

DIE SCHICHTENDOPPELBERECHUNG GROSSER CHLOROPLASTEN

von

A. FREY-WYSSLING UND E. STEINMANN

Pflanzenphysiologisches Institut der E.T.H., Zürich (Schweiz)

Bei der Beobachtung geeigneter Chloroplasten in verschieden konzentriertem Glycerin als Einschlussmittel erscheint ihre Doppelbrechung veränderlich¹. Aus dieser Feststellung ist auf einen unsichtbaren submikroskopischen Schichtenbau der Chloroplasten geschlossen worden², im Sinne der Wienerschen Mischkörpertheorie, die aussagt, dass in einem durchtränkungsfähigen Paket von submikroskopischen Lamellen eine Doppelbrechung Δn entsteht, die in gesetzmässiger Weise vom Brechungsindex n_2 der Imbibitionsflüssigkeit abhängt. Die Schichtendoppelbrechungskurve $\Delta n = f(n_2)$ ist eine nach unten geöffnete Hyperbel, von welcher jedoch bisher nur ein kleiner Teil des aufsteigenden Astes verfolgt werden konnte, während sich das Extremum der Kurve und namentlich der absteigende Hyperbelast noch nicht mit Sicherheit erfassen liessen, da der sehr labile Chloroplastenbau durch die meisten höherbrechenden, nicht wässerigen Einschlussmittel irreversible Veränderungen erleidet.

Wir haben daher versucht, vollständige Schichtendoppelbrechungskurven zu erhalten, die unabhängig davon, ob man mit Flüssigkeitsreihen aufsteigenden oder absteigenden Brechungsvermögens imbibiert, reversibel reproduzierbar sind. Nur dann ist man sicher, ob die beobachteten Doppelbrechungsveränderungen nicht durch andere Effekte wie Quellungs-, Entquellungs- oder Lösungsscheinungen bedingt sind.

Ihrer einfachen plattenartigen Form und des Fehlens von mikroskopisch sichtbaren Granen wegen eignen sich die Chloroplasten der Conjugatenalgen der Gattung *Mougeotia* besonders gut zu solchen Studien. Für die Untersuchung wurde eine grosszellige Art (Fadendurchmesser 22 μ) aus einem Versuchsteich unseres Gartens verwendet.

I. DIE DOPPELBERECHUNG LEBENDER CHLOROPLASTEN

MENKE³ hat die Optik der *Mougeotia*-Plastiden beschrieben. Sie sind optisch negativ einachsig; die optische Achse steht senkrecht zur Chloroplastenplatte. Deshalb zeigen *Mougeotia*-Plastiden nur Doppelbrechung, wenn sie auf ihrer Schmalseite beobachtet werden. Die Auslöschung ist in dieser Stellung gerade. Der grössere ordentliche Brechungsindex n_o verläuft dann parallel zur Längsrichtung des Chloroplasten.

Die Doppelbrechung der lebenden Chloroplasten ist nicht konstant. Sie variiert mit den Umweltbedingungen. Unsere Messungen im grünen Licht der Quecksilberdampflampe ergaben eine Grösse der Doppelbrechung von $n_a - n_o = -0.00176 \pm 0.00023$. Dieser Wert stimmt grössenordnungsmässig überein mit der Angabe von MENKE (-0.0012).

Die grüne Eigenfarbe der Chloroplasten kompliziert die Doppelbrechungsscheinung. Literatur S. 259.

nungen. Durch die starke Absorption in bestimmten Wellenlängenbereichen tritt eine anormale Dispersion der Doppelbrechung auf⁴. Diese wurde von uns an Chloroplasten lebender Algenfäden über das ganze sichtbare Spektrum mit einem grossen Leitz-Monochromator erneut bestimmt. Die Gangunterschiede wurden mit einem Berek-Kompensator gemessen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Werte immer etwas zu hoch aus gefallen sind, da der schwache Gangunterschied der Zellwände in sie eingegangen ist; der Fehler ist jedoch so unbedeutend und konstant, dass von einer Korrektur abgesehen worden ist. Die Resultate der Messungen sind in Fig. 1. aufgezeichnet. Sie unterscheiden

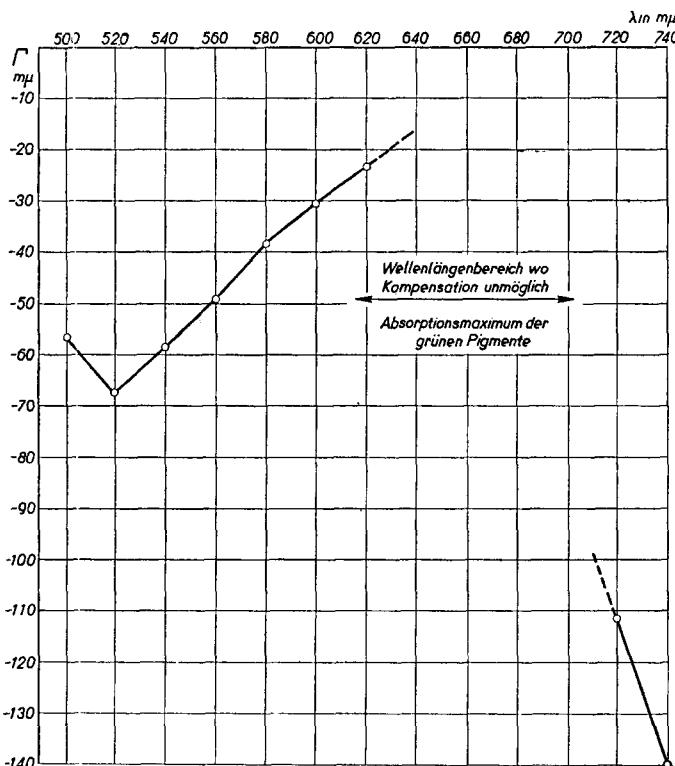


Fig. 1. Dispersion der Doppelbrechung lebender Chloroplasten von *Mougeotia*. Abszisse: Wellenlänge λ in $m\mu$. Ordinate: Gangunterschied Γ in $m\mu$.

sich von den Angaben von MENKE (1943) dadurch, dass im Gebiet der Hauptabsorption der grünen Pigmente im Rot ($\lambda = 640-700 m\mu$) eine Kompensation des austretenden roten Lichtes nicht möglich war. Dieses ist teilweise depolarisiert. Da den Chloroplasten anliegende Gerbstoffkugelchen, die isotrop und ungefärbt sind, ebenfalls rot aufleuchten, handelt es sich um depolarisiertes Streulicht. Die anormalen Veränderungen der Brechungsindizes gefärbter Substanzen, die in den Wellenbereichen grösster Absorption auftreten, geben einen Hinweis dafür, dass das rote Aufleuchten der Chloroplasten durch selektive Lichtsplitterung⁵ als Folge der starken Absorption der Plastidenpigmente zustande kommt.

Die Tatsache, dass man das rote Licht, das durch die Chloroplasten dringt, nicht kompensieren kann, gibt auch eine Erklärung für die unter dem Namen "Quadranten-Effekt"^{6, 7, 8} beschriebene Erscheinung. In Wasser beobachtete Chlorophyllkörper der *Literatur S. 259.*

höheren Pflanzen zeigen nämlich zwischen gekreuzten Nicols ein negatives Sphäritenkreuz. Versucht man den auftretenden Gangunterschied zu kompensieren, so stellt man fest, dass die beiden Quadranten, die durch Kompensation schwarz erscheinen sollten, rötlich aufleuchten. Es handelt sich dabei nicht um Fluoreszenz, denn die Erscheinung verschwindet, wenn man mit Licht beleuchtet, dem die roten Wellenlängen fehlen. Der "Quadranteneffekt" ist somit ein Spezialfall der allgemeinen Erscheinung, dass sich bei allen Chloroplasten, die smaragdgrüne Polarisationsfarbe zeigen, das rote Licht, das zwischen gekreuzten Nicols durch die Plastiden dringt, nicht kompensieren lässt.

2. DIE DOPPELBERECHUNG FIXIERTER CHLOROPLASTEN

Für die Aufnahme von Doppelbrechungskurven in Funktion vom Brechungsvermögen des Einschlussermittels eignen sich lebende Chloroplasten schlecht. Ohne eine vorherige Fixierung lassen sich Imbibitionen mit verschiedenen brechenden Flüssigkeiten wegen der äußerst grossen Labilität der Plastiden nicht reversibel durchführen. Durch die Fixierung und die nachfolgende Entwässerung wird die Absorption der Chloroplasten stark geschwächt und damit die anormale Dispersion beseitigt, sodass ohne allzu grosse Fehler im weissen Licht gemessen werden kann. Eine weitere Veränderung durch die Fixierung besteht darin, dass die Doppelbrechung bis zum zweieinhalfachen Wert der Doppelbrechung des lebenden Plastiden ansteigen kann. Bei allen von uns zur Fixierung geeigneten befundenen Lösungen trat durch die entquellende Wirkung der Fixiersubstanzen eine Doppelbrechungszunahme auf.

Um die spezielle Wirkung der einzelnen Fixiermittel kontrollieren zu können, wurden verschiedene gebräuchliche Fixiersubstanzen verwendet. Die folgenden ergaben reversibel imbibitionsfähige *Mougeotia*-Plastiden: gesättigte wässrige Pikrinsäure-Sublimat-Lösung, Zenkers Gemisch ohne Essigsäure, 2%ige Osmiumtetroxyd-Lösung, Flemmings Gemisch.

Als Imbibitionsmittel eigneten sich wegen der hohen Brechung der Proteine am besten Gemische von Methylenjodid mit Azeton oder Xylol. Bei der Benutzung von Xylol wurde Alkohol als Entwässerungsmedium gebraucht, im anderen Falle Azeton.

Technik der Imbibition: Einige Algenfäden wurden mittels eines Knotens an ein menschliches Haar gebunden. Das Haar wurde in eine Kapillare gezogen und aussen an der Kapillare mit Klebstoff befestigt. Die Glaskapillare wurde mit einem Kapillarrotator auf dem Objektivtisch des grossen Leitz Polarisationsmikroskopes befestigt und stand auf der einen Seite mit einer Vakuum-pumpe in Verbindung, so dass jede beliebige

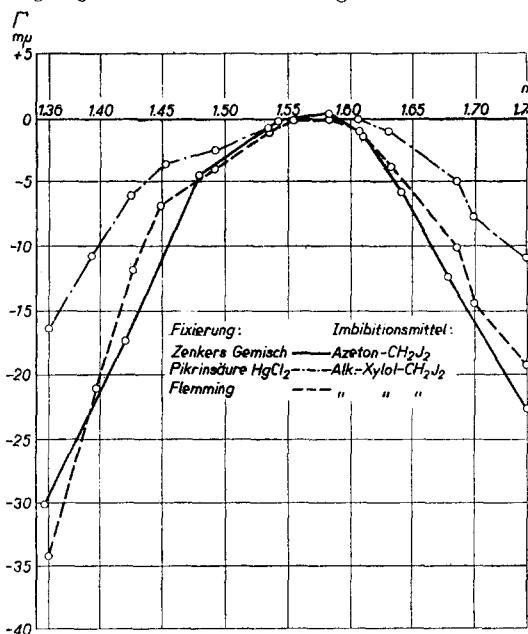


Fig. 2. Schichtendoppelbrechungskurven lipoidfreier Chloroplasten. Abszisse: Brechungsindex n_2 der Imbibitionsflüssigkeit. Ordinate: Gangunterschied Γ in μ m.

Flüssigkeit durch die Kapillare an die Algenfäden herangesogen werden konnte. Trotz der Drehbarkeit der Kapillare im Rotator war eine genaue Dickenmessung der Plastiden unmöglich. So sind in Fig. 2

Literatur S. 259.

und 3 nur jeweils die Gangunterschiede aufgetragen worden, was natürlich die einzelnen Kurven nicht ohne weiteres miteinander vergleichen lässt.

Vorteilhaft bei dieser Untersuchung in einer Kapillare war, dass die ungleich rasche Verdunstung der Komponenten des die Algenfäden umspülenden Imbibitionsgemisches verunmöglicht wurde, so dass es ohne weiteres gelang, Azeton-Methylenjodid-Gemische zu gebrauchen, ohne dass eine Änderung des Brechungsindex durch Verdunstung des leicht flüchtigen Azetons zu erwarten war. Zudem gelang es, die Messungen in allen verschiedenen brechenden Flüssigkeiten mehrmals an ein und demselben Chloroplasten auszuführen. Durch die vollkommene Reversibilität der Imbibitionsvorgänge konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Flüssigkeiten in den fixierten Plastiden keine groben, irreversiblen Veränderungen erzeugen. So wurde jede aufgezeichnete Kurve der Fig. 2 und 3 erhalten, indem ein und derselbe Chloroplast vier Mal hintereinander mit denselben Flüssigkeitsgemischen imbibiert wurde. Die eingetragenen Punkte sind also das arithmetische Mittel aus vier Einzelmessungen, von denen jede wiederum das arithmetische Mittel aus zehn Ablesungen am Kompensator darstellt.

Die Messungen wurden in weissem Licht (gewöhnliche Mikroskopierlampe) mit einem Berek-Kompensator bei Zimmertemperatur ausgeführt. Sehr kleine Gangunterschiede um die Punkte, wo beinahe Isotropie herrschte, wurden mit einem drehbaren $\lambda/10$ Glimmerplättchen gemessen.

Aus Fig. 2 und 3 sind die Einflüsse der verschiedenen Fixier- und Imbibitionsmittel zu ersehen. Es fällt auf, dass die Kurven bei Verwendung des Azeton-Methylenjodid-Gemisches regelmässiger verlaufen als bei Anwendung eines Alkohol-Xylol-Methylen-jodid-Gemisches.

Die erhaltenen Kurven erlauben folgende Feststellungen: 1. Die Doppelbrechung der *Mougeotia*-Chloroplasten ist eine ausgesprochene Schichtendoppelbrechung. 2. Die Maxima aller Kurven liegen bei einem Brechungsindex des Imbibitionsmittels von ca. 1.58, was mit dem Brechungsindex der Proteine, wie er von Muskelmyosin und Nervenscheidenproteinen bekannt ist, gut übereinstimmt⁹.

Interessant ist die Tatsache, dass bei Fixiergemischen, die nur proteinfällende Substanzen enthalten (Fig. 2), keine Restdoppelbrechung übrig bleibt, wenn mit einer Flüssigkeit von $n_2 = 1.58$ imbibiert wird. Die Chloroplasten erscheinen dann völlig isotrop; es leuchten nur die Pyrenoide auf, die sich auch ohne Stärkehülle optisch anders als der Plastide verhalten.

Fixiert man mit 2%iger OsO_4 -Lösung, die die Plastiden am naturgetreuesten erhält, und wobei auch die mikroskopisch feststellbaren Schrumpfungen durch die nachfolgende Imbibition mit Alkohol und Xylol äusserst gering sind, kann man einen Vorzeichen-

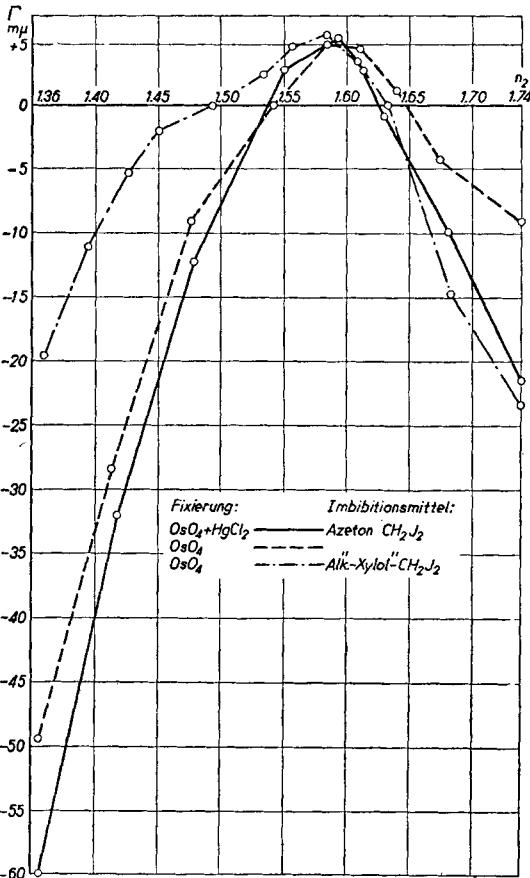


Fig. 3. Schichtendoppelbrechungskurven lipoidhaltiger Chloroplasten. Abszisse: Brechungsindex n_2 der Imbibitionsflüssigkeit. Ordinate: Gangunterschied Γ in $\mu\mu$.
Fixierung: $\text{OsO}_4 + \text{HgCl}_2$ — Azeton CH_2J_2
 OsO_4 - - - - - Alk-Xylol- CH_2J_2

wechsel des Gangunterschiedes beobachten. Merkwürdigerweise bleibt dieser Vorzeichenwechsel auch erhalten, wenn zum OsO_4 gesättigte Sublimatlösung im Verhältnis 1:1 zugesetzt wird, während bei Fixierung mit Sublimat allein keine positive Restdoppelbrechung auftritt. Dies ist ein Zeichen dafür, dass bei Fixiergemischen immer nur diejenige Substanz wirksam ist, die am schnellsten in den zu fixierenden Körper eindringt. Die Lipoidfixierende Eigenschaft des OsO_4 deutet darauf hin, dass der Vorzeichenwechsel durch die positive Eigendoppelbrechung der Lipoide zustande kommt, denn auch nach Behandlung mit H_2O_2 , das gerichtet eingelagertes OsO_4 entfernen soll¹⁰, blieb diese erhalten.

Genauere Angaben über die Wirkungsweise der Fixiermittel auf den zytologischen Feinbau kann man wohl nur durch die Untersuchung der Wirkung der gebräuchlichsten Substanzen auf chemisch genau definierte Modellkörper erhalten. In der polarisations-optischen Untersuchungsmethoden haben wir ein Mittel zur Verfügung, um feinste Veränderungen (Quellung, Entquellung, Fällung, Lösung) der Komponenten von Strukturen im submikroskopischen Gebiete genau zu registrieren.

Wir betrachten unsere Messungen als eine beweiskräftige Stütze für das von FREY-WYSSLING¹¹ aufgestellte Strukturschema homogen gebauter Chloroplasten, wonach diese Plastiden einen submikroskopischen Protein-Lipoid-Schichtenmischkörper darstellen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurden Messungen der Dispersion des Gangunterschiedes von *Mougeotia*-Chloroplasten über das ganze sichtbare Spektrum ausgeführt. Im roten Gebiete des Spektrums tritt Lichtzerstreuung auf (selektive Lichtsplitterung n. ZOCHER).

2. Es wird eine Methode angegeben, die erlaubt, die Fixierung und die spätere Behandlung mit verschiedenen Imbibitionsmitteln an ein und demselben Chloroplasten zu verfolgen.

3. Es wurde der Einfluss verschiedener Fixiermittel auf den Verlauf der Formdoppelbrechungskurven untersucht. OsO_4 in 2%iger Lösung erwies sich als bestfixierendes Mittel. Gemische aus Aceton und Methylenjodid als Imbibitionsmittel ergaben die regelmässigsten Doppelbrechungskurven.

4. Es ist erstmals gelungen, vollständig einwandfreie Schichtendoppelbrechungskurven von Plastiden aufzunehmen. Es liegt ein lamellierter Proteinmischkörper mit orientiert eingelagerten Lipoiden vor. Die Restdoppelbrechung ist indessen gering, so dass die Lipoide, die 30% der Chloroplastensubstanz ausmachen, nur unvollkommen gerichtet sein können.

SUMMARY

1. Measurements have been carried out, over the whole of the visible spectrum, of the path-difference dispersion in *Mougeotia* chloroplasts. In the red region of the spectrum light scattering occurs (ZOCHER's "selective light splitting").

2. A method is described which permits fixing and later treatment with different imbibition media of one and the same chloroplast.

3. The influence has been studied of different fixing media on the form-birefringence curves. OsO_4 in 2% solution has proved to be the best fixing medium. Mixtures of acetone and methylene iodide gave the most regular birefringence curves.

4. For the first time it has been possible to obtain complete, pure layer-birefringence curves. They arise from protein interleaved with oriented lipoids. The residual birefringence is small, however, so that the lipoids, which constitute 30% of the chloroplast substance, can be oriented only imperfectly.

RÉSUMÉ

1. La dispersion de la retardation a été mesurée, chez les chloroplastes de *Mougeotia*, dans tout le spectre visible. Il y a diffusion de la lumière ("selektive Lichtsplitterung" de ZOCHER) dans la partie rouge du spectre.

2. Une méthode est indiquée, qui permet de suivre, chez un même chloroplaste, sa fixation et son imbibition ultérieure par différents liquides.

3. L'influence de plusieurs fixateurs sur la biréfringence lamellaire a été examinée. Le meilleur fixateur est une solution de OsO_4 à 2%. L'imbibition par des mélanges d'acétone et d'iodure de méthylène fournit les courbes de biréfringence les plus régulières.

4. Pour la première fois, des courbes de la biréfringence lamellaire des plastes ont pu être obtenues de façon absolument irréfutable. Les plastes se montrent ainsi constitués par des complexes protéiques lamellaires, dans lesquels sont intercalés des lipoïdes plus ou moins orientés. La biréfringence résiduelle (biréfringence subsistant après l'élimination, par imbibition, de la biréfringence lamellaire) est faible, ce qui montre que les lipoïdes, qui constituent 30% de la masse des chloroplastes, ne sont eux-mêmes qu'imparfaitement orientés.

LITERATUR

- 1 W. MENKE, Chloroplastenstudie I, *Protopl.*, 21 (1934) 279.
- 2 A. FREY-WYSSLING, Der Aufbau der Chlorophyllkörper, *Protopl.*, 29 (1937) 279.
- 3 W. MENKE, Über den Feinbau der Chloroplasten, *Kolloid-Z.*, 85 (1938) 256; Dichroismus und Doppelbrechung der Chloroplasten, *Biol. Zbl.*, 63 (1943) 326.
- 4 W. MENKE, *l.c.*, (1938, 1943).
- 5 H. ZOCHER, Ultramikroskopie, in PETERFI: Methodik der wissenschaftlichen Biologie, Bd. I, p. 417 (1928).
- 6 F. WEBER, Doppelbrechung und Grana der Chloroplasten, *Molisch-Festschrift*, p. 447 (1936); Die Doppelbrechung der Chloroplasten, *Protopl.*, 27 (1937) 280.
- 7 R. SAVELLI, Remarques optiques sur les Plastes, *Protopl.*, 28 (1937) 365; 29 (1937) 1.
- 8 A. FREY-WYSSLING UND K. WUHRMANN, Zur Optik der Chloroplasten, *Helv. Chim. Acta*, 30 (1946) 20.
- 9 H. H. PFEIFFER, *Kolloid-Z.*, 104 (1943) 57, hat Schichtendoppelbrechungskurven der Chloroplasten von *Anthoceros* veröffentlicht, wo das Maximum bei $n = 1.428$ liegt. Als Doppelbrechung der Chloroplasten in Wasser gibt er 0.0642 an (ein Wert, der von allen Zellbestandteilen nur von Zellwänden aus optimal kristallisierter Zellulose erreicht wird), während wir für *Mougeotia* mehr als 30 mal weniger finden (0.0017). Man kann in jene Messungen daher kein Vertrauen haben.
- 10 M. HARDERS-STEINHÄUSER, Über Formdoppelbrechungskurven der osmierten Markscheide der Nervenfasern, *Z. wiss. Mikroskop.*, 54 (1937) 339.
- 11 A. FREY-WYSSLING, 1937 *l.c.*

Eingegangen den 20. April 1948