

# Entwicklung und Struktur der Proplastiden

Von KURT MÜHLETHALER, Ph.D., und ALBERT FREY-WYSSLING, Ph.D.

(Aus dem Institut für Allgemeine Botanik, Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, Schweiz)

ABBILDUNGEN 243 BIS 246

(Eingegangen am 22. Juli, 1959)

## ABSTRACT

In this study the proplastid development in embryonic cells is described for the apical meristem of *Elodea canadensis*, embryo sacs from *Lilies*, and *Begonia* leaf buds. The formation of these cell organelles originates with submicroscopical particles which consist of a homogeneous stroma with a surrounding double membrane. When these proplastids reach an average size of  $1 \mu$ , the inner layer of the membrane begins to invaginate into the stroma. This process is comparable to tubuli formation in mitochondria.

Under growth conditions with sufficient exposure to light, the development of the grana and stroma lamellae proceeds without interruption. If the plants are kept in the dark, small vesicles are formed which accumulate in the prolamellar body of the proplastids. After illumination these elementary vesicles merge to form membranes which evolve into grana and stroma lamellae. The structural similarity of the early proplastid stages with the mitochondria seems to indicate that there exists some phylogenetic relationship between the two cell organelles.

## EINLEITUNG

Ueber die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten sind in den letzten Jahren vor allem von Strugger (1-4) und seinen Mitarbeitern Grave (5), Kaja (6), Böing (7), und Perner (8) zahlreiche licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen veröffentlicht worden. Sie haben gezeigt, dass die Plastiden in den höheren Pflanzen einen komplizierten Entwicklungsprozess durchmachen. Die Differenzierung geht nach diesen Autoren von Plastiden aus, die nur aus einem amoeboiden Stroma und einem sogenannten Primärgranum bestehen (1). Dieses Initial-Granum soll von früheren Plastiden übernommen worden sein und sich während der Plastidenentwicklung durch identische Reduplikation vermehren. Die Existenz eines solchen persistierenden Bauelementes ist jedoch von Heitz und Maly (9), Düvel (10), Eymé (11), Buvat (12) und von Wettstein (29) bestritten worden. Im Gegensatz zu Strugger sind diese Autoren der Ansicht, dass die Granen erst während der Plastidenentwicklung im Stroma entstehen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Heitz (13), Leyon (14), Perner (8), Mühlethaler

(15) und von Wettstein (29) haben ergeben, dass die im Lichtmikroskop als "Primärgranen" bezeichneten Strukturen keine morphologische Ähnlichkeit mit den in ausgewachsenen Chloroplasten vorhandenen Granen aufweisen. Sie bestehen aus zahlreichen, ca. 190 Å bis 450 Å grossen Elementarpartikeln, die in einigen Pflanzen (z.B. bei *Chlorophytum*) zu kristallgitterartigen Körpern geordnet sind. Da sie als Bildungszentren für die sich später entwickelnden Granen- und Stromalamellen anzusehen sind, haben Hodge, McLean und Mercer (16) dafür die Bezeichnung "prolamellar body" (Prolamellarkörper) vorgeschlagen. Von Dangeard (17) ist auch der Ausdruck "Centroplast" verwendet worden. Im folgenden werden wir für dieses Bauelement den Terminus Prolamellarkörper anwenden.

Umstritten ist aber nicht nur der Entwicklungsprozess der internen Plastidenstruktur, sondern auch die Frage der Plastiden-Genese. Nach den klassischen Untersuchungen von Schimper (18) sollen diese Zellorganelle nie de novo entstehen, sondern nur durch Teilung an die nächste Generation weiter gegeben werden. Diese Schimper'sche

Kontinuitätstheorie ist in letzter Zeit von Strugger (2) aufgegriffen und auf andern Zellpartikeln, wie z.B. Mitochondrien und Sphärosomen, ausgedehnt worden. Die für die Photosynthese und die Stärkebildung massgebende Partikelpopulation wurden schon früher unter dem Sammelbegriff "Plastidom" zusammengefasst und als unabhängiges Organellsystem dem "Chondriom" gegenübergestellt. Dabei erhob sich die Streitfrage, ob die Plastiden ein selbständiges Reduplikationsystem darstellen oder ob sie während ihrer ontogenetischen-oder phylogenetischen Entwicklung aus den Mitochondrien entstanden seien. Auf Grund der bisherigen lichtmikroskopischen Befunde war, wegen der Kleinheit der Objekte, ein Entscheid nicht leicht möglich (19). Dieses Problem kann indessen, wie Arnon, Whatley und Allen (20) kürzlich erwähnten, auch biochemisch angegangen werden. Sie fanden, dass nicht nur die Mitochondrien, sondern auch die Plastiden die Fähigkeit besitzen ATP aufzubauen. Ein Unterschied besteht darin, dass in den Plastiden eine photosynthetische,—in den Mitochondrien aber eine oxydative Phosphorylierung erfolgt. Die von molekularem Sauerstoff völlig unabhängige photosynthetische Phosphorylierung in den Plastiden lässt vermuten, dass diese Art ATP-Synthese vielleicht die primäre war. In den frühesten Entwicklungsstufen des Pflanzenreiches, als die Atmosphäre noch keinen Sauerstoff enthielt, dienten daher die Plastidenpigmente möglicherweise in erster Linie der Synthese energiereicher P-Verbindungen. Ihre heutige Funktion, nämlich die CO<sub>2</sub>-Assimilation, wäre dann erst zu einem späteren Zeitpunkt erworben worden (20). Da die Mitochondrien für die Phosphorylierung auf den bei der Photosynthese frei werdenden Sauerstoff angewiesen sind, wurde die Vermutung geäussert, sie als Abkömmlinge der Plastiden zu deuten. Eine strukturelle Aehnlichkeit dieser beiden Zellkomponenten während ihrer ontogenetischen Entwicklung würde diese Hypothese stützen.

#### Methoden

Die jüngsten Proplastiden-Stadien sind nur in embryonalen Zellen zu finden. Für unsere Untersuchungen verwendeten wir Embryosackanlagen verschiedener Liliaceen (*Lilium martagon*, *L. candidum*, und *Fritillaria imperialis*), Vegetationskegel von *Elodea canadensis* und Knospen von *Begonia*-Blattstecklingen.

Am günstigsten erwiesen sich die Vegetationskegel von *Elodea*, da man sie unter dem Präpariermikroskop leicht in einzelne Zonen unterteilen und so die Entwick-

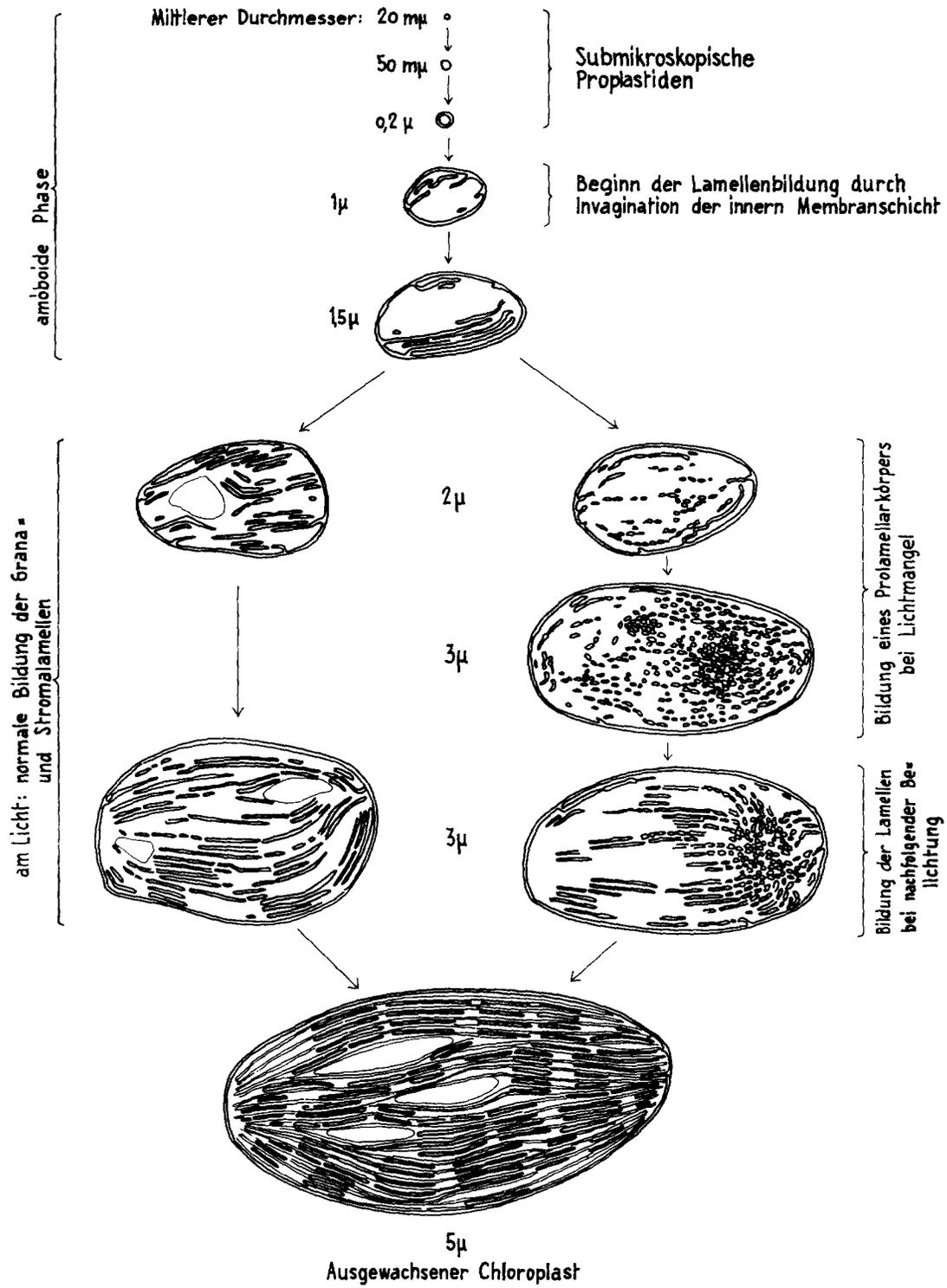
lung der Plastiden in aufeinanderfolgenden Schnittreihen, von der Spitze aus, verfolgen konnte. Wie Düvel (10) zeigte, enthalten die Proplastiden aus der dritten Blattanlage bereits Chlorophyll. In der fünften und sechsten Blattanlage durchlaufen sie eine Teilungsphase und in den darauf folgenden Zonen ist ihre Entwicklung bereits beendet.

Für sämtliche Objekte verwendeten wir als Fixierungsmittel entweder Osmiumsäure oder KMnO<sub>4</sub>. Die letzte, von Luft (21) angegebene Methode, ergab ausgezeichnete Resultate. Zur Kontrastierung wurden die Gewebe während der Entwässerung im 70 Prozent Aceton mit Uranylacetat und Phosphorwolframsäure (1 Prozent) behandelt. Als Einbettungsmittel gebrauchten wir Araldit.

#### ERGEBNISSE

In sämtlichen von uns untersuchten Pflanzen, beginnt die Entwicklung der Plastiden—Innenstruktur durch Einwachsen der inneren Membranschicht. Sie erfolgt also gleich, wie bei den Mitochondrien, und aus diesem Grunde ist es sehr schwierig die beiden Zellorganelle auseinander zu halten. In den Mitochondrien wachsen diese "Tubuli" mehr oder weniger senkrecht zur Oberfläche in das Stroma hinein, während sie in den Plastiden nach der Einfaltung abbiegen und knapp unter der Oberfläche entlang ziehen (Fig. 2 bis 4). Im allgemeinen beginnt dieser Prozess, wenn die Proplastiden einen Durchmesser von 0,6 bis 2  $\mu$  aufweisen und setzt gleichzeitig an mehreren Stellen der Oberfläche ein. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt auch die Bildung der ersten Stärkekörner. Wie Fig. 2 zeigt, beginnt sich das vorher homogene Stroma an einzelnen Stellen aufzuhellen und kurze Zeit später erscheinen in diesen Bezirken Stärkekörner. Entweder ist ein einzelnes Stärkekorn zu beobachten, oder es sind mehrere Körner zu Aggregaten vereinigt. Da dieser Reservestoff nur im Plastiden-Stroma entstehen kann, besteht kein Zweifel über die Identität der untersuchten Zellorganelle mit Proplastiden. In den embryonalen Zellen sind die Proplastiden daher vornehmlich in den Dienst der Reservespeicherung gestellt, weshalb sie oft auch als Leukoplasten bezeichnet werden. Mit Strugger (2) sind wir aber der Ansicht, dass diese Speicherfunktion nur vorübergehender Natur ist und daher nicht als Richtlinie für die Nomenklatur gelten kann.

Ausser diesen, eben beschriebenen Proplastiden sind im Grundcytoplasma noch kleinere Zellpartikel sichtbar. Sie bestehen, wie Fig. 1 zeigt, lediglich aus homogenem Stroma mit einer doppelschichtigen Membran. Ihre Grösse ist sehr variabel und



TEXT-Fig. 1. Schema der Chloroplastenentwicklung.

schwankt zwischen 0,02 bis 0,5  $\mu$ . In den embryonalen Zellen, wo diese Partikel recht zahlreich sind, können alle Uebergangsgrößen bis zu den Plastiden und Mitochondrien auftreten. Auf Grund dieser Beobachtungen müssen wir annehmen, dass die im Lichtmikroskop erkennbaren Plasmapartikel aus submikroskopischen Anlagen entstehen. Da diese Frühstadien keinerlei Innenstruktur aufweisen, kann nicht entschieden werden, ob sie sich später zu Plastiden oder Mitochondrien entwickeln. Entsprechend ihrer späteren physiologischen Aufgabe dürften jedoch zwei, in ihrem chemischen Aufbau von Anfang an verschiedene Populationen, vorhanden sein.

In den Mitochondrien hört nach dem Einwachsen der "Cristae" die morphologische Entwicklung auf, während in den Plastiden dieses Stadium erst den Beginn der internen Differenzierung darstellt. Wie in der schematischen Zeichnung (Text-fig. 1) angedeutet ist, erfolgt die weitere Ausbildung in verschiedener Weise. Bei guter Belichtung werden die einwachsenden Doppelschichten kontinuierlich vermehrt (Fig. 4) und entwickeln sich zu Granen- und Stromalamellen. Wie bereits Hodge, McLean, und Mercer (16) zeigten, unterbleibt bei Lichtmangel die Schichtenbildung. Die einwachsenden Tubuli zerfallen in zahlreiche Bläschen von 20 bis 30  $\mu$  Durchmesser und ordnen sich zu einem sog. Prolamellarkörper zusammen.

In unserer Versuchsreihe wurden einige *Elodea*-Sprosse am Licht, andere im Dunkeln kultiviert. Die belichteten Pflanzen zeigten nie eine dem Prolamellarkörper entsprechende Innenstruktur, während die Proplastiden aus etiolierten Sprossen bereits nach 3 Tagen solche Körper enthielten. Nach einer Etiolierungsdauer von 23 Tagen ist, wie Fig. 5 zeigt, nahezu das ganze Stroma von Prolamellar-Bläschen erfüllt. Eine gitterartige Ordnung der 0,05  $\mu$  grossen Bläschen konnte bei *Elodea* nie beobachtet werden, während sie in den Proplastiden von *Chlorophytum* stets zu finden war (Fig. 7). Die Grösse und die Anordnung dieser "Elementar-einheiten" scheint in den Proplastiden der verschiedenen Pflanzen zu variieren.

Die Etiolierung verhindert offenbar die Synthese eines, für die Lamellenstruktur wichtigen Stoffes, während andere Substanzen, wie z.B. die Carotinoid-Pigmente, auch im Dunkeln weiter produziert werden. Die Kenntnisse, die wir über den chemischen Aufbau der Prolamellarkörper besitzen, sind noch ungenügend. Nach Spiekermann (22) und

nach Ruch (27) soll neben den Pigmenten (Carotinoide) auch Ribonukleinsäure darin vorkommen. Desoxy-ribonukleinsäure konnte Stäubli (28), im Gegensatz zu Spiekermann, in den Chloroplasten nicht finden. Vermutlich sind, trotz der Unlöslichkeit des Prolamellarkörpers in Fettlösungsmitteln, gewisse Lipoidmengen in ein unlösliches Substrat eingelagert. Durch die Etiolierung wird, wie De Deken-Grenson (23) veröffentlichte, die Synthese von Chloroplastenprotein unterbunden. Auf Grund dieses Befundes lässt sich vermuten, dass im unbelichteten Proplastid die Ausbildung der Lamellenstruktur unterdrückt wird, weil das Protein für die Trägerlamellen fehlt. Die Synthese beginnt erst wieder bei Belichtung. Während dem Ergrünen der Plastiden nimmt das Trockengewicht nach De Deken-Grenson (23) um 17 Prozent, der Proteingehalt aber um 47 Prozent zu. Andreeva und Plyshevskaya (24) stellten fest, dass nach Zugabe von  $(N^{15}H_4)_2SO_4$  der markierte Stickstoff in Pflanzen, die am Licht gehalten wurden, sowohl im Plasma-, wie im Plastiden-Protein zu finden war. In etiolierten Pflanzen lässt sich der radioaktive Stickstoff dagegen nur im Plasmaprotein nachweisen. Da somit im Dunkeln sowohl die Proteinsynthese als auch die Ausbildung der Lamellen in den Plastiden beeinträchtigt wird, scheint ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Vorgängen zu bestehen.

Wie in den Fig. 6 und 7 gezeigt wird, beginnen sich nach der Belichtung die Bläschen des Prolamellarkörpers zu strecken und sie verschmelzen zu Doppellamellen. Zuerst entwickeln sich die Granen (Fig. 7), die geldrollenartig übereinander liegen und erst wenn diese nahezu fertig ausgebildet sind (Fig. 9), wachsen dazwischen die Stromaschichten. Eine identische Reduplikation der Granalamellen konnten wir nirgends beobachten. Unsere Untersuchungen zeigen, dass sie entweder durch seitliches Einwachsen von der Plastidenmembran, oder aus dem Prolamellarkörper (Fig. 8) entstehen. Die dazwischenliegenden Stromaschichten unterscheiden sich von den Granen nur durch ihre grössere Flächenentwicklung. Wie ihr Flächenwachstum erfolgt, kann allerdings aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht ersehen werden. Die von Hodge, McLean und Mercer (16) vertretene Ansicht, dass sich die Grana erst nach der Ausbildung der Stromaschichten entwickeln, konnten wir in unseren Objekten nicht bestätigen.

Das Chlorophyll ist, wie die lichtmikroskopischen Beobachtungen zeigen, nur in den Granalamellen vorhanden.

Während der Entwicklung des Lamellensystems sind die Proplastiden normalerweise in lebhafter Teilung begriffen. Das Stroma und die bereits vorhandenen Grana- und Stromaschichten werden durch Einschnürung getrennt, worauf sich die beiden Tochterindividuen selbständig weiter entwickeln (Fig. 10).

#### DISKUSSION

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die innere Struktur der Proplastiden von der Belichtung abhängt. Es ist daher verständlich, dass die lichtmikroskopischen Befunde zu keinen übereinstimmenden Resultaten führten. In den Zellen, die wenig Licht erhalten, wie z.B. die innern Knospenblätter oder die zwischen ältern Blattbasen steckenden jungen Monokotylen-Blätter, werden die Proplastiden, wie Strugger (1) entdeckte einen Prolamellarkörper aufweisen. Dieser fehlt aber in den gut belichteten Pflanzenorganen, wie z.B. im *Elodea* Vegetationskegel (10, 12).

In sämtlichen von uns untersuchten Pflanzen beginnt die Differenzierung der Proplastiden mit der Einfaltung der innern Membranschicht. Eine Kontinuität der Granen, wie sie von Strugger (1) postuliert wurde, fehlt. Die im Lichtmikroskop als "Primärgranen" erkennbaren Strukturen sind morphologisch und physiologisch von den in ausgewachsenen Plastiden sichtbaren Granen verschieden. Wie wir nachweisen konnten, entstehen diese Prolamellarkörper als Folge einer Etiolierung und verschwinden bei erneuter Belichtung wieder. Die eigentlichen Plastidenanlagen sind im makromolekularen Bereich zu suchen und es erscheint durchaus möglich, dass solche in der Zelle de novo entstehen können. Die von Schimper (18) übernommene Kontinuitätstheorie erscheint uns daher nicht als gesichert.

Die Ähnlichkeit der frühen Proplastidenstadien mit den Mitochondrien gibt erneut zur Diskussion über die phylogenetische Entwicklung der beiden Partikelpopulationen Anlass. Eine Verwandtschaft dieser Zellorganelle wie sie Guilliermond (19) postulierte, ist in den letzten Jahren mehrheitlich abgelehnt worden. Die in unsern Aufnahmen gezeigte Ähnlichkeit der frühen Plastidenstadien mit den Mitochondrien, sowie die, in der Einleitung erwähnten Befunde von Arnon, Whatley und Allen (20) lassen indessen einen

solchen Zusammenhang vermuten. Im Gegensatz zu der französischen Schule sind wir jedoch der Ansicht, dass die Mitochondrien eher sekundär aus den Plastiden entstanden sind. Zur Stützung dieser Ansicht kann auch auf die Befunde von Brody und Vatter (25) hingewiesen werden, die in der primitiven Rotalge *Prophyridium cruentum* typisch ausgebildete Plastiden, aber keine Mitochondrien fanden. Letztere fehlen auch in Blaualgen (25) und photosynthetischen Bakterien (26).

Wie fluoreszenzoptischen Beobachtungen zu entnehmen ist, beginnt die Pigmentbildung in den Plastiden zu einem Zeitpunkt, wo diese nach Grösse und Struktur den Mitochondrien ähnlich sehen. Es wäre daher verständlich, dass sich vor Urzeiten aus jenem Stadium eine neuartige pigmentfreie Partikelpopulation mit der Funktion der Mitochondrien entwickelt hat.

#### ZUSAMMENFASSUNG

In embryonalen Zellen aus dem Vegetationskegel von *Elodea canadensis*, Embryosäcken von *Lilien*, und in Knospen von *Begonia*-Blattstecklingen wurde die Entwicklung der Proplastiden untersucht. Sie entstehen aus submikroskopischen Partikeln, die nur aus Stroma mit einer umgebenden Doppelmembran bestehen. Wenn diese Zellorganelle eine Grösse von ca. 1  $\mu$  erreicht haben, beginnt wie bei den Mitochondrien, die innere Membranschicht an verschiedenen Stellen ins Stroma einzuwachsen. Bei genügender Belichtung entwickelt sich daraus die typische Granenstruktur mit Paketen von Doppellamellen. Die Schichtenbildung erscheint bei ungenügender Belichtung gehemmt, dafür entsteht im Proplastiden ein aus Bläschen zusammengesetzter Prolamellarkörper. Aus diesem entstehen dann erst nach einsetzender Belichtung verspätet die Granen- und Stromalamellen. Die Frühstadien der Plastiden weisen eine grosse Ähnlichkeit mit den Mitochondrien auf, was für die von biochemischer Seite postulierte Verwandtschaft der beiden Zellorganelle spricht.

#### LITERATUR

1. Strugger, S., *Naturwissenschaften*, 1950, **37**, 166.
2. Strugger, S., *Protoplasma*, 1954, **43**, 120.
3. Strugger, S., *Protoplasma*, 1957, **48**, 360.
4. Strugger, S., und Perner, E., *Protoplasma*, 1956, **46**, 711.
5. Grave, G., *Protoplasma*, 1954, **44**, 273.
6. Kaja, H., *Ber. bot. Ges.*, 1954, **67**, 93.
7. Böing, J., *Protoplasma*, 1955, **45**, 55.
8. Perner, E. S., *Z. Naturforsch.*, 1956, **11b**, 560, 567.

9. Heitz, E., und Maly, R., *Z. Naturforsch.*, 1953, **8b**, 243.
10. Düvel, D., *Protoplasma*, 1954, **44**, 239.
11. Eymé, J., *Botaniste*, 1958, **42**, 191.
12. Buvat, R., *Ann. sc. nat. Bot. et biol. végétale*, 1958, **19**, 121.
13. Heitz, E., *Exp. Cell Research*, 1954, **7**, 606.
14. Leyon, H., *Exp. Cell Research*, 1954, **7**, 609.
15. Mühlethaler, K., *Protoplasma*, 1955, **45**, 264.
16. Hodge, A. J., McLean, J. D., and Mercer, F. V., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1956, **2**, 597.
17. Dangeard, P., *Compt. rend. Acad. sc.*, 1958, **246**, 2980.
18. Schimper, A. F. W., *Bot. Ztg.*, 1883, **41**, 105, 121, 137, 153.
19. Guilliermond, A., Mangenot, G., und Plantefol, L., *Traité de cytologie végétale*, Paris, Le François, 1933.
20. Arnon, D. I., Whatley, F. R., und Allen, M. B., *Science*, 1958, **127**, 1026.
21. Luft, J. H., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1956, **2**, 799.
22. Spiekermann, R., *Protoplasma*, 1957, **48**, 303.
23. De Deken-Grenson, M., *Biochim. et Biophysica Acta*, 1954, **14**, 203.
24. Andreeva, T. F., und Plyshevskaya, E. G., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, 1952, **87**, 301.
25. Brody, M., und Vatter, A. E., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1959, **5**, 289.
26. Vatter, A. E., und Wolfe, R. S., *J. Bact.*, 1958, **75**, 480.
27. Ruch, F., *Z. Zellforsch.*, im Druck.
28. Stäubli, W., Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, 1957.
29. von Wettstein, D., *Developmental Cytology*, New York, Ronald Press Co., 1959.

## EXPLANATION OF PLATES

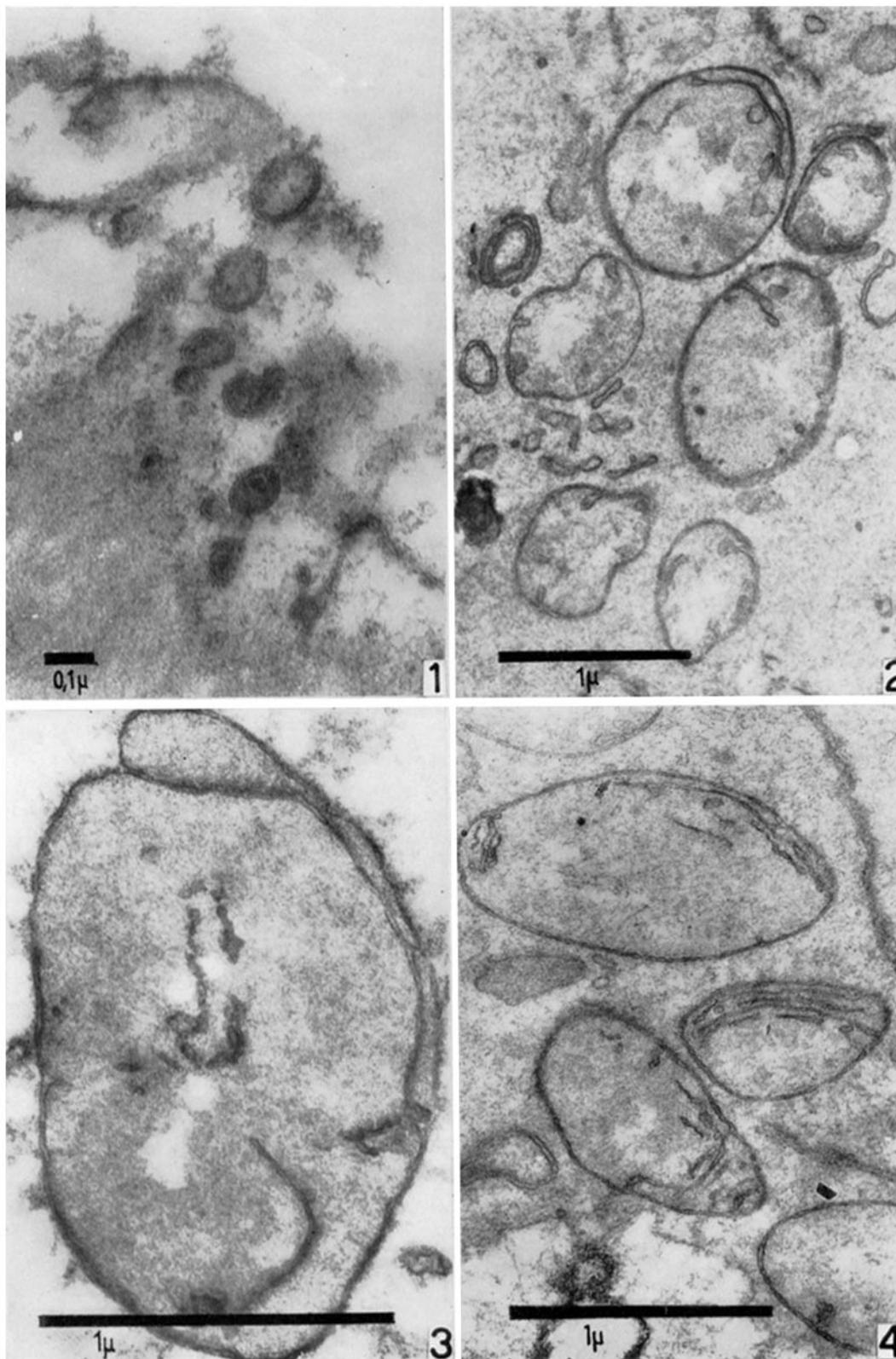
## PLATE 243

FIG. 1. Early stage of plastid development in an apical meristem of *Elodea canadensis*. The bodies have an internal stroma and a surrounding double membrane. Their size varies between 0.02 to 0.2  $\mu$ .  $\times$  70,000.

FIG. 2. The differentiation of the lamellar system begins after the invagination of the inner membrane layer into the stroma. At this stage the proplastids measure 0.5 to 1  $\mu$  in diameter. (Leaf bud of *Begonia*.)  $\times$  30,000.

FIG. 3. Typical invagination stage of a proplastid in a terminal bud of *Fritillaria imperialis*.  $\times$  55,000.

FIG. 4. Beginning of the internal differentiation in illuminated proplastids of *Elodea canadensis*.  $\times$  40,000.



(Mühlethaler and Frey-Wyssling: Proplastiden)

PLATE 244

FIG. 5. Proplastid from an apical meristem of *Elodea* after an etiolation period of 23 days. Most of the stroma is filled with the prolamellar body. The minute vesicles have an average size of  $0.05 \mu$ .  $\times 30,000$ .

FIG. 6. Proplastid after a period of etiolation of 10 days and a subsequent short illumination. The vesicles composing the prolamellar body merge and form lamellae. (*Elodea*.)  $\times 25,000$ .

FIG. 7. Beginning of grana formation around a prolamellar body in a proplastid of *Chlorophytum Sternbergianum*. The arrangement of the elementary particles is similar to a crystal lattice.  $\times 33,000$ .

FIG. 8. An advanced development stage with a number of fully formed grana. The prolamellar body has been reduced to a few vesicles.  $\times 30,000$ .

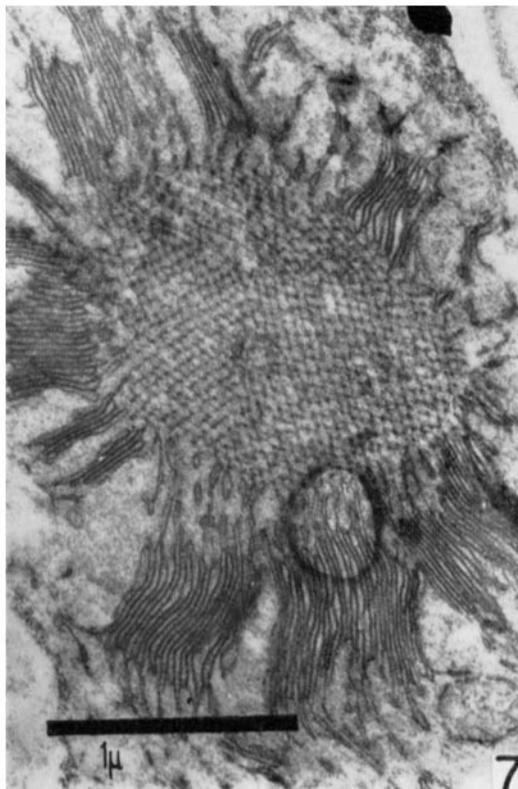


PLATE 245

FIG. 9. Young chloroplast from a *Elodea* leaf. The grana regions are nearly complete while the stroma lamellae are still in the stage of formation.  $\times 57,000$ .



(Mühlethaler and Frey-Wyssling: Proplastiden)

PLATE 246

FIG. 10. In full grown chloroplasts the intra grana regions are traversed by numerous stroma lamellae.  $\times$  30,000.



(Mühlethaler and Frey-Wyssling: Proplastiden)