

# Aleuronvakuolen und Sphärosomen im Endosperm von *Ricinus communis* während der Samenreifung und Keimung

Autor(en): **Schwarzenbach, Alfred Michael**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **81 (1971)**

PDF erstellt am: **19.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-57127>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# **Aleuronvakuolen und Sphärosomen im Endosperm von *Ricinus communis* während der Samenreifung und Keimung**

Von *Alfred Michael Schwarzenbach*

Laboratorium für Elektronenmikroskopie I der ETH Zürich

Manuskript eingegangen am 14. April 1971

## **Inhalt**

1. Einleitung und Problemstellung. – 2. Histologie der *Ricinus*-Frucht. – 3. Material und Methoden. – 4. Resultate. A. Die Samenreifung. B. Die Keimung. – 5. Diskussion. – Zusammenfassung. – Summary. – Literatur.

## **1. Einleitung und Problemstellung**

### *a) Geschichtlicher Rückblick*

Die ersten grundlegenden Arbeiten über Samengewebe gehen auf Hartig (1855), Nägeli (1928) und Pfeffer (1872) zurück. Die drei Forscher beschrieben die typischen Samenspeicherstoffe Stärke, Lipide, Proteine und Phosphate vor allem mit mikrochemischen Methoden. Schon damals erwies sich der *Ricinus*-Samen als besonders günstiges Untersuchungsobjekt für Reserveeiweisse: Die reifen Endospermzellen enthalten praktisch nur Öltröpfchen und Aleuronvakuolen. Nach der Extraktion des Öls können die Aleuronvakuolen mühelos untersucht werden; sie sind in allen Zellen vorhanden, verhältnismässig gross und weisen regelmässig ein grosses Proteinkristalloid auf.

Schon im letzten Jahrhundert wurden einige grundlegende Beiträge zum Bau der Aleuronvakuole geleistet. Hartig (1855) gilt als Entdecker der Reserveeiweisse, die er «Aleuron» oder «Klebermehl» nannte. Nach dem damaligen Stand des Wissens klassifizierte man die Grundsubstanz der Aleuronvakuolen zu den Albuminen, die kristallinen Eiweisskörper bezeichnete man als Proteinkristalloide. Nägeli (1928) beobachtete die Färb- und Quellbarkeit von «kristallähnlichen Proteinkörpern» und bezeichnete sie, zum Unterschied von echten Kristallen, als «Kristalloide». Diese Bezeichnung wird auch heute noch verwendet.

Die erstmalige Beobachtung, dass Reserveeiweisse in Vakuolen (Schleimbläschen) deponiert werden, geht auf Maschke (1859) zurück; seine Meinung setzte sich jedoch nicht durch. In den Arbeiten von de Vries (1885) und Went (1888) wurden dann Beweise für die Vakuolennatur dieser Organellen erbracht und damit der Ausdruck «Aleuronvakuole» anstelle von «Proteinkörper» (v. Holle, 1858) oder «Proteinkörner» (Pfeffer, 1872) eingeführt. Der Ausdruck «Globoide» für die phosphatspeichernden Körperchen, welche regelmässig in Aleuronvakuolen auftreten, geht auf Pfeffer (1872) zurück. Die Globoide enthalten ein Ca-Mg-Salz der Inosithexaphosphorsäure.

## b) Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit werden Endosperm und Embryo von *Ricinus communis* in verschiedenen Entwicklungsstadien beschrieben. Dabei wurde die Ontogenie von Aleuronvakuolen und Sphärosomen und deren Verhalten während der Keimung mit Hilfe des Elektronenmikroskopes untersucht. Dank der Gefrierätztechnik konnten Einblicke in die Zytologie des trockenen Samengewebes gewonnen und ein Beitrag zur Kenntnis von Struktur und Funktion der Aleuronproteine geleistet werden.

## 2. Histologie der Ricinusfrucht

Um die Gewebe des Samens im Elektronenmikroskop identifizieren zu können, wurden vorerst mit Bromphenolblau oder Osmiumtetroxid gefärbte Schnitte im Lichtmikroskop untersucht. Unsere Beobachtungen zeigten, dass das Samengewebe während der Reifung eine Entwicklung durchläuft, die in folgende drei Phasen unterteilt werden kann:

1. Wachstum durch Zellteilung (bis 15. Tag nach Befruchtung);
2. Auffüllen mit Speicherstoffen (15. bis 45. Tag);
3. Austrocknung (45. bis 60. Tag).

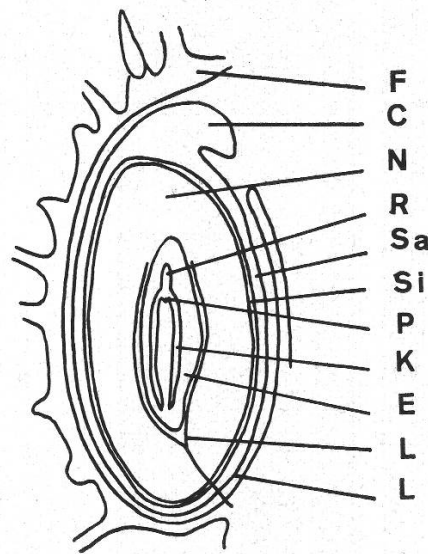


Abbildung I

Schematischer Schnitt durch eine 15 Tage alte *Ricinus*-Frucht. F Fruchtwand. C Caruncula. N Nucellus. R Radicula. Sa äussere Samenschale. Si innere Samenschale. P Plumula. K Kotyledon. E Endosperm. L Leitbündel

Während dieser etwa 60 Tage dauernden Entwicklung erfahren die einzelnen Fruchtgewebe folgende, für die Beurteilung der Stadien wichtige Veränderungen:

a) Die Fruchtwand zirka 10 Tage alter Früchte ist rot gefärbt; sie trägt weiche Stacheln, die später verfestigt werden. Nach 40 Tagen ist die Fruchtwand weinrot und stirbt in der Austrocknungsphase ab, wobei sie sich braun verfärbt.

b) Die hautartige, äussere Schicht der Samenschale ist zuerst farblos. Nach zirka 25 Tagen wird sie an den Polen braun und weist im reifen Zustand eine braunweisse Scheckung auf.



c) Die innere Schicht der Samenschale kann bereits in jungen Entwicklungsstadien in Form eines Zylinderepithels identifiziert werden. Später differenzieren sich die Zellen zu Fasern, welche schliesslich die harte, innere Schicht der Samenschale bilden.

d) Der Nucellus nimmt anfänglich einen grossen Teil des Sameninneren ein; er wird im Verlauf der Reifung vom wachsenden Endosperm an die Samenschale gedrückt. Während der Austrocknungsphase wird der Nucellus auf ein Häutchen reduziert.

e) Das Endosperm ist von Leitgewebe eingehüllt und füllt im reifen Samen den Raum zwischen Samenschale und Embryo aus.

f) Im Endosperm eingebettet liegt der aus Plumula, Radicula und Kotyledonen bestehende Embryo.

### 3. Material und Methoden

Die Ricinuspflanze gehört zur Familie der Euphorbiaceen. Die für die vorliegenden Versuche verwendete Art *Ricinus communis* ssp. *arbolescens* wurde im Treibhaus kultiviert.

**Fixation und Einbettung:** Zur Herstellung von Schnittpräparaten wurden Gewebestückchen nach Hess (1966) in 3 % Acrolein und 3 % Glutaraldehyd im 0,1 m Cacodylatpuffer, stabilisiert mit 0,1 m  $\text{CaCl}_2$  und 0,14 m KCl bei pH 7,0, vorfixiert und mit 2 %  $\text{OsO}_4$  für 2 Stunden im Eisbad fixiert. Goldchlorid, Formaldehyd und Kaliumpermanganat erwiesen sich als weniger geeignete Fixationsmittel für Samengewebe. Nach der Entwässerung folgte die Einbettung in Araldit-Epon (Mollenhauer, 1964) oder Maraglass (Freeman und Spurlock, 1962). Die Schnittbänder wurden auf mit Kohle verstärkte Formvarnetzchen aufgefangen und mit Bleicitrat nach Reynolds (1963) nachkontrastiert.

**Gefrierätzung:** Das für die Gefrierätzung (Moor et al., 1961; Moor und Mühlethaler, 1963) verwendete Material wurde ebenfalls in der oben erwähnten Glutaraldehyd-Acrolein-Lösung während einer Stunde bei 4 °C fixiert. Anschliessend wurden die Proben während einer bis mehrerer Stunden mit 20 bis 30 % Glycerin bei Zimmertemperatur imbibiert, hierauf auf Goldplättchen übertragen und in flüssigem Freon 22 eingefroren. In anderen Versuchen wurde das Gewebe unfixiert eingefroren. Nach der Gefrierätzung wurde der Platin-Kohle-Abdruck in 40prozentiger Chromsäure während 1 bis 2 Stunden gereinigt. Mehrere Versuche mit verschiedenen Samengeweben zeigten, dass Chromsäure fettreiche, sehr trockene Zellen am besten ablöst.

### 4. Resultate

#### A. Die Samenreifung

##### a) Untersuchte Stadien

Die Entwicklung des Endosperms wurde in fünf Stadien eingeteilt:

- I 5 Tage nach Befruchtung; rote Fruchtwand mit Narbe
- II 15 Tage, Fruchtwand rot mit Stacheln; Samen weiss
- III 30 Tage, Fruchtwand braunrot; Pole der Samen braunrot
- IV 45 Tage, Stacheln trocknen aus; Samen rosa gescheckt
- V 60 Tage, Fruchtwand trocken; Samen braunrot gescheckt



## b) Gewebedifferenzierungen während der Samenreifung

Schon im Stadium der Befruchtung kann die Anlage zur *Samenschale* im Licht- und Elektronenmikroskop identifiziert und damit das Sameninnere abgegrenzt werden. Ihre meristematischen Zellen zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Dictyosomen und Plastiden aus. Später differenzieren die Zellen zu Fasern mit starken Zellwänden und bilden schliesslich die harte Samenschale.

Innerhalb der Samenschale liegt der *Nucellus*, ein lockeres Gewebe mit grossen, vakuolisierten Zellen, die im Laufe der Samenreifung keine morphologischen Veränderungen erfahren.

Zwischen Nucellus und Endosperm liegen *Leitbündel*, die in gefärbten Präparaten eine gut sichtbare Grenzschicht bilden.

Die Vermehrung der *Endospermzellen* erfolgt in einer peripheren Zone, die direkt an die Leitbündel anschliesst.

Der *Embryo* kann in jungen Stadien nur schlecht vom Endosperm unterschieden werden, weil anfänglich beide Gewebe dieselben Entwicklungsschritte durchlaufen.

## c) Die Zellorganellen im Endosperm

Stadium I: Die jungen Endospermzellen (Abb. 1) enthalten ein dichtes Zytoplasma, das von rauhem endoplasmatischem Reticulum (ER) und Dictyosomen durchsetzt ist. Zahlreiche Mitochondrien lassen auf eine starke Atmungstätigkeit schliessen. Die Zellkerne weisen in der Regel einen grossen Nukleolus auf.

Während der Differenzierung entstehen grosse Zentralvakuolen (Abb. 2). Das Zytoplasma wird dadurch auf einen wandständigen Belag reduziert, der nur noch wenig rauhes ER enthält. Gelegentlich können «Microbodies» (Abb. 2a) beobachtet werden. Die Synthesetätigkeit der Zellen scheint sich zu diesem Zeitpunkt vorwiegend auf den Ausbau der Zellwand zu beschränken, wie aus der Aktivität der Dictyosomen hervorgeht. Dabei entsteht ein Gewebe mit ineinandergefältelten Zellgrenzen, die für das erste Stadium charakteristisch sind (Abb. 2, 3).

Stadium II: Nach einer 15tägigen Latenzzeit erfahren die Endospermzellen eine Umgestaltung: Zuerst nehmen das ER (Abb. 4) und die Zahl der Ribosomen im Grundplasma zu, während die Zentralvakuolen schrumpfen. Vereinzelt treten Provakuolen und Sphärosomen auf. Die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle steigt, während der Anteil des ER, die Dictyosomen und die Zellkerne unverändert bleiben.

Später werden die Provakuolen zahlreicher, und es treten deutlich erkennbare Proplastiden auf, die sich um den Kern gruppieren (Abb. 5). Gleichzeitig werden in der ganzen Zelle verstreut Sphärosomen gebildet. Im Schnittpräparat erscheinen sie schwach kontrastiert (Abb. 6a–d). Im Gefrierabdruck weisen sie eine homogene Innenstruktur auf (Abb. 7a–c). Oberflächenansichten treten selten auf, vermutlich weil die Bruchfläche bevorzugt durch die Lipidmatrix verläuft.

Die Sphärosomen entstehen aus kleinen Vesikeln mit Einheitsmembran (Abb. 6b–f), die nach Grieshaber (1964) vom ER abstammen (Abb. 6b). Ihre Identifikation gelingt anhand der charakteristischen, homogenen Matrix, die nach Osmiumfixation leicht kontrastiert erscheint. Die Abbildungen 6b–f zeigen, dass die Dicke der mittleren Schicht der Einheitsmembran zunimmt, das Lumen der Vesikeln dabei eingeengt wird (Abb. 6c, e) und schliesslich verschwindet. Das Sphärosom wird nach dieser Entwicklung nur noch vom äusseren Blatt der Einheitsmembran umschlossen (Abb. 6a, b, c, e). Während der weiteren Volumenzunahme der Sphärosomen wird die Struk-

tur der Hülle granulär (Abb. 6b, c), eine Beobachtung, die sowohl im Schnittpräparat als auch im Gefrierabdruck gemacht werden kann.

Stadium III: Die Endospermzellen sind mit Zytoplasma und Organellen angefüllt. Das rauhe ER hat sich erneut ausgedehnt, während die Verteilung von Mitochondrien, Proplastiden und Kernen unverändert geblieben und die Zentralvakuole zusammengeschrumpft ist. In diesem Stadium beginnt die Entwicklung der Aleuronvakuolen. Das Zytoplasma wird an einigen Stellen von Provakuolen durchsetzt (Abb. 8). Die enge Nachbarschaft dieser Vesikeln mit Elementen des ER und der Dictyosomen könnte auf einen ontogenetischen Zusammenhang hinweisen. An diesen Vakuolen können Stadien der Autophagocytose beobachtet werden (Abb. 9): Abschnitte des Zytoplasmas und ganze Organellen werden aufgenommen, verlieren an Kontrast und werden schliesslich völlig aufgelöst.

Stadium IV: 40 bis 45 Tage nach der Befruchtung setzt die Austrocknungsphase ein. Das Zytoplasma enthält wenig Ribosomen. ER und Dictyosomen sind nur noch selten zu beobachten (Abb. 10). Proplastiden sind keine mehr vorhanden: Sie scheinen von den Vakuolen verdaut worden zu sein. Mitochondrien und Zellkerne sind geschrumpft. Die Zahl der Sphärosomen hat stark zugenommen. Die Vakuolen nehmen keine oder nur kleine Vesikeln auf und weisen nun einen Durchmesser von ca.  $20 \mu$  auf (Abb. 11): Damit haben sie die Ausmasse der Aleuronvakuolen des folgenden Stadiums erreicht. In ihrem Innern sind stark elektronenstreuende Körper zu erkennen, die als Globoide interpretiert werden. Abbildung 11 zeigt eine Aleuronvakuole mit einem Globoid, in welcher ein Proteinkristalloid entsteht.

Stadium V: Das Präparat des lufttrockenen Endosperms stellt das Endstadium der Entwicklung dar. In diesen Zellen ist das Zytoplasma im Schnittpräparat auf dünne Säume zwischen den Speicherorganellen reduziert (Abb. 12–15). ER und Dictyosomen können nicht mehr identifiziert werden. Die Mitochondrien sind bei der Austrocknung zu kleinen Körperchen von ca.  $1 \mu$  Durchmesser zusammengeschrumpft. Obschon ihre Innenstruktur nicht mehr sichtbar ist, dürfen sie als Mitochondrien interpretiert werden, weil im vorhergehenden Stadium noch viele Mitochondrien vorhanden waren und die Vakuolen ihre Verdauungstätigkeit eingestellt haben. Auch die Zellkerne sind geschrumpft. Die Sphärosomen füllen den grössten Teil der Zellen aus. Ihr Inhalt wird bei der Präparation für die Schnitttechnik ausgewaschen (Abb. 12, 13), was im vierten Stadium noch nicht beobachtet werden konnte.

Die Aleuronvakuolen enthalten Globoide und Globulinkristalloide: In 90–150 nm dicken Schnitten erscheinen die Globoide stark elektronenstreuend, in dünneren Schnitten, wo das Phytin herausgebrochen ist, kontrastlos. Wenn das Phytin fehlt, bleibt eine membranartige Hülle zurück (Abb. 14).

Die Grundsubstanz der Albumine erscheint im Schnittpräparat flockig. Darin eingebettet liegen die lichtmikroskopisch sichtbaren, oktaederförmigen Globulinkristalloide. Im Wachstum begriffene Kristalloide stellen Kombinationen von Würfel und Oktaeder dar, die als «Kubooktaeder» bezeichnet werden. Wird das Wachstum in einer Richtung begünstigt, entstehen Modifikationen des Kubooktaeders.

Im Polarisationsmikroskop zeigen die Kristalloide keine Doppelbrechung, weil sie kubisch und somit optisch isotrop sind.

In den Schnittpräparaten weisen sie unregelmässige Umrisse auf (Abb. 14). Die Verwischung der Umrisse, die durch die Entwässerung bei der Einbettung verursacht wird, kann im Gefrierabdruck nicht beobachtet werden (Abb. 15). Trotz Entwässerung



bleibt die Feinstruktur im Innern der Kristalloide erhalten (Abb. 16). Die Gitterebenen werden durch parallel verlaufende, dunkle Linien dargestellt, die sich aus Partikeln von 60–70 Å Durchmesser zusammensetzen. Die Gitterkonstante beträgt im Mittel 50–60 Å. Der Vergleichswert aus dem Gefrierabdruck, bei dessen Herstellung keine Entwässerung benötigt wurde, beträgt 70–80 Å.

Über die Umrissform der Kristalloide konnten nur Gefrierabdrucke von nicht oder möglichst kurz gequollenem Material Aufschluss geben, denn die Deformation ist von der Quellungszeit abhängig. (Schon nach fünfstündiger Imbibition sind die Kristalloide völlig durch Quellungsrisse entstellt.) Als Umrisse wurden vor allem Hexagone und seltener Rhomben gefunden.

Einzelne Gitterebenen der Kristalloide treten in Präparaten von gequollenem Material deutlich in Erscheinung: Bei der Präparation wird das eingedrungene Quellungs- wasser sublimiert; dabei werden Feinstrukturen freigelegt, die im trockenen Samenge- webe, das kein ungebundenes Wasser enthält, verborgen bleiben. Liegen die Gitterebe- nen zur Spaltfläche leicht geneigt, erscheinen sie als Stufen (Abb. 18). Sind sie zur Ab- bildungsebene stärker abgewinkelt, erscheinen die Stufen als Treppen (Abb. 19) oder Rillen (Abb. 20). Auf den Gitterebenen werden kugelige Untereinheiten in hexagona- ler Anordnung sichtbar. Der mittlere Durchmesser der einzelnen Partikeln beträgt im Gefrierabdruck 80–100 Å (Abb. 17).

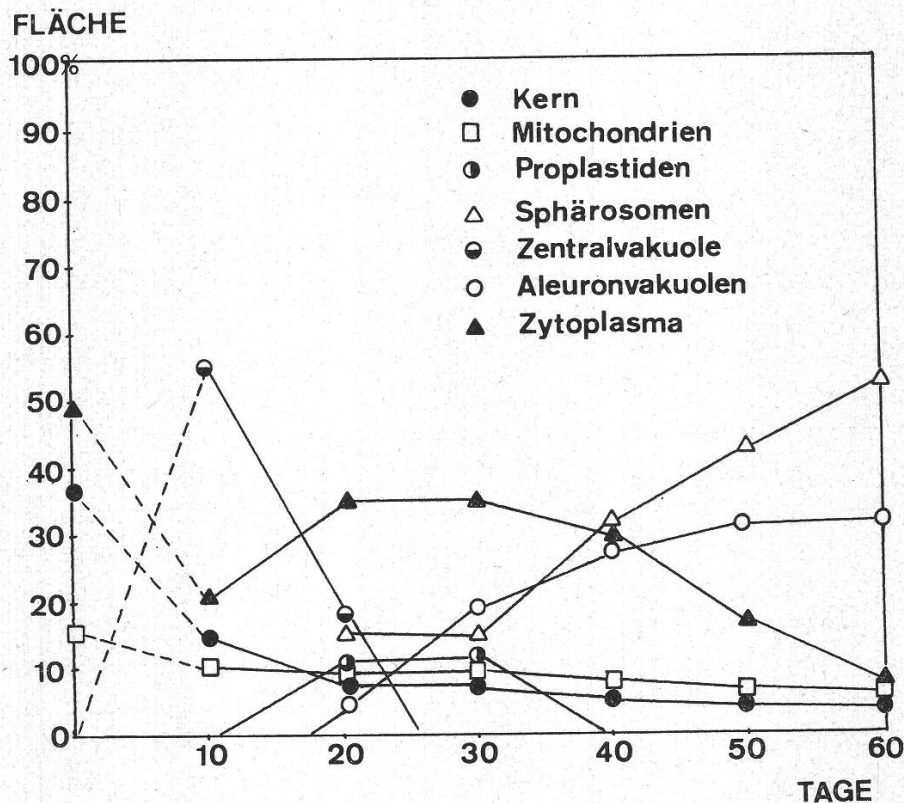


Abbildung II

Die approximative Flächenbeanspruchung der einzelnen Zellbestandteile, bezogen auf die ganze Zelle (100 %) als Funktion der Entwicklungszeit. Für den ersten Wert (1. Tag) wurde ein mehrere kleine Zellen umfassendes Gebiet ausgemessen, welches der Fläche einer Zelle der folgenden Stadien entsprach. Alle übrigen Werte stammen aus repräsentativen Schnitten von Zellen mit gleicher Flächenbeanspruchung



Die fünf Stadien der Endospermentwicklung werden in Abbildung II zusammengefasst. Die Kurven zeigen die Veränderung der approximativen Flächenbeanspruchung der einzelnen Organellen (bezogen auf die ganze Zelle) als Funktion der Entwicklungszeit. Diese Flächenbeanspruchungen wurden an charakteristischen Schnittbildern ermittelt unter der vereinfachenden Annahme, dass die ganze Zelle und die Organellen Kreisflächen darstellen. Die Flächenbeanspruchung der Organellen wird in % der gesamten Zellfläche ausgedrückt.

## B. Die Keimung

### a) Die Stadien

Ricinussamen wurden 12 Stunden vorgequollen und ausgesät. Vom Zeitpunkt der Aussaat an wurden täglich Keimlinge für die elektronenmikroskopische Untersuchung präpariert. Im Laufe der zirka 8tägigen Keimung wird das Endosperm abgebaut.

1. Tag nach Aussaat: Der Same ist äusserlich unverändert.
- 2.-3. Tag: Der Keimling sprengt die Samenschale.
4. Tag: Die Wurzel ist zirka 1,5 cm lang und bildet Seitenwurzeln.
5. Tag: Die Länge der Wurzel beträgt zirka 3 cm.
6. Tag: Der Keimling besitzt eine 4-5 cm lange Wurzel. Die Kotyledonen wachsen und werden an den Rändern grün. Das Endosperm ist stark aufgequollen.
- 7.-8. Tag: Längenwachstum des Stengels. Bei einigen Keimlingen können sich die Kotyledonen schon vom Endosperm befreien, bei anderen bleibt es kleben, bis es völlig ausgetrocknet ist.

### b) Die Zellorganellen

Die Kotyledonen saugen die Nährstoffe des Endosperms auf. Ihre Entwicklung wird deshalb in den Keimungsstadien zusammen mit derjenigen des Endosperms beschrieben:

Die Kotyledonen sind schon im trockenen Samen in Palisaden- und Schwammparenchym differenziert. Eine starke Zellwand schliesst das Schwammparenchym gegen das anstossende Endospermgewebe ab. Die Kotyledonenzellen (Abb. 21, 22) unterscheiden sich schon bei der Samenreife in wesentlichen Punkten von den Endospermzellen: Sie enthalten viel mit Ribosomen, ER, Dictyosomen und Proplastiden durchsetztes Grundplasma. Die Mitochondrien zeigen geringere morphologische Veränderungen als diejenigen im Endosperm; ihre Substruktur bleibt auch im trockenen Gewebe erkennbar. Die Kerne erscheinen weniger geschrumpft. Sphärosomen und Aleuronvakuolen sind seltener als im Endosperm. Die Kotyledonenzellen weisen somit eine geringere Differenzierung in Richtung eines Speichergewebes auf.

Am ersten und zweiten Tag der Keimung sind in den Endospermzellen noch keine Veränderungen festzustellen. Am dritten und vierten Tag zeigen die den Kotyledonen benachbarten Endospermzellen (Abb. 24) eine merkliche Wasseraufnahme. Ihr Zytoplasma beginnt sich aufzulockern, wobei gleichzeitig kleine Vesikeln auftreten. Es handelt sich dabei um Provakuolen. Andere Vesikeln mit doppelter Hülle werden als Pro-mitochondrien interpretiert, weil im nächsten Stadium viele Mitochondrien beobachtet werden können. Die Sphärosomen sind unverändert geblieben, während das Albumin der Aleuronvakuolen eine merkliche Wasseraufnahme erkennen lässt. Die Glo-

boide und Kristalloide weisen Quellungsrisse auf. Die durch den Wasserentzug bei der Samenreifung eingetretenen strukturellen Veränderungen (Schrumpfungen) können in den Kotyledonenzellen dieser Entwicklungsstufe nicht mehr beobachtet werden. Die Proplastiden weisen Prolamellarkörper und in den belichteten Randzonen bereits Stroma- und Granalamellen auf. Es sind Zentralvakuolen zu beobachten, welche die Sphärosomen autophagocytieren. Die Zellkerne weisen deutlich erkennbare Nukleolen auf (Abb. 22, 23).

Am fünften und sechsten Tag sind die Reservestoffe der den Kotyledonen anliegenden Endospermzellen völlig mobilisiert. Der Grad der Mobilisation nimmt mit zunehmendem Abstand von den Kotyledonen derart ab, dass die zuäusserst gelegenen Zellen noch den Speicherzellen im trockenen Samen ähnlich sehen. Dieser Mobilisationsgradient weist auf die Wirkung eines von den Kotyledonen abgesonderten Stoffes (Hormons?) hin und lässt die zytologischen Vorgänge der Mobilisation erkennen: Die Provakuolen werden zahlreicher und fusionieren. Gleichzeitig treten auch organellose Gebiete auf, die von keiner Membran umgeben sind. Die Aleuronvakuolen schwellen auf. Die flockige Grundsubstanz der Albumine schwindet, und die Globulinkristalloide zerfallen in kleine Stücke (Abb. 25), die später in Lösung gehen. Die Sphärosomen erscheinen kontrastärmer, während die Mitochondrien und Zellkerne aufgelöst werden. Im Gefrierabdruck können viele ins Plasmalemma übergehende Endo- und/oder Exocytosebläschen beobachtet werden (Abb. 28).

Vom fünften Tag an können in den Endospermzellen neue Organellen gefunden werden, die morphologisch denjenigen von Breidenbach et al. (1968) im selben Objekt beschriebenen und biochemisch als Glyoxisomen identifizierten Strukturen entsprechen. Diese Glyoxisomen besitzen eine einfache Membran (Abb. 26), können einen Durchmesser von 4–5  $\mu$  erreichen und enthalten Granula eines dichteren Materials. Sie sind im mittleren Abbaustadium, das heisst am fünften und sechsten Tag am häufigsten. Vermutlich entstehen sie aus Provakuolen, denn sie sind mit den Vakuolen funktionell verwandt. Später werden in den Zellen desselben Stadiums Zytoplasma und Organellen kontrastärmer und die organellosen Gebiete zahlreicher (Abb. 27).

Schliesslich sind mit Ausnahme der Sphärosomen keine Zellorganellen mehr identifizierbar. Die wenigen noch vorhandenen Membransysteme scheinen in Auflösung begriffen zu sein.

Die Kotyledonenzellen desselben Stadiums enthalten grosse Kerne; das Zytoplasma ist weniger dicht mit Ribosomen durchsetzt als zuvor. Mitochondrien und Proplastiden bzw. Chloroplasten zeigen keine Veränderungen. Die Zentralvakuole nimmt auch in diesem Stadium durch Autophagocytose Sphärosomen auf. Die eingeschleusten Sphärosomen werden kontrastärmer und verschwinden schliesslich ganz.

Am 7. und 8. Tag haben sich die nur noch aus einem Gerüst von gequollenen Zellwänden bestehenden inneren Endospermzellen stellenweise von den Kotyledonen abgelöst (Abb. 25). In den äusseren Endospermzellen können noch ER, Dictyosomen und Mitochondrien beobachtet werden. – Die Kotyledonenzellen werden zu diesem Zeitpunkt stärker vakuolisiert.

Zusammenfassend kann die Mobilisation des Inhaltes einer Endospermzelle wie folgt beschrieben werden:

1. Auftreten von ER, Dictyosomen und Provakuolen sowie von organellosen Räumen;
2. Auflösung der Kristalloide und Globoide;



3. Auflösung der Mitochondrien und des Zellkernes;
4. Auflösung der Sphärosomen;
5. Schwammiges Aufquellen der Zellwände. Schliesslich sind von den Organellen nur noch Membranreste übriggeblieben.

Schon vom 4. und 5. Tag an kann der Keimling vom Endosperm unabhängig weiterwachsen. Das Endosperm wird nur dann völlig aufgebraucht, wenn es sich nicht von den Kotyledonen ablöst.

## 5. Diskussion

### Samenreifung

#### 1. Allgemeines zum Endospermgewebe

Während der Samenreifung durchläuft das Gewebe drei Entwicklungsphasen: In den ersten Tagen nach der Befruchtung entstehen Endospermzellen, deren Zahl durch Zellteilung erweitert wird. Hierauf werden Nährstoffe ins Endosperm eingelagert und schliesslich das Gewebe durch Wasserentzug inaktiviert. Die drei Entwicklungsphasen gehen fliessend ineinander über.

Bei diesen Vorgängen ist vor allem der Übergang der Endospermzellen von einer aktiven Synthesephase zu Beginn der Samenreifung in den inaktiven Zustand bei der Samenruhe (ein minimaler Stoffwechsel kann allerdings auch noch im ruhenden Samengewebe nachgewiesen werden) von Interesse.

#### 2. Zytoplasma und Zellorganellen

Während der Inaktivierungsphase des Endosperms werden folgende vier Schwerpunkte in der morphologischen Entwicklung beobachtet:

- a) Konzentration und Reduktion des Grundplasmas;
- b) vorübergehendes Auftreten von Proplastiden;
- c) Schrumpfen von Mitochondrien und Zellkernen;
- d) Auftreten von Sphärosomen und Aleuronvakuolen.

a) Cocucci und Sturani (1965 a) untersuchten den DNS- und RNS-Gehalt des Ricinusendosperms während der Samenreifung. Sie stellten fest, dass die DNS-Menge des Gewebes annähernd konstant bleibt. Dagegen sinkt der Gehalt an Kern-RNS auf die Hälfte; die Mitochondrien-RNS und die Ribosomen-RNS verschwinden praktisch ganz; nur die lösliche Fraktion steigt im Zusammenhang mit dem RNS-Abbau an. Diese Resultate stehen im Einklang mit der beobachteten Reduktion des Grundplasmas und der darin enthaltenen Ribosomen. Die Autoren vermuten, dass das Gewebe durch den zunehmenden Verlust der Synthesefähigkeit von m-RNS inaktiviert wird, weil markiertes Phosphat in allen Reifungsstadien praktisch nur in die «niedermolekulare» (t-RNS) eingebaut wird und weil die Anteile von «hochmolekularer» (m-RNS) abfallen (Cocucci und Sturani, 1965 b).

b) In der Zeit vom 15. bis 35. Tag der Samenreifung enthalten die Zellen aus kleineren Vorstufen hervorgegangene Proplastiden. Es kann nicht beurteilt werden, ob diese Proplastiden eine Synthesefunktion aufweisen, denn ihr Stroma akkumuliert weder



Stärke, Fett noch Protein. Sie erscheinen kurz vor dem Entstehen der Aleuronvakuolen und werden von diesen autophagocytiiert.

c) Das Schrumpfen der Mitochondrien und der Zellkerne ist eine Folge der Entwässerung des Gewebes. Wie aus verschiedenen Arbeiten hervorgeht, ist damit auch ein Abfallen der Enzymaktivitäten verbunden: Bianchetti und Cornaggia (1965a) zeigten, dass die Aufnahme von Phosphat, Sulfat und Uracil mit zunehmender Reifung der Samen abnimmt, die Inkubationsrate aber für jedes Stadium auf den Normalwert steigt, sobald das Gewebe in Wasser gequollen wird. Die Wasserabhängigkeit der Enzymaktivität kann aber auch direkt gezeigt werden: Nach Messungen von Bianchetti und Cornaggia (1965b) steigt die Aktivität glycolytischer Enzyme, sobald trockene Samen bei 4 °C mit Wasser imbibiert werden. Andere Experimente zeigten, dass diese Enzyme durch Entwässerung über CaCl<sub>2</sub> inaktiviert, durch erneute Imbibition wieder reaktiviert werden. Auch für andere Enzyme wurde demonstriert, dass ihre Aktivität als Funktion des Wassergehaltes bei der Reifung abnimmt (Lado, 1965).

d) Sphärosomen: Zehn Tage nach der Befruchtung erscheinen erstmals Sphärosomen. Dies stimmt mit den Resultaten von Canvin (1963) überein, welcher die Ricinolsäure in gaschromatographischen Untersuchungen vom 12. Tag an feststellen konnte. Bis zum 20. Tag bleibt dann die Anzahl der Sphärosomen pro Zelle ungefähr konstant, nimmt aber bis zum 40. Tag wieder sehr stark zu. Nach Messungen von Canvin (1963) werden zwei Drittel des Gesamtöls in dieser zweiten Vermehrungsphase der Sphärosomen synthetisiert. Die Membran von Sphärosomen wurde von Grieshaber (1964) und Sorokin (1967) als Einheitsmembran beschrieben. Eigene Resultate deuten aber darauf hin, dass sie nur vom äusseren Blatt einer Einheitsmembran umgeben sind. Folgende Gründe sprechen gegen eine vollständige Einheitsmembran: Aus den Untersuchungen über die Sphärosomenontogenie geht hervor, dass die Lipide zwischen den beiden Blättern der ursprünglich vorhandenen Einheitsmembran akkumuliert werden (Abb. III). Die Sphärosomenmembran kann demzufolge nur aus dem äusseren Blatt einer Einheitsmembran entsprechen. Wenn die Sphärosomen bezüglich ihres Membranbaus den Vakuolen homolog wären, könnten ihre Membranen mit denjenigen der Vakuolen fusionieren; solche Stadien wurden jedoch nie beobachtet. Im trockenen Samengewebe läuft man ausserdem kaum Gefahr, sich an Sphärosomen anschmiegende andere Membranen als Sphärosomenmembranen zu interpretieren, weil in diesem Objekt die übrigen Membransysteme stark reduziert sind. In den Entwicklungsstadien hingegen wurden derartige Situationen oft beobachtet (Abb. 6b). Die Sphärosomen konnten sowohl in Schnittpräparaten wie auch in Gefrierabdrucken erkannt, miteinander verglichen und eindeutig identifiziert werden.

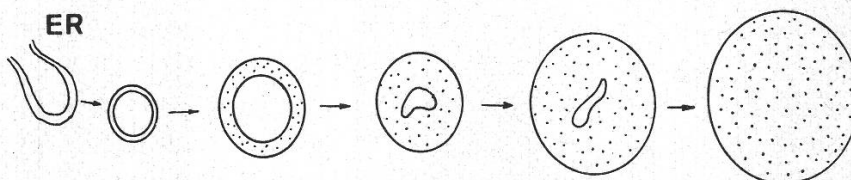


Abbildung III

Zur Ontogenie der Sphärosomen: Das ER schnürt Provakuolen ab, welche zwischen den beiden Blättern der Einheitsmembran Lipide akkumulieren. Die Sphärosomenmembran entspricht dem äusseren Blatt der Einheitsmembran. Das innere Blatt verschwindet während der Entwicklung

Nach Grieshaber (1964) und Frey-Wyssling et al. (1963) entstehen die Sphärosomen-initialen aus Elementen des ER. In allen Entwicklungsstadien können ER-Zisternen beobachtet werden, womit eine Ontogenese nach Grieshaber möglich erscheint. Sorokin (1967) unterschied zwischen Fetttropfen (ohne lytische Enzyme: z. B. bei *Arachys*, Jacks et al., 1967) und Sphärosomen (mit lytischen Enzymen: Sauter, 1967, 1968; Matile und Spichiger, 1968). Ory et al. (1968) haben den Sphärosomen des Ricinusendosperms eine lipolytische Aktivität zugeschrieben; die Bezeichnung «Sphärosomen» ist somit für die Lipidspeicher des Endosperms korrekt angewendet. Die lipolytische Aktivität ist jedoch nicht auf die Sphärosomen beschränkt. Lipidmobilisierende Enzyme wurden auch in den Glyoxisomen (Breidenbach et al., 1968) und im Zellsaft (Yamada und Stumpf, 1965) gefunden.

Aleuronvakuolen: Die Vermutung von Frey-Wyssling (1949), dass die Proteine in den Aleuronvakuolen beim Austrocknen des Endospermgewebes ausfallen, wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal elektronenmikroskopisch ergründet. Die entsprechenden Ereignisse können im folgenden Schema zusammengefasst werden:

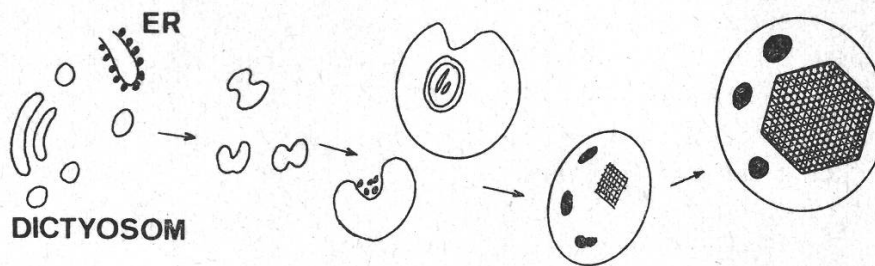


Abbildung IV

Die Ontogenie der Aleuronvakuolen: ER und Dictyosomen (?) produzieren Vesikeln, welche fusionieren. Später autophagozytieren die Vakuolen Zytoplasma und Zellorganeile. In der Austrocknungsphase fallen Globoide und Proteinkristalloide in der Albuminmatrix aus

Als Anfangsstadien der Aleuronvakuolengenesse wurden vom ER und vermutlich auch von Dictyosomen abstammende Provakuolen beobachtet, welche fusionieren und zytoplasmatisches Material phagozytieren. 40 Tage nach Beginn der Samenreife sind die auf diese Weise entstandenen Vakuolen durch weitere Fusionen zu ca.  $20\ \mu$  grossen Organellen herangewachsen. Einige Tage später fallen in ihrem Innern zuerst das Phytin, später die Globuline in Form von Kristalloiden aus.

Engleman (1966) beschrieb ER-Zisternen als Anfangsstadien der Aleuronvakuolenentwicklung in den Kotyledonen von *Gossypium*. Ähnliche Beobachtungen machten Bain und Mercer (1966) bei *Pisum*. Der «ER-Ribosomenkomplex» wurde auch von Oepik (1968) bei *Phaseolus*, von Quilichini (1952) bei Leguminosen und von Buttrose (1963) bei Zerealien als Ursprung der Aleuronvakuolenontogenie beschrieben. Mit den Provakuolen der Endospermzellen fusionieren vermutlich auch Golgi-Bläschen. Diese Vesikeln können zwar nach der Abschnürung von den Dictyosomen nicht mehr eindeutig zugeordnet werden. Ueda (1966) und Matile und Moor (1968) zeigten jedoch, dass sie mit Vakuolen verschmelzen können. Nachdem sich mehrere Provakuolen zu



Vakuolen vereinigt haben, beginnt die Autophagocytose von Zellorganellen und Grundplasma. Fusionen und Phagocytosestadien bei Vakuolen sind schon früher beschrieben worden, zum Beispiel in den Wurzelspitzen von Maiskeimlingen (Matile und Moor, 1968). Poux (1963c), Brandes et al. (1965), Sievers (1966) und Thornton (1968) fanden ebenfalls, dass die Vakuole Organellen verdauen kann.

Mit zunehmendem Durchmesser der Vakuolen nimmt die Fusionsfreudigkeit ab. Sobald der endgültige Durchmesser von ca.  $20\mu$  erreicht ist, werden Fusion und Phagocytose eingestellt. Die Vakuolen erfahren gleichzeitig einen Funktionswechsel: Aus den lytischen Kompartimenten werden Speicherorganellen. Mit der Einlagerung der Reserveproteine ist eine zunehmende Entwässerung verbunden, die für die Inaktivierung der lytischen Enzyme verantwortlich gemacht werden könnte.

Die Vakuolenmembran konnte in den Reifungsstadien, im trockenen Samen und im Verlauf der Keimung beobachtet und damit ihre Kontinuität bewiesen werden. Dieses Resultat steht im Einklang mit Ergebnissen von Nieuworp (1963), Paleg und Hyde (1964) und Buttrose (1971).

Die Globoide wurden schon von Pfeffer (1872) als feste Bestandteile der Aleuronvakuolen beschrieben. Der klassische Befund, dass die Globoide aus Phytin bestehen, wurde in neuerer Zeit von Lui und Altschul (1967) für Baumwollsamensamen bestätigt. Zanetti und Forti (1965) fanden Nukleotidase- und RNase-Aktivitäten im Ricinusendosperm und vermuten daher, dass das als Phytin gespeicherte Phosphat hauptsächlich durch den RNS-Abbau geliefert wird. Von Pfeffer (1872) und von Buttrose (1971) wurden im Endosperm von Ricinus und Gerste eine die Globoide einhüllende «Membran» beschrieben. Nach eigenen Untersuchungen ist eine membranartige Struktur tatsächlich vorhanden, die jedoch nicht als Einheitsmembran charakterisiert werden kann: Anstelle der drei Schichten (dunkel-hell-dunkel) wird nur eine einzige kontrastreiche Schicht sichtbar.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen werden die Proteinkristalloide im Ricinusendosperm dem kubischen System zugeordnet. Nach Cohn und Edsall (1943) kristallisieren Samenglobuline auch *in vitro* in kubisch oder hexagonal dichtester Kugelpackung. Perner (1965b) beschrieb bei *Pisum* Proteinkristalloide mit einer Kugelpackung, die einem kubisch flächenzentrierten Gitter entspricht. Aus den Abbildungen geht hervor, dass die Kristalloide aus kugeligen Untereinheiten aufgebaut sind. Pfeffer (1872) wie auch Frey-Wyssling (1953, 1955) vermuteten, dass es sich um Globuline handeln könnte. Im Gefrierabdruck weisen die Untereinheiten einen Durchmesser von 80–100 Å und die Gitterebenen einen Abstand von 70–80 Å auf. Diese Werte dürften dem Zustand *in vivo* sehr nahe kommen, da die Gefrierätztechnik die Objektstrukturen im wasserhaltigen Zustand darstellt. Im Schnittpräparat konnten 60–70 Å grosse Partikeln und Gitterabstände von 50–60 Å ausgemessen werden. Dieser Unterschied der Masse in Gefrierabdruck und Schnittbild lässt vermuten, dass die Proteinkristalloide Wasser enthalten, das bei der Entwässerung entzogen wird. Die Substruktur der Kristalloide bleibt auch nach Entwässerung erhalten.

Mit unseren Untersuchungen vergleichbare Arbeiten wurden ausschliesslich mit der Schnitttechnik ausgeführt. Zu ähnlichen Resultaten gelangten Shumway et al. (1967) und Holdsworth (1968) bei Eiweisseinschlüssen in Plastiden und Hohl (1960) bei Kristalloiden im Zytoplasma. Die Autoren glauben, dass es sich um Speicherproteine handelt. Andere Kristalloide, die in den verschiedensten Geweben (Leitgewebe, Wurzelspitzen, Koleoptilen) oder Organellen (Kerne, Plastiden, Microbodies) beschrieben



wurden, weisen wesentlich grössere Gitterabstände auf. Kristalloide in vergleichbaren, ausgetrockneten Geweben wurden von Perner (1965 a, b) und Marinos (1965) beschrieben. Beide Autoren fanden Werte um 150 Å und interpretierten die Einschlüsse als Speicherproteine. Demzufolge weisen die hier untersuchten Kristalloide Merkmale auf, durch welche sie sich von den meisten der früher beschriebenen unterscheiden: Ihre Gitterebenenabstände gehören zu den kleinsten der bis heute beobachteten. Sie treten in inaktiven Zellen auf und sind in Vakuolen lokalisiert.

Über die Funktion der Kristalloide in Speichergeweben besteht noch wenig Klarheit. Danielson (1956) ist der Ansicht, dass derartige Einschlüsse lediglich einen Proteinspeicher darstellen. Verschiedene andere Autoren vertreten jedoch die Meinung, dass es sich um inaktive Enzyme handle (Kretovich et al., 1954; Rall, 1965). Das Problem wird erst dann mit biochemischen Methoden entschieden werden können, wenn es möglich ist, homogene, völlig gereinigte Präparate herzustellen. Bis heute ergaben die Analysen lediglich, dass Samenglobuline aus einem Gemisch verschiedener Proteine bestehen (Altschul et al., 1966).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung der Aleuronvakuolen im Zusammenhang mit anderen zytologischen Vorgängen untersucht mit dem Ziel, aus den wechselseitigen Beziehungen Aufschluss über die Funktion der Proteinkristalloide zu erhalten. Ein eindeutiger Entscheid zugunsten von Enzym- oder Speicherfunktion dieser Kristalloide kann nicht gefällt werden. Die Anhäufung dieser Einschlüsse im Speichergewebe, ihre Lebensdauer, die sich nur auf die Austrocknungsphase und die Quellung des Samens beschränkt, und die Tatsache, dass die Aleuronvakuolen ihre gespeicherten Proteine bei der Mobilisation selbst verdauen, lassen es wahrscheinlich erscheinen, dass die Kristalloide ausschliesslich physiologisch inaktive Speicherproteine enthalten.

## II. Die Keimung

a) Mobilisation: Der beobachtete Mobilisationsgradient im Endosperm zeigt, dass der Abbau von Reservestoffen vom Embryo her ausgelöst wird. Paleg (1960), Paleg et al. (1962), Paleg und Hyde (1964) und Cohen und Paleg (1967) haben gefunden, dass beim Gerstenkeimling Gibberellinsäuren die Endospermobilisation bewirken. Die Vermutung liegt nahe, dass auch bei Ricinus die Mobilisation der Reservestoffe durch Hormone ausgelöst wird. Diese Hormone aktivieren vermutlich die lytischen Enzyme der Keimlinge, wie zum Beispiel Proteasen in *Cucurbita* (Penner und Ashton, 1967), in *Arachys* (Irving und Fontaine, 1945), Lipasen in *Ricinus* (Ory et al., 1968) und Phosphatasen in *Triticum*, *Cucumis* und *Linum* (Poux, 1963 a, b, 1965). Diese Enzyme können einerseits schon im ruhenden Samen vorgebildet oder andererseits während der Keimung neu synthetisiert werden. Für die Enzyme des Glyoxalatzyklus konnte gezeigt werden, dass sie im Verlauf der Keimung neu entstehen (Gientka-Rychter und Cherry, 1968; Hock und Beevers, 1966; Longo, 1968, und Marcus und Velasco, 1960). Dies trifft auch für andere Enzyme zu, die in der Vakuole lokalisiert sind (Matile, 1966, 1968, 1969). Im Gegensatz dazu enthalten die Sphärosomen, wie aus Untersuchungen von Ory et al. (1968) bei Ricinus und von Spichiger (1969) bei Tabak hervorgeht, bereits im ruhenden Endosperm lytische Enzyme. Die Enzyme werden somit nicht alle zur selben Zeit gebildet.

Auch der Ort, wo sie ihre Aktivität entwickeln, ist nicht einheitlich. Nach eigenen Beobachtungen wird der Sphärosomeninhalt im Endosperm ohne Kontakt mit Vakuolen kontrastärmer. Die Sphärosomen scheinen demzufolge eigene Lipasen zu enthalten (vgl. Ory et al., 1968). Proteasen und Phosphatasen dürften in den Aleuronvakuolen lokalisiert sein, weil die Proteinkristalloide und die Globoide während der Keimung in kurzer Zeit verdaut werden. Wie Breidenbach et al. (1968) zeigen konnten, sind die Enzyme des Glyoxalatzyklus in den Glyoxisomen enthalten. Für die Mobilisation der Reservestoffe einer Endospermzelle werden somit drei verschiedene Kompartimente beansprucht.

In den Kotyledonen werden die Speicherstoffe auf einem anderen Weg mobilisiert. Dort entstehen nicht mehrere lytische Kompartimente, sondern eine Zentralvakuole, welche die Speicherstoffe enthält oder aufnimmt und verdaut. Die Provakuolen und Aleuronvakuolen verschmelzen zu einer einzigen Zentralvakuole, in der alle Speicherstoffe gemeinsam verdaut werden.

Die unterschiedliche Mobilisation in Endosperm- und Kotyledonenzellen dürfte ihren Grund darin haben, dass die beiden Zelltypen morphologisch verschieden aufgebaut sind. Die Kotyledonenzellen enthalten einen normalen Organellenbestand, während die Endospermzellen hoch spezialisiert sind. Man darf deshalb annehmen, dass die Kotyledonenzellen einen normalen, das heisst mehr oder weniger ausgewogenen Turn-over besitzen, während der Umtrieb der Endospermzellen wegen der strukturellen Differenzierung auf die Seite der Lyse verlagert ist. Die strukturellen Unterschiede der beiden Zelltypen stehen sehr wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem unterschiedlichen Chromosomensatz. Nach den Modellvorstellungen von Matile und Moor (1968) wird die Stabilität der Vakuolenmembran gegenüber lytischen Enzymen nur durch genügende Syntheseleistungen des Protoplasmas gewährleistet. Fallen diese Leistungen nicht mehr ins Gewicht, so wird das lytische Kompartiment undicht und damit die Autolyse eingeleitet.

b) Transport: Zu Beginn der Keimung lebt der Embryo ausschliesslich von den Nährstoffen der Kotyledonen und des Endosperms. Zwischen den beiden Geweben existieren keine Verbindungswege in Form von Leitbündeln. Es muss deshalb ein anderer Transportweg benützt werden. Die bei noch funktionstüchtig erscheinenden Endospermzellen beobachteten Exocytosebläschen könnten als Hinweis auf eine aktive Ausfuhr von Hydrolyseprodukten gewertet werden. Nach vollständiger Autolyse erreichen die Abbauprodukte das dem Endosperm anliegende Schwammparenchym durch Diffusion. Kriedemann und Beever (1967a) schlugen eine aktive Absorption der Hydrolyseprodukte durch den Embryo vor, weil die Kotyledonen des *Ricinus*-Embryos selbst gegen ein starkes Konzentrationsgefälle Zucker aufnehmen können. Diese Autoren sind ausserdem der Ansicht, dass auch reine Diffusion eine Rolle spielt (Kriedemann und Beever, 1967b).



## Zusammenfassung

Das Endosperm von *Ricinus communis* wurde während der Samenreifung und Keimung in verschiedenen Stadien mit Hilfe der Schnitt- und Gefrierätztechnik untersucht:

### Samenreifung:

1. Das Gewebe: In einer 60tägigen Entwicklungszeit verdichtet sich das Zytoplasma und schrumpfen Kerne, Mitochondrien und Zentralvakuolen; der frei werdende Raum wird von Sphärosomen und Aleuronvakuolen beansprucht.

2. Sphärosomenontogenie: Die Proosphärosomen werden vom ER gebildet. Die Einlagerung der Reservelipide erfolgt zwischen den Blättern der Einheitsmembran. Die Hülle der Sphärosomen entspricht dem äusseren Blatt einer Einheitsmembran. Das innere Blatt verschwindet im Laufe der Entwicklung.

3. Aleuronvakuolenontogenie: Rauhes ER und Dictyosomen (?) liefern Provakuolen, welche fusionieren. Die Vakuolen reduzieren durch Phagozytose von Zellorganellen das Zytoplasma. Die ca. 20  $\mu$  grossen, reifen Aleuronvakuolen enthalten in einer Albuminmatrix eingebettete Globoide und Proteinkristalloide.

4. Die Proteinkristalloide werden dem kubischen System zugeordnet. Sie sind aus kugeligen Untereinheiten (Durchmesser 80–100 Å im Gefrierabdruck, 60–70 Å im Schnittpräparat) aufgebaut. Die durchschnittlichen Gitterabstände betragen im Gefrierabdruck 70–80 Å und im Schnittpräparat 50–60 Å.

### Keimung:

5. Während einer Dauer von 7 bis 8 Tagen wird das Endosperm mobilisiert; die Abbauprodukte gelangen in die Kotyledonen.

6. Sphärosomen: Die Sphärosomen des Endosperms werden ohne Kontakt mit Vakuolen aufgelöst, während sie in den Kotyledonen von der Zentralvakuole abgebaut werden.

7. Aleuronvakuolen: Die Aleuronvakuolen der Kotyledonen gehen kontinuierlich in Zentralvakuolen über, wobei die Inhaltsstoffe aufgelöst werden.

8. Die ungleichen Entwicklungen von Endospermgewebe und Kotyledonen werden darauf zurückgeführt, dass die beiden Gewebe im trockenen Samen einen verschiedenartigen morphologischen Aufbau aufweisen und während der Keimung unterschiedliche lysosomale Systeme bilden.

## Summary

An electron microscopic study made with both, thin sectioning and freeze etching techniques on the endosperm of *Ricinus communis* has yielded the following results:

1. During the maturation of the seed there is a shrinkage of cytoplasm, nuclei, mitochondria and of the central vacuoles. Concomitantly numerous aleurone vacuoles and spherosomes are produced.

2. The spherosomes originate as provacuoles from the ER. The lipid content of the spherosomes accumulates between the inner and outer layer of the unit membrane.



The outer envelope of the spherosomes corresponds to the outer layer of the unit membrane and the inner layer of the unit membrane cannot be observed. The inner part seems to disappear during development.

3. Aleurone vacuoles also originate as provacuoles which arise from a fusion of vesicles produced by ER and perhaps dictyosomes. Later the vacuoles incorporate and digest cytoplasmic ground substance and organelles. In dry seeds the aleurone vacuoles have a diameter of up to  $20\ \mu$  and they contain globoids and large protein crystalloids embedded in an albumen matrix.

4. The crystalloids have a structure which is considered to be a cubic lattice system. The crystalloid subunits have a diameter of  $80\text{--}100\ \text{\AA}$  when prepared by freeze etching and  $60\text{--}70\ \text{\AA}$  in ultrathin sections. The lattice spacing is  $70\text{--}80\ \text{\AA}$  on the replica and  $50\text{--}60\ \text{\AA}$  in sections.

5. During germination the contents of the endosperm are consumed by the cotyledons.

6. The lipid contents of the spherosomes in the endosperm are dissolved by the spherosomal and glyoxisomal lytic enzymes. In contrast, the spherosomes of the cotyledons are incorporated into and digested by the central vacuoles.

7. The aleurone vacuoles digest their contents and swell before becoming central vacuoles.

8. The differentiated development of the endospermic tissue and the cotyledons is possibly due to the fact that the two kinds of tissues show a different morphological structure in the dry seed and, moreover, produce different lysosomal systems in the germination process.

## Literatur

- Altschul A. M., L. Y. Yatsu, R. L. Ory und E. M. Engleman. 1966. Seed proteins. *Ann. Rev. Plant Phys.* 17, 113–136.
- Bain J. M. und F. V. Mercer. 1966. Subcellular organisation of the developing cotyledons of *Pisum sativum* L. *Aust. J. biol. Sci.* 19, 49–67.
- Bianchetti R. und M. P. Cornaggia. 1965a. Uptake and incorporation of phosphate, sulphate and uracil by ripening castor bean seeds. *G. Bot. Ital.* 72 (2/3), 341–350.
- und M. P. Cornaggia. 1965b. Inactivation and reactivation of enzymes in endosperms of castor bean seeds. *G. Bot. Ital.* 72 (2/3), 370–382.
- Brandes D., D. E. Buetow, F. J. Bertini und D. B. Malkoff. 1965. Role of lysosomes in cellular lytic processes. I. Effect of carbon starvation in *Euglena gracilis*. *Exp. Mol. Pathol.* 3, 583–592.
- Breidenbach B. W., A. Kahn und H. Beevers. 1968. Characterization of glyoxisomes from castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 43, 705–713.
- Buttrose M. S. 1963. Ultrastructure of the developing aleurone cells of wheat grain. *Aust. J. biol. Sci.* 16, 768–774.
- 1971. Ultrastructure of barley aleurone cells as shown by freeze-etching. *Planta (Berl.)* 96, 13–26.
- Canvin D. T. 1963. Formation of oil in the seed *Ricinus communis*. *Can. J. Biochem. and Physiol.* 41 (9), 1879–1885.
- Cocucci S. und E. P. Sturani. 1965a. Nucleic acids in ripening castor bean seed endosperm: II. Changes of the RNA from different fractions. *G. Bot. Ital.* 72 (2/3), 357–358.
- und E. P. Sturani. 1965b. Nucleic acids in ripening castor bean endosperm. I. Quantitative and qualitative changes of total RNA. *G. Bot. Ital.* 72 (2/3), 355–356.
- Cohen D. und L. G. Paleg. 1967. Physiological effects of gibberellic acid. X. The release of gibberellin-like substances by germinating barley embryos. *Plant Physiol.* 42, 1288–1296.
- Cohn E. J. und J. T. Edsall. 1943. Protein aminoacids and peptides. Reinhold Publ. Corp., New York.
- Danielson C. E. 1956. Plant proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 7, 215–236.
- Engleman E. M. 1966. Ontogeny of aleurone grains in cotton embryo. *Am. J. Bot.* 53, 231–237.
- Freeman J. A. und B. O. Spurlock. 1962. A new epoxy embedment for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 13, 437–443.
- Frey-Wyssling A. 1949. Stoffwechsel der Pflanzen. S. 157–160. Büchergilde Gutenberg, Zürich.
- 1953. Submicroscopic morphology of protoplasm. 2<sup>nd</sup> Engl. ed. Elsevier, Amsterdam.
- 1955. Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. *Protoplasmatologia* 2 (A2), 119–136.
- E. Grieshaber und K. Mühlethaler. 1963. Origin of spherosomes in plant cells. *J. Ultrastruct. Res.* 8, 506–516.
- Gientka-Rychter A. und H. J. Cherry. 1968. *De novo* synthesis of isocitratase in peanut (*Arachis hypogaea*) cotyledons. *Plant Physiol.* 43, 653–659.
- Grieshaber E. 1964. Entwicklung und Feinbau der Sphärosomen in Pflanzenzellen. *Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zürich* 109, 1–23.
- Hartig T. 1855. Über das Klebermehl. *Bot. Z.* 13, 881–882.
- Hess W. M. 1966. Fixation and staining of fungus hyphae and host plant root tissues for electron microscopy. *Stain Techn.* 41, 27–35.
- Hock B. und H. Beevers. 1966. Development and decline of the glyoxylate-cycle enzymes in watermelon seedlings (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Effects of dactinomycin and cycloheximide. *Z. Pflanzenphysiol.* 55, 405–414.
- Hohl H. R. 1960. Über die submikroskopische Struktur normaler und hyperplastischer Gewebe von *Datura stramonium*. I. Teil: Normalgewebe. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 70, 395–439.
- Holdsworth R. H. 1968. The presence of a crystalline matrix in pyrenoids of the diatom *Achnanthes brevipes*. *J. Cell Biol.* 37, 831–837.
- v. Holle G. 1858. Beiträge zur näheren Kenntnis der Proteinkörper im Samen der Gewächse. I. Samen mit Proteinkörpern. *Neues Jahrb. für Pharmacie von Walz und Winkler*, Bd. X, 1–24.
- Irving G. W. und T. D. Fontaine. 1945. Purification and properties of a newly discovered proteolytic enzyme of the peanut. *Arch. Biochem.* 6, 351–364.
- Jacks T. J., L. Y. Yatsu und A. M. Altschul. 1967. Isolation and characterization of peanut spherosomes. *Plant Physiol.* 42, 585–597.

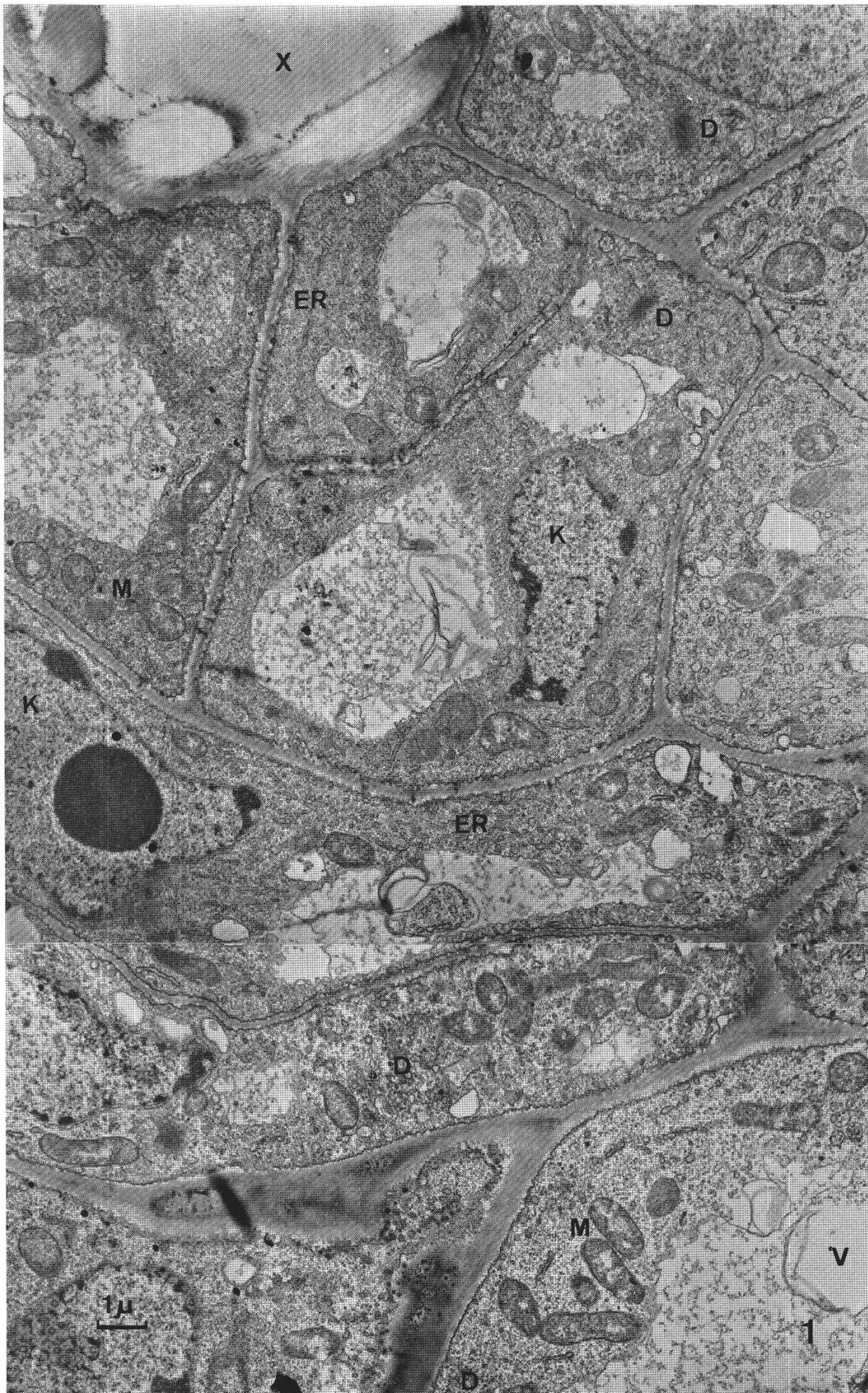


- Kretovich V. L., A. A. Bundel, S. S. Melik-Sarkisyan und K. M. Stepanovich. 1954. The so-called storage proteins of soya. *Biokhimiya* 19 (2), 208–215.
- Kriedemann P. und H. Beevers. 1967a. Sugar uptake and translocation in the castor bean seedling: I. Characteristic of transfer in intact and excised seedlings. *Plant Physiol.* 42 (2), 161–173.
- 1967b. Sugar uptake and translocation in the castor bean seedling: III. An autoradiographic study of the absorption pathway. *Planta (Berl.)* 73, 175–180.
- Lado P. 1965. Inactivation of mitochondria in the castor bean seed endosperm during ripening. *G. Bot. Ital.* 72 (2/3), 359–369.
- Longo C. P. 1968. Evidence for *de novo* synthesis of isocitratase and malate synthetase in germinating peanut cotyledons. *Plant Physiol.* 43, 660–664.
- Lui N. S. T. und A. M. Altschul. 1967. Isolation of globoids from cottonseed aleurone grain. *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 678–684.
- Marcus A. und J. Velasco. 1960. Enzymes of the glyoxylate cycle in germinating peanuts and castor beans. *J. Biol. Chem.* 235, 563–567.
- Marinos N. G. 1965. Comments on the nature of a crystal-containing body in plant cells. *Protoplasma* 60, 31–33.
- Maschke P. 1859. Über den Bau und die Bestandtheile der Kleberbläschen in *Bertholletia*, deren Entwicklung in *Ricinus*, nebst einigen Bemerkungen über Amylonbläschen. *Bot. Z.* 17, 409–448.
- Matile Ph. 1966. Enzyme der Vakuolen aus Wurzelzellen von Maiskeimlingen. Ein Beitrag zur funktionellen Bedeutung der Vakuole bei der intrazellulären Verdauung. *Z. Naturforsch.* 21b, 871–878.
- 1968. Aleuronvacuoles as lysosomes. *Z. Pflanzenphysiol.* 58, 365–368.
- 1969. Enzymologie pflanzlicher Zellkompartimente. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 82, 397–405.
- und H. Moor. 1968. Vacuolation: Origin and development of the lysosomal apparatus in root-tip cells. *Planta (Berl.)* 80, 159–175.
- und J. Spichiger. 1968. Lysosomal enzymes in spherosomes (oil droplets) of tobacco endosperm. *Z. Pflanzenphysiol.* 58, 277–280.
- Mollenhauer H. H. 1964. Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. *Stain Techn.* 39, 111–114.
- Moor H. und K. Mühlethaler. 1963. Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell Biol.* 17, 609–628.
- K. Mühlethaler, H. Waldner und A. Frey-Wyssling. 1961. A new freezing ultramicrotome. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10, 1–13.
- Nägeli C. 1928. Über die crystallähnlichen Proteinkörper und ihre Verschiedenheit von wahren Crystallen. *Sitzungsber. Ak. Wiss. München* 4 (2), 121–137, 1862. Auszug in *Ostwalds Klassiker der exakten Wissenschaften* 227, 33–38.
- Nieudorp P. J. 1963. Electron microscopic structure of the epithelial cells of the scutellum of barley. *Acta Botan. Neerl.* 12, 295–301.
- Oepik H. 1968. Development of cotyledon cell structure in ripening *Phaseolus vulgaris* seeds. *J. exp. Bot.* 19, 58–64.
- Ory R. L., L. Y. Yatsu und H. W. Kircher. 1968. Association of lipase activity with the spherosomes of *Ricinus communis*. *Arch. Biochem.* 264, 255–264.
- Paleg L. G. 1960. Physiological effects of gibberellic acid. I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. *Plant Physiol.* 35, 293–299.
- B. Coombe und M. Buttrose. 1962. Physiological effects of gibberellic acid. V. Endosperm responses of barley, wheat and oats. *Plant Physiol.* 37, 798–803.
- Paleg L. G. und B. Hyde. 1964. Physiological effects of gibberellic acid. VII. Electron microscopy of barley aleuron cells. *Plant Physiol.* 39, 673–680.
- Penner D. und F. M. Ashton. 1967. Hormonal control of proteinase activity in squash cotyledons. *Plant Physiol.* 42, 791–796.
- Perner E. 1965a. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Zellen von Embryonen im Zustand völliger Samenruhe. I. Die zelluläre Strukturordnung in der Radicula lufttrockener Samen von *Pisum sativum*. *Planta (Berl.)* 65, 334–357.
- 1965b. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Zellen von Embryonen im Zustand völliger Samenruhe. II. Die Aleuronkörner in der Radicula lufttrockener Samen von *Pisum sativum*. *Planta (Berl.)* 67, 324–343.
- Pfeffer W. 1872. Untersuchungen über die Proteinkörner und die Bedeutung des Asparagins beim Keimen der Samen. *Jahrb. Wiss. Bot.* 8, 429–574.

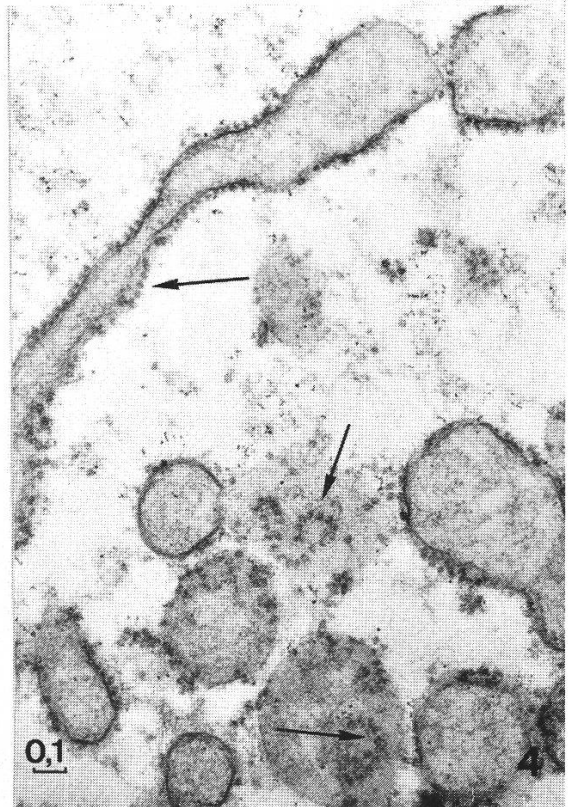
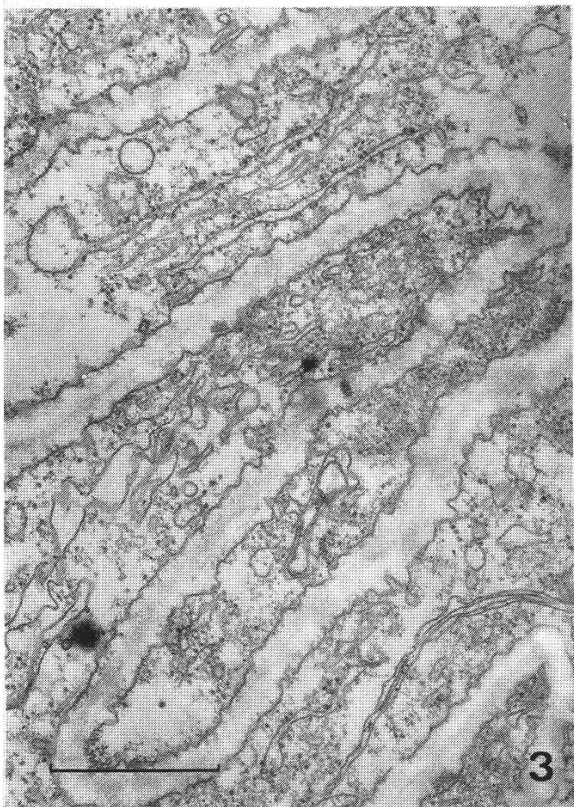
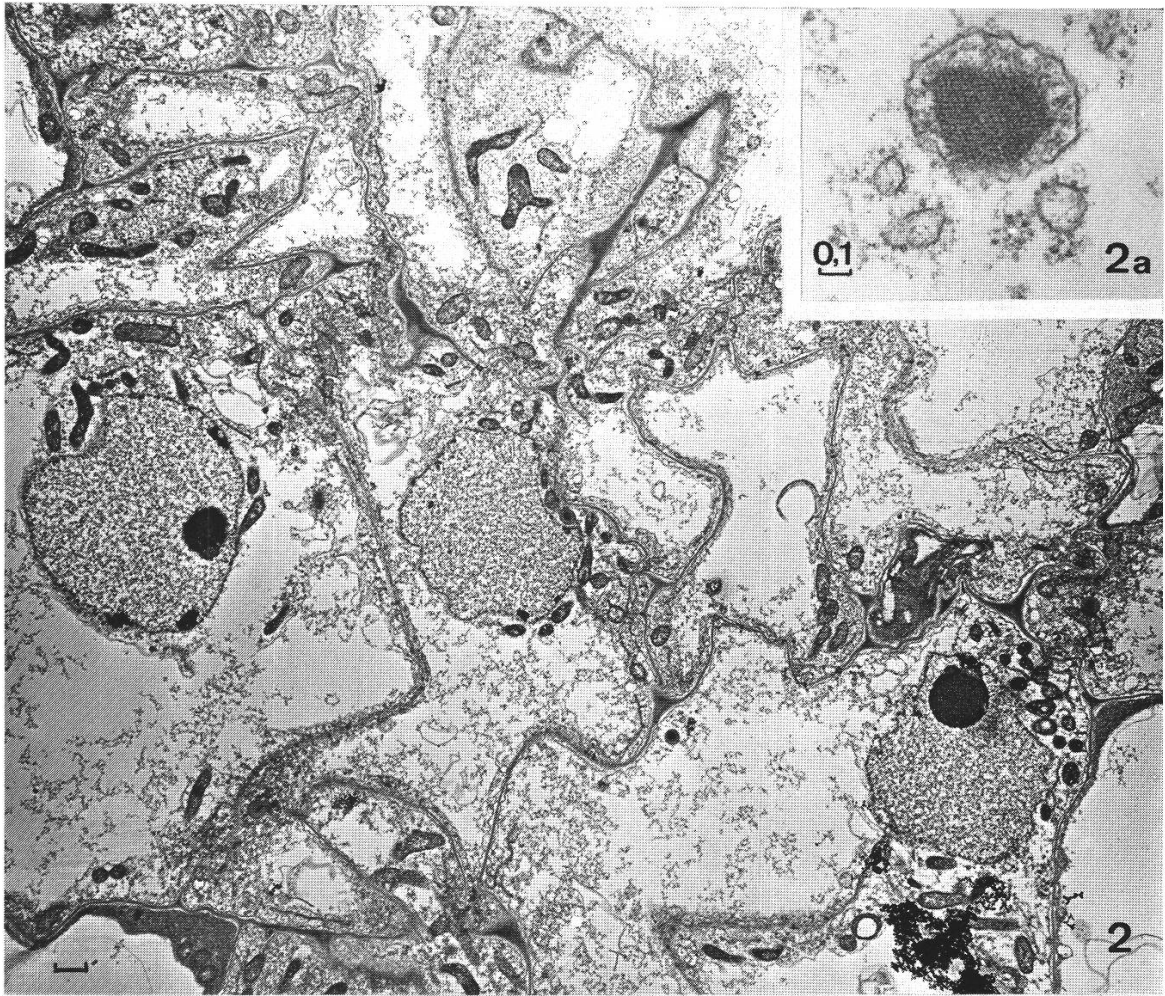
- Poux N. 1963 a. Localisation de la phosphatase acide dans les cellules méristématiques de blé (*Triticum vulgare* Vill.). J. Microscopie 2, 485-489.
- 1963 b. Localisation des phosphatases et de la phosphatase acide dans les cellules des embryons de blé (*Triticum vulgare* Vill.) lors de la germination. J. Microscopie 2, 557-568.
- 1963 c. Sur la présence d'enclaves cytoplasmiques en voie de dégénérescence dans les vacuoles des cellules végétales. CR Acad. Sci. (Paris) 257, 736-738.
- 1965. Localisation de l'activité phosphatasique acide et des phosphates dans les grains d'aleurone. I. Grains d'aleurone renfermant à la fois globoides et cristalloïdes. J. Microscopie 4, 27-46.
- Quilichini R. 1952. Contribution à l'évolution cytologique et chimique de quelques graines de légumineuses. Botaniste 36, 1-192.
- Rall Yu. S. 1965. Effect of the heating of maize grain upon its germinating power and certain biochemical properties (solubility of proteins and catalase activity). S. 175-180 in Kretovich V. L.: Biochemistry of grain and breadmaking. IPST, Jerusalem.
- Reynolds E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-213.
- Sauter J. J. 1967. Untersuchungen zur zytochemischen Oxidaselokalisation in Sphärosomen verschiedener Gewebe von *Populus*. Z. Pflanzenphysiol. 57, 352-367.
- 1968. Cytochemischer Nachweis von Redoxfermenten in fetttropfenassoziierten «Sphärosomen». Naturwiss. 55 (7), 351.
- Shumway L. K., T. E. Weier und C. R. Stocking. 1967. Crystalline structures in *Vicia faba* chloroplasts. Planta (Berl.) 76, 182-189.
- Sievers A. 1966. Lysosomenähnliche Kompartimente in Pflanzenzellen. Naturwiss. 53, 334-335.
- Sorokin H. P. 1967. The spherosomes and the reserve fat in plant cells. Amer. J. Bot. 54, 1007-1016.
- Spichiger J. U. 1969. Isolation und Charakterisierung von Sphärosomen und Glyoxisomen aus Tabakendosperm. Planta (Berl.) 89, 56-75.
- Thornton R. M. 1968. The fine structure of *Phycomyces*. I. Autophagic vesicles. J. Ultrastruct. Res. 21, 269-280.
- Ueda K. 1966. Fine structure of *Chlorogonium elongatum* with special reference to vacuole development. Cytologia 31, 461-472.
- de Vries H. 1885. Plasmolytische Studien über die Wand der Vakuolen. Jahrb. Wiss. Bot. 16, 465-598.
- Went F. A. 1888. Die Vermehrung der normalen Vakuolen durch Theilung. Jahrb. Wiss. Bot. 19, 295-356.
- Yamada M. und P. K. Stumpf. 1965. Fat metabolism in higher plants. XXIV. A soluble  $\beta$ -oxidative system from germinating seeds of *Ricinus communis*. Plant Physiol. 40, 653-658.
- Zanetti G. und G. Forti. 1965. Preliminary observations on the enzymatic degradation of RNA in castor bean seeds. G. Bot. Ital. 72 (2/3), 332-333.



Tafel I

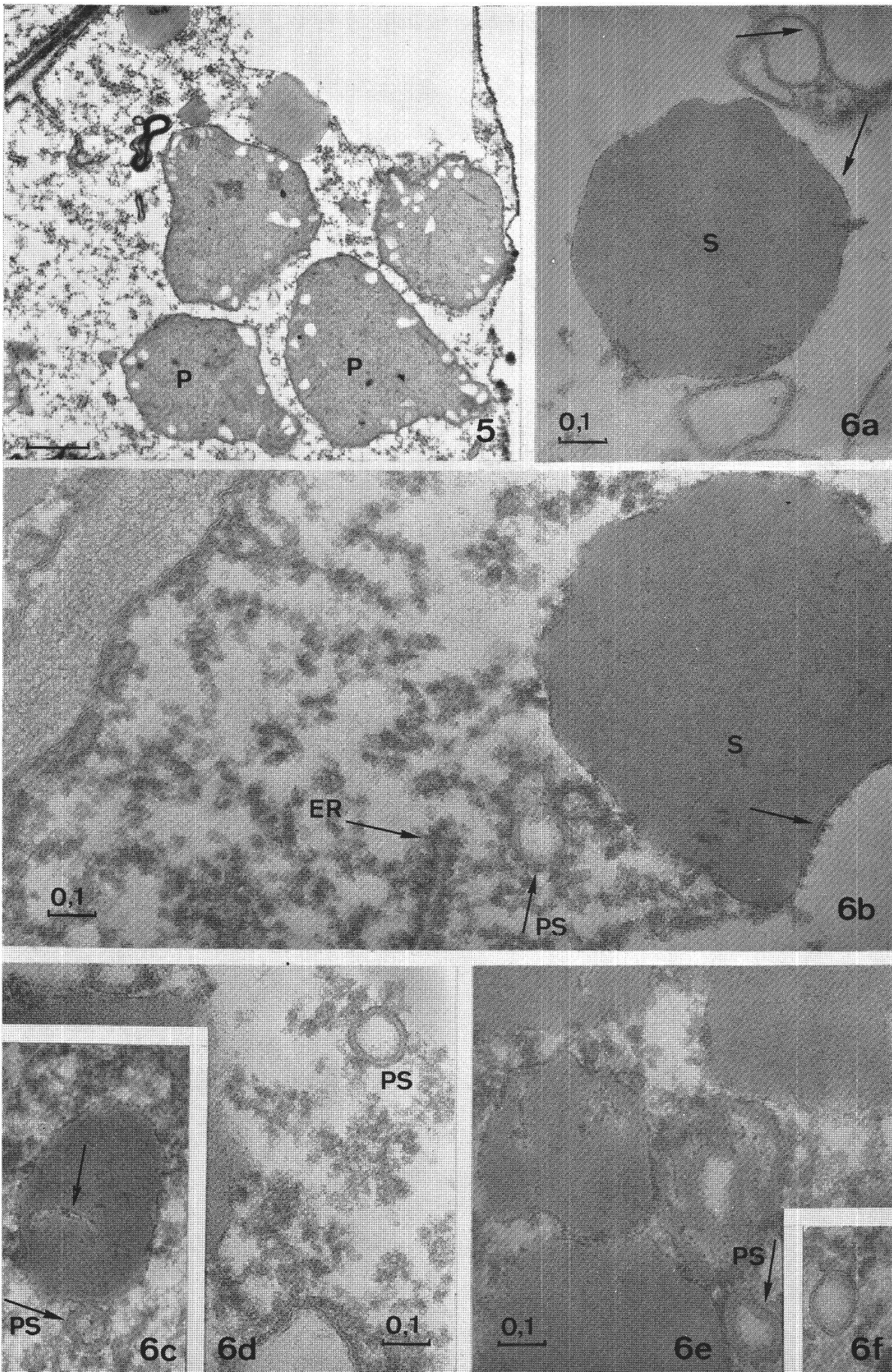


Tafel II



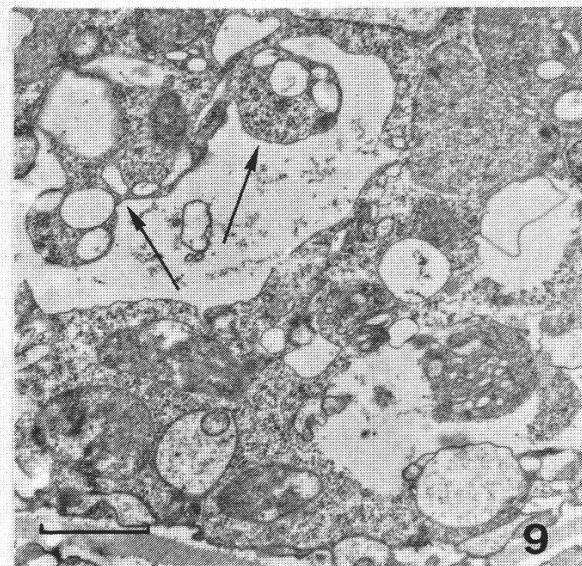
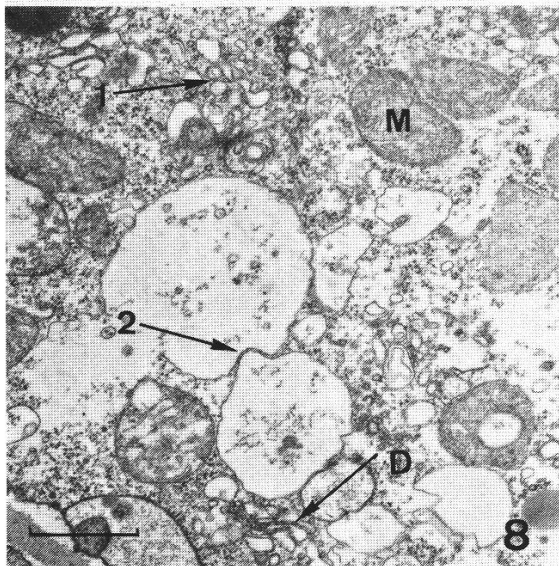
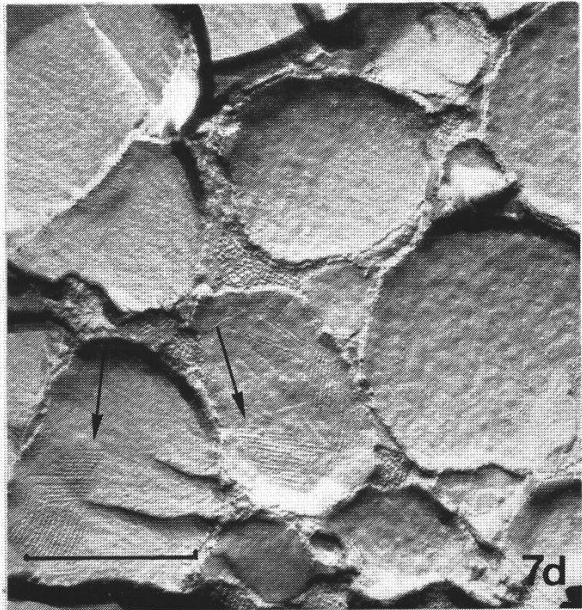
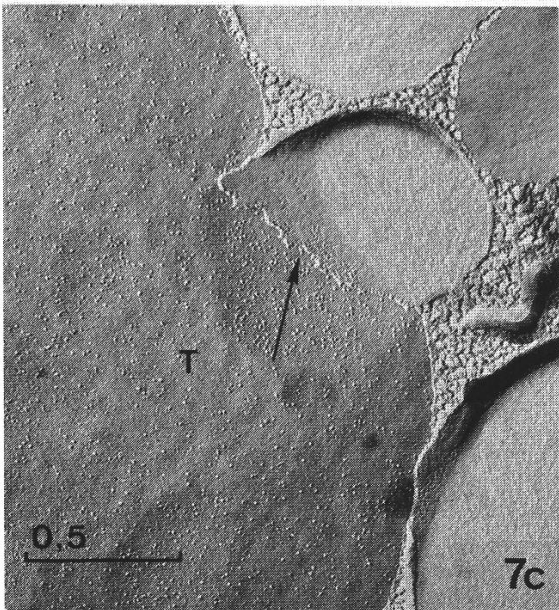
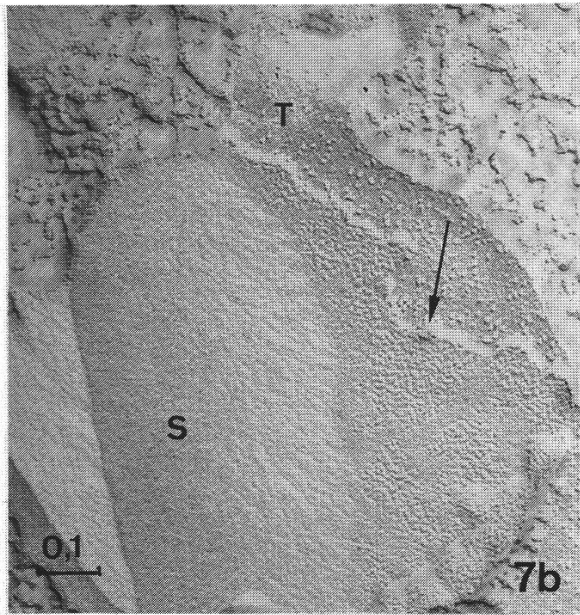
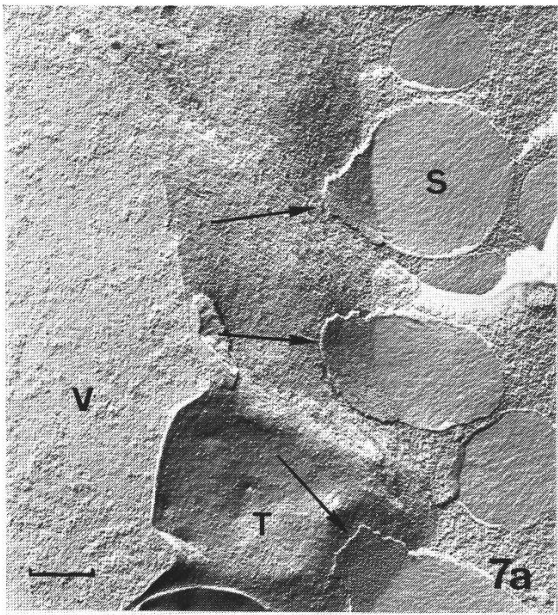


Tafel III



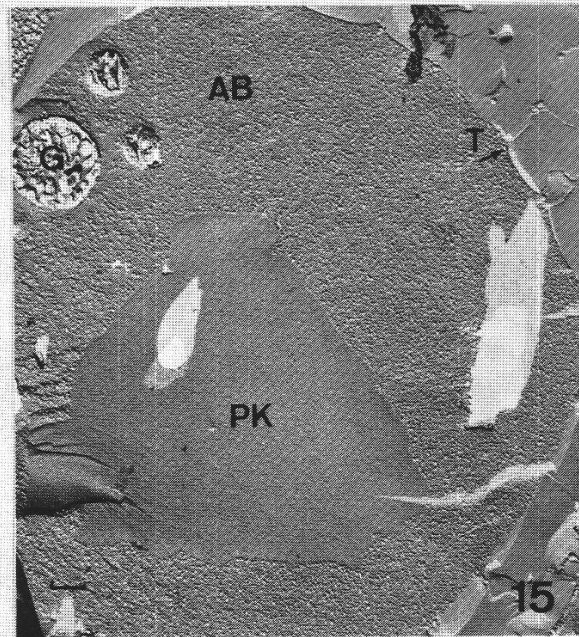
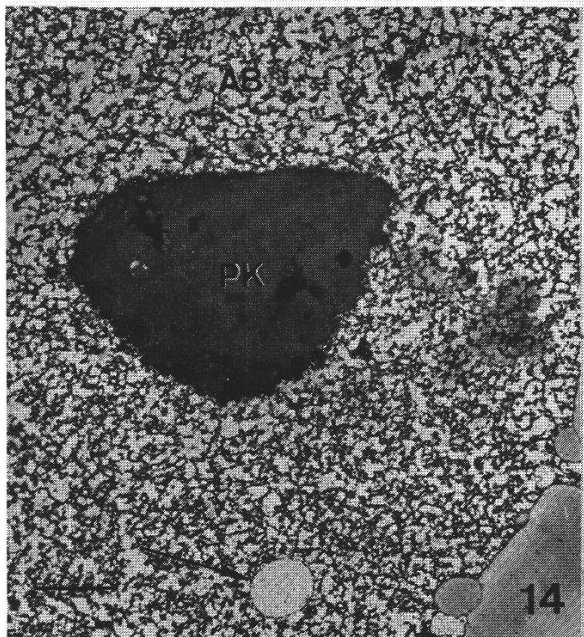
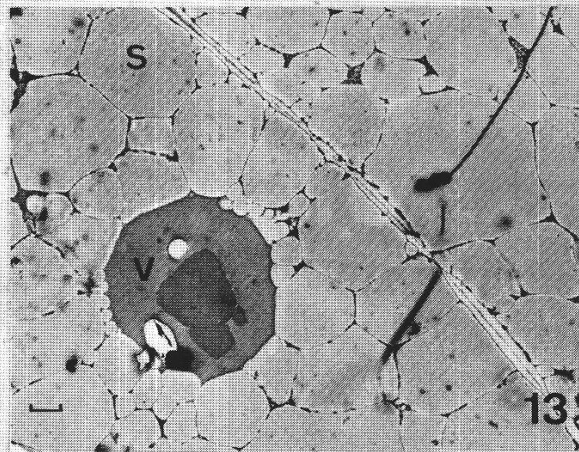
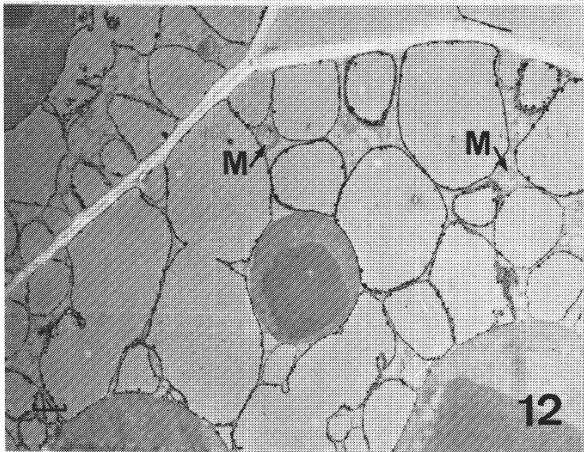
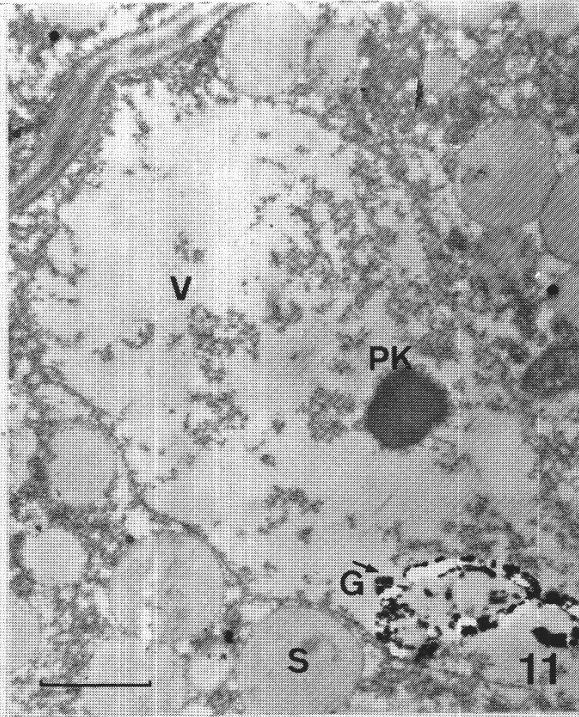
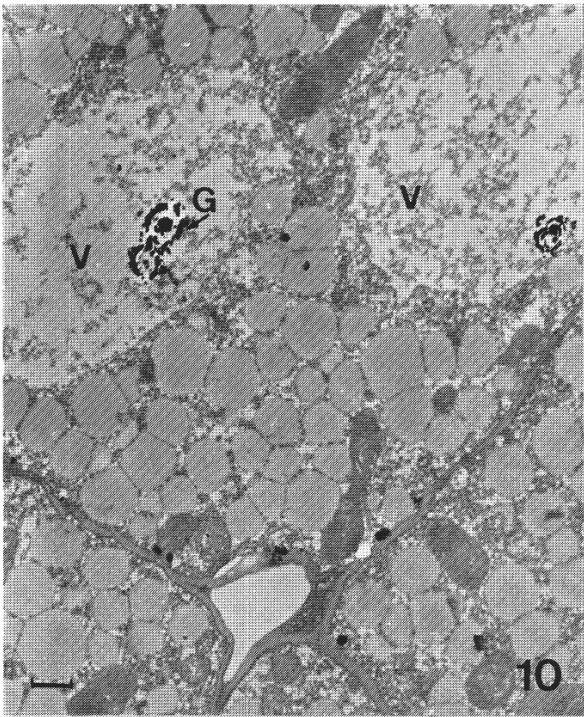


Tafel IV

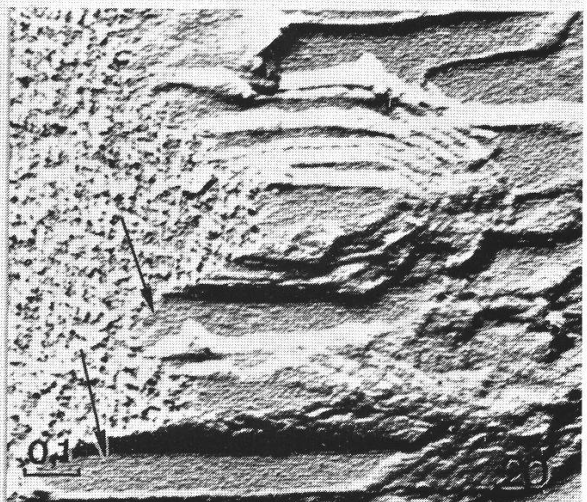
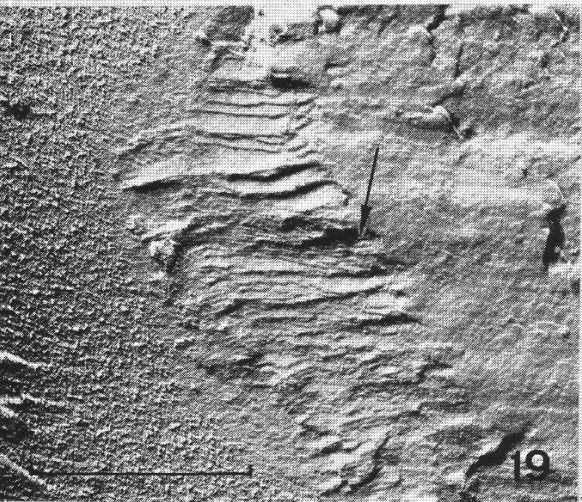
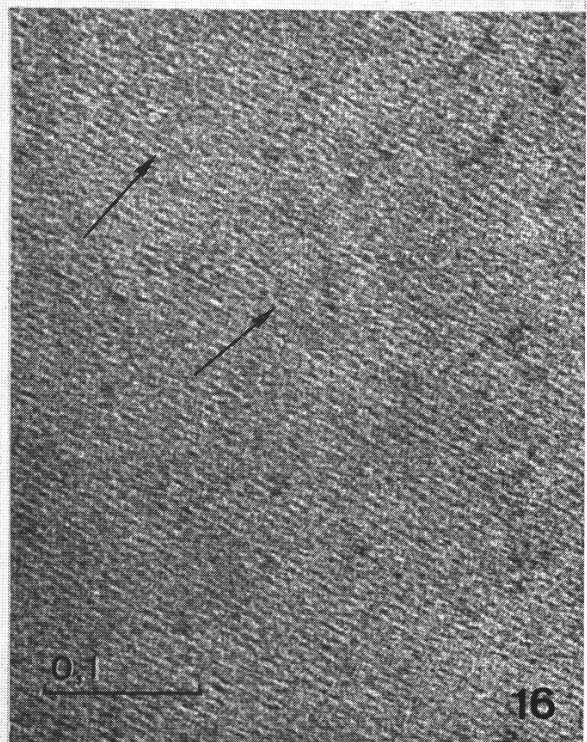
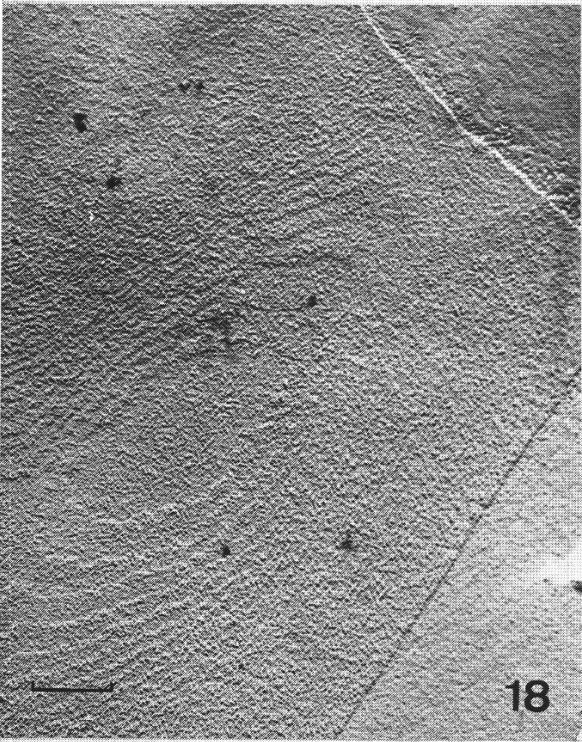
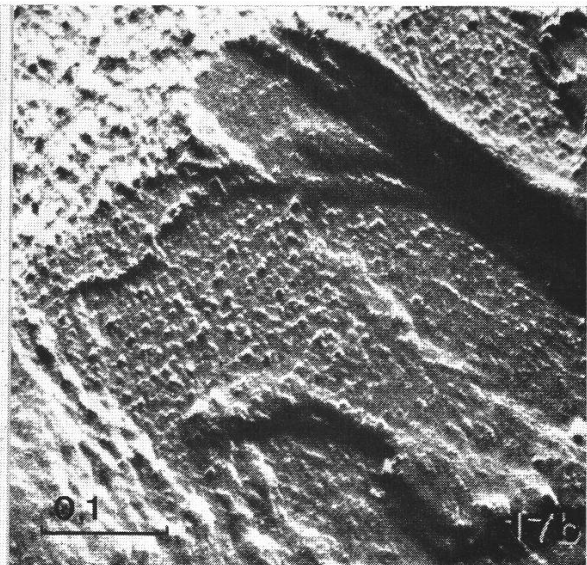
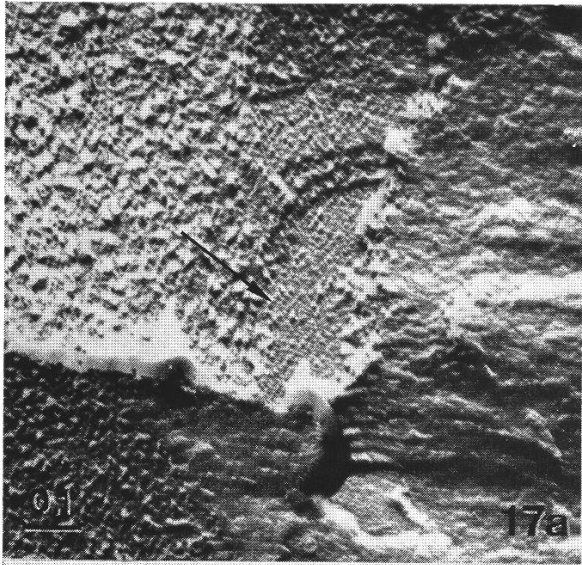




Tafel V

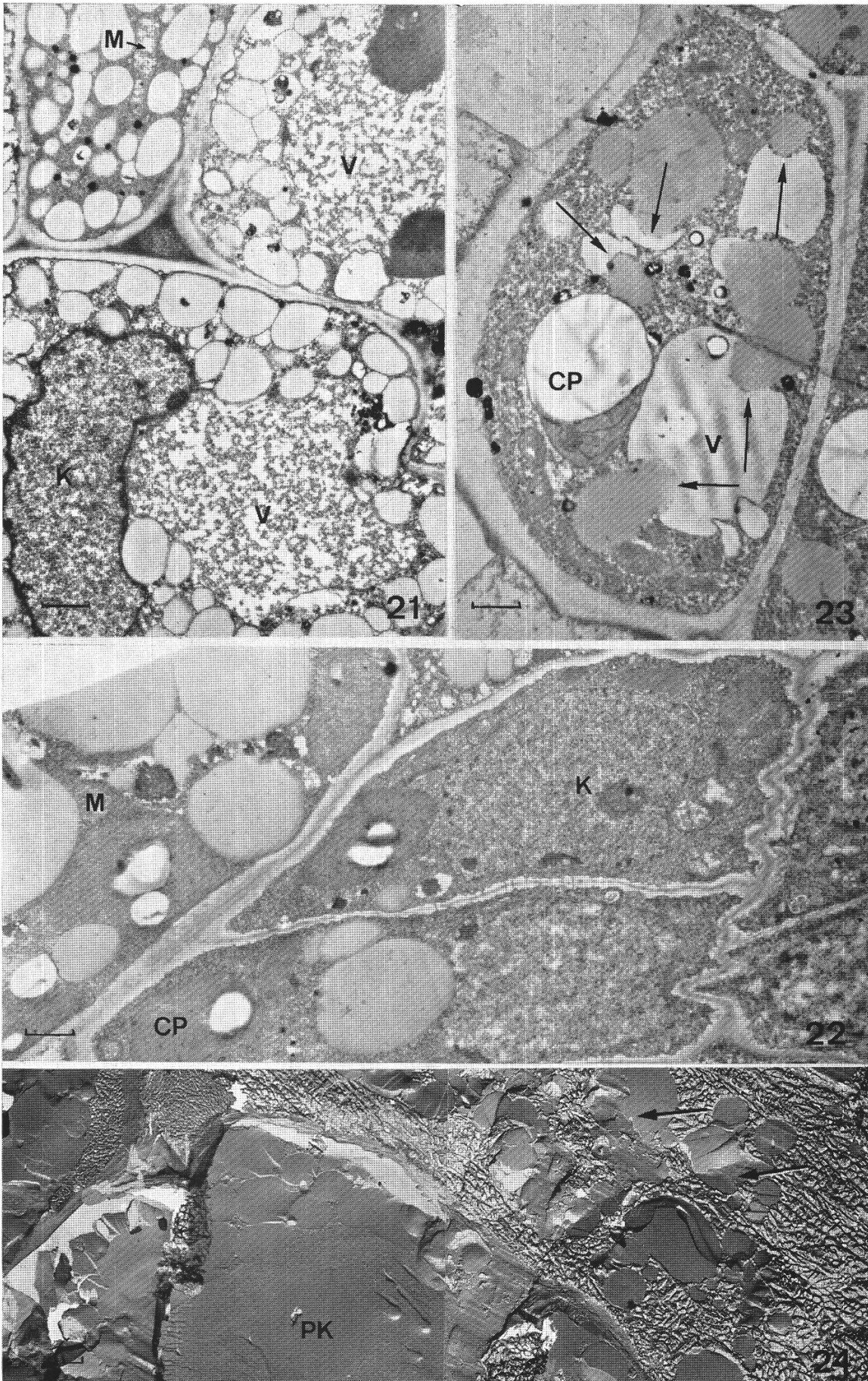


Tafel VI



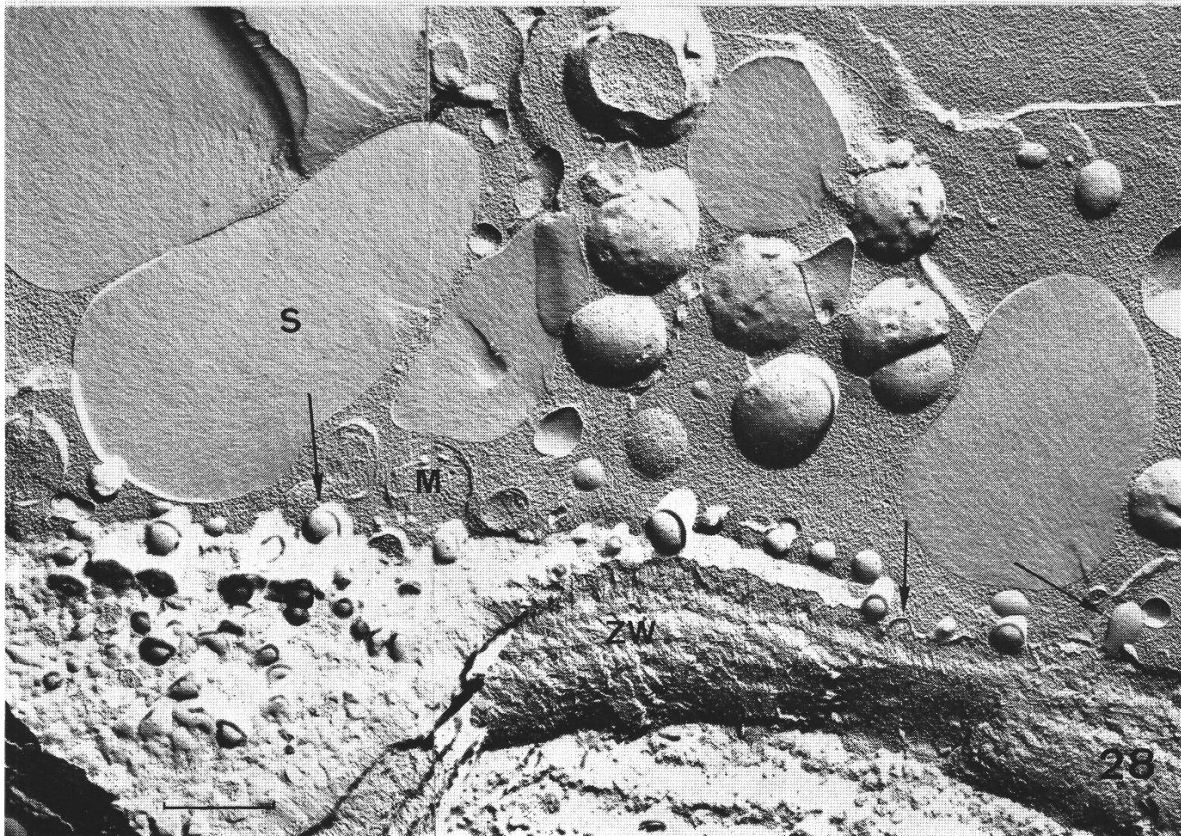
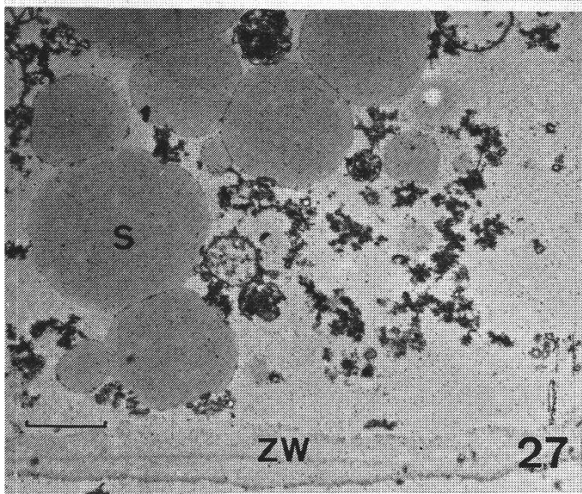
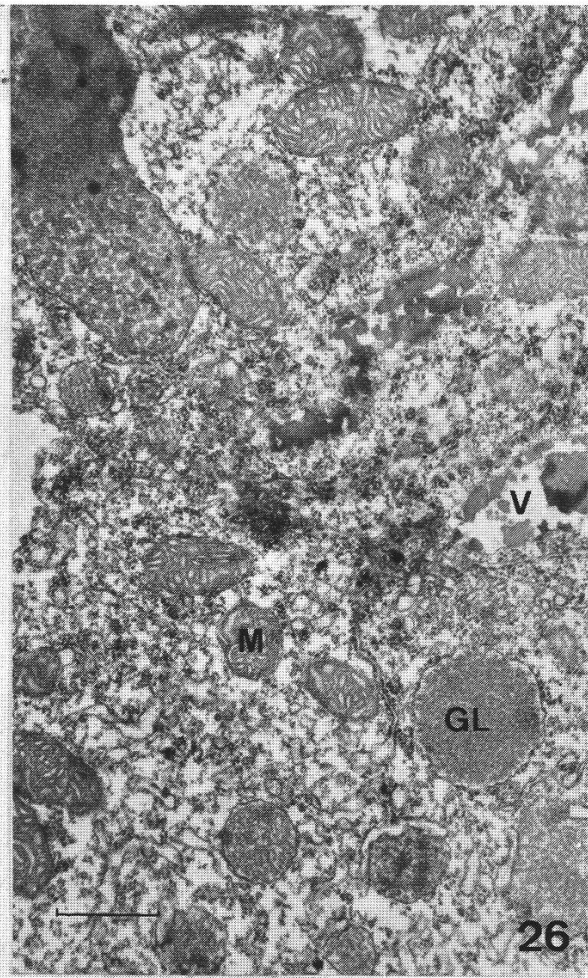
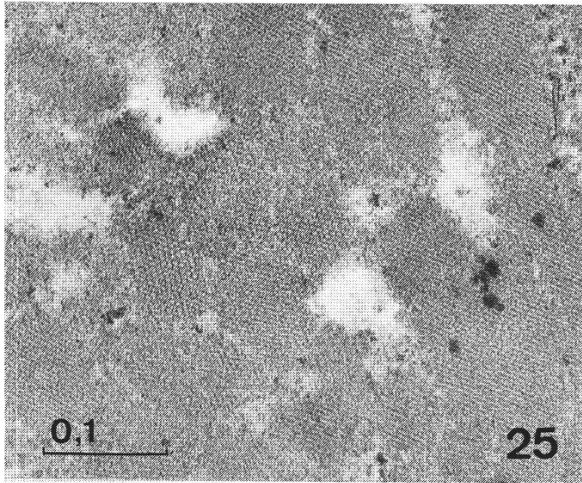


Tafel VII





Tafel VIII





## Legenden

Abkürzungen: AB Albumin, CP Chloroplast, D Dictyosom, ER endoplasmatisches Reticulum, G Globoid, GL Glyoxisom, K Kern, M Mitochondrion, P Proplastid, PK Proteinkristalloid, PS Pro-sphärosom, S Sphärosom, T Tonoplast, V Vakuole, X Xylem, ZW Zellwand

### Tafel I

#### Abbildung 1

Endosperm im Stadium I. Die Zellen in der Nähe des Xylems (oben links) sind jung und teilungsfähig. Weiter im Sameninneren werden die Zellen vakuolisiert (unten rechts). 8000 ×

### Tafel II

#### Abbildung 2

Vakuolisierte Zellen mit gefältelten Zellwänden im Stadium I der Samenreifung. 4000 ×. 2a: Micro-body. 40000 ×

#### Abbildung 3

Zellwandfalten im Stadium I. 22000 ×

#### Abbildung 4

Endoplasmatisches Reticulum mit Polyribosomen im Stadium II. Die Pfeile weisen auf die Polyribosomen. 40000 ×

### Tafel III

#### Abbildung 5

Proplastiden im Stadium III. 10500 ×

#### Abbildung 6 a-f

a) Die Sphärosomenmembran entspricht dem äusseren Blatt einer Einheitsmembran (Pfeile). 80000 ×. b) Sphärosom mit ER und Pro-sphärosom. Die Einheitsmembran unten rechts (Pfeil) stammt von einer Vakuole. 80000 ×. c) Pro-sphärosom und Sphärosom, bei welchem das äussere und innere Blatt der Einheitsmembran sichtbar ist. 80000 ×. d) Pro-sphärosom: Die Lipide werden zwischen den Blättern der Einheitsmembran akkumuliert. 80000 ×. e) Stadien der Sphärosomenontogenie. 80000 ×. f) Provakuole. 80000 ×

### Tafel IV

#### Abbildung 7 a-d

Gefrierabdrucke: a) Sphärosomen liegen an einem Tonoplasten, wobei die Innenseite ihrer Hülle sichtbar wird. 8000 ×. b) Innenseite der Sphärosomenhülle. 80000 ×. c) Sphärosom an einem Tonoplasten. 40000 ×. d) Sphärosomenhülle, von aussen gesehen. 22500 ×

#### Abbildung 8

Stadium III: Das Zytoplasma ist von Mitochondrien, Dictyosomen und Vesikeln (1) durchsetzt. (2) Vakuolen in Fusion. 14000 ×

#### Abbildung 9

Stadium III: Vakuole, welche durch Phagozytose Zytoplasma aufnimmt. 14000 ×

### Tafel V

#### Abbildung 10

Stadium IV: In den Aleuronvakuolen sind die Globoide am Entstehen. Die Zahl der Sphärosomen hat stark zugenommen. 5000 ×

#### Abbildung 11

Stadium IV: Aleuronvakuole mit Globoid und Proteinkristalloid. Die Strukturhaltung im Schnittpräparat wird mit zunehmender Trockenheit des Gewebes schlechter. 14000 ×

Abbildung 12

Stadium V: Goldchloridfixation, mit Bleicitrat nachkontrastiert. Nur die Sphärosomenhüllen sind kontrastiert. Die Proteinkristalloide, Tonoplasten, Plasmalemmen und Mitochondrien weisen einen sehr schwachen Kontrast auf. 4000 ×

Abbildung 13

Stadium V: Fixation nach Hess. Alle Membranen sind gefärbt. 4000 ×

Abbildung 14

Proteinkristalloid, Maraglasseinbettung. Unten ist eine membranartige Struktur beim weggelösten Globoid zu erkennen (Pfeil). 10 500 ×

Abbildung 15

Aleuronvakuole im Gefrierabdruck. Das Kristalloid weist die Form eines Hexagons auf. 4200 ×

Tafel VI

Abbildung 16

Kristalloidstruktur. 200 000 ×

Abbildung 17

Kristalloiduntereinheiten im Gefrierabdruck. a) 72 000 ×. b) 160 000 ×

Abbildung 18

Mit «Stufen» bezeichnete Kristalloidschichten. 10 500 ×

Abbildung 19

Die Gitterebenen (Pfeil) sind zur Abbildungsebene abgewinkelt. 28 000 ×

Abbildung 20

Senkrecht zur Abbildungsebene stehende Gitterebenen (Pfeil). 72 000 ×

Tafel VII

Abbildung 21

Kotyledonenzellen im reifen Samen: Die Zellorganellen sind nur unwesentlich geschrumpft. 7800 ×

Abbildung 22

Kotyledonenzellen am 2. Keimungstag. 8000 ×

Abbildung 23

Kotyledonenzellen am 3. und 4. Keimungstag. Vakuolen autophagocytieren die Sphärosomen (Pfeile). 8000 ×

Abbildung 24

Vordringen des Quellungswassers im Endosperm (Pfeile). Rechts Eiskristalle, links trockene Zellen. 3500 ×

Tafel VIII

Abbildung 25

Kristalloidbruchstücke im Endosperm am 3. und 4. Tag. 160 000 ×

Abbildung 26

Glyoxisomen im Endosperm. Das Zytoplasma ist durchsetzt von ER und Provakuolen. 12 800 ×

Abbildung 27

Ausschnitt aus einer Endospermzelle am 7. bis 8. Tag. Die Organellen und Sphärosomen sind in Auflösung begriffen. 10 000 ×

Abbildung 28

Die zahlreichen ins Plasmalemma übergehenden Endo- oder Exocytosebläschen können für den aktiven Transport der Zellen verantwortlich sein. 14 000 ×