

**Chemismus, Struktur und Entstehung der
Carotinkriställchen in der Nebenkronen
von *Narcissus poeticus* L. var. 'La Riante'**

ABHANDLUNG

zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

HERBERT KUHN

dipl. Natw. ETH
geboren am 27. Februar 1938
von Waltenschwil AG



Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. A. Frey-Wyssling, Referent
Prof. Dr. K. Mühlethaler, Korreferent

1970

Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB
Uppsala, Sweden

Chemismus, Struktur und Entstehung der Carotinkriställchen in der Nebenkrone von *Narcissus poeticus* L. var. 'La Riante'

H. KUHN¹

*Laboratorium für Elektronenmikroskopie, Institut für Allgemeine Botanik der
Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich*

Angenommen am 15. März 1970

Die Nebenkrone von *Narcissus poeticus* L. besitzt, wie die Wurzel von *Daucus carota* L. und die Frucht von *Lycopersicon esculentum* L. in den Chromoplasten Carotinkriställchen.

Mittels Dichtezentrifugation wurden diese aus den Nebenkronen isoliert, und ihr Chemismus und die Struktur bestimmt. In den Kriställchen konnte kein Protein nachgewiesen werden und die Dünnschichtchromatographie und die Absorptionsmessungen ergaben, dass sie aus reinem β -Carotin bestehen. Diese Resultate wurden durch die Röntgendiffraktion bestätigt. Damit konnte man beweisen, dass der strukturelle Aufbau mit dem von synthetischen *trans*- β -Carotinkriställchen (42) identisch ist. Sie gehören nicht in die hexagonale Kristallklasse (4, 19, 50), sondern in die monokline mit der Raumgruppe $P 2_1/c$.

Der durch die Gefrierätzung (Fig. 7, 8, 24, 26) gezeigte Schichtenbau lässt sich mit den Resultaten der Röntgendiffraktion (Präzessionsaufnahmen) erklären. Die Stufen werden durch die Tafel Ebene gebildet, die teilweise weggebrochen ist. Diese entspricht der Ebene (001). Zwischen den (001)-Ebenen sind nur schwache Gitterkräfte vorhanden, wodurch verständlich wird, dass die Spaltebene zwischen diesen Ebenen liegt.

Die von Dünnschnitten und Gefrierätzabdrucken gemachten elektronenmikroskopischen Aufnahmen erlaubten, den Bildungsort der Carotinkriställchen im Spaltraum von Thylakoiden zu lokalisieren. Während dem Verfärben der Nebenkrone von grün zu schmutzig orange, werden die Chloroplasten in Chloro-chromoplasten umgewandelt. Dabei werden die Grana länger und abgeflacht. Die Thylakoide erscheinen im Dünnschnitt stark elektronendicht. In orangen Nebenkronen findet man innerhalb der Granumthylakoide der Chromoplasten Carotinkriställchen.

Die Chromoplasten, die als Endstadium der Plastidenontogenese in Erscheinung treten, sind durch ihren hohen Carotingehalt gekennzeichnet. Auf Grund dieses Pigmentgehaltes sind bereits 1885 durch lichtmikroskopische Untersuchungen verschie-

¹ Neue Adresse: Abteilung für experimentelle Medizin F. Hoffman-La Roche & Co. AG, CH-4002 Basel (Schweiz).

dene Chromoplasten-Typen unterschieden worden (36). Diese Einteilung lässt sich indessen mit Hilfe des Elektronenmikroskopes viel besser durchführen. Man gelangt dabei zu drei verschiedenen Typen (12).

1. Chromoplasten, in denen das Carotin in Globuli lokalisiert ist. Diese Form wurde gefunden in Blütenblättern von *Ranunculus repens* L. (10) und in Herbstblättern von *Ginkgo biloba* L. (48).

2. Chromoplasten mit carotinhaltigen Filamenten treten in den Früchten von *Capsicum annum* L. und in Hagebutten auf (9, 38, 39).

3. Chromoplasten, die Carotinkriställchen enthalten. Über diese Ausbildungsform sind vermutlich die meisten Arbeiten geschrieben worden. Sie ist charakteristisch für die Wurzel von *Daucus carota* L. (1-3, 12, 19, 32, 36, 40, 43-45, 49, 50), die Frucht von *Lycopersicon esculentum* L. (4, 15, 16, 34, 35) und die Nebenkrone von *Narcissus poeticus* L. (8, 20, 21, 23).

Die meisten Untersuchungen des dritten Typs versuchten den Bildungsort der Kriställchen zu lokalisieren und deren Chemismus zu bestimmen. In der Regel wurden die Carotinkriställchen jedoch während der Präparation für Dünnschnitte durch die Lösungsmittel Aethanol und Aceton herausgelöst, was ihre Lokalisation erschwerte. Dies führte zu Kontroversen über den Bildungsort. Da es bis jetzt nicht möglich war, die Kriställchen rein zu isolieren, ist ihre chemische Zusammensetzung ebenfalls nicht eindeutig geklärt. So wurde vorgeschlagen, dass es sich um Kristalloide handelt, die aus alternierenden Schichten von Carotin und Cytomembranen aufgebaut seien (12).

Diese ungelösten Fragen regten diese Arbeit an. Vorerst sollen die Carotinkriställchen aus der Nebenkrone von *Narcissus poeticus* L. var. ‚La Riante‘ isoliert werden. Mittels Dünnschichtchromatographie und Absorptionsmessungen erhält man dann Auskunft über die Pigmentart. Eine nachfolgende Proteinbestimmung zeigt, ob es sich um ein Kristalloid, wie oben beschrieben, handelt oder ob hier ein reines Pigmentkriställchen vorliegt. Die Struktur des Kriställchens wird durch die Röntgendiffraktion bestimmt. Diese Untersuchungen werden zudem den Schichtenbau der Kriställchen erklären, der durch die Gefrierätzung sichtbar wird (12, 20). Im letzten Abschnitt wird versucht, den Bildungsort der Kriställchen innerhalb der Chromoplasten zu lokalisieren. Dafür werden die Methoden Dünnschnitt-Technik und Gefrierätzung verwendet.

MATERIAL UND METHODEN

1. Objekt

Alle Untersuchungen wurden an den Nebenkronen von *Narcissus poeticus* L. var. ‚La Riante‘ durchgeführt (8). Diese Sorte unterscheidet sich von der Wildform durch eine grosse, vollständig orange-rot gefärbte Nebenkrone, deren kräftige Farbe von zahlreichen Carotinkriställchen stammt, die auf die ganze Nebenkrone verteilt sind.

2. Isolation der Carotinkriställchen

Für die chemischen und strukturellen Untersuchungen mussten die Carotinkriställchen durch Dichtegradientenzentrifugation vom übrigen Zellmaterial getrennt werden. Vorerst wurden Nebenkronen mit Quarzsand (0,1–0,8 mm) im Verhältnis 1:2 im Porzellanmörser unter Zugabe von Sorbitlösung 12 %, der Triton 1 % zugefügt war, zerrieben. Die Tritonlösung zerstört die Membranen, die das Kriställchen umgeben. Die Flüssigkeitsmengen wählte man so, dass nach etwa 1/2 stündigem Zerreiben eine dickflüssige Masse entstand. Zur Beseitigung grober Teilchen erfolgte eine Filtration durch ein Nylonnetz von 0,1 mm Maschenweite. Das Filtrat wurde während 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert, wodurch grössere Zellorganelle wie ganze Chromoplasten sedimentierten. Vom Überstand wurden je 3 ml in die 5 ml-Gradientenröhrchen des SW 39-Rotors der Ultrazentrifuge gegeben und mit Sorbitlösung 4 % überschichtet. Bei 10 000 Upm während 10 Minuten rahmten die ölhaltigen Stoffe auf, die sich mit einer Pipette entfernen liessen. Die nachfolgende Zentrifugation, zwei Stunden bei 39 000 Upm, bewirkte das Aufflottieren der meisten Carotinkriställchen, denn die Dichte von β -Carotin beträgt $1,00 \pm 0,01 \text{ g cm}^{-3}$ (46). Anschliessend wurden sie in Aethanol 50 % gewaschen und abzentrifugiert. Diese Behandlung erfolgte dreimal. Um eine mögliche Oxidation durch den Luftsauerstoff zu verhindern, gelangte für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und für die chemischen Bestimmungen das feuchte Sediment zur Verwendung. Hingegen war es notwendig die Kriställchen für die Proteinbestimmung und für die Röntgendiffraktion während mindestens 12 Stunden über Phosphorpentoxid im Vakuum zu trocknen.

3. Dünnschichtchromatographie

Die Bestimmung des Carotins erfolgte mittels der Absorptionsdünnschichtchromatographie (13). Das verwendete Laufmittel bestand aus 40 ml Benzin (K_p 100–140°C), 10 ml Benzol und 1 ml Aceton. Die isolierten Carotinkriställchen wurden in Aceton gelöst und neben synthetischem *dl*- α -Carotin und *trans*- β -Carotin der F. Hoffmann-La Roche, Basel, punktförmig auf die vorgetrocknete Dünnschichtplatte aufgetragen. Um eine Oxidation zu verhindern, wurde die Platte sofort in die Trennkammer gebracht.

4. Absorptionsmessungen

Von isolierten Carotinkriställchen, wie auch von synthetischem *dl*- α -Carotin und *trans*- β -Carotin in *n*-Hexanlösungen von ungefähr gleicher Konzentration wurde mit dem Beckman Spectrophotometer DB im Bereich von 220–600 nm die Absorption bestimmt.

5. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der isolierten Carotinkriställchen, wurden diese in einer für die Proteinhydrolyse gebräuchlichen Ampulle in Petroläther gelöst. Anschliessend wurde 6*n* Salzsäure zugefügt und durch Ausschütteln die Carotinfraction von der Proteinfraction abgetrennt. Dieser Arbeitsgang wurde solange wiederholt, bis kein Carotin mehr sichtbar war. Nun wurde über dem Wasserbad sämtlicher Petroläther entfernt, die Ampulle zugeschmolzen und das Protein bei 110°C während 48 Stunden hydrolysiert. Die Aminosäurebestimmung erfolgte mit dem Beckman/Spinco aminoanalyzer Mod. 120 B nach Moore und Stein (30, 31).

6. Röntgendiffraktion

a) *Pulveraufnahmen.* Die isolierten und die synthetischen Carotinkriställchen wurden in einer Röntgenkamera nach Debye-Scherrer während 6 Stunden mit Cu- K_{α} -Strahlung 40 kV/20 mA belichtet und die erhaltenen Pulverdiagramme mit den Daten für β -Carotin (42) verglichen.

b) *Präzessionsaufnahmen.* Die Bestimmung der Achsenorientierung erfolgte bei synthetischen β -Carotinkriställchen mittels eines Präzessionsgoniometers nach Buerger. Belichtet wurde während 10 Stunden mit Cu- K_{α} -Strahlung 40 kV/20 mA.

7. Gefrierätzung

Von verschiedenen Entwicklungsstadien wurden vom Rand der Nebenkrone mit einer Rasierklinge Stückchen von etwa 1×2 mm herausgeschnitten und diese während 2 Stunden in Cacodylatpuffer mit 3 % Glutaraldehyd und 3 % Acrolein (17) vorfixiert. Nach einer zweistündigen Imprägnierung mit 25 prozentigem Glycerin wurden nach dem gewohnten Verfahren (26–29) mit einer Balzers Gefrierätzeinrichtung Abdrucke gewonnen.

8. Dünnschnitte

Die Präparation und Vorfixierung wurde wie für die Gefrierätzung durchgeführt. Darauf folgte die Nachfixierung mit 1 % Osmiumtetroxid (17), die Entwässerung mit Aethanol-Aceton und die Einbettung in Araldit-Epon (24). Die letzten Schritte der Entwässerung vom Aethanol 70 % bis zum Aceton-Plastic Gemisch 3:7 bei -30°C verminderten das Herauslösen des Carotins. Schnitte von 500–700 Å Dicke wurden mit Glas oder Diamantmesser auf dem LKB Ultratom III angefertigt und mit Bleicitrat (33) nachkontrastiert.

RESULTATE

1. Chemismus der Carotinkriställchen

Die Auswertung der Dünnschichtchromatographie ergab für die isolierten Carotinkriställchen die gleichen Werte wie für das synthetische *trans*- β -Carotin. Eine Auftrennung in mehrere Pigmente konnte nicht beobachtet werden. Das synthetische *dl*- α -Carotin liegt in Übereinstimmung zu Hager *et al.* (13) näher bei der Laufmittelfront.

Durch die Absorptionsmessungen im Bereich von 220–600 nm wurde die Identifizierung als β -Carotin bekräftigt (Fig. 1). Die Hauptmaxima liegen wie für *trans*- β -Carotin bei 450 und 477 nm, diejenigen für *dl*- α -Carotin bei 446 und 474 nm. Diese Werte sind identisch mit denen aus der Literatur für β -Carotin und α -Carotin (14).

Für die Proteinbestimmung nach Moore und Stein (30, 31) wurden 0.5 mg isolierte Carotinkriställchen verwendet. Bei einem Proteingehalt von 5–10 %, der notwendig ist, um ein Kristalloid aus Pigment und Membranen aufzubauen, muss die Bestimmung für mehrere Aminosäuren deutlich positiv verlaufen. Im ganzen Spektrum der sauren, neutralen und basischen Aminosäuren konnte kein Scheitelpunkt fest-

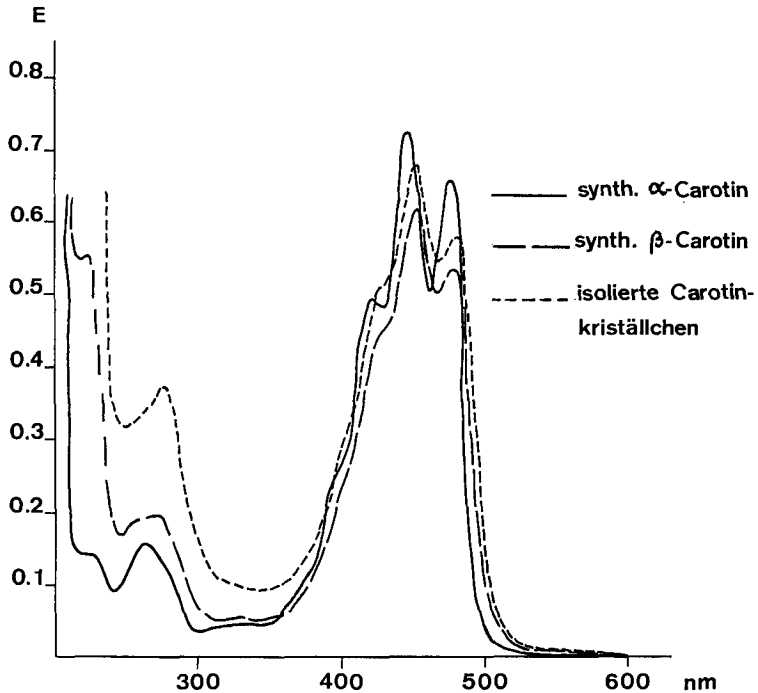


FIG. 1. Extinktionskurven für synthetisches *trans*- β -Carotin, synthetisches *dl*- α -Carotin und isolierte Carotinkriställchen. Das verwendete Lösungsmittel ist *n*-Hexan.

gestellt werden. Diese Resultate zeigen eindeutig, dass es sich bei den isolierten Carotinkriställchen um reines β -Carotin handelt.

2. Struktur der Carotinkriställchen

a) *Elektronenmikroskopie*. An isolierten Carotinkriställchen aus der Wurzel von *Daucus carota* L. wurde eine Schichtstruktur mit einer Stufenhöhe von etwa 1000 Å gefunden (1). Mit dem Gefrierätzverfahren kann man einen feineren Schichtenbau zeigen (Fig. 7). Von synthetischen *trans*- β -Carotinkriställchen erhält man ähnliche Bilder (Fig. 8). Die genaue Bestimmung der Stufenhöhe ist schwierig, da man die wirkliche Orientierung der Kriställchen zur Bedampfungsrichtung nicht kennt. Ausserdem liegt sie mit etwa 20 Å im Bereich der Auflösungsgrenze der Gefrierätzung.

b) *Röntgendiffraktion (Pulveraufnahmen)*. Die auf Grund der Ergebnisse der Gefrierätzung geäußerte Vermutung, dass es sich bei den isolierten Carotinkriställchen um die gleiche Kristallstruktur handeln könnte wie beim *trans*- β -Carotin, wird durch die Röntgendiffraktion nach Debye-Scherrer bestätigt (Fig. 9–11). Die Pulveraufnahme von *dl*- α -Carotin (Fig. 9) ist deutlich verschieden von derjenigen der isolierten

TABELLE I

RÖNTGENDIFFRAKTION NACH DEBYE-SCHERRER VON SYNTHETISCHEN *trans*- β -CAROTIN-KRISTÄLLCHEN UND VON AUS DER NEBENKRONE DER NARZISSE ISOLIERTEN KRISTÄLLCHEN^a

4 θ in Grad		Indizes der Ebenen / aus den Zellkonstanten (42) berechnete 4 θ — Werte in Grad	
synthetische <i>trans</i> - β -Carotinkriställchen	isolierte Carotinkriställchen		
53,7	52,9	(211)/54,72	(202)/54,80
49,5	49,0	(122)/49,12	(200)/48,88
46,7	47,1	($\bar{1}$ 23)/46,92	
43,7	43,4	(104)/43,12	($\bar{1}$ 21)/44,04
		(120)/44,08	
37,9	37,4	($\bar{1}$ 14)/37,84	(020)/37,20
33,6	33,4	($\bar{1}$ 13)/33,48	
31,2	31,0	(102)/31,08	
29,5	29,0	($\bar{1}$ 11)/29,52	

^a Belichtung: 6 Stunden mit Cu- K_{α} -Strahlung; 40 kV/20 mA.

Carotinkriställchen (Fig. 10). Hingegen deckt sich diese mit der Aufnahme von *trans*- β -Carotin (Fig. 11). Diese Übereinstimmung wird noch besser sichtbar, wenn man die gemessenen θ -Werte mit den Daten für β -Carotin (42) vergleicht (Tab. I).

c) Röntgendiffraktion (Präzessionsaufnahmen). Von synthetischen β -Carotinkriställchen wurden in verschiedenen Orientierungen Präzessionsaufnahmen gemacht. Es zeigte sich bald, dass die reziproke Achse b^* , und somit auch die Achse b mit der Längsachse des Kriställchens zusammenfallen.

Bei der Durchstrahlung senkrecht zur Tafelenebene erhielt man die senkrecht aufeinander stehenden Achsen b^* und d^* (Fig. 3). Die letztere ist keine Hauptachse. Dreht man 15° um die b -Achse, so erscheinen auf dem Beugungsbild die reziproken Achsen b^* und a^* (Fig. 2). Die reziproken Achsen b^* und c^* werden abgebildet nach einer Drehung um 90° (Fig. 4).

Aus diesen Resultaten kann man entnehmen, dass die Plättchenebene der Kriställchen durch die reellen Achsen a und b gebildet wird, also die Ebene (001) darstellt. Die c -Achse liegt $105,3^\circ$ geneigt auf die Ebene (001) und senkrecht auf die b -Achse (Fig. 5). In Fig. 6 ist das Kristallgitter, das aus der Literatur bekannt ist (42), in zwei Projektionen dargestellt. Fig. 6a gibt die Projektion auf die Plättchenebene wieder, Fig. 6b stellt die Projektion auf die (010)-Ebene dar. An Hand der gestrichelt und der ausgezogen eingetragenen Carotinmoleküle kann man feststellen, dass zwei nicht identische Molekülschichten \rightarrow und \rightarrow , die in der Plättchenebene liegen, miteinander alternieren. Die Symmetriezentren der Carotinmoleküle dieser beiden Molekül-

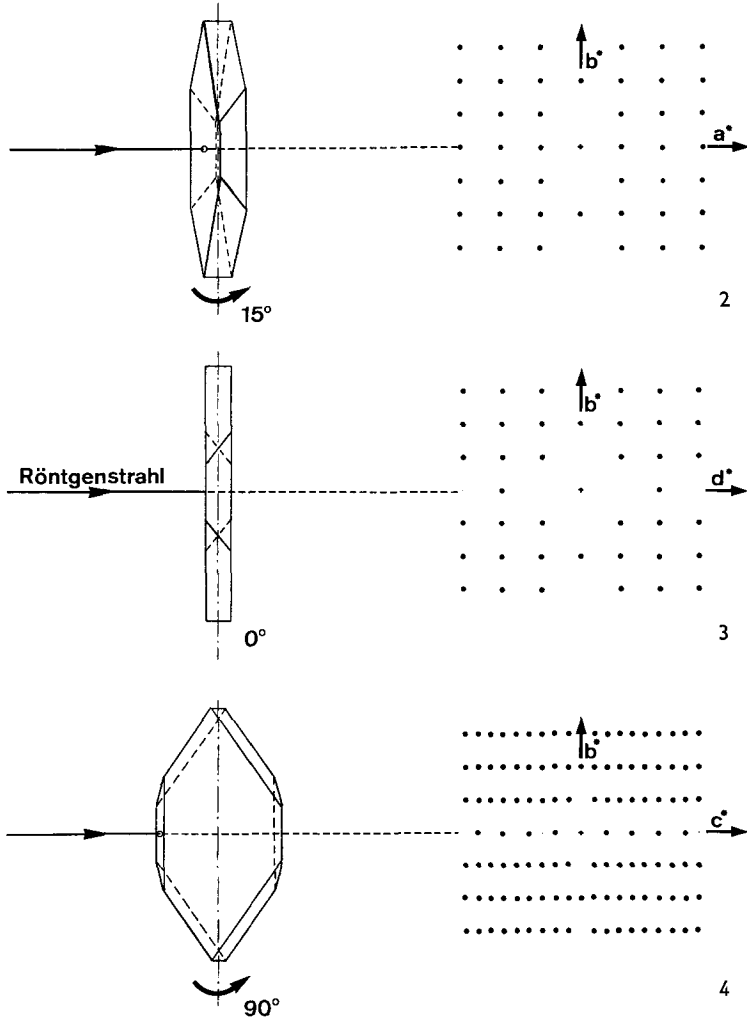


FIG. 2-4. Röntgendiffraktion (Präzessionsaufnahmen) von synthetischem *trans*- β -Carotinkriställchen in verschiedenen Orientierungen. Auf der linken Seite ist die Orientierung eingezeichnet, rechts davon das dazu gehörende Beugungsbild. Dieses wurde nach den Originalen übertragen. Belichtung: 10 Stunden mit Cu-K_{α} -Strahlung; 40 kV/20 mA.

FIG. 2. Die Durchstrahlungsrichtung ist senkrecht auf die Längsachse des Kriställchens und 75° zu dessen Plattchenebene geneigt. Das Beugungsbild zeigt die senkrecht zueinander stehenden reziproken Achsen b^* und a^* .

FIG. 3. Die Durchstrahlungsrichtung ist senkrecht auf die Plattchenebene. Im Beugungsbild ist senkrecht zur reziproken Achse b^* eine reziproke Achse d^* zu erkennen.

FIG. 4. Die Durchstrahlungsrichtung ist senkrecht auf die Längsachse des Kriställchens und parallel zu dessen Plattchenebene. Im Beugungsbild erscheinen die reziproken Achsen b^* und c^* , die senkrecht aufeinander stehen.

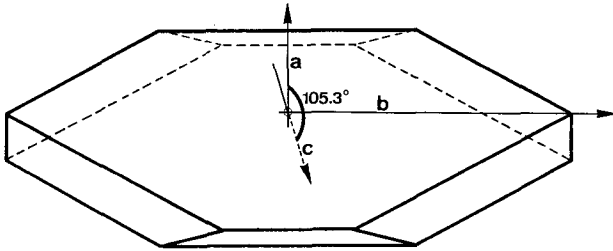


FIG. 5. Räumliche Darstellung der Achsenorientierung im Kriställchen. Die a- und b-Achsen bilden die Plättchenebene, die c-Achse liegt $105,3^\circ$ zur a-Achse geneigt und senkrecht zur b-Achse.

schichten sind in Richtung der b-Koordinate um $1/2 b$ gegeneinander verschoben (Fig. 6a). Zusammen bilden diese beiden Schichten eine ganze Periode, die senkrecht auf die (001)-Ebene gemessen $23,6 \text{ \AA}$ beträgt. Diese Dicke stimmt gut mit der ungefähren Stufenhöhe von 20 \AA überein, die aus den Gefrierätzbildern (Fig. 7, 8, 24) gemessen wurde.

3. Entstehung der Carotinkriställchen

Die Plastidenontogenie in der Nebenkronen der Narzisse verläuft von den Proplastiden aus über gut entwickelte Chloroplasten zu den orange-roten Chromoplasten, die Carotinkriställchen enthalten (20). In dieser Untersuchung soll der Bildungsort der Carotinkriställchen bestimmt werden. Ergänzend zur Dünnschnitt-Technik wurde auch die Gefrierätzung angewendet.

In sehr jungen Blütenknospen ist die Nebenkronen gelblich-grün. Sie verfärbt sich rasch grün und enthält dann voll ausgebildete Chloroplasten (Fig. 12, 21). Kurz vor dem Öffnen der Blüte wird die Nebenkronen durch vermehrte Carotinsynthese schmutzig orange. Dabei verkleinert sich der Spaltraum der Thylakoide, wodurch die Grana zusammengedrückt erscheinen (Fig. 13). Ausserdem werden die Thylakoide in diesem Stadium stark elektronendicht, was mit einer zunehmenden Adsorption des Kontrastmittels durch den ansteigenden Gehalt an Carotin zusammenhängen mag. Bereits in diesem Stadium treten vereinzelt Thylakoide auf, die auffallend gestreckt sind (Fig. 14). Bei genauerer Untersuchung kann man feststellen, dass der Thylakoidspaltraum mit einem elektronendichten Material ausgefüllt ist. Dies muss das Anfangsstadium der Carotinkriställchenbildung sein.

In den sich öffnenden Blüten ist die Nebenkronen gleichmässig orange-rot gefärbt. Chloroplasten sind nur noch selten zu finden, meistens sieht man Chromoplasten mit auffallend elektronendichten Carotinkriställchen (Fig. 15), die stark gewellt sind. Diese Verbiegung der Kriställchen beobachtet man bei der Gefrierätzung nicht. Sie erfolgt deshalb durch die Schrumpfung der Plastidenmembranen bei der Entwässerung oder der Einbettung (Fig. 22–24, 27–29). Durch die Entwässerung mit Aethanol

und Aceton wird das Carotin trotz der Behandlung bei -30°C teilweise herausgelöst. Dadurch wird eine Membran sichtbar, die das Kriställchen umhüllt (Fig. 16, 18, 19). In Fig. 19 ist zudem am Ende des Kriställchens die Umbiegung dieser Membran freigelegt. Daraus kann man schliessen, dass es sich um eine Thylakoidmembran handelt. Das Carotinkriställchen wird folglich im Spaltraum eines Thylakoides gebildet. Die Membran ist auch durch die Gefrierätzung nachweisbar. In Fig. 27–29 ist sie stellenweise auf beiden Seiten des Kriställchens erkennbar.

Ein Chromoplast kann ein oder mehrere Carotinkriställchen enthalten. Vermutlich werden sie meistens innerhalb eines Granums gebildet, denn sehr oft trifft man parallel zueinander liegende Kriställchen an (Fig. 15, 16, 20, 23). Die Zahl der Kristall-Lamellen kann, wie aus Fig. 20 ersichtlich ist, recht gross sein. Natürlich entsteht nicht in jedem Granumthylakoid ein Carotinkriställchen. So können neben kriställchenfreien Thylakoiden solche liegen, die ein Kriställchen enthalten (Fig. 16, 18, 19, 22, 23).

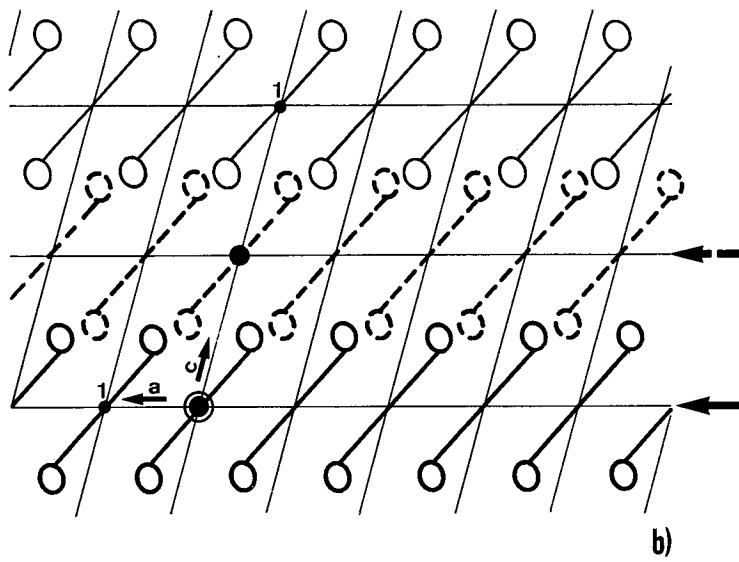
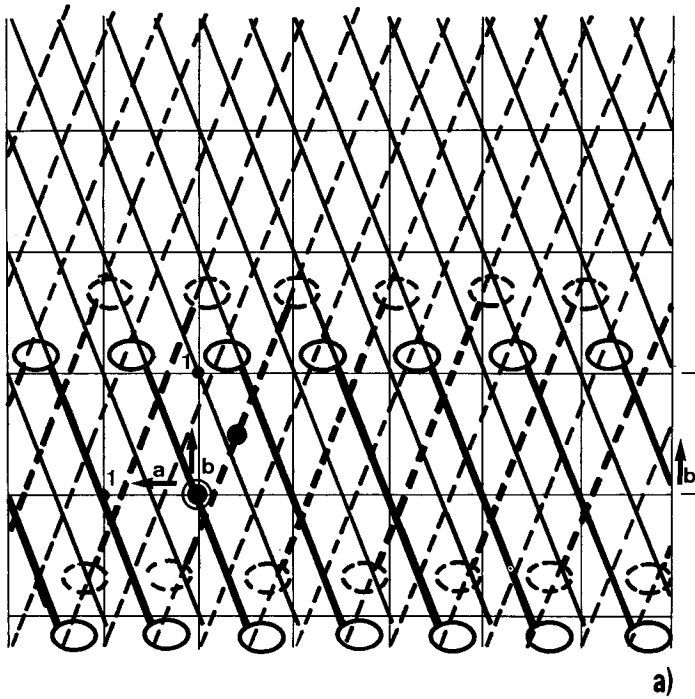
Liegt das Kriställchen parallel zur Schnittfläche, so wird es durch die Präparation meistens herausgelöst. Zurück bleibt nur der Abdruck seines Umrisses innerhalb des Plastiden (Fig. 17). Ähnliche Kristallformen kann man bei der Gefrierätzung beobachten, wo das Kriställchen nicht aufgelöst wird (Fig. 24). In Fig. 24 sind die Stufen sichtbar, die durch das Wegbrechen einiger Carotinschichten zustande gekommen sind. Das Kriställchen ist teilweise durch die Membran überdeckt.

Gebogene Carotinkriställchen findet man auch auf Gefrierätzbildern (Fig. 25, 26). Es zeigt sich indessen keine wellenartige Verformung wie bei den Dünnschnittbildern (Fig. 15). Die Biegung, wie in Fig. 16, ist vermutlich durch das starke Flächenwachstum der Thylakoidmembranen innerhalb der Plastidenhülle bedingt.

Elektronendichte Globuli sind in allen Entwicklungsstadien vorhanden. In Chromoplasten (Fig. 13, 15, 17) sind sie eher zahlreicher und grösser als in Chloroplasten (Fig. 12). Die Unterschiede sind jedoch zu gering um sie mit der Carotinsynthese in Beziehung zu bringen.

Vergleicht man die Form der Chromoplasten nach Gefrierätzung mit jenen der Dünnschnitt-Technik, so stellt man fest, dass die letzteren viel spitzer sind. Dieses Bild kommt sicher durch die Schrumpfung der Plastidenhülle zustande, die dann von starren Carotinkriställchen angespannt werden. Ist der Widerstand des Kriställ-

FIG. 6. Kristallgitter von *trans*- β -Carotin. (6a) Projektion auf die Ebene (001). (6b) Projektion auf die Ebene (010). In beiden Projektionen sind Carotinmoleküle eingezeichnet. Die Orientierung der in 6b mit \rightarrow bezeichneten Moleküle ist in 6a durch die schräg von rechts unten nach links oben verlaufenden ausgezogenen Striche eingezeichnet. Für die in 6b mit \dashrightarrow bezeichneten Moleküle gelten in 6a die gestrichelten Linien. In 6a sind die in 6b mit \rightarrow und \dashrightarrow bezeichneten Carotinmoleküle von je einer b-Koordinate mit ihren Ringen gezeichnet. Zu beachten ist die um $1/2$ b veränderte b-Koordinate. Als Orientierungshilfe sind im Symmetriezentrum je eines Moleküls dieser beiden nicht identischen Schichten die Punkte \odot und \bullet in beiden Projektionen eingetragen.



chens klein, so wird es verbogen. Einzelne Kriställchen sind durch ihr Wachstum in der Lage die Plastidenhülle zu durchstossen. Dabei gelangen sie ins Zellplasma, wie in Fig. 29 ersichtlich ist.

DISKUSSION

1. *Chemismus der Carotinkriställchen*

In der Nebenkronen von *Narcissus poeticus* L. wurden schon 1918 (23) Kriställchen nachgewiesen, die als Pigmentkriställchen bezeichnet wurden. Aufwendige Untersuchungen von Straus (43–45) an Möhren ergaben für isolierte Chromoplasten, die er den Kriställchen gleichstellte (45), einen sehr hohen Gehalt an Protein und Lipid. Das Carotin machte nur 20–50 % des Trockengewichtes aus. Diese Resultate und neuere elektronenmikroskopische Aufnahmen von den Chromoplasten aus der Wurzel von *Daucus carota* L. (12), die einen Schichtenbau zeigen, führten zur Annahme, dass die Kriställchen ein Lipochromoprotein darstellen könnten, indem Lipoproteinmembranen mit Carotinschichten abwechseln würden. Von dieser Auffassung wurde indessen nach polarisationsmikroskopischen Studien an den Kriställchen der Narzissenblüte abgerückt (8). Andere Autoren vertraten die Ansicht, dass es sich um ein Pigmentkriställchen handelt, das von Lipoproteinmembranen umgeben ist (1–3, 19, 50). Diese Struktur wurde Carotinkörper genannt.

Auf Grund von Absorptionsmessungen und einem Vergleichen der Kristallform mit synthetischen *trans*- β -Carotinkriställchen wurden die Kriställchen in der Nebenkronen von *Narcissus poeticus* L. als β -Carotinkriställchen erklärt (5, 6). Da die Kriställchen nicht isoliert wurden, darf man diese Resultate indessen nicht als gesichert betrachten, denn sie könnten noch eine Komponente enthalten, die man mit den angewendeten Methoden nicht erfassen konnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden die isolierten Kriställchen aus der Nebenkronen von *Narcissus poeticus* L. var. ‚La Riante‘ als reines β -Carotin bestimmt. Zu diesem Resultat führten die folgenden Methoden: Dünnschichtchromatographie, Absorptionsmessungen, Röntgendiffraktion und Proteinbestimmung. Da kein Protein vorhanden ist, muss der Schichtenbau des Kriställchens aus Pigment und Lipoproteinmembran (12) für die Narzissenkriställchen abgelehnt werden. Der für Carotinkriställchen aus der Wurzel von *Daucus carota* L. gefundene hohe Proteingehalt von

FIG. 7. Gefrierätzung von isoliertem Carotinkriställchen. $\times 120\,000$.

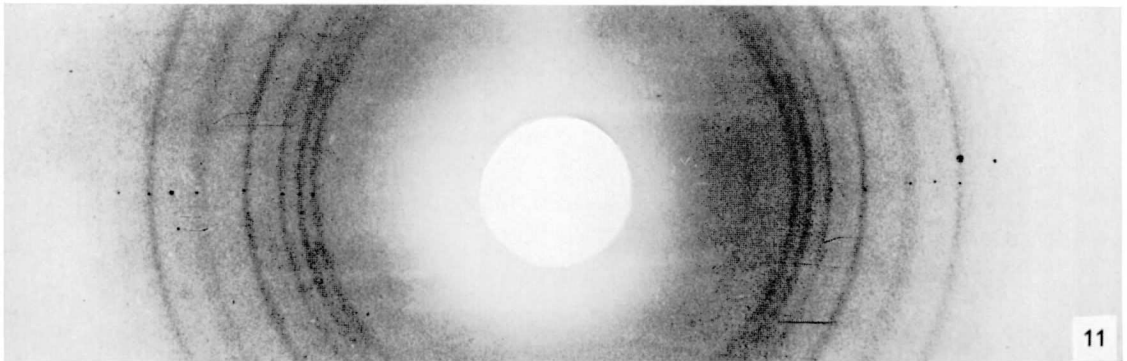
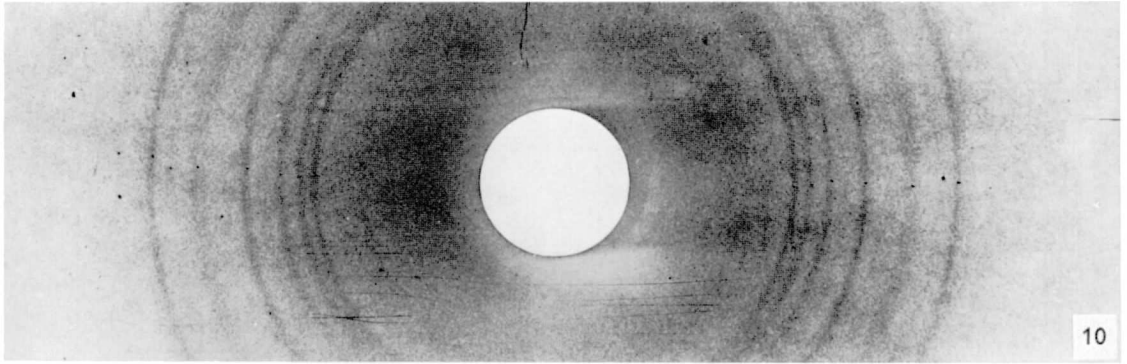
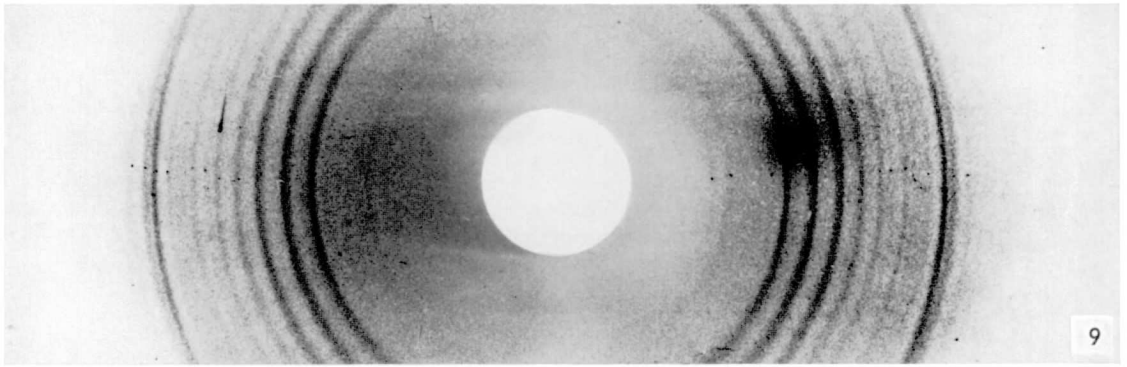
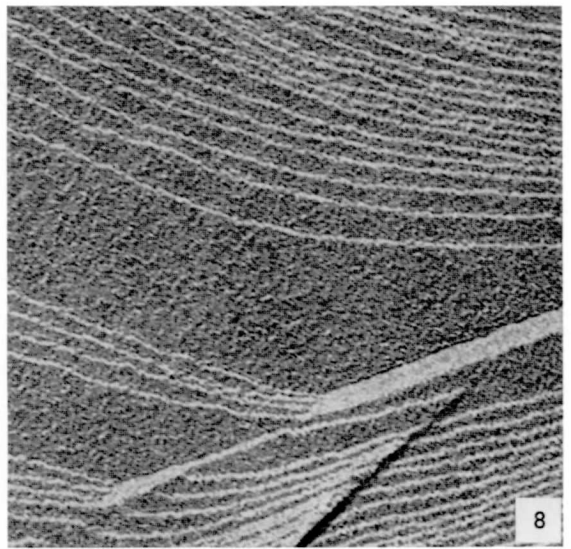
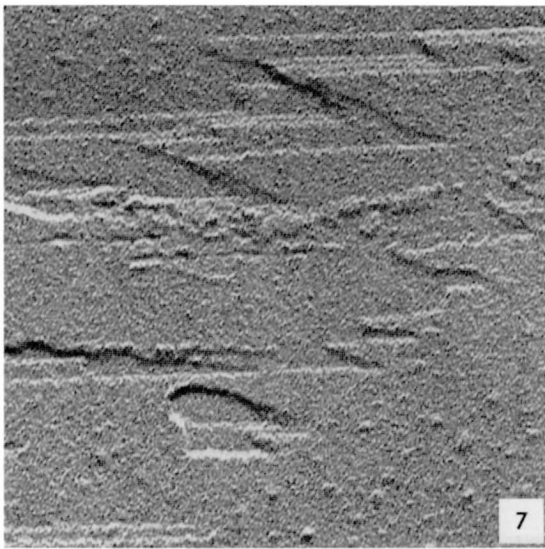
FIG. 8. Gefrierätzung von synthetischem *trans*- β -Carotinkriställchen. $\times 120\,000$.

FIG. 9–11. Röntgendiffraktion (Pulveraufnahmen) von verschiedenen Carotinkriställchen. Belichtung: 6 Stunden mit Cu- K_{α} -Strahlung; 40 kV/20 mA.

FIG. 9. Synthetisches *dl*- α -Carotin.

FIG. 10. Isolierte Carotinkriställchen aus der Nebenkronen der Narzisse.

FIG. 11. Synthetisches *trans*- β -Carotin.



etwa 10 % (2, 19) dürfte z.T. auf Verunreinigungen zurückzuführen sein. Ohne eine solche Kontamination wäre es nicht möglich, die Kriställchen in Wasser zu sedimentieren, denn ihre Dichte entspricht jener des Wassers (46).

2. Struktur der Carotinkriställchen

Mit der angewandten Röntgendiffraktion nach Debye-Scherrer (Fig. 9–11) wurde für die Kriställchen der Narzisse das gleiche Kristallgitter bestimmt, wie es für synthetische *trans*- β -Carotinkriställchen gefunden wurde (18, 42, 46). Die hexagonale Symmetrie, die für die Carotinkriställchen aus der Wurzel von *Daucus carota* L. (2, 3, 19) und aus der Frucht von *Lycopersicon esculentum* L. (3, 4) angegeben wurde, trifft nicht zu. Für die nativen Kriställchen von *Daucus carota* L. und von *Narcissus poeticus* L. ergeben polarisationsoptische Untersuchungen (8) schiefe Auslöschung, was nur im monoklinen und triklinen System möglich ist. Die Elektronenbeugungs-Untersuchungen (2–4, 19) nehmen keinen Bezug auf die Daten der Röntgendiffraktion (18, 37, 41, 42, 46). Ihr einziges Kriterium ist das Beugungsbild in nur einer Projektion, das allein keine Schlüsse über den dreidimensionalen Bau zulässt. In einer eigenen Arbeit (21) wurde versucht dieses Beugungsbild mit der bekannten monoklinen Struktur von *trans*- β -Carotin (18, 42, 46) in Einklang zu bringen. Eine kritische Prüfung dieser Ergebnisse hat nun aber gezeigt, dass diese Interpretation, die auf einer pseudohexagonalen Struktur gründen musste, falsch ist.

Es ist unmöglich, dass die Lycopinkriställchen der Tomate (3, 4) das gleiche Beugungsbild bewirken, wie die β -Carotinkriställchen der Möhre (2, 3, 19), denn diese beiden Substanzen besitzen sicher keine identische Einheitszelle. Daraus muss man schliessen, dass die erhaltenen Elektronenbeugungsbilder (2–4, 19, 21) von einer unbekannt Substanz stammen. Ein Umwandlungsprodukt der Carotinkriställchen kommt nicht in Frage, da kristalline Einschlüsse einer Formvarfolie das gleiche Beugungsbild erzeugen. Bei allen Experimenten wurde Formvar als Trägerfolie verwen-

FIG. 12–20. Dünnschnitte von der Nebenkrone von *Narcissus poeticus* L. var. „La Riente“. Vorfixierung mit Glutaraldehyd/Acrolein je 3 % in Cacodylatpuffer, Nachfixierung mit Osmiumtetroxid 1 % in Cacodylatpuffer, Nachkontrastierung mit Bleicitrat nach Reynolds (33).

FIG. 12. Chloroplast aus grüner Nebenkrone mit gutausgebildetem Granum. $\times 40\ 000$.

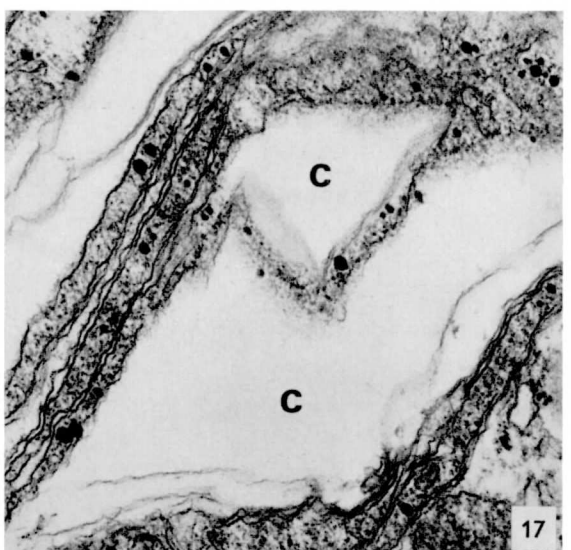
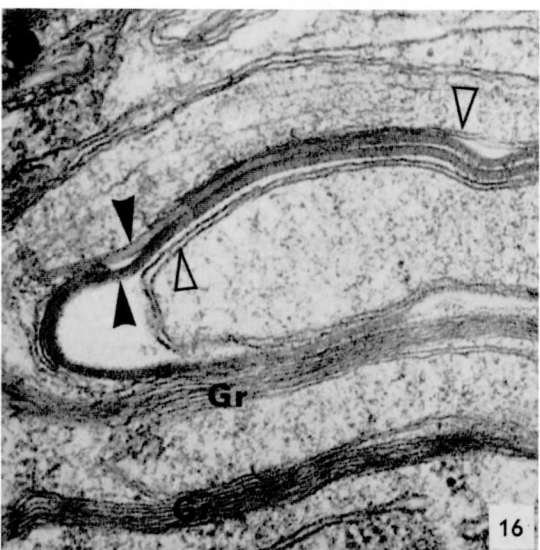
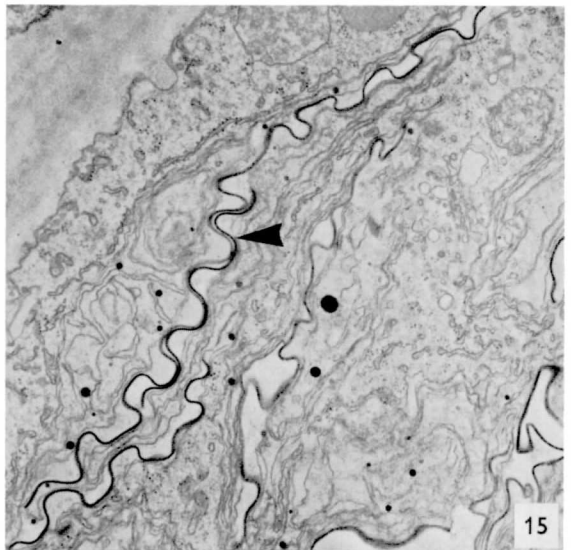
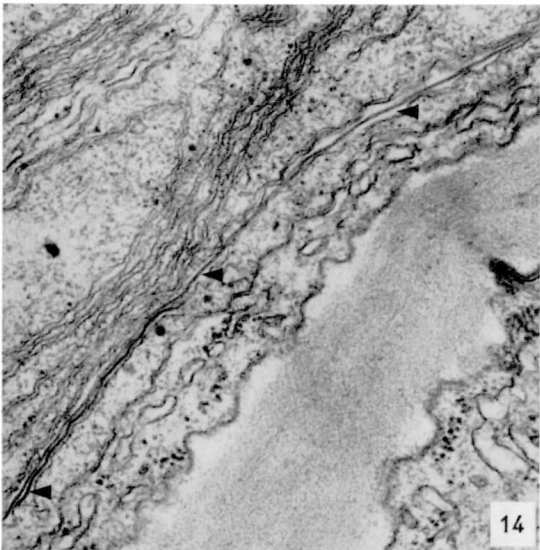
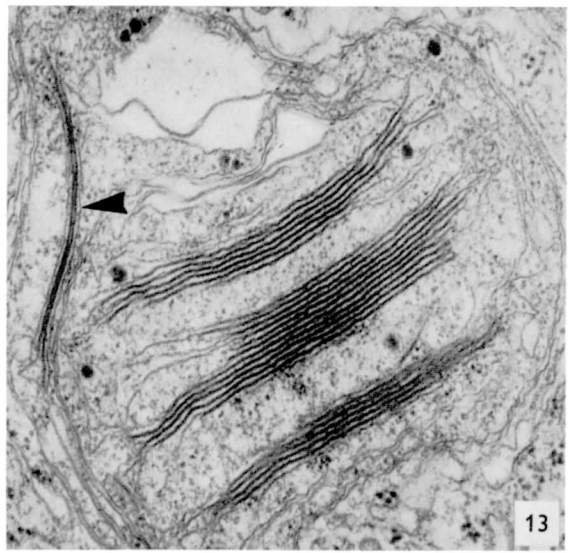
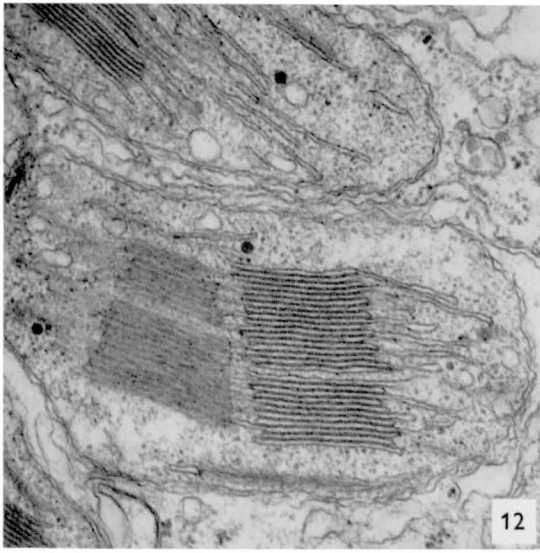
FIG. 13. Chloro-chromoplast aus schmutzig oranger Nebenkrone. Die Granumthylakoide erscheinen abgeflacht, ihr Spaltraum ist z.T. kaum sichtbar \blacktriangleright . $\times 40\ 000$.

FIG. 14. Anfangsstadium der Kriställchenbildung. Dieses wird im Spaltraum eines Thylakoides gebildet (drei Pfeile). $\times 36\ 000$.

FIG. 15. Chromoplasten von oranger Nebenkrone. Die stark elektronendichten Carotinkriställchen \blacktriangleright sind durch die Schrumpfung der Plastidenmembranen auffallend gewellt. In einem Chromoplasten kann man mehrere Kriställchen erkennen. $\times 16\ 000$.

FIG. 16. Parallel zu Thylakoiden mit Carotinkriställchen \blacktriangleright verlaufen solche, die leer sind \triangleright . Die Verformung der Grana (*Gr*) ist in dieser Aufnahme deutlich sichtbar. $\times 60\ 000$.

FIG. 17. Die Umrisse der herausgelösten Carotinkriställchen (*C*) kann man erkennen. Die osmio-philten Globuli sind klein und nicht häufig. $\times 40\ 000$.



det. Es war daher naheliegend, in ihr die Ursache der Beugung zu suchen. Entsprechende Versuche mit einer leeren Pioloform BL 24 Trägerfolie ergab das gleiche Resultat. Wiederum entstand von kristallinen Einschlüssen ein identisches Beugungsbild. Die Trägerfolie selbst kann man daher als Ursache der hexagonalen Elektronenbeugungsbilder ausschliessen, denn Formvar ist ein Polyvinylaldehyd, Pioloform BL 24 dagegen ein Acetal des Butyraldehyds. Die Quelle der Elektronenbeugung muss folglich durch eine Verunreinigung verursacht sein. In Frage kommt ein Vertreter der Calciumorthosilikate, denn diese gehören in die hexagonale Kristallklasse und die Dimensionen ihrer Einheitszelle passen gut zu den gemessenen d -Werten (21). Solche Orthosilikate sind durch ihr Vorkommen in Zement und Glas sehr weit verbreitet. Sie können als Staub aus der Luft auf die Trägerfolie fallen oder dann bei der Präparation der Folie vom Glasobjektträger auf diese übertragen werden. Unsere Experimente geben keine Auskunft über die wahre Natur der Verunreinigung, doch zeigen sie einwandfrei, dass es sich nicht um Carotinkriställchen handelt.

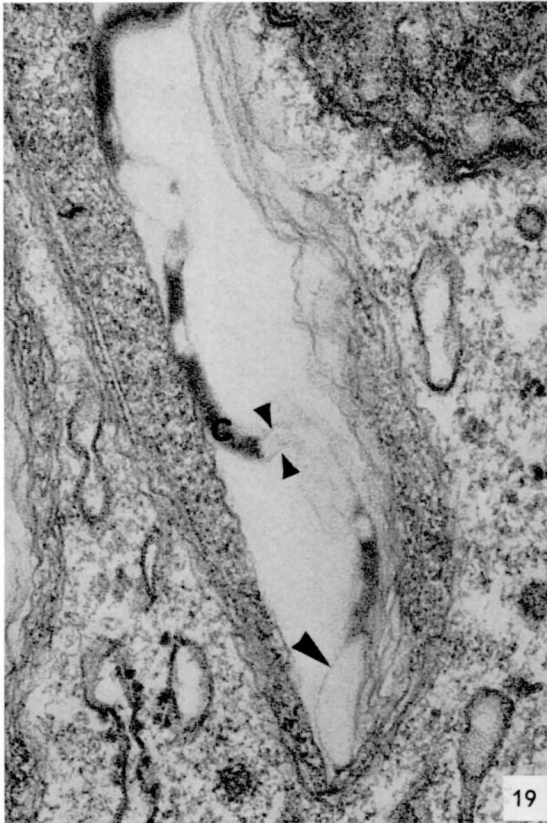
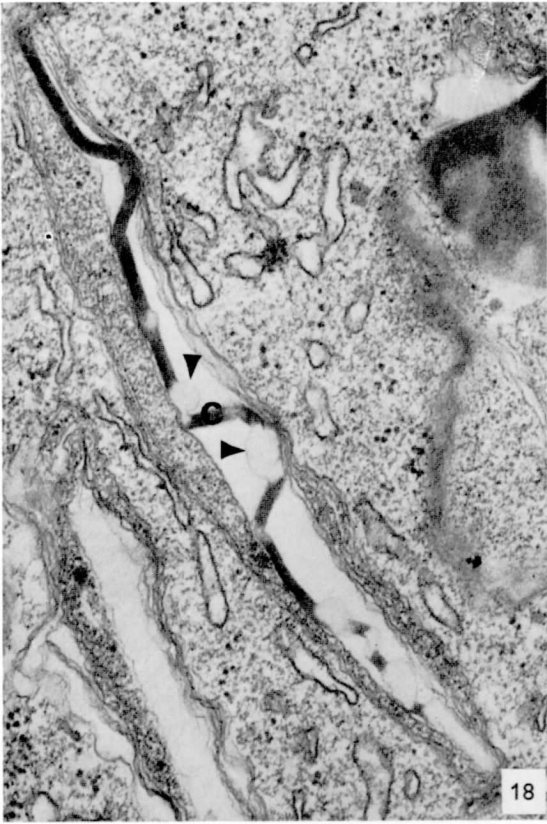
Die Orientierungsaufnahmen der Röntgendiffraktion an synthetischen *trans*- β -Carotinkriställchen mittels des Präzessionsgoniometers nach Buerger ergeben für die Plättchenebene die Ebene (001). Parallel zu ihr verläuft die Spaltfläche, die auf den Gefrierätzbildern (Fig. 7, 8, 24–26) sichtbar ist. Anhand der Orientierung der Carotinmoleküle im Kristallgitter (Fig. 6), stellt man fest, dass drei Spaltebenen möglich sind, die keine Carotinmoleküle durchschneiden. Es sind dies die Ebenen (102), die in (21) fälschlicherweise angenommen wurde, die Ebene (100) und die Ebene (001). Da die Bruchfläche mit der Plättchenebene identisch ist (Fig. 24), handelt es sich beim synthetischen *trans*- β -Carotin um die Ebene (001). Die Stufenhöhe der synthetischen *trans*- β -Carotinkriställchen aus der Narzisse beträgt ungefähr 20 Å. Diese Grösse finden wir, wenn wir als Stufe die beiden in Fig. 6b gezeichneten, nicht identischen Molekülschichten \rightarrow und \rightarrow , die eine ganze Periode bestimmen, annehmen. Ob als Stufe auch die halbe Periode möglich ist, kann man mittels der üblichen Gefrierätzung nicht zeigen, da deren Auflösungsgränze bei 20 Å liegt. Diese Beobachtungen könnten vermuten lassen, dass auch bei den natürlichen Carotinkriställchen der Narzisse Tafelenebene und Bruchfläche identisch sind und der Ebene (001) entsprechen.

Die synthetischen *trans*- β -Carotinkriställchen zeigen verschiedene Formen. Manch-

FIG. 18. Durch die teilweise Auflösung des Carotinkriställchens (C) wird die Thylakoidmembran stellenweise sichtbar \blacktriangleright . Durch das starre Kriställchen werden die schrumpfenden Plastidenmembranen angespannt. Daher das spitze Aussehen der Chromoplasten. $\times 44\ 000$.

FIG. 19. Das Carotinkriställchen (C) ist z.T. herausgelöst. Es ist umgeben von einer Thylakoidmembran, die man auf beiden Seiten sehen kann $\blacktriangleright\blacktriangleleft$. Ferner ist die Umbiegung der Membran sichtbar \blacktriangleright . $\times 80\ 000$.

FIG. 20. Innerhalb des Chromoplasten liegen bis sechs Carotinkriställchen parallel zueinander. Sie sind z.T. umgebogen, was so zu deuten ist, dass sie im Spaltraum von Thylakoiden gebildet werden. $\times 44\ 000$.



mal sehen sie sechseckig aus wie in Fig. 2–5, oder dann gleichen sie mehr dem Kriställchen in Fig. 24. In allen Präzessionsaufnahmen konnte man jedoch feststellen, dass die b-Achse immer in der Längsachse liegt.

3. Entstehung der Carotinkriställchen

Die Carotinkriställchen lösen sich beim Entwässern in den Lösungsmitteln Aethanol und Aceton, weshalb man in Dünnschnitten nur selten ganze Carotinkriställchen findet. Ihre Lokalisation im Plastiden wird dadurch erschwert, was zu verschiedenen Vermutungen über ihre Entstehung führte. Durch lichtmikroskopische Untersuchungen an der Wurzel von *Daucus carota* L. kam man zur Auffassung, dass die Carotinkriställchen aus den osmiophilen Globuli entstehen, die man bereits in Chloroplasten findet (32, 40). Es ist jedoch fraglich, ob die osmiophilen Globuli in den Chloroplasten mit den meist viel grösseren in den Chromoplasten etwas zu tun haben. Lichtenthaler (22) hat an Chloroplasten und Chromoplasten von *Ficus elastica*-Blättern zeigen können, dass zwei verschiedene Typen existieren. In der vorliegenden Arbeit sind nur kleine osmiophile Globuli beobachtet worden, die mit den Carotinkriställchen nicht in Verbindung gebracht werden können.

Die Plastiden der Wurzel von *Daucus carota* L. wurden auch elektronenmikroskopisch untersucht. Dadurch vermutete man, dass die Carotinkriställchen auf Thylakoidmembranen oder auf Stärkekörner abgelagert werden (2, 19, 49, 50). Untersuchungen an Tomatenfrüchten haben ergeben, dass die Carotinkriställchen im Spalt-raum eines Thylakoids oder zwischen zwei parallelen Thylakoiden gebildet werden (34, 35). Am gleichen Objekt wurden jedoch bei verschiedenen Carotinmutanten zwei unterschiedliche Bildungsarten beschrieben (15, 16). Die β -Carotinkriställchen sollten, wie oben für *Daucus carota* L. beschrieben (32, 40), aus osmiophilen Globuli hervorgehen. Für die Lycopinkriställchen wird dagegen eine Bildung innerhalb eines Thylakoides angenommen, was auch für die β -Carotinkriställchen von *Narcissus poeticus* L. zutrifft. Die Annahme von zwei verschiedenen Entstehungsarten ist zu

FIG. 21–29. Gefrierätzung von der Nebenkrone der Narzisse. Vorfixierung mit Glutaraldehyd/Acrolein je 3 % in Cacodylatpuffer, anschliessend mit Glycerin 25 % imprägniert.

FIG. 21. Gutausgebildetes Granum (*Gr*) eines Chloroplasten aus einer grünen Nebenkrone. $\times 48\ 000$.

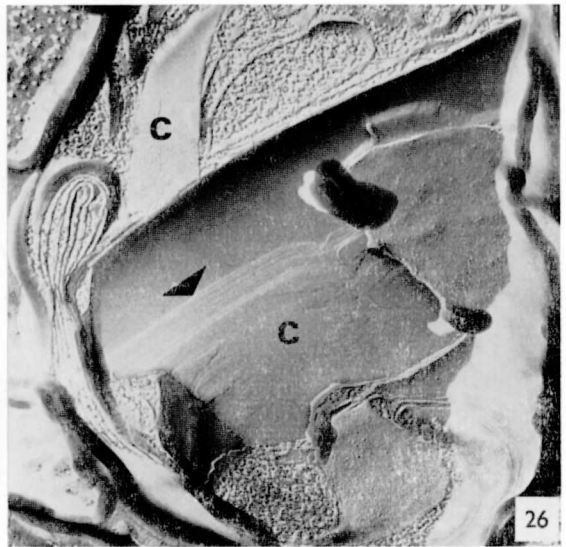
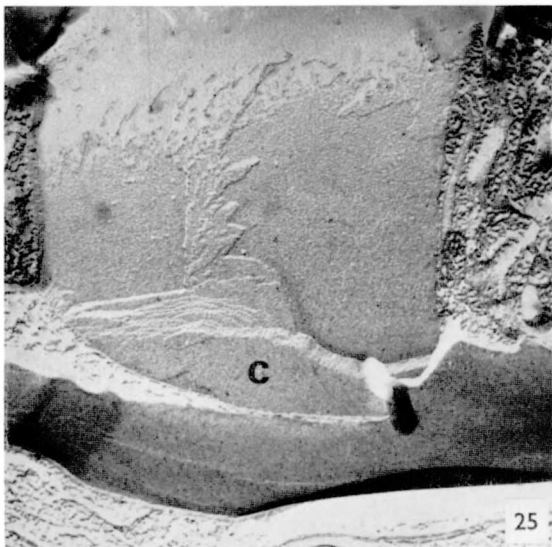
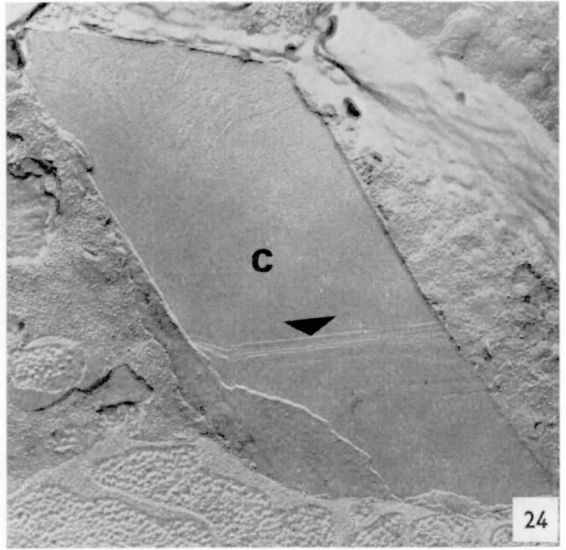
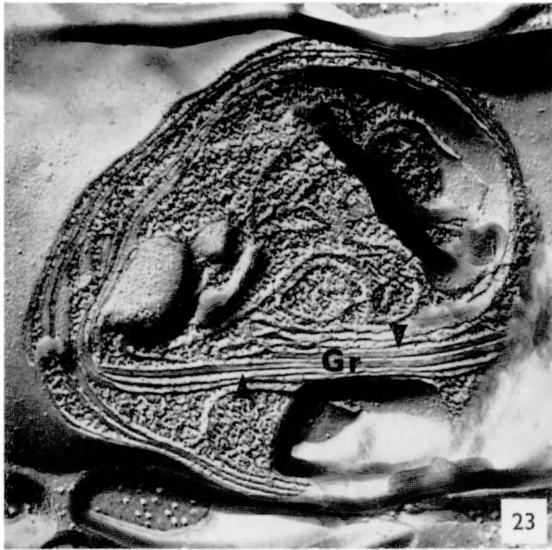
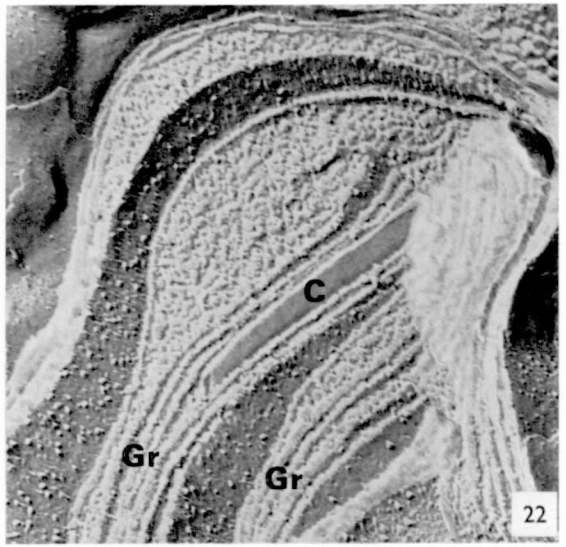
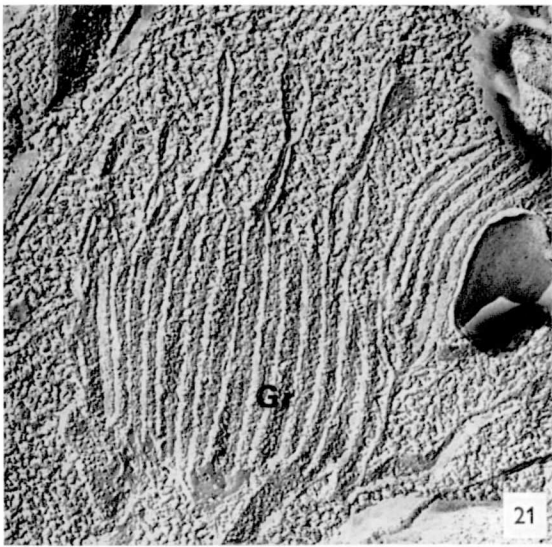
FIG. 22. Carotinkriställchen (*C*) innerhalb eines Granums (*Gr*). Die Grana sind in ihrer Form verändert, die Membranen sind länger und näher zusammengedrückt. $\times 70\ 000$.

FIG. 23. Quergebrogener Chromoplast mit Granum (*Gr*), in dem zwei Carotinkriställchen \blacktriangleright sichtbar sind. $\times 46\ 000$.

FIG. 24. Flachliegendes Carotinkriställchen (*C*) mit Stufen \blacktriangledown von ungefähr $20\ \text{Å}$, die durch das Wegbrechen von Carotinschichten zustandekommen. Die das Kriställchen umgebende Membran ist z.T. weggebrochen. $\times 34\ 000$.

FIG. 25. Bedingt durch die Form des Chromoplasten ist das Carotinkriställchen (*C*) verbogen. $\times 50\ 000$.

FIG. 26. Aufgebrochener Chromoplast mit zwei freigelegten Carotinkriställchen (*C*). Jenes mit den gut sichtbaren Stufen \blacktriangledown ist gebogen. $\times 36\ 000$.



bezweifeln. Erstens werden für die verschiedenen Carotine kaum eigene örtlich getrennte Synthesysteme vorliegen. Viel eher unterscheiden sich die Mutanten durch Variationen derselben Synthesekette. Zweitens ist es seltsam, dass gerade die in dieser Arbeit in Thylakoiden beobachteten Carotinkriställchen in der Tomate auf ganz andere Weise entstehen sollten. Studiert man die Arbeiten über die Tomatenchromoplasten (15, 16), stellt man fest, dass die abgebildeten β -Carotinkriställchen vorwiegend parallel zur Schnittfläche liegen, die Lycopinkriställchen dagegen querschnitten sind. Durch das Übereinanderliegen von Kriställchen und Globuli kann eine Verbindung Kriställchen-Globuli leicht vorgetäuscht werden. In einem Schnitt von 500–800 Å Dicke ist diese Anordnung gut möglich, beträgt doch die Kriställchendicke vielfach nur etwa 200 Å. Um hier sichere Aussagen machen zu können, müsste man die Kriställchen der verschiedenen Mutanten isolieren und ihre Struktur sowie ihren Chemismus bestimmen.

Bei *Lycopersicon esculentum* L. (15, 16) wie auch bei *Narcissus poeticus* L. (Fig. 16, 19, 23) kann man innerhalb eines Chromoplasten mehrere Carotinkriställchen finden, die parallel zueinander liegen. Daraus darf man schliessen, dass die Carotinkriställchen in der Nebenkronen der Narzisse, wie auch diejenigen in der Tomatenfrucht, vorwiegend in Granumthylakoiden gebildet werden. Damit dürfte man den Synthesort des Carotins in den Grana finden, denn auch die carotinhaltigen Fibrillen der Chromoplasten der *Capsicum annum* L.-Frucht bilden sich von den Grana aus (38).

Zusammenfassend darf man sagen:

1. Bei *Lycopersicon esculentum* L. wie auch bei *Narcissus poeticus* L. werden Carotinkriställchen im Spaltraum von Thylakoiden gebildet. Ob dies hier die einzige Bildungsart ist und ob sie auch für *Daucus carota* L. zutrifft, kann man aus den vorhandenen Arbeiten nicht schliessen. Da auch im letzten Objekt Proplastiden oder Chloroplasten die Vorstufe der Chromoplasten sind, ist kaum ein anderer Weg zu erwarten.

2. Die Entstehung der Kriställchen ist auf das durch die Thylakoidmembran abgeschlossene System und die dadurch resultierende hohe Carotinkonzentration zurückzuführen. Es handelt sich um einen normalen Kristallisationsvorgang, der am letzten Tag vor dem Öffnen der Blüte beschleunigt wird, denn während diesen 24

FIG. 27. Carotinkriställchen (C) bei dem stellenweise auf beiden Seiten die Thylakoidmembran sichtbar ist. $\times 60\ 000$.

FIG. 28. Zwei quergebrogene Carotinkriställchen (C) mit freigelegtem Thylakoid (Th). $\times 90\ 000$.

FIG. 29. Chromoplast, welcher der Längsachse entlang aufgebrochen ist. Ein in einem Thylakoiden liegendes Carotinkriställchen (C) durchzieht den ganzen Chromoplasten. Neben dem Plastiden liegt ein weiteres Carotinkriställchen (C_a). Dieses hat vermutlich die Plastidenhülle durchstossen und ist so ins Zellplasma gelangt. $\times 34\ 000$.



Stunden steigt die Carotinkonzentration in der Nebenkrone der Narzisse um das Doppelte an (6).

4. Membranen und Carotinsynthese

Gegenwärtig diskutiert man sehr oft die Mitwirkung von Cytomembranen bei den verschiedenen Biosynthesen. Da die Carotinkriställchen innerhalb eines Thylakoids gebildet werden, wäre es naheliegend, die Thylakoidmembran für die Carotinsynthese verantwortlich zu machen. Auffallend ist die Umwandlung des Membransystems der Plastiden, die parallel zur Bildung der Chromoplasten und dadurch auch zur vermehrten Carotinsynthese verläuft. Bei *Daucus carota* L. beobachtet man oft myelinfigurenähnliche Membrangebilde. Diese Umwandlung ist bei *Narcissus pseudonarcissus* L. besonders ausgeprägt (25). In der vorliegenden Arbeit konnte man in den Chromoplasten von *Narcissus poeticus* L. eher eine Verminderung der Membranen feststellen. Dies spricht gegen eine Beteiligung der Thylakoidmembranen an der Carotinsynthese, denn das Objekt mit der grössten Membranzumwandlung (*Narcissus pseudonarcissus* L.) besitzt kein Carotin und nur Carotinoidmengen im normalen Ausmass. Die Nebenkrone von *Narcissus poeticus* L. hingegen ist mit etwa 150 µg β-Carotin/1 mg Trockengewicht das Gewebe mit der höchsten bekannten Carotinkonzentration (6). Viel eher sind die Membranen, wie auch die Carotinoide das Resultat einer übersteigerten Lipidsynthese, denn die Carotinoide und die Lipide der Membranen werden mit Hilfe von Acetyl-Coenzym A aufgebaut. Die Membranen sind nicht nur in ihrer Ausdehnung verändert, sondern auch in ihrer Dicke, die im Chromoplasten nur noch 40–60 Å beträgt. Die Ursache dieser Veränderung dürfte in einer von den Membranen der Chloroplasten verschiedenen Zusammensetzung liegen.

5. Plastidenontogenie

Der von Schimper (36) vorgeschlagenen reversiblen Plastidenontogenese wurde von Frey-Wyssling *et al.* (11) die monotrope gegenübergestellt. Seither ist dieses Problem mehrmals aufgerollt worden. In meristematischen Zellen wurden Chromoplasten gefunden (40), was als Beweis zur Reversibilität der Plastiden gedeutet wurde. Dem ist entgegenzuhalten, dass nicht alle Organelle innerhalb einer meristematischen Zelle die Teilungsfähigkeit besitzen müssen.

Bei Citrus-Früchten wurde versucht durch Gibberellinbehandlung die Chromoplasten in Chloroplasten zurückzuverwandeln (47). Dies war scheinbar möglich bei gelb-grünen Früchten, die nach der Behandlung wieder ergrünten. In ihren Plastiden kann man dann gut ausgebildete Grana beobachten. Das Ausgangsstadium darf man hier nicht als Chromoplasten bezeichnen, deutet doch schon die Farbe der Frucht

auf den Gehalt an Chlorophyll hin. Man nennt es besser Chloro-chromoplast, in dem immer noch Chlorophyll synthetisiert wird, aber bereits auch eine vermehrte Carotinsynthese festgestellt werden kann. Solche Stadien findet man auch in den Narzissenblüten, die kurz vor dem Aufblühen sind. Diese Stadien lassen sich sicher wieder zur gesteigerten Chlorophyllsynthese anregen, wie dies bei den Citrusfrüchten mittels Gibberellin möglich war. Eine ähnliche Beobachtung konnte an der Nebenkrone von *Narcissus poeticus* L. gemacht werden. Einen Tag, nachdem der Krönchensaum der verschiedenen Stadien für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen weggeschnitten war, begann die Nebenkrone der schmutzig-orangen Stadien an der Schnittstelle zu ergrünen. Diese Veränderung trat bei den offenen Blüten nicht ein. Man kann dies so erklären, dass durch die Verwundung eine gibberellinähnliche Verbindung synthetisiert wurde, die wie bei den Citrusfrüchten zur Chlorophyllsynthese anregte. Bei Artischockenknollen konnte nach der Verwundung eine solche Verbindung nachgewiesen werden (7). Ob dies für die Narzisse wirklich zutrifft, konnte wegen der geringen zur Verfügung stehenden Gewebemenge nicht gezeigt werden. Jedenfalls darf man annehmen, dass eine Umkehrung nur von Zwischenstadien aus möglich ist. Sonst hätten die Nebenkrone der offenen Blüten auch ergrünen müssen.

SUMMARY

Chromoplasts in the corona of *Narcissus poeticus* L. contain carotene crystals. These were isolated from the corona by density-gradient centrifugation, and their chemical nature and crystal structure were determined. No protein could be detected in the crystals. Their pure β -carotene content was demonstrated by thin-layer chromatography and absorption measurements. These results are confirmed by X-ray diffraction studies. It follows that the structure of these crystals is identical with those of synthetic *trans*- β -carotene. They belong to the monoclinic crystal system.

X-ray diffraction results of synthetic *trans*- β -carotene crystals make the layered structure, shown by freeze-etching, understandable. The flat sheets correspond to the plane (001).

Electron microscopy of both thin sections and freeze-etch replicas showed that the carotene crystals are produced in the intrathylakoidal spaces.

Die vorliegende Arbeit ist unter Leitung der Herren Professoren Dr. A. Frey-Wyssling, Vorsteher des Institutes für Allgemeine Botanik ETH, Zürich und Dr. K. Mühlethaler, Leiter des Laboratoriums für Elektronenmikroskopie entstanden. Für die Strukturuntersuchungen wurde ich von den Herren Professor Dr. J. D. Dunitz und Dr. P. Strickler vom Laboratorium für Chemische Kristallographie ETH, Zürich beraten, für die Proteinbestimmung von den Herren Professor Dr. H. Zuber und Dr. G. Roncari des Labors für Molekularbiologie ETH, Zürich, wofür ich meinen Dank aussprechen möchte.

Diese Arbeit wurde ermöglicht durch ein Stipendium aus dem Jubiläumsfond der ETH, Zürich.

LITERATUR

1. BEN-SHAUL, Y. und KLEIN, S., *Bot. Gaz.* **126**, 79 (1965).
2. BEN-SHAUL, Y., TREFFRY, T. und KLEIN, S., *J. Microsc. (Paris)* **7**, 265 (1968).
3. BEN-SHAUL, Y. und SHMUELI, U., *Electron Microsc. Proc. European Reg. Conf. 4th, Rome 1968*. Vol. II, p. 411.
4. BEN-SHAUL, Y. und NAFTALI, Y., *Protoplasma* **67**, 333 (1969).
5. BOOTH, V. H., *Biochem. J.* **65**, 660 (1957).
6. — *ibid.* **87**, 238 (1963).
7. BRADSHAW, M. J. und EDELMAN, J., *J. Exp. Bot.* **20**, 87 (1969).
8. FREY-WYSSLING, A., *An. Edafol. Agrobiol.* **26**, 25 (1967).
9. FREY-WYSSLING, A. und KREUTZER, E., *J. Ultrastruct. Res.* **1**, 397 (1958).
10. — *Planta* **51**, 104 (1958).
11. FREY-WYSSLING, A., RUCH, F. und BERGER, X., *Protoplasma* **45**, 97 (1955).
12. FREY-WYSSLING, A. und SCHWEGLER, F., *J. Ultrastruct. Res.* **13**, 543 (1965).
13. HAGER, A. und MEYER-BERTENRATH, T., *Planta* **69**, 198 (1966).
14. — *ibid.* **76**, 149 (1967).
15. HARRIS, W. M. und SPURR, A. R., *Am. J. Bot.* **56**, 369 (1969).
16. — *ibid.* **56**, 380 (1969).
17. HESS, W. M., *Stain Technol.* **41**, 27 (1966).
18. HUNTER, R. F., LOMER, T. R., VAND, V. und WILLIAMS, N. E., *J. Chem. Soc.* **1**, 710 (1948).
19. KLEIN, S. und BEN-SHAUL, Y., Final Report, Botany Dept., The Hebrew Univ., Jerusalem, 1967.
20. KUHN, H., Diplomarbeit ETH, Zürich (1967), unveröffentlicht.
21. KUHN, H., FREY-WYSSLING, A. und STRICKLER, P., *Experientia* **25**, 972 (1959).
22. LICHTENTHALER, H. K., *Ber. Deut. Bot. Ges.* **79**, 82 (1966).
23. MOLISCH, H., *Ber. Deut. Bot. Ges.* **36**, 281 (1918).
24. MOLLENHAUER, H. H., *Stain Technol.* **39**, 111 (1964).
25. MOLLENHAUER, H. H. und KOGUT, C., *J. Microsc. (Paris)* **7**, 1045 (1968).
26. MOOR, H., *Int. Rev. Exptl. Pathol.* **5**, 179 (1966).
27. — *Int. Rev. Cytol.* **25**, 391 (1969).
28. MOOR, H. und MÜHLETHALER, K., *J. Cell Biol.* **17**, 609 (1963).
29. MOOR, H., MÜHLETHALER, K., WALDNER, H. und FREY-WYSSLING, A., *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**, 1 (1961).
30. MOORE, S. und STEIN, W. H., *J. Biol. Chem.* **192**, 663 (1951).
31. — *Methods Enzymol.* **6**, 819 (1963).
32. RECK, G., Dissertation, Techn. Hochschule Carolo-Wilhelmina, Braunschweig, 1962.
33. REYNOLDS, E. S., *J. Cell Biol.* **17**, 208 (1963).
34. ROSSO, S. W., *J. Ultrastruct. Res.* **20**, 179 (1967).
35. — *ibid.* **25**, 307 (1968).
36. SCHIMPER, A. F. W., *Jahrb. Wiss. Bot.* **16**, 1 (1885).
37. SLY, W. G., *Acta Cryst.* **17**, 511 (1964).
38. SPURR, A. R. und HARRIS, W. M., *Am. J. Bot.* **55**, 1210 (1968).
39. STEFFEN, K., *Planta* **50**, 640 (1958).
40. STEFFEN, K. und RECK, G., *Planta* **60**, 627 (1964).

41. STERLING, C., *Acta Cryst.* **17**, 500 (1964).
42. — *ibid.* **17**, 1224 (1964).
43. STRAUS, W., *Helv. Chim. Acta* **25**, 705 (1942).
44. — *Exp. Cell Res.* **6**, 392 (1954).
45. — *Protoplasma* **53**, 405 (1961).
46. TAYLOR, W. H., *Z. Kristallog.* **A96**, 150 (1937).
47. THOMSON, W. W., LEWIS, L. N. und COGGINS, C. W., *Cytologia* **32**, 117 (1967).
48. TÔYAMA, S., *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku Sect.* **B12**, 31 (1965).
49. — *ibid.* **B12**, 245 (1967).
50. TREFFRY, T., BEN-SHAUL, Y. und KLEIN, S., *Electron Microscopy, Proc. Int. Congr. 6th, Kyoto 1966*. Vol. II, p. 337.

Lebenslauf

- 1938 27. Februar, geboren in Dottikon
- 1945–1950 Primarschule in Dottikon und Villmergen
- 1950–1954 Bezirksschule in Wohlen
- 1954–1957 Laborantenlehre in Aarau
- 1957–1962 Anstellung als Laborant an der Eidg. Anstalt für das forstliche Versuchswesen, Birmensdorf/ZH,
während dieser Zeit Vorbereitung auf die Eidg. Matura bei der Akademikergemeinschaft, Zürich
- 1963 Maturität Typus C
- 1963–1967 Studium an der Abteilung für Naturwissenschaften der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich
- 1967 Diplom als Naturwissenschaftler, biologischer Richtung
- 1968 Befähigungsausweis für das höhere Lehramt
- seit 1967 Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Allgemeine Botanik ETH, Zürich, durch den Jubiläumsfonds,
Ausführung der Promotionsarbeit