation and analysis of cDNA encoding tomato cysteine protease expressed during leaf senescence*. *Plant Mol. Biol.* 30: 755-767.
- FUJIKI Y., ITO M., NISHIDA I., WATANABE A., 2000. *Multiple signaling pathways in gene expression during sugar starvation. Pharmacological analysis of din gene expression in suspension-cultured cells of Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 1139-1147.
- FUJIKI Y., YOSHIKAWA Y., SATO T., INADA N., ITO M., NISHIDA I., WATANABE A., 2001. *Dark-inducible genes from Arabidopsis thaliana are associated with leaf senescence and repressed by sugar*. *Physiol. Plant.* 111: 345-352.
- GAN S., 1995. *Molecular characterization and genetic manipulation of plant senescence*. Ph.D. thesis. University of Wisconsin, Madison.
- GAN S., AMASINO, R.M., 1995. *Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin*. *Science* 270: 1986-1988.
- GAN S., AMASINO R.M., 1996. *Cytokinins in plant senescence: from spray and pray to clone and play*. *Bioessays* 18: 557-565.
- GAN S., AMASINO R.M., 1997. *Making sense of senescence. Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence*. *Plant Physiol.* 103: 313-319.
- GEPSTEIN S., 1988. *Photosynthesis*. In: *Senescence and Aging in Plants* (L.D. Noodén and C. Leopold eds), Academic Press, San Diego: 147-149.
- GLICKMAN M.H., CIECHANOVER A., 2002. *The ubiquitin-proteasome proteolysis pathway: destruction for the sake of construction*. *Physiol. Rev.* 82: 373-428.
- GRBIC V., BLEECKER A.B., 1995. *Ethylene regulates the timing of leaf senescence in Arabidopsis*. *Plant J.* 8: 595-602.
- GUIAMET J.J., PICHERSKY E., NOODÉN L.D., 1997. *Secretion of thylakoid components from senescing soybean chloroplasts*. *Plant Physiol.* 114: 238.
- GUIAMET J.J., TEERI J.A., NOODÉN L.D., 1990. *Effects of nuclear and cytoplasmic genes altering chlorophyll loss on gas exchange during monocarpic senescence in soybean*. *Plant Cell Physiol.* 31: 1123-1130.
- GUO Y., CAI Z., GAN S., 2004. *Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence*. *Plant, Cell Environ.* 27: 521-549.
- GUO F.Q., CRAWFORD N.M., 2005. *Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence*. *Plant Cell* 17: 3436-3450.
- HAJOUJ T., MICHELIS R., GEPSTEIN S., 2000. *Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence*. *Plant Physiol.* 124: 1305-1314.
- HAMILTON A.J., LYCETT G.W., GRIERSON D., 1990. *Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants*. *Nature* 346: 248-287.
- HELLMANN H., ESTELLE M., 2002. *Plant development: regulation by protein degradation*. *Science* 297: 793-797.
- HENSEL L.L., GRBIC V., BAUMGARTEN D.A., BLEECKER A.B., 1993. *Development and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in Arabidopsis*. *Plant Cell* 5: 553-564.
- HUNG K.T., KAO C.H., 2003. *Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid*. *J. Plant. Physiol.* 160: 871-879.
- HUNG K.T., KAO C.H., 2004. *Nitric oxide acts as an antioxidant and delays methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves*. *J. Plant Physiol.* 161: 43-52.
- HUNG K.T., KAO C.H., 2005. *Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by hydrogen peroxide*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 21-28.
- HYO J.K., HOJIN R., SUNG H.H., HYE R.W., PYUNG O.L., IN C.L., JEN S., HONG G.N., ILDOO H., 2006. *Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis*. *PNAS* 103: 814-819.
- ICHIMURA K., SHINOZAKI K., TENA G., 2002. *Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature*. *Trends in Plant Sci.* 7: 301-308.
- JANG J.-C., LEON P., ZHOU L., SHEEN J., 1997. *Hexokinase as a sugar sensor in higher plants*. *Plant Cell* 9: 5-19.
- JONES A., 2000. *Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death?* *Trends Plant Sci.* 5: 225-230.
- JORDI W., SCHAPEDONK A., DAVELAAR E., STOOPEN G.M., POT C.S., DE VISSER R., VAN RHIJN, GAN S., AMASINO R., 2000. *Increased cytokinin levels in transgenic PSAG12 - IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning*. *Plant Cell Environ.* 23: 279-289.
- KAWASAKI S., TAKEUCHI J., 1989. *Senescence-induced, thylakoid-bound diisopropylfluorophosphate-binding protein in spinach. Induction pattern, localization, and some properties*. *Plant Physiol.* 90: 338-344.
- KEITH C., FREEMAN M., BJORKMAN P.O., NICANDER B., SITBON F., TILLBERG E., 2005. *Effects of senescence-induced alteration in cytokinin metabolism on source-sink relationships and ontogenic and stress-induced transitions in tobacco*. *Planta* 221: 801-814
- KERR J.F.R., WYLLIE A.H., CURRIE A.R., 1972. *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br. J. Cancer.* 26: 239-257.
- KURAN H., 1993. *Changes in DNA, dry mass and protein content of leaf epidermis nuclei during aging of perennial monocotyledonous plants*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 62: 149-154.
- LAM E., KATO N., LAWTON M., 2001. *Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response*. *Nature* 411: 848-853.
- LAWROL D., 1993. *Photosynthesis*. 2nd Ed. Longman Scientific and Technical, Essex.
- LAZAN H.B., BARLOW E.W.R., BRADY C.J., 1983. *The significance of vascular connection in regulating senescence of the detached flag leaf of wheat*. *J. Exp. Bot.* 34: 726-736.

- LEOPOLD A.C., 1961. *Senescence in plant development*. Science 134: 1727-1732.
- LESHEM Y., WILLS R.B.H., VENG-VA KU V., 1998. *Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants*. Plant. Physiol. Biochem. 36: 825-833.
- LESHEM Y., PINCHASOV Y., 2000. *Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries Fragaria ananassa (Duch.) and avocados Persea americana (Mill.)*. J. Exp. Bot. 51: 1471-1473.
- LOHMAN K.N., GAN S., JOHN M.C., AMASINO R.M., 1994. *Molecular analysis of natural leaf senescence in Arabidopsis thaliana*. Physiol. Plant. 92: 322-328.
- MAGALHÃES J.R., MONTE D.C., DURZAN D., 2000. *Nitric oxide and ethylene emission in Arabidopsis thaliana*. Physiol. Mol. Biol. Plants 6: 117-127.
- MATILE P., HORTENSTEINER S., THOMAS H., KRAUTLER B., 1996. *Chlorophyll breakdown in senescent leaves*. Plant Physiol. 112: 1403-1409.
- MICELI F., CRAFT-BRANDNER S.J., EGLI D.B., 1995. *Physical restriction of pod growth alters development of soybean plants*. Crop. Sci. 35: 1080-1085.
- NAM H.G., 1997. *The molecular genetic analysis of leaf senescence*. Curr. Opin. Biotech. 8: 200-207.
- NOH Y.-S., AMASINO R.M., 1999. *Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12*. Plant Mol. Biol. 41: 181-194.
- NOODÉN L.D., 1988. *The phenomena of senescence and aging*. In: Senescence and Aging in Plants (L.D. Noodén and C. Leopold eds), Academic Press, San Diego: 1-50.
- NOODÉN L.D., LEOPOLD A.C., 1978. *Hormonal control of senescence and abscission*. In: Phytohormones and Related Compounds, Vol. II (Letham D.S., Higgins T.J., Goodwin P.B., eds), Elsevier, Amsterdam: 329-369.
- NOODÉN L.D., GUIAMÉT J.J., 1989. *Regulation of assimilation and senescence by the fruit in monocarpic plants*. Physiol. Plant. 77: 267-274.
- NOODÉN L.D., GUIAMÉT J.J., JOHN I., 1997. *Senescence mechanisms*. Physiol. Plant. 101: 746-753.
- OELLER P.W., WONG L.M., TAYLOR L.P., PIKE D.A., THEOLOGIS A., 1991. *Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNS*. Science 254: 437-439.
- OH S.A., PARK J.-H., LEE G.I., PAK K.H., PARK S.K., NAM H.G., 1997. *Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in Arabidopsis thaliana*. Plant J. 12: 527-535.
- ONO K., NISHI J., WATANABE A., TERASHIMA I., 2001. *Possible mechanisms of adaptive leaf senescence*. Plant Biol. 3: 234-243.
- ORZAEZ D., GRANELL A., 1997. *DNA fragmentation is regulated by ethylene during carpel senescence in Pisum sativum*. Plant J. 11: 137-144.
- PARTHIER B., 1988. *Gerontoplasts - the yellow end in the ontogenesis of chloroplasts*. Endocytobiosis Cell Res. 5: 163-190.
- PAUL M.J., FOYER C.H., 2001. *Sink regulation of photosynthesis*. J. Exp. Bot. 52: 1383-1400.
- PICTON S., BARTON S.L., BOUZAYEN M., HAMILTON A.J., GRIERSON D., 1993. *Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene*. Plant J. 3: 469-481.
- PROCHAZKOVA D., SAIRAM R.K., SRIVASTAVA G.C., SINGH D.V., 2001. *Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves*. Plant Sci. 161: 765-771.
- PROCHAZKOVA D., WILHELMOVA N., 2004. *Changes in antioxidant protective protection in bean cotyledons during natural and continuous irradiation-accelerated senescence*. Biol. Plant. 48: 33-39.
- QUIRINO B.F., HOH Y.S., HIMELBLAU E., AMASINO R.M., 2000. *Molecular aspects of leaf senescence*. Trends Plant Sci. 5: 278-282.
- RICHMOND A.E., LANG A., 1957. *Effect of kinetin on protein content and survival of detached Xanthium leaves*. Science 125: 650-651.
- ROUSSEAU M.C., HALL A.J., SANCHEZ R.A., 1996. *Far-red enrichment and photosynthetically active radiation level influence leaf senescence in field grown sunflower*. Physiol. Plant. 96: 217-224.
- ROUSSEAU M.C., BALLARE C.L., JORDAN E.T., VIERSTRA .RD., 1997. *Directed overexpression of PHYA locally suppresses stem elongation and leaf senescence responses to far-red radiation*. Plant Cell Environ. 20: 1551-1555.
- RYU S.B., WANG X.M., 1995. *Expression of phospholipase-D during castor bean leaf senescence*. Plant Physiol. 108: 713-719.
- SHAW M., MANOCHA M.S., 1965. *Fine structure in detached, senescing wheat leaves*. Can. J. Bot. 43: 747-755.
- SHIU S.H., BLEECKER A.B., 2001. *Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases*. PNAS. 98: 10763-10768.
- SIMON E.W., CHAPMANN J.A., 1961. *The development of mitochondria in Arum spadix*. J. Exp. Bot. 12: 414-420.
- SINGH S., LETHAM D.S., PALNI L.M.S., 1992a. *Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. V. Endogenous cytokinin levels and metabolism of zeatin riboside in leaf discs from green and senescent tobacco (Nicotiana rustica) leaves*. J. Plant Physiol. 139: 279-283.
- SINGH S., LETHAM D.S., PALNI, L.M.S., 1992b. *Cytokinin biochemistry in relation to leaf senescence. VII. Endogenous cytokinin levels and exogenous applications of cytokinins in relation to sequential leaf senescence of tobacco*. Physiol. Plant. 86: 398-406.
- SMART C.M., 1994. *Gene expression during leaf senescence*. New Phytol. 126: 419-448.
- TAYLOR C.B., BARIOLA P.A., DELCARDAYRE S.B., RAINES R.T., GREEN P.J., 1993. *RNS2: a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation*. PNAS. 90: 5118-5122.
- THIMANN K.V., TETLEY R.M., KRIVAK B.M., 1977. *Metabolism of oat leaves during senescence: V. Senescence in light*. Plant Physiol. 59: 448-454.
- THOMAS H., 1987. *Foliar senescence mutants and other genetic variants*. In: Development Mutants in Higher Plants (H. Thomas and D. Grierson, eds.), Cambridge University Press, Cambridge: 245-265.
- THOMAS H., SMART C.M., 1993. *Crops that stay green*. Ann. Appl. Biol. 123: 193-219.
- THOMAS H., STODDART J.L., 1980. *Leaf senescence*. Annu. Rev. Plant Physiol. 31: 83-111.
- THOMAS H., OUGHAM H.J., HORTENSTEINER S., 2001. *Recent advances in the cell biology of chlorophyll catabolism*. Adv. Bot. Res. 35: 1-52.
- THOMAS H., OUGHAM H.J., WAGSTAFF C., STEAD A.D., 2003. *Defining senescence and death*. J. Exp. Bot. 54: 1127-1132.
- THOMSON W.W., PLATT-ALOIA K.A., 1987. *Ultrastructure and senescence in plants*. In: Plant senescence: its biochemistry and physiology (Thomson W.W. et al., Eds.), American Society of Plant Physiologists, Rockville MD: 20-30.
- VAN DOORN W.G., 2004. *Is petal senescence due to sugar starvation? Plant Physiol.* 134: 35-42.
- VAN DOORN W.G., WOLTERING E.J., 2004. *Senescence and programmed cell death: substance or semantics? J. Exp. Bot.* 55: 2147-2153.
- VARSHAVSKY A., 1997. *The N-end rule pathways of protein degradation*. Gene Cell 2: 13-28.
- WEAVER L.M., GAN S., QUIRINO B., AMASINO R.M., 1998. *A comparison of expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment*. Plant Mol. Biol. 37: 455-469.

- WEAVER L.M., AMASINO R.M., 2001. *Senescence is induced in individually darkened Arabidopsis leaves, but inhibited in whole darkened plants*. Plant Physiol. 127: 876-886.
- WILSON J.B., 1997. *An evolutionary perspective on the "death hormone" hypothesis in plants*. Physiol. Plant. 99: 511-516.
- WOO H.R., CHUNG K.M., PARK J.-H., OH S.A., AHN T., HONG S.H., JANG S.K., NAM H.G., 2001. *ORE9: an F-box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis*. Plant Cell 13: 1779-1790.
- XIAO W., SHEEN J., JANG J.-G., 2000. *The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development*. Plant Mol. Biol. 44: 451-461.
- YOSHIDA S., 2003. *Molecular regulation of leaf senescence*. Curr. Opin. in Plant Biol. 6: 79-84.
- YOSHIDA T., MINAMIKAWA T., 1996. *Successive amino-terminal proteolysis of the large subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase by vacuolar enzymes from French bean leaves*. Eur. J. Biochem. 238: 317-324.
- YOSHIDA S., ITO M., CALLIS J., NISHIDA I., WATANABE A., 2002a. *A delayed leaf senescence mutant is defective in arginyl-tRNA: protein arginyltransferase, a component of the N-end rule pathway in Arabidopsis*. Plant J. 32: 129-137.
- YOSHIDA S., ITO M., NISHIDA I., WATANABE A., 2002b. *Identification of a novel gene HYS1/CPR5 that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defense responses in Arabidopsis thaliana*. Plant J. 29: 427-437.
- ZAPATA J.M., GUERA A., ESTEBAN-CARRASCO A., MARTIN M., SABATER B., 2005. *Chloroplasts regulate leaf senescence: delayed senescence in transgenic ndhF-defective tobacco*. Cell Death Diff. 12: 1277-84.
- ZIMMERMANN P., ZENTGRAF U., 2005. *The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development*. Cell. Mol. Biol. Lett. 10: 515-534.