

Entwicklung und Feinbau der Sphärosomen in Pflanzenzellen

Von

ERNST GRIESHABER

Inhaltsübersicht

	Seite
I. Die Sphärosomenfrage	1
II. Material und Methoden	3
1. Versuchspflanzen	3
2. Allgemeine Techniken	4
3. Spezielle Techniken	4
III. Identifizierung	5
IV. Entwicklung und Struktur	6
1. Feinbau	6
2. Ontogenese	6
3. Differenzierung	13
V. Die Fetttropfen	14
Fettbildung	14
IV. Modell- und Beschattungsversuche	15
1. Fettverlust durch die Präparation	15
2. Öl-Emulsionen	16
3. Die Grundsubstanz	16
VII. Besprechung der Ergebnisse	17
1. Entwicklung der Fetttropfen	17
2. Feinbau	18
3. Funktion	20
Zusammenfassung	21
Literatur	22

I. Die Sphärosomenfrage

Im Jahre 1880 prägte VON HANSTEIN den Ausdruck «Mikrosomen» für optisch dichte, granuläre Einschlüsse des pflanzlichen Cytoplasmas. Spätere Untersuchungen mit mikrochemischen Farbreaktionen ergaben jedoch, dass dieser Begriff verschiedenartige Teilchen umfasste. In der Folge entstand eine Fülle neuer Bezeichnungen: Ölkörperchen (WILL, 1896), Chromatinkörperchen (ZETNOW, 1899; GUILLIERMOND,

1910), Volutinkörperchen (MEYER, 1904), Sphärosomen (DANGEARD, 1919), Grana mit Mitochondrienfunktion (MARQUARDT, 1952), Mitochondrien (BAUTZ und MARQUARDT 1953a, b; GRAFFI, 1941; GUILLIERMOND, 1913; MARQUARDT und BAUTZ, 1955) und andere mehr. Dennoch vermochte sich der Ausdruck «Mikrosomen» für kugelige Partikeln von $0,5-1 \mu$ Grösse allgemein durchzusetzen. Die hohe Lichtbrechung dieser Teilchen erlaubte schon früh, sie besonders klar im Dunkelfeld- und später im Phasenkontrast-Mikroskop zu charakterisieren. Eine Unterscheidung von kleinsten Fetttropfen ($d \leq 1 \mu$) war allerdings ausgeschlossen (STEFFEN, 1953; DRAWERT und MIX, 1962).

Nachdem die Elektronenmikroskopie den Bereich des Submikroskopischen erschlossen hatte, wurde der ursprünglich rein cytomorphologische Begriff erstmals von CLAUDE (1943), nun aber auf eine submikroskopische Teilchenfraktion im Zentrifugat von Gewebeaufschlüssen angewandt. Der irrtümlich beanspruchte Terminus fand im biochemischen Schrifttum unverzüglich Eingang und behauptete sich. Um Missverständnisse zu vermeiden, übernahmen die Botaniker den schon 1919 von DANGEARD für besonders stark lichtbrechende «Mikrosomen» eingeführten Ausdruck Sphärosomen.

Neuere Arbeiten mit verschiedenen klassischen Färbemethoden beabsichtigten, die Fragen nach der funktionellen Bedeutung und chemischen Konstitution der Sphärosomen abzuklären. Die fixierten Teilchen erwiesen sich beim Test mit Fettreagenzien (Sudanschwarz, Sudan III, Phosphin-3R, Rhodamin B, Nilblausulfat, Indophenolblau) als hoch lipophil und ergaben auch im Analysenversuch einen Lipoidgehalt von 40% des Trockengewichts (vgl. ZIEGLER 1953a). Völlig unerwartete Effekte erbrachten fluoreszenzoptische Lebenduntersuchungen, wo sich die Sphärosomen gegenüber kathodischen Fluorochromen wie Berberinsulfat, Janusgrün B, Nilblausulfat, Setocyanin, Viktoriablau und anderen deutlich positiv verhielten (DRAWERT, 1953; KUTTIG, 1957; STUGGER, 1939). Die Sphärosomenfluoreszenz erwies sich als äusserst redoxempfindlich. Eiweisse wurden an sorgfältig mit Osmiumtetroxyd fixierten und entfetteten Sphärosomen mit Pyronin (PERNER, 1952a) und nach Fixation mit Methanoleisessig mittels Amidoschwarz färberisch nachgewiesen (JAROSCH, 1961). Über die Natur dieser Eiweisse liegen keine Angaben vor.

PERNER (1952a) beobachtete bei der Anwendung des Nadi-Reagens (Gemisch von α -Naphthol und Dimethyl-p-phenyldiamin in Wasser gelöst) auf die lebende Zwiebel-Epidermis eine Anreicherung des unter O_2 -Zutritt gebildeten Indophenolblaus in den Sphärosomen. Zu ähnlichen Resultaten führten Versuche mit dem farblosen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), welches durch intrazelluläre Reduktion in das rote Formazan umgebildet und in den Sphärosomen gespeichert wird (ZIEGLER, 1953). Diese Befunde veranlassten PERNER (1952a) auf die Gegenwart von Oxydasen und Dehydrogenasen in den Sphärosomen zu schliessen. Sie müssten demnach als eigentliche Redoxzentren der Zelle betrachtet werden und liessen sich den Organellen zuordnen. Eine Beziehung zu den amorphen Fetttropfen wäre damit ausgeschlossen (PERNER, 1958). Gegen die Anwendung des Organellbegriffs sind jedoch schwerwiegende Bedenken geäussert worden. DRAWERT (1952) schreibt die erwähnten Redoxvorgänge nicht den Sphärosomen, sondern den physiologisch hochaktiven Mitochondrien zu. Die Anreicherung von Indophenolblau und Formazan in den Sphäro-

somen wird dem lipophilen Charakter dieser Reaktionsprodukte zugeschrieben und soll wie diejenige der Lipochrome passiv (NOVIKOFF et al., 1961; ZIEGLER, 1953 a, b) erfolgen. Auch die beschriebenen Fluoreszenzerscheinungen werden als Löslichkeits-effekte aufgefasst (DRAWERT 1952, 1953, 1954). Nach Untersuchungen von KUTTIG (1957) sind die obgenannten basischen Farbstoffe in der verwendeten Pufferlösung nur schwach dissoziiert und verhalten sich daher lipophil; sie werden somit nicht als elektropositive, sondern als elektroneutrale Moleküle angereichert (vgl. auch KINZEL, 1954; MIX, 1958). Es scheint, dass der hohe Lipidgehalt der Sphärosomen für den Färbeverlauf weitaus wichtiger ist als allfällig anwesende Proteine (DRAWERT, 1953; KUTTIG, 1957). Auf Grund dieser Ergebnisse werden die Sphärosomen nicht als enzymtragende Cytoplasmapartikel, sondern als eine besondere Art von inerten Fett-respektive Öltröpfchen aufgefasst (DRAWERT und MIX, 1962).

Noch immer besteht also die Streitfrage: Handelt es sich bei den Sphärosomen um ephemere Fetteinschlüsse des Grundplasmas oder erfüllen sie, wie die Mitochondrien, Plastiden oder Ribosomen, die Voraussetzungen eines Organells? Von elektronenmikroskopischer Seite liegen nur vereinzelte Mitteilungen über Sphärosomen vor. Eine Lösung des Problems konnte noch nicht erzielt werden. In Aufnahmen von HOHL (1960, 1960/61) besitzen die Sphärosomen eine einfache Membran von 60—80 Å Dicke und einen bei schwacher Vergrößerung unstrukturierten, homogenen (O_8O_4) oder feinkörnigen ($KMnO_4$) Inhalt. Nach der Meinung von STRUGGER (1960) sollen die Sphärosomen von einer «doppelschichtigen Haut» begrenzt sein. Im Gegensatz dazu sind die Sphärosomen nach DRAWERT und MIX (1962) membranlose, fettartige Entmischungsprodukte.

Auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen wird mit der vorliegenden Arbeit versucht, die Sphärosomenfrage aus dem Widerspruch der Meinungen zu lösen. Im Vordergrund des Interesses stand die Frage nach dem submikroskopischen Bau dieser Teilchen. Die Ausweitung der Experimente auf die zellulären Fettkörperchen erwies sich als unumgänglich. Ausser der Entwicklung der Sphärosomen galt unsere Aufmerksamkeit daher besonders dem morphologischen Verhalten der Öltröpfchen während der Speicherung in eigentlichen Fettgeweben.

II. Material und Methoden

1. Versuchspflanzen

Zur Identifikation der Sphärosomen im Elektronenmikroskop wurde das klassische Untersuchungsobjekt der Lichtmikroskopie, die obere Schuppenepidermis von *Allium cepa* L. verwendet. Die grosse Zentralvakuole dieser flächig ausgedehnten Dauerzellen ist für das lichtmikroskopische Studium äusserst vorteilhaft, erschwert jedoch die elektronenmikroskopische Präparation derart, dass detaillierte Einblicke in die Feinstruktur der Sphärosomen nicht gewonnen werden konnten. Die Untersuchungen über die Entwicklung und Differenzierung der Sphärosomen erfolgten daher zur Hauptsache an der meristematischen Koleorhiza von *Zea Mays* L., in der bereits ZIEGLER (1953 a, b) die Sphärosomen lichtoptisch nachgewiesen hat.

Die Beobachtung der Fetttropfen während der Speicherung und Mobilisation der Fette wurde ausschliesslich an Kotyledonen von *Brassica Napus* L. und *Sinapis alba* L. durchgeführt. Der submikroskopische Bau dieser Reserveteilchen wurde vergleichshalber noch an Ölsamen oder ölhaltigen, embryonalen Achsengeweben folgender Pflanzen untersucht: *Arachis Hypogaea* L., *Lilium usitatissimum* L., *Helianthus annuus* L., *Prunus Amygdalus* L., *Rhizinus communis* L., *Olea europaea* L. und andere.

2. Allgemeine Techniken

a) Fixation und Entwässerung: 1—5% KMnO_4 in Brunnenwasser erwies sich in den meisten Fällen als vortreffliches Fixiermittel. Die Anwendung erfolgte in etwas vereinfachter Weise nach dem Verfahren von MOLLENHAUER (1959). Das OsO_4 wurde in 1%iger Lösung bei ca. 2° C nach dem Rezept von RHODIN und ZETTERQVIST (vgl. ZETTERQVIST, 1956) benützt. In einigen Versuchen kam OsO_4 in Dampfform zur Anwendung. Ergänzende Beobachtungen wurden an formolbehandelten Objekten (Lösung ungepuffert, pH = 7,2) gewonnen.

Die fixierten Proben wurden mit Aceton entwässert. Die 75%ige Lösungstufe enthielt in der Regel Kontraststoffe: entweder 1% Uranylacetat oder Uranylacetat und Phosphorwolframsäure zu je 1%. War eine möglichst kurzfristige Entwässerung erwünscht, so wurde die «Metallfärbung» an den Dünnschnitten vorgenommen.

b) Einbettung: Die Einbettung erfolgte zumeist in Araldit. Falls das Einbettungsmittel nachträglich herauszulösen war, musste Methacrylat verwendet werden. Zur Verminderung der mit der Polymerisation auftretenden Schrumpfung wurden die Objekte aus dem monomeren sogleich in schwach vopolymerisiertes Methacrylat übergeführt und hierauf durch UV-Bestrahlung gehärtet (PARSONS und DARDEN, 1961). Eine Umgehung der fettlösenden Acetonentwässerung ermöglichte das von STÄUBLI (1960) eingeführte, «wasserlösliche» Einbettungsmittel «X 133/2097» der Ciba AG, Basel. Diese Methode führte leider zu keinen neuen Ergebnissen.

3. Spezielle Techniken

a) Blockierung der Autolyse: Die stark hydratisierten Epidermiszellen der Niederblätter von *Allium cepa* zeigten nach der üblichen Präparation ein schwer geschädigtes Strukturbild. Zur Hemmung des submortal einsetzenden, enzymatischen Abbaus wurden die Gewebe während 2 Stunden mit einer Ca- und Mg-bindenden 0,0005-m Komplexon II-Lösung vorbehandelt und hierauf mit Osmiumtetroxyd fixiert (BAIRATI und LEHMANN, 1954).

b) Beschattungstechnik: Zur Darstellung des Grundgerüsts der zellulären Fettkörperchen, welches selbst nach Einlagerung schwermetallhaltiger Verbindungen kontrastarm erscheint, wurden Methacrylat-Dünnschnitte dem folgenden Verfahren unterworfen: 1. Herauslösen des Einbettungsmittels während 20 Minuten mit Amylalkohol und Amylacetat. 2. Einstündige Fettextraktion mit mehrfach gewechseltem Petroläther. 3. Platinbeschattung der Schnitte unter einem Winkel von 20°.

c) Modellversuche:

Fettverlust durch die Präparation. Die durch die präparativen Eingriffe verursachten Fettverluste wurden an künstlich hergestellten Ölschichten ermittelt.

Zu diesem Zwecke wurden gewichtsgleiche, wasserfreie Filterpapierstreifen mit in Petroläther gelöstem Olivenöl durchtränkt. Die pro Papierstreifen dotierte Ölmenge wurde so niedrig gehalten, dass die berechnete Schichtdicke des kapillar verteilten Öles (gleichmässige Benetzung der Zellulosefasern vorausgesetzt) weniger als $0,1 \mu$ betrug. Dadurch war einerseits eine reichlich grosse Oberfläche für die Einwirkung des Fixiermittels gewährleistet, andererseits entsprach die Schichtdicke des Ölfilmes den Dimensionen der natürlichen Fettkörperchen. Die Papierstreifen wurden danach wie die histologischen Objekte fixiert, gespült, kontrastiert und entwässert. Nach dem Verdampfen der einzelnen Lösungsmittel wurden die Filterpapierstücke gewogen. In den Tabellenwerten (Seite 15) sind die Gewichtsveränderungen des reinen Zellulosefilters infolge Fixation, Kontraststoffaufnahme und Acetonbehandlung auf Grund besonderer Blindversuche berücksichtigt worden.

Öl-Emulsionen. Der Feinbau künstlicher Öltröpfchen wurde an Emulsionen von ungehärtetem Oliven- respektive Leinöl in Agar und Gelatine untersucht: 50 cm^3 einer kolloidalen, gegen destilliertes Wasser dialysierten, 2%igen Agar- respektive 5%igen Gelatinelösung wurden mit 1 cm^3 Öl versetzt und bei einer Temperatur von 30° C in einem Blendor ca. 1 Minute emulgiert. Das hernach erstarrte Gel wurde in kleine Blöcke geschnitten und wie die Gewebestückchen entwässert und eingebettet.

III. Identifizierung

Die elektronenmikroskopische Identifizierung der Sphärosomen erfolgte an der oberen Schuppenepidermis der Küchenzwiebel. Der nicht in jeder Hinsicht befriedigende Erhaltungsgrad des Cytoplasmas verhinderte das Erfassen kleinster Struktureinheiten, genügte indessen einer zuverlässigen Unterscheidung zwischen Sphärosomen, Proplastiden und Mitochondrien. Zur Identifizierung lassen sich folgende Kriterien heranziehen:

Grösse: Die lichtoptisch ermittelten Teilchendurchmesser von $0,5\text{--}1 \mu$ (PERNER und PFEFFERKORN, 1953; Perner, 1958, und andere) konnten im Elektronenmikroskop bestätigt werden.

Gestalt: Nach phasenkontrastoptischen Lebenduntersuchungen weisen die Sphärosomen eine ideal kugelige Form auf. Bereits die OsO_4 -Fixation führt jedoch zu einer lichtmikroskopisch gut erkennbaren, polyedrischen Deformation (Abb. 1; unentwässertes Präparat!), die im Elektronenmikroskop besonders auffällig in Erscheinung tritt (Abb. 2).

Osmotische Indifferenz: Unter der Annahme, dass eine osmotische Beeinflussung der offensichtlich fetthaltigen Partikeln kaum zu erwarten sei, wurden Zwiebelepidermen in stark hypertonische Lösungen eingelegt. Eine ungepufferte, 1,5-m Glukoselösung zum Beispiel erzeugt in wenigen Stunden eine irreversible Konkavplasmolyse. Der rigorose Eingriff vermag jedoch die Sphärosomen nicht wesentlich zu beeinflussen; im Gegensatz zu andern Teilchen, die unter gleichen Bedingungen vollständig kollabieren, behalten sie ihren gewohnten Aspekt bei (Abb. 2).

Charakterisierung: Die Sphärosomen von *Allium cepa* zeichnen sich durch einen dichten, granulären Bau und eine feine Grenzmembran aus. Die ursprünglich glatte,

sphärische Teilchenoberfläche erscheint im Elektronenmikroskop unregelmässig eingedellt und zerknittert. Eine bevorzugte Lage der Sphärosomen gegenüber anderen Zellstrukturen ist nicht erkennbar: sie liegen neben Plastiden und Mitochondrien mehr oder weniger statistisch im Cytoplasma verteilt.

IV. Entwicklung und Struktur

1. Feinbau

Das Innere der 0,1—0,4 μ grossen Sphärosomen der Mais-Koleorhiza zeigt nach Fixierung mit Osmiumtetroxyd oder Kaliumpermanganat einen ausgesprochen granulären Aufbau (Abb. 3, 16), der durch eine zusätzliche Uranyl-Imprägnierung wesentlich verdeutlicht wird. Im Unterschied zur Feinstruktur der Plastiden- und Mitochondrien-Initialen erscheinen bestimmte Inhaltsstoffe dichter und namentlich gröber granuliert. Der im übrigen ähnliche Charakter rechtfertigt, diese Granulärstruktur als Stroma der Sphärosomen zu bezeichnen. Die Abgrenzung gegenüber dem Grundplasma wird durch eine typische, dunkel-hell-dunkel geschichtete Elementarmembran von 70 ± 10 Å Dicke gebildet (Abb. 16). Eine Verwechslung mit den von einer Doppelmembran umschlossenen Proplastiden und Promitochondrien ist demnach, auch ohne Berücksichtigung der Stromaunterschiede, ausgeschlossen.

Formolfixierte Sphärosomen besitzen grundsätzlich gleiche morphologische Merkmale. Allerdings kann mit dieser Fixation kein zusätzlicher Kontrast erzielt werden, so dass feinste Bilddetails verlorengehen. Eine Kontrastierung ist daher unerlässlich. Sie gestattet eine klare Abbildung der Doppelstruktur der Elementarmembran. Diese erscheint jedoch zarter als nach OsO_4 - oder KMnO_4 -Fixation und misst im Mittel 65 Å. Das Stroma ist, auch ohne Einlagerung kontraststeigernder Verbindungen, wesentlich kompakter und feinkörniger als das Grundplasma, was auf eine relativ hohe Eigendichte hinweist! Schrumpfungerscheinungen treten keine auf. Die ausnahmslos kugeligen Sphärosomenformen sprechen für eine günstige Struktur-erhaltung der Inhaltsstoffe.

Die Resultate lassen erkennen, dass der durch die elektronenmikroskopische Präparation verursachte Schrumpfungseffekt primär auf die Fixierung zurückgeht (vgl. Identifikation). Während die ursprünglich sphärische Teilchenform der mit Formol behandelten Sphärosomen voll erhalten bleibt, erscheint sie nach Osmiumtetroxyd- oder Permanganat-Fixierung stark verändert. Das unterschiedliche Verhalten der Sphärosomen gegenüber den verwendeten Fixativen dürfte demnach zur Hauptsache auf einer Koagulation von Inhaltssubstanzen beruhen. Durch die Entwässerung verursachte Stoffverluste mögen die Schrumpfung noch zusätzlich verstärken.

2. Ontogenese

Die Entwicklung der Sphärosomen in der Koleorhiza von *Zea Mays* beginnt bereits vor Abschluss der Samenreife, dauert in der Folge ununterbrochen an und kann selbst noch in prä mortal veränderten Protoplasten beobachtet werden.

Abkürzungen zu den Bildtafeln I—IV

<i>S</i>	Sphärosomen	<i>G</i>	Golgi-Apparat
<i>PS</i>	Prosphärosomen	<i>GV</i>	Golgi-Vakuole
<i>F</i>	Fetttröpfchen	<i>xb</i>	x-bodies
<i>P</i>	Plastiden	<i>VA</i>	Vakuole
<i>PP</i>	Proplastiden	<i>T</i>	Tonoplast
<i>M</i>	Mitochondrien	<i>Pm</i>	Plasmalemma
<i>PM</i>	Promitochondrien	<i>Z</i>	Zellwand
<i>ER</i>	Endoplasmatisches Retikulum	<i>UAc</i>	Uranylacetat
<i>RV</i>	Vesikel des <i>ER</i>	<i>PWS</i>	Phosphorwolframsäure

— = 1 μ , wenn nicht anderes erwähnt.

Legenden zu den Bildtafeln I—IV

TAFEL I

Abb. 1—2 Sphärosomen in den Epidermiszellen der Niederblätter von *Allium cepa*. Fixation mit Osmiumdampf.

Abb. 1. Hellfeldaufnahme. Veränderung der sphärischen Teilchenform durch die Fixation. 3500 \times .

Abb. 2. Elektronenaufnahme. Nach einer irreversiblen Plasmolyse sind ausser den formresistenten Sphärosomen keine Cytoplasmastrukturen mehr identifizierbar. 23 000 \times .

Abb. 3—4 Sphärosomen der Mais-Koleorhiza.

Abb. 3. Die von einer Elementarmembran begrenzten Sphärosomen besitzen eine granuläre Internstruktur. Im mittleren Bildabschnitt liegen kugelige Golgi- neben länglichen Retikulum-Bläschen. OsO₄, UAc. 42 000 \times .

Abb. 4. Zellausschnitt mit charakteristischem Partikelbestand kurz nach dem Wurzel-durchbruch. KMnO₄, UAc. 24 000 \times .

TAFEL II

Abb. 5—8 Entwicklung der Sphärosomen in der Koleorhiza und im Scutellum von Mais. KMnO₄, UAc, PWS.

Abb. 5. Abgliederung von Retikulum-Vesikeln und Bildung von Prosphärosomen. 20 000 \times .

Abb. 6. Ausbildung des Sphärosomenstromas in einem Endstück einer Retikulum-Zisterne (Pfeil). 90 000 \times .

Abb. 7. Die Einlagerung der Fette beginnt im Innern der Sphärosomen. In Aussakungen des ER erkennt man dichtes Stroma (Pfeile). 30 000 \times .

Abb. 8. Mais-Scutellum. Fettkörperchen variabler Grösse in einer Zelle aus dem keimenden Samen. 30 000 \times .

TAFEL III

Abb. 9—11 Entwicklung der Fetttropfen im Raps-Keimblatt. KMnO_4 , UAc.

Abb. 9. Sphärosomen, Mitochondrien und Teil eines Chloroplasten in einer jungen Zelle (ca. 14 Tage nach der Befruchtung). $24\,000\times$.

Abb. 10. Verhältnisse nach beendetem Teilungswachstum. Das ER ist in Entwicklung begriffen und bildet vermehrt Vesikel und Proosphärosomen (Pfeile). Die Zahl der Mitochondrien ist erhöht. $14\,000\times$.

Abb. 11. Übersichtsbild einer reifen Kotyledozelle. Die zahlreichen Fettpartikel liegen wandständig. Im stellenweise aufgelockerten, zentralen Cytoplasma erkennt man Areale mit grob- und feingranuliertem Material, dazwischen einige Plastiden. ER und Golgi-Apparate fehlen. $11\,000\times$.

TAFEL IV

Abb. 12. Kotyledozelle von *Sinapis alba*. Die feine Doppellinie der Elementarmembran ist teilweise deutlich aufgelöst (Pfeile). KMnO_4 , UAc, PWS. $80\,000\times$.

Abb. 13. Fetttropfen aus einer Endospermzelle der Olive. Teil eines stark pigmentierten Chromoplasten (P). KMnO_4 , UAc. $25\,000\times$.

Abb. 14—15 Extraktions- und Beschattungsversuch am Rapskotyledo. OsO_4 , UAc, Einbettung in Methacrylat.

Abb. 14. Kontrollaufnahme. Engste Packung von elektronenoptisch transparenten Fetttropfen vor der Extraktion des Fettes. $12\,000\times$.

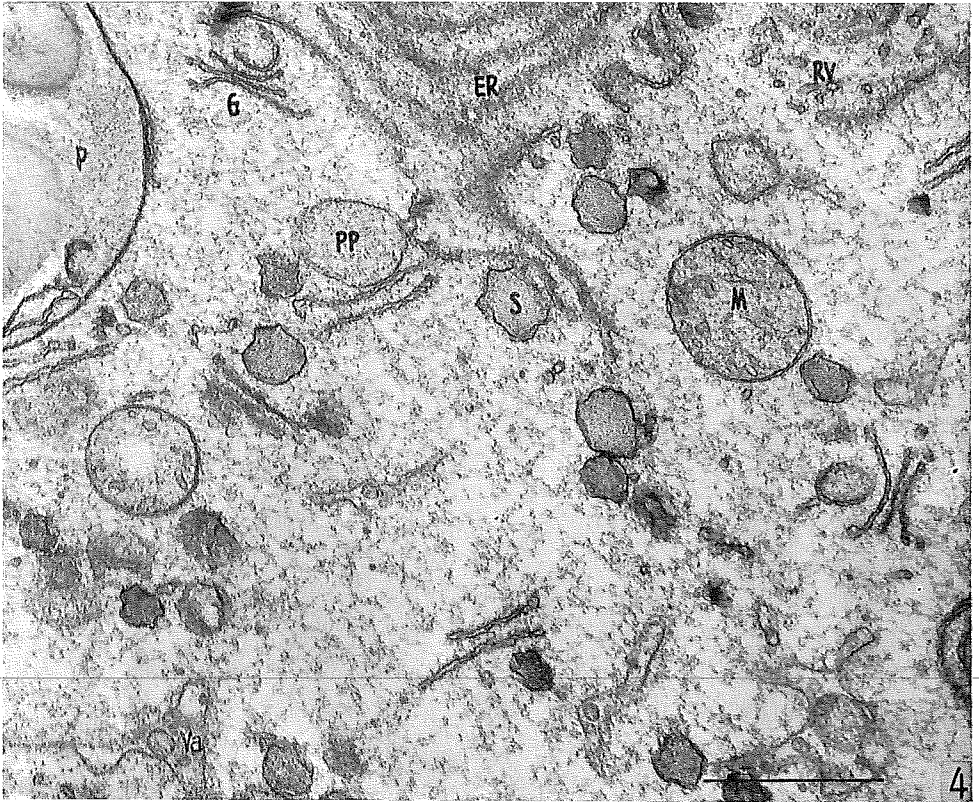
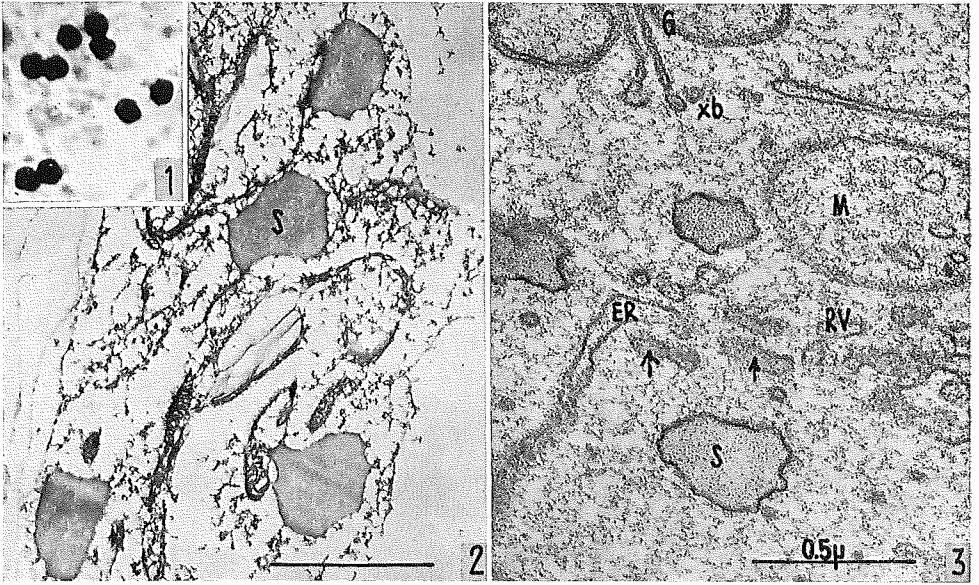
Abb. 15. Einbettungsmittel und Fette sind am Dünnschnitt herausgelöst und die Rückstände mit Platin beschattet worden. Pfeil: Beschattungsrichtung. Die Membranen (m) sind grösstenteils umgekippt. Der fixierte Teilcheninhalt erscheint stark geschrumpft. $12\,000\times$.

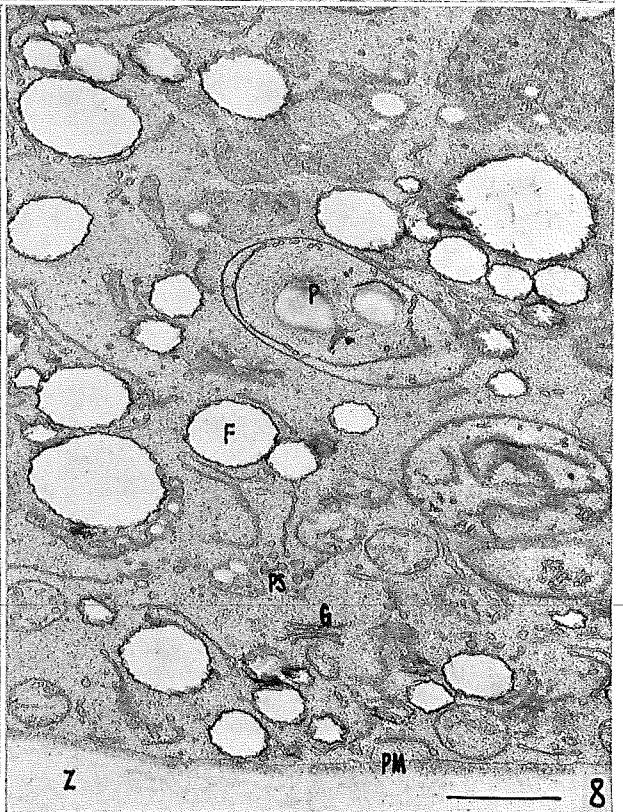
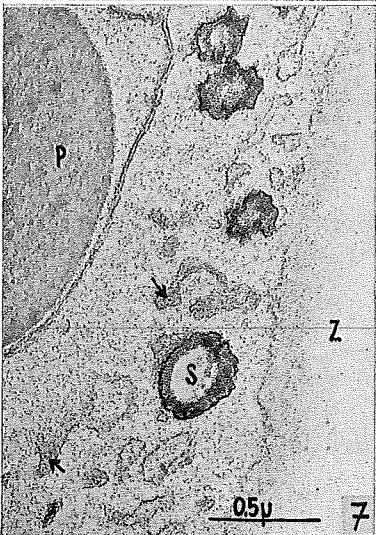
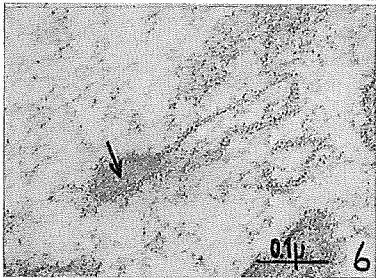
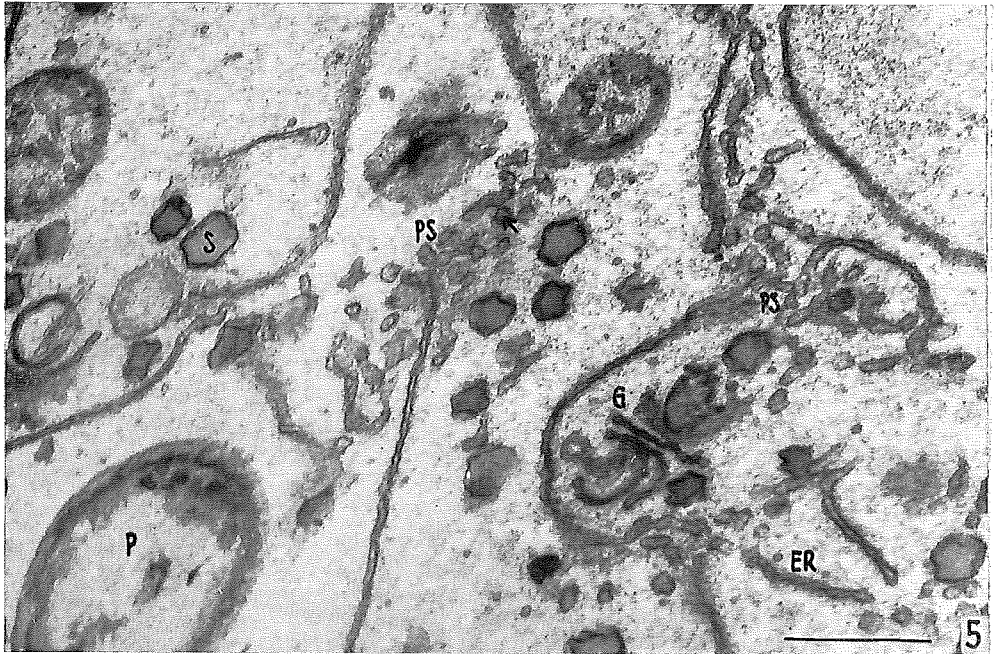
Abb. 16. Sphärosomen-Feinstruktur: Das feingranuläre Stroma ist von einer charakteristischen Elementarmembran umgeben. KMnO_4 , UAc. $90\,000\times$.

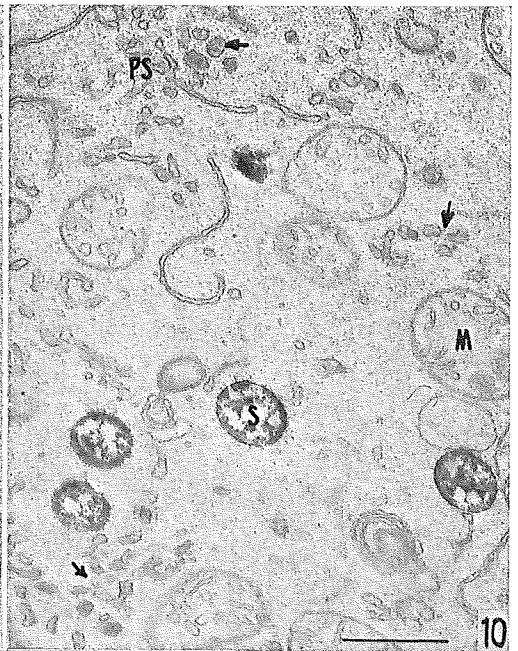
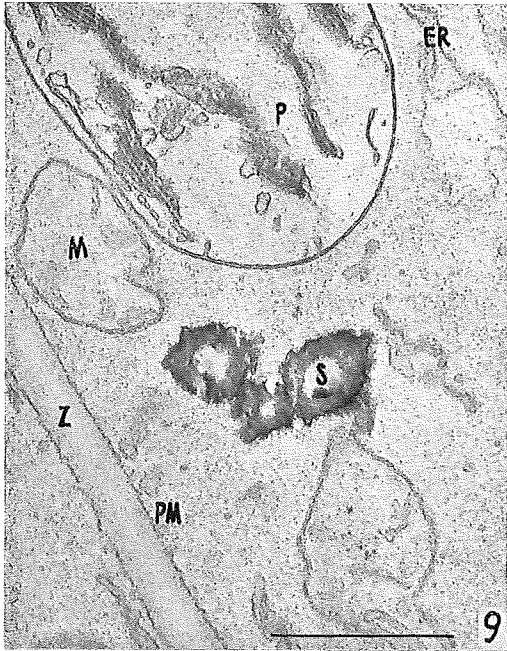
Abb. 17—18 Künstliche Öl-Emulsionen.

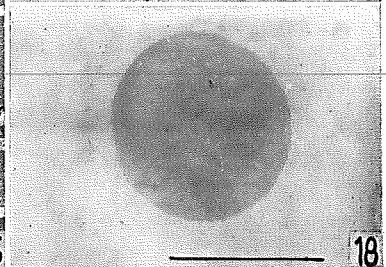
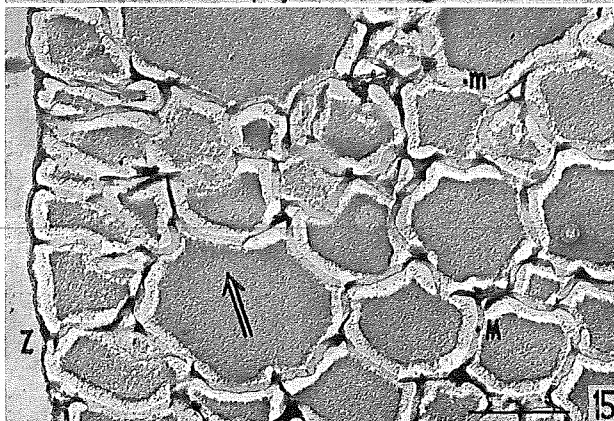
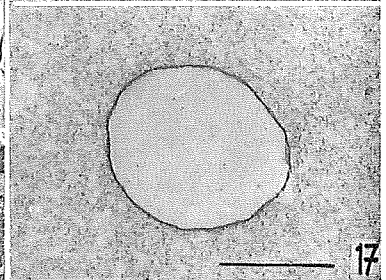
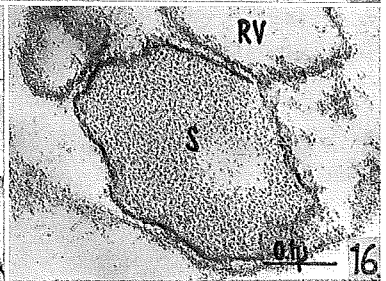
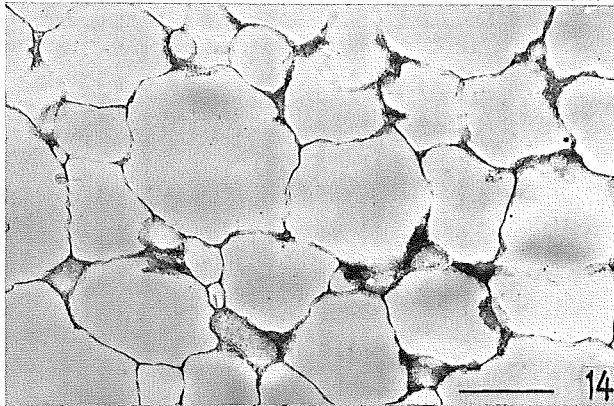
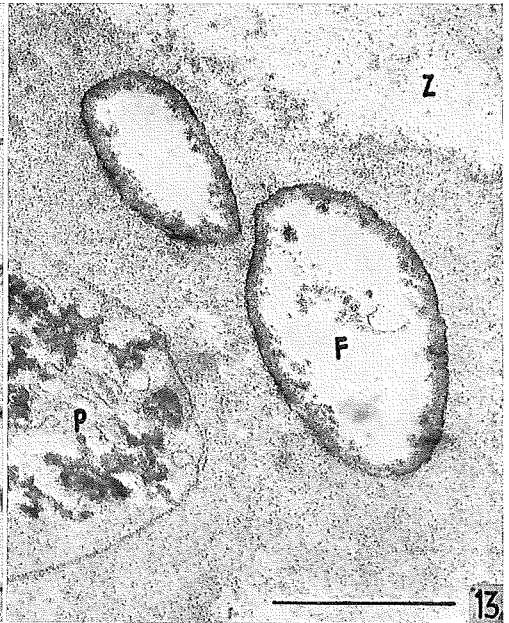
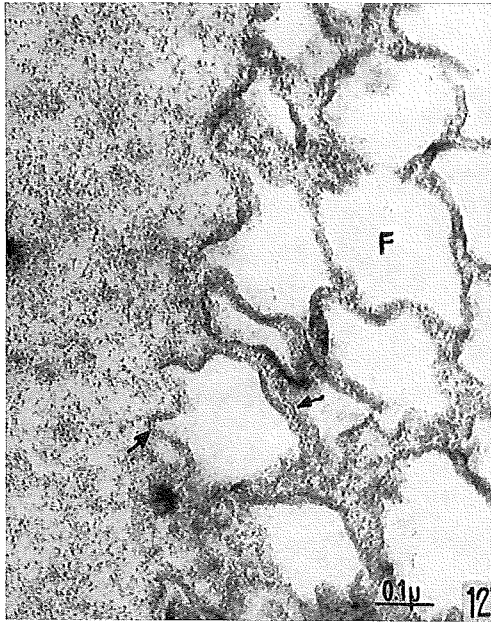
Abb. 17. Olivenöltröpfchen in Gelatine. Die Eiweisse der äusseren, dispersen Phase bewirken die Ausbildung einer Haptogenmembran. KMnO_4 , UAc, PWS. $15\,000\times$.

Abb. 18. Leinöl in Agar. Die Tröpfchen besitzen keine strukturierte Hülle. Das Fett erscheint homogen grau. KMnO_4 , UAc, PWS. $20\,000\times$.









In 300—500 Å grossen Bläschen, die an Falten des endoplasmatischen Retikulums (ER) abgegliedert werden und durch ihren elektronendichten Inhalt auffallen, können früheste Stadien erkannt werden (Abb. 3, 5; Pfeile). Als ihre Vorläufer kommen inhaltsreiche Aussackungen des Retikulums in Betracht (Abb. 6, 7; Pfeile), deren Membranen frei von Ribosomen sind. Die abgeschnürten, kompakten Teilchen von zumeist weniger als 900 Å Durchmesser umgeben die Retikulumfortsätze in lockerem Schwarm und sind mit zahlreichen elektronenoptisch leeren Bläschen vermischt (Abb. 5). Sie besitzen bereits den charakteristischen, granulären Feinbau ausdifferenzierter Sphärosomen sowie deren artefizielle Schrumpfgestalt. Diese Kleinsphärosomen entwickeln sich durch einfaches Grössenwachstum zu adulten Partikeln (Abb. 5).

In Übereinstimmung mit PERNER (1958) nennt JAROSCH (1961) die kleinsten, im Dunkelfeld sichtbaren Sphärosomen von 0,1—0,4 μ Grösse «Prosphärosomen». Lichtmikroskopisch unterscheiden sie sich deutlich von den Sphärosomen und sollen gegenüber diesen einen relativ geringen Lipidgehalt aufweisen (JAROSCH, 1961). Leider vermag das elektronenmikroskopische Bild darüber keine Auskunft zu geben. Obschon kein Zweifel bestehen kann, dass JAROSCH dieselben Vorläufer-Teilchen beschreibt, brauchen wir den Ausdruck «Prosphärosomen» im folgenden nur im rein morphologischen Sinn.

Neben den vom Retikulum abstammenden Vesikeln treten in den Golgi-Regionen ähnliche Bläschen ($d = 350\text{—}500 \text{ \AA}$) auf, von denen manche dunkle Einschlüsse enthalten (Abb. 3). Auch in randständigen Erweiterungen der Golgi-Membranen lassen sich solche dichten inhomogenen Stoffansammlungen feststellen (Abb. 3). Die bemerkenswerte strukturelle Ähnlichkeit sowie die enge topographische Beziehung lassen an eine Sprossung aus dem Golgi-Apparat denken. Morphologisch entsprechen diese Teilchen den «x-bodies» von HIRSCH (1961). Sie sind von kleinsten Sphärosomenformen kaum zu unterscheiden, reagieren jedoch mit Permanganat schon nach 15—20 min kräftig, während das Stroma der Prosphärosomen noch unkontrastiert erscheint. Für die Abklärung der Ursprungsfrage ist zudem die Beobachtung bedeutsam, dass solche Golgi-Abkömmlinge nach und nach verschwinden und in der alten, besonders reichlich Prosphärosomen bildenden Koleorhiza völlig fehlen. Ein Zusammenhang zwischen dem Golgi-Apparat und der Entwicklung der Sphärosomen scheint daher nicht zu bestehen; die Sphärosomen entstammen dem ER!

3. Differenzierung

Ein auffälliger Differenzierungsvorgang ist nach erfolgtem Wurzeldurchbruch an den Sphärosomen der Koleorhiza von Mais zu beobachten. Einmal lässt sich eine vermehrte Bildung von Sphärosomen festhalten, und zum andern erreichen die kaum 0,4 μ grossen Partikeln nunmehr ein Zwei- bis Dreifaches der ursprünglichen Grösse. Mit dieser Volumenzunahme geht eine scharfe morphologische Differenzierung einher, die sich zumeist in einem vom Zentrum ausgehenden Verlust der Granulation äussert und schliesslich zu elektronenoptisch transparenten Teilchen führt (Abb. 7, 8). Derartige Teilchen finden sich auch in entsprechenden Altersstadien der übrigen Keimlingsgewebe. Parallel dazu zeigen sich einige tiefgreifende Veränderungen in der cytoplasmatischen Organisation, die ihren markantesten Ausdruck in zwei charakte-

ristischen Ereignissen findet: erstens in der Ausbildung schlauchartig verzweigter Vakuolen und zweitens in einer Anreicherung und späteren Auflösung von Mitochondrien, Plastiden und kleinen Plasmagranula in diesen bizarr geformten Safräumen. Nach Abschluss der ausgiebigen Vakuolisierungs- und Zerfallsprozesse enthalten die schmalen Cytoplasmastränge vorwiegend Sphärosomen.

Wie lässt sich eine derartige, feinstrukturelle Veränderung im Sphärosomeninnern erklären? Im Zusammenhang mit den allgemeinen Abbauvorgängen komplexer Zellbestandteile, welche hier im besonderen als Begleiterscheinungen einer Lipophanose gedeutet werden müssen, dürfte es sich um eine Verfettung der Sphärosomen handeln. Zur Erhärtung dieser an sich naheliegenden Annahme drängt sich ferner das Ergebnis einer analytischen Untersuchung von LINDSTROM und FISK (1926) auf. Die Autoren ermittelten den Fettgehalt reifer Maissamen. Als eine für unsere Fragestellung wichtige Tatsache wurde gefunden, dass ca. 70% der gesamten Samenfette im Embryo liegen. Unter der Berücksichtigung der cytomorphologischen Verhältnisse können demnach nur die Sphärosomen als Speicherorte für diese Zellfette in Frage kommen. Damit findet die seit langem vermutete Bedeutung der Sphärosomen im Fettstoffwechsel (GUILLIERMOND, 1921; JAROSCH, 1961; STEINER, 1954, und andere) eine experimentelle Bestätigung.

V. Die Fetttropfen

Die Fettbildung

Sphärosomen sind vereinzelt bereits in den frühen Entwicklungsstadien der Raps- und Senfsamen (mit ihrem noch reichlichen Chloroplastenbestand) zu beobachten. Das ER ist vorderhand nur spärlich entwickelt, währenddem die Mitochondrien in grosser Zahl auftreten (Abb. 10). Nach vollendetem Plasmawachstum zeigen die Membranen des ER eine deutliche Vermehrung. Sie durchsetzen als längliche Schnittprofile nach und nach weite Bereiche des Cytoplasmas und lassen zugleich eine gesteigerte Vesikelbildung erkennen. In der Mehrzahl dieser 300—900 Å grossen Bläschen erscheinen schon vor der eigentlichen «Fettbildungsphase» elektronendichte Einlagerungen, die bald einen ausgeprägt granulären Aspekt annehmen (Abb. 10; Pfeile). Die Fettsynthese selbst wird durch ein massives Auftreten von Proosphärosomen eingeleitet und erreicht mit der Differenzierung von Sphärosomen zu Fetttropfen ihren Höhepunkt und zugleich Abschluss. Die in rascher Folge gebildeten Fettpartikel mit Durchmesser von 0,3—0,8 μ beherrschen hierauf das Bild der Zelle («Ölplasma») und häufen sich im Ektoplasma an (Abb. 11). Obschon die zahlreichen Teilchen (in einer mittleren Kotledeozelle liegen an die 50000 Fettkörperchen) dicht gepackt, das heisst in gegenseitig engster Berührung stehen (Abb. 14), kommen Tropfenverschmelzungen nicht vor. Dies dürfte auf die vorhandene Grenzmembran der Fetteilchen zurückzuführen sein. (Abb. 12).

Die Resultate geben gute Einblicke in die Entwicklungsverhältnisse der Fetteilchen in Reservegeweben. Die in der Koleorhiza von Mais gefundenen Sachverhalte werden bestätigt: die Fetttropfchen sind ausdifferenzierte Sphärosomen und entwickeln sich durch individuelles Wachstum aus submikroskopischen Bläschen des ER! Der Aus-

druck Öl-«Tropfen» — mit einer falschen Vorstellung hinsichtlich der Bildung dieser Teilchen belastet — wird dadurch fragwürdig und sollte sinngemäß vermieden werden. Indessen kann freilich von dieser allgemein üblichen Bezeichnung, ohne die Gefahr einer ungebührlichen Terminologisierung, kaum Abstand genommen werden.

VI. Modell- und Beschattungsversuche

1. Fettverlust durch die Präparation

Neben der chemischen Fixation ist auch die Entwässerung eine Quelle für Artefakte. Sie führt ebenfalls zu einer beträchtlichen Einbusse an cytoplasmatischen Substanzen (BAHR et al., 1957; LOW, 1954; PORTER und KALLMANN, 1953). Das als Entwässerungsmittel verwendete Aceton wirkt besonders stark fettlösend, so dass mit einer ansehnlichen Extraktion von Pflanzenölen gerechnet werden muss. In der Tab. I

Tabelle I. Fettverlust durch Fixation und Entwässerung.

Behandlung des auf einen Zellulosefilter aufgetragenen Olivenöls	Werte nach Behandlung in % des Ausgangsgewichtes	
	1 % OsO ₄	5 % KMnO ₄
Fixierung 3 Std.*	99	98
Imprägnierung mit 1 % Uranylacetat im 75%igen Acetonbad während 15 Std.	70—80	50—60
Entwässerung in abs. Aceton	15—25**	3—5
Entwässerung in abs. Aceton ohne vorangegangene Kontrastierung	20—30	1—5
Petrolätherextraktion 48 Std.	5—10	1—3

* Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurden die Zeiten der üblichen Präparationstechnik beibehalten.

** Die Verfälschung der Daten zufolge anwesender Schwermetallverbindungen konnte nicht berücksichtigt werden; die Verhältnisse liegen daher in Wirklichkeit eher ungünstiger!

sind die Ergebnisse quantitativer Messungen solcher Stoffabnahmen am Beispiel kaltgepressten Olivenöls zusammengefasst (Methodik siehe S. 4/5). Die aufgeführten Werte sind insofern aufschlussreich, als sie einerseits die Unbrauchbarkeit des Permanganats zur Fetterhaltung veranschaulichen und andererseits die dem Osmiumtetroxyd zugesprochene Bedeutung als allgemeines Fettreagens (GUILLIERMOND et al., 1933; REIMER, 1959; SITTE, 1958, und andere), in Übereinstimmung mit den Befunden von BAHR (1954), deutlich widerlegen. Obschon ca. ein Fünftel der Depotfette fixiert und durch die damit auftretende Schwärzung makroskopisch wahrnehmbar wird, bleibt es bei der Konsequenz, dass die Fettpartikel im Elektronenmikroskop hell zur Abbildung gelangen (Abb. 11, 14).

2. Öl-Emulsionen

Zum Vergleich mit den Befunden an cytoplasmatischen Fettkörperchen wurde der Feinbau der Öltröpfchen von Öl-Emulsionen in Agar und Gelatine untersucht. Leinöl mit einer Jodzahl (JZ) von 175—200 diente als Modell für hochungesättigte Fette, Olivenöl (JZ = 79—84) zur Demonstration des Verhaltens nichttrocknender Pflanzenöle.

Die in Agar dispergierten Ölteilchen lassen keine Membranstrukturen erkennen; es handelt sich um elektronenoptisch nicht auflösbare Phasengrenzflächen (Abb. 18). Im Gelatinegel erhält man, vorab mit Permanganat, eine scharf gezeichnete Membran variabler Dicke (Abb. 17). Eine Verlängerung der Emulgierzeit bringt eine Verdickung dieser kompakten und stets ungeschichteten Hülle mit sich. Sie dürfte angesichts der leichten Färbbarkeit mit KMnO_4 und insbesondere Uranylacetat hauptsächlich aus adsorbierten Eiweissen der kolloid-dispersen Phase bestehen und entspräche demnach der zu erwartenden Haptogenmembran.

Die täuschende Ähnlichkeit des emulgierten Öls mit den pflanzlichen Reservefettkörperchen infolge Ausbleiben des elektronenoptischen Kontrastes wird durch den gemeinsamen hohen Gehalt an Neutralfetten bestimmt. Im Gegensatz zur Granulation in den Entwicklungsformen der plasmatischen Öltropfen erscheint das Innere der künstlichen Ölkügelchen stets homogen (Abb. 17, 18). Eine geringe Grautönung mag mitunter auftreten (Abb. 18), dann jedoch nur bei osmiumfixierten und vor allem in Methacrylat eingebetteten Öltröpfchen. Zudem fehlt den letzteren stets die für cytoplasmatische Grenzflächenstrukturen charakteristische Differenzierung in Elementarmembranen oder Doppelmembranen.

Die Unterschiede zwischen den zellulären Fettkörperchen und den Tröpfchen der Emulsion verbieten daher die Deutung der Fettspeicherung als lokale Entmischung eines an Lipiden übersättigten Grundplasmas.

3. Die Grundsubstanz

Parallel zur Bildung der Zellfette beziehungsweise deren Einlagerung in die Sphärosomen treten die oben beschriebenen «Stromafenster» auf. Da nach unseren Erfahrungen (vgl. auch VON WETTSTEIN, 1957) die Neutralfette auf Grund der in der elektronenmikroskopischen Cytologie eingehaltenen Fixationsbedingungen (Fixationszeit, -temperatur, -mittel etc.) nicht kontrastiert werden (Abb. 8, 11, 14), das heisst hell zur Darstellung gelangen, muss das kontrastlose, zentrale Gebiet im Sphärosomeninnern auch unter diesem Gesichtspunkt als Fett gedeutet werden.

Die Frage nach dem Schicksal der Grundsubstanz anlässlich der Fettmagazinierung wurde mit Hilfe der eingangs erwähnten Beschattungstechnik erhellt, welche erlaubt, das nicht fettartige Grundgerüst der Fetteilchen sichtbar zu machen. Mit OsO_4 und Uranylacetat vorbehandelte Objekte wurden zu diesem Zweck in Methacrylat eingeschlossen und ultradünn geschnitten. Nachdem das Einbettungsmittel und die Fette stufenweise herausgelöst worden waren, wurden die Schnitte mit Platin schräg bedampft. Abb. 15 gibt das Elektronenbild des unlöslichen Fettkörperinhaltes wieder (Negativkopie; dunkel = massenreich; Schnittdicke etwa 600 Å). Es ist er-

staunlich, wie gut jede Partikel erkennbar ist. Das in den üblichen Schnittbildern (zum Beispiel Abb. 12) nicht sichtbar gemachte Material erscheint hier dunkel und zudem stark geschrumpft. Die Membranen der Teilchen sind, obgleich kollabiert, intakt geblieben. Abb. 14 zeigt einen analogen Ausschnitt aus dem unbehandelten Kontrollpräparat: das Partikelinnere erscheint weitgehend elektronendurchlässig!

Auch eine vorsichtige Beurteilung der Versuchsergebnisse erlaubt, den Hauptanteil der beschatteten Restsubstanzen der Stoffklasse der Proteine zuzuordnen. Als Indiz dafür muss die auffällige Schrumpfung, die jedenfalls nicht durch Fette verursacht wird, hervorgehoben werden. Wiederholt man nämlich diesen Extraktionsversuch mit emulgiertem Öl, so findet man inhaltslose Tröpfchen. Dieses gegensätzliche Resultat lässt erkennen, dass jene (in Abb. 15 veranschaulichten) Stoffe offenbar mit der Grundsubstanz der Sphärosomen in Beziehung gebracht werden müssen. Diese Überlegungen geben nun folgende Vorstellung frei: Die Fetttropfen enthalten keinen im physikalisch-chemischen Sinne homogenen Inhalt. Neben Triglyceriden müssen noch irgendwelche Proteine oder Lipoproteine vorliegen, die auf das Sphärosomenstroma zurückgehen dürften. Dieses würde damit nicht, wie nach den üblichen Schnittbildern (zum Beispiel Abb. 7, 9) vermutet werden könnte, durch die Fettsubstanzen nach und nach ersetzt oder verdrängt, sondern lediglich «maskiert», das heisst der kontrastierenden Wirkung von Os und Mn weitgehend entzogen.

Unter diesem Gesichtspunkt setzt sich der Inhalt der zellulären Fetttropfchen aus zwei stofflich verschiedenartigen Komponenten zusammen:

1. aus einem nicht fettartigen, vermutlich eiweisshaltigen Grundgerüst und
2. aus unkontrastierbaren, neutralen Lipiden.

VII. Besprechung der Ergebnisse

1. Entwicklung der Fetttropfen (Abb. 19)

Rückblick: In allen untersuchten pflanzlichen Objekten sind die Fetttropfchen Abkömmlinge des ER und durchlaufen in ihrer Entwicklung das Sphärosomenstadium. Die Fetttropfengeneese wird durch eine Vesikelbildung an den Ästen des Retikulums eingeleitet. Die Akkumulation elektronenoptisch dichten Materials erfolgt in der Regel vor oder unmittelbar nach der Abschnürung. In Übereinstimmung mit den stromahaltigen Organellen entwickelt sich jede Partikel individuell. Ein Verschmelzen zweier oder mehrerer Teilchen konnte weder licht- (BRÜNNIG, 1935; STEINER, 1957) noch elektronenmikroskopisch beobachtet werden. Ihr Zusammenfliessen wird offenbar durch die begrenzende Elementarmembran verhindert. Mit der anfänglich gedrosselten Fettsynthese erscheinen vermehrt Proosphärosomen (Abb. 10). (Bei *Brassica Napus* dauert die Samenreifeung ca. 30 Tage. Während 12—15 Tagen nach der Befruchtung wird nur mässig Fett gebildet; ZELLER [1957].) Die später beschleunigte Fettbildung und -anreicherung erfolgt, unter Aufhellung der Granulärstruktur (Abb. 7, 9, 10), ausschliesslich in den Sphärosomen. Mit der Ausbildung der transparenten Partikeln ist der Vorgang abgeschlossen. In reifen Ölsamen ruht die gesamte Fettreserve in diesen relativ kleinen Zelleinschlüssen ($d = 0,2—1,3 \mu$).

In Zellen ohne besondere Speicheraufgaben (Blattepidermen, Tapetumparenchym, Wurzelmeristeme, Kotyledonarknoten etc.) scheint die Entwicklung mit der Bildung der Sphärosomen abgeschlossen zu sein. In diesem Falle stellen die Sphärosomen stabile Dauerformen dar. Derartige Gewebe können jedoch unter ganz bestimmten Umständen (zum Beispiel bei der fettigen Degeneration oder durch experimentellen Entzug von O_2 oder Licht) zur abnorm erhöhten Fettsynthese angeregt werden und zeigen dann ebenfalls die Differenzierung der Sphärosomen zu Fettkörperchen.

2. Feinbau

Es erhebt sich die Frage nach der chemischen Natur des in den Sprossabschnitten des ER auftretenden Materials (Tafel V; Abb. 6, 7), welches später das Stroma der kleinen und grossen Sphärosomen bildet.

a) Fixationsproblem: Die in der elektronenmikroskopischen Technik verwendeten, schwermetallhaltigen Standardreagenzien (OsO_4 , $KMnO_4$, Uranylacetat, Phosphorwolframsäure) reagieren mit den höherschmelzenden Neutralfetten nicht oder, wie zum Beispiel das Osmiumtetroxyd, nur ausserordentlich schwach (BAHR, 1954; PORTER und KALLMANN, 1953; MERCER und BIRBECK, 1961). Dieser Sachverhalt kommt auch in den Werten der Tab. 1 klar zum Ausdruck. Es ist übrigens erstaunlich, dass selbst die stark ungesättigten Fettsäureester, welche zum Beispiel in Lein- oder Sonnenblumenöl prozentual vorherrschen, keine nennenswerte Reaktion einzugehen vermögen (vgl. Abb. 18). Für dieses unerwartete Verhalten ist wohl in erster Linie die Natur der wenig lipophilen Reagenzien verantwortlich zu machen. Aus diesem Grunde erscheinen die Fettkörperchen, entgegen der allgemeinen Ansicht (REIMER, 1959; SITTE, 1958), im Elektronenbild hell (vgl. hierzu WETTSTEIN, 1957). In den «Übergangsformen» (siehe Schematafel V, Abb. 19) dürfte somit der helle Innenhof inaktive Neutralfette vorstellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen solcher Differenzierungsstadien finden sich auch in Veröffentlichungen von MANTON (1957) und MOLLENHAUER (1957) und werden von letzterem als «unidentified cytoplasmic bodies» bezeichnet.

Unter diesem Gesichtspunkt erweist sich der optisch leere Innenraum der Fettkörperchen als ein Fixierungsartefakt und damit erst in zweiter Linie als Folge einer Materialextraktion durch organische Entwässerungsmittel wie Aceton, Alkohol usw. Diese Auffassung bestätigen Versuche mit dem «wasserlöslichen» Einbettungsmittel Durcupan, die ebenfalls zu geschrumpften Teilchen führten.

b) Sphärosomeninhalt: Infolge des beschriebenen Verhaltens der Sphärosomen und Fetttropfen gegenüber den verwendeten Fixier- und Kontrastmitteln lässt sich die kräftige Granulation in den Evaginationen des ER und in den Sphärosomen nicht der Gegenwart neutraler Lipide zuschreiben! Dennoch enthalten auch die Sphärosomen Fette, zeigen sie doch im Lichtmikroskop eine deutlich positive Fettreaktion. Für die Anwesenheit von Fetten spricht zudem ihr weitgehend indifferentes Verhalten gegenüber osmotischem Schock. Auch die mit Formol erreichbare hohe Formstabilität der Teilchen weist auf einen beträchtlichen Fettgehalt hin. Endlich werden die Sphärosomenfette durch die Morphogenese der Fetttropfchen bei der

Entwicklung der Ölsamen erneut bestätigt. Überdies treten in der ersten, durch einen flachkurvigen Fettanstieg gekennzeichneten Reifeperiode (ZELLER, 1957) vorwiegend Sphärosomen auf, während Fetttropfen fehlen. Dieser Befund rechtfertigt die frühere Aussage über das Fettspeichervermögen der Sphärosomen.

Die hohe Reaktionsfähigkeit des Stromas mit $KMnO_4$, Phosphorwolframsäure und Uranylacetat lässt vermuten, dass die markante Granulärstruktur zur Hauptsache durch Proteine oder Lipoproteine zustande kommt. Diese Vorstellung korre-

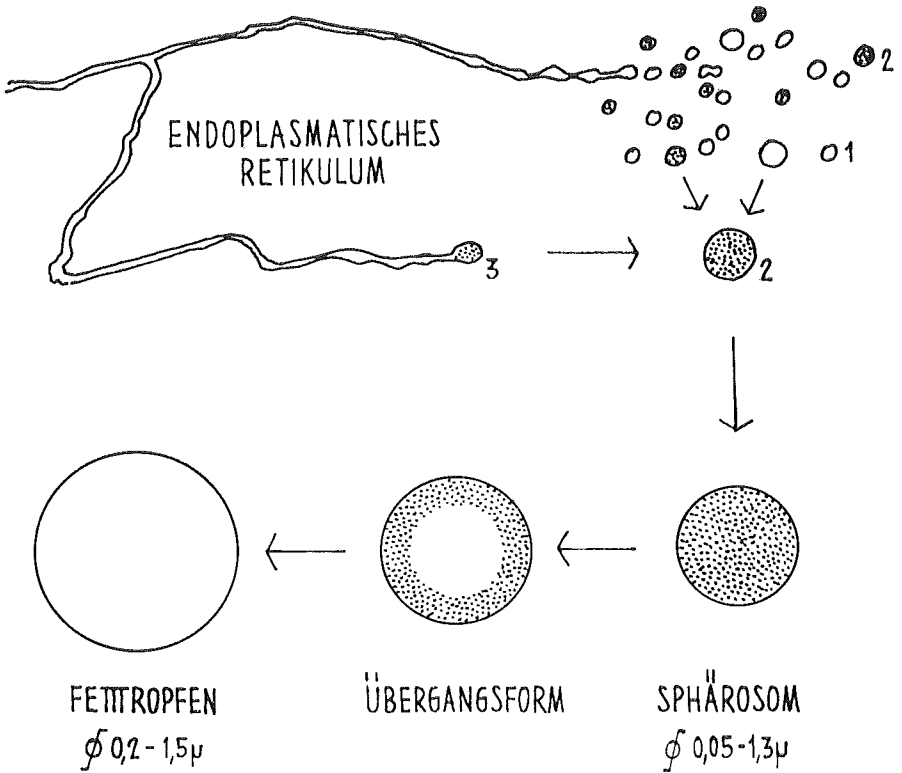


Abb. 19. Entwicklungsschema der Fettkörperchen des pflanzlichen Cytoplasmas.

1 Vesikel des ER ($d = 300 - 1500 \text{ \AA}$). 2 Jüngste Sphärosomenformen, sogenannte «Prosphärosomen» ($d = 300 - 1000 \text{ \AA}$). 3 Endständige Erweiterung des ER mit Sphärosomenstroma.

spondiert mit Resultaten aus Färbeversuchen an Sphärosomen. PERNER (1952a) findet in entfetteten Sphärosomen dunkelbraune Reststoffe, die sich mit klassischen Proteinindikatoren wie Pyronin, Rosanilin, Viktoriablau und andern färben lassen, während die Fettreaktion negativ verläuft. Man wird kaum fehlgehen, wenn man diese proteinhaltigen Überreste der Gegenwart der Grundsubstanz zuschreibt, zumal eigene Extraktionsversuche an Fettkörperchen zu ähnlichen Ergebnissen führten

(s. S. 16/17). Der Doppelcharakter der Inhaltsstoffe — Stromaproteine, Depotfette — lässt nun die oft gegensätzlich beurteilte Affinität der Sphärosomen zu den basischen Fluoreszenzfarbstoffen einerseits und den gebräuchlichen Fettreagenzien andererseits verständlich werden.

c) Fetttropfeninhalt: Wie die Sphärosomen verfügen auch die zellulären Fettkörperchen über proteinartige Stromasubstanzen. Diese treten allerdings erst nach der beschriebenen Abtrennung der Fette augenfällig in Erscheinung und antworten auf verschiedene organische Lösungsmittel (Aceton, Petroläther, Acetate usw.) mit einer deutlichen Schrumpfung (Abb. 15). Ferner weist auch das hohe Brechungsvermögen der Sphärosomen und Fetttropfen (sie sind phasenkontrastoptisch nicht voneinander unterscheidbar! DRAWERT und MIX, 1962; STEFFEN, 1953) auf eine ähnliche Zusammensetzung der Inhaltsstoffe hin. Als gemeinsame Komponenten kommen auch in dieser Hinsicht Lipide und wiederum Proteine in Betracht. Rapsöl zum Beispiel besitzt einen Brechungsindex (n_D) von 1,456—1,466, während Strukturproteine einen wesentlich höheren n_D -Wert von ca. 1,58 aufweisen (Chloroplastenprotein, Neurokeratin, Muskelmyosin; FREY-WYSSLING, 1957).

Die hervorstechende hohe Lichtbrechung der Sphärosomen und Fetttropfen dürfte somit wie folgt entstehen: 1. Die während der Differenzierung abnehmende Hydratation des Stromas ermöglicht eine vermehrte Lipideinlagerung. Damit wird die von JAROSCH (1961) gefundene, verstärkte Refraktion der Sphärosomen gegenüber den Proosphärosomen verständlich. 2. Künstliche Öltropfen zeigen im Vergleich mit Sphärosomen und Fetteilchen eine geringere optische Dichte (relativ heller Phasenkontrast). Diese Beobachtung lässt sich mit der Annahme erklären, dass ausser dem mehr oder weniger ausgeprägten Fettanteil dieser Partikeln noch zusätzliche, stark lichtbrechende Verbindungen vermutlich proteinartiger Natur vorliegen. In diesem Sinne spricht auch die vorerwähnte hohe Eigendichte formalinfixierter Sphärosomen.

d) Übergangsformen: Die charakteristische Granulärstruktur des Sphärosomenstromas scheint beim letzten Schritt der Fetttropfenentwicklung durch das zunehmende Fett allmählich verdrängt zu werden (Abb. 7, 8). Dies ist aber nicht der Fall: das Stroma bleibt und bildet, wenn auch relativ abnehmend, ein konstantes Bauelement der Fetttropfchen. Es wird jedoch in dem vermehrt gebildeten Neutralfett zusehends eingeschlossen und dadurch der elektronenmikroskopischen Präparation beziehungsweise Beobachtung endgültig entzogen (Abb. 14). Die üblichen Schnittpräparate vermögen daher über die Gegenwart des Stromas keine Auskunft zu geben. Erst nachdem die Fette quantitativ herausgelöst worden sind, kann jenes mit Hilfe einer Metallaufdampfung sichtbar gemacht werden (Abb. 15).

3. Funktion

Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf enge Beziehungen zwischen dem Sphärosomenstroma und dem Fettstoffwechsel schliessen. Im Zusammenhang mit dem obligaten Auftreten der Sphärosomen in der Genesereihe der Fetttropfchen könnte ihre Funktion somit bestehen: 1. In der Synthese der Fette, 2. In der Hereinnahme von a) im Grundplasma synthetisierten Fettmolekülen oder b) Fettsäuren und Glycerin, die dann im Sphärosom verestert würden. Nun kommen zwar die Sphärosomen für

den Fettsäureaufbau kaum in Frage, da die hierzu erforderlichen Enzymssysteme in den Mitochondrien lokalisiert sind (KARLSON, 1961; ODA et al., 1957; STUMPF und BARBER, 1956). Damit würde die zweite Möglichkeit, das heisst die Biosynthese zu Glycerinester, um so wahrscheinlicher. Von den zur Veresterung verantwortlichen Enzymen ist die saure Phosphatase unlängst von WALEK-CZERNECKA (1962) in den Sphärosomen der lebenden Zwiebel-Epidermis entdeckt worden; weder Mitochondrien noch Plastiden zeigten nachweisbare Aktivitäten. Inwiefern es sich eventuell um ein rein oberflächlich gelagertes Enzym handelt, kann auf Grund der lichtoptischen Befunde allerdings nicht beurteilt werden. Im Zusammenhang mit dem frühen Sichtbarwerden der Fette im Innern der Sphärosomen sind wir jedoch bereit, die Grundsubstanz als Enzymträger anzusprechen.

Das von PERNER (1952a) beobachtete nadipositive Verhalten der Sphärosomen sowie auch ihre Eigenschaft, Formazan aufzunehmen (ZIEGLER, 1953 a, b), lassen keine Beziehungen zur sauren Phosphatase erkennen. Somit fehlt der ihnen beige-messenen Mitochondrien-Aktivität (PERNER, 1952a, 1958) bis heute jede experimentelle Grundlage — die Gegenwart eines Enzyms des Fettstoffwechsels steht indessen fest!

Die speziellen morphologischen Eigenschaften (begrenzende Elementarmembran, enzymtragendes Stroma) sowie das zellphysiologische Verhalten kennzeichnen die Sphärosomen als Organelle. Auf Grund der ihnen zufallenden Teilfunktionen, Fettbildung und Fettspeicherung, sind sie keine inerten Vorstufen der Fetttropfen (wie bei GUILLIERMOND, 1921; DRAWERT und MIX, 1962; STEFFEN, 1953, und andern vermutet), sondern erfüllen, wie von STEINER (1954) bereits erkannt, als «primäre Orte» der Fettbildung eine funktionelle Aufgabe.

Das intrazelluläre Fett der Pflanzen entsteht demnach nicht, wie unter dem Einfluss kolloidchemischen Denkens allgemein angenommen wurde (vgl. etwa DAN-GEARD, 1919; DRAWERT, 1954; GUILLIERMOND, 1924; GUTZ, 1956), durch Zusammen-treten der im Grundplasma gebildeten Triglyceridmoleküle zu lichtmikroskopisch wahrnehmbaren Tröpfchen, sondern in individuellen Konstituenten des Cytoplasmas, den Sphärosomen.

Zusammenfassung

Durch die seit Jahren bestehende Kontroverse um Herkunft und Beziehung der Sphärosomen und Fetttropfen veranlasst, wurden pflanzliche Gewebe, die reich an derartigen Teilchen sind, elektronenmikroskopisch untersucht.

Die Sphärosomen entstehen aus abgeschnürten Bläschen des endoplasmatischen Retikulums. In Fettgeweben differenzieren sie zu Fetttropfen. Das feingranuläre Sphärosomenstroma ist auf Grund seines cytochemischen Verhaltens an der Fettsynthese beteiligt. Sowohl Sphärosomen wie Fetttropfen sind von einer glatten, das heisst ribosomenfreien Elementarmembran umgeben. Aus der Tatsache, dass die Fettreserven der Zellen in besonderen Teilchen gebildet und angereichert werden, geht hervor, dass die Sphärosomen keine «toten» Zelleinschlüsse, sondern funktionell aktive Organelle darstellen.

Literatur

- BAHR, G. F. (1954): *Exper. Cell Res.* 7, 457.
- BAHR, G. F., BLOOM, G. and FRIBERG, V. (1957): *Ibid* 12, 342.
- BAIRATI, A. and LEHMANN, F. E. (1954): *Experimentia* 10, Nr. 14, 173.
- BAUTZ, E. und MARQUARDT, H. (1953): *Naturwiss.* 40, 531.
— (1953): *Ibid.* 40, 532.
- BRÜNNIG, E. (1935): *Z. wiss. Mikroskop.* 52, 166.
- CLAUDE, A. (1943): *Science* 97, 451.
- DANGEARD, P. A. (1919): *C. r. Acad. Sci. Paris* 169, 1005.
- DRAWERT, H. (1952): *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 65, 263.
— (1953): *Ibid.* 66, 135.
— (1954): *Ibid.* 67, 33.
- DRAWERT, H. und MIX, M. (1962): *Ibid.* 75, 128.
- FREY-WYSSLING, A. (1957): *Macromolecules in Cell Structure*. Harvard Univ. Press. Cambridge, Mass.
- GRAFFI, A. (1941): *Z. Krebsforschung* 49, 477.
- GUILLIERMOND, A. (1910): *Arch. Protistenk.* 19, 289.
— (1913): *C. r. Soc. Biol. Paris* 74, 618.
— (1921): *C. r. Acad. Sci. Paris* 172, 1676.
— (1924): *Am. Sci. natur. Bot., Sér. X*, 6, 1.
- GUILLIERMOND, A., MANGENOT, A. et PLANTEFOL, L. (1933): *Traité de cytologie végétale*, Librairie E. le François, Paris.
- GUTZ, H. (1956): *Planta* 46, 481.
- V. HANSTEIN, J. (1880): *Biologie des Protoplasmas*. Bot. Abhdlgn. Morphol. u. Physiol. 4, Heft 2, Bonn.
- HIRSCH, G. CHR. (1961): *Acta medicinae Okayama* 15, 5.
- HOHL, H.-R. (1960): *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 70, 395.
— (1960/61): *Phytopath. Z.* 40, 317.
- JAROSCH, R. (1961): *Protoplasma* 53, 34.
- KARLSON, P. (1961): *Lehrb. der Biochemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- KINZEL, H. (1954): *Protoplasma* 44, 52.
- KÜTTIG, W. (1957): *Ibid.* 48, 562.
- LINDSTROM, E. W. and FISK, G. (1926): *Iowa Agric. Exper. Stat. Res. Bull.* 98, 277.
- LOW, F. W. (1954): *Anat. Rec.* 120, 827.
- MANTON, I. (1957): *J. of Exper. Bot.* 8, 383.
- MARQUARDT, H. (1952): *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 65, 197.
- MARQUARDT, H. und BAUTZ, E. (1954): *Naturwiss.* 41, 361.
— (1955): *Arch. Microbiol.* 23, 251.
- MERCER, E. H. and BIRBECK, M. S. C. (1961): *Electron Microscopy*, Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- MEYER, A. (1904): *Bot. Z.* 62, 113.
- MIX, M. (1958): *Protoplasma* 50, 434.
- MOLLENHAUER, K. (1959): *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6, 431.
- NOVIKOFF, A. B., SHIN, W.-Y. and DRUCKER, J. (1961): *Ibid.* 9, 47.
- ODA, T., YOSHIZAWA, K., NAKAMOTO, T. KUBO, Y. and OKAZAKI, H. (1957): *Acta Medic. Okayama* 12, 29.
- PARSONS, D. S. and DARDEN, E. B. (1961): *Exper. Cell Res.* 24, 466.
- PERNER, E. S. (1952a): *Biol. Zbl.* 71, 43.
— (1952b): *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 65, 52.
— (1953): *Protoplasma* 42, 457.
— (1958): *Protoplasmatologia* 3, A2, 1.
- PERNER, E. S. und PFEFFERKORN, G. (1953): *Flora (Jena)* 140, 98.
- PORTER, K. R. and KALLMANN, F. (1953): *Exper. Cell Res.* 4, 127.

- REIMER, L. (1959): Elektr. mikr. Untersuchungs- und Präparationsmethoden. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- SITTE, P. (1958): *Protoplasma* 49, 447.
- STÄUBLI, W. (1960): *C. r. Acad. Sci. Paris* 250, 1137.
- STEFFEN, K. (1953): *Flora* 140, 140.
- (1955): Chondriosomen und Mikrosomen, *Handb. d. Pflanzenphysiol.* 7, 574.
- STEINER, M. (1954): *Naturwiss.* 41, 90.
- (1957): Die Physiologie d. Fettbildg. u. Fettspeichg. bei niederen Pflanzen. *Handb. d. Pflanzenphysiol.* 7, 209.
- STOECKENIUS, W. (1960): 4. Intern. Congr. Elektr. Mikrosk. 2, 174.
- STRUGGER, S. (1939): *Biol. Zbl.* 59, 274.
- (1960): Arbeitsgem. Forsch. Nordrhein-Westfalen. H. 65 a. Westdt. Verlag, Köln und Opladen.
- STUMPF, P. K. and BARBER, G. A. (1956): *Plant Physiol.* 31, 539.
- WALEK-CZERNECKA, A. (1962): *Acta Soc. Polon.* 31, 539.
- v. WETTSTEIN, D. (1957): *Exper. Cell Res.* 12, 427.
- WILL, H. (1896): *Zbl. Bakter.* II 2, 752.
- ZELLER, A. (1957): *Handb. d. Pflanzenphysiol.* 7, 280.
- ZETTERQVIST, H. A. (1956): *Diss. Karol. Inst. Stockholm.*
- ZETTNOW, E. (1899): *Z. Hygiene* 30, 1.
- ZIEGLER, H. (1953 a): *Z. f. Naturforsch.* 8, 662.
- (1953 b): *Naturwiss.* 40, 144.

