

Phyton (Austria)	Vol. 17	Fasc. 1-2	159-165	18. 8. 1975
------------------	---------	-----------	---------	-------------

## Einfluß von 6-Benzylaminopurin auf die Feinstruktur von Mitochondrien und Plastiden in vitro kultivierter Protokorme von *Cymbidium*

Von

Manfred GAILHOFER & Irmtraud THALER \*)

Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen der Universität Graz

Mit 9 Abbildungen

Eingelangt am 4. April 1975

### Zusammenfassung

Der Einfluß von 6-Benzylaminopurin (BAP) auf Mitochondrien und Plastiden in vitro kultivierter Protokormzellen einer *Cymbidium*-Hybride wurde elektronenmikroskopisch untersucht. In den mit BAP im Licht kultivierten Zellen treten neben normalen Mitochondrien auch vergrößerte auf; in BAP-Dunkelkulturen wurde Extrusion von Mitochondrienmaterial in das Cytoplasma beobachtet. In den Kontrollkulturen zeigen die Mitochondrien verschiedene Phasen der Degeneration wie Vergrößerung, Kristallbildung und schließlich Auftreten von Riesenmitochondrien.

In Parenchymzellen von Lichtkulturen mit BAP herrschen Jungchloroplasten vor, ausgebildete Chloroplasten zeigen keinerlei Degenerationserscheinungen; die Chloroplasten der Kontrollen hingegen sind teilweise stark degeneriert, wobei massenhaft Phytoferritin auftritt. Dieses fehlt in den Plastiden der BAP-Lichtkultur völlig und kommt in den Leukoplasten der BAP-Dunkelkultur nur in geringer Menge vor.

Die Beobachtungen deuten auf einen die Entwicklung und Differenzierung hemmenden Einfluß des BAP hin.

### Summary

The effect of 6-benzylaminopurine (BAP) on mitochondria and plastids of protocorms of a *Cymbidium* hybrid cultivated in vitro was investigated

---

\*) Dr. M. GAILHOFER und Prof. Dr. I. THALER, Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen an der Universität, A-8010 Graz (Austria), Schubertstraße 51.

by electron microscope. In cells cultivated with BAP in light enlarged mitochondria appear besides normal sized ones. In cells cultivated in the dark was observed an extrusion of mitochondrial substance into the cytoplasm. In the controls the mitochondria show various stages of degeneration, i. e. enlargement, forming of crystals and finally there are found giant mitochondria. In parenchyma cells grown with BAP in light young chloroplasts predominate, fully differentiated ones do not show any symptoms of degeneration, whereas the chloroplasts in the controls are very degenerated containing phytoferritin in abundance. Phytoferritin is absent in tissues grown with BAP in light and appears only in small quantities growing with BAP in the dark. These observations may be explained by a retarding effect of BAP upon the development and differentiation of the cells and tissues.

### Einleitung

RÜCKER 1974 hat den Einfluß verschiedener Cytokinine auf in vitro kultivierte Protokorme von *Cymbidium* morphologisch und histologisch untersucht. Sie stellte fest, daß höhere Konzentrationen das Wachstum der Pflanze hemmen und das Entstehen von unregelmäßig gestalteten Protokormen fördern. Die Zellwand wird vorzeitig differenziert, häufig treten Xylemelemente in meristematischen oder in sich differenzierten Geweben auf. Außerdem wird eine Störung der Chlorophyllsynthese in manchen Gewebeteilen beobachtet.

Auch die Art der DNS-Zunahme im Kern ist vom Wuchsstoffgehalt im Nährmedium abhängig und steht in Beziehung zur Differenzierung. Bei zunehmenden Kinetingaben werden die Mitosen zugunsten der Endomitosen unterdrückt, wodurch es zu einer vorzeitigen abnormalen Zelldifferenzierung kommt (NAGL & RÜCKER 1972, 1974).

Unsere Untersuchungen galten der Frage, ob sich hohe Gaben eines Cytokinins (6-Benzylaminopurin) auch auf den Feinbau der Plastiden und Mitochondrien auswirken.

Frau Dr. Waltraud RÜCKER (Pharmakognostisches Institut der Universität Wien) danken wir herzlich für die Überlassung der *Cymbidium*-Kulturen.

### Material und Methode

Protokormfragmente von *Cymbidium* (Hybride „In memoriam Cyrill Strauss“) wurde auf Agar-Medium nach MURASHIGE & SKOOG 1962 kultiviert (RÜCKER 1974). Gut wachsenden Kulturen wurde 50 ppm 6-Benzylaminopurin, im folgenden kurz BAP genannt, dargeboten. Die Kontrollkultur enthielt im Nährmedium kein BAP. Eine Serie der BAP-Kultur („BAP-licht-Kultur“) und die Kontrollkultur waren während der gesamten Versuchsdauer von 4 Monaten einem Licht-Dunkel-Rhythmus von je

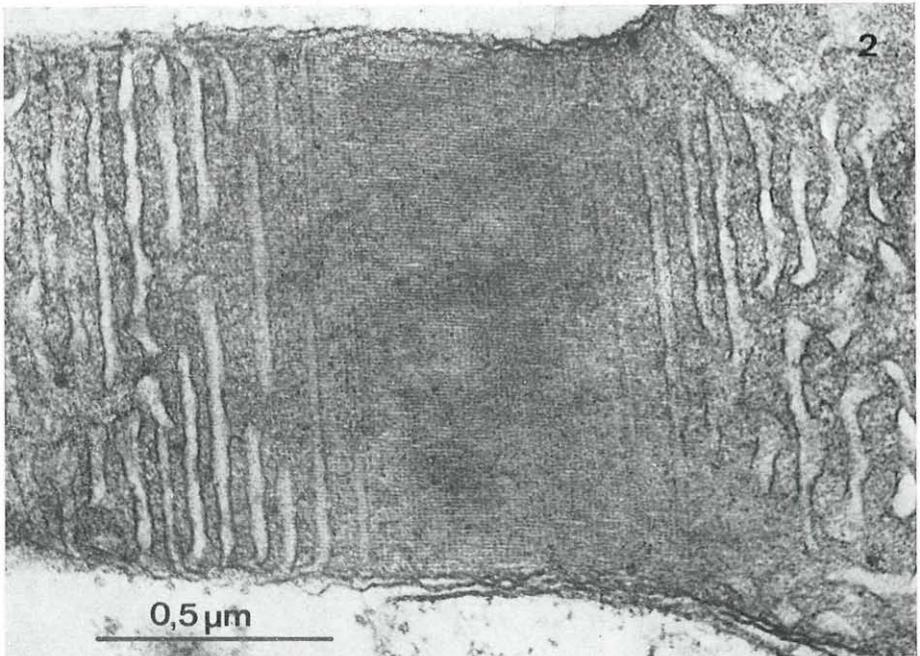
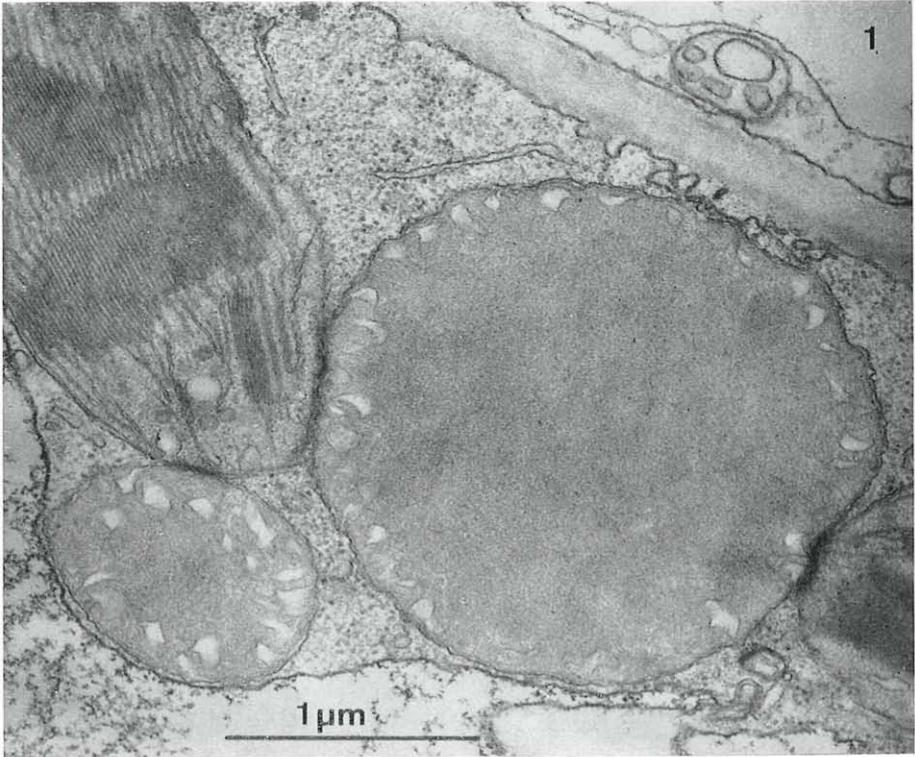


Abb. 1. BAP-licht-Kultur: Normales und vergrößertes Mitochondrium mit zwei Chloroplasten.  $\times 33600$ .

Abb. 2. Kontrollkultur: Ausschnitt aus dem mittleren Teil eines Mitochondriums mit kristallinem Bereich.  $\times 62370$ .



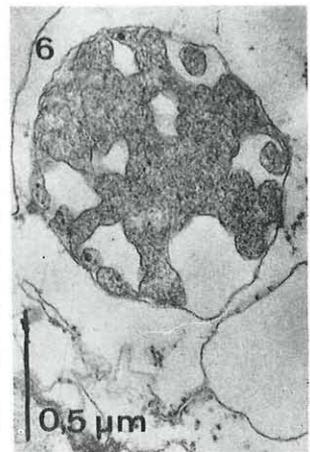
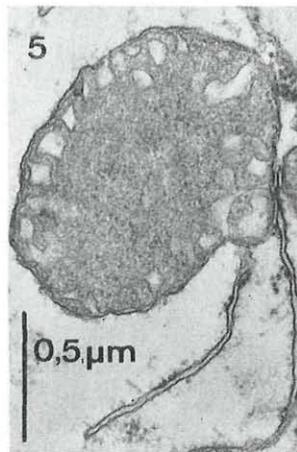
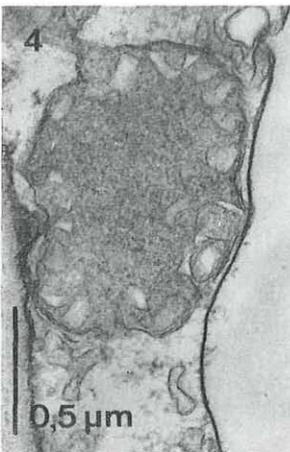
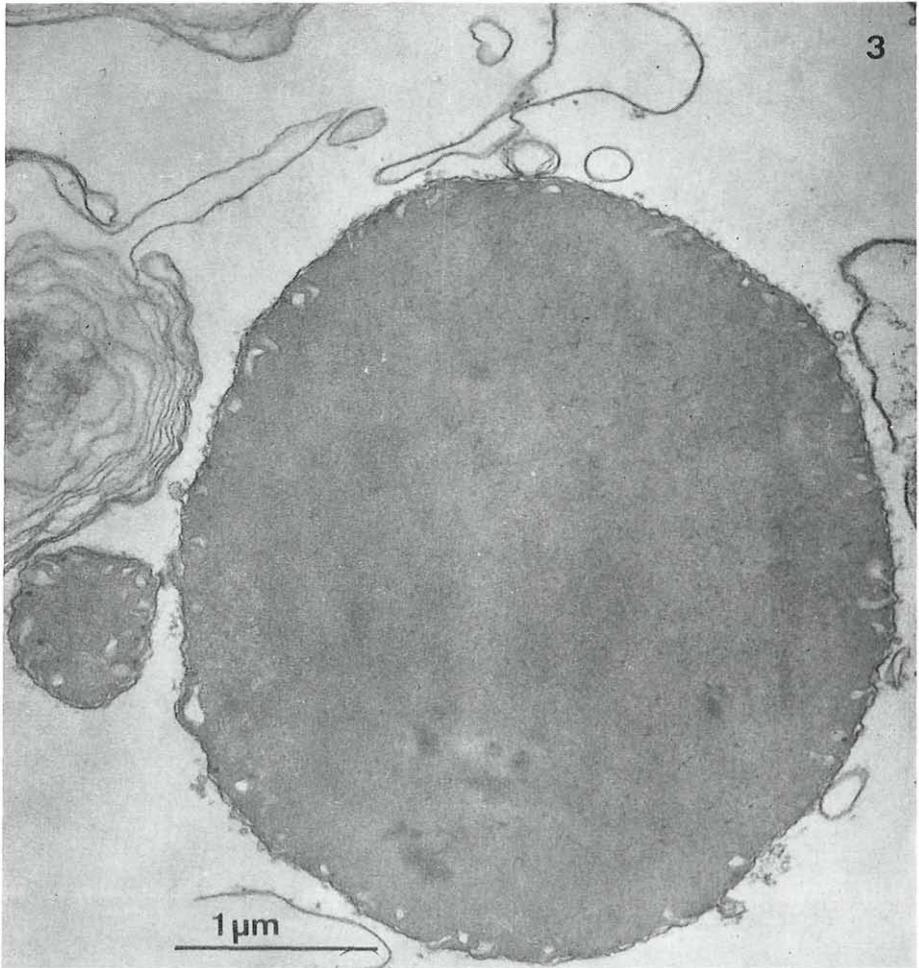


Abb. 3. Kontrollkultur: Riesenmitochondrium und Mitochondrium normaler Größe.  $\times 26100$ .

Abb. 4–6. BAP-dunkel-Kultur: Mitochondrien in Degeneration; Näheres im Text.  $\times 33600$ .



12 Stunden ausgesetzt. Die Temperatur wurde bei 22 bis 24° C gehalten. Einige Protokormkulturen mit BAP wurde nach 2 Monaten Licht-Dunkel-Rhythmus gänzlich im Dunkeln weiterkultiviert („BAP-dunkel-Kultur“). Die Kulturen wurden im Reaktorzentrum Seibersdorf, Institut für Landwirtschaft, von Frau Dr. RÜCKER gezüchtet und uns für die vorliegende Untersuchung zur Verfügung gestellt.

Etwa 1 mm<sup>3</sup> große Protokormstücke wurden 1,5 Stunden mit 4%igem phosphatgepufferten Glutardialdehyd pH 7,1 (SABATINI & al. 1963) vorfixiert, im Puffer ausgewaschen und anschließend 2 Stunden mit 1%igem Osmiumtetroxid in Veronalpuffer pH 7,1 nachfixiert (PALADE 1952). Nach dem Auswaschen mit Leitungswasser und Entwässerung in Äthanol wurde über Propylenoxid in Epon eingebettet (LUFT 1961). Die Ultradünnschnitte wurden mit dem Reichert OmU 2 hergestellt, mit Uranylacetat (WRISCHER 1967) und Bleicitrat (REYNOLDS 1963) kontrastiert und im Siemens Elmiskop IA untersucht.

### Eigene Beobachtungen

#### Mitochondrien

Die untersuchten Gewebe zeigen durchwegs einen Übergang von Differenzierung zur Degeneration, wobei diese in der Kontrolle am auffallendsten ist. In parenchymatischen Zellen der BAP-licht- und der Kontrollkultur treten neben 0,5–1 µm großen Mitochondrien auch vergrößerte mit einem Durchmesser bis zu 3,5 µm auf. Die Matrix dieser Organellen erscheint verdichtet (Abb. 1). Nur in degenerierten Zellen der Kontrollkultur wurden neben wenigen normal großen Mitochondrien je ein Riesenmitochondrium beobachtet, das beinahe die Größe eines Zellkernes erreicht (Abb. 3). Sein Durchmesser beträgt bis zu 6 µm und ist damit etwa 10mal größer als der normaler Mitochondrien. Außerdem kommen in der Kontrollkultur, allerdings nur selten, Mitochondrien vor, deren Matrix größtenteils kristallin ist (Abb. 2). Punktförmige Untereinheiten ordnen sich in Reihen, die in der Längs- wie in der Querrichtung der Mitochondrien verlaufen. Der Abstand der Linien beträgt etwa 80 Å. Die Cristae sind in der Umgebung des Kristalls gestreckt, untereinander parallel und senkrecht zur Längsachse des Mitochondriums angeordnet. Gegen den Kristall hin werden die Konturen der Cristae zunehmend undeutlicher und erscheinen von den Punktreihen des Kristalls überlagert.

In den Mitochondrien der BAP-dunkel-Kultur liegen oft von der Innenmembran umschlossene Bezirke vor, die durch das Einrollen der Sacculi entstehen (Abb. 4). Die Außenmembran kann in diesem Bereich unterbrochen sein (Abb. 5). Wie Serienschnitte zeigen, kommt es schließlich zu einer Extrusion, wobei im Mitochondrium eine Aussparung zurückbleibt (Abb. 6). Die glatte Zone des rauhen ERs liegt häufig der Außenmembran der Mitochondrien an (Abb. 5).

### Plastiden

In der farblosen Protokormspitze der Kontrollkultur finden sich Proplastiden, in den parenchymatischen Zellen ausdifferenzierte Chloroplasten. In degenerierenden Zellen ist ihr Thylakoidsystem aufgetrieben und die Zahl der Plastoglobuli vermehrt. Im Stroma der meisten Plastiden findet sich Phytoferritin, es kommt amorph, aggregiert oder kristallin vor (Abb. 7). Die Phytoferritinkristalle sind ungefähr  $1\ \mu\text{m}$  groß. Ihre Makromoleküle bilden in dichter Aufeinanderfolge oder distanziert parallele Reihen. Im Kristallgitter fallen mehrere Fehlstellen auf. Der Durchmesser des kontrastreichen Makromoleküls beträgt ca.  $70\ \text{Å}$ . Eine Substruktur ist nicht erkennbar. In der BAP-dunkel-Kultur finden sich durchwegs Leukoplasten von sehr unterschiedlicher Gestalt (Abb. 8). Sie sind häufig langgestreckt, zeigen eine oder mehrere Einschnürungen und enthalten nur wenige Thylakoide, hingegen eine größere Zahl von Plastoglobuli. Phytoferritin tritt in geringer Menge meist amorph oder in wenigen Reihen zu etwa 10 Makromolekülen angeordnet auf. Niemals wurden Prolamellar-körper beobachtet.

In den Parenchymzellen der BAP-licht-Kultur finden sich vor allem Jungchloroplasten. Die Grana bestehen nur aus 2–4 Thylakoiden und im Stroma liegen nur wenige Plastoglobuli. Manchmal ist das Thylakoidsystem aufgetrieben. In der unteren Zone des Protokorms enthalten die Zellen normale ausgebildete Chloroplasten und außerdem häufig vergrößerte Mitochondrien (Abb. 1). Phytoferritin wurde in den Plastiden dieser Kultur nie gefunden. Stärkehaltige Plastiden kommen in allen untersuchten Kulturen nur äußerst selten vor.

Junge Siebelemente wurden in allen Kulturen, besonders häufig in BAP-Kulturen, beobachtet, sie sind leicht an dem Vorkommen der auffallenden langgestreckten Plastiden mit den elektronendichten Einschlüssen zu erkennen, die zu keilförmigen Eiweißkristallen heranwachsen (Abb. 9). Außerdem treten in ihrem Stroma zahlreiche Vesikel auf, die durch Einstülpungen der inneren Plastidenmembran entstehen. Stärke und Phytoferritin wurde in diesen Plastiden niemals beobachtet. Diese Plastiden gehören dem p-Typ nach BEHNKE 1975 an.

### Diskussion

Mitochondrien verschiedener Größe, wie wir sie in Kontroll- und BAP-licht-Kulturen von *Cymbidium*-Protokormen beobachten konnten, sind auch in Gewebekulturen von Fibro- und Myoblasten beschrieben worden. Kinematographisch wurde beobachtet, daß sich diese Organellen abrunden, verzweigen und auch zusammenfließen können (vgl. REALE 1973). In *Cymbidium*-Kulturen treten einzelne Riesenmitochondrien erst in völlig degenerierten Zellen der Kontrollkulturen auf; sie fallen auch durch ihre elektronendichte Matrix, in der Granula zu erkennen sind, auf. Da sich

neben dem Riesenmitochondrium nur mehr wenige Mitochondrien normaler Größe vorfinden, liegt die Annahme nahe, daß die Riesenmitochondrien durch Fusion normaler entstanden sind. Sie sind allerdings nicht eine ständige Komponente der Degeneration. Sie ähneln am meisten den matrixreichen Riesenmitochondrien menschlicher Nierenzellen (THOENES 1966). In pathologisch veränderten tierischen Zellen kommen oft verschieden gestaltete Riesenmitochondrien vor (REALE 1973). Als Ursache für verdichtete und angeschwollene Mitochondrien, wie sie bei Autolyse und in nekrotischen tierischen Zellen auftreten, werden osmotische Veränderungen und ATP-Mangel angegeben (vgl. DAVID 1970). Aber auch im pflanzlichen Gewebe, in den Blattzellen von *Chenopodium quinoa* und *C. armaranticolor* wurden nach einer Infektion mit einem Apfelmavirus Riesenmitochondrien beobachtet (WEINTRAUB & RAGETLI 1971); diese zeigen lamelläre und tubuläre Einschlüsse, in der Matrix Granula und fibrilläre Strukturen, bei fortschreitender Degeneration auch viele Vakuolen.

Eiweißkristalle in Mitochondrien wurden in verschiedenen pflanzlichen und tierischen Zellen beschrieben (vgl. TSEKOS 1972). Wir konnten Kristallstrukturen nur in wenigen Mitochondrien der Kontrollkulturen von *Cymbidium* beobachten. Der aus Fibrillen aufgebaute Kristall steht einerseits mit der inneren Membran des Mitochondriums und andererseits mit den Cristae in Verbindung. Ähnliche Einschlüsse wurden in den Mitochondrien der Früchte von *Malpighia glabra* beschrieben (ARNOTT 1966).

Die Mitochondrien der BAP-dunkel-Kultur waren niemals vergrößert, sie scheinen auf andere Weise zu degenerieren. Kleinere Partien der granulären Matrix, die ein Sacculum umschließen, können ausgestoßen werden; ER, das man häufig mit der Außenmembran verbunden sieht, scheint dabei beteiligt zu sein. Verbindungen von ER mit der Außenmembran von Mitochondrien wurden von MORRÉ, MERRITT & LEMBI 1971 bei *Allium cepa* beschrieben, jedoch nicht im Zusammenhang mit Zellabbauvorgängen diskutiert. Die Mitochondrienveränderungen der *Cymbidium*-Kulturen treten in verschiedenen Stadien der Degeneration der Zellen auf und werden offenbar nicht von BAP beeinflusst, sondern durch Lichtmangel hervorgerufen.

Nach RÜCKER 1974 beeinflussen Cytokinine (BAP) den Chlorophyllhaushalt. Wie wir beobachteten, sind die Plastiden der BAP-licht-Kultur größtenteils zu Jungchloroplasten, jene der Kontrollkultur zu voll differenzierten Chloroplasten entwickelt. In den Zellen der BAP-licht-Kultur, die ausdifferenzierte Chloroplasten enthalten, sind die Mitochondrien schon degenerativ vergrößert. Differenzierungs- und Degenerationssymptome treten somit in der BAP-licht-Kultur oft nebeneinander auf. Die Chloroplasten dieser Kultur enthielten im Stroma niemals Phytoferritin, wie es in den degenerierenden Chloroplasten aus dem Parenchym der Kontrollkultur häufig war. In solchen Zellen fanden sich die größten Mitochondrien. Phytoferritin wurde in Proplastiden und in ausdifferenzierten Chloroplasten vieler

Angiospermen beschrieben (Lit. bei ROBARDS & HUMPHERSON 1967, AMELUNXEN, THALER & HARSdorFF 1970). Es wird als Eisenreservoir für einen funktionierenden Photosyntheseapparat angesehen (ROBARDS & ROBINSON 1968, PERRIN 1970). Auch die Plastiden der Gewebekulturen von *Streptanthus tortuosus* enthalten Phytoferritin (SJOLUND & WEIER 1967). ROBERTS & NORTHcOTE 1970 kultivierten *Acer pseudoplatanus* auf HELLER-Medium und erhielten trotz BAP-Zusatz Phytoferritin. Dieses von unseren Beobachtungen abweichende Versuchsergebnis ist möglicherweise im viel geringeren BAP-Zusatz (1,3 ppm gegenüber 50 ppm in unseren Kulturen) begründet. In letzter Zeit wurde Phytoferritin in photosynthetisch wenig aktiven Chloroamyloplasten einer *Smicronyx*-Galle auf *Cuscuta campestris* (GAILHOFER & THALER 1974) und in Chloroplasten vergilbender Kohlrabi-blätter (MŁODZIANOWSKI & KWINTKIEWICZ 1973) beobachtet, sodaß Phytoferritin auch als Alterssymptom angesehen werden muß.

Dieses Eisenprotein tritt auch in den Plastiden virusinfizierter *Beta vulgaris* und welkekranker *Cocos nucifera* auf (CRONSHAW et al. 1966, MARAMOROSCH & HIRUMI 1973).

Die durch 6-Benzylaminopurin verursachte allgemeine Stimulation des Stoffwechsels verzögert in den untersuchten *Cymbidium*-Kulturen offenbar das biologische Altern. In der BAP-licht-Kultur war die degenerative Mitochondrienvergrößerung verzögert und in den Chloroplasten kein Phytoferritin ausgebildet. In der BAP-dunkel-Kultur ist die Degeneration der Leukoplasten anscheinend fortgeschritten, so daß trotz BAP-Gaben geringfügig Phytoferritin gebildet werden kann. Auch im Cytoplasma treten typische Regenerationserscheinungen auf, die in einer weiteren Arbeit beschrieben werden.

#### Schrifttum

- AMELUNXEN F., THALER I. & HARSdorFF M. 1970. Die Struktur der Phytoferritinkristalle von *Phajus grandifolius*. — Z. Pflanzenphysiol. 63: 199—210.
- ARNOTT H. J. 1966. Mitochondrial crystals in the Barbados-Cherry (*Malpighia glabra*). — Amer. J. Bot. 53: 603.
- BEHNKE H. D. 1975. P-type sieve-element plastids: A correlative ultrastructural and ultrahistochemical study on the diversity and uniformity of a new reliable character in seed plant systematics. — Protoplasma 83: 91—101.
- CRONSHAW J., HOEFERT L. & ESAU K. 1966. Ultrastructural features of *Beta* leaves infected with beet yellows virus. — J. Cell Biol. 31: 429—443.
- DAVID H. 1970. Zellschädigung und Dysfunktion. — Protoplasmatologia X/1. Wien—New York.
- GAILHOFER M. & THALER I. 1974. Plastidenstrukturen einer *Smicronyx*-Galle auf *Cuscuta campestris*. — Phyton 16: 57—64.
- LUFT J. H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. — J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 409—414.

- MARAMOROSCH K. & HIRUMI H. 1973. Phytoferritin accumulations in leaves of diseased coconut palms. — *Protoplasma* 78: 175—180.
- MŁODZIANOWSKI F. & KWINTKIEWICZ M. 1973. The inhibition of kohlrabi chloroplast degeneration by kinetin. — *Protoplasma* 76: 211—226.
- MORRÉ J., MERRITT W. D. & LEMBI C. A. 1971. Connections between mitochondria and endoplasmic reticulum in rat liver and onion stem. — *Protoplasma* 73: 43—49.
- NAGL W. & RÜCKER W. 1972. Beziehungen zwischen Morphogenese und nuklearem DNS-Gehalt bei aseptischen Kulturen von *Cymbidium* nach Wuchsstoffbehandlung. *Z. Pflanzenphysiol.* 67: 120—134.
- 1974. Shift of DNA replication from diploid to polyploid cells in cytokinin-controlled differentiation. — *Cytobios* 10: 137—144.
- PALADE G. E. 1952. A study of fixation for electron microscopy. — *J. exp. Med.* 95: 285—298.
- PERRIN A. 1970. Diversité des formes d'accumulation de la phytoferritine dans les cellules constituant l'épithème des hydathodes de *Taraxacum officinale* WEBER et *Saxifraga aizoon* JACQ. — *Planta* 93: 71—81.
- REALE E. 1973. Mitochondrien. — In: HIRSCH G. C., RUSKA H. & SITE P. Grundlagen der Zytologie, 305—343. Jena.
- REYNOLDS E. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. — *J. Cell Biol.* 17: 208—213.
- ROBARDS A. W. & HUMPHERSON P. G. 1967. Phytoferritin in plastids of the cambial zone of willow. — *Planta* 76: 169—178.
- & ROBINSON C. L. 1968. Further studies on phytoferritin. — *Planta* 82: 179—188.
- ROBERTS K. & NORTHCOLE D. H. 1970. The structure of sycamore callus cells during division in a partially synchronized suspension culture. — *J. Cell. Sci.* 6: 299—321.
- RÜCKER W. 1974. Einfluß von Cytokinen auf Wachstum und Differenzierung in vitro kultivierter Protokorme von *Cymbidium*. — *Z. Pflanzenphysiol.* 72: 388—351.
- SABATINI D. D., BENSCH K. & BARNETT R. J. 1963. Cytochemistry and electron microscopy. — *J. Cell Biol.* 17: 19—58.
- SJOLUND R. D. & WEIER T. E. 1967. Ultrastructural aspects of chloroplast development in callus cultures of *Streptanthus tortuosus* (*Cruciferae*). — *Amer. J. Bot.* 54: 637.
- THOENES W. 1966. Über matrixreiche Riesenmitochondrien. Elektronenmikroskopische Beobachtungen am Tubulusepithel der menschlichen Niere bei nephrotischem Syndrom. — *Z. Zellforsch.* 75: 422—433.
- TSEKOS I. 1972. Die Feinstruktur kristalloider Einschlüsse in Mitochondrien von *Porterioochromonas stipitata*. — *Arch. Mikrobiol.* 85: 138—1411
- WEINTRAUB M. & RAGETLI H. W. J. 1971. A mitochondrial disease of leaf cels. infected with an apple virus. — *J. Ultrastruct. Res.* 36: 669—693.
- WRISCHER M. 1967. Kristalloide im Plastidenstroma. — *Planta* 75: 309—318.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1975

Band/Volume: [17\\_1\\_2](#)

Autor(en)/Author(s): Gailhofer Manfred Karl, Thaler Irmtraud

Artikel/Article: [Einfluß von 6-Benzylaminopurin auf die Feinstruktur von Mitochondrien und Plastiden in vitro kultivierter Protokorme von Cymbidium. 159-165](#)