

Elektronenmikroskopische Beobachtungen zur Entstehungsweise der Exkretbehälter von *Ruta graveolens*, *Citrus limon* und *Poncirus trifoliata*

Von

Georg Heinrich, Hamburg

Mit 8 Abbildungen

(Eingegangen am 12. November 1969)

Einleitung

Die Fruchtknotenwand von *Ruta graveolens* weist von allen Teilen der Pflanze den höchsten Ölgehalt auf, es werden in ihr etwa dreimal mehr ätherische Öle als in den Blättern gebildet. Die ätherischen Öle machen über 3% des Trockengewichtes aus. Die beiden Methylketone Nonanon-2 und Undecanon-2 treten überwiegend auf (KUBECZKA, 1967). Nonanon-2 verdunstet bevorzugt, so daß in der reifen Frucht fast ausschließlich Undecanon-2 vorliegt. Während man über die wasserdampfflüchtigen Sekundärprodukte durch KUBECZKA (1967) gut unterrichtet ist, dilatieren die Meinungen darüber, ob die Exkretbehälter schizogen oder lysigen entstehen. Von neun Untersuchern nehmen vier eine rein lysigene, fünf eine zumindestens in den Anfängen schizogene Entwicklung an (vgl. SIECK, 1895; SPRECHER, 1956). Die *Citrus*-Behälter werden meist als rein lysigen angesehen; es fehlt aber nicht an gegenteiliger Meinung (vgl. FOHN, 1935). Eventuell bieten die im Chemismus unterschiedlichen Hauptkomponenten, bei *Citrus* und *Poncirus* Monoterpene, bei *Ruta* Phenylketone, auch einen unterschiedlichen Aspekt im Elektronenmikroskop.

Material und Methode

Etwa gleichgroße Stücke aus 5 mm großen Früchten der Zitrone, *Citrus limon* (L.) BURM. f. und aus 3—8 mm großen Früchten von *Poncirus trifoliata* (L.) RAF. wurden in 1% auf pH 7 gepuffertem OsO₄ 3 Stunden lang fixiert und in Vestopal eingebettet. Teile aus 1,5—2 mm hohen Fruchtknoten der Weinraute, *Ruta graveolens* L., bettete ich nach OsO₄-Fixierung in Epon ein. *Poncirus*-Stücke kamen bei einer Einbettung nach Vorfixierung mit 4% gepuffertem Glutaraldehyd in Epon. Den nötigen Kontrast lieferten Uranylacetat und Bleicitrat; Siemens Elmiskop I.

1. Die Exkretbehälter von *Ruta*

Junge Drüsenzellen besitzen ein dichtes, ribosomenreiches Grundplasma, Vakuolen mit osmierbaren hydrophilen Inhaltsstoffen fehlen. Die Leukoplasten enthalten zahlreiche Tubuli und sind auf Grund ihrer osmiophilen Plastoglobuli von den ebenfalls tubulären Mitochondrien auseinanderzuhalten (Abb. 1, 2). Die Tubuli der kleinen ovalen Mitochondrien zeigen meist größere Lumina als die der Plastiden, außerdem liegen sie nicht so dicht, so daß eine Unterscheidung auch an kleinen Anschnitten dann möglich ist, wenn Plastoglobuli nicht vorhanden sind. Im Zytoplasma findet man homogen grau erscheinende, meist abgerundete Lipoidtropfen, die höchstwahrscheinlich Neutralfette darstellen (Abb. 1, 2, 4). Eine zweite Sorte lipophiler Komponenten trifft man ausschließlich in der Zellwand an, selbst sehr kleine Tropfen werden bis auf eine dünne periphere Schicht weitgehend während der Einbettung extrahiert (Abb. 1, 2, 3). Diese Stoffe sind die Methylketone. Es ist erstaunlich, daß sie nur in der Zellwand anzutreffen sind. Lichtmikroskopische Prüfung OsO_4 -fixierter Karpelle vor der Einbettung läßt allerdings vermuten, daß geringe Mengen ätherischer Öle auch im Zytoplasma der Drüsenzellen liegen. Die Umrise einiger Vakuolen sehen ebenfalls so aus, als wären sie vorher mit ätherischen Ölen angefüllt gewesen. Vielleicht dringt das Fixierungsmittel rascher entlang der Zellwand als durch die Protoplasten ein und kann dadurch die dort liegenden Methylketone während der nachfolgenden Entwässerung besser erhalten als die eventuell im Zytoplasma befindlichen. Dagegen spricht allerdings, daß die Neutralfette auch im Inneren der Zelle ausreichend fixiert sind. Die Methylketone durchdringen das Plasmalemma ohne es dabei zu schädigen (Abb. 3) und gelangen in die Zellwand. Anzeichen für eine granulokrine Sekretion, also eine Beteiligung des ER oder der Dictyosomen bei der Abgabe des Öles in die Zellwand sind nicht festzustellen. Es könnte ekkrine Sekretion (SCHNEPF, 1956, 1966) vorliegen. Die interzellulären Ölsammlungen erreichen in Zellen, in denen die Innenstruktur der Organellen nicht im geringsten geschädigt ist, bereits sehr große Ausmaße. Das Auseinanderweichen der pektinreichen Zellwand erfolgt dabei nicht immer genau median, häufig sind mit Öle erfüllte Aussackungen der Zellwand nur nach einer Seite zu finden (Abb. 1, 2). Die langgestreckten peripheren Zellen, die zwischen den typischen Drüsenzellen und den stark vakuolisierten parenchymatischen Zellen der Fruchtknotenwand liegen, zeichnen sich ebenfalls durch sehr dichtes ribosomenreiches Zytoplasma aus. Außer in der Form unterscheiden sie sich von den typischen Drüsenzellen durch ihre Plastiden, die neben den Tubuli auch Thylakoide, die Grana bilden können, besitzen. Diese Zellen enthalten etwa gleich viele Lipoidtropfen wie die Drüsenzellen. Die parenchymatischen Zellen weisen wesentlich

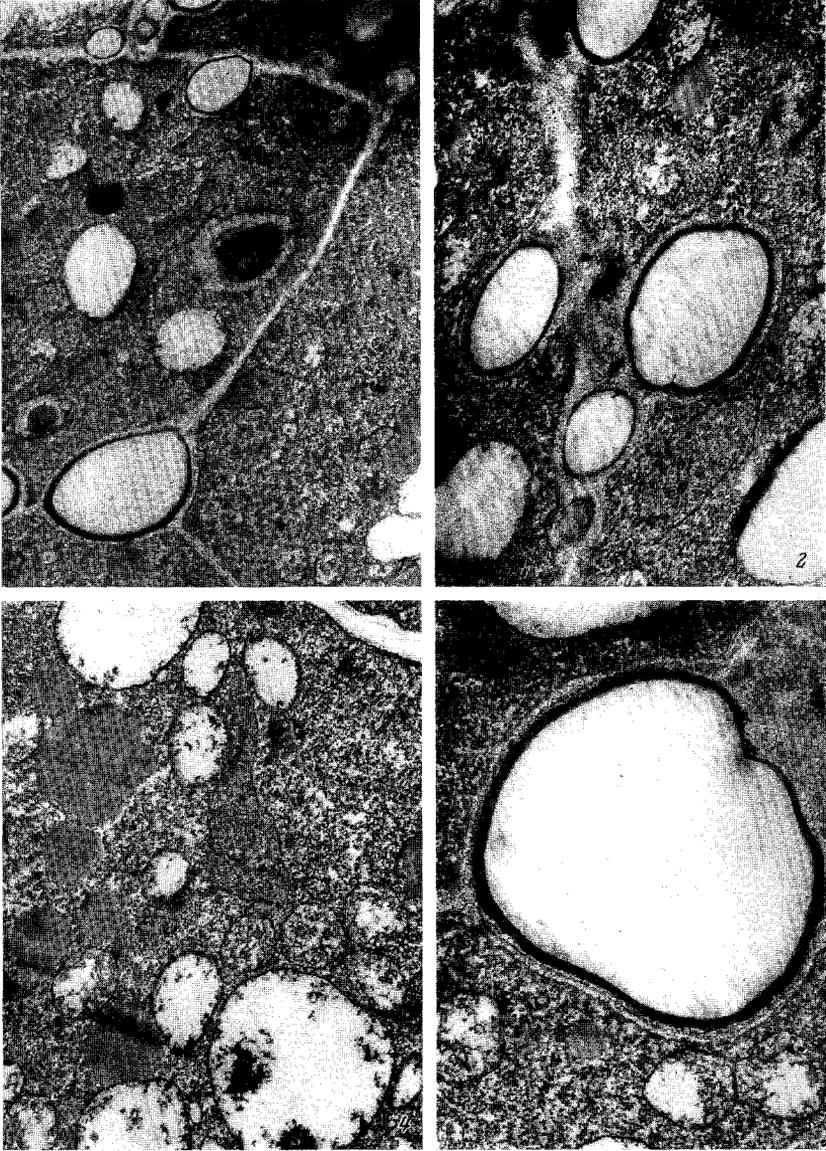


Abb. 1—4. *Ruta graveolens*, Ausschnitte aus jungen Drüsenzellen, OsO_4 , Epon. 1 Die Methylketone befinden sich in der Zellwand, im dichten ribosomenreichen Grundplasma fallen tubuläre Plastiden auf; $6000\times$, auf 9300 nachvergr. 2 Aussackungen der Zellwand sind mit ätherischem Öl angefüllt, im Grundplasma liegen Fett-Tropfen; $12000\times$, auf 17800 nachvergr. 3 Das Plasmalemma wird von den durchtretenden Methylketonen, die bis auf den durchfixierten Rand während der Entwässerung extrahiert werden, nicht zerstört; $20000\times$, auf 21200 nachvergr. 4 Im Grundplasma befinden sich zahlreiche gleichmäßig kontrastierete lipophile Tropfen, es handelt sich wahrscheinlich um Neutralfette; $12000\times$, auf 12500 nachvergr.

weniger Lipidtropfen auf. In einem späteren Stadium sind die randlichen Zellen ebenfalls zur Bildung von Methylketonen befähigt.

Über eine Beteiligung der Organellen an der Erzeugung der Methylketone kann nichts ausgesagt werden, schon deshalb nicht, weil im Inneren der Zelle keine ätherischen Öle zu beobachten sind. Das ER ist bei *Ruta*, verglichen mit dem der Exkretbehälter von *Citrus* und *Poncirus*, schwach entwickelt, verglichen mit dem aus den Zellen der Öldrüsenhaare von *Arctium lappa* (SCHNEPF, 1969) oder mit dem aus den sitzenden Drüsen der Blätter von *Monarda fistulosa* (HEINRICH, unveröffentlicht) außerordentlich schwach. Die Zisternen des tubulär ausgebildeten ER besitzen geringere Durchmesser als die Tubuli der Mitochondrien. Dictyosomen sind bei *Ruta* sehr selten, sie bleiben klein und sind nur in jungen Zellen anzutreffen. Die Drüsenzellen enthalten mehr Mitochondrien als die umgebenden parenchymatischen Zellen, es kommen etwa gleich viel wie in den noch nicht stark vakuolisierten Drüsenzellen von *Poncirus* vor. Die Leukoplasten der Drüsenzellen enthalten Tubuli, ähnlich wie die Leukoplasten aus den Drüsenzellen von *Poncirus*. Anzeichen dafür, daß in ihnen die Methylketone gebildet werden, gibt es nicht.

2. Die Exkretbehälter von *Citrus* und *Poncirus*

Sie weisen nur selten Tropfen ätherischen Öles in der Zellwand auf, diese sind meist klein, eine Auftreibung der Zellwand und Spaltung im Bereich der Mittellamelle kommt selten vor. Die meisten bisher angefertigten Aufnahmen zeigen bei *Citrus* und *Poncirus* keine schizogenen Vorgänge. Zum Unterschied zu *Ruta* bleibt ein Großteil des ätherischen Öles solange in der Plastide gespeichert (Abb. 5, 6), bis die Zelle zugrunde geht. Die Plastiden sehr junger Drüsenzellen von *Poncirus* enthalten etwa 60% aller lipophiler Komponenten, die nicht in membrangebundener Form in der Zelle anzutreffen sind. Es handelt sich dabei zum größten Teil um ätherische Öle, wie durch Gefriertrocknung bewiesen werden konnte. Gefriertrocknung eignet sich, um flüchtige von nichtflüchtigen Substanzen in elektronenoptischen Aufnahmen unterscheiden zu können (HEINRICH, in Druck). In etwas älteren Drüsenzellen, in denen die Plastiden durch zahlreiche stark verzweigte und gekrümmt verlaufende Tubuli auffallen, steigt die Menge der ätherischen Öle weiterhin bis auf etwa 80% an. Einen Ausschnitt aus einer derartigen Zelle demonstriert Abb. 6. Auch in alten Drüsenzellen füllen große Mengen lipophiler Substanzen die Plastiden fast vollständig an, allerdings überwiegt in vielen Zellen dann der Anteil im Grundplasma.

Einige Male wurden *Poncirus*-Drüsenzellen angeschnitten, die ähnlich wie die von *Ruta* ebenfalls größere Ölsammlungen in der Zellwand aufweisen (Abb. 7). Manchmal erfolgt die Anlage des Exkrettraumes

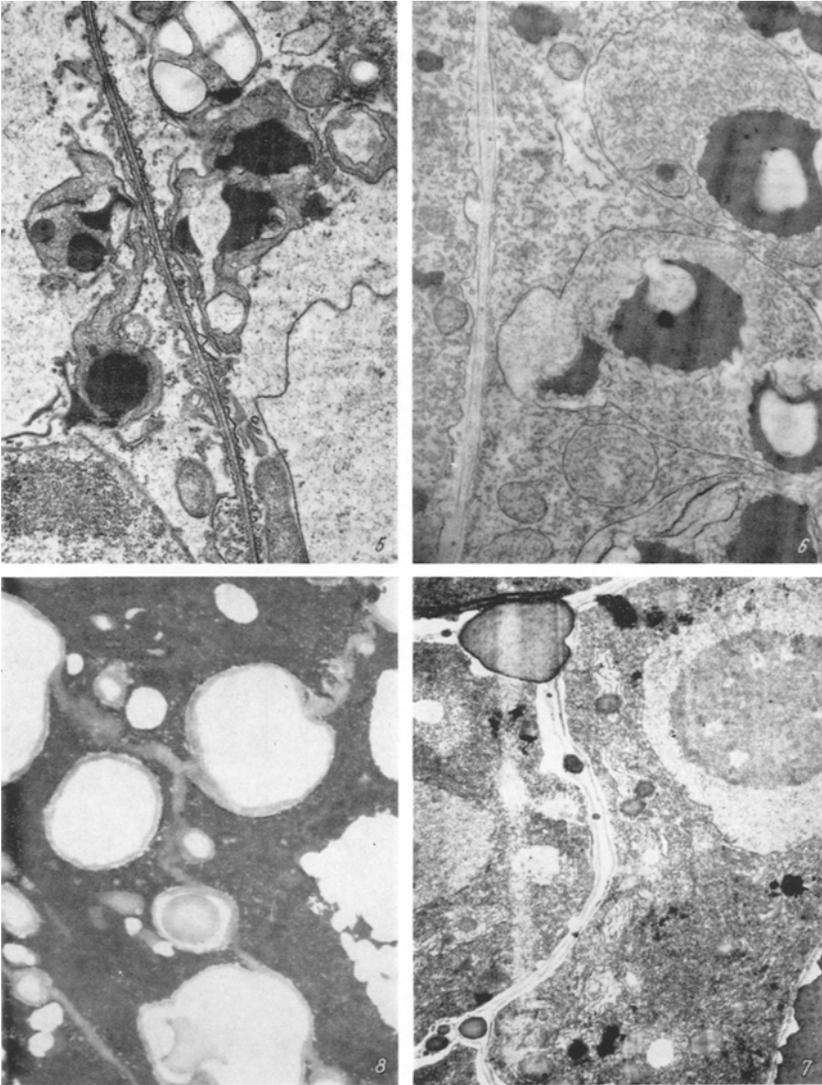


Abb. 5—8. 5 *Citrus limon*, Drüsenzellen aus Exkretbehälter, OsO_4 , Vestopal, die ätherischen Öle liegen in den Plastiden, in denen sie wahrscheinlich auch gebildet werden; $6000\times$, auf 9500 nachvergr. 6—8 Drüsenzellen von *Poncirus trifoliata*, 6 OsO_4 , Vestopal, in diesem Stadium sind die ätherischen Öle zu etwa 80% in den durch zahlreiche Tubuli charakterisierten Plastiden akkumuliert, der Rest liegt im Grundplasma; $7500\times$, auf 9500 nachvergr. 7 Selten sind die ätherischen Öle bei *Poncirus* auch in der Zellwand anzutreffen; Glutaraldehyd, OsO_4 , Epon, $4000\times$, auf 4800 nachvergr. 8 Stückchen aus der Schale junger *Poncirus*-Früchte lagen in d-Limonen, das ätherische Öl wird bevorzugt in die Zellwand eingelagert, es entsteht ein mit *Ruta* vergleichbares Bild; Glutaraldehyd, 105 Minuten d-Limonen, OsO_4 , Epon, $5000\times$, auf 5000 nachvergr.

zwischen den mittleren Drüsenzellen ebenfalls schizogen. Das seltene Auftreten schizogener Vorgänge neben überwiegend lysigenen bei *Poncirus*, das eventuell auch für die Zitrone zutrifft, könnte die divergierenden Ansichten der verschiedenen Autoren erklären.

3. Experimentelle Änderung der lysigenen Entstehungsweise der Exkretbehälter von *Poncirus* in eine überwiegend schizogene

Stücke aus einer 5 mm langen, mit gepuffertem Glutaraldehyd vorfixierten *Poncirus*-Frucht wurden 105 Minuten in d-Limonen, die Hauptkomponente des *Poncirus*-Öls, eingelegt. Schnitte durch den Drüsenkomplex zeigen, daß ein großer Teil des ätherischen Öles in die Zellwand eingelagert ist. Diese wird dabei median, ähnlich wie bei *Ruta*, bevorzugt dort, wo die Zellwände benachbarter Zellen aufeinander stoßen, aufgespalten (Abb. 8). Das spricht dafür, daß ein schizogenes Auseinanderweichen der Zellwände auch bei *Poncirus* auf weite Strecken hin stattfinden könnte. Bei den typisch schizogenen Drüsenkomplexen muß nicht eine höhere Pektinaseaktivität für das Aufspalten entlang der Mittellamelle angenommen werden, die ätherischen Öle verursachen das selbst. Wahrscheinlich ist der Exkretbehälter von *Ruta* deshalb schizogen, weil die ätherischen Öle nicht wie bei *Poncirus* in den meisten Drüsenzellen zum größten Teil im Zellinneren zurückgehalten werden, sondern die Zelle verlassen.

Man könnte es als Vorteil für die Zelle ansehen, daß ihre Stoffwechselprodukte nicht im Zytoplasma und in den Organellen liegen bleiben. *Poncirus* kann aber eine mit *Ruta* vergleichbar große Menge an ätherischen Ölen produzieren, ohne daß die Drüsenzelle vergiftet wird. Diese Öle sind in den Plastiden, die wahrscheinlich auch die Produktionsorte des ätherischen Öles sind, gespeichert.

Von außen herangebrachte ätherische Öle zerstören im Gegensatz zu den genuinen Ölen der lebenden *Poncirus*-Drüsenzelle die Organellen der Drüsenzellen und dringen in die Mitochondrien ein, die sonst immer ölfrei sind. Die Organellen der Drüsenzellen zeigen eine etwas höhere Resistenz gegen von außen herangebrachte Öle als die der benachbarten parenchymatischen Zellen. Trotzdem müßten sie durch die große Ölmenge, die im Laufe der Exkretbereitung anfällt, früher zerstört werden, als das der Fall ist. Es ist eine offene Frage, wodurch die Öltröpfchen daran gehindert werden, in der lebenden Zelle in die Mitochondrien einzudringen und weshalb das Plasmalemma durchwandert werden kann, ohne dabei zerstört zu werden.

Je nach Alter der Drüsenzelle und damit geänderter Ölmenge und prozentuellem Anteil der einzelnen Komponenten des ätherischen Öls zueinander und je nach der Art der Fixierung sehen die ätherischen Öle im e-optischen Bild verschieden aus. Vorfixierung mit Glutaraldehyd

erleichtert das Eindringen von OsO_4 und bringt eine bessere Erhaltung der ätherischen Öle mit sich, eine Verlagerung derselben findet dabei nicht statt. Die Methylketone von *Ruta* werden aus etwa gleichgroßen Stücken bei vergleichbarer Einbettung mehr herausgelöst als die Monoterpene von *Poncirus* und *Citrus*.

Zusammenfassung

Die schizogenen Exkretbehälter aus der Fruchtknotenwand von *Ruta graveolens* wurden elektronenoptisch untersucht und mit den überwiegend lysigenen Drüsenkomplexen von *Citrus limon* und *Poncirus trifoliata* verglichen. Diese Ölbehälter entstehen wahrscheinlich deshalb meist lysigen, weil die Monoterpene von *Poncirus* und *Citrus* im Gegensatz zu den Methylketonen von *Ruta* zum größten Teil im Innern der Zelle in den Plastiden gespeichert werden. Einlegen der *Poncirus*-Schale in Monoterpene bringt das Bild einer überwiegend schizogenen Drüse mit sich.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für finanzielle Unterstützung.

Literaturverzeichnis

- AMELUNXEN, F. (1965): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Drüenschuppen von *Mentha piperita* L. *Planta med.* **13**, 457—473.
- FOHN, M. (1935): Zur Entstehung und Weiterbildung der Exkreträume von *Citrus medica* L. und *Eucalyptus globulus* LAB. *Österr. Bot. Z.* **84**, 198—209.
- HEINRICH, G. (1966): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Genese der Exkrete in den lysigenen Exkreträumen von *Citrus medica*. *Flora*, Abt. A, **156**, 451—456.
- (1970): Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Drüsenzellen von *Poncirus trifoliata*. *Protoplasma* **69**, 15—36.
- KUBEZKA, K. H. (1967): Vergleichende Untersuchungen zur Biogenese flüchtiger Produkte des Sekundärstoffwechsels. I. Untersuchungen an *Ruta graveolens* L. *Flora*, Abt. A, **158**, 519—544.
- SCHNEPF, E. (1965): Morphologie der Duftölausscheidung bei *Typhonium divaricatum* (Araceae). *Planta (Berl.)* **66**, 374—376.
- (1966): Die Morphologie der Sekretion in pflanzlichen Drüsen. *Ber. dtsch. Bot. Ges.* **78**, 478—483.
- (1969): Über den Feinbau von Öldrüsen. I. Die Drüsenhaare von *Arctium lappa*. *Protoplasma* **67**, 185—194.
- SIECK, W. (1895): Die schizolysigenen Secretbehälter. *Jb. wiss. Bot.* **27**, 197—242.
- SPRECHER, E. (1956): Beiträge zur Frage der Biogenese sekundärer Pflanzenstoffe der Weinraute (*Ruta graveolens* L.). *Planta* **47**, 323—358.

Anschrift: Dr. GEORG HEINRICH, Institut für Allgemeine Botanik,
D-2000 Hamburg 36, Jungiusstraße 6