

## Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden

### V. Das Fehlen von ribosomaler RNS in den Plastiden der Plastommutante 'Mrs. Parker' von *Pelargonium zonale* Ait.

THOMAS BÖRNER, ROLF KNOTH, FALKO HERRMANN und RUDOLF HAGEMANN<sup>1</sup>

Fachbereich Genetik, Sektion Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität, Halle/S. (DDR)

#### Structure and Function of the Genetic Information in Plastids

##### V. The Absence of Ribosomal RNA from the Plastids of the Plastom-Mutant 'Mrs. Parker' of *Pelargonium zonale*

**Summary.** 1. The variety 'Mrs. Parker' of *Pelargonium zonale* (fig. 1) is a periclinal chimera of the constitution white-over-green (L I and L II: white, L III: green). Retiprocal crosses with the green variety 'Trautlieb' demonstrate a biparental, extranuclear inheritance of the character green - white. The F<sub>1</sub> consists of green, green-white variegated and white seedlings (table 1).

2. In green-white variegated F<sub>1</sub>-plants "mixed cells" (fig. 2) have been found containing two genetically different types of plastids: green plastids (from 'Trautlieb') and white plastids (from 'Mrs. Parker'). The white cells of 'Mrs. Parker' represent a white plastid mutant (= plastom mutant); its genetic designation is "extranuclear: alba-1", symbol *en: alba-1*.

3. Leaf material for biochemical studies was obtained from pure white and entirely green shoots of variegated F<sub>1</sub> hybrids (fig. 3). The ultrastructure of the white plastids was studied by electron microscopy.

4. From normal green cells of *Pelargonium zonale* four bands of high molecular weight ribosomal RNA can be isolated: 25 S and 18 S RNA of the cytoplasmic ribosomes and 23 S and 16 S RNA of plastid ribosomes (fig. 5a).

5. The mutation of the plastid DNA in the plastids of 'Mrs. Parker' causes an altered RNA pattern: The 23 S and 16 S RNA of the plastid ribosomes cannot be detected in polyacrylamid gels (whereas 25 S and 18 S RNA are present) (fig. 5b).

6. In cells of white leaves numerous plastids are present. They are smaller than normal chloroplasts and have a double-layered envelope. However, the formation of normal internal membrane structures is blocked.

7. In mutated plastids of 'Mrs. Parker' ribosomes cannot be detected in electron micrographs (fig. 6).

8. From these findings we conclude that protein synthesis cannot be performed in mutated plastids. The multiplication of the plastids — and presumably also the replication of plastid DNA — is not impaired by the deficiency in plastid protein synthesis.

9. These results indicate that protein synthesis within the plastids is necessary for full development and differentiation of the chloroplasts, although an essential part of the plastidial proteins are synthesized on cytoplasmic ribosomes.

Vor über 60 Jahren fand Erwin Baur (1909) nicht-mendelnde Vererbung nach Kreuzung von grünen und weißrandigen Sorten von *Pelargonium zonale*. Er führte die Merkmalsdifferenz grün — weiß auf erbliche Plastiden-Unterschiede zurück und formulierte die Theorie, daß die Plastiden Erbträger sind. Baurs Theorie erhielt seitdem eine glänzende Bestätigung. Es ist heute unbestritten, daß die Plastiden Träger primärer genetischer Information sind. In jüngster Zeit konnte durch intensive cytologische und biochemische Studien festgestellt werden, daß

die Plastiden eine eigene DNS und einen eigenen Apparat zur Proteinsynthese besitzen. Damit wurden die Fragen aktuell, welche Bestandteile der Zellorganellen durch ihre DNS und welche durch die Kern-DNS codiert werden und welche Funktion das plastidenspezifische Proteinsynthesesystem hat.

Man geht diesen Fragen heute auf unterschiedlichen experimentalen Wegen nach (Übersichten bei Hagemann 1971 b; Parthier 1970):

Ein Weg ist, die Plastiden zu isolieren und an den isolierten Organellen Einbauversuche mit markierten Verbindungen *in vitro* durchzuführen. Nach der Analyse der neugebildeten Komponenten kann man Aussagen über die Syntheseleistung der Organellen machen.

Als recht effektiv hat sich ein zweiter Weg erwiesen: der Einsatz von Translations- und Transkriptionsinhibitoren. Chloramphenicol und Cyclohexi-

<sup>1</sup> Wir widmen diese Arbeit meinem akademischen Lehrer Hans Stubbe — dem Schüler Erwin Baurs — zu seinem 70. Geburtstag am 7. März 1972 mit den besten Wünschen für weitere gute Gesundheit und volle Schaffenskraft. Ich danke ihm für die Möglichkeit zu 10-jähriger kontinuierlicher und fruchtbare Arbeit in seinem gut ausgestatteten Institut, in einer wissenschaftlich anregenden Atmosphäre unter einem großzügigen Chef. R. H.

mid zeigten sich bisher als besonders geeignet, da sehr überzeugend nachgewiesen werden konnte, daß Chloramphenicol in bestimmten Konzentrationen selektiv die Proteinsynthese der Plastiden hemmt, wogegen Cycloheximid hemmend auf die cytoplasmatische Proteinsynthese einwirkt (vgl. Margulies 1971). Das Antibiotikum Rifampicin hemmt die DNS-abhängige RNS-Polymerase bei Bakterien. Rifampicin soll, z. B. bei *Chlamydomonas*, dieses Enzym auch in den Plastiden inhibieren, nicht aber die Transkription im Zellkern. Mit diesem Hemmstoff kann man demzufolge *in vivo* Untersuchungen zur Funktion der Plastiden-DNS anstellen (Surzycki 1969).

Die Technik der DNS-RNS-Hybridisierung stellt einen anderen Weg dar, der zur Beantwortung der Frage nach dem Informationsgehalt der Plastiden-DNS führt. Die Methode beruht darauf, daß sich RNS an einzelsträngige, denaturierte DNS anlagert, wenn sie in der DNS Basensequenzen findet, die nach den Basenpaarungsregeln komplementär zu ihrer eigenen Basensequenz passen. Die RNS wird also mit den DNS-Regionen hybridisieren, welche die Information für ihre Struktur tragen (Tewari und Wildman 1970).

Von uns wird ein weiterer Weg beschritten, die gestellten Fragen zu beantworten. Durch die biochemische und cytologische Analyse von Veränderungen, die als Folge von Plastommutationen auftreten, versuchen wir, Rückschlüsse auf die Art der genetischen Information der Plastiden-DNS und auf die Rolle des plastidenspezifischen Proteinsyntheseapparates zu ziehen (Hagemann 1971 a, b). In dieser Arbeit soll über Untersuchungen der rRNS und der Struktur der Plastiden einer Plastommutante von *Pelargonium zonale* berichtet werden. Die Ergebnisse lassen Aussagen über die Funktion der Plastiden-DNS und die Bedeutung der plastideneigenen und der cytoplasmatischen Proteinsynthese für die Entwicklung der Plastiden zu.

### Material und Methoden<sup>1</sup>

Als Untersuchungsobjekte dienten F<sub>1</sub>-Bastarde der Sorten 'Mrs. Parker' und 'Trautlieb' von *Pelargonium zonale*. Die weißen Plastiden von 'Mrs. Parker' repräsentieren eine Plastommutante. Die F<sub>1</sub>-Pflanzen wurden im Gewächshaus herangezogen und dort gehalten. Von besonderer Bedeutung für unsere Untersuchungen waren gescheckte Pflanzen mit entmischt rein weißen und rein grünen Trieben. Die weißen Triebe enthalten nur mutierte Plastiden, die grünen Pflanzenteile nur genetisch normale Chloroplasten. Alle Zellen dieser Pflanzen besitzen aber die gleiche genetische Information im Zellkern.

Aus den Blättern entmischter weißer und grüner Triebe wurden die Gesamt-Nukleinsäuren in Anlehnung an bekannte Verfahren isoliert (Marmur 1961, Solymosy et al. 1968).

<sup>1</sup> Abkürzungen: DNS = Desoxyribonukleinsäure, RNS = Ribonukleinsäure, rRNS = ribosomale RNS, tRNS = Transfer RNS, MAK = Methylalbumin-Kieselgur, PAA = Polyacrylamid, S = Sedimentationskoeffizient.

Die Auftrennung der Nukleinsäuren in DNS, hochmolekulare rRNS und niedermolekulare RNS wurde nach Mandell und Hershey (1960) mit Hilfe von MAK-Säulen vorgenommen.

Eine genauere Analyse erlaubte die PAA-Gelelektrophorese (nach Bishop et al. 1967), die im Halbmikromäßigstab mit 3% PAA-Gelen durchgeführt wurde. Die Gele wurden mit Methylenblau angefärbt und der Farbumschlag mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Die Auswertung der Gele wurde densitometrisch (Vitatron-Densitometer) bei 578 nm vorgenommen.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung führten wir an Glutaraldehyd-fixiertem Blattmaterial durch (1% GA in 0,2 M Na-Cacodylat-Puffer, pH 7,2). Postfixation erfolgte in 1% gepuffertem Osmiumtetroxid; zur Nachkontrastierung verwendeten wir 5% Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds. Die Beobachtung der Dünnschnitte erfolgte in den Elektronenmikroskopen KEM 1/2 (VEB Werk für Fernsehelektronik, Berlin) (Abb. 6a) und Siemens-Elmiskop IA (Abb. 6b, c).

Die genetischen und lichtmikroskopischen Arbeiten an den Pelargonien-Sorten wurden von R. Hagemann durchgeführt, die Fraktionierung der Nukleinsäuren mit der MAK-Säule von F. Herrmann und Th. Börner, die PAA-Gelelektrophorese von Th. Börner, die elektronenmikroskopische Untersuchung von R. Knoth.

### Ergebnisse

#### Genetische Untersuchungen

Die Pflanzen der von uns bearbeiteten *Pelargonium*-Sorte 'Mrs. Parker' sind diplochlamye Periklinalchimären der Konstitution Weiß-über-Grün, d. h. LI und LII: weiß, LIII: grün (Kümmler 1922, Renner 1936). Die Laubblätter von 'Mrs. Parker' haben einen breiten weißen Rand (Abb. 1). Im Gegensatz zu mehreren anderen Periklinalchimären von *Pelargonium zonale* bleiben die weißen Blatteile von 'Mrs. Parker' sowohl nach Beschattung als auch in vollem Sonnenlicht praktisch rein weiß.

Durch Dekapitation, Stecklingschnitt und Blending aller Achselknospen haben wir an zahlreichen periklinalchimärischen Trieben Regenerationsbildungen induziert, die uns rein grüne und rein weiße Triebe lieferten; diese Triebe stellen die individualisierten Chimären-Komponenten dar.

Zwischen den *Pelargonium*-Sorten 'Mrs. Parker' sowie der individualisierten weißen Komponente (bei



Abb. 1. Periklinalchimäre 'Mrs. Parker' von *Pelargonium zonale*

Tabelle 1. Kreuzungen zwischen Sorten von *Pelargonium zonale*

Weiblicher Elter	Männlicher Elter	Keimlinge		
		grün	gescheckt	weiß
Mrs. Parker (weißrandig; L II: weiß)	× Trautlieb (grün)	319	205	5
Trautlieb (grün)	× Mrs. Parker (weißrandig; L II: weiß)	106	31	3

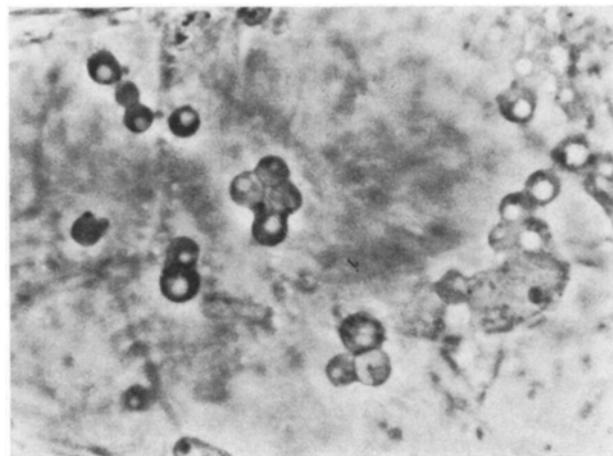
beiden LII: weiß) und 'Trautlieb' (einheitlich grün) wurden reziproke Kreuzungen durchgeführt. Die F<sub>1</sub>-Generationen beider Kreuzungsrichtungen (Tabelle 1) bestanden aus rein grünen, grün-weiß gescheckten und rein weißen Keimlingen. Sie erweisen klar den extranukleären Erbgang des Merkmalsunterschiedes grün – weiß. In den grün-weiß gescheckten Keimlingen konnten wir lichtmikroskopisch Mischzellen (Abb. 2) mit grünen Plastiden (von 'Trautlieb') und weißen Plastiden (von 'Mrs. Parker') auffinden (vgl. Hagemann 1964, S. 39).

Damit ist nachgewiesen, daß der genetische Defekt in den weißen Zellen der Periklinalchimäre 'Mrs. Parker' durch eine Plastommutation bedingt ist. Die weißen Zellen enthalten Plastiden einer weißen Plastommutante. Diese Mutante gehört zum Typ „extranuklear: alba“ (Hagemann 1971 a) und erhält das Symbol: *en:alba-1*. Wir bezeichnen sie im folgenden einfach nach ihrer Herkunft als 'Mrs. Parker'. (Bezüglich paralleler Untersuchungen an der gelben Plastommutante 'Mrs. Pollock' von *Pelargonium zonale* siehe Herrmann und Hagemann 1971.)

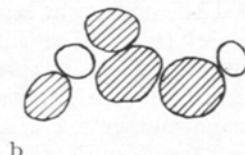
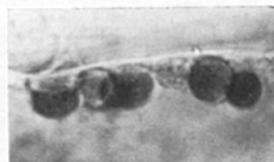
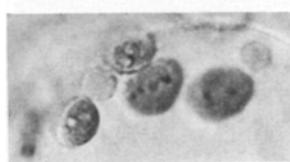
In den grün-weiß gescheckten F<sub>1</sub>-Pflanzen kommt es im Laufe der ontogenetischen Entwicklung zu Plastidenentmischungen, die zur Entstehung von rein grünen und rein weißen Zellen neben Mischzellen führen. Dabei treten u. a. auch Sektorialchimären auf. Solche Sektorialchimären mit ganz grünen und mit ganz weißen Trieben (Abb. 3) sind in unseren biochemischen Untersuchungen verwendet worden (vgl. Material und Methoden), weil sie genetisch völlig gleiche Zellkerne enthalten und sich nur durch den Besitz von genetisch normalen grünen Plastiden bzw. genetisch mutierten weißen Plastiden unterscheiden. Finden wir biochemische und elektromikroskopische Differenzen zwischen den grünen und den weißen Zellen (bzw. Ästen) solcher Pflanzen, so sind sie auf Unterschiede in der genetischen Information der Plastiden-DNS der weißen bzw. grünen Plastiden zurückzuführen.

#### Biochemische Untersuchungen

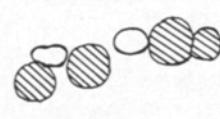
Die Fraktionierung der Gesamtstrukturen grüner Blätter auf MAK-Säulen ergab fünf Fraktionen (Abb. 4a). Die Fraktionen I und II sind der niedermolekularen RNS (4S und 5S RNS) zuzuordnen. Die



a



b



c

Abb. 2. Zellen in Keimblättern von Bastarden der Kreuzung 'Mrs. Parker' × 'Trautlieb' von *Pelargonium zonale*.

a) Zelle mit rein weißen Plastiden

b) u. c) Mischzellen. Sie enthalten genetisch normal grüne Plastiden (von 'Trautlieb') und weiße mutierte Plastiden (von 'Mrs. Parker').

In den schematischen Zeichnungen der Mischzellen sind die grünen Plastiden schraffiert; demgegenüber sind von den weißen Plastiden nur die Umrisse gezeichnet.

Abb. 3. Entmischte Blätter und Triebe an F<sub>1</sub>-Pflanzen der Kreuzung 'Mrs. Parker' × 'Trautlieb'

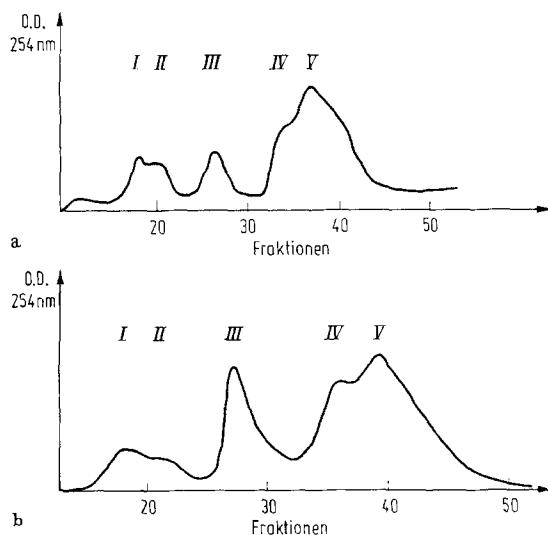


Abb. 4. Fraktionierung der Gesamt-nukleinsäuren auf MAK-Säulen (das Eluat wurde in Fraktionen von 6 ml gesammelt).

- a) Nukleinsäuren grüner Blätter
- b) Nukleinsäuren weißer Blätter

Fraktionen IV und V enthalten die hochmolekulare rRNA. Fraktion III wird durch DNA und etwas RNA gebildet (Ruppel 1967, Wollgiehn 1968). Das Elutionsprofil der Gesamt-nukleinsäuren aus weißen Blättern (Abb. 4b) unterscheidet sich deutlich von dem der Gesamt-nukleinsäuren normal grüner Blätter. Die RNA-Fraktionen sind im Verhältnis zu Fraktion III eindeutig verringert. Die Mutantenblätter enthalten also weniger tRNA und weniger rRNA als die grünen Blätter.

Zur Präzisierung unserer Aussagen wurden die Nukleinsäuren elektrophoretisch an PAA-Gelen aufgetrennt. Diese Methode erlaubt, die hochmolekulare rRNA der Plastiden von der cytoplasmatischen rRNA zu trennen. Innerhalb bestimmter Grenzen ist eine lineare Beziehung zwischen Laufgeschwindigkeit und Molekulargewicht gegeben (Loening 1969), die es ermöglicht, das Molekulargewicht der einzelnen RNA-Arten zu bestimmen. Nach Anfärbung und anschließender Differenzierung der Gelen sind im Normalfall (beim Vorliegen nicht-degraderter RNA aus normal grünen Blättern) vier Banden hochmolekularer rRNA zu erkennen (Abb. 5a):

Die Banden I und III entsprechen der 23S rRNA (Molekulargewicht  $1,3 \times 10^6$ ) und der 16S rRNA (Molekulargewicht  $0,7 \times 10^6$ ) der Cytoplasma-Ribosomen.

Die Banden II und IV konnten wir als rRNA der Plastiden identifizieren. Eine vergleichende Elektrophorese mit rRNA, die aus *Escherichia coli* isoliert wurde, zeigte, daß die hochmolekularen RNA-Komponenten mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Banden II und IV der *Pelargonium*-RNA im Gel wandern; die RNA der Banden II und IV hat demzufolge wie die bakterielle rRNA Molekulargewichte von  $1,1 \times 10^6$  (= 23S) und  $0,56 \times 10^6$  (= 16S). Bei der

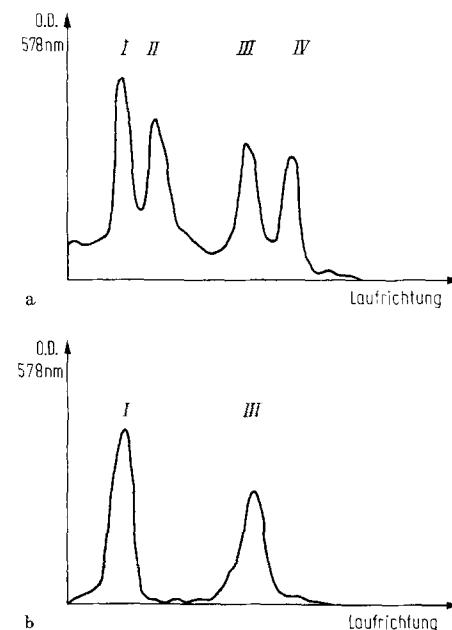


Abb. 5. Densitogramme von PAA-Gelen. Auftrennung von rRNA aus grünen (a) und weißen (b) Blättern

Auftrennung von RNA aus Chloroplasten-Präparaten trat eine starke Anreicherung der Banden II und IV auf. Daher können wir diese — in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (Loening und Ingle 1967, Stutz und Noll 1967) — der rRNA der Plastiden zuordnen.

Die Fraktionierung der Nukleinsäuren aus weißen Blättern der Plastommutante 'Mrs. Parker' ergab deutliche Unterschiede zur Kontrolle: In den mutierten Plastiden fehlen die 23S und 16S rRNA-Komponenten (Abb. 5b). Sie ließen sich auch bei hoher Konzentration der im Gel aufgetrennten Nukleinsäurelösung nicht nachweisen.

Demgegenüber sind in den bleichen Proplastiden etiolierter Keimlinge höherer Pflanzen diese beiden RNA-Arten sehr wohl enthalten (Bogorad 1967; Pechauf und Börner unveröffentl.), ebenso auch in den bleichen Blättern anderer Mutanten von *Pelargonium zonale* (Börner unveröffentl.).

Voll funktionsfähige Ribosomen können nur gebildet werden, wenn ihre beiden Bestandteile, die rRNA und die Proteine, vorhanden sind (Kurland 1970). Nach unseren Resultaten war daher zu erwarten, daß die weißen Plastiden von 'Mrs. Parker' keine (oder doch nur ganz wenige) Ribosomen enthalten.

#### *Elektronenmikroskopische Untersuchung*

Die weißen Plastiden der Plastommutante 'Mrs. Parker' unterscheiden sich deutlich von ausdifferenzierten Chloroplasten. Sie sind kleiner und häufig — vor allem in etwas älteren Blättern — stark vakuolisiert (vgl. Abb. 2a). Ihre Außenhülle besteht wie bei den Chloroplasten aus einer Doppelmembran. Die

Entwicklung submikroskopischer Membranstrukturen bleibt grundsätzlich auf dem Stadium eines irregulären Vesikelkomplexes stehen. Besonders auffallend ist, daß die weißen Plastiden keine Ribosomen enthalten (Abb. 6a). Demgegenüber sind in mutierten bleichen Plastiden der ergrünungsfähigen Sorte 'Mrs. Pollock' von *Pelargonium zonale* Ribosomen vorhanden (Abb. 6b), ebenso in normal ausgebildeten Chloroplasten von *Pelargonium zonale* (Abb. 6c).

### Diskussion

Wir beobachten, daß — bei Vorliegen eines intakten Zellkerns — als Folge einer Plastidenmutation die Plastidenribosomen fehlen. Die Bildung dieser Ribosomen wird demnach durch die Plastiden-DNS kontrolliert. Dabei ist eine Kontrolle über die Synthese der rRNA und (oder) der ribosomalen Proteine denkbar.

Für eine Kontrolle der Plastiden-DNS über die rRNA sprechen eine Reihe neuerer Forschungsergebnisse. Mit der Methode der DNS-RNA-Hybridisierung konnte bei *Euglena* und bei *Nicotiana* festgestellt werden, daß die RNA der Plastidenribosomen im Vergleich zur rRNA des Cytoplasmas bevorzugt mit der Plastiden-DNS hybridisiert, während umgekehrt die cytoplasmatische rRNA eine höhere Hybridisierungsrate mit der Kern-DNS aufweist (Scott und Smillie 1967, Tewari und Wildman 1968). Daher ist mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die rRNA der Plastiden durch die Plastiden-DNS codiert wird; auch autoradiographische Studien sprechen hierfür (Gibbs 1967, 1970). Allerdings kommt es in gewissem Maße auch zur Hybridisierung zwischen rRNA der Plastiden und Kern-DNS; die Kern-DNS enthält demnach offenbar Sequenzen, welche der rRNA der Plastiden komplementär sind.

Die Proteine der Plastidenribosomen werden nach den Untersuchungen von Surzycki et al. (1970), Goodenough et al. (1971), Margulies (1971) und Spencer et al. (1971) im Cytoplasma synthetisiert und, zumindest bei *Acetabularia*, von der Kern-DNS codiert (Kloppstech und Schweiger 1971).

Unsere Versuche lassen noch keine Entscheidung darüber zu, ob die primäre Mutationswirkung die rRNA oder die ribosomalen Proteine betrifft. Auf Grund der Resultate der eben genannten Autoren möchten wir aber vermuten, daß die mutierte Plastiden-DNS zu einer Veränderung der plastidialen rRNA führt. Möglicherweise kann man jedoch diese Befunde nicht ohne weiteres von einem Untersuchungsobjekt auf ein anderes übertragen; so schließt Ellis (1971) aus Hemmversuchen mit Lincomycin, daß zumindest einige Proteine der Plastidenribosomen in den Plastiden synthetisiert werden.

Die DNS-RNA-Hybridisierungsversuche lassen allein durchaus die Möglichkeit zu, daß auch die Kern-DNS als Syntheseort für die Plastiden-rRNA fungieren könnte. Sollte das tatsächlich zutreffen, so müßte nach unseren Ergebnissen die im Kern und

die in den Plastiden synthetisierte RNA der Plastidenribosomen der Kontrolle durch die Plastiden-DNS unterliegen. Wie Wildman (1971) vermuten wir aber, daß es sich bei den mit der rRNA (und DNS) der Plastiden hybridisierenden Abschnitten der Kern-DNS um nicht-funktionelle Regionen handelt.

Wegen des Fehlens der plastidialen rRNA und der Ribosomen kann die Plastomutante 'Mrs. Parker' in ihren Plastiden keine Proteinsynthese durchführen. Unsere cytologischen (licht- und elektronenmikroskopischen) Untersuchungen haben gezeigt, daß in den Zellen der Mutante zahlreiche Plastiden (äußerlich vom Typ der Proplastiden bzw. Leukoplasten) vorhanden sind. Es bedarf somit nicht der plastidenspezifischen Proteinsynthese, damit Plastiden in annähernd normaler Anzahl vorhanden sind und auch regelmäßig vermehrt werden.

Für eine Plastidenmutante von *Nicotiana tabacum* wurde das Vorhandensein von DNS in den mutierten Plastiden elektronenmikroskopisch nachgewiesen (Wildman 1971), ebenso in den weißen Plastiden der *iojap*-Mutante von *Zea mays* (Shumway und Weier 1967) und einer 'albino'-Mutante von *Vicia faba* (Dyer et al. 1971). Vermutlich ist auch in den mutierten Plastiden von 'Mrs. Parker' DNS vorhanden. In den weißen Plastiden der beiden genannten Mutanten von *Zea* und *Vicia* sind — ebenso wie in der Plastomutante 'Mrs. Parker' von *Pelargonium* — keine Ribosomen vorhanden. — Aus dem Vorhandensein von DNS und dem Fehlen von Ribosomen in diesen Plastiden ergibt sich, daß die Replikation der Plastiden-DNS nicht von der Proteinsynthese in diesen Organellen abhängen kann (Shumway und Weier 1967, Dyer et al. 1971). Nach den Untersuchungen von Surzycki (1969) und Surzycki et al. (1970) wird die plastidiale DNS-Polymerase an den Cytoplasma-Ribosomen synthetisiert und von der Kern-DNS codiert.

Die fehlende plastidale Proteinsynthese bewirkt eine unvollständige Entwicklung der Plastiden. Besonders augenfällig ist, daß die typische innere Lamellarstruktur der Chloroplasten nicht ausgebildet wird. Das führt sekundär zum Verlust des Chlorophylls, für dessen Stabilität eine Komplexbildung mit bestimmten Proteinen nötig ist. Dagegen ist die Doppelmembran, welche die Plastide als Hülle umgibt, bei den Mutanten-Plastiden vorhanden; und zwar sowohl die äußere als auch die innere Membran. Die Synthese der Strukturelemente der Plastidenhülle sollte demnach — im Gegensatz zur Synthese von Proteinen, welche die Innenstruktur, die Thylakoide, aufbauen — im Cytoplasma ablaufen (vgl. Dyer et al. 1971). Dies erscheint uns interessant im Hinblick auf die Tatsache, daß nach Ansicht sehr vieler Autoren bei den Mitochondrien die Proteine der inneren Mitochondrien-Membran und der Innenstrukturen an den Mitochondrien-Ribosomen synthetisiert werden und beide durch Antibiotika wie Chloramphen-

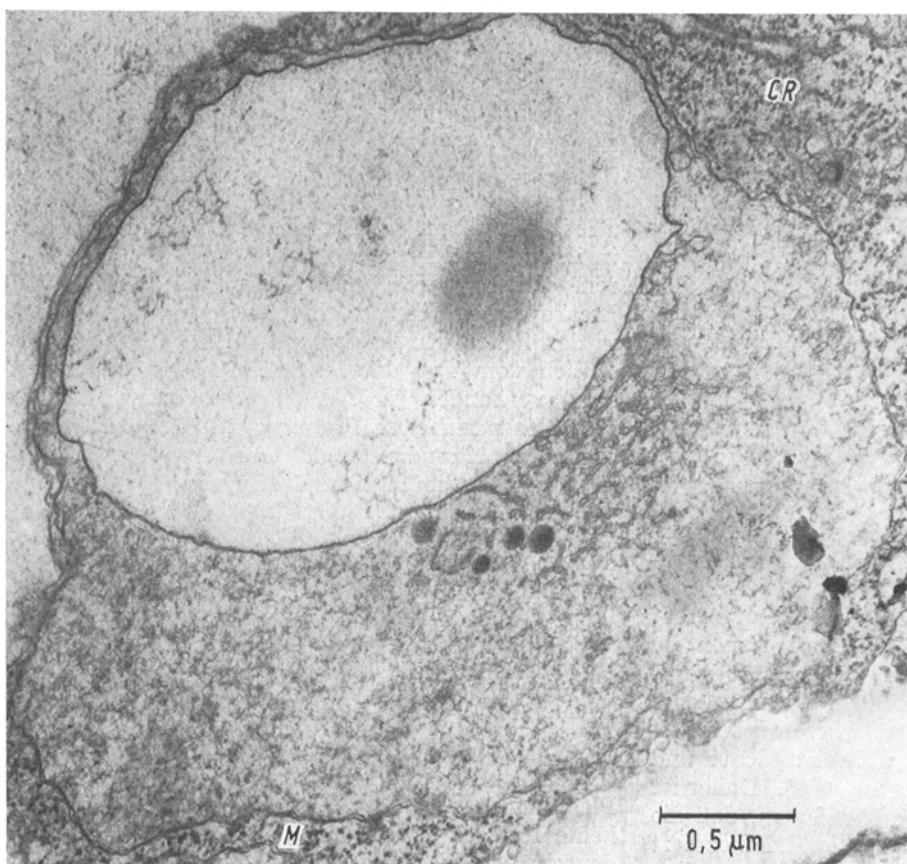


Abb. 6a-c. Elektronenmikroskopische Aufnahmen normaler und mutierter Plastiden von *Pelargonium zonale* mit Cytoplasma-Ribosomen (CR), Plastiden-Ribosomen (PR) und doppelschichtiger Hüllmembran (M)

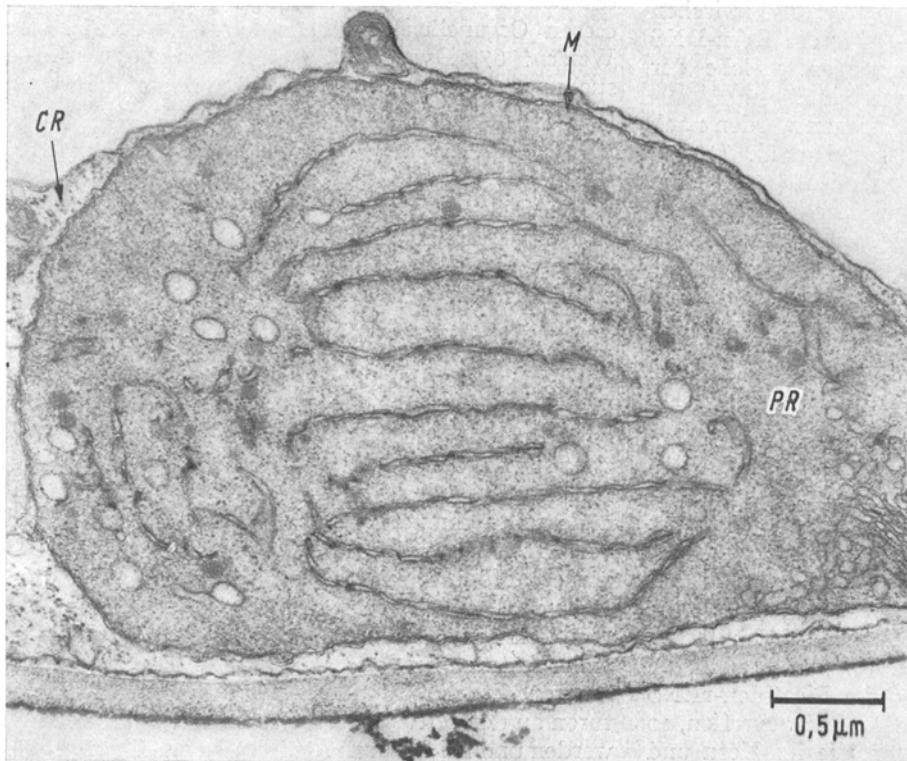
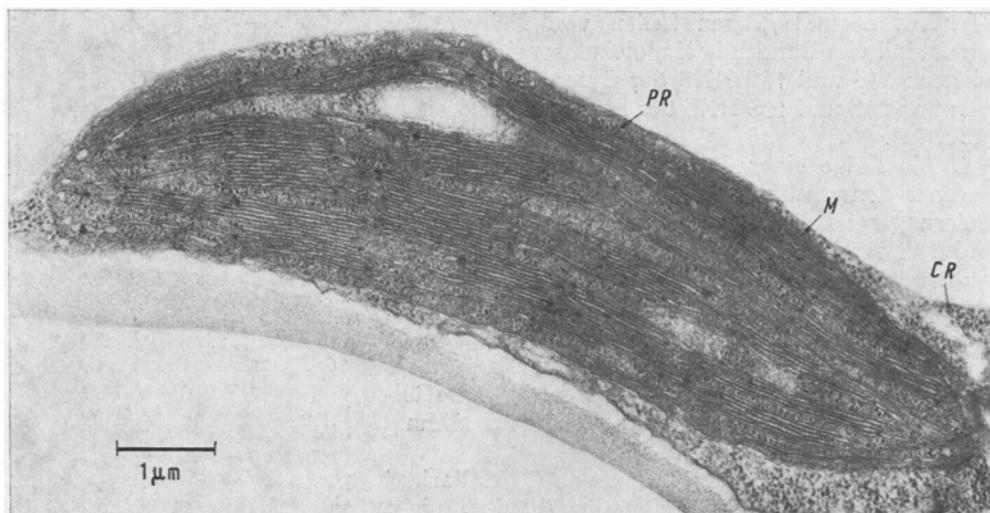


Abb. 6a. Mutierte Plastide aus entmischem weißem Gewebe der Plastommutante 'Mrs. Parker'. Beachte das Fehlen von Plastiden-Ribosomen. Vergrößerung 37.500 ×

Abb. 6b. Mutierte Plastide aus entmischem bleichem Gewebe der ergrünungsfähigen Plastommutante 'Mrs. Pollock'. Beachte das Vorkommen von Plastiden-Ribosomen. Vergrößerung 30.000 ×

Abb. 6c. Normaler Chloroplast aus dem Mesophyll  
Vergrößerung 15.000 ×



nicol in ihrer Synthese blockiert werden (vgl. Neupert und Ludwig 1971).

Offen bleiben muß noch die Frage, ob die Plastomutation nur über das Fehlen der plastidalen Proteinsynthese wirksam wird oder ob sie darüber hinaus noch auf andere Weise die festgestellte Destruktion der Plastidenstruktur bewirkt; wir können auch noch nicht sagen, ob die trotz der fehlenden plastideneigenen Proteinsynthese vorhandene Plastiden-Doppelmembran außer in der elektronenmikroskopisch erfaßbaren Struktur auch in ihrer Funktion voll intakt ist.

Die Existenz von weißen Plastiden ohne plastidenspezifische Proteinsynthese bestätigt die schon aus sehr vielen Untersuchungen abgeleitete Erkenntnis, daß für die Bildung voll ausdifferenzierter Chloroplasten das Zusammenwirken von cytoplasmatischer und plastideneigener Proteinsynthese notwendig ist (vgl. Hagemann 1971b). Außer den zahlreichen Plastomutanten, bei denen die Plastidenentwicklung durch mutative Veränderungen in der Plastiden-DNS beeinträchtigt wird, gibt es eine Vielzahl von Kerngen-Mutanten, welche in spezifischer Weise auf die Plastidenentwicklung einwirken (Surzycki et al. 1970, v. Wettstein et al. 1971, Goodenough et al. 1971). In der Kontrolle von Entwicklung und Differenzierung der Plastiden gibt es daher eine „Arbeitsteilung“ zwischen Kern-DNS und Plastiden-DNS. Die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Plastomutanten von *Antirrhinum majus* führten zum Nachweis, daß durch bestimmte Plastidenmutationen (*en:alba-1* und *en:viridis-1*) definierte Komponenten der Lamellarproteine der Plastiden ausfallen (Herrmann und Bauer-Stäb 1969, Herrmann 1971 a, b, c). Ihr Fehlen ist nicht auf einen generellen Verlust der plastidenspezifischen Proteinsynthese zurückzuführen, sondern ist ein spezifischer Defekt als Folge von Mutationen der Plastiden-DNS (Herrmann 1971c, Börner und Herrmann unveröffentl.). Hemmversuche mit Chloramphenicol bei *Vicia faba*

sprechen dafür, daß mindestens zwei Lamellarproteine der Chloroplasten an den Plastiden-Ribosomen synthetisiert werden (Machold 1971). Andere Experimente mit Proteinsyntheseinhibitoren geben Hinweise dafür, daß neben Lamellarproteinen auch bestimmte Enzymproteine in den Plastiden synthetisiert werden (Smillie et al. 1967, Ohmann 1969, Schiff 1970, Smillie et al. 1971, Spencer et al. 1971). Interessant sind neuere Untersuchungen, wonach die größere Untereinheit der Ribulose-1,5-diphosphatcarboxylase an den 70S Ribosomen der Plastiden gebildet wird, die kleine Untereinheit dagegen an den 80S Ribosomen des Cytoplasmas (Cridle et al. 1970, Margulies 1971). Welche dieser Proteine von der Chloroplasten-DNS und welche von der Kern-DNS codiert werden, müssen weiterführende Versuche zeigen.

### Zusammenfassung

1. Die Sorte 'Mrs. Parker' von *Pelargonium zonale* (Abb. 1) ist eine Periklinalchimäre der Konstitution Weiß-über-Grün (LI und LII weiß, LIII grün). Reziproke Kreuzungen mit der grünen Sorte 'Trautlieb' zeigen einen biparentalen, extranukleären Erbgang des Unterschiedes grün — weiß. Die *F<sub>1</sub>* besteht aus grünen, grün-weiß gescheckten und weißen Keimlingen (Tabelle 1).

2. In grün-weiß gescheckten *F<sub>1</sub>*-Pflanzen konnten echte Mischzellen nachgewiesen werden, die nebeneinander normal grüne Plastiden (von 'Trautlieb') und mutierte weiße Plastiden (von 'Mrs. Parker') enthalten (Abb. 2). Die weißen Zellen von 'Mrs. Parker' repräsentieren somit eine weiße Plastomutante; sie erhält die Bezeichnung „extranuklear: *alba-1*“; Symbol *en:alba-1*.

3. Entmischte weiße und grüne Triebe von *F<sub>1</sub>*-Bastarden (Abb. 3) dienten als Objekte für biochemische Untersuchungen. Von weißen Plastiden wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

4. Aus normal grünen Zellen von *Pelargonium zonale* sind vier Banden hochmolekularer rRNA zu gewinnen: 25S und 18S RNS der Cytoplasma-Ribosomen und 23S und 16S RNS der Plastiden-Ribosomen (Abb. 5a).

5. Als Folge einer Mutation der Plastiden-DNS treten in den weißen Plastiden von 'Mrs. Parker' Veränderungen im RNS-Muster auf (Abb. 5b): Die 23S und 16S rRNA lassen sich in Polyacrylamid-Gelen nicht nachweisen (die 25S und 18S RNS der Cytoplasma-Ribosomen sind unverändert vorhanden).

6. In den Zellen der weißen Blätter sind zahlreiche Plastiden vorhanden. Sie sind kleiner als normale Chloroplasten und haben eine doppelschichtige Hüllmembran; hingegen ist eine normale Ausbildung innerer Membranstrukturen blockiert.

7. In den mutierten Plastiden von 'Mrs. Parker' konnten Ribosomen elektronenmikroskopisch nicht nachgewiesen werden (Abb. 6).

8. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß in den mutierten Plastiden keine Proteinsynthese stattfinden kann. Die Vermehrung der Plastiden — und wahrscheinlich auch die Replikation der Plastiden-DNS — wird durch diesen Defekt nicht beeinträchtigt.

9. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Proteinsynthese innerhalb der Plastiden für eine vollständige Entwicklung und Differenzierung der Chloroplasten notwendig ist, auch wenn ein wesentlicher Teil der Plastiden-Proteine an den Ribosomen des Cytoplasmas synthetisiert wird.

### Literatur

- Baur, E.: Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der „Varietates albomarginatae hort.“ von *Pelargonium zonale*. Z. i. A. u. Vererbungsl. **1**, 330—351 (1909). — 2. Bishop, D. H. L., Claybrook, V. R., Spiegelman, S.: Electrophoretic separation of viral nucleic acids on polyacrylamide gels. J. Mol. Biol. **26**, 373—387 (1967). — 3. Boardman, N. K., Linnane, A. W., Smillie, R. M. (Eds.): Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts. Amsterdam: North Holland Publ. 1971. — 4. Bogorad, L.: Biosynthesis and morphogenesis in plastids. In: Goodwin, T. W. (Ed.), Biochemistry of chloroplasts, Vol. **2**, 615—631. London/New York: Academic Press 1967. — 5. Criddle, R. S., Dau, B., Kleinkopf, G. E., Huffaker, R. C.: Differential synthesis of ribulosediphosphate carboxylase subunits. Biochem. Res. Comm. **41**, 621—627 (1970). — 6. Dyer, T. A., Miller, R. H., Greenwood, A. D.: Leaf nucleic acids. I. Characteristics and role in the differentiation of plastids. J. Exp. Bot. **22**, 125—136 (1971). — 6a. Ellis, R. J.: Lincomycin as a chloroplast probe. Biochem. J. **124**, 52 p. (1971). — 7. Gibbs, S. P.: Synthesis of chloroplast RNA at the site of chloroplast DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. **28**, 653—657 (1967). — 8. Gibbs, S. P.: Nuclear and organelle RNA synthesis in Ochromonas: The effects of light. J. Cell Biol. **46**, 599 bis 604 (1970). — 9. Goodenough, U. W., Togasaki, R. K., Paszewski, A., Levine, R. P.: Inhibition of chloroplast ribosome formation by gene mutation in *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Boardman, N. K. et al. 1971, 224—234. — 10. Hagemann, R.: Plasmatische Vererbung. Jena: G. Fischer 1964. — 11. Hagemann, R.: Extrachromosomal Vererbung. Fortschr. Bot. **30**, 265—267

- (1968). — 12. Hagemann, R.: Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden. I. Die Bedeutung von Plastomutanten und die genetische Nomenklatur extranukleärer Mutationen. Biol. Zbl. **90**, 409—418 (1971a). — 13. Hagemann, R.: Die Stellung des extranukleären (extrachromosomal) Erbgutes im genetischen System. Leopoldina: Mitt. Deutsch. Akad. Naturf. Reihe **3**, Jg. 16 (1971b). — 14. Herrmann, F.: Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden. II. Untersuchung der photosynthetischen Plastomutante alba-1 von *Antirrhinum majus* L. Photosynthetica **5**, 258—266 (1971a). — 15. Herrmann, F.: Chloroplast lamellar proteins of the plastid mutant en: *viridis*-1 of *Antirrhinum majus* having impaired photosystem II. Exptl. Cell Res., im Druck (1971b). — 16. Herrmann, F.: Structure and function of the genetic information in plastids. IV. Genetic control of pigment-protein complexes I and Ia of the plastid mutant en: alba-1 of *Antirrhinum majus*. FEBS Letters, **19**, 267—269 (1971c). — 17. Herrmann, F., Bauer-Stäb, G.: Lamellarproteine mutierter Plastiden der Plastomutante *albomaculata*-1 von *Antirrhinum majus* L. Flora Abt. A **160**, 391—393 (1969). — 18. Herrmann, F., Hagemann, R.: Struktur und Funktion der genetischen Information in den Plastiden. III. Genetik, Chlorophylle und Photosyntheseverhalten der Plastomutante „Mrs. Pollock“ und der Genmutante „Cloth of Gold“ von *Pelargonium zonale*. Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP) **16**, 390—409 (1971). — 18a. Kloppstech, K., Schweiger, H. G.: Nuclear coded ribosomal proteins in chloroplasts of Acetabularia. Abstracts 7th meeting FEBS, Nr. 339, Varna 1971. — 19. Kümmeler, A.: Über die Funktion der Spaltöffnungen weißbunter Blätter. Jahrb. wiss. Bot. **61**, 610 bis 669 (1922). — 20. Kurland, C. G.: Ribosome structure and function emergent. Science **169**, 1171—1177 (1970). — 21. Loening, U. E.: The determination of the molecular weight of ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. The effects of change in conformation. Biochem. J. **113**, 131—138 (1969). — 22. Loening, U. E., Ingle, J.: Diversity of RNA components in green plant tissues. Nature **215**, 363—367 (1967). — 23. Machold, O.: Lamellar proteins of green and chlorotic chloroplasts as affected by iron deficiency and antibiotics. Biochim. Biophys. Acta **238**, 324—331 (1971). — 24. Mandell, J. D., Hershey, A. D.: A fractionating column for analysis of nucleic acids. Analyt. Biochem. **1**, 66—77 (1960). — 25. Margulies, M. M.: Concerning the sites of synthesis of proteins of chloroplast ribosomes and of fraction I protein (ribulose-1,5-diphosphate carboxylase). Biochem. Biophys. Res. Comm. **44**, 539—545 (1971). — 26. Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. **3**, 208—218 (1961). — 27. Neupert, W., Ludwig, G. D.: Sites of biosynthesis of outer and inner membrane proteins of *Neurospora crassa* mitochondria. Eur. J. Biochem. **19**, 523—532 (1971). — 28. Ohmann, E.: Regulation des autotrophen und heterotrophen Stoffwechsels in *Euglena gracilis* und *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Habilitationsschrift Math. Nat. Fak., Martin-Luther-Universität Halle 1969. — 29. Parthier, B.: Existenz und Realisierung extrachromosomaler genetischer Information in Plastiden und Mitochondrien. Biol. Rdsch. **8**, 289—306 (1970). — 30. Renner, O.: Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter. Flora **130**, 218—290 (1936). — 31. Ruppel, H. G.: Nucleinsäuren in Chloroplasten. I. Charakterisierung der DNS und RNS von *Antirrhinum majus*. Z. Naturforschung **22b**, 1068—1076 (1967). — 32. Schiff, J. A.: Developmental interactions among cellular compartments in *Euglena*. In: Symp. Soc. Exp. Biol. XXIV, Control of organelle development, Cambridge, 277—301 (1970). — 33. Scott, N. S., Smillie, R. M.: Evidence for the direction of chloroplast ribosomal RNA synthesis by chloroplast DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. **28**, 598—603 (1967). —

34. Shumway, L. K., Weier, T. E.: The chloroplast structure of *iojap* maize. Amer. J. Bot. **54**, 773–780 (1967). — 35. Smillie, R. M., Bishop, D. G., Gibbons, C. C., Graham, D., Grieve, A. M., Raison, J. K., Reger, D. J.: Determination of the sites of synthesis of proteins and lipids of the chloroplast using chloramphenicol and cycloheximide. In: Boardman et al. Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts. Amsterdam: North-Holland Publ. 1971, 422–433. — 36. Smillie, R. M., Graham, D., Dwyer, M. R., Grieve, A., Tobin, N. F.: Evidence for the synthesis in vivo of proteins of the Calvin cycle and of the photosynthetic electron transfer pathway on chloroplast ribosomes. Biochem. Biophys. Res. Comm. **28**, 604–610 (1967). — 37. Solyomosy, F., Fedorscak, A. S., Gylas, A., Farkas, G. L., Ehrenberg, L.: A new method based on the use of diethylpyrocarbonate as a nuclease inhibitor for the extraction of undegraded nucleic acid from plant tissue. Europ. J. Biochem. **5**, 520–527 (1968). — 38. Spencer, D., Whitfield, P. R., Bottomley, W., Wheeler, A. M.: The nature of the proteins and nucleic acids synthesized by isolated chloroplasts. In: Boardman et al., Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts. Amsterdam: North-Holland Publ. 1971, 422–433. — 38a. Stutz, E., Noll, H.: Characterization of cytoplasmic and chloroplast polysomes in plants: evidence for three classes of ribosomal RNA in nature. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **57**, 774–781 (1967). — 39. Surzycki, S. J.: Genetic functions of the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*: effect of rifampicin on chloroplast-DNA-dependent RNA polymerase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **63**, 1327–1334 (1969). — 40. Surzycki, S. J., Goodenough, U. W., Levine, R. P., Armstrong, J. J.: Nuclear and chloroplast control of chloroplast structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Symp. Soc. Exp. Biol. XXIV, Control of organelle development, Cambridge 1970, 13–37. — 41. Tewari, K. K., Wildman, S. G.: Function of chloroplast DNA. I. Hybridization studies involving nuclear and chloroplast DNA with RNA from cytoplasmic (80S) and chloroplast (70S) ribosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **59**, 569–576 (1968). — 42. Tewari, K. K., Wildman, S. G.: Information content in the chloroplast DNA. In: Control of organelle development, Cambridge 1970, 147–179. — 43. Wettstein, D. v., Henningsen, K. W., Boynton, J. E., Kannagara, G. C., Nielsen, O. F.: The genetic control of chloroplast development in barley. In: Boardman et al., Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts. Amsterdam: North-Holland Publ. 1971, 205 bis 223. — 44. Wildman, S. G.: An approach towards ascertaining the function of chloroplast DNA in tobacco plants. In: Boardman et al., Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts. Amsterdam: North-Holland Publ. 1971, 402–412. — 45. Wollgfehn, R.: Schnellmarkierte RNS in Blättern. I. Isolierung und Fraktionierung der RNS aus Blättern. Flora Abt. A **159**, 58–76 (1968).

Eingegangen am 17. November 1971

Angenommen durch R. Hagemann

Biol. Thomas Börner  
 Dipl.-Biol. Rolf Knoth  
 Dr. Falko Herrmann  
 Prof. Dr. Rudolf Hagemann  
 Fachbereich Genetik  
 Sektion Biowissenschaften  
 Martin-Luther-Universität  
 Domplatz 1  
 402 Halle/S. (Germany/DDR)