

PLASTOGLOBULI KOD VRSTE *CHLOROPHYTUM COMOSUM* (THUMB.) BAKER

With English and German Summary
Mit deutscher und englischer Zusammenfassung

NIKOLA LJUBEŠIĆ

(Laboratorij za elektronsku mikroskopiju, Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb)

Primljeno 20. 12. 1968.

U v o d

Elektronski mikroskop je pokazao da sve niže i više biljke sadrže u plastidima osmiofilne uklopine koje je Wettstein (1957) zbog okruglog oblika nazvao globuli, a kojima su Lichtenthaler i Sprey (1966), da bi naglasili njihovu vezu s plastidima, dali naziv plastoglobuli. Elektronsko-mikroskopska istraživanja plastoglobula vršili su među ostalima Steimann i Sjöstrand (1955), Falk (1960), Sitte (1963), Greenwood et al. (1963), Lichtenthaler i Peveling (1966, 1967a, 1967b) te Silaeva i Shiryaev (1966a, 1966b). Plastoglobule su izolirali i kemijski analizirali Bailey et al. (1963), Bailey i Whyborn (1963), Lichtenthaler (1964), Bailey et al. (1966) te Lichtenthaler i Sprey (1966). Pored kloroplasta vrlo veliku količinu plastoglobula sadrže kromoplasti (Steffen i Walter 1958, Frey-Wyssling i Kreutzer 1958, Lance-Nugarède 1960 i dr.).

Zbog pogodne veličine plastoglobula kod klorofituma (*Chlorophytum comosum*) bilo je zgodno načiniti nekoliko pokusa kojima se nastojala bolje upoznati njihova funkcija.

Materijal i metode

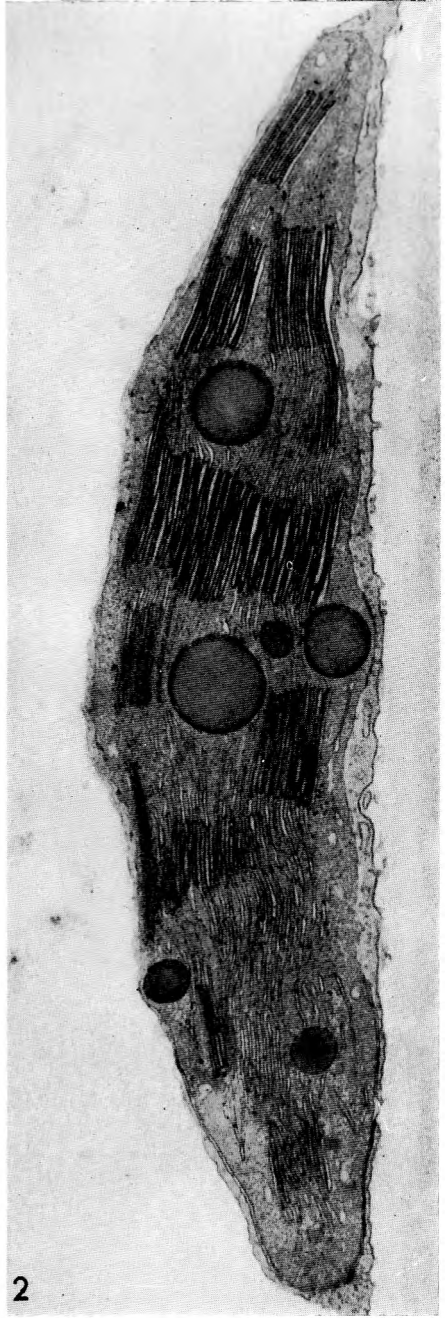
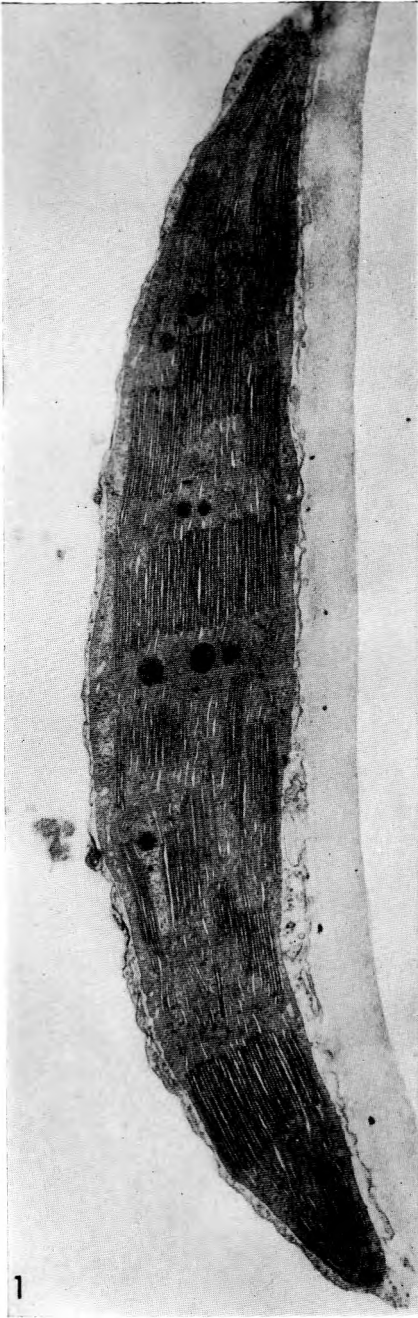
Kao eksperimentalni materijal poslužili su listovi vrste *Chlorophytum comosum* (Thumb.) Baker (*Ch. sternbergianum* Steudel). Za svjetlosno-mikroskopska istraživanja korišteni su tangencijalni prerezi listova u živom i fiksiranom stanju. Fiksacija materijala za svjetlosni mikroskop vršena je 4% -tnim formaldehidom. Plastoglobuli su bojeni sa sudanom III, sudanskim crnilom B ili Altmannovom smjesom (Romeis 1948).

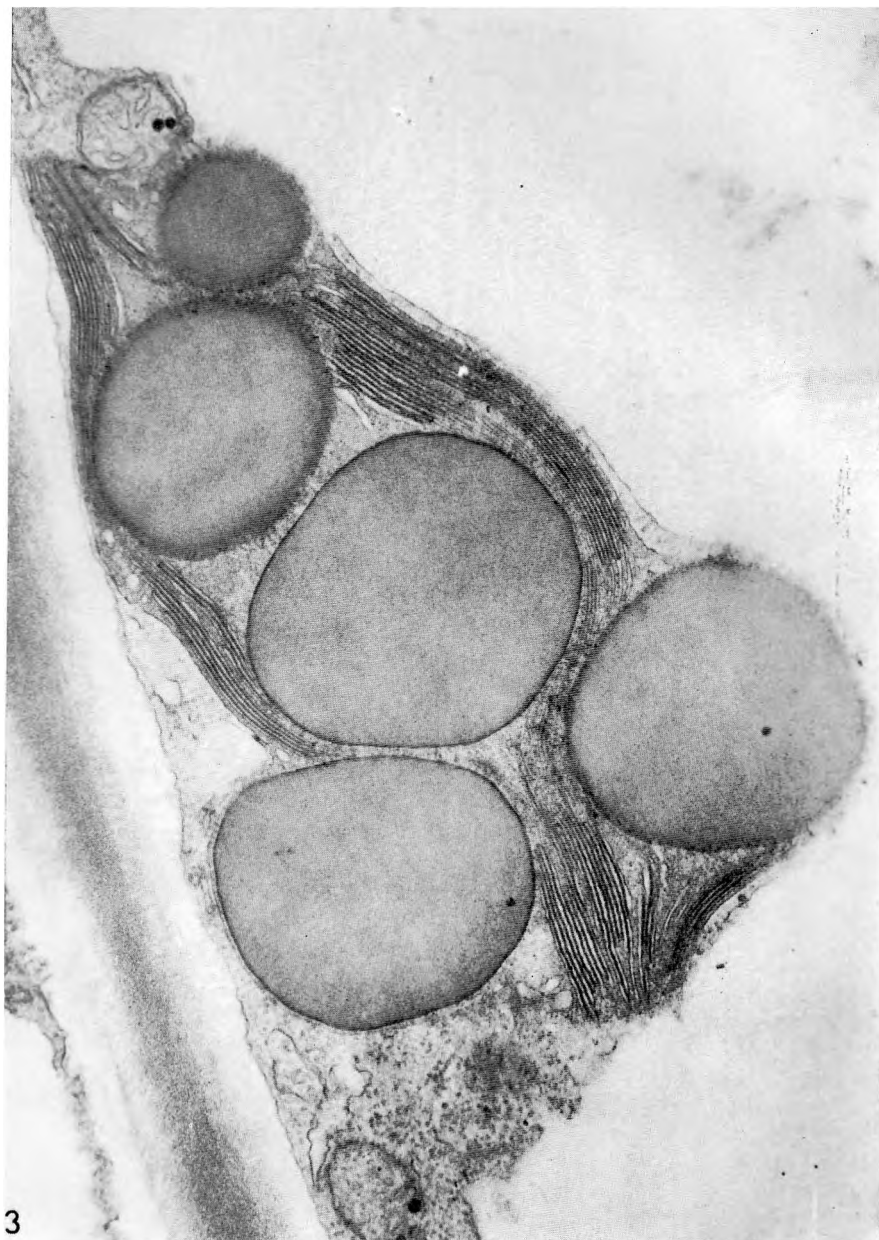
Za elektronski mikroskop fiksirani su komadići lista s 1% -tnim OsO_4 (Palade 1952) 1—2 sata ili 4—6% -tnim glutaraldehidom 2—3 sata te postfiksirani u 1% -tnom OsO_4 u trajanju od 1—2 sata (Gunning 1965). Fiksirani materijal je nakon dehidracije acetonom ili etanolom uklopljen u araldit ili metakrilat te rezan na Ultratomu LKB* staklenim noževima. Prerezi su kontrastirani olovnim citratom (Reynolds 1963). Sve snimke su načinjene pomoću Elmiskopa I*.

Tumač slika — Explanation of figures — Abbildungserklärung

- Sl. 1. *Ch. comosum*. Kloroplast iz mladog lista. Plastoglobuli promjera oko 0,1 μm . Glutaraldehid — OsO_4 . Kontrastirano olovnim citratom, 30000:1.
- Fig. 1. *Ch. comosum*. Chloroplast of a young leaf. Plastoglobuli with diameter of about 0,1 μm . Glutaraldehyde — OsO_4 . Lead citrate staining, 30 000:1.
- Abb. 1. *Ch. comosum*. Chloroplast aus einem jungen Blatt. Plastoglobuli mit Durchmesser um etwa 0,1 μm . Glutaraldehyd — OsO_4 . Kontrastiert mit Bleizitrat, 30 000 : 1.
- Sl. 2. *Ch. comosum*. Kloroplast iz odraslog lista. Plastoglobuli promjera 0,2—0,4 μm . Svi ostali dijelovi kloroplasta normalni. Glutaraldehid — OsO_4 . Kontrastirano olovnim citratom, 35 000 : 1.
- Fig. 2. *Ch. comosum*. Chloroplast of a mature leaf. Plastoglobuli with diameter of 0,2—0,4 μm . Glutaraldehyde — OsO_4 . Lead citrate staining, 35 000 : 1.
- Abb. 2. *Ch. comosum*. Chloroplast aus einem ausgewachsenen Blatt. Plastoglobuli mit Durchmesser von 0,2—0,4 μm . Alle übrigen Teile des Chloroplasten sind normal. Glutaraldehyd — OsO_4 . Kontrastiert mit Bleizitrat, 35 000 : 1.
- Sl. 3. *Ch. comosum*. Plastidi iz starog lista. Plastoglobuli promjera iznad 1,0 μm ispunjavaju gotovo čitav plastid. Ostaci tilakoida nalaze se stisnuti na području između plastoglobula. Glutaraldehid — OsO_4 . Kontrastirano olovnim citratom, 39 000 : 1.
- Fig. 3. *Ch. comosum*. Plastid of an old leaf. Plastoglobuli with diameter over 1,0 μm fill out nearly the whole plastid. The remainders of the thylakoids are pressed into the region between the plastoglobules. Glutaraldehyde — OsO_4 . Lead citrate staining, 39 000 : 1.
- Abb. 3. *Ch. comosum*. Plastide aus einem alten Blatt. Plastoglobuli mit Durchmesser über 1,0 μm erfüllen fast die ganze Plastide. Die Reste der Thylakoide befinden sich gedrängt im Gebiet zwischen den Plastoglobuli. Glutaraldehyd — OsO_4 . Kontrastiert mit Bleizitrat, 39 000 : 1.

* Instrumenti interinstitutskog Odjela elektronske mikroskopije (Instituta »Ruder Bošković«, Instituta za biologiju Sveučilišta i Zavoda za opću patologiju i patološku anatomiju Medicinskog fakulteta) Zagreb.





Rezultati i diskusija

Dok su kod velike većine biljaka plastoglobuli submikroskopske veličine, kod vrste *Ch. comosum* imaju u normalnom zelenom listu promjer od 0,3—1,0 μm (sl. 2). Ovakvo velike plastoglobule moguće je pratiti i s pomoću svjetlosnog mikroskopa. Prosječno u kloroplastu ima 10—20 velikih plastoglobula.

Iako vrlo mladi list sadrži plastoglobule samo oko 0,1 μm (sl. 1), kod normalnog odraslog lista njihov promjer naraste do 0,5 pa i do 1,0 μm . Maksimalnu veličinu postignu plastoglobuli neposredno prije propadanja lista (oko 1,5—2,0 μm) (sl. 3). Ovo povećanje nije rezultat stapanja više malih plastoglobula, jer njihov broj po kloroplastu ne pada, već naprotiv stalno postepeno raste.

Variranjem nekoliko vanjskih faktora kao što su izmjena fotoperioda, intenzitet osvjetljenja, temperatura i promjena godišnjeg doba, nije nikako bilo moguće utjecati na razvitak plastoglobula. Jedina promjena je povećanje plastoglobula sa starošću lista.

Rast veličine sa starošću lista ne potvrđuje neka starija mišljenja da se radi o rezervnoj supstanciji i da je povećanje plastoglobula ovisno o promjenama godišnjih doba (Mikulsk a 1960).

Kada bi plastoglobuli bili rezervna supstancija, oni bi se morali trošiti u nepovoljnim životnim uvjetima. Međutim trošenje plastoglobula nije bilo moguće izazvati nikakvim vanjskim faktorima. Listovi klorofituma s velikim plastoglobulima odrezani su s biljke i stavljeni u tamu kako bi zbog izostajanja fotosinteze bili prisiljeni mobilizirati eventualne »hranjive tvari« iz plastoglobula. To se, međutim, nije nikada događalo. Ne samo da se plastoglobuli nisu smanjivali već su se, naprotiv, sa starošću lista stalno povećavali, dok na kraju nisu listovi propali s maksimalno velikim plastoglobulima.

Povećanje plastoglobula sa starošću lista ukazivalo bi da su oni nastali procesom »odjeljivanja« (Entmischungsprozesse) ili lipofaneroze (Frey-Wyssling 1955, Franz 1958). Nasuprot tome, istraživanja Wettsteina (1957), Lichtenthalera i Spreya (1966) te Spreya i Lichtenthalera (1966) ukazuju na izvjesnu ulogu plastoglobula u formiranju tilakoida.

Pokusi na duhanu (Ljubešić 1968) pokazuju također da se plastoglobuli povećavaju sa starošću lista. Ponovnim ozelenjavanjem starih i požutjelih listova ustanovljeno je, naime, da ne dolazi do smanjivanja plastoglobula. Iako pri tome dolazi do formiranja novih tilakoida. Ovi su rezultati, prema tome, barem djelomično u suprotnosti s mišljenjem onih autora koji pripisuju plastoglobulima ulogu u izgradnji tilakoida.

Zaključak

Sistematska svjetlosno-mikroskopska i elektronsko-mikroskopska istraživanja kloroplasta vrste *Chlorophytum comosum* pokazala su prisustvo velikih plastoglobula (0,5—2,0 μm). Utvrđeno je jednoznačno da se plastoglobuli povećavaju sa starenjem lista i da u momentu propadanja lista dosegnu maksimalnu veličinu. Variranjem vanjskih faktora nije bilo moguće izazvati njihovo trošenje ili na bilo koji način utjecati na njihove promjene.

Najljepše se zahvaljujem prof. dru Zvonimiru Devidéu i dr Mercedes Wrischer na pomoći prilikom izrade i pisanja ovog rada.

Literatura

- Bailey, J. L. and A. G. Whyborn, 1963: The osmiophilic globules of chloroplasts. II. Globules of the spinach-beet chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* 78, 163—174.
- Bailey, J. L., A. G. Whyborn, A. D. Greenwood, R. M. Leech and J. P. Williams, 1963: The osmiophilic globules of chloroplasts. *Biochem. J.* 88, 27—28.
- Bailey, J. L., J. P. Thornber and A. G. Whyborn, 1966: The chemical nature of chloroplast lamellae. Iz: Goodwin, T. W.: *Biochemistry of chloroplasts*. Vol. I, Academic Press, London and New York. 243—255.
- Falk, H., 1960: Magnoglobuli in Chloroplasten von *Ficus elastica* Roxb. *Planta* 55, 525—532.
- Franz, R., 1958: Lipoidmischung von Algenplastiden. *Protoplasma* 49, 197—225.
- Frey-Wyssling, A., 1955: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. *Protoplasmatologia II A* 2, 15. Springer Verlag, Wien.
- Frey-Wyssling, A. und E. Kreuzer, 1958: Die submikroskopische Entwicklung der Chromoplasten in den Blüten von *Ranunculus repens* L. *Planta* 51, 104—114.
- Greenwood, A. D., R. M. Leech and J. P. Williams, 1963: The osmiophilic globules of chloroplasts. I. Osmiophilic globules as normal component of chloroplasts and their isolation and composition in *Vicia faba* L. *Biochim. Biophys. Acta* 78, 148—162.
- Gunning, B. E. S., 1965: The fine structure of chloroplast stroma following aldehyde osmium-tetroxide fixation. *J. Cell Biol.* 24, 79—93.
- Lance-Nugarède, A., 1960: Développement inframicroscopique des chromoplastes, au cours de l'ontogenèse des fleurs ligulées de *Chrysanthemum segetum*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 250, 173—175.
- Lichtenthaler, H. K., 1964: Untersuchung über die osmiophilen Globuli der Chloroplasten. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 77, 398—402.
- Lichtenthaler, H. K. und E. Peveling, 1966: Osmiophile Lipideinschlüsse in den Chloroplasten und im Cytoplasma von *Hoya carnosa* R. *Br. Naturwissenschaften* 53, 534.
- Lichtenthaler, H. K. und E. Peveling, 1967a: Plastoglobuli in verschiedenen Differenzierungsstadien der Plastiden bei *Allium cepa* L. *Planta* 72, 1—13.
- Lichtenthaler, H. K. und E. Peveling, 1967b: Plastoglobuli und osmiophile cytoplasmatische Lipideinschlüsse in grünen Blättern von *Hoya carnosa* R. *Br. Z. Pflanzenphysiol.* 56, 153—165.
- Lichtenthaler, H. K. und B. Sprey, 1966: Über die osmiophilen globulären Lipideinschlüsse der Chloroplasten. *Z. Naturforschung* 21b, 690—697.
- Ljubešić, N., 1968: Feinbau der Chloroplasten während der Vergilbung und Wiederergrünung der Blätter. *Protoplasma* 66, 369—379.
- Mikulska, E., 1960: Inkluzje tuszczowe w chloroplastach. *Acta Soc. Bot. Polon.* 29, 431—455.
- Palade, G. E., 1952: A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* 95, 285—298.
- 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.
- Romeis, B., 1948: *Mikroskopische Technik*. R. Oldenbourg, München.
- Silaeva, A. M. i A. J. Shi'yaev, 1966a: O tankoi strukture osmiofil'nykh globul khloroplasta. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 170, 433—434.
- Silaeva, A. M. and A. I. Shi'ryaev, 1966b: Three-dimensional plastid structure reconstructed on the basis of electron microscopic observations. Sixth International Congress for Electron Microscopy, Kyoto. 375—376.
- Sitte, P., 1963: Hexagonale Anordnung der Globuli in Moos-Chloroplasten. *Protoplasma* 56, 197—201.
- Sprey, B. und H. Lichtenthaler, 1966: Zur Frage der Beziehungen zwischen Plastoglobuli und Thylakoidgenese in Gerstenkeimlingen. *Z. Naturforschung* 21b, 697—699.

- Steffen, K. and F. Walter, 1958: Die Chromoplasten von *Solanum capsicastrum* L. und ihre Genese. *Planta* 50, 640—670.
- Steinmann, E. and F. S. Sjöstrand, 1955: The ultrastructure of chloroplasts. *Exp. Cell Res.* 8, 15—23.
- Wettstein, D., 1957: Chlorophyll-Letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Exp. Cell Res.* 12, 427—506.

SUMMARY

PLASTOGLOBULES IN *CHLOROPHYTUM COMOSUM* (THUMB.) BAKER

Nikola Ljubešić

(Laboratory for Electron Microscopy, Institute »Ruđer Bošković«, Zagreb)

Plastoglobules of considerable size (0,5—1,0 μm) appear in *Ch. comosum*. Therefore it is very easy to follow the changes of these plastoglobules by means of electron as well as light microscope. Some experiments have been undertaken to get more information on the role of the plastoglobules.

It has been definitely proved that plastoglobules increase in size during senescence of the leaves obtaining at the moment of death their maximal size. The variation of environmental factors as photoperiod, light intensity, temperature, seasonal changes of the year had no influence on the size and number of plastoglobules. These results are in disagreement with some earlier opinions that the appearance of plastoglobules is connected with seasonal variations or that they represent a reserve substance.

ZUSAMMENFASSUNG

PLASTOGLOBULI VON *CHLOROPHYTUM COMOSUM* (THUMB.) BAKER

Nikola Ljubešić

(Laboratorium für Elektronenmikroskopie, Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb)

Bei *Ch. comosum* kommen sehr grosse Plastoglobuli vor (0,5—1,0 μm). Solche grossen Plastoglobuli lassen sich sowohl mit Hilfe vom Elektronenmikroskop als auch Lichtmikroskop leicht verfolgen. Es wurden einige Versuche durchgeführt um die Bedeutung der Plastoglobuli besser kennen zu lernen.

Es konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Plastoglobuli mit dem Altern des Blattes ständig grösser werden um im Moment des Absterbens des Blattes ihre maximale Grösse zu erreichen. Das Variieren von äusseren Faktoren wie z. B. der Photoperiode, Lichtintensität, Temperatur und Wechsel der Jahreszeiten hatte gar keinen Einfluss auf die Grösse und Zahl der Plastoglobuli. Diese Resultate stehen im Widerspruch mit älteren Anschauungen denen zu Folge das Vorkommen von Plastoglobuli von den Jahreszeiten abhängig sei, bzw. die Plastoglobuli eine Reserve-substanz darstellen.