©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Phyton (Austria)	Vol. 23	Fasc. 2	197—210	30. 9. 1983

Aus dem Institut für Pflanzenphysiologie der Karl-Franzens-Universität Graz

Die Feinstruktur der Plastideneinschlüsse von *Ranunculus bulbosus*

Von

Manfred GAILHOFER *)

Mit 24 Abbildungen auf 9 Tafeln

Eingelangt am 2. April 1982

Key words: Plastids, plastid inclusions, membrane bound body, *Ranunculus bulbosus*

Summary

GAILHOFER M. 1983. Fine structure of plastid inclusions of *Ranunculus bulbosus*. — Phyton (Austria) 23 (2): 197—210, with 24 figures (9 tables). — German with English summary.

Plastids of *Ranunculus bulbosus* contain up to tree different inclusions: one type resembles the membrane bound inclusions, the other two types are not membrane bound and appear elongated or rhombic, respectively. The occurence of these inclusions in plastids of different tissues was determined and their development investigated. All three different inclusions occur in differentiating plastids of guard cells; in adult chloroplasts of this cell type the elongated one does not exist.

Epidermal plastids as well as mesophyll chloroplasts temporarily form prolamellar bodies during development in light. In epidermal and guard cell plastids the prolamellar body is frequently connected to the membrane bound inclusion. Thylakoids were found to be adpressed to the membrane bound body; by folding of the membrane grana-like structures can be formed.

Membrane bound inclusions are already found in proplastids; the other inclusions are formed during further cell differentiation. The elongated inclusion consists of filaments and grows larger by accumulation of additional filaments.

---

*) Dr. M. GAILHOFER, Institut für Pflanzenphysiologie der Karl-Franzens-Universität Graz, A-8010 Graz, Schubertstraße 51, Austria.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Chloroplasts of palisade and spongy parenchyma, of the ground parenchyma of the petiole and stem do not contain any inclusions — not even during development.

The elongated inclusion is digestible with pepsin or pronase, which indicates that it consists of protein. The rhombic and the membrane bound inclusions were found to be pepsin and pronase insensitive.

Zusammenfassung

GAILHOFER M. 1983. Die Feinstruktur der Plastideneinschlüsse von *Ranunculus bulbosus*. — Phyton (Austria) 23 (2): 197—210, mit 24 Abbildungen (9 Tafeln). — Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

Die Plastiden von *Ranunculus bulbosus* können bis zu drei verschiedene Einschlüsse enthalten: membranumgebene Körper sowie stabförmige und rautenförmige Einschlüsse ohne begrenzende Membran. Ihr Vorkommen in verschiedenen Geweben von Wurzel, Stamm und Blatt wurde festgestellt und ihre Entwicklung verfolgt.

Die drei genannten Einschlüsse treten nur in nicht ausdifferenzierten Plastiden der Schließzellen gemeinsam auf, in den ausdifferenzierten fehlt der stabförmige Einschluß.

Die Plastiden der oberirdischen Organe bilden während der Entwicklung vorübergehend Prolamellarkörper, die in Epidermis- und Schließzellen mit dem membranumgebenen Körper in Verbindung stehen; ihm sind Thylakoide angepreßt, durch Faltung seiner Membran entstehen granaähnliche Strukturen.

Membranumgebene Körper treten schon in Proplastiden auf, die anderen Einschlüsse werden während der weiteren Zelldifferenzierung gebildet. Der stabförmige Einschluß wird durch Anlagerung zusätzlicher Filamente vergrößert.

Die Chloroplasten des Palisaden- und Schwammparenchyms sowie des Grundgewebes in Blattstiel und Stamm enthalten in keinem Entwicklungsstadium Einschlüsse.

Die Eiweißnatur des stabförmigen Einschlusses wird durch Abbau mit Pronase oder Pepsin sichergestellt; der Inhalt des membranumgebenen und des rautenförmigen Einschlusses wird durch diese Enzyme nicht aufgelöst.

Einleitung

Über das Vorkommen von Einschlüssen in Plastiden verschiedener Pflanzen wurde schon von SCHIMPER 1885 berichtet. Unter anderen gibt er stabförmige Einschlüsse in *Ranunculus steveni* an. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, daß Plastideneinschlüsse frei im Stroma oder membranumgeben auftreten (Ref. THOMSON & WHATLEY 1980). Beide können gemeinsam in einer Plastide vorkommen (HOEFERT & ESAU 1975). Struktur und Funktion erscheinen bei einigen Einschlüssen wie z. B. dem Fraktion 1 Protein geklärt (TAKEBE *et al.* 1973). Die Natur der membranumgebenen Einschlüsse hingegen ist noch ziemlich

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

unbekannt. Ihr Inhalt ist amorph oder kristallin (NEWCOMB 1967), die chemische Zusammensetzung scheint in den verschiedenen Arten unterschiedlich zu sein. Es werden phenolische Substanzen in *Prunus persica*, vornehmlich Lipide in *Bryophyllum* und *Kalanchoë*, Lipoproteine in *Lactuca sativa* und Proteine als Hauptkomponente in *Nicotiana tabacum* angegeben (FLEMION *et al.* 1967, GIFFORD & STEWART1968, SRIVASTAVA & PAULSON 1968, AMES & PIVORUN 1974). Derartige Einschlüsse verschwinden oft während der Differenzierung zu Chloroplasten, ihr Inhalt wird als Reservestoff aufgefaßt, der zur Membransynthese dienen könnte (BOASSON, LAETSCH & PRICE 1972, ROSINSKI & ROSEN 1972). In Epidermiszellen sind Plastideneinschlüsse oft persistierende Strukturen (PLATT-ALOIA & THOMSON 1979).

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen von KNOBLAUCH-REITER 1963 an *Ranunculus bulbosus* ergaben, daß die Plastiden der Epidermen der Blätter, Blatt- und Blütenstiele, nicht jedoch die der Schließzellen, stabförmige Einschlüsse enthalten. Diese geben mit Millon positive Reaktion, lassen sich mit Pepsin und Trypsin abbauen und bestehen daher wohl aus Eiweiß. MOLISCH 1901 bezeichnet Plastiden mit Eiweißeinschlüssen als Proteinoplasten. DEKOCK *et al.* 1971 untersuchten Blattspitzen von *Ranunculus reptans* elektronenmikroskopisch und fanden in den Chloroplasten der Porenzellen von Hydathoden neben kristallartigen Einschlüssen „pyrenoid-like bodies".

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß auch in den Plastiden von Ranunculus bulbosus verschiedenartige Einschlüsse auftreten. Ihre Entwicklung wird in verschiedenen Organen verfolgt, ihre mögliche Eiweißnatur durch Proteolyse überprüft.

Material und Methoden

Es wurden junge und ausdifferenzierte Blätter, Blattstiele, Blühsprosse und Wurzeln von *Ranunculus bulbosis* L. untersucht.

Etwa 1 mm^3 große Gewebestücke wurden mit 3%igem phosphatgepuffertem Glutardialdehyd (pH 7,1) vorfixiert, im Puffer gewaschen, mit 1%igem Osmiumtetroxid in Veronal-Acetatpuffer (pH 7,1) nachfixiert, entweder in einer Äthanolreihe entwässert und über Propylenoxid in Epon eingebettet oder mit Glycomethacrylat (GMA) entwässert und darin eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Reichert Om U 2 hergestellt, mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und im Siemens Elmiskop I A untersucht.

Für den proteolytischen Abbau (MONNERON & BERNHARD 1966, GIESE 1971) wurden Schnittbänder von Epon- oder GMA-Einbettungen mittels Kunststoffschlingen bei 37° C für 30 Minuten auf 5%iger Perjodsäure flottiert und anschließend gründlich gewaschen. Inkubiert wurde bei 37° C, wenn nötig bis zu 8 Stunden, mit folgenden Medien:

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

a) 0,5% Pronase E (Merck) in 0,1 M Thioglycolsäure mit 1 N und 0,01 1 NaOH auf pH 7,4 gebracht;
b) 0,5% Pepsin, 3 x cryst. (Fluka A. G.) gelöst in aq. dest. mit 160 mg Cysteiniumchlorid pro 10 ml;
c) 0,5% Pepsin gelöst in 0,1 N HCl.

Als Kontrollen dienten die jeweiligen Ansätze ohne Enzym. Nach gründlichem Waschen wurden die Schnittbänder, auf Objektträgernetzen montiert und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert, untersucht.

Ergebnisse

Die Proteinoplasten eben ausdifferenzierter Epidermiszellen der Sprosse, Blätter und Blattstiele von *Ranunculus bulbosus* enthalten als auffallendes Merkmal zwei verschiedene Einschlüsse (Abb. 1): Je Plastide ein bis drei membranumgebene Körper und einen im Stroma liegenden stabförmigen Einschluß. Nahe der inneren Plastidenmembran oder mit ihr in Verbindung stehend kommen Vesikel vor, ferner Stärke und Plastogluboli. Grana mit wenigen Thylakoiden liegen frei im Stroma oder eng dem membranumgebenen Körper an. Der Durchmesser des membranumgebenen Körpers beträgt bis zu 2 µm, dessen Inhalt ist fädig und granulär, jedoch ohne regelmäßige Struktur (Abb. 4). Er erscheint oft heller als das Plastidenstroma, in alternden Plastiden hingegen ist er bei unveränderter Struktur elektronendichter.

Der frei im Plastidenstroma liegende stabförmige Einschluß erreicht eine Länge von etwa 7 µm und eine Breite von ca. 1,5 µm und bestimmt die Länge des Proteinoplasten. Er ist an beiden Enden abgestumpft und aus mehr oder weniger parallel zur Längsachse verlaufenden Filamenten von nicht bestimmbarer Länge aufgebaut. Der runde bis sechseckige Querschnitt des Einschlusses läßt ein Muster aus Punkten, parallelen, manchmal auch gekreuzten Linien, erkennen (Abb. 2).

Die Entwicklung beider Einschlüsse wurde in den jüngsten Blättern und während des Streckungswachstums in Sprossen, Blattstielen und Blättern verfolgt.

Die Epidermiszellen der jüngsten untersuchten, etwa 1 mm langen Blätter enthalten Proplastiden mit wenigen Lamellen, Stärke und einen elektronendichten, membranumgebenen Körper von ca. 0,25 µm Durchmesser (Abb. 3), der stabförmige Einschluß ist noch nicht vorhanden. In etwas älteren Blättern erreichte der membranumgebene Körper Durchmesser bis zu 2 µm, vereinzelt liegt ihm ein Thylakoid an (Abb. 4). Im Plastidenstroma umgeben kurze gebogene Filamente den noch kleinen stabförmigen Einschluß (Abb. 4 a), vor allem dort, wo die beiden Einschlüsse der inneren Plastidenmembran nahe liegen, treten Einstülpungen dieser Membran und Vesikel auf (Abb. 4).

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Die Proteinoplasten in Epidermiszellen von etwa 1 mm langen Blattstielen und ca. 3—4 mm großer Blätter enthalten neben einigen Thylakoiden einen bis zwei wenig organisierte Prolamellarkörper, deren Tubuli mit dem membranumgebenen Körper in Verbindung stehen können (Abb. 7). Der stabförmige Einschluß erscheint sechseckig, den Ecken können auffallende wulstartige Strukturen vorgelagert sein (Abb. 8); manchmal erkennt man Partikel, wohl die Querschnitte von Filamenten, die Ecken eines Rhombus markierend (Abb. 9). Der Abstand dieser punktförmig erscheinenden Filamentquerschnitte ist größer als im Einschluß selbst, ihr Durchmesser beträgt etwa 8 nm (Abb. 9).

Längsgetroffen zeigt der stabförmige Einschluß im Inneren dichtgepackte Filamente, denen sowohl seitlich als auch an den Enden weitere, locker angeordnete Filamente anliegen. Die Filamente sind etwa 9 nm breit und scheinen aus globulären Partikeln zusammengesetzt zu sein. Die verfolgbare Länge der Filamente beträgt ca. 1 μm, an ihren freien Enden liegen oft Vesikel (Abb. 10).

Diese locker dem Einschluß anliegenden Filamentbezirke treten nur während der Organdifferenzierung und der Zellstreckung auf, in den Proteinoplasten ausdifferenzierter Epidermiszellen fehlen sie.

In etwas älteren Entwicklungsstadien werden keine Prolamellarkörper mehr beobachtet, die Proteinoplasten besitzen Grana mit drei bis vier Thylakoiden, angepreßt an den membranumgebenen Körper oder frei im Stroma liegend; auffallend sind zahlreiche Einstülpungen der inneren Plastidenmembran und meist randständig liegende Vesikel (Abb. 5). Die Membran, die den Körper umgibt, erscheint stellenweise so gefaltet, daß thylakoidähnliche Strukturen entstehen, deren „Loculi" als Kanäle in den Körper münden (Abb. 5, 6).

Die Plastiden in den Schließzellenpaaren, die noch keinen Zentralspalt ausgebildet haben, enthalten ebenfalls membranumgebene Körper. Randständige Thylakoide kleiner Grana sind erweitert, ihr Inhalt gleicht dem des Körpers (Abb. 12). Lamellen, die mit dem Prolamellarkörper in Verbindung stehen, haben so engen Kontakt mit der Schmalseite des stabförmigen Einschlusses, daß sie in diese Struktur einzufließen scheinen (Abb. 13). Im Plastidenstroma treten weiters mehrere Einschlüsse mit rautenförmigem, manchmal unregelmäßigem Umriß, und granulärem elektronendichten Inhalt auf; ihre Länge beträgt etwa 0,5 μm, die Breite 0,12 μm. Randständige Vesikel können mit der inneren Plastidenmembran verbunden sein. In dieser Entwicklungsstufe fehlt diesen Plastiden die Stärke.

In den Plastiden ausdifferenzierter Schließzellen fehlt der stabförmige Einschluß, der membranumgebene Körper ist kontrastarm und enthält fädige Strukturen, wie sie auch in den angepreßten erweiterten Lamellen und in den aufgetriebenen randständigen Thylakoiden der Grana beobachtet werden. Stärke ist nun vorhanden (Abb. 11).

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Zur selben Zeit wie die Plastiden in Epidermis- und Schließzellen enthalten auch die Jungchloroplasten in Palisaden- und Schwammparenchym und im Rindenparenchym des Blattstiels regelmäßig aufgebaute Prolamellarkörper. Weder während der Differenzierung noch im ausdifferenzierten Zustand enthalten diese Chloroplasten Einschlüsse. Solche treten nur in Chloroplasten der Parenchymzellen auf, die scheidenartig kleine Gefäßbündel umgeben (Abb. 14). Es handelt sich um die gleichen rautenförmigen Einschlüsse, die auch in den Plastiden der Schließzellen vorkommen. Im Schnitt wurden bis zu 12 derartige Einschlüsse gezählt, sie sind bis zu 1 μm lang und etwa 0,25 μm breit und liegen zwischen dem gut entwickelten Thylakoidsystem.

Die Leukoplasten der Siebröhren enthalten nur Stärke und gehören daher nach Behnke 1971 dem S-Typ an (Abb. 16). Im strukturarmen Stroma kommen zahlreiche Partikel vor, die als Stärkefragmente anzusehen sind (Mittelheuser & Van Steveninck 1975).

Schließlich wurden auch die Plastiden der Wurzel untersucht. Schon in meristematischen Zellen enthalten Proplastiden neben wenigen Lamellen einen etwa 0,4 μm großen membranumgebenen Körper (Abb. 15). Dieser erreicht in den Leukoplasten ausdifferenzierender Zellen einen Durchmesser von etwa 0,7 bis 0,85 μm. Vesikel und Lamellen sind sowohl mit der inneren Plastidenmembran als auch mit der Membran des Einschlusses in Verbindung, eine durchgehende Verbindung der inneren Plastidenmembran mit der Hülle des Einschlusses wurde nicht beobachtet (Abb. 17).

In ausdifferenzierten Zellen treten derartige Einschlüsse in den Amyloplasten der Wurzelhaube und in den Leukoplasten der Exodermis und der Wurzelrinde auf. In den Leukoplasten der Wurzelrinde steht der membranumgebene Körper manchmal mit einem reich verzweigten tubulären System in Verbindung, der Inhalt erscheint gleichartig (Abb. 18).

Die Leukoplasten der Exodermis (Abb. 19) und die Amyloplasten der Wurzelhaube (Abb. 20) enthalten weiters ein bis drei rautenförmige Einschlüsse, wie sie schon in den Chloroplasten der Schließzellen und in den Gefäßbündelscheiden der Blätter beobachtet worden sind.

Um die Natur der drei beschriebenen Einschlüsse festzustellen, wurden Ultradünnschnitte mit proteolytischen Enzymen behandelt. Bei Fixierung mit Glutardialdehyd allein bleibt die Struktur der Einschlüsse nur schlecht erhalten, ebenso bei Einbettung in Glycolmethacrylat. Es war daher notwendig, die enzymatischen Abbauversuche an doppelfixierten und in Epon eingebetteten Präparaten am Ultradünnschnitt auszuführen.

Beim Bleichen der Schnitte mit Perjodsäure wird der rautenförmige Einschluß aufgelöst, so daß eine weitere Untersuchung nicht durchführ-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

bar ist. Ein Abbau dieses Einschlusses ohne Vorbehandlung mit Perjodsäure ist weder mit Pepsin noch mit Pronase möglich. Bei allen anderen Zellstrukturen führt das Bleichen der Schnitte mit Perjodsäure zu keiner nennenswerten Kontrastverminderung.

Im Pepsin-HCl-Gemisch kommt es zur Hydrolyse der Stärke und zur Auflösung der Plastglobuli, manchmal auch der begrenzenden Membran des membranumgebenen Körpers, während dieser selbst und ebenso der stabförmige Einschluß unverändert bleiben. Es handelt sich durchwegs um unspezifische Reaktionen, die auch in der Kontrolle ohne Enzym beobachtet werden.

Auch im Pepsin-Cystein-Gemisch bleibt der Inhalt des membranumgebenen Körpers nach 200 Minuten Inkubationsdauer erhalten. Der stabförmige Einschluß hingegen und die ihm vorgelagerten Filamentbezirke (vgl. Abb. 10) werden nach 160 Minuten fast vollständig aufgelöst (Abb. 22). Im Kontrollmedium ohne Enzym sind Teile der Stärke, die Plastogluboli, Thylakoide und oft die begrenzende Membran des membranumgebenen Körpers unspezifisch gelöst (Abb. 21).

Ein Pronase-Thioglycolsäure-Gemisch baut nach 150 Minuten den stabförmigen Einschluß, nicht jedoch den membranumgebenen Körper ab (Abb. 23). Unspezifisch, also auch im Medium ohne Pronase, wird die den membranumgebenen Körper begrenzende Membran aufgelöst (Abb. 23, 24). Auch eine auf 8 Stunden ausgedehnte Inkubation führt weder mit Pepsin noch mit Pronase zum Abbau des membranumgebenen Körpers.

Diskussion

Membranumgebene Körper werden im Meristem der Sproßspitzen von *Bryophyllum* und *Kalanchoë* und im Kambium von *Fraxinus americana* beobachtet (Gifford & Stewart 1968, Srivastava 1966). In Etioplasten des Kallusgewebes von *Populus tremuloides* und in Plastiden belichteter Wurzeln von *Phaseolus vulgaris* entwickeln sie sich aus dem Tubularkomplex (Blackwell *et al.* 1969, Newcomb 1967).

In *R. bulbosus* stehen die membranumgebenen Körper mit dem Prolamellarkörper in Verbindung, sind aber schon vor dessen Entwicklung vorhanden. Die Prolamellarkörper in den Plastiden der Epidermis treten ebenso wie die in jungen Chloroplasten des Palisadengewebes während der normalen Entwicklung vorübergehend auf. Sie sind im Gegensatz zu denen in den jungen Chloroplasten unregelmäßig organisiert und könnten daher auch als Tubularkomplexe bezeichnet werden. Da sich jedoch beim Verdunkeln ausdifferenzierter Pflanzen von *R. bulbosus* gleichartige Prolamellarkörper entwickeln (Gailhofer unveröff.), wurde auf den Ausdruck Tubularkomplex verzichtet. Auch Platt-Aloia & Thomson 1979 nehmen eine enge Beziehung zwischen Tubularkomplex und Prolamellarkörper an.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

In *Nicotiana tabacum* besteht eine Verbindung des membranumgebenen Körpers nicht nur mit dem Prolamellarkörper sondern auch mit Granalamellen (STETLER & LAETSCH 1969). Während der Differenzierung der Plastiden in der Epidermis von *R. bulbosus* liegen der begrenzenden Membran des Körpers granumähnliche Strukturen an, die durch mehrfache Faltung der begrenzenden Membran entstanden sein könnten. In den Chloroplasten junger Blätter von *Persea americana* tritt eine ähnliche Faltung der limitierenden Membran auf, der ein Granum angepreßt ist (CRAN & POSSINGHAM 1974). Membranverbindungen zwischen dem sich entwickelnden Granasystem und dem membranumgebenen Körper werden auch in den epidermalen Plastiden von *Sesamum indicum* angenommen, randständige Thylakoide von Grana sind erweitert und enthalten ähnlichen Inhalt wie der Körper (PLATT-ALOIA & THOMSON 1979). MARTIN & LARBALESTIER 1977 schlagen vor, membranumgebene Einschlüsse in den Plastiden der Epidermis von *Taraxacum officinale* als erweiterte Thylakoide zu betrachten. CASADORO *et al.* 1977 hingegen konnten bei *Atropa belladonna* keine Verbindung zwischen Thylakoidmembranen und der Membran des Körpers finden.

Der Inhalt des membranumgebenen Körpers kann sich während der Plastidendifferenzierung in der Struktur verändern (vgl. PLATT-ALOIA & THOMSON 1977). In *Nicotiana tabacum* folgt während der Entwicklung zu Chloroplasten auf ein homogenes ein granuläres Stadium, darauf in fast ausdifferenzierten Chloroplasten ein fibrilläres Netzwerk (STETLER & LAETSCH 1969). Der Inhalt der erweiterten Thylakoide in den Plastiden der Schließzellen von *R. bulbosus* verändert sich gleich dem des membranumgebenen Körpers; einer granulären folgt eine fädig aufgelockerte Struktur. Neben den schon erwähnten Membranverbindungen scheint dies ein weiterer Hinweis dafür zu sein, daß der membranumgebene Körper ein Teil des Thylakoidsystems sein könnte.

Pepsin, nicht jedoch Pronase, baut den Inhalt des membranumgebenen Körpers von *Nicotiana* weitgehend ab und weist auf Eiweiß als Hauptbestandteil hin (AMES & PIVORUN 1974). Enzymaktivitäten von Peroxidase und Polyphenoloxidase stützen diese Annahme (HENRY 1975 a, b). Die membranumgebenen Einschlüsse in den Plastiden der Milchröhren von *Papaver somniferum* wurden bei der Behandlung mit Pepsin, Trypsin oder α-Chymotrypsin nicht abgebaut (NESSLER & MAHLBERG 1979); als Inhaltsstoff der Körper wird Lipoprotein vermutet. Auch bei *R. bulbosus* wurde mit Pepsin oder Pronase kein Erfolg erzielt, obwohl die proteolytische Aktivität beider Enzyme an den stabförmigen Einschlüssen in denselben Epidermisplastiden wirksam war. Anders als AMES & PIVORUN 1974, und NESSLER & MAHLBERG 1979, die den enzymatischen Abbau am Block nach der Glutardialdehydfixierung vorgenommen haben, wurden bei *R. bulbosus* die beiden Proteasen nach der Fixation mit OsO_4 und der Einbettung am Ultradünnschnitt

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

angewendet. Jeder Fixierungsschritt bringt eine Konformationsänderung am Molekül mit sich, am Ultradünnschnitt ist oft eine gesteigerte proteolytische Aktivität zu erwarten (GEIER 1977).

Das unterschiedliche Verhalten der membranumgebenden Körper bei der Behandlung mit proteolytischen Enzymen läßt die Annahme zu, daß der Inhalt des Körpers in *R. bulbosus* anderer Natur sein könnte als jener von *Nicotiana,* schließt aber das Vorhandensein einer Eiweißkomponente im Inhalt nicht aus.

Während der Differenzierung aller Plastiden von *R. bulbosus* treten Einstülpungen der inneren Plastidenmembran und randständige Vesikel auf. Vesikel sind auch mit dem membranumgebenen Körper in den Leukoplasten der Wurzel verbunden, ihr Inhalt jedoch von dem des Körpers verschieden. Nach NEWCOMB 1967 könnten Tubuli und Zisternen eine Passagemöglichkeit für extern gebildetes Protein darstellen. In den Plastiden der Epidermis von *Vicia faba* könnten Vesikel beim Transport von Metaboliten eine Rolle spielen (PALLAS & MOLLENHAUER 1972).

In den Plastiden der Epidermis treten die Intrusionen der inneren Plastidenmembran nur vorübergehend in großer Zahl auf. Verbindungen mit dem membranumgebenen Körper konnten hier nicht eindeutig festgestellt werden, wohl aber liegen Vesikel dem stabförmigen Einschluß eng an. Dieser ist während der Zelldifferenzierung Bestandteil aller Epidermis- und Schließzellenplastiden. Er wird nach dem membranumgebenen Körper gebildet und ist aus Filamenten zusammengesetzt. In den Epidermiszellen bleibt dieser Einschluß — soweit die Entwicklung verfolgt wurde — erhalten.

Der Abbau mit Pepsin oder Pronase weist auf die Eiweißnatur des Einschlusses hin, bestätigt den lichtmikroskopisch erbrachten Befund von KNOBLAUCH-REITER 1963 und rechtfertigt es, diese Plastiden als Proteinoplasten zu bezeichnen (MOLISCH 1901).

Während des Streckungswachstums der Epidermiszellen vergrößert sich der Einschluß und erreicht dabei seine endgültige Ausdehnung. Nur während dieser Differenzierungsphase liegen dem dichtgepackten Einschluß zahlreiche Filamente locker, fallweise regelmäßig geordnet, an. Ein regelmäßiges Muster kann also schon knapp vor der Eingliederung der Filamente in den kristallartigen Einschluß auftreten, die Filamente werden als Protomeren des Einschlusses aufgefaßt. Um die dichtere Packung im Einschluß zu verstehen, wird angenommen, daß während der Aggregation eine Konformationsänderung am Filament stattfindet. Dabei könnte gebundenes Wasser abgegeben und dadurch die Tertiärstruktur der Filamente verändert werden (vgl. SITTE 1973).

Ähnliche langgestreckte, im Plastidenstroma liegende Einschlüsse fanden HOEFERT & ESAU 1975 in den Plastiden der Blattepidermis von *Beta*

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

vulgaris, nicht jedoch in den Chloroplasten der Schließzellen. Auch in den Chloroplasten der ausdifferenzierten Schließzellen von *R. bulbosus* fehlt der stabförmige Einschluß. Während der Entwicklung dieser Plastiden ist er jedoch vorhanden. Anscheinend handelt es sich um Reserveeiweiß, das vorübergehend in Form von Filamenten deponiert worden ist. STETLER & LAETSCH 1969 beobachten beim Ergrünen von Chloroplasten bei *Nicotiana* das vorübergehende Auftreten langgestreckter Fibrillen. In Etioplasten des Weizens werden beim Ergrünen schon vorhandene Proteine für die Entwicklung der ersten Lamellen mobilisiert (REMY 1973), aus den Etioplasten der Gerste werden schon vor der Lamellenbildung Substanzen der Elektronentransportkette isoliert (PLESNIČAR & BENDALL 1973). „The biosynthesis of these components is therefore not under the same control as that of the photosystem" (BENDALL 1977).

DEKOCK *et al.* 1971 fanden in den Chloroplasten „only in cells at the extreme tip of the leaf adjacent to the hydathode apertures" von *Ranunculus reptans* „crystallites" und „pyrenoid-like bodies". Diese sind zweifellos membranumgebene Körper, jene entsprechen den rautenförmigen Einschlüssen, wie sie bei *R. bulbosus* z. B. in den Schließzellen vorkommen. Über ihre Funktion ist bis jetzt nichts bekannt, der Abbauversuch mit Pepsin oder Pronase mißlingt. Auch die anderen Plastiden, in denen rautenförmige Einschlüsse angetroffen werden, kommen in spezialisierten Geweben wie Wurzelhaube, Exodermis und Gefäßbündelscheide vor.

Mit Ausnahme der rautenförmigen Einschlüsse in den Chloroplasten der Gefäßbündelscheide treten alle drei in *R. bulbosus* gefundenen Einschlüsse nur in solchen Plastiden auf, in denen entweder kein Lamellensystem entwickelt wird, wie etwa in den Wurzeln, oder in denen dieses im Vergleich zu den Chloroplasten des Mesophylls reduziert erscheint. Im Gegensatz dazu werden in den Chloroplasten des Rinden-, Schwamm- und Palisadenparenchyms auch während der Entwicklung keine Einschlüsse gefunden.

Schrifttum

AMES I. H. & PIVORUN J. P. 1974. A cytochemical investigation of a chloroplast inclusion. — Amer. J. Bot. 61: 794—797.

BEHNKE H.-D. 1971. Sieve-tube plastids of *Magnoliidae* and *Ranunculidae* in relation to systematics. — Taxon 20: 723—730.

BENDALL D. S. 1977. Development of photosynthetic electron transport in greening barley. — In: BRADBEER J. W., Etioplasts; Biochem. Soc. Trans. 5: 84—88.

BLACKWELL S. J., LAETSCH W. M. & HYDE B. B. 1969. Development of chloroplast fine structure in aspen tissue culture. — Amer. J. Bot. 56: 457—463.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

BOASSON R., LAETSCH W. M. & PRICE I. 1972. The etioplast-chloroplast transformation in tobacco: Correlation of ultrastructure, replication, and chlorophyll synthesis. — Amer. J. Bot. 59: 217—223.

CASADORO G., RASCIO N. & PAGANELLI CAPPELLETTI E. M. 1977. Membrane-bound plastidial inclusions in belladonna (*Atropa belladonna* L.). — Biol. Cellulaire 29: 61—66.

CRAN D. G. & POSSINGHAM J. V. 1974. Plastid thylakoid formation. — Ann. Bot. 38: 843—847.

DEKOCK P. C., RUTHERFORD M. & BIRSE E. M. 1971. The leaf tip of *Ranunculus reptans* L. — Ann. Bot. 35: 1191—1195.

FLEMION F., DENGLER R. E., DENGLER N. G. & STEWART K. D. 1967: Ultrastructure of the shoot apices and leaves of normal and physiologically dwarfed peach seedlings. I. Plastid development. — Contr. Boyce Thompson Inst. Plant Res. 23: 331—334.

GEYER G. 1977: Elektronenmikroskopische Histochemie. 1, p. 163. In: Handbuch der Histochemie (GRAUMANN W. & NEUMANN K. Hrsg.) 1, 3. — Gustav Fischer Verlag, Stuttgart—New York.

GIESE H. 1971. Strukturanalyse biologischer Totalpräparate mit Hilfe lytischer Enzyme. — In: SCHIMMEL G. & VOGELL W., Methodensammlung der Elektronenmikroskopie, 3.2.1.4. — Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH Stuttgart.

GIFFORD E. M. jr. & STEWART K. D. 1968. Inclusions of the proplastids and vacuoles in the shoot apices of *Bryophyllum* and *Kalanchoë*. — Amer. J. Bot. 55: 269—279.

HENRY E. W. 1975 a. Peroxidases in tobacco abscission zone tissue. III. — J. Ultrastruct. Res. 52: 289—299.

— 1975 b. Polyphenol oxidase activity in thylakoids and membrane-bound granular components of *Nicotiana tabacum* chloroplasts. — J. Microscopie Biol. Cell. 22: 109—116.

HOEFERT L. L. & ESAU K. 1975. Plastid inclusions in epidermal cells of *Beta*. — Amer. J. Bot. 62: 36—40.

KNOBLAUCH-REITER L. 1963. Eiweißeinschlüsse in Plastiden von Ranunculaceen. — Phyton 10: 157—160.

MARTIN E. S. & LARBALESTIER G. 1977. A membrane-bound plastid inclusion in the epidermis of leaves of *Taraxacum officinale*. — Can. J. Bot. 55: 222—225.

MITTELHEUSER C. J. & VAN STEVENINCK R. F. M. 1975. Starch associated particles in D-glucosamine-treated leaf tissue. — Protoplasma 85: 261—270.

MOLISCH H. 1901. Studien über den Milchsaft und Schleimsaft der Pflanzen. — Gustav Fischer Verlag, Jena.

MONNERON A. & BERNHARD W. 1966. Action de certaines enzymes sur des tissus inclus en Epon. — J. Microscopie 5: 697—714.

NESSLER C. L. & MAHLBERG P. G. 1979. Plastids in laticifers of *Papaver*. I. Development and cytochemistry of laticifer plastids in *P. somniferum* L. (*Papaveraceae*). — Amer. J. Bot. 66: 266—273.

NEWCOMB E. H. 1967. Fine structure of protein-storing plastids in bean root tips. — J. Cell. Biol. 33: 143—163.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

PALLAS J. E. & MOLLENHAUER H. H. 1972. Physiological implications of *Vicia faba* and *Nicotiana tabacum* guard-cell ultrastructure. — Amer. J. Bot. 59: 504—514.

PLATT-ALOIA K. A. & THOMSON W. W. 1977. Chloroplast development in young sesame plants. — New Phytol. 78: 599—605.

— — 1979. Membrane bound inclusions in epidermal plastids of developing sesame leaves and cotyledons. — New Phytol. 83: 793—799.

PLESNIČAR M. & BENDALL D. S. 1973. The photochemical activities and electron carriers of developing barley leaves. — Biochem. J. 136: 803—812.

REMY R. 1973. Pre-existence of chloroplast lamellar proteins in wheat etioplasts. Functional and protein changes during greening under continuous or intermittent light. — FEBS Letters 31: 308—312.

ROSINSKI J. & ROSEN W. G. 1972. Chloroplast development: Fine structure and chlorophyll synthesis. — Quart. Rev. Biol. 47: 160—191.

SCHIMPER A. F. W. 1885. Untersuchungen über die Chlorophyllkörper und die ihnen homologen Gebilde. — Jb. wiss. Bot. 16: 1—247.

SITTE P. 1973. Molekulare Morphologie der Zelle. — In: HIRSCH G. C., RUSKA H. & SITTE P., Grundlagen der Cytologie, 81—116. — VEB Gustav Fischer Verlag Jena.

SRIVASTAVA L. M. 1966. On the fine structure of the cambium of *Fraxinus americana* L. — J. Cell. Biol. 31: 79—93.

— & PAULSON R. E. 1968. The fine structure of the embryo of *Lactuca sativa*. II. Changes during germination. — Can. J. Bot. 46: 1447—1453.

STETLER D. A. & LAETSCH W. M. 1969. Chloroplast development in *Nicotiana tabacum* „Maryland Mammoth". — Amer. J. Bot. 56: 260—270.

TAKEBE I., OTSUKI Y., HONDA Y., NISHIO T. & MATSUI C. 1973. Fine structure of isolated mesophyll protoplasts of tobacco. — Planta 113: 21—27.

THOMSON W. W. & WHATLEY J. M. 1980. Development of nongreen plastids. — Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 375—394.

Tafel I

Abb. 1. Knospenstiel; Ausschnitt aus einer Epidermiszelle, vier Proteinoplasten mit teils quer-, teils längsgetroffenen stabförmigen Einschlüssen (K), membraunumgebenen Körpern (M), Stärke und Plastglobuli; Maßstrecke 1 μm

Abb. 2. Blütenstiel, Epidermis; Ausschnitt aus einem quergetroffenen, stabförmigen Einschluß; Maßstrecke 200 nm

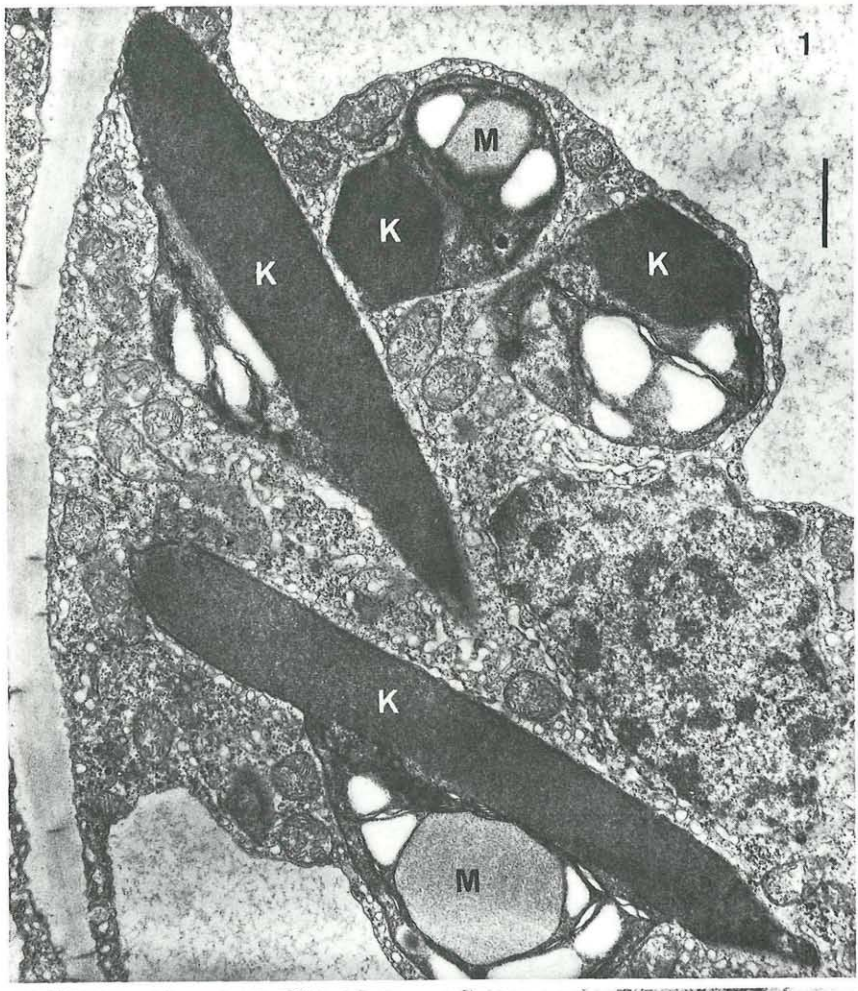
Tafel II

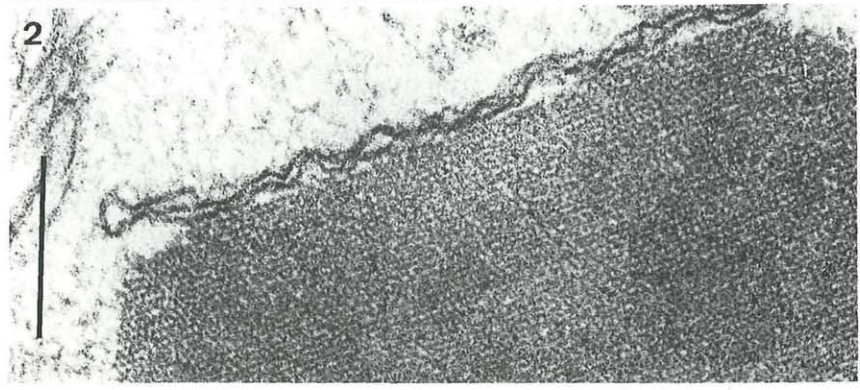
Abb. 3. Etwa 1 mm langes Blatt nahe der Sproßspitze; Ausschnitt aus einer Epidermiszelle, zwei Proplastiden mit je einem von Stärke umgebenen membranumgebenen Körper (Pfeile); Maßstrecke 1 μm

Abb. 4. Junges Blatt, Epidermis; Plastide mit einem membranumgebenen Körper (M) und anliegendem Thylakoid (Pfeil), frei im Stroma liegen teils gerade, teils gekrümmte Filamente (K); Maßstrecke 1 μm

Abb. 4 a. Ausschnitt von Abb. 4; gerade und gebogene Filamente; Maßstrecke 0,5 μm

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

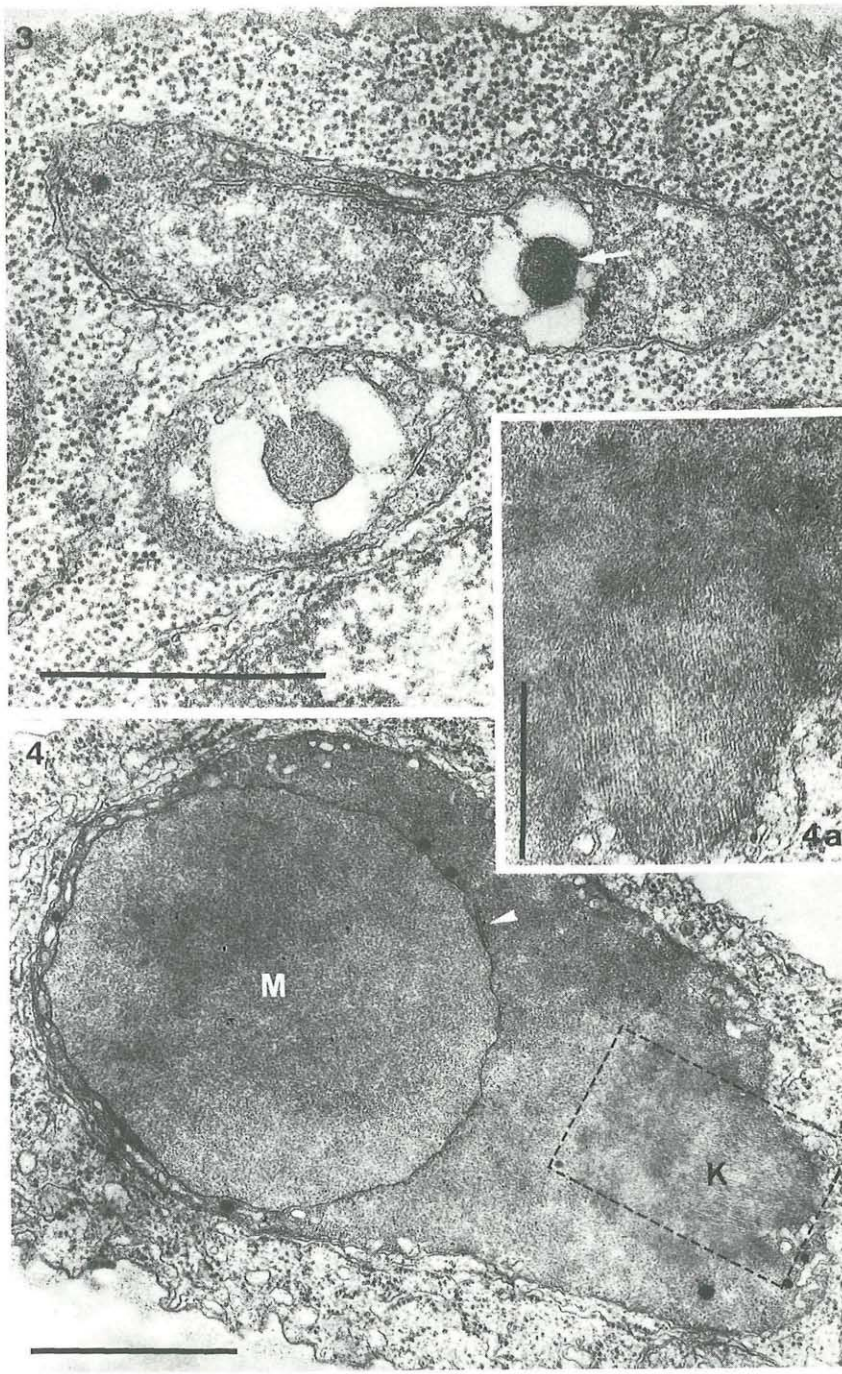




Tafel I

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

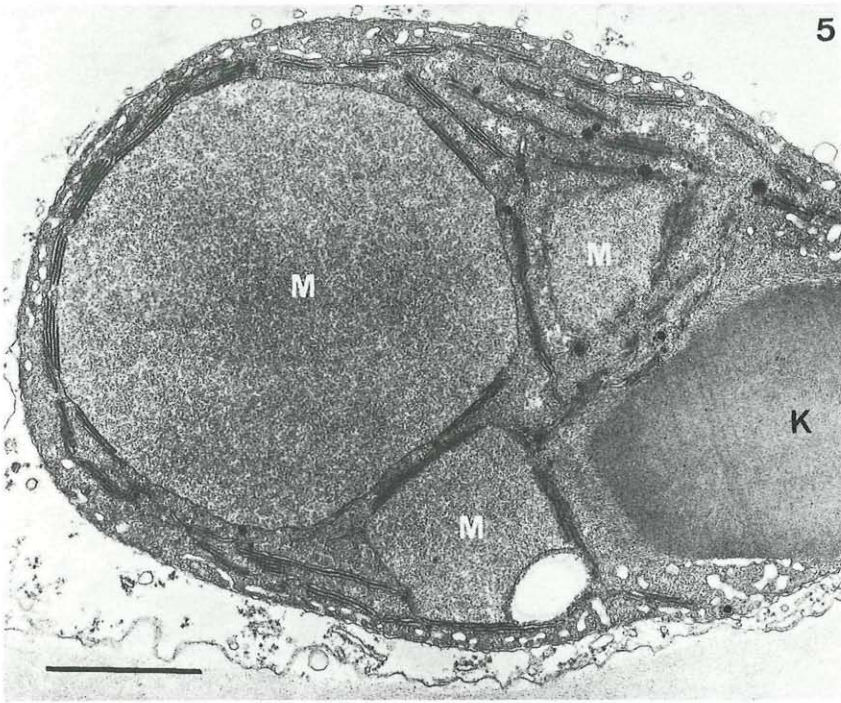
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

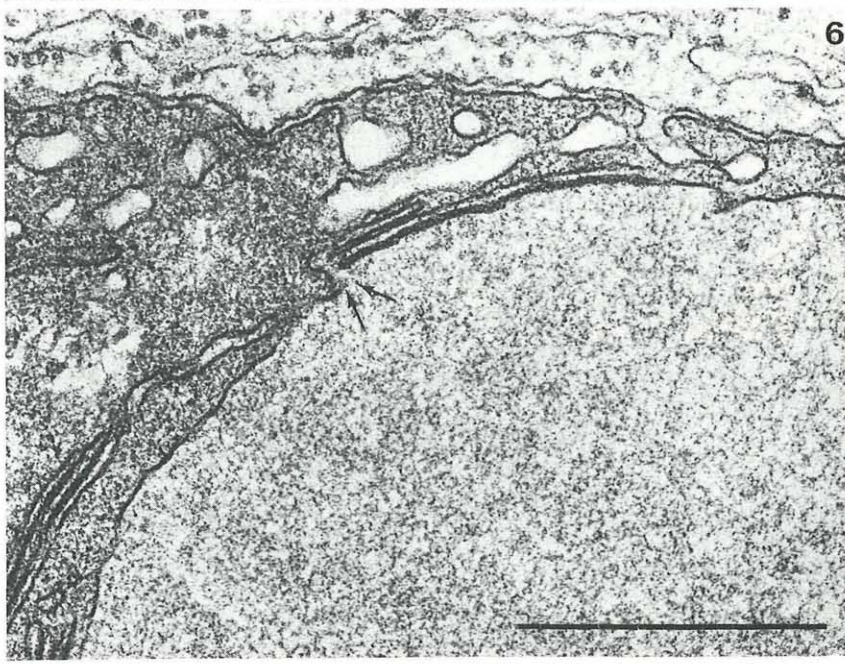


Tafel II

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

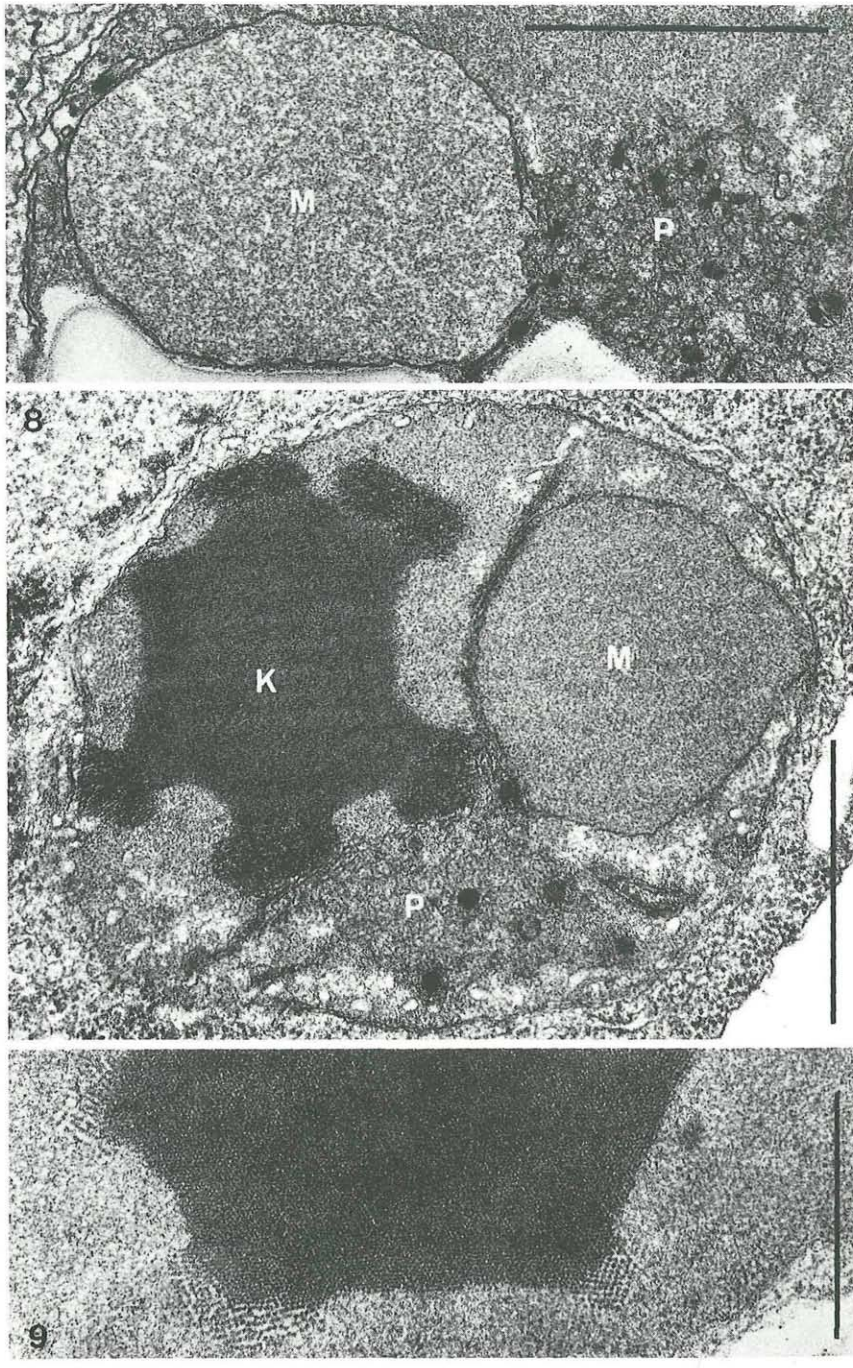




Tafel III

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

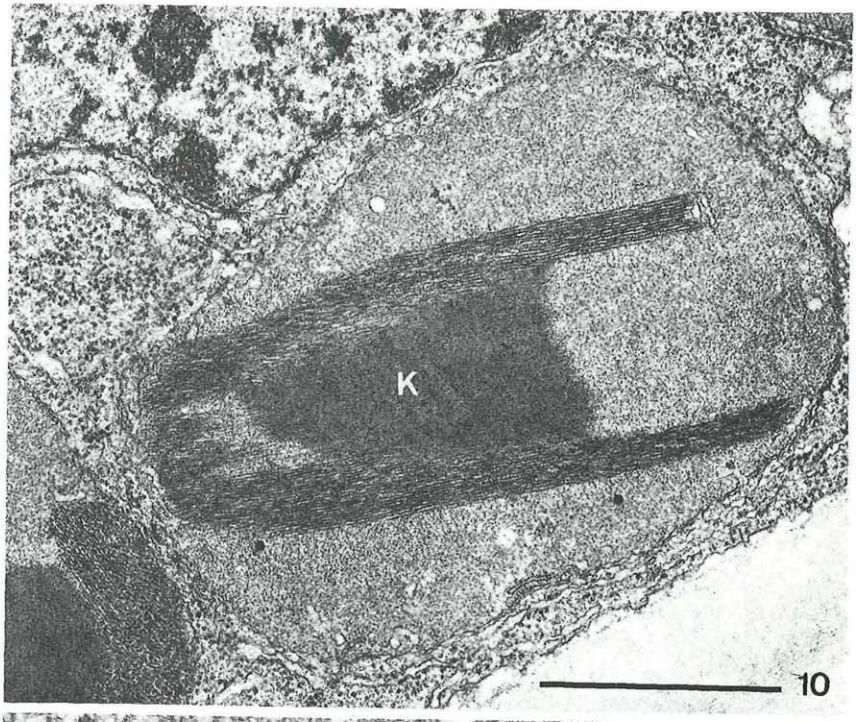
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

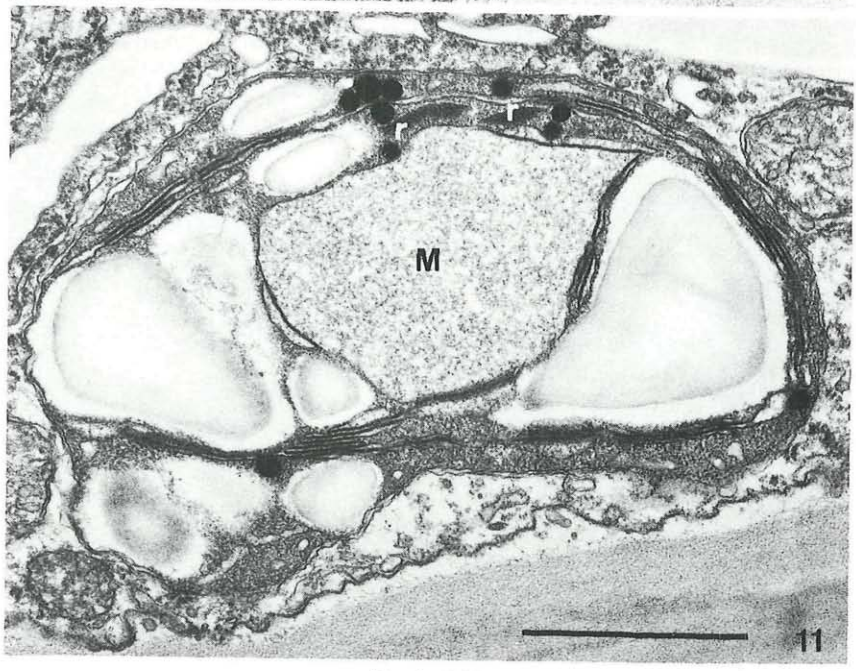


Tafel IV

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

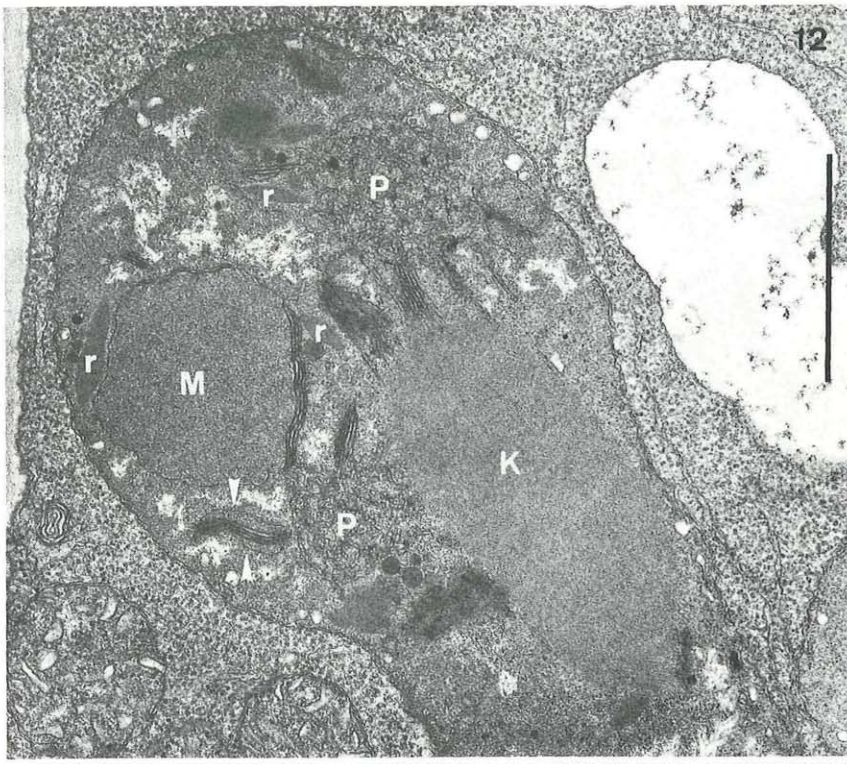


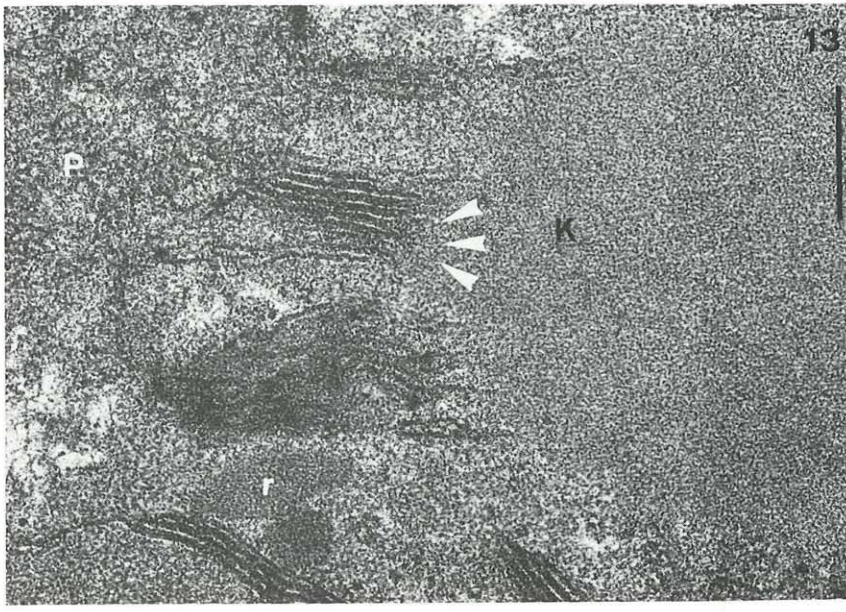


Tafel V

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

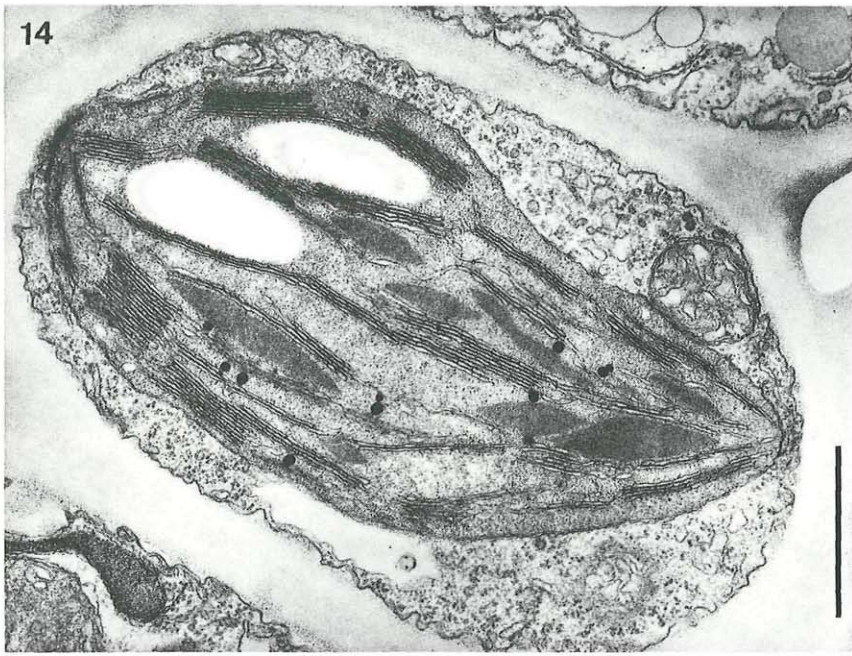


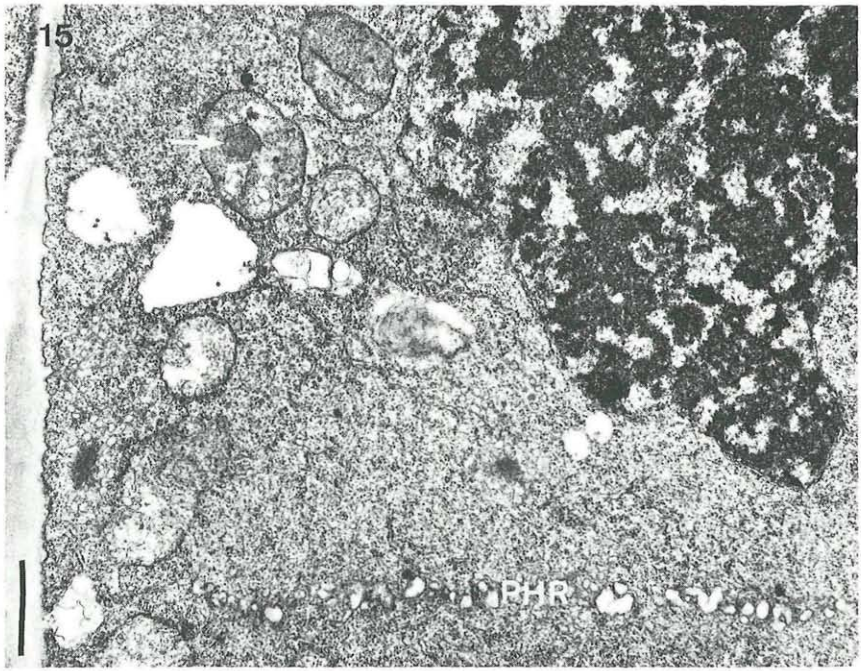


Tafel VI

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

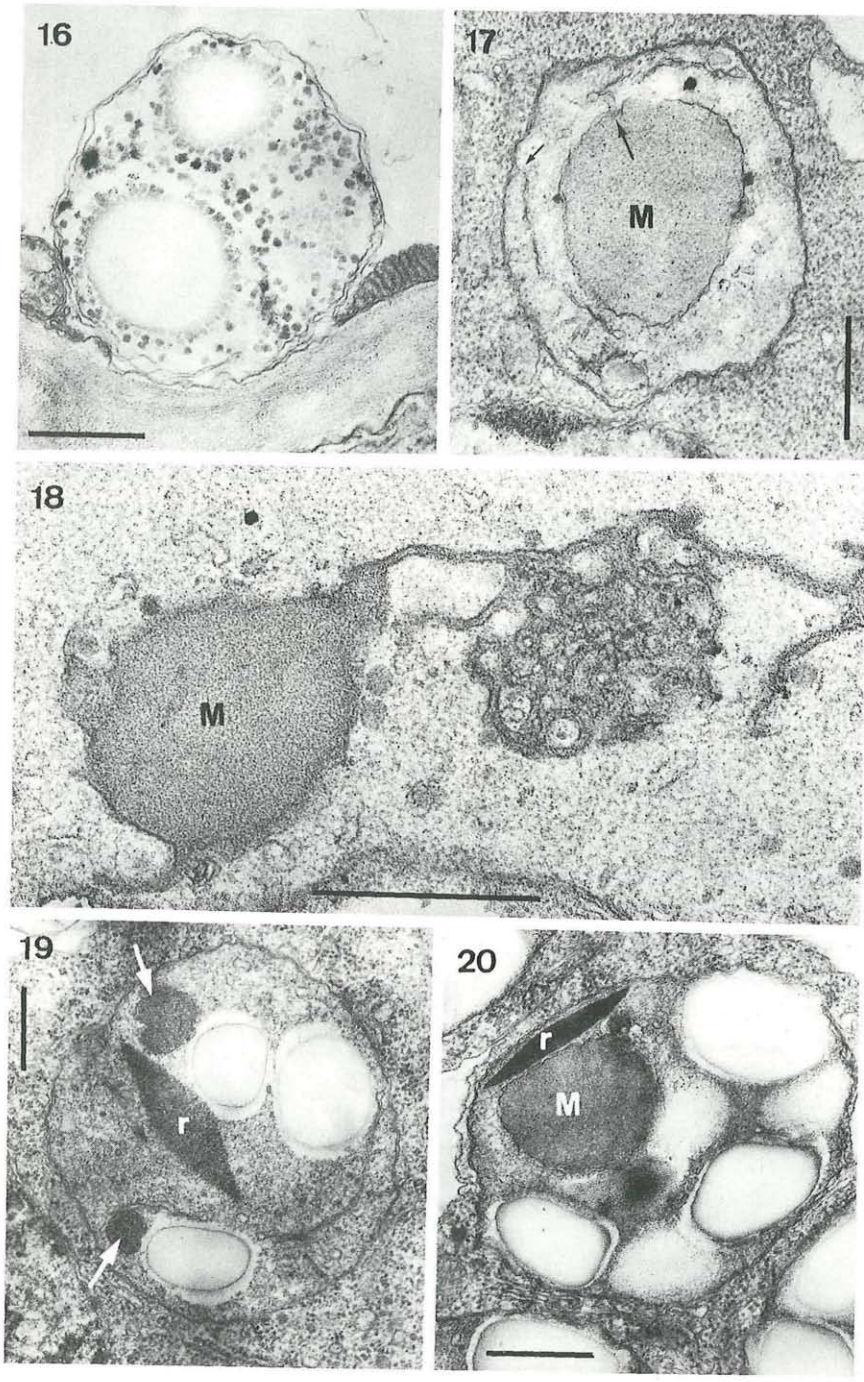




Tafel VII

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

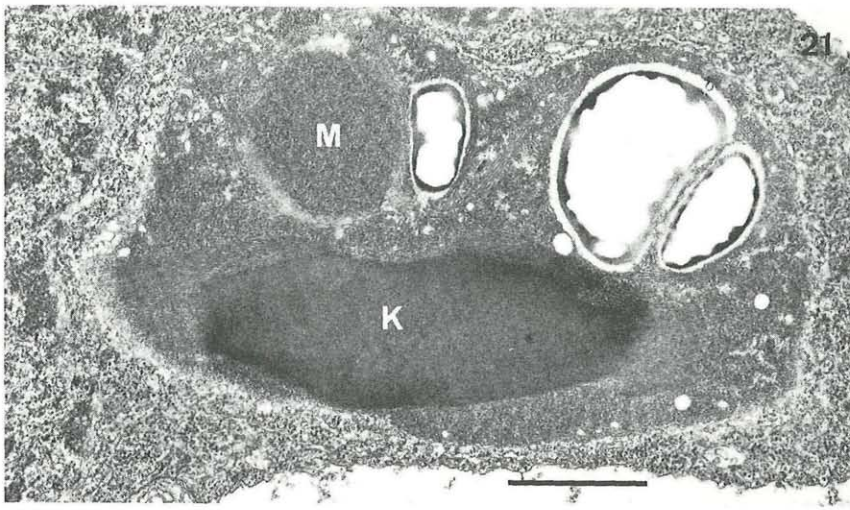
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

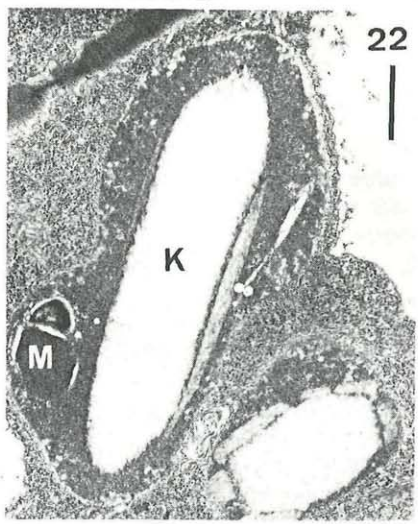


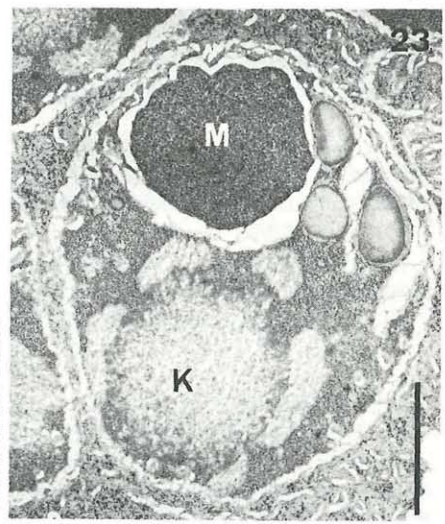
Tafel VIII

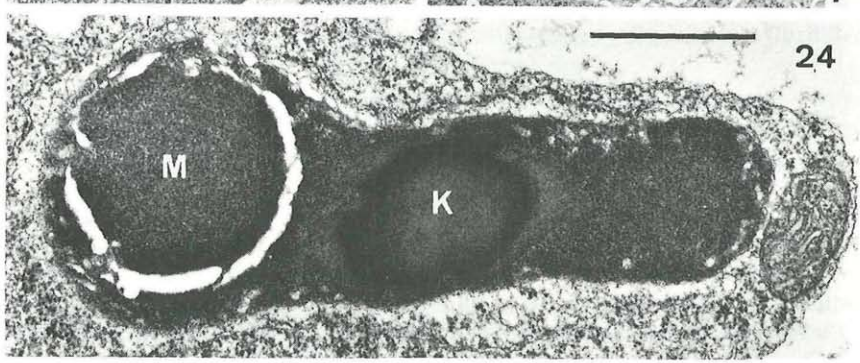
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at









Tafel IX

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Tafel III

Abb. 5. Blatt, Epidermis; Proteinoplasten mit drei membranumgebenen Körpern (M), Thylakoidstapeln, zahlreichen Einstülpungen der inneren Plastidenmembran, randständigen Vesikeln und einem stabförmigen Einschluß (K); Maßstrecke 1 μm

Abb. 6. Blattstiel, Epidermis; Ausschnitt aus einem Proteinoplasten mit Einstülpungen der inneren Plastidenmembran, randständigen Vesikeln und Teil eines membranumgebenen Körpers mit Membraneinfaltungen (Pfeile); Maßstrecke 0,5 μm

Tafel IV

Abb. 7. Blattstiel, Epidermis; Teil eines Proteinoplasten mit einem membranumgebenen Körper (M) in Verbindung mit einem Prolamellarkörper (P); Maßstrecke 1 μm

Abb. 8. Blattstiel, Epidermis; Proteinoplast mit einem membranumgebenen Körper (M), einem Prolamellarkörper (P) und einem quergetroffenen stabförmigen Einschluß (K) mit den Ecken vorgelagerten Filamenten; Maßstrecke 1 μm

Abb. 9. Blütenstiel, Epidermis; Teil eines stabförmigen Einschlusses mit den Ecken vorgelagerten quergetroffenen Filamenten; Maßstrecke 0,5 μm

Tafel V

Abb. 10. Blattstiel, Epidermis; Proteinoplast mit längsgetroffenem stabförmigem Einschluß (K), dem an den Rändern Filamente angelagert sind; Maßstrecke 1 μm

Abb. 11. Blatt; Chloroplast einer Schließzelle mit einem membranumgebenen Körper (M), angrenzenden, aufgetriebenen Thylakoiden, Stärke, Plastoglobuli und zwei rautenförmigen Einschlüssen (r); Maßstrecke 1 μm

Tafel VI

Abb. 12. Blatt, junge Schließzelle; Ausschnitt aus einem Chloroplasten (Proteinoplasten) mit zahlreichen rautenförmigen Einschlüssen (r), zwei Prolamellarkörpern (P), einem stabförmigen Einschluß (K), einem membranumgebenen Körper (M), einem Thylakoidstapel mit aufgetriebenen randständigen Thylakoiden (Pfeile), die ähnliches Material als der membranumgebende Körper enthalten; zahlreiche elektronenhelle Bezirke mit fibrillärem Inhalt; Maßstrecke 1 μm

Abb. 13. Ausschnitt von Abb. 12. Thylakoide mit dem Prolamellarkörper (P) in Verbindung mit dem stabförmigen Einschluß (K) in engem Kontakt (Pfeile); rautenförmiger Einschluß (r); Maßstrecke 200 nm

Tafel VII

Abb. 14. Blatt, Gefäßbündelscheidenzelle; Chloroplast mit Stärke, Plastoglobuli und rautenförmigen Einschlüssen im Stroma; Maßstrecke 1 μm

Abb. 15. Wurzelspitze; Ausschnitt aus einer meristematischen Zelle mit Zellkern, Mitochondrien und Proplastiden; membranumgebener Körper (Pfeil), Phragmoblast (PHR); Maßstrecke 1 μm

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Tafel VIII

Abb. 16. Blatt, Gefäßbündel; Teil einer Siebröhre mit einer Siebröhrenplastide und ER; Maßstrecke 0,5 μm

Abb. 17. Wurzelspitze; Ausschnitt aus einer sich differenzierenden Zelle, Leukoplast; Lamellen mit der inneren Plastidenmembran (kleiner Pfeil) oder dem membranumgebenen Körper (großer Pfeil) in Verbindung; Maßstrecke 0,5 μm

Abb. 18. Wurzelrinde; Ausschnitt aus einem Leukoplasten, der membranumgebene Körper (M) steht mit einem tubulären System in Verbindung; Maßstrecke 0,5 μm

Abb. 19. Wurzel; Leukoplast aus einer Exodermiszelle mit zwei membranumgebenen Körpern (Pfeile) und einem rautenförmigen Einschluß (r), wenigen Lamellen und Stärke; Maßstrecke 0,5 μm

Abb. 20. Wurzelhaube; Amyloplast mit membranumgebenem Körper (M) und rautenförmigem Einschluß (r); Maßstrecke 0,5 μm

Tafel IX

Abb. 21. und 22. Blattstiel, Epidermis; proteolytischer Abbau mit Pepsin

Abb. 21. Kontrolle; Inkubationsgemisch ohne Enzym. Inkubationsdauer: 200 Minuten; der stabförmige Einschluß (K) und der membranumgebene Körper (M) werden nicht aufgelöst, unspezifische Auflösung von Stärke und Plastoglobuli; Maßstrecke 1 μm

Abb. 22. Inkubationsgemisch mit Pepsin, Inkubationsdauer 160 Minuten; der stabförmige Einschluß (K) und die ihm anliegenden Filamente sind fast vollständig abgebaut, der membranumgebene Körper (M) bleibt erhalten; unspezifische Auflösung der Plastoglobuli; Maßstrecke 1 μm

Abb. 23. und 24. Blattstiel, Epidermis; proteolytischer Abbau mit Pronase

Abb. 23. Inkubationsgemisch mit Pronase, Inkubationsdauer 150 Minuten; unvollständiger Abbau des stabförmigen Einschlusses (K) und der anliegenden Filamente, Abbau der Plastidenhülle und der Lamellen, der membranumgebene Körper (M) bleibt erhalten; unspezifische Auflösung der den membranumgebenen Körper begrenzenden Membran; Maßstrecke 1 μm

Abb. 24. Kontrolle, Inkubationsgemisch ohne Pronase, Inkubationsdauer 240 Minuten; der stabförmige Einschluß (K) und der membranumgebene Körper (M) werden nicht aufgelöst, unspezifisch löst sich die Membran des membranumgebenen Körpers; Maßstrecke 1 μm

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1983

Band/Volume: 23_2

Autor(en)/Author(s): Gailhofer Manfred Karl

Artikel/Article: Die Feinstruktur von Plastideneinschlüssen von Ranunculus bulbosus. 197-210