Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 64 (1954)

Artikel: Aktivität und Lokalisation von saurer Phosphatase in den vegetativen Teilen einiger Angiospermen und in einigen Samen

Autor: Frey, Gustav

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-45161

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.10.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Aktivität und Lokalisation von saurer Phosphatase in den vegetativen Teilen einiger Angiospermen und in einigen Samen

Von *Gustav Frey*

(Aus dem Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich)

Eingegangen am 29. Juni 1954

Seite

Vorwort 392
Einleitung 392
Ziel der Untersuchung 392

Teil A. Bestimmung der Wirkungseigenschaften und Lokalisation der sauren Phosphatase 393
I. Methoden 393
1. Histochemische Lokalisation 393
a) Testreaktion 393
b) Kontrollen 394
c) Substratbereitung 396
d) Herstellung der Schnitte 396
e) Präparate 397
f) Festhaltung der Versuchsergebnisse 397
2. Vorversuche zur histochemischen Methode 397
a) Diffusionserscheinungen 397
b) Adsorptionserscheinungen 398
c) Permeabilitätsprobleme 399
3. Quantitative Bestimmung der Phosphatase-Aktivität 401
II. Versuche über aktivitätsbestimmende Faktoren 403
1. *p*H-Abhängigkeit 403
2. Temperatur-Abhängigkeit 404
3. Wirkung von F^- 404
4. Wirkung von Mg^{+2} 405
5. Abhängigkeit vom Quellungszustand 405
6. Jahreszeitliche Abhängigkeit 405
7. Altersabhängigkeit 406
III. Lokalisation der Aktivität saurer Phosphatase in den vegetativen Organen einiger Angiospermen 406
1. Lokalisation in der Blattspreite 406
a) Leitbündel 407
b) Palisaden- und Schwammparenchym 408
c) Chloroplasten 408
d) Anthocyanhaltige Zellen 409
e) Stomata 409
2. Lokalisation in Blattstiel und Sproßachse 410
a) Leitgewebe 411
b) Kambium 414

Seite

c) Markstrahlen 414
d) Stärkescheide 415
e) Subepidermale Chlorenchymschichten 416
f) Sekretgangscheide 416
g) Festigungsgewebe 416
h) Junge Knollen von *Solanum tuberosum* 417
3. Lokalisation in der Wurzel 417
4. Aktivitätsvergleich Blatt/Stengel und Wurzel 417
IV. Lokalisation in keimenden Samen 417
1. *Zea Mays* 418
a) Zwei Tage gekeimte Samen 418
b) Vergleich verschiedener Keimungsstadien 421
c) Quantitative Bestimmung der Phosphatase-Aktivität 422
2. *Triticum vulgare* 423
3. *Phoenix dactylifera* 424
a) Phosphatase-Aktivität im Samen mit 24 mm langem Keimling . . . 424
b) Vergleich verschiedener Keimungsstadien 425
4. *Allium Cepa* 426
a) Ein Tag gequollener Samen 426
b) Vergleich verschiedener Keimungsstadien 426
5. *Ricinus communis* 428
a) Samen mit Keimlingen von 18 mm Hypokotyllänge 429
b) Vergleich verschiedener Keimungsstadien 429
6. *Pisum sativum* 430
a) Zwei Tage gekeimter Samen 430
b) Vergleich verschiedener Keimungsstadien 431
V. Meristematische Gewebe in Keimlingen und ausgewachsenen Pflanzen . . 431
VI. Universelle Lokalisation 432
VII. Intrazelluläre Lokalisation, Polarisation 432
VIII. Glukose-1-phosphat und Fruktose-6-phosphat als Substrat 432

Teil B. Physiologische Bedeutung der Aktivität saurer Phosphatase 433
I. Spezifität der Phosphatasen 433
II. Hydrolytische, synthetische und Phosphokinase-Wirkung saurer Phosphatasen 434
III. Beziehung der Phosphatase-Lokalisation zum Stärkevorkommen 435
IV. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität in der Photosynthese und deren unmittelbaren Folgeprodukten 438
V. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität in Chloroplasten-Frühstadien . . 439
VI. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität in der Mobilisation von Reservezellulose 439
VII. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität in der Fettresorption 440
VIII. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität im Eiweiß-Stoffwechsel 440
IX. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität im Abbau von Phospholipoiden . . 441
X. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität im Abbau von Phytin 441
XI. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität im Stofftransport 442
XII. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität in der Anthozyan-Synthese . . . 444
XIII. Das universelle Vorkommen der Phosphatase-Aktivität 444
XIV. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität bei Synthese- und Phosphokinase-Wirkung 445
Zusammenfassung 446
Literaturverzeichnis 448

Vorwort

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Wanner ausgeführt. Ich möchte ihm für das Interesse, das er meiner Arbeit stets entgegengebracht hat, besonders danken. Zu Dank verpflichtet bin ich ferner auch Herrn K. Frank (früherer Assistent am Institut) für die Einführung in die Technik der Mikrophotographie und die Vermittlung vieler praktischer Handgriffe, ebenso Herrn Dr. A. Bruhin (Assistent am Institut) für Anleitung im Photographieren und eine erste Einführung in die Methode der Phosphatase-Lokalisation.

Einleitung

Die Enzymologie hat sich in den beiden letzten Dezennien zu einem umfangreichen Forschungsgebiet entwickelt, wobei Beiträge von chemischer, medizinischer und biologischer Seite sich ergänzen. Während die chemische Forschung darauf gerichtet ist, die Eigenschaften der Fermente *in vitro* zu ergründen, interessieren sich die Physiologen dafür, wo diese Dirigenten des Stoffwechsels in den lebenden Organen vorkommen, welche der *in vitro* festgestellten Reaktionsmöglichkeiten *in vivo* realisiert sind und welche weitere Bedeutung ihnen im großen Zusammenhang der Lebensvorgänge zukommt. In den letzten Jahren ist erkannt worden, daß der Phosphorsäure im Stoffwechsel eine Schlüsselstellung zukommt, indem durch Bildung hoch energiereicher Phosphate, durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen zahlreiche Stoffumwandlungen vermittelt werden. Nicht nur im Kohlehydrat-Stoffwechsel, sondern auch im Auf- und Abbau von Lipoiden, Proteinen, Vitaminen und Koenzymen spielt Phosphorsäure eine Rolle. Die betreffenden chemischen Reaktionen werden dabei durch Transphosphatasen, Phosphorylasen und Phosphatasen katalysiert. Die Phosphatasen stehen einerseits am Schluß der Reaktionsketten, indem sie die Phosphorsäure aus den Estern freisetzen, und zugleich am Anfang, indem sie dadurch Phosphorsäure für neue Aufbaureaktionen zur Verfügung stellen. Von den zahlreichen Phosphatasen wurden in der vorliegenden Arbeit diejenigen verfolgt, welche in saurem Milieu Glyzerophosphat spalten.

Ziel der Untersuchung

Über die sog. saure Phosphatase sind schon von zahlreichen Forschern Untersuchungen *in vitro* durchgeführt worden, es liegen aber noch verhältnismäßig wenig Arbeiten, in welchen histochemische Methoden zur Anwendung kamen, vor. Diese Methoden sind wohl für die alkalische Phosphatase in tierischen Geweben schon sehr häufig ver-

wendet worden, in bezug auf die saure Phosphatase in Pflanzen hingegen sind erst wenige Lokalisationen durchgeführt worden (vor allem Yin [1945], Glick und Fischer [1945], [1946] und Kugler et al. [1947]). Das Ziel der Untersuchung bestand darin, nochmals gründlich zu kontrollieren, *wo* das Ferment lokalisiert ist in den vegetativen Organen von einigen Angiospermen und außerdem in einigen Samen, welche typische Vertreter bestimmter Reservestoffe darstellen, und dabei zu prüfen, ob auf Grund von gewebespezifischen Lokalisationen und dem Auftreten der Aktivität in bestimmten physiologischen Zuständen auf eine Beziehung zum Kohlehydrat-Stoffwechsel, insbesondere Aufbau und Abbau der Stärke, ferner auch zum Kohlehydrat-*Transport* geschlossen werden könne. Außerdem interessiert es, ob die Phosphatase-Aktivität in Beziehung steht zu den Umwandlungen anderer Stoffgruppen und weiteren physiologischen Vorgängen.

TEIL A

Bestimmung der Wirkungseigenschaften und Lokalisation der sauren Phosphatase

I. Methoden

1. Histochemische Lokalisation

a) Testreaktion

In den meisten Untersuchungen wurde die von Glick und Fischer (1949) für pflanzliche Gewebe entwickelte Methode von Gomori (1939) in vereinfachter Form angewendet. Die Säurephosphatase wird dabei durch ihre Hydrolysewirkung auf Na-α-Glyzerophosphat nachgewiesen. Von den beiden Spaltprodukten läßt sich die Phosphorsäure leichter nachweisen. Sie wird mit Bleinitrat gefällt als weißes Bleiphosphat und dieses übergeführt in das braun-schwarze Bleisulfid durch Ammonsulfid. Je nach der Menge von gebildetem Niederschlag erscheinen die Zellen bzw. einzelne Partikel in den Zellen, welche das Ferment enthalten, gelbbraun bis braun-schwarz. Die Schwärzungstiefe ist so zugleich ein Maß für die Aktivität des Enzyms. Die chemischen Reaktionen werden in folgenden Einzelschritten mit Gewebeschnitten durchgeführt:

1. Schnitte waschen in destilliertem Wasser.
2. Inkubation der Schnitte in Substratgemisch, 15 Min. bei 38° im Thermostat.
3. Dreimal waschen in destilliertem Wasser.
4. 2 Min. in 2-%-Essigsäure.

5. Dreimal waschen mit destilliertem Wasser.
6. 5 Min. Ammonsulfidlösung.
7. Einmal waschen mit destilliertem Wasser.

Die Gesamtheit dieser sieben Schritte wird im weiteren Text der Kürze halber als Testreaktion bezeichnet.

Das Substratgemisch setzt sich folgendermaßen zusammen:

Na-α-Glyzerophosphat	3,2 %	0,4 ml	
Bleinitrat	0,1 m	1 ml	
Azetatpuffer	0,1 m	4 ml	($NaCH_3COO/CH_3COOH$-Gemisch, $pH = 5{,}1$)
Destilliertes Wasser		0,6 ml	

Durch den Azetatpuffer wird, wie weiter unten noch gezeigt wird, das pH-Optimum für die Enzymwirkung aufrechterhalten.

Die sieben Schritte in der Testreaktion haben folgende Bedeutung:

Schritt 1: Beim Schneiden können leicht bewegliche Zellinhalte von einzelnen Zellen in andere verschleppt werden und so unter Umständen falsche Lokalisationen des Enzyms vortäuschen. Diese leicht beweglichen Bestandteile werden ausgewaschen.

Schritt 2: Enzymwirkung, Hydrolyse des Na-α-Glyzerophosphates, Fällung der freigesetzten PO_4^{-3}-Ionen durch die Pb^{+2}-Ionen als $Pb_3(PO_4)_2$ am Reaktionsort.

Schritt 3: Auswaschen des Bleiphosphat-Niederschlages aus *angeschnittenen* Zellen, Entfernung des Glyzerophosphates und damit Unterbindung der weiteren Enzymwirkung, Herauswaschen der überschüssigen, in der Fällungsreaktion nicht gebundenen Bleiionen aus den intakten Zellen. Diese Bleiionen würden mit dem später folgenden Ammonsulfid einen Niederschlag ergeben, der auch in Zellen, wo das Enzym nicht vorkommt, eine Phosphatase-Aktivität vortäuschen würde.

Schritt 4: Die Essigsäure löst das Bleiphosphat nicht, wohl aber andere Bleisalze, welche während der Inkubation gefällt worden sind und beim späteren Umsatz mit dem Ammonsulfid wiederum eine nicht vorhandene Phosphatase-Aktivität vortäuschen würden.

Schritt 5: Herauswaschen der durch die Essigsäure freigesetzten Bleiionen, Entfernen der Essigsäure.

Schritt 6: Ammonsulfid fällt den weißen Bleiphosphat-Niederschlag in den schwarzen Bleisulfid-Niederschlag um:

$$3(NH_4)_2S + Pb_3(PO_4)_2 \gtrless 3PbS + 2(NH_4)_3(PO_4)$$

Schritt 7: Entfernung des überschüssigen Ammonsulfides.

b) Kontrollen

Es wurden immer fünf Parallelversuche durchgeführt:

1. Schnitte inkubiert im Substratgemisch (= Testreaktion)
   a) Frischschnitte
   b) mit Narkotika vorbehandelte Schnitte
   (Begründung siehe 2 *c*).
2. Eigentliche Kontrollreaktion: Der in der Testreaktion entstehende Niederschlag von $Pb_3(PO_4)_2$ kann außer durch während der Enzymreaktion freigesetztes Phosphat auch durch schon im voraus in den Geweben vorhandene freie Phosphorsäure gebildet worden sein. Um nur die durch die Phosphatase freigesetzte Phosphorsäure zu erfassen, muß das im voraus vorhandene Phosphat in Abzug gebracht werden. Dies geschieht am besten so, daß eine Anzahl von Schnitten in Kontrollgemisch inkubiert wird, welches kein Glyzerophosphat, sondern nur Bleinitrat + Puffer enthält. Die Reaktionsfolge wird im übrigen in den gleichen sieben Schritten durchgeführt wie die Testreaktion. Schnitte aus der Kontrollreaktion werden verglichen mit solchen aus der Testreaktion. Die Differenz in der Schwärzungstiefe entsprechender Zellen gibt so das Maß der Phosphatase-Aktivität an: schwacher Färbungsunterschied bedeutet geringe, starker Färbungsunterschied hohe Phosphatase-Aktivität. Genau betrachtet kann auch während der Kontrollreaktion durch die Fermentwirkung aus pflanzeneigenen Phosphorsäureestern Phosphat abgespalten werden. Diese Enzymwirkung kann aber durch Erhitzen der Schnitte vor der Inkubation (auf 70°) oder durch Inkubation bei 0° ausgeschaltet werden. Ein Vergleich zwischen so durchgeführten Kontrollen und solchen, welche auf 38° inkubiert worden waren, zeigt aber keinen Unterschied. Die Inkubationsdauer von 15 Minuten ist dafür zu kurz.
   Das gesamte in der Kontrollreaktion erfaßte Phosphat wird künftig als Kontrollphosphat bezeichnet.
   Soll der tatsächliche Gehalt eines Gewebes an freiem, anorganischem Phosphat bestimmt werden, so müssen noch weitere Präzisierungen vorgenommen werden.
3. Das Ammonsulfid (Schritt 6 in der Reaktionsfolge) kann auch im voraus vorhandene Schwermetallionen fällen. Solche Schwermetallionen können festgestellt werden durch Behandlung von Frischschnitten mit Ammonsulfid allein. Bei sämtlichen Versuchen zeigten sich aber praktisch keine Schwermetalle.
4. Es müssen auch Schnitte ohne jeglichen Chemikalienzusatz durchmustert werden, um natürliche Färbungen erkennen zu können. So weist zum Beispiel die Aleuronschicht in den Maiskörnern eine braune Färbung auf, welche man ohne diese Kontrolle als anorganisches Phosphat interpretieren würde. Dieser Fehler

ist offenbar Glick und Fischer unterlaufen (1946). Die wenigsten Gewebe weisen aber solche braune oder schwarze Färbungen auf, so daß sich auch das anorganische Phosphat leicht durch den optischen Eindruck im Mikroskop bestimmen läßt.
Am selben Schnitt zuerst die Kontroll- (2) und darauf die Testreaktion (1) durchzuführen ist nicht vorteilhaft, da durch die Kontrollreaktion die Enzymaktivität vermindert wird.
Die Verwendung eines Okularphotometers für die Ermittlung der Differenz zwischen 1 und 2 ist nicht geeignet, weil dieses nur den Helligkeitsunterschied messen kann, während das Auge eine viel feinere Unterscheidungsmöglichkeit gestattet, indem es auch Unterschiede in der Farbqualität wahrnimmt. Für die qualitative Phosphatase-Lokalisation genügt der optische Eindruck im Mikroskop zweifellos, er ist jedoch nur ein annäherndes Maß bei der quantitativen Bestimmung (vgl. 3).

c) Substratbereitung

Beim Mischen der Substanzen für das Substratgemisch fällt Bleiphosphat als gallertiger, weißer Niederschlag aus. Die zur Verfügung stehenden Glyzerophosphat-Präparate enthalten stets etwas freies Phosphat. Dieses PO_4^{-3} wird bei der Zugabe von Bleinitrat natürlich gefällt. Genau genommen bleibt immer noch eine geringe Konzentration von Phosphat, nämlich diejenige, welche zusammen mit dem vorhandenen Pb^{+2} gerade unterhalb des Wertes des Löslichkeitsproduktes $(Pb^{+2}) \times (PO_4^{-3})$ bleibt. Durch eine minimale Menge von zusätzlichem (durch die Enzymtätigkeit freigesetztem) PO_4^{-3} wird dieses Löslichkeitsprodukt überschritten und eine Fällung erzeugt. Dadurch kommt ein äußerst empfindlicher Test auf die Enzymaktivität zustande. Eine *Eigenhydrolyse* des Glyzerophosphates in wässeriger Lösung tritt nur langsam ein. Sofern das Substratgemisch während 15 Minuten auf 38° erwärmt und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert oder abfiltriert wird, läßt sich das klare Filtrat mehrere Tage im Kühlschrank aufbewahren, ohne daß eine weitere Fällung eintritt. Auch beim Erwärmen auf 38° tritt auf alle Fälle während der ersten Stunde keine Eigenhydrolyse in Erscheinung. Bei Serienuntersuchungen braucht also das Substrat nicht jedesmal frisch bereitet zu werden.

d) Herstellung der Schnitte

Die pflanzlichen Organe wurden je nach Härte und Größe mit dem Rasiermesser von Hand, mit dem Schlittenmikrotom oder mit dem Gefriermikrotom geschnitten. Besonders für die Samen war das Gefriermikrotom gut geeignet. Von Sproßachsen und Blättern wurden sehr gute Schnitte erzielt mit dem Schlittenmikrotom, wobei auf die Unter-

seite des Mikrotommessers mit Paraffin eine Rasierklinge angeklebt wurde.

e) Präparate

Die Anleitung von Glick und Fischer sieht die Herstellung von Dauerpräparaten vor. Beim Einbetten werden die Objekte auf mindestens 50°, bei Verwendung gewöhnlicher Paraffine sogar auf über 60° erhitzt. Dadurch wird aber, wie weiter unten noch nachgewiesen wird (II., 2), die Enzymaktivität stark gehemmt. Orte mit geringer Fermentwirkung treten überhaupt nicht in Erscheinung (auch festgestellt von Goetsch et al. [1951]). Es wurde deshalb auf das Einbetten in Paraffin zum Schneiden verzichtet. Nach Durchführung der Test- bzw. Kontrollreaktion wurden die Schnitte auf Objektträger in Glyzerin eingelegt. Solche Präparate bleiben monatelang unverändert.

f) Festhaltung der Versuchsergebnisse

Die Ergebnisse wurden zum großen Teil in Mikrophotographien festgehalten, von denen hier nur eine kleine Auswahl geboten werden kann. In vielen Fällen werden die Resultate besser durch Skizzen wiedergegeben, da die Schwarzweißphoto auch vom Bleisulfid nicht beschlagene Zellstrukturen als grau festhält. Ebenfalls kommen Nuancen in der Farbqualität des Testniederschlages (gelbbraun bis braunschwarz), welche ein besseres Maß für die Fermentaktivität sind als der Helligkeitswert, in der Schwarzweißphoto nicht zum Ausdruck. Es muß deshalb in erster Linie auf die Beschreibung abgestellt werden.

2. Vorversuche zur histochemischen Methode

a) Diffusionserscheinungen

Von mehreren Forschern, welche mit der Methode von Gomori (= Methode von Takamatsu) in tierischen Geweben die alkalische Phosphatase lokalisierten, wurde darauf hingewiesen, daß das in diesem Test entstehende Ca-Phosphat bei längerer Inkubationsdauer intrazellulär und interzellulär diffundiert (Danielli [1950], Jacoby und Martin [1949 *a, b*], Feigin et al. [1950], Novikov [1951] und Moe [1951]). Nobak et al. (1951) hatten auch für Bleiphosphat eine interzelluläre Diffusion nachgewiesen. Yokoyama et al. (1951) sowie Danielli (1953 *b*) zeigten ferner für die alkalische Phosphatase in tierischen Geweben, daß das Ferment selbst intrazellulär und interzellulär zu diffundieren vermag. Ergeben sich dieselben Erscheinungen bei der sauren Phosphatase in Pflanzengeweben?

Nach Durchführung der Testreaktion kann im Mikroskop gelegentlich beobachtet werden, wie feinste Partikelchen des PbS-Niederschlages durch die Brownsche Bewegung intrazellulär verschleppt werden. Die

intrazelluläre Lokalisation auch der sauren Phosphatase ist also äußerst vorsichtig zu interpretieren.

Eine interzelluläre Diffusion konnte bei den gewählten kurzen Inkubationszeiten von 15 Minuten und 30 Minuten nicht festgestellt werden. Es wird weiter unten noch gezeigt, daß die saure Phosphatase in älteren Maissproßachsen hauptsächlich in den Siebröhren und Geleitzellen lokalisiert ist. In Längsschnitten konnte in den zu den Siebröhren benachbarten Trachealelementen nicht mehr PbS festgestellt werden als in der Kontrolle. Es ist aber möglich, daß bei langen Inkubationszeiten (mehrere Stunden) in gewissen Geweben das Bleiphosphat doch durch die Zellmembranen zu diffundieren vermag (z. B. Sekretgang-Scheidezellen, III., 2 *f*).

b) Adsorptionserscheinungen

An der Bildung des Testniederschlages sind in der Folge der sieben Einzelschritte folgende Ionen direkt beteiligt: PO_4^{-3}, Pb^{+2} und S^{-2}. Wenn PO_4^{-3}- oder Pb^{+2}-Ionen oder die Molekeln $Pb_3(PO_4)_2$ und PbS von einzelnen Zellstrukturen besonders gut adsorbiert werden, kann eine falsche intrazelluläre Lokalisation vorgetäuscht werden. Ob solche Adsorptionen auftreten, wurde folgendermaßen entschieden:

Schnitte von ausgewachsenen Maisblättern, welche während 2 Stunden in mehrfach erneuertem destilliertem Wasser gelegen hatten, wiesen im Parenchym der Mittelrippe nach Durchführung der Kontrollreaktion absolut keine Schwärzung auf. Es waren in diesen Zellen also keine PO_4^{-3}-Ionen und keine Schwermetallionen vorhanden. Außerdem war auch keine Adsorption der Pb^{+2}-Ionen aus dem Kontrollgemisch eingetreten.

Solche Schnitte wurden nun in Azetatpuffer-Phosphorsäure-Gemisch mit einer Phosphorsäure-Konzentration, welche bei 50prozentiger Spaltung des Glyzerophosphates in der Testreaktion auftreten muß, inkubiert. Anschließend Schritte 3 bis 7 der Testreaktion. Es trat keine Schwärzung ein. Folglich wurden die PO_4^{-3}-Ionen nicht adsorbiert.

Inkubation mit aufgeschlämmtem Bleiphosphat ergab auf den Schnittoberflächen eine Schwärzung, im Innern völlig intakter Zellen jedoch nicht. Wurden die Schnitte zuvor 15 Minuten lang auf 80° erhitzt, so trat keine Schwärzung ein. Trotz der Waschungen waren also in den angeschnittenen Zellen von Frischschnitten auf den Membranen Plasmareste haften geblieben, welche Bleiphosphat zu adsorbieren vermochten. Durch das Erhitzen war aber das Plasma zerstört worden und die Adsorptionsfähigkeit verlorengegangen.

Wenn der Testniederschlag sich also auf Plastiden im Innern von Zellen zeigt, so heißt das noch nicht, daß diese Plastiden selbst Phosphatase enthalten, sondern es kann sich um adsorbiertes Bleiphosphat handeln, welches durch im Zytoplasma lokalisierte Phosphatase gebildet

worden ist. Dieses Ergebnis ist wichtig für die Beurteilung, ob zum Beispiel Chloroplasten und Zellkerne Phosphatase enthalten (siehe III., 1 *b*, und IV., 1 a_1).

Nachdem nachgewiesen war, daß das Bleiphosphat von Zellbestandteilen adsorbiert werden kann, erübrigte sich die Untersuchung für Bleisulfid, da das Bleiphosphat in der Folge der Einzelschritte in der Testreaktion vor dem Bleisulfid gebildet wird.

In späteren Untersuchungen zeigte es sich, daß oft in Interzellularen, sowohl in der Test- wie auch in der Kontrollreaktion, PbS ausfällt, und zwar in beiden Fällen mit gleicher Schwärzungstiefe. Es handelt sich also nicht um Phosphatase-Wirkung, sondern von den in der Kontrollreaktion ins Gewebe diffundierten Ionen wird Pb^{+2} an den Interzellularwänden adsorbiert und in Schritt 6 mit S^{-2} gefällt.

c) Permeabilitätsprobleme

Um eine Aktivitätsbeeinflussung der Phosphatase durch Fixiermittel zu vermeiden, wurden anfänglich Frischschnitte (also von unfixiertem Material) hergestellt und unmittelbar nach dem Schneiden inkubiert. Dabei ergab sich zum Beispiel bei Blattschnitten von *Dahlia variabilis* nach der Testreaktion das Bild der Figur 1. In einer Randzone von 50—70 μ Tiefe (Aufsicht auf die Blattunterseite) zeigen sämtliche chloroplastenhaltige Zellen Phosphatase-Aktivität. Die Leitbündel weisen durchgehend den Testniederschlag auf. Die Ketten von netzförmig verzweigten Zellen des Schwammparenchyms zeigen von der Schnittfläche aus verschieden weit gegen das Blattinnere Phosphatase-Wirkung. Die Palisadenzellen reagierten nur in der Randzone positiv. Dieses Bild läßt sofort vermuten, daß das Substrat nicht in sämtliche Zellen zu permeieren vermochte. Die Inkubationszeit wurde nun verlängert auf 3 Stunden, die Waschprozesse auf total 45 Minuten und die Einwirkung des Ammonsulfids auf 3 Stunden. Jetzt zeigten sämtliche Schwamm- und Palisadenzellen Phosphatase-Aktivität. Phosphatase war also in all diesen Zellen vorhanden und aktiv, trat aber bei der 15 Minuten dauernden Inkubation nicht überall in Erscheinung, weil das Substrat nur in der Randzone einzudringen vermochte.

Ist es das Glyzerophosphat, das Bleinitrat oder das Ammonsulfid, welches schlecht permeiert? In der Kontrollreaktion, die sich nur durch das Fehlen des Glyzerophosphates von der Testreaktion unterscheidet, trat bei 15 Minuten Inkubationszeit das Kontrollphosphat im Palisadenparenchym über die ganze Schnittbreite hinweg gleichmäßig in Erscheinung. Es ist also das Glyzerophosphat, welches langsam permeiert, wie das auch für Glukose-1-Phosphat gilt (bekannt geworden aus Untersuchungen über die Phosphorylase Paech et al. [1953]).

Es wurde auch untersucht, ob die bekannte Methode der Vakuuminfiltration ein besseres Eindringen des Substrates ergeben würde. Die

infiltrierten, völlig intakten Blätter wurden 15 Minuten im Substrat bei 38° liegen gelassen (Inkubation), anschließend geschnitten und die Schnitte gemäß Schritt 3 bis 7 der Testreaktion weiter behandelt.

Parallel dazu wurden nichtinfiltrierte Blätter geschnitten und die Schnitte inkubiert im Substratgemisch. In diesem Fall ergab sich das Bild der Figur 1, bei Infiltration waren nur Spuren (und nur in ganz vereinzelten Schwammparenchymzellen) von Phosphatase-Wirkung zu erkennen.

Daraus ergeben sich Folgerungen über den Weg, auf dem das Glyzerophosphat ins Blatt eindringt:

Es vermag sehr schlecht von den Interzellularen aus in die Zellen zu permeiern. Es dringt bei Schnittflächen leicht ein und diffundiert einerseits sehr leicht durch die Leitbündel, anderseits (aber bedeutend

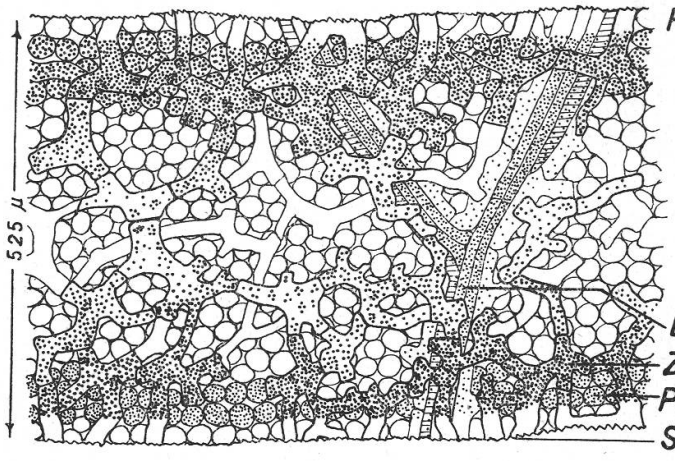


Fig. 1

Schnitt aus Blattspreite von Dahlia variabilis, Ansicht von Unterseite, Kombinationszeichnung. Abstufung der Testniederschlagsmenge durch Dichte der Punktierung angegeben.

weniger gut) durch das Schwammparenchym von Zelle zu Zelle (Figur 1) (durch die Plasmodesmen in den Berührungsflächen der Zellen?) und gelangt über die Trichterzellen in die Palisadenzellen. Das Glyzerophosphat geht somit in entgegengesetzter Richtung denselben Weg, welchen Haberlandt (1896) für die in der Photosynthese gebildeten Zucker annahm.

Erforderliche Schnittdicke:

Figur 1 zeigt in der Randzone des Schnittes einen 25—35 μ breiten Saum, der nicht reagiert hat. Es handelt sich um angeschnittene Zellen, welche mehr oder weniger ausgewaschen wurden (ein feiner Plasmawandbelag bleibt oft samt Chloroplasten noch kleben; vgl. Adsorptionserscheinungen). Blattschnitte mit Zellen von der ungefähren Größe der hier verwendeten *Dahlia*-Blätter müssen also über 70 μ dick sein.

Einfluß von Fixiermitteln:

Um die Zellen für das Glyzerophosphat permeabel zu machen, wurde mit verschiedenen Fixiermitteln die Semipermeabilität aufge-

hoben (Frischschnitte wurden 1 Stunde lang in die Fixiermittel eingelegt, gewaschen und 15 Minuten inkubiert).

Resultate:

Alkohol 50prozentig und Azeton 30prozentig: die Phosphatase-Aktivität wird sichtbar in sämtlichen chloroplastenhaltigen Zellen (also gleiches Ergebnis wie bei dreistündiger Inkubation von nichtfixiertem Material).

Äther 50prozentig: Die Phosphatase-Aktivität ist sehr stark vermindert im Vergleich zu mit Alkohol behandelten Schnitten.

Essigsäure 30prozentig: Die Phosphatase ist völlig inaktiviert.

In den Kontrollreaktionen zeigt sich kein Unterschied zwischen narkotisierten Schnitten und Frischschnitten. Dies bestätigt die schon oben gemachte Feststellung, daß das *Glyzerophosphat* und nicht das Bleinitrat oder das Ammonsulfid *schlecht permeiert*. Langes Fixieren mit Alkohol beeinträchtigt die Phosphatase-Aktivität:

Abbildung 1: Querschnitt durch Sproßachse von *Heracleum Sphondylium*. Fixierung mit 50prozentigem Alkohol, 1 Stunde. Maximum der Phosphatase-Aktivität im Phloem, geringere Aktivität im Libriform.

Abbildung 2: Gleiches Objekt, Fixierung acht Tage mit 70prozentigem Alkohol: Maximum der Phosphatase-Aktivität im Libriform, Phloem wesentlich schwächer als in 1.

Den obigen Ergebnissen entsprechend wurden alle Testreaktionen (15 Minuten Inkubation) mit Frischschnitten kontrolliert durch solche, welche 1 Stunde mit 50prozentigem Alkohol fixiert worden waren (vgl. Kontrollen 1 *a* und *b*). Dadurch ist auch der allfällige Einwand widerlegt, daß die im histochemischen Test zum Ausdruck kommenden unterschiedlichen Aktivitäten nur durch Permeabilitätsunterschiede bedingt seien. Zur weiteren Sicherung der Ergebnisse der histochemischen Methode wurden bei einem Versuchsobjekt, beim Maiskorn, auch quantitative Bestimmungen der Phosphatase-Aktivität durchgeführt.

3. Quantitative Bestimmung der Phosphatase-Aktivität

Objekt: Acht Tage gekeimter Samen von *Zea Mays*.

Mit dieser Untersuchung wurden zwei Ziele verfolgt:

1. Enthält der Stärketeil des Endosperms wirklich Phosphatase?
2. Kontrolle, ob die im histochemischen Test in verschiedenen Gewebs- bzw. Organteilen zum Ausdruck kommenden Schwärzungsunterschiede den tatsächlichen Aktivitätsunterschieden des Fermentes in diesen Teilen entsprechen.

Präzisierung: Es kann dabei nur die Aktivität pro Volumeneinheit Gewebe bestimmt werden, wobei dahingestellt bleiben muß, ob eine bestimmte in Erscheinung tretende Phosphatase-Wirkung auf verhält-

nismäßig hoher Enzymkonzentration, aber geringer Aktivität der einzelnen Molekeln oder geringer Fermentkonzentration und dafür hoher Aktivität der einzelnen Molekeln beruht.

Prinzip: Es wird die durch die Phosphatase in einer bestimmten Zeit aus einer bestimmten Glyzerophosphatmenge freigesetzte Phosphorsäure quantitativ bestimmt. Die Bestimmung erfolgt getrennt für folgende Gewebeteile: Aleuronschicht, Stärketeil des Endosperms, Scutellum, Wurzel und Koleoptile. Es werden die Volumina dieser fünf Gewebsfraktionen bestimmt und die freigesetzte Phosphorsäuremenge pro Volumeneinheit berechnet.

Details: Die Bestimmung der Phosphorsäure erfolgt nach der Methode von Berenblum und Chain (1938) kolorimetrisch. Um gute Durchschnittswerte zu erhalten, werden hundert Körner verwendet. Die fünf Fraktionen werden im Porzellanmörser mit mehrfach gewaschenem und getrocknetem feinem Quarzsand homogenisiert. Gleiche Gewichtsanteile des Materials werden für den Test und für die Kontrolle verwendet. Das Testmaterial wird mit 50 ml Substratgemisch, welches Na-α-Glyzerophosphat und *p*H-Puffer in gleicher Konzentration wie im histochemischen Test enthält, verrührt und bei 38° im Thermostat 24 Stunden unter mehrmaligem Umrühren inkubiert. Parallel dazu wird das Kontrollmaterial mit je 50 ml Kontrollösung, nur den Azetatpuffer enthaltend, inkubiert. Anschließend werden die Fermentreaktionen abgestoppt durch kurzes Aufkochen. Die Lösungen werden abfiltriert und im Kühlschrank bei 0° bis zur Analyse aufbewahrt.

Eine Kontrolle des in den Geweben vorhandenen wasserlöslichen Phosphates muß unter genau gleichen Bedingungen wie bei der Testreaktion durchgeführt werden, weil sich während der Inkubationszeit Autolysevorgänge abspielen können. Die durch die Fermentwirkung abgespaltene Phosphorsäuremenge wird dann als Differenz zwischen Test und Kontrolle bestimmt. Davon muß natürlich der Blindwert des verwendeten Glyzerophosphates abgezogen werden.

Ermittlung der Volumina der Organfraktionen: Für Koleoptile, Wurzel, Scutellum und Endosperm lassen sich die Volumina leicht ermitteln, indem die je 100 Samenteile in einen Wasser enthaltenden Meßzylinder gebracht und die Volumenzunahme bestimmt wird. Für die sehr wenig Raum einnehmende Aleuronschicht ist diese Methode zu ungenau. Das Volumen der 100 Aleuronschichten wurde als Produkt von Oberfläche $\times$ Dicke berechnet. Dafür wurden die 100 Samenschalen (sie lassen sich in diesem Keimungsstadium verhältnismäßig leicht abschälen) unter Aufspaltung der Randpartien in die Ebene ausgebreitet, ihre Umrisse aufgezeichnet und die gesamte Fläche mit einem Planimeter ausgemessen. Die Dicke variiert sehr wenig und kann an Schnitten im Mikroskop ausgemessen werden.

Die Ergebnisse sind in Kapitel IV., 1 *d*, zuammengestellt.

II. Versuche über aktivitätsbestimmende Faktoren

Aus *In-vitro*-Versuchen mit Enzym-Reinpräparaten ist bekannt, daß die Aktivität eines Fermentes abhängig ist vom *p*H, von der Temperatur, von modifizierenden Faktoren (Aktivatoren, Inhibitoren und Destruktoren; als solche kommen Ionen, vor allem Metallionen, aber auch höher molekulare Stoffe in Betracht), vom Wassergehalt, von Strahlungen u. a.

In vivo sind die Verhältnisse natürlich wesentlich komplizierter, da auch indirekte Beeinflussung möglich ist. So ist nicht nur der Zustand des Apoenzymkolloides selbst, sondern auch derjenige anderer Kolloide des Plasmas wichtig. Fermente können an letztere adsorbiert oder frei gelöst sein. Kursanov et al. postulieren, daß Hydrolasen im adsorbierten Zustand synthetisch, in freiem Zustand dagegen spaltend wirken. Auch können intraplasmatische Lipoidfilme vorübergehend die anzutreffenden Reservestoffe abschirmen oder intraplasmatische semipermeable Membranen das Vordringen der Substrate zu den intrazellulär lokalisierten Enzymen verhindern. Ferner ist in Mensch und Tier auch eine hormonale Kontrolle der Aktivität alkalischer Phosphatasen nachgewiesen worden (Verzar et al. [1952]), Mathies et al. [1949], Verzar [1951]). Eine sich durch Phytohormone ergebende tages- oder jahreszeitliche Steuerung der Enzymaktivität ist ebenfalls denkbar, jedoch noch gar nicht untersucht.

Einige dieser Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit geprüft. Bei ersten orientierenden Versuchen an verschiedenen Pflanzen zeigte es sich, daß die Blätter von *Zea Mays* für vergleichende Betrachtungen gut geeignet sind. Es kann vorausgenommen werden, daß die Aktivität saurer Phosphatase hauptsächlich auf die Leitbündel konzentriert ist. Ein Vergleich der Schwärzung nach Inkubation unter verschiedenen Bedingungen läßt das Maß der Phosphatase-Aktivität beurteilen. Es wurde dabei nur auf den optischen Eindruck gleich dicker Schnitte abgestellt.

1. pH-Abhängigkeit

Es ist von Interesse, den Einfluß der *p*H-Variationen zu prüfen, um beurteilen zu können, ob die Fermentaktivität in verschiedenen physiologischen Zuständen durch *p*H-Schwankungen in der Zelle gesteuert werden könnte.

Das *p*H des Substratgemisches wurde variiert durch Änderung des Verhältnisses (CH_3COONa) : (CH_3COOH), für tiefes *p*H durch Zugabe von HCl und für hohes *p*H durch NaOH. Es wurden für die verschiedenen *p*H-Stufen benachbarte Schnitte eines großen Maisblattes verwendet, so daß diese Schnitte keine unterschiedlichen Eigenschaften aufwiesen.

Ergebnis: Die Phosphatase zeigt ihre höchste Aktivität bei einem *p*H knapp über 5. Unter 3 und über 8 ist das Enzym völlig inaktiviert. Es ist damit die Angabe von Glick und Fischer (1949) bestätigt, welche das *p*H-Optimum mit 5,1 angeben.

*p*H-Werte von 4 bis 8 kommen in verschiedenen pflanzlichen Geweben vor, jedoch ist die Schwankung in bestimmten einzelnen Zellen geringer (Bünning [1948]). Nach Untersuchungen von Ross et al. (1951 *a*) mit *alkalischer* Phosphatase ist das *p*H-Optimum übrigens von der Substratkonzentration abhängig. Die in pflanzlichen Geweben ebenfalls vorkommende alkalische Phosphatase (Ross et al. [1951 *b*]) tritt in obigen Versuchen nicht in Erscheinung, weil dieses Ferment in pflanzlichen Zellen Glyzerophosphat nicht zu spalten vermag.

2. *Temperaturabhängigkeit*

Die Versuchsanordnung erfolgte analog zur Ermittlung der *p*H-Abhängigkeit. Es wurden Schnitte in Schälchen bei 0°, 10°, 20°, 37°, 40°, 55°, 60° und 65° C je 15 Minuten lang inkubiert. (Die Lösungen wurden auf die entsprechenden Temperaturen gebracht, bevor die Schnitte hineingegeben wurden.)

Ergebnis: Bei 0° und 65° ist bei der gewählten Inkubationszeit die Phosphatase völlig inaktiviert, bei 10° und 60° ist die Aktivität sehr schwach, bei 37° bis 38° optimal. Damit ist die Angabe von Glick und Fischer (1949) ebenfalls bestätigt, welche eine Temperatur von 37,5° für das Aktivitätsoptimum angeben.

3. *Wirkung von F^-*

Versuchsanordnung: Dem Substratgemisch (und dem Kontrollgemisch) werden in verschiedenen Schälchen verschiedene Konzentrationen von NaF zugegeben, so daß nach der Mischung in bezug auf die nun vorhandene Lösungsmittelmenge folgende Konzentrationen von Fluorionen bestehen:

Konzentration an F^-		Ergebnis
5×10^{-1} molar	Niederschlag von PbF	völlige Inaktivierung
5×10^{-2} »		
5×10^{-3} »	. . . . .	völlige Inaktivierung
5×10^{-4} »	. . . . .	schwache Aktivität
5×10^{-5} »	. . . . .	Aktivität ganz wenig schwächer als im normalen Substratgemisch

Zum Vergleich wurde noch eine Inkubation im normalen Substratgemisch ausgeführt.

Ergebnis: F^- inaktiviert die saure Phosphatase. Die Inaktivierung ist vollkommen bei einer Fluoridkonzentration von 5×10^{-3} m (bei *p*H 5,1 und T = 38°).

4. *Wirkung von Mg^{+2}*

Versuchsanordnung: Analog zur Versuchsreihe mit F^-. Es wird das Nitrat verwendet, damit kein neues Anion in die Lösung gelangt, welches möglicherweise einen Einfluß auf das Enzym ausüben könnte. [NO_3^- ist schon durch die Zugabe von $Pb(NO_3)_2$ im Substratgemisch vorhanden.]

Konzentrationen: $(Mg^{+2}) = 5 \times 10^{-1}$, 5×10^{-2} bis 5×10^{-10} m. Dazu Kontrollreihe mit obigen Mg^{+2}-Konzentrationen im Kontrollgemisch. Ferner eine Kontrolle mit normalem Substratgemisch (d. h. ohne Mg^{+2}).

Ergebnis: Indifferenz. Die hier in Erscheinung tretende Phosphatase ist also gemäß der Klassifikation von Roche (1951) die Phosphomonoesterase II.

5. *Abhängigkeit vom Quellungszustand*

In Getreidekörnern ist, wie weiter unten noch ausgeführt wird, saure Phosphatase unter anderem im Scutellumepithel lokalisiert, im Zwiebelsamen im Haustorialepithel. Beide Samen zeigen in diesen Geweben, wenn trocken geschnitten, keine Enzymaktivität; diese tritt erst auf, nachdem die Samen ein oder zwei Tage gequollen sind (vgl. Abbildungen 3, 4, 6).

Es bestehen drei Möglichkeiten zur Erklärung dieser Erscheinung:

1. Das Enzym selbst muß erst Wasser aufnehmen, um seine Aktivität ausüben zu können (Änderung des kolloidalen Zustandes des Apofermentes).
2. Es ist das Zytoplasma, welches seinen kolloidalen Zustand ändern muß, um eine Enzymaktivität zu ermöglichen.
3. Das Enzym wird erst gebildet. Dieser Fall ist zum Beispiel nachgewiesen für die α-Amylase in Getreidesamen. Die β-Amylase ist schon im ruhenden Samen vorhanden, die α-Amylase hingegen wird erst bei der Keimung gebildet.

Zu entscheiden, welche der drei Möglichkeiten hier verwirklicht ist, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Schnitte, welche vor Ausführung der Testreaktion zwei Tage in Wasser gelegen haben, zeigen meist eine stärkere Enzymaktivität als frische Schnitte. Es mag dies durch extreme Quellung oder bereits durch Plasmadesintegration bedingt sein (siehe B, VIII.).

6. *Jahreszeitliche Abhängigkeit*

Es wurde die Aktivität von gleichaltrigen Maispflanzen im Sommer, Herbst, Winter und Frühling verglichen. Die Pflanzen wurden in Töpfen in nährstoffreicher Erde gezogen, die Winterpflanzen im Gewächshaus. Die Enzymaktivität ist im Winter sehr stark herabgesetzt, in jungen Blättern ist sie fast völlig aufgehoben.

7. *Altersabhängigkeit*

Ein Vergleich von 2 Wochen und 3 Monate alten Maispflanzen zur gleichen Jahreszeit (August) zeigt eine wesentlich höhere Aktivität in Blättern und Stengelleitbündeln der ersteren.

III. Lokalisation der Aktivität saurer Phosphatase in den vegetativen Organen einiger Angiospermen

1. Lokalisation in der Blattspreite

Untersucht wurden Blätter von *Zea Mays, Solanum tuberosum, Dahlia variabilis, Plectranthus Oertendahlii, Apium graveolens, Cyperus natalensis, Pelargonium zonale* und das Oberblatt von *Allium Cepa.*

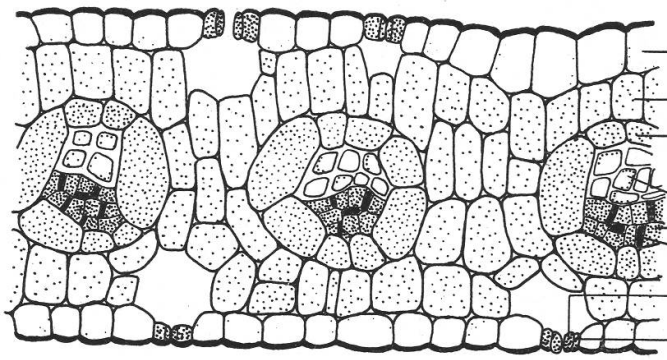


Fig. 2
Zea Mays, Blattspreite quer
Phosphataseaktivität punktiert angeg.

Die Lokalisation der Phosphatase-Aktivität im Blatt von *Zea Mays* ist in Figur 2 dargestellt. In Frischschnitten tritt Phosphatase nur in den Leitbündeln und der Leitbündelscheide in Erscheinung. Nach Auf-

---

Tafel 5

Abbildungen 1 und 2

Heracleum Sphondylium, Partie aus Sproßachse (Querschnitt). *P* Phloem; *L* Libriform. Testreaktion. Einfluß der Fixierung mit Alkohol.

Abbildung 1: Alkohol 50prozentig, Fixierung 1 Stunde. Phloem stärkere Aktivität als Libriform.

Abbildung 2: Alkohol 70prozentig, Fixierung 8 Tage. Libriform stärkere Aktivität als Phloem.

Abbildungen 3, 4 und 6

Partie aus Maiskorn. Abhängigkeit der Phosphatase-Aktivität vom Quellungszustand. *P* Parenchym, *E* Epithel des Scutellums; *F* drüsenartige Falte des Scutellumepithels; *En* Endosperm.

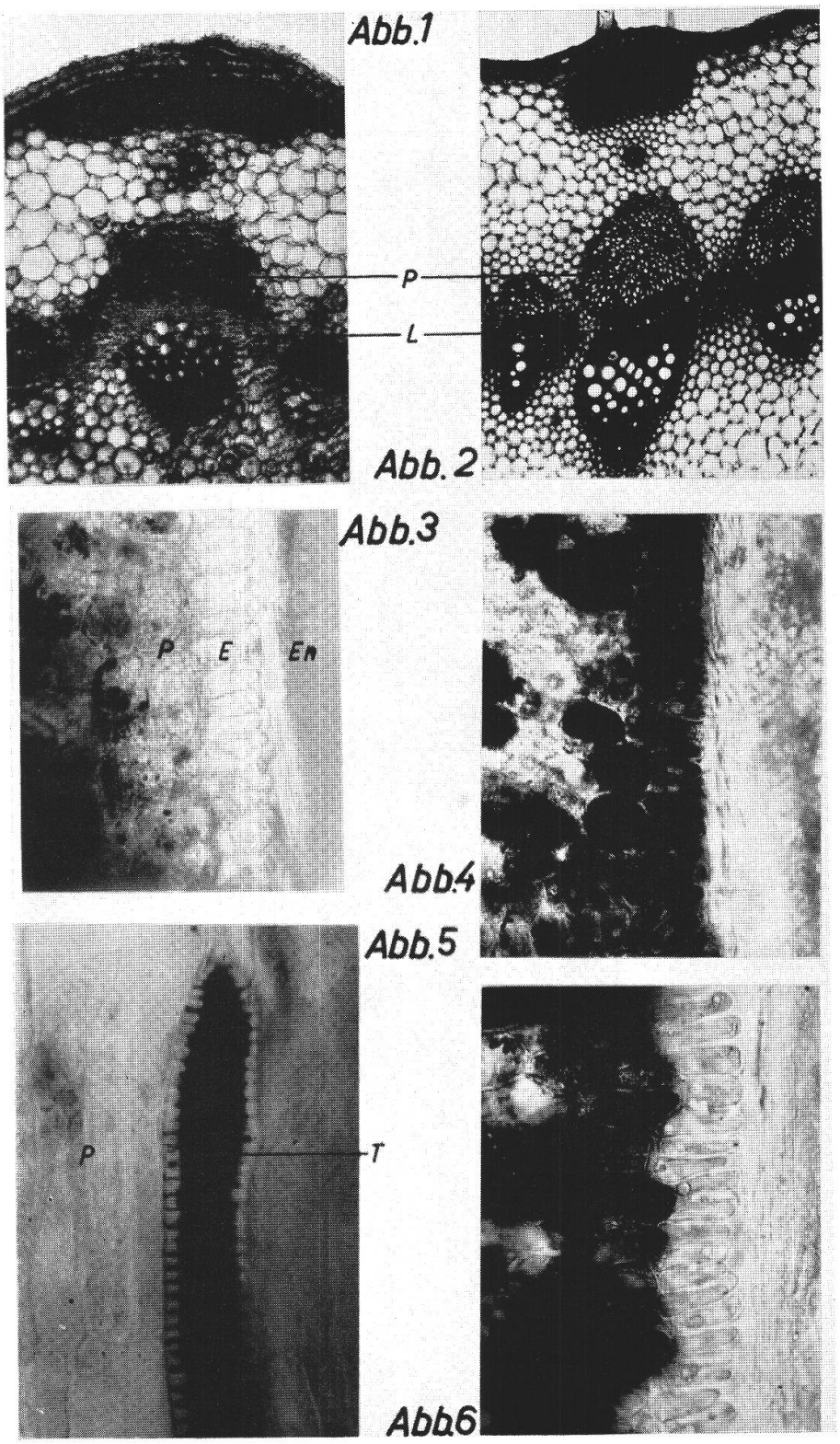
Abbildung 3: Testreaktion mit trockenem Samen. Keine Aktivität im Scutellumepithel.

Abbildung 4: Testreaktion mit 1 Tag gequollenem Samen. Scutellumepithel stark aktiv.

Abbildung 6: Kontrollreaktion mit 1 Tag gequollenem Samen.

Abbildung 5: Same von *Phoenix dactylifera,* Partie aus dem Haustoriumfuß. Starke Aktivität in der Tracheide *T*. *P* Parenchym.

Tafel 5



Tafel 6

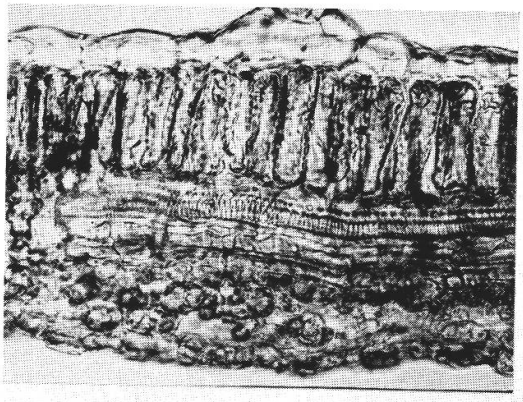


Abb. 7

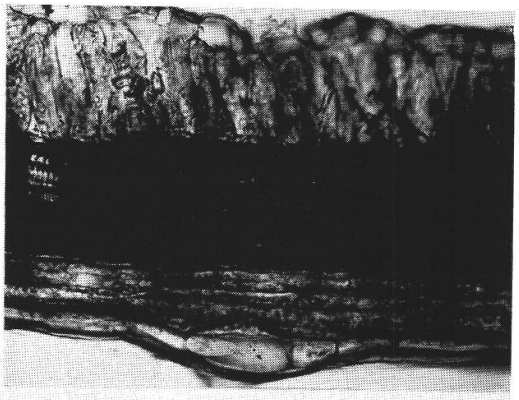


Abb. 8

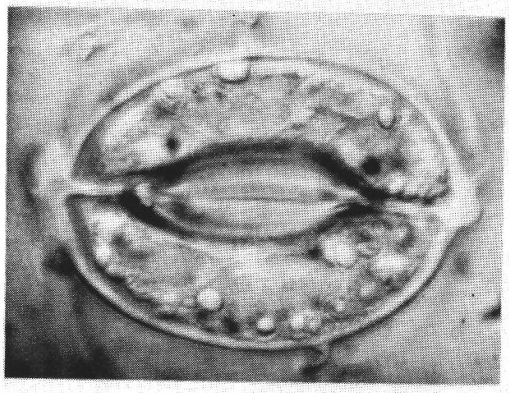


Abb. 9

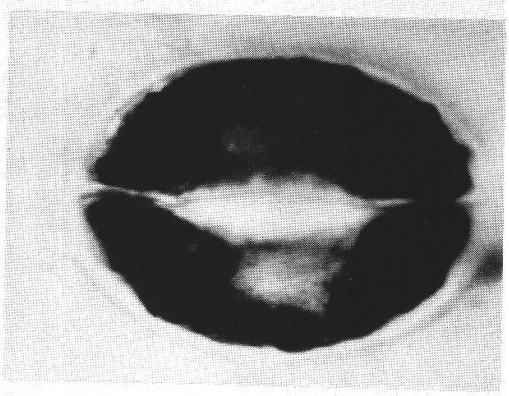


Abb. 10

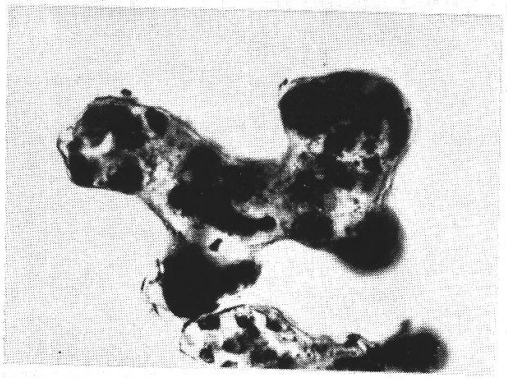


Abb. 11

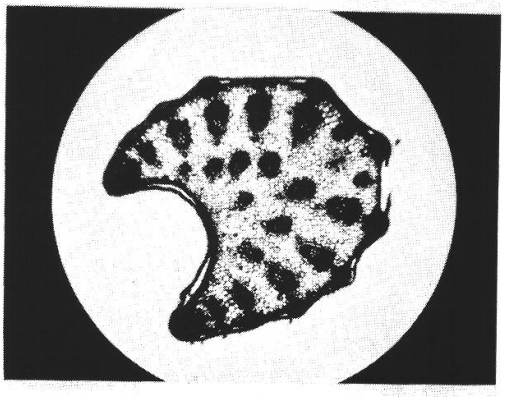


Abb. 12

hebung der Semipermeabilität der Zellen durch 50prozentigen Alkohol (vgl. I., 2 *c*) kommt aber auch in den vorher für Glyzerophosphat impermeablen Zellen des Chlorenchyms Phosphatase-Wirkung zum Ausdruck. Übereinstimmend bei allen untersuchten Pflanzen zeigt sich Phosphatase-Aktivität in den Palisaden- und den Schwammparenchymzellen, in der Leitbündelscheide (sofern eine solche vorhanden ist), in den Leitbündeln und in den Schließ- und Nebenzellen der Stomata (vgl. Abbildungen 7 bis 11). In der oberen und unteren Epidermis wurde keine oder nur höchst geringe Phosphatase-Wirkung festgestellt; diese Zellen enthalten aber viel Kontrollphosphat. Blatthaare und Emergenzen reagieren ebenfalls positiv.

a) Die Leitbündel

weisen durchwegs eine viel höhere Phosphatase-Aktivität auf als die

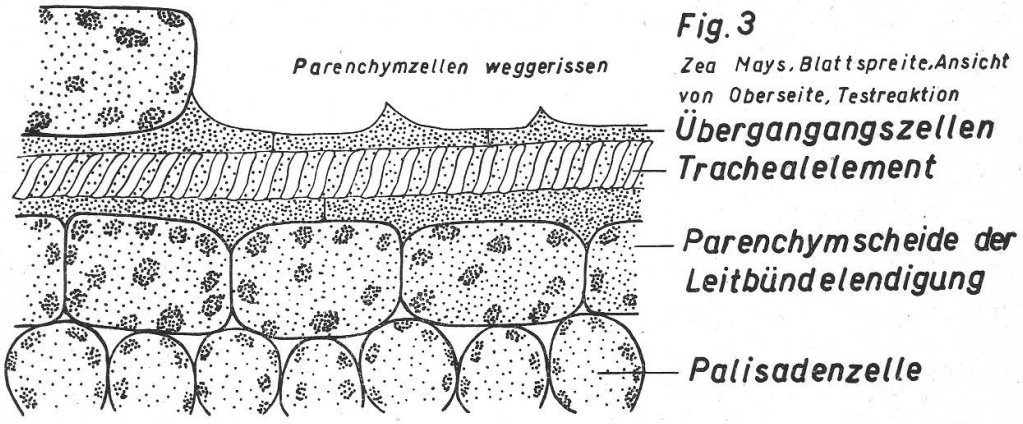


Fig. 3
Zea Mays, Blattspreite, Ansicht von Oberseite, Testreaktion

übrigen Zellen des Blattes. Bei *Zea Mays* besitzen die Trachealelemente durchwegs geringe Aktivität; sie ist wesentlich höher in den Siebelementen und zeigt ein Maximum in den Geleitzellen. In den kleinsten

---

Tafel 6

Abbildungen 7 und 8

Solanum tuberosum, Blattspreite quer, Frischschnitte.

Abbildung 7: Kontrolle.
Abbildung 8: Test. Sehr starke Aktivität im Leitbündel.

Abbildungen 9 und 10

Dahlia variabilis, Stoma des Blattes. 9 Kontrolle, 10 Test. Sehr starke Aktivität in den Schließzellen

Abbildung 11

Dahlia variabilis, isolierte Zelle des Schwammparenchyms. Chloroplasten mit Testniederschlag

Abbildung 12

Daucus carota, Blattstiel. Test. Aktivität in Leitbündeln, Kollenchymsträngen und subepidermalem Chlorenchym

Leitbündeln werden die Trachealelemente (oft nur ein einziges vorhanden) von ausgebuchteten Zellen begleitet, die von Koch (1884) als peripherische, von Fischer (1885) als Übergangszellen bezeichnet worden sind (Figur 3). Diese Zellen zeigen in der Regel sehr hohe Phosphatase-Aktivität. (Dasselbe Ergebnis ist nach Abschluß dieser Arbeit, jedoch noch vor deren Drucklegung, von Bauer [1954] publiziert worden.)

Bei *Solanum tuberosum* (Abbildungen 7 u. 8) sind die Protoxylem-Spiral-Trachealelemente so aktiv, oder noch aktiver, als die Siebelemente auf deren Ober- und Unterseite bzw. in den Endleitbündelchen die leitenden Parenchymzellen (Begriff nach Hayward [1938]; Übergangszellen bei Fischer [1885] auf der Unterseite. In den Trachealelementen ist der Testniederschlag jedoch in der Regel wandständig, während er in den Siebelementen diffus im ganzen Zellinhalt verteilt ist. Dies ist offenbar durch die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung des Zytoplasmas bedingt. Im Oberblatt von *Allium Cepa* weisen ebenfalls Xylem und Phloem ungefähr gleiche Aktivität auf.

b) In Palisaden- und Schwammparenchym

erscheint der Testniederschlag übereinstimmend bei allen Objekten fein diffus verteilt im Zytoplasma und wesentlich stärker auf den Chloroplasten. Wenn ein Gefälle der Phosphatase-Aktivität im Parenchym der Blattspreite besteht, so ist dieses sehr gering. In Maisblättern scheint gelegentlich die Leitbündelscheide etwas stärker aktiv als die Palisaden- und die Parenchymschicht, jedoch ist der Unterschied sehr gering. Es ist diese Beobachtung immerhin deshalb interessant, weil diese Leitbündelscheidezellen die einzigen chloroplastenhaltigen Zellen im Maisblatt sind, welche Stärke bilden. Es konnte auch ein Aktivitätsunterschied zwischen den Mesophyllzellen von *Zea Mays*-Blättern (Zuckerblatt) und *Plectranthus*-Blättern (Stärkeblatt) festgestellt werden: letztere reagieren stärker positiv. Bei *Plectranthus* erscheint der Niederschlag hauptsächlich auf den Chloroplasten, bei *Zea Mays* vermehrt auf kleinen Plastiden im Zytoplasma.

c) Chloroplasten

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich eindeutig ein starker Testniederschlag auf den Chloroplasten. Besonders deutlich kam dies in einem 3 Stunden lang inkubierten, nicht narkotisierten Blatt von *Dahlia variabilis* zum Ausdruck. Abbildung 11 stellt eine isolierte Zelle des Schwammparenchyms dar. Die Chloroplasten erscheinen wesentlich aktiver als das Zytoplasma. Im Lichtmikroskop läßt sich nicht unterscheiden, ob der Niederschlag nur auf der Oberfläche oder auch im Innern der Chloroplasten sitzt. Auf dieses Problem hat schon Yin (1945) hingewiesen. Es besteht die Möglichkeit, daß nur das umgebende

Zytoplasma Phosphatase enthält und daß im Test gebildetes Bleiphosphat sich auf den Chloroplasten niederschlägt (vgl. Adsorptionserscheinungen). Macdowall (1953) kommt nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen von durch Zentrifugation gewonnenen und anschließend inkubierten Chloroplasten aus *Iris*- und Spinatblättern zum Schluß, daß diese Chloroplasten im Innern keine Phosphatase enthalten. Es kann aber eingewendet werden, daß beim Zentrifugieren das Ferment ausgeschleudert wurde oder daß wegen der Semipermeabilität der Chloroplastenmembran das Substrat nicht einzudringen vermochte. Statt zuerst zu zentrifugieren und dann zu inkubieren, würden die Blätter besser erst narkotisiert, inkubiert und erst dann die Chloroplasten abzentrifugiert und für die elektronenmikroskopische Untersuchung des Chloroplasteninnern zerlegt.

Interessanterweise konnten in den vorliegenden Untersuchungen mit *Plectranthus*-Blättern Chloroplasten gefunden werden, welche nur auf einem scharf umgrenzten Bezirk ihrer Oberfläche den Testniederschlag aufwiesen. Nach Zerzupfen von Blattstücken konnten Chloroplasten frei schwimmend beobachtet werden. Nach Behandlung mit Jodjodkali zeigte sich, mit dem Testniederschlag sich deckend und noch etwas über diesen Bereich hinaus, Stärke. Die Pflanzen waren $2^1/_2$ Stunden dunkel gestellt worden, die Stärke befand sich also im Zustand des Abbaus. Nach diesem Ergebnis scheint es doch möglich, daß in Chloroplasten Phosphatase aktiv sein kann, oder dann besitzt vielleicht der Stärketeil des Chloroplasten eine besondere Adsorptionskraft für Bleiionen, Bleiphosphat oder Bleisulfid.

d) Anthozyanhaltige Zellen

Blätter von im Winter im Gewächshaus gezogenen Maispflanzen enthielten im Februar in Epidermiszellen und Zellen der Haarpolster häufig rote Anthozyane. Diese Zellen besitzen in der Regel aktive Phosphatase.

e) Stomata

Schließ- und Öffnungsbewegungen der Stomata werden bekanntlich von Stärke $\gtrless$ Zucker-Umwandlungen in den Schließzellen begleitet. Bei sämtlichen oben aufgeführten Pflanzen konnte in diesen Schließzellen (bei *Zea Mays* auch in den Nebenzellen) hohe Phosphatase-Aktivität festgestellt werden. In Frischschnitten kommt diese Aktivität nur unregelmäßig zum Ausdruck. Es wurde deshalb anfänglich ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Aktivität und dem Speicherzustand von Stärke, dem Speicherzustand von Zucker oder der Mobilisations- bzw. Depositionsphase der Stärke vermutet. Eingehende Untersuchungen mit abgezogenen Epidermisstücken und mit narkotisierten Blättern ergaben jedoch, daß das unregelmäßige Auftreten der

Aktivität auf der geringen und schwankenden Permeabilität dieser Zellen für Glyzerophosphat beruht. (Von Stöger [1950] ist übrigens festgestellt worden, daß die Permeabilität der Schließzellen auch für Glyzerin außerordentlich gering ist und bei hydroaktiver und photoaktiver Öffnungstendenz zunimmt.) In allen vier oben erwähnten Phasen (vorwiegend Stärkespeicherung = geschlossene Stomata, vorwiegend Zuckerspeicherung = offene Stomata, Stärkemobilisation = Öffnungsbewegung und Stärkedeposition = Schließbewegung), erzielt durch Dunkelstellen und Belichten der Pflanzen in Kombination mit Temperaturvariation, ist die Phosphatase hoch aktiv.

Es muß aber *in vivo* doch eine Beeinflussung der Phosphatase-Aktivität durch *p*H-Schwankung bestehen, welche nach Pekarek (siehe Bünning [1948] von 4 bis 6,2 reichen kann, hier aber nicht zum Ausdruck kommen konnte wegen des durch den Puffer aufgezwungenen Wertes von 5,1.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß Schließzellen (zum Teil auch die Nebenzellen) der Stomata sicher Phosphatase enthalten (vgl. Abbildungen 9 und 10). Ob die Aktivität in verschiedenen physiologischen Zuständen schwankt, muß dahingestellt bleiben. Die Aufdeckung eines Zusammenhanges Schließbewegung—*p*H-Schwankung—Phosphatase-Aktivitätsbeeinflussung—Phosphorylase-Antagonismus—Stärke/Zucker—Umwandlung macht weitere Untersuchungen nötig.

2. Lokalisation in Blattstiel und Sproßachse

Vgl. Abbildungen 12 bis 28

Untersucht wurden: Blattstiel des ergrünten Kotyledo von gekeimten *Ricinus*-Samen, Blattstiele von *Daucus carota* (Abbildung 12), *Beta vulgaris, Plectranthus Oertendahlii, Heracleum Mantegazzianum* und *Solanum tuberosum* (Abbildungen 13 und 14); Sproßachsen von *Zea*

Tafel 7

Abbildungen 13 und 14
Solanum tuberosum, Blattstiel. 13 Kontrolle, 14 Test.
C Chlorenchym *aP* äußeres Phloem, *X* Xylem, *iP* inneres Phloem

Abbildung 15
Zea Mays, Sproßachse, Leitbündel. Test. *S* Siebröhre, *G* Geleitzelle

Abbildung 16
Cucurbita Pepo, Partie aus Sproßachse, Längsschnitt. Test. *G* Geleitzelle, *S* Siebplatte, bei *P* Plasmolyse im oberen Siebröhrenglied sichtbar

Abbildungen 17 und 18
Cucurbita Pepo, Partie aus Sproßachse, Querschnitt.
17 Kontrolle, 18 Test. *iS* interfasciculäre Siebröhren

Tafel 7

Abb. 13

Abb. 14

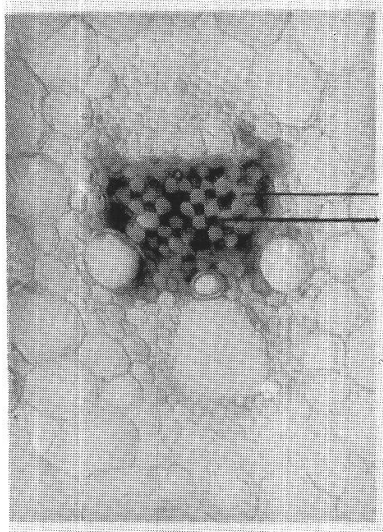


Abb. 15

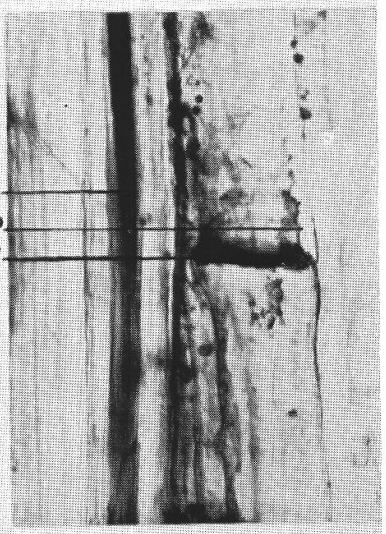


Abb. 16

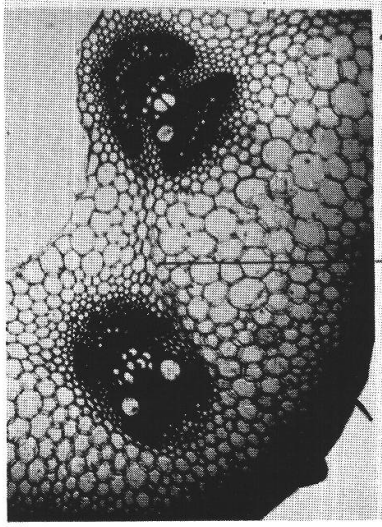


Abb. 17

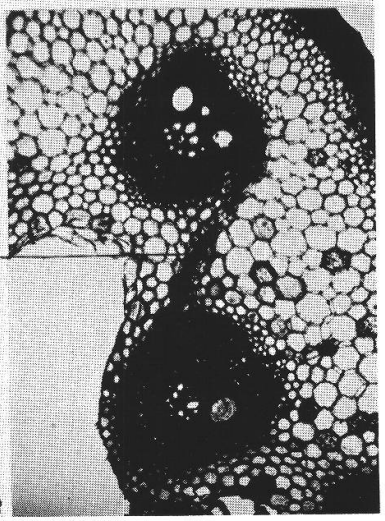


Abb. 18

Tafel 8

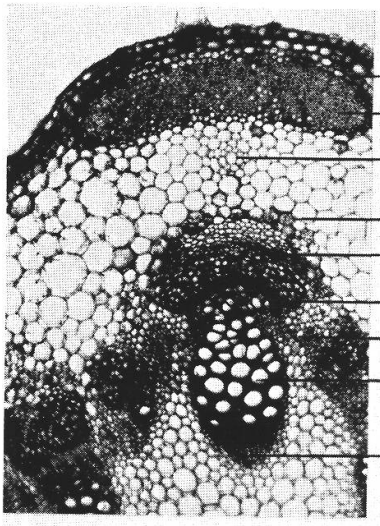


Abb. 19

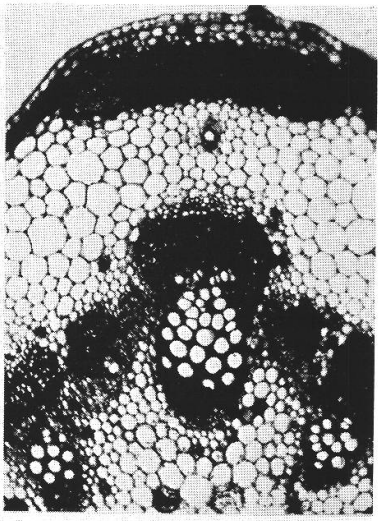


Abb. 20

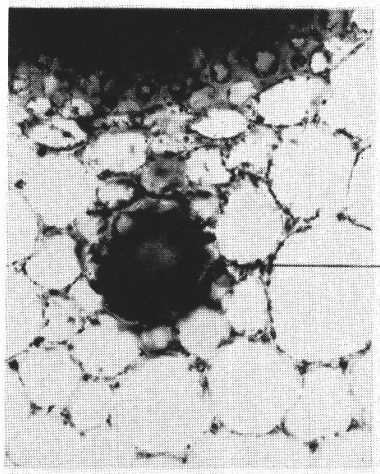


Abb. 21

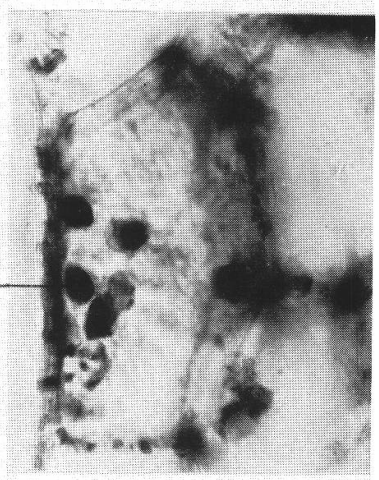


Abb. 22

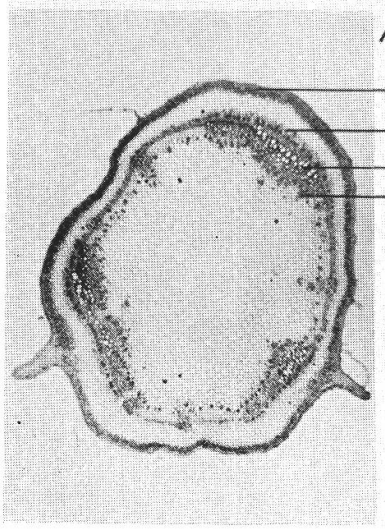


Abb. 23

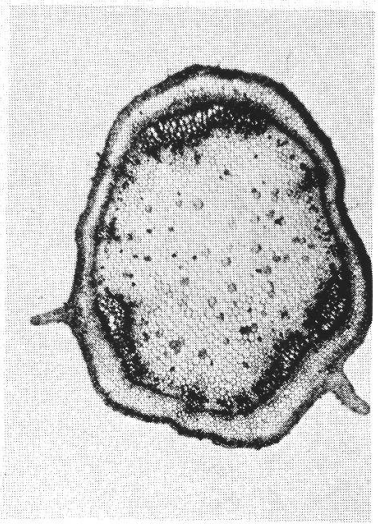


Abb. 24

Mays, Cucurbita Pepo, Heracleum Sphondylium, Heracleum Mantegazzianum, Solanum tuberosum, Vitis vinifera und *Pelargonium zonale. Übereinstimmend bei sämtlichen Objekten ist die Phosphatase lokalisiert in den chloroplastenhaltigen Zellschichten unter der Epidermis und wesentlich stärker in den Leitgeweben. Rinden- und Markparenchym zeigen durchwegs nur sehr schwache Phosphatase-Aktivität.* Diese Lokalisation kommt in den Querschnittübersichten der Abbildungen 13 und 14 sowie 23 und 24 zum Ausdruck.

Einzelheiten läßt die in Abbildungen 19 und 20 wiedergegebene Querschnittpartie von *Heracleum Sphondylium* erkennen. Phosphatase ist aktiv: 1. in Sproßhaaren, 2. in den zwei bis drei subepidermalen Zellagen, welche Chloroplasten enthalten, 3. im Zellinhalt der Kollenchymstränge, 4. in der Sekretgangscheide, 5. in einzelnen Zellen der Stärkescheide, 6. in den Bastfasern, 7. im Phloem (sehr stark), 8. im Kambium, 9. im Libriform (mittel bis stark), 10. im Xylem-Parenchym (sehr stark). Die einzelnen Orte höherer Aktivität sollen im folgenden genauer besprochen werden.

a) Leitgewebe

Sie lassen sich besonders gut studieren bei *Zea Mays* und *Cucurbita Pepo.*

Phloem: Abbildung 15 läßt im Leitbündel von *Zea Mays* stärkste Phosphatase-Aktivität in den Geleitzellen des Phloems erkennen. Längsschnitte beweisen, daß auch in den Siebröhren die Phosphatase stark, wenn auch etwas schwächer als in den Geleitzellen, wirksam ist. (Ob Bleiphosphat aus den Geleitzellen in die Siebröhren zu diffundieren vermag, konnte nicht entschieden werden.) In Querschnitten fließen die Siebröhren meist, Tracheen stets aus. Querschnitte zeigen deshalb in der Regel Phosphatase nur im Phloem. In den Siebröhren von *Cucurbita Pepo* erscheint das Ferment konzentriert gegen die Siebplatten hin, und

---

Tafel 8

Abbildungen 19 und 20

Heracleum Sphondylium, Partie aus Sproßachse, Querschnitt. 19 Kontrolle, 20 Test. *C* Chlorenchym, *K* Kollenchym, *S* Sekretgangscheide, *Ss* Stärkescheide, *P* Phloem, *Ka* Kambium, *L* Libriform, *X* Xylem, *XP* Xylemparenchym

Abbildung 21

Gleiches Objekt. Test. *S* Sekretgangscheide

Abbildung 22

Gleiches Objekt, Zelle aus der Stärkescheide. Test. *C* Chloroplast mit Testniederschlag

Abbildungen 23 und 24

Solanum tuberosum, Sproßachse, Querschnitt. 23 Kontrolle, 24 Test. *C* Chlorenchym, *aP* äußeres Phloem, *X* Xylem, *iP* inneres Phloem

zwar auch in völlig unverletzten Siebröhrengliedern. (Abbildung 16 läßt in dem einen Siebröhrenelement den plasmolysierten Protoplasten erkennen.) Querschnitte ergaben, daß der Testniederschlag auf den Siebfeldern der Siebplatten sitzt. Verbindungsstränge, welche nach Esau (1953) durch die Siebplatten führen, konnten durch die Phosphatase-Reaktion nicht sichtbar gemacht werden. Auch hier reagieren die Geleitzellen besonders stark. *Cucurbita Pepo*-Sprosse besitzen als Beson-

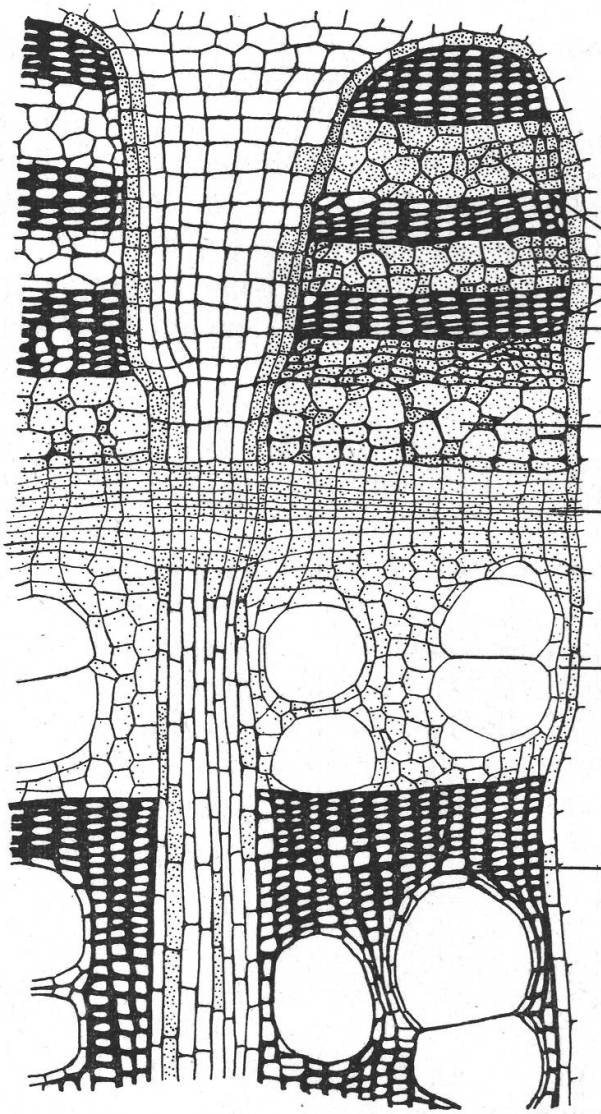


Fig. 4
Vitis vinifera, Sprossachse, Leitbündelpartie. Phosphatase-aktivität durch Punktierung angegeben.

derheit interfasciculäre Siebröhren. Auch sie enthalten Phosphatase (Abbildungen 17 und 18). Die Aktivität ist aber, wie auch in den Siebröhren der Leitbündel, verhältnismäßig gering im Vergleich zu allen übrigen untersuchten Objekten. Auch Phloemparenchymzellen, welche Chloroplasten enthalten *(Heracleum Sphondylium),* reagieren positiv. Bei *Cucurbita Pepo,* wo die Leitbündel bikollateral gebaut sind, besteht kein Aktivitätsunterschied zwischen äußerem und innerem Phloem (Abbildungen 17 und 18). Dasselbe gilt auch für *Solanum tuberosum,* wo

ebenfalls ein äußeres und ein inneres (bzw. im Blattstiel abaxiales und adaxiales) Phloem vorkommt (Abbildungen 25 und 26, 13 und 14). Hier treten in Querschnitten im inneren Phloem wiederum die Geleitzellen sehr stark in Erscheinung (Abbildung 27).

Xylem: In der Sproßachse der ausgewachsenen Maispflanzen (Abbildung 15) konnte auch in Längsschnitten in den Metaxylemtracheiden keine Phosphatase gefunden werden. Hingegen weisen Protoxylem-Trachealelemente, welche den Gefäßgang umsäumen, häufig Phosphatase-Aktivität auf. Bei *Cucurbita* waren die Trachealelemente häufig stärker aktiv als die Siebröhren. Es konnten mehrere Tüpfelplatten oder Perforationenplatten (vgl. Esau [1953]) gefunden werden, welche in den Tüpfeln bzw. in den Perforationen aktive Phosphatase enthielten. Die Kontrolle zeigte keine Schwärzung, es handelte sich also nicht um Kontrollphosphat und nicht um Adsorption von Bleiionen. Ob noch Tüpfelmembranen vorhanden oder richtige Perforationen ausgebildet waren, konnte natürlich wegen der Schwärzung nicht entschieden werden. Auch in längs gestellten Tüpfeln von *Cucurbita*-Trachealelementen war Phosphatase vorhanden (es handelte sich um eine obere Sproßpartie). Es bestätigt sich somit die Angabe von Scott (1942), daß Trachealelemente bis in vorgeschrittene Entwicklungsstadien noch Plasmareste enthalten können. Bei *Vitis vinifera* war in Tracheiden des primären Xylems des Vorjahres, ferner im neuen Xylem Phosphatase wirksam (Figur 4). In jungen Kartoffelknollen reagierten Tracheiden hingegen negativ. Es mag dies mit der elektrischen Ladung des Xylems zusammenhängen. Nach Arwin (1953) sind die Trachealelemente negativ geladen. Die gleich geladenen Glyzerophosphat-Anionen werden deshalb abgestoßen und vermögen nicht in die intakten Zellen zu permeieren.

Das Xylemparenchym zeigt sehr hohe Phosphatase-Aktivität bei *Heracleum Sphondylium* (Abbildung 20) und *Solanum tuberosum* (Abbildung 26). Diese Zellen enthalten bezeichnenderweise Chlorophyll und lagern übrigens auch Stärke ein.

Da bei der austreibenden Setzzwiebel, wo die Zucker in der Schalenzwiebel mobilisiert und aufwärts in die ergrünenden Oberblätter transportiert werden, die Phosphatase-Aktivität im Xylem etwas höher ist als im Phloem, könnte vermutet werden, daß bei der Zuckerdeposition die Phosphatase stärker wirksam sei im Phloem. Um abzuklären, ob das Verhältnis der Aktivitäten von Xylem und Phloem in Beziehung stehe zur Wanderungsrichtung der Zucker, wurde deshalb auch eine stark herangewachsene, voll assimilierende Küchenzwiebelpflanze untersucht. Die Aktivität war auch hier im Xylem etwas höher als im Phloem, und zwar sowohl im grünen Oberblatt als auch in der Zucker einlagernden Schalenzwiebel. Es besteht also (auf alle Fälle bei diesem Objekt) kein Zusammenhang mit der Transportrichtung der Zucker.

b) Kambium

In allen Fällen zeigt dieses Gewebe ziemlich hohe Phosphatase-Aktivität.

c) Markstrahlen

Markstrahlen sind von besonderem Interesse, da sie in hohem Maße Stärke einlagern. Sie besitzen tatsächlich auch sehr starke Phosphatase-Aktivität (Abbildung 28). Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Aktivität und Stärkemobilisation bzw. Stärkedeposition? Um die Mobilisationsphase zu erfassen, wurden folgende Sproßachsen untersucht:

1. *Vitis vinifera* im April, vorjährige Sprosse, welche jetzt Knospen austrieben.
2. Mehrere ältere Sproßachsen von *Solanum tuberosum* am Ende der Vegetationsperiode, als die Blätter der Sprosse zu vergilben begannen. In diesem Zustand wird die Stärke in die Knollen abtransportiert.

Bei *Vitis* (Figur 4) war die Phosphatase-Aktivität am stärksten in den Randzellen des Markstrahles, welche ans Phloem angrenzen, und zwar bereits in entleerten Zellen und solchen, wo die Stärkekörner in Auflösung begriffen waren. Im Bereich des Xylems waren nur vereinzelte Markstrahlzellen aktiv und die Stärkeauflösung weniger weit fortgeschritten. Offenbar wird hauptsächlich das Phloem mit den Stärkemobilisationsprodukten versorgt, und zwar das neue, in Bildung begriffene, sowie auch das letztjährige, welches reaktiviert wird.

Tafel 9

Abbildungen 25 und 26

Solanum tuberosum, Partie aus Sproßachse, Querschnitt. 25 Kontrolle, 26 Test. *aP* äußeres Phloem, *C* Kambium, *X* Xylem, *XP* Xylemparenchym, *iP* inneres Phloem

Abbildung 27

Gleiches Objekt, innere Phloemgruppe. Test. *iF* innere perizyklische Faser (ausgeflossen), *iP* inneres Phloem

Abbildung 28

Gleiches Objekt, Partie aus Xylem. Test. *M* Markstrahl

Abbildung 29

Solanum tuberosum, Partie aus junger Knolle. Test. Schnittdicke 50 μ, die meisten Parenchymzellen angeschnitten und entleert. *L* Leitbündel, *P* unverletzte Parenchymzellen mit Stärkekörnern und sehr starker Phosphatase-Aktivität

Abbildung 30

Ricinus communis, Kotyledo (Keimungsstadium: 18 mm langes Hypokotyl), Querschnitt. Test

Tafel 9

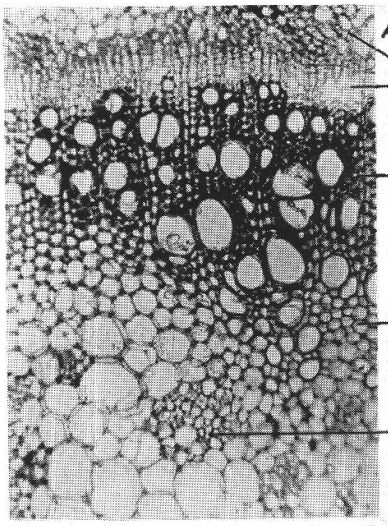


Abb. 25

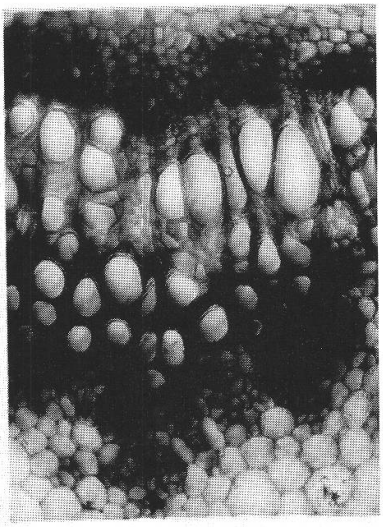


Abb. 26

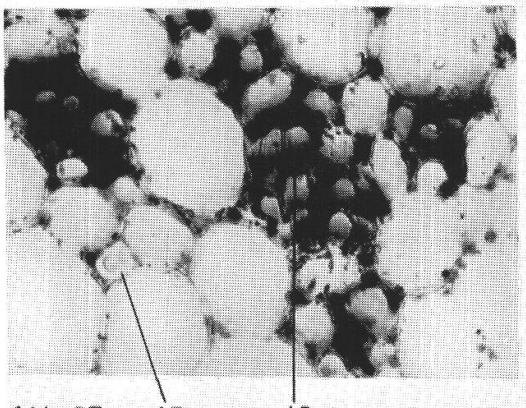


Abb. 27

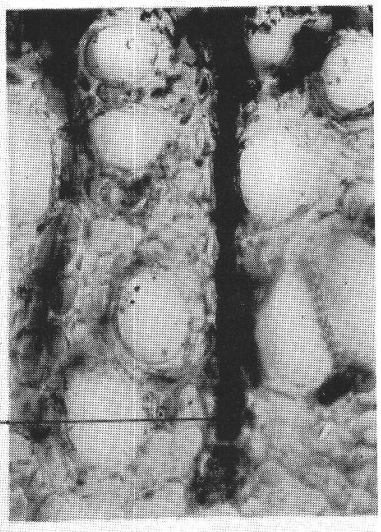


Abb. 28

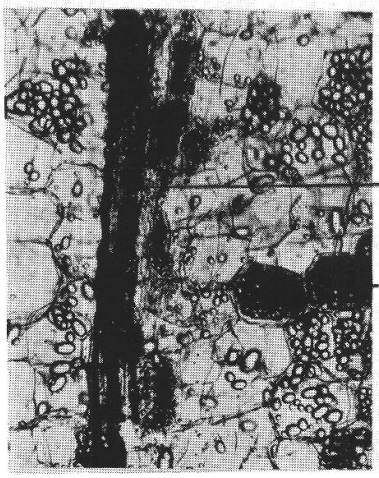


Abb. 29

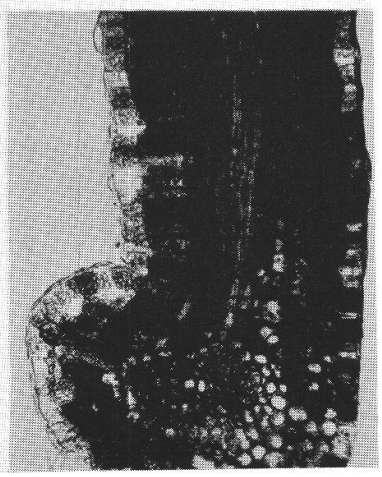
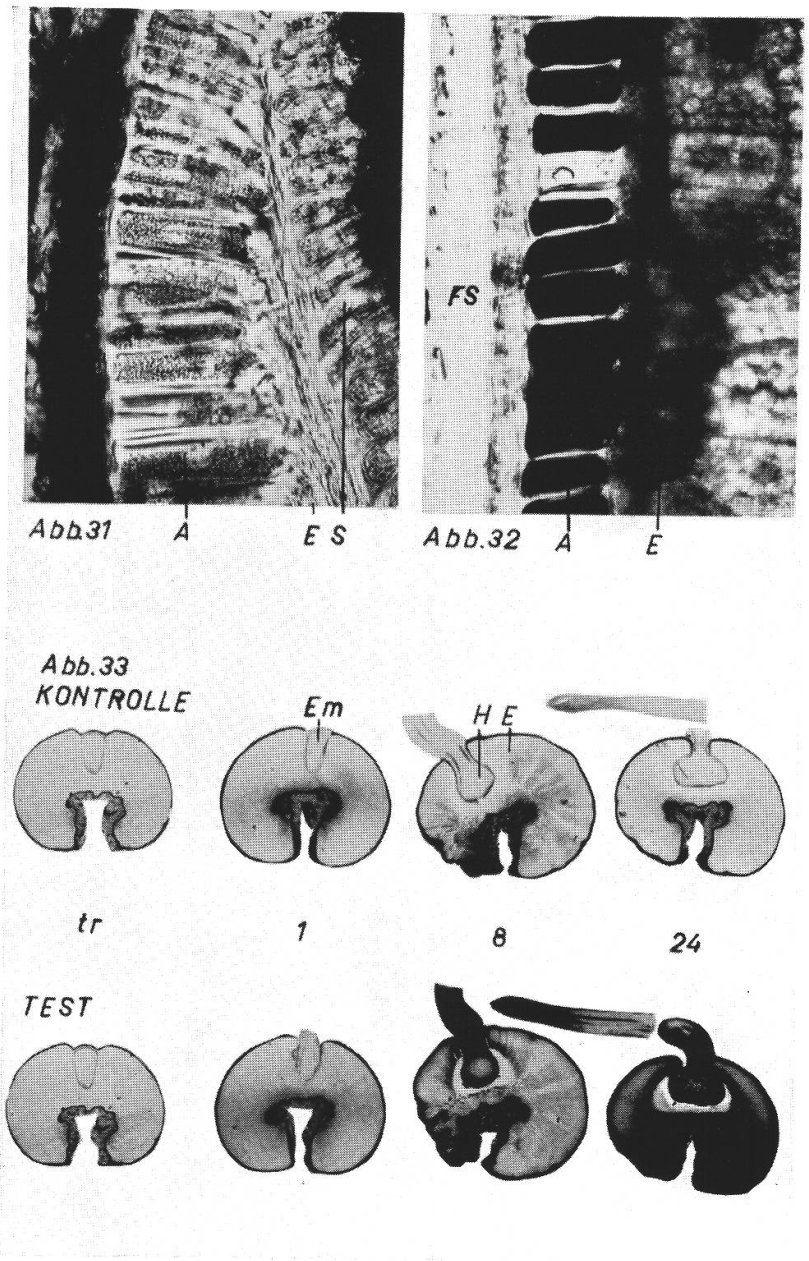


Abb. 30

Tafel 10



Auch in den Kartoffelsprossen war die Phosphatase in den Markstrahlen aktiv; um die Partikel zu identifizieren, auf denen sich der Testniederschlag hauptsächlich zeigte, wurde folgendermaßen verfahren: Nach der Testreaktion wurden die Zellen skizziert und die Lage der Plastiden festgelegt. Der Schnitt wurde zur Auflösung des PbS in verdünnte Salzsäure eingelegt und hernach ausgewaschen. Nach der Jodreaktion konnten die Plastiden wieder im Mikroskop aufgesucht werden. Es handelte sich um Stärkekörner und kleinere Eiweißkörner (vgl. Adsorptionserscheinungen).

Die Depositionsphase wurde mit verhältnismäßig jungen *Solanum*- und *Vitis*-Sprossen erfaßt. Phosphatase-Aktivität war vorhanden. Stärkste Aktivität konnte bei *Solanum tuberosum* zur Zeit stärkster Assimilationstätigkeit festgestellt werden (Abbildung 28). Die Phosphatase ist also sowohl beim Stärkeabbau wie auch bei der Einlagerung wirksam. Bei der Mobilisation ist die Aktivität etwas geringer.

d) Stärkescheide

Markstrahlen erfüllen nicht nur die Funktion der Reservestoffspeicherung, sondern auch des Stoffaustausches in radialer Richtung. Um die Beziehung der Phosphatase-Aktivität zu den Stärkeumsetzungsreaktionen zu erfassen, ist es deshalb angezeigt, das typisch stärkespeichernde Gewebe, die Stärkescheide, einer gründlichen Untersuchung zu unterziehen. Sie wurde mit Sproßachsen von *Heracleum Sphondylium* und *H. Mantegazzianum, Solanum tuberosum* und Blattstielen von *Plectranthus Oertendahlii* durchgeführt. Es wurden ontogenetische Frühstadien, die Phase, wo in den Chloroplasten der Stärkescheidezellen Stärke auftritt, der eigentliche Speicherzustand und die Mobilisationsphase geprüft; letztere wurde vor allem durch Dunkelstellen von *Plectranthus*-Topfpflanzen erfaßt. Es können natürlich in einem bestimmten Objekt gleichzeitig in verschiedenen Zellen verschiedene Stadien der Entwicklung vom Chloroplasten zum Amyloplasten vorhanden sein. Es muß jedesmal die Jodkontrolle durchgeführt werden. Die Phosphatase-Aktivität ist während des Speicherzustandes gering (prak-

---

Tafel 10

Abbildungen 31 und 32

Partie aus dem Maiskorn (2 Tage gekeimt). 31 Kontrolle, 32 Test.
A Aleuronschicht, *E* Endosperm, *S* Scutellumepithel, *FS* Frucht- und Samenschale

Abbildung 33

Samen von *Phoenix dactylifera,* Querschnitte; verschiedene Keimungsstadien:
tr trockener Same, 1 Same mit 1 mm, 8 mit 8 mm und 24 mit 24 mm langem Keimling, letzterer bei 8 Spitzenpartie abgeschnitten, bei 24 Mittelpartie entfernt.
Em Embryo, *H* Haustorium, *E Endosperm*

tisch gleich 0), hingegen ziemlich hoch bei der Mobilisation. *Zellen mit rein grünen Chloroplasten, welche noch keine Spur von Stärke eingelagert hatten, zeigten hingegen sehr starke Phosphatase-Aktivität,* und zwar erschien der Testniederschlag vor allem auf den Chloroplasten, während das Zytoplasma weniger aktiv war (Abbildung 22). Der Testniederschlag konnte nur bei solchen Chloroplasten gefunden werden, welche keine oder nur Spuren von Stärke enthielten. Es stellt sich wiederum das Problem, ob es sich nur um eine Adsorptionswirkung handelt und sich diese im Laufe der Chloroplastenentwicklung ändert. Im Lichtmikroskop kann wieder nicht entschieden werden, ob der Testniederschlag nur auf der Oberfläche oder auch im Innern der Chloroplasten sitzt. Höchst wahrscheinlich sind aber doch die Chloroplasten selbst aktiv, denn es konnten einerseits Zellen gefunden werden, wo das Zytoplasma inaktiv, die Chloroplasten aber schwarz erschienen (Stärkescheide in *Plectranthus-Petiolus*), und anderseits solche Zellen, wo im Zytoplasma stark geschwärzte Eiweißkörnchen vorhanden waren, die Chloroplasten aber keine Bräunung aufwiesen (junger *Solanum tuberosum*-Sproß). Bei letzterem Objekt fanden sich auch solche Chloroplasten, welche nur in einem Teil geschwärzt waren. Nach Behandlung mit HCl und Jod konnte keine Stärke in diesen Chloroplasten festgestellt werden. Es waren aber im selben Objekt zahlreiche Chloroplasten vorhanden, welche in einem Teil Stärke enthielten, aber den Testniederschlag nicht aufwiesen.

Es ist also höchst wahrscheinlich so, daß die Chloroplasten in Frühstadien ihrer Entwicklung (vor oder unmittelbar bei Beginn der Stärkebildung) aktive Phosphatase enthalten.

e) Subepidermale Chlorenchymschichten

Sie reagieren stets positiv. Sie lagern keine Stärke ein bei *Heracleum* (Abbildungen 12, 14, 18 und 20).

f) Sekretgangscheide

(Abbildung 21)

Die innerste Zellschicht um die Sekretgänge in *Heracleum*-Sprossen weist stets sehr starke Phosphatase-Wirkung auf. Das Auftreten der Aktivität in der anschließenden Zellschicht ist wahrscheinlich auf Diffusion des Bleiphosphates oder des Bleisulfides zurückzuführen. In der inneren Zellschicht ist gelegentlich, aber nicht immer, eine intrazelluläre Konzentrationszunahme des Testniederschlages gegen das Sekretganglumen festzustellen.

g) Festigungsgewebe

Die Kollenchymstränge, die Bastfasern und das Libriform in *Heracleum* (Abbildung 20), die äußeren und inneren perizyklischen Fasern

bei *Solanum tuberosum* und die Bastfasern in *Vitis vinifera* enthielten stets hoch aktive Phosphatase. Diese Zellen besitzen auch stets verhältnismäßig viel Kontrollphosphat.

h) Junge Knollen von Solanum tuberosum

(Abbildung 29)

Es wurden Knöllchen von 5 bis 30 mm Durchmesser während der Vegetationsperiode untersucht. Sie befanden sich also zweifellos im Zustand der Stärkeeinlagerung. Hohe Phosphatase-Aktivität war zu finden in den Siebelementen der zuführenden Stolonen und der Knollen selbst sowie in sämtlichen Speicherzellen.

3. Lokalisation in der Wurzel

Die Ergebnisse von Y i n (1945) konnten bestätigt werden, daß die Phosphatase-Aktivität in der *ausgewachsenen* Wurzel ebenfalls im Phloem und etwas weniger stark in den perizyklischen Parenchymen und im Protoxylem auftritt (ferner in der Endodermis und in den Wurzelhaaren). In der *embryonalen* Wurzel zeigt sich die Aktivität stärker im Periblem als im Plerom, ferner in Kalyptra und Koleorhiza.

4. Aktivitätsvergleich Blatt/Stengel und Wurzel

In den obigen histochemischen Untersuchungen ist zum Ausdruck gekommen, daß die Blätter in fast sämtlichen Zellen (ausgenommen nur die Epidermis) ziemlich hohe Phosphatase-Aktivität besitzen, während in Stengel und Wurzel große Gewebeteile (Rinden- und Markparenchym) nur sehr geringe Phosphatase-Wirkung aufweisen. Dieses Ergebnis wird bestätigt durch die quantitative Untersuchung von Gewebshomogenaten durch W i l d m a n n et al. (1947, 1949). Danach ist die Phosphatase-Aktivität des Zytoplasmas mit der ersten der beiden Hauptproteinfraktionen, in die sich das zytoplasmatische Eiweiß der Blätter trennen läßt, verbunden. Diese Proteinfraktion I macht in Blättern durchschnittlich 75 % des totalen zytoplasmatischen Eiweißes aus, in Stengel und Wurzel aber höchstens 20 % (wobei der totale Zytoplasma-Eiweißgehalt in Stengel und Wurzeln nicht höher ist als in den Blättern). Die im histochemischen Test zum Ausdruck gekommenen Aktivitätsunterschiede beruhen also nicht einfach auf unterschiedlicher Permeabilität.

IV. Lokalisation in keimenden Samen

Auf Grund der neueren Forschungsergebnisse über die Rolle der Phosphorsäure im Kohlenhydrat-, Lipoid- und Proteinstoffwechsel scheint es angebracht, außer nach einer Beziehung der Phosphatase-Lokalisation zur Stärkemobilisation auch nach Beziehungen zur Mobi-

lisation von Reservezellulose, Fetten und Eiweißen zu suchen. Diese Probleme lassen sich am besten in keimenden Samen, welche einen dieser Stoffe in ausgeprägtem Maße speichern, untersuchen.

1. Zea Mays (stärkespeichernder Samen)

Dieses Objekt ist schon 1947 von Kugler et al. untersucht worden. Es wurden jedoch nicht verschiedene Keimungsstadien verglichen und auch nicht das Bestehen einer Beziehung zwischen Phosphatase-Lokalisation und Stärkeauftreten verfolgt.

a) Zwei Tage gekeimte Samen

Vgl. Figuren 6 bis 8

Figur 6: Stärkegehalt im Embryo. In Übereinstimmung mit Sachs (1862) konnte viel Stärke im Scutellumparenchym, wenig in Koleoptile, Koleorhiza, Periblem und Mark festgestellt werden. Stärkefrei sind Scutellumepithel, Prokambiumstränge (in denjenigen der Embryonalachse jedoch nach vier Tagen Einlagerung, wahrscheinlich in Zellen, die sich zu parenchymatischen Elementen entwickeln), Blattprimordien in der Koleoptile, Kalyptra und Dermatogen der Primärwurzel.

Figur 7: Phosphatase-Aktivität. Starke Aktivität in Scutellumepithel, Speicherzellen des Scutellums (dieselben Zellen, welche anorganisches Phosphat enthalten, zeigen nach der Testreaktion eine zusätzliche Schwärzung, besitzen also Phosphatase). (Übereinstimmung mit Kugler et al. [1947]; eine regelmäßige Polarisation der Epithelzellen mit stärkerer Aktivität gegen das Endosperm kann aber nicht festgestellt werden. Vgl. auch Abbildung 4.) Schwache Aktivität in den Prokambiumsträngen (erst periphere Partien im Scutellum, vgl. spätere Keimungsstadien weiter unten!).

Figur 8: Kontrollphosphat. In sämtlichen Speicherzellen des Scutellums, Maximum direkt unter Scutellumepithel (vgl. auch Abbildung 6), Spuren in Mark und Periblem der Primärwurzel, Blattanlagen; keines oder nur Spuren in Scutellumepithel und Prokambiumsträngen.

In Ergänzung zu Kugler et al. (1947) ist noch auf folgende Einzelheiten hinzuweisen:

Prokambiumstränge (Figur 5): Phosphatase zeigt sich im gesamten Inhalt der Zellen. Der Testniederschlag erscheint aber akkumuliert gegen die Enden der langgestreckten Zellen. Interessanterweise treten auch die Kerne und insbesondere deren Nukleoli in Erscheinung, was Kugler et al. bei allen übrigen Zellen mit Phosphatase-Aktivität festgestellt hatten. Sie wiesen aber nicht darauf hin, daß es sich um ein Diffusionsartefakt handeln kann. Feigin et al. (1950), ferner Yokoyama et al. (1951) haben in tierischen Zellen nachgewiesen, daß Zellkerne Ca-Phosphat adsorbieren. Novikov (1951) hat dasselbe für

Bleiphosphat gezeigt. D a n i e l l i (1953) kommt aber zum Schluß, daß Zellkerne trotzdem oft *alkalische* Phosphatase enthalten (zum Beispiel in Zwiebelwurzelspitzen).

Speicherzellen des Scutellums (Figur 5): Diese Zellen weisen großflächige, unbehöfte Tüpfel oder Siebareale auf, welche meist sternförmig

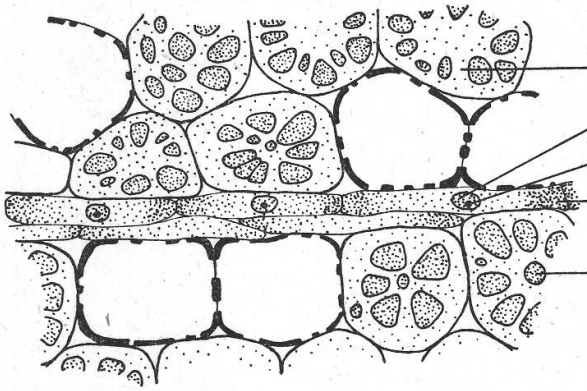


Fig. 5
Maiskorn, Partie aus dem Scutellum

angeordnet sind. Der Testniederschlag erscheint außer im Zellinnern hauptsächlich auf diesen Siebfeldern (auf der Zellinnenseite) (Interpretation siehe Teil B).

Haftet die Phosphatase den Stärkekörnern in den Speicherzellen direkt an?

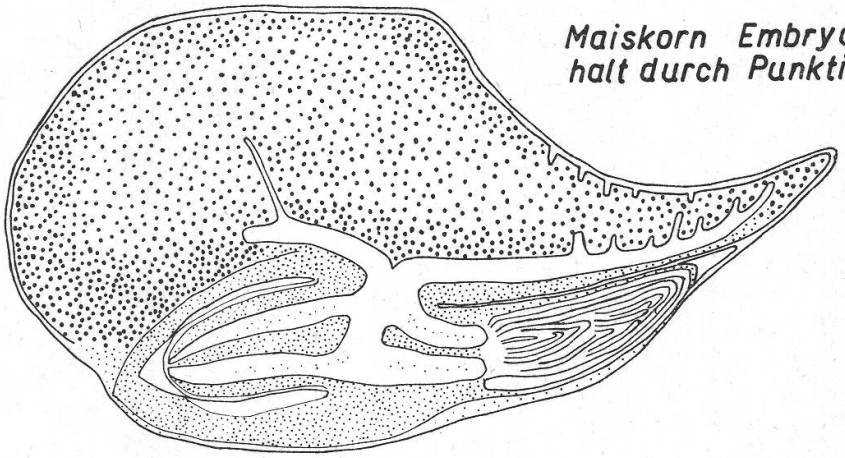


Fig. 6
Maiskorn Embryo, Stärkegehalt durch Punktierung angegeben

Die Stärkekörner sind hie und da nach der Testreaktion mit einem feinen Film von PbS beschlagen. Gelegentlich sitzen auch größere Niederschlagskörner auf ihnen. In der Regel sind die Stärkekörner aber frei, und die PbS-Flocken sind im Zytoplasma verteilt. In den beiden ersteren Fällen handelt es sich offenbar um intrazelluläre Diffusion und Adsorption des Bleiphosphates oder Bleisulfides.

Aleuronschicht und Stärketeil des Endosperms: Wie bei Kugler, zeigte sich auch in diesen Untersuchungen sehr hohe Phosphatase-Aktivität in der Aleuronschicht, den ersten zwei bis drei darunter gelegenen Zellagen des Endosperms (Abbildungen 31 und 32), sowie

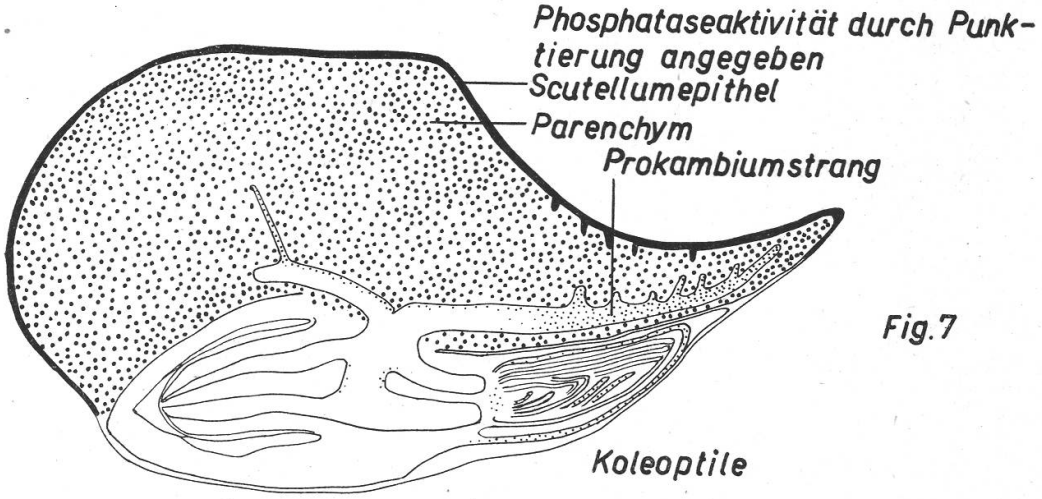


Fig. 7

schwache Aktivität in einer schmalen Endospermzone, welche am Scutellum anliegt.

Kommt die Schwärzung im Stärketeil des Endosperms nur durch Diffusion des Bleiphosphates oder -sulfides aus der Aleuronschicht bzw. dem Scutellumepithel zustande? Wenn auch bei Maissproßxylem keine interzelluläre Diffusion festgestellt werden konnte, so ist sie hier viel-

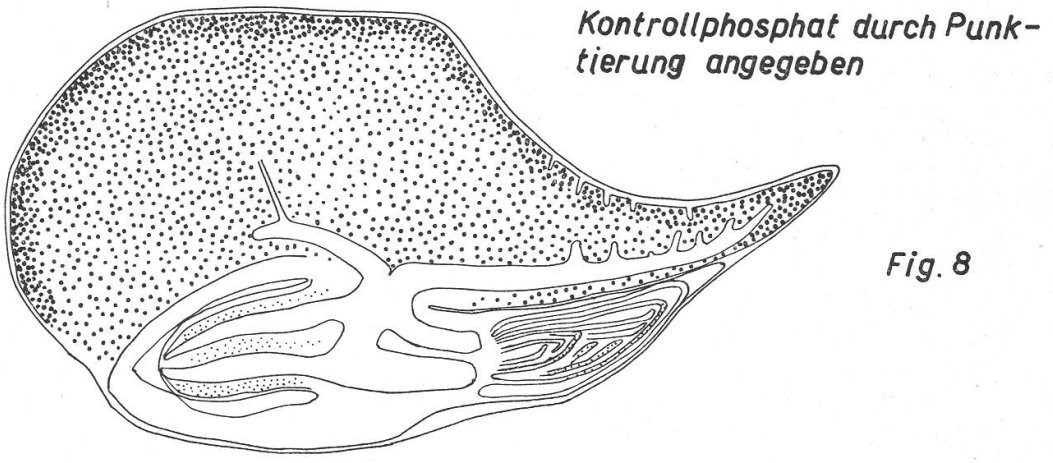


Fig. 8

leicht doch möglich, denn die Membranen sind weniger dick und können infolge anderer Struktur permeabel sein. Daß die Phosphatase selbst durch die Membranen auswandert und das Ferment sich als typisches Exoenzym verhält, ist unwahrscheinlich, denn in späteren Keimungsstadien ist die Phosphatase nicht weiter ins Endosperm vorgerückt. Offenbar besteht höchstens eine schwache Exoenzymtendenz.

Die Abklärung, ob der Stärketeil des Endosperms wirklich Phosphatase enthält, ergab sich aus quantitativen Versuchen mit Gewebefraktionen (vgl. *c*).

Ob die saure Phosphatase allgemein ein Endoenzym sei, kann nicht aus den vorliegenden Beobachtungen beurteilt werden. Es ist festgestellt worden, daß Phosphatasen in Exoenzymsystemen von Getreide- und Tomatenwurzeln eine Rolle spielen (Rogers et al. [1942]).

b) Vergleich verschiedener Keimungsstadien

Es wurden der Gehalt an Kontrollphosphat und Stärke und die Phosphatase-Aktivität bei 0, 1, 2, 4, 8 und 16 Tagen gekeimten Maiskörnern verglichen.

Kontrollphosphat:

Scutellum: Ständige Abnahme von 0 bis 16 Tagen. Im ungequollenen Zustand ist sehr viel anorganisches Phosphat vorhanden, schon 1 Tag Quellung bringt eine frappante Abnahme.

Scutellumepithel: Enthält stets nur sehr wenig Kontrollphosphat; durch die Phosphatase freigesetztes Phosphat muß also abwandern.

Prokambiumstränge: Es tritt eine schwache Akkumulation vor allem in der Embryonalachse und der jungen Wurzel ein.

Endosperm: Im trockenen Samen etwas Kontrollphosphat vorhanden. Später nur noch Spuren. Schwaches Konzentrationsgefälle von der Aleuronschicht gegen das Innere des Endosperms.

Stärke:

Scutellum: Abnahme im Verlauf der Keimung. Schon nach 8 Tagen sind fast alle Speicherzellen entleert.

Endosperm: Nach Untersuchungen von Bessenich (1924) und Dahm (1924) erfolgt die Endospermentleerung von der Peripherie her. Die hier untersuchten Keimungsstadien zeigten jedoch einen viel deutlicheren Stärkeabbau vom Scutellum aus. Letzteres Ergebnis hat übrigens auch Sachs (1862*a*) gefunden. Die unterschiedlichen Ergebnisse mögen darauf zurückzuführen sein, daß in der Versuchsanordnung von Bessenich und Dahm im voraus das Scutellum entfernt worden war. Wenn diese Verfasser und auch Pfeffer (1893) zum Schluß kommen, daß das Scutellum für die Entleerung des Endosperms nicht nötig sei, so geht aus obigem doch hervor, daß im intakten Maiskorn offenbar Stoffe vom Scutellum ins Endosperm diffundieren, welche den Stärkeabbau fördern.

Phosphatase-Aktivität:

In Scutellumspeicherzellen, Scutellumepithel und den diesem benachbarten Endospermzellen kann die Phosphatase-Aktivität vom

zweiten Tag an festgestellt werden. In Aleuronschicht, den unmittelbar darunter liegenden stärkehaltigen Zellen und Prokambiumsträngen kann schon im trocken geschnittenen Korn eine sehr schwache Aktivität wahrgenommen werden. In den der Aleuronschicht direkt benachbarten Endospermschichten nimmt schon am ersten Tag die Aktivität stark zu. Vom zweiten Tag an ist übereinstimmend in der Aleuronschicht, der subaleuronalen Endospermschicht, dem Scutellumepithel, den Scutellumspeicherzellen und den Prokambiumsträngen starke Phosphatase-Aktivität vorhanden, die im Verlauf der Keimung eher noch etwas zunimmt. Nur in den dem Scutellum benachbarten Endospermzellen bleibt die Enzymwirkung sehr schwach. Obschon die Stärkeabbauzone immer weiter peripheriewärts rückt, folgt ihr die Phosphatase-Aktivität nicht. In den Prokambiumsträngen tritt die Aktivität zuerst in den peripheren Partien auf und schreitet in den Embryo hinein fort. Vom achten Tage an läßt sich eine Differenzierung in außen gelegene Spiral- und Ring-Trachealelemente und zentral gelegene Siebelemente erkennen, wobei letztere stärker positiv reagieren.

Koleoptile, Primärblättchen und Koleorhiza weisen vom vierten Tag an starke Aktivität auf. In den Prokambiumsträngen der Primärwurzel tritt sie eher etwas später auf; bis dahin überwiegt die Aktivität im Periblem; die Kalyptra reagiert schwach.

Die Beziehung Phosphatase-Aktivität/Stärkevorkommen wird in Teil B diskutiert.

c) Quantitative Bestimmung der Phosphatase-Aktivität

Die Methode wurde unter I., 3, beschrieben. Die Samen waren 8 Tage gekeimt, die Primärblätter hatten sich entfaltet, die Wurzeln besaßen eine Länge von 5 bis 8 cm. Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse der Analysen wieder, bezogen auf 100 Samen. Das im Test zur Verfügung gestellte Substratgemisch enthält im voraus freie Phosphorsäure, welche, bezogen auf 100 Samen, $1{,}045_6$ mg Phosphor (Blindwert) ausmacht. Der P-Gehalt des in ungespaltener Form im Substratgemisch enthaltenen Glyzerophosphates beträgt $69{,}312_5$ mg. Die Zahlenwerte in den einzelnen Kolonnen bedeuten:

Kolonne 1: Nach der Inkubation im Testmaterial vorhandenes anorganisches Phosphat minus Blindwert (ausgedrückt in mg Phosphor) (Test auf γ genau).

Kolonne 2: Nach der Inkubation im Kontrollmaterial vorhandenes anorganisches Phosphat.

Kolonne 3: Durch Phosphatase-Wirkung freigesetztes Phosphat (Differenz von 1 und 2).

Kolonne 4: Spaltungsrate in Prozent der zur Verfügung gestellten $69{,}312_5$ mg Glyzerophosphatphosphor.

Kolonne 5: Volumen der betreffenden Gewebe von 100 Samen (vor dem Homogenisieren).

Kolonne 6: Pro mm^3 Gewebevolumen durch Phosphatase-Wirkung freigesetzter Phosphor (γ P/mm^3).

Kolonne 7: Grobe Verhältniszahlen.

	1	2	3	4	5	6	7
	mg P	mg P	mg P	%	ml	$\gamma/\mu l$	
Aleuronschicht	26,812	22,048	4,764	6,87	0,978	4,870	6
Endosperm (ohne Aleuronschicht)	52,497	7,500	44,997	54,92	36,2	1,243	$1^1/_2$
Scutellum	100,004	57,280	42,724	61,64	11,0	3,884	5
Koleoptile	103,644	44,779	58,865	84,93	76,5	0,769	1
Wurzel	57,270	12,956	44,314	63,93	28,5	1,555	2

Ergebnisse:

1. In der Aleuronschicht ist die Volumeneinheit ein weniges aktiver als im Scutellum. Die Aleuronschicht ist aber viermal aktiver als der Stärketeil des Endosperms.
2. Der Stärketeil des Endosperms enthält also tatsächlich Phosphatase (vgl. *a*). Es ist also nicht einfach der Testniederschlag, welcher aus den angrenzenden Geweben ins Endosperm hinein diffundiert. Wenn man auf Grund der histochemischen Ergebnisse berücksichtigt, daß im Endosperm die Phosphatase hauptsächlich in einer schmalen Zone innerhalb der Aleuronschicht lokalisiert ist, so erkennt man die hohe Aktivität dieser wenigen Zellschichten.

Diese Zahlen bestätigen also in groben Zügen die relativen Aktivitäten, die im histochemischen Test zum Ausdruck kamen: Aleuronschicht sehr stark aktiv, Scutellum (im besonderen Scutellumepithel) etwas weniger, aber auch sehr stark aktiv, Stärketeil des Endosperms in der Randzone stark aktiv. Für Koleoptile und Wurzeln ergibt sich offenbar deshalb eine geringe relative Aktivität, weil im wesentlichen ja nur die Leitbündel (in den Primärblättern dazu das Chlorenchym, in der Wurzel hingegen zusätzlich die Endodermis und perizyklischen Parenchyme) aktive Phosphatase enthalten.

2. Triticum vulgare

Die Phosphatase ist in genau gleicher Weise lokalisiert wie im Maiskorn. Einzelheiten wurden bereits schon von Glick und Fischer (1946) angegeben.

3. Phoenix dactylifera

Dieser monokotyle Samen speichert keine Stärke, auch nicht in nennenswertem Maß Fett oder reduzierende Zucker. Die Endospermzellen enthalten natürlich etwas Eiweiß. Weitaus die Hauptmasse macht aber die *Reservezellulose* aus, welche in Form von dicken Zellwandverstärkungen abgelagert ist. Im Verlauf der Keimung werden diese Wandverdickungen immer mehr abgebaut und die mobilisierten Reservestoffe vom Kotyledo aufgenommen, der sich in Form eines Haustoriums immer weiter im Endosperm ausbreitet.

Keimung: Die Samen für die im folgenden dargelegten Versuche keimten in frischem Brunnenwasser während mehrerer Wochen nicht. Sie konnten jedoch im Thermostat in feucht ausgeschlagenen Petrischalen bei 24° C zur Keimung gebracht werden. Die Petrischalen waren zuvor im Dampftopf sterilisiert und die Samen selbst mit Calciumhypochloritlösung entkeimt worden. Nach vier Tagen keimten die ersten Samen.

a) Phosphatase-Aktivität im Samen mit 24 mm langem Keimling

Vgl. Abbildung 33

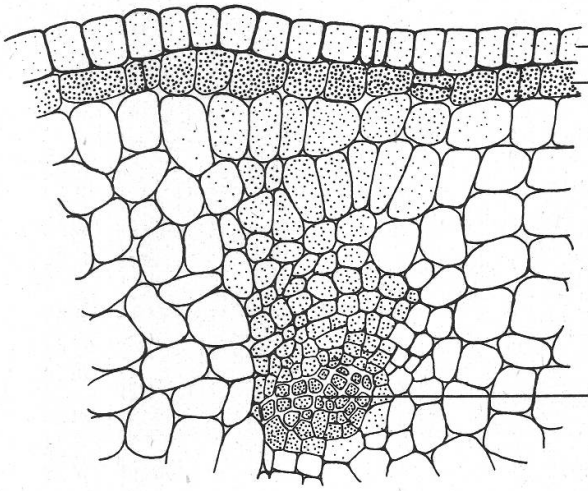
Kontrollphosphat ist nur wenig vorhanden im Zellinnern völlig intakter Zellen des Endosperms, in den Prokambiumsträngen des Haustoriums und in der meristematischen Spitzenpartie des Kotyledos.

Phosphatase ist aktiv im Endosperm, in der Epidermis und den Prokambiumsträngen des Haustoriums sowie in der Spitzenpartie des Kotyledos.

Endosperm: Um das Kotyledonarhaustorium herum erscheint im Endosperm eine farblose Zone. Es sind dies fast völlig entleerte Zellen, von denen im wesentlichen nur noch die Reservezellulose-Membranen zu erkennen sind. Während des Abbaues dieser Membranen tritt weder Kontrollphosphat noch Phosphatase-Aktivität in ihrer unmittelbaren Umgebung auf. Außerhalb dieser Zone ist im Endosperm aber Phosphatase wirksam, und es tritt auch etwas freies Phosphat auf (siehe 8-mm-Keimungsstadium, Abbildung 33). Die Phosphatase-Aktivität ist auch etwas erhöht in den an die helle Zone grenzenden Zellen. Interpretation siehe Teil B.

Haustorium: Im 24-mm-Stadium erscheint der gesamte Haustoriumfuß aktiv (Abbildung 33) (Wachstum, zugleich Stärkeeinlagerung im Parenchym!). In späteren Keimungsstadien (Figur 9) ist die Phosphatase jedoch hauptsächlich in der Subepidermis wirksam, in geringerem Maß in der Epidermis. Es ist zu beachten, daß die Zellvermehrung im Haustorialparenchym beim Wachstum des Haustoriumfußes im Verlaufe der Keimung allein durch Zellteilung in der Subepidermis zustande kommt (Antiklinal- und Periklinalteilungen). In der Epidermis

geht nur ein Dilatationswachstum (durch Antiklinalteilungen) vor sich (schon von Sachs [1862 *b*] festgestellt). Figur 9 zeigt auch einen quer getroffenen, sehr aktiven Prokambiumstrang. Interessanterweise reagieren auch die zwischen Subepidermis und Prokambiumstrang gelegenen Zellen positiv. Es handelt sich wohl kaum nur um Diffusion des Bleiphosphates (oder des Bleisulfides), sonst hätte diese vom Prokambiumstrang aus in allen Richtungen gleich weit laufen müssen. Einzelne Tracheiden demonstrieren die Enzymwirkung sehr deutlich (vgl. Abbildung 5), wobei die Plasmodesmen klar in Erscheinung treten. In den Leitbündeln des Kotyledooberteiles ist das Enzym sowohl im Phloem wie auch im Xylem aktiv.



Kontrollphosphat ist in denselben Zellen lokalisiert wie die Phosphatase. Offenbar handelt es sich um durch die Phosphatase-Tätigkeit im natürlichen Stoffwechsel freigesetztes Phosphat.

b) Vergleich verschiedener Keimungsstadien

Um verschiedene Stufen des Reservestoffabbaues zu erhalten, wurden die angekeimten Samen bei verschiedenen Temperaturen der weiteren Keimung überlassen. So konnten schließlich gleichzeitig ungequollene Samen und solche mit 1, 8 und 24 mm Keimlingslänge der Untersuchung unterzogen werden (Abbildung 33).

Der *Kontrollphosphatgehalt* schwankt im Endosperm unwesentlich. Im Keimling akkumuliert sich etwas Phosphat dort, wo auch die Phosphatase aktiv ist.

Die *Phosphatase-Aktivität* nimmt im Endosperm vom 8- zum 24-mm-Stadium zu. Im Haustorium ist sie im 8- und 24-mm-Stadium sehr stark in einer breiten Randzone (in einem wesentlich späteren Keimungsstadium nach sechs Wochen ist die Phosphatase fast ausschließlich in der Subepidermis lokalisiert). Es ist in diesem Zusammenhang nochmals auf die oben erwähnten Zellteilungen im Fuß des

Haustoriums hinzuweisen. Die Prokambiumstränge sind im trockenen Samen noch inaktiv; die Phosphatase tritt auch hier erst nach Erreichung eines gewissen Quellungsgrades in Erscheinung.

Außerdem zeigt sich die Phosphatase im 8- und 24-mm-Stadium in der wachsenden Spitzenpartie des Kotyledos (meristematisches Gewebe).

4. Allium Cepa

Auch dieser Monokotylensamen enthält als wesentlichen Reservestoff in Form von Zellwandverdickungen des Endosperms abgelagerte Reservezellulose. Das Zellumen ist relativ größer als bei *Phoenix dactylifera* und weist Aleuronkörner, Lipoide, Proteine und reduzierende Zucker auf. Letztere Stoffe findet man auch im spiral- oder kreisförmig im ruhenden Samen aufgerollten Kotyledo.

a) 1 Tag gequollener Samen

Kontrollphosphat enthält das ganze Endosperm in reichlichem Maße, ebenso das Parenchym des Haustoriums. Prokambiumstrang und Haustorialepithel weisen kein freies Phosphat auf.

Die Phosphatase-Aktivität (Figur 10) ist in diesem Keimungsstadium im Endosperm noch schwer festzustellen wegen des hohen Gehaltes an Kontrollphosphat. (In späteren Keimungsstadien ist der Schwärzungsunterschied jedoch deutlich, da der Kontrollphosphat-Gehalt zurückgeht.) Das Enzym ist praktisch in allen unverletzten Zellen des Endosperms wirksam. Auch das ganze Haustorium zeigt Phosphatase-Aktivität. Für sein Parenchym gelten genau dieselben Beobachtungen wie für das Endosperm. Wesentlich ist, daß auch dieses Kotyledonarhaustorium eine Epidermis mit Phosphatase-Aktivität aufweist. Die Prokambiumstränge besitzen in diesem Keimungsstadium erst eine schwache Aktivität.

b) Vergleich verschiedener Keimungsstadien

Es wurden Samen, welche 0, 5, 7, 11, 14, 17 und 20 Tage gekeimt hatten, gleichzeitig geschnitten und verglichen.

Endosperm:

Die Zellen werden vom Haustorium her peripheriewärts aufgelöst, wobei Zellinhalt mit Kontrollphospat und Reservezellulose der Membranen ungefähr gleichzeitig abgebaut werden. In den ersten Tagen der Quellung und Keimung ist ein stärkerer Phosphatverbrauch festzustellen als im späteren Verlauf der Keimung.

Der Testniederschlag erscheint im Zellinnern auf feinen Partikelchen und auf Zellmembranen. In abgebauten Zellen verschwindet die Phosphatase-Aktivität.

Haustorium:

Reservestoff- und Kontrollphosphat-Gehalt:	Phosphatase-Aktivität:
Ungekeimter Samen:	
Epidermis: nur Spuren von Kontrollphosphat	keine Enzymaktivität
Prokambiumstrang: nur Spuren von Kontrollphosphat	keine Enzymaktivität
Parenchym: sehr viel Kontrollphosphat, prall gefüllt mit Reservestoffen.	Enzymaktivität nicht feststellbar
5 Tage gekeimter Samen:	
Epidermis: kein Kontrollphosphat	starke Enzymaktivität
Prokambiumstrang (differenziert in Xylem und Phloem): Null	Phloem: schwach, Xylem: sehr schwach
Parenchym: abgenommen	sehr schwach
Zu dieser Zeit beginnen die Zellteilungen im Haustorium; Verbrauch von Phosphat für Aufbau von Protoplasma!	
7 Tage gekeimter Samen:	
Parenchym fast völlig entleert, fast kein Kontrollphosphat mehr; im ausdifferenzierten Xylem (Spiral-Trachealelemente) PO_4^{-3} vorhanden	In Epidermis, Parenchym und Leitbündel zugenommen
11 Tage gekeimter Samen:	
Die Reservestoffe in der Mittelpartie des Kotyledos sind völlig aufgezehrt. Der Abbau schreitet gegen das im Samen drin stekkende Ende des Kotyledos fort	Epidermis: zugenommen Im Leitbündel überwiegt jetzt die Aktivität im Phloem über diejenige des Xylems. Parenchym: stark
17 Tage gekeimter Samen:	
Auch Spitzenpartie des Haustoriums völlig entleert. Sehr wenig Kontrollphosphat, diffus verteilt	Auf den Membranen der entleerten Zellen sehr stark. Epidermis und Leitbündel zugenommen.
20 Tage gekeimter Samen:	
Samen so weit aufgelöst, daß keine verwendbaren Schnitte von Haustorien mehr hergestellt werden können.	

Ergebnis: Das Kontrollphosphat, das zu Beginn der Keimung reichlich im Parenchym vorhanden ist, verschwindet vom 5. Tag an. Die Phosphatase-Aktivität tritt erst nach Erreichen eines gewissen Quellungsgrades ein in sämtlichen Geweben und nimmt dann ständig zu. Innerhalb des Leitbündels geht sie auf das Phloem über.

Diffusion der Phosphatase vom Haustorium ins Endosperm?

In den ersten 2 bis 3 Zellschichten des Endosperms, die ans Haustorium angrenzen, ist die Aktivität der Phosphatase sehr hoch.

Eine erste Orientierung an 3, 6 und 9 Tage gekeimten Samen schien Zunahme der Phosphatase-Aktivität in diesen Zellen zu zeigen. Es waren jedoch alles Schnitte, in denen das Haustorium längs getroffen war. Die Phosphatase konnte beim Schneiden in verschiedenem Maß aus dem Haustorium verschleppt worden sein. Das Problem konnte fol-

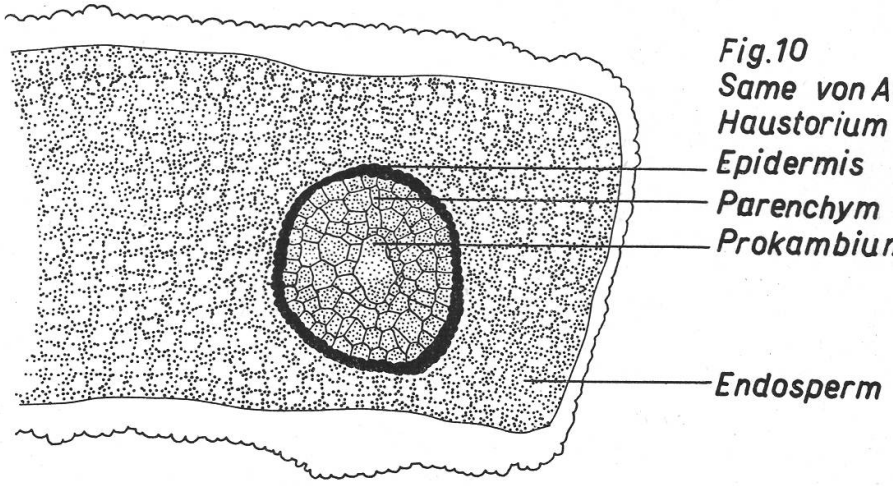


Fig.10
Same von Allium Cepa
Haustorium quer:

gendermaßen abgeklärt werden: In den verschiedenen Keimungsstadien wurden die Kotyledonarhaustorien erst aus dem Samen herausgezogen und dann erst die Samen(-reste) geschnitten, und zwar so, daß möglichst Querschnitte entstanden. Es zeigte sich in aufeinanderfolgenden Keimungsstadien kein Vorrücken der Phosphatase ins Endosperm. Das Ergebnis ist also gleich wie beim Maiskorn: wenn schon eine Exoenzym-Tendenz vorhanden ist, so ist diese sehr gering.

5. Ricinus communis

Von medizinisch-physiologischer Seite (Verzar et al. [1936], Favarger [1949]) wurde die Ansicht geäußert, daß möglicherweise auch die Fettresorption im Darm an Phosphorylierung und Dephosphorylierung gebunden sei und somit der alkalischen Phosphatase in Duodenal- und Dünndarmschleimhaut auch eine Bedeutung in der Fettresorption zukomme. Es ist deshalb gegeben, dieses Problem auch im Pflanzenreich zu verfolgen, wenigstens zunächst in dem Sinn, ob Vor-

aussetzungen dafür (Auftreten von Phosphorsäure und Phosphatase an spezifischen Stellen) verwirklicht seien. Für eine solche Untersuchung ist der Samen von *Ricinus communis* sehr gut geeignet. Er speichert bekanntlich in hohem Maße im Endosperm Fett (bis 70 %), daneben auch Eiweiß und Phytin in den Aleuronkörnern.

a) Samen mit Keimlingen von 18 mm Hypokotyllänge

Endosperm: Kontrollphosphat zeigt sich in und auf den Aleuronkörnern. Diese sind zum großen Teil bereits aufgelöst. Die Testreaktion ergibt eine zusätzliche Schwärzung der Aleuronkörner. Es läßt sich wiederum nicht entscheiden, ob Phosphatase im Innern der Aleuronkörner vorhanden ist oder ob es sich nur um Diffusions- und Adsorptionserscheinungen handelt. Phosphatase im Zytoplasma ist vorhanden.

Kotyledonen (vgl. Abbildung 30). Kontrollphosphat ist in sämtlichen Zellen enthalten. Die Phosphatase-Aktivität ist außerordentlich stark. Um nur einen so dichten Niederschlag zu erhalten, daß die Schnitte noch durchmikroskopiert werden konnten, wurde die Inkubationszeit auf 7½ Minuten und die Ammonsulfidkonzentration auf ¼ der üblichen Konzentration herabgesetzt, ferner das Ammonsulfid nur so lange appliziert, bis von Auge abgeschätzt die richtige Schwärzung erreicht war. Die Einwirkungszeit wurde dabei abgestoppt, um die Kontrolle unter genau gleichen Bedingungen durchführen zu können.

Phosphatase ist in sämtlichen Zellen vorhanden. Das Maximum der Aktivität weist das Schwammparenchym auf, das auch am meisten Stärke enthält. Es folgen Leitbündel (Phloem und auch Xylem aktiv) und Palisadenparenchym, Epidermis der morphologischen Unterseite (Kontaktfläche mit dem Endosperm) und schließlich die Epidermis der Oberseite. Es ist interessant, daß die Epidermis der Kontaktseite aktiver ist als diejenige der Oberseite; sie enthält auch mehr Stärke.

b) Vergleich verschiedener Keimungsstadien

Es wurden trockene Samen, 4 Tage gequollene und solche mit 5, 18, 30, 38, 48, 55, 70 und 90 mm langem Hypokotyl untersucht.

Endosperm: Kontrollphosphat ist zu Beginn der Keimung sehr viel vorhanden, es wird dann aber rasch verbraucht oder abtransportiert. Die Phosphatase-Aktivität ist im trockenen Samen Null (Bestätigung der Abhängigkeit vom Quellungsgrad), zeigt sich erstmals im 5-mm-Stadium, nimmt im Verlaufe der weiteren Keimung im Innern wieder ab und an der Peripherie zu und tritt im letzten Stadium sehr stark auf den Zellmembranen in Erscheinung. Die Aleuronkörner beginnen sich schon früh zu zersetzen (Auflösung ihrer Grundsubstanz schon bei 4 Tagen Quellung), und die Reservestoffe nehmen dann entsprechend ab.

Kotyledonen: Das Kontrollphosphat bleibt konstant oder nimmt eher etwas ab. Anfänglich enthalten alle Zellen (außer den Prokam-

biumsträngen) Aleuronkörner. Im 18-mm-Stadium sind fast sämtliche aufgelöst. Die Phosphatase-Aktivität ist zu Beginn der Quellung Null und tritt erstmals deutlich in Erscheinung im 18-mm-Stadium. In dieser Entwicklungsstufe läßt sich auch erstmals Stärke in den Kotyledonen erkennen. Intrazellulär erscheint der Testniederschlag besonders deutlich auf kleinen, kugeligen Eiweißkörnern. Es kann sich nicht um die Globoide handeln, denn diese wären durch die Essigsäure in Schritt 4 der Testreaktion gelöst worden. Einsetzen der Phosphatase-Aktivität und Beginn der Stärkebildung fallen also zeitlich zusammen. Es besteht auch in bezug auf Aktivitätsabstufung und Stärkegehalt in verschiedenen Geweben eine positive Korrelation (vgl. oben *a*). Interessanterweise ist die Beziehung aber gerade umgekehrt wie in den Chloroplasten der Stärkescheide (*Heracleum* und *Solanum tuberosum:* dort verschwand die Enzymwirkung beim Einsetzen der Stärkebildung!).

6. Pisum sativum

Dieser Samen enthält kein Endosperm. Die Reservestoffe (Stärke, Eiweiß und etwas Fett) sind in die stark angeschwollenen, halbkugeligen Kotyledonen eingelagert. Dementsprechend ist kein Absorptionsepithel an den Kotyledonen im Kontakt mit dem Endosperm vorhanden. Wohl aber unterscheiden sich die beiden äußersten Zellschichten in Form und Inhalt von dem vorwiegend Stärke speichernden, großzelligen innern Gewebe des Kotyledos: die Epidermis enthält nur Aleuronkörner und die aus etwas größeren, mehr oder weniger rechteckigen Zellen gebaute Subepidermis nebst Aleuronkörnern auch etwas Stärke. Die Epidermis hat somit einen ähnlichen Charakter wie die Aleuronschicht in den Getreidekörnern. Hier ist auch Phosphatase lokalisiert.

a) 2 Tage gekeimter Samen

Kontrollphosphat ist in sämtlichen Zellen vorhanden. Die Phosphatase (Figur 11) ist besonders aktiv in den Prokambiumsträngen, etwas weniger in der Epidermis und Subepidermis und verhältnismäßig gering im Parenchym der Kotyledonen. Einzelne parenchymatische Zellen lassen stärkere Aktivität erkennen. Diese Zellen enthalten auch eher etwas mehr Kontrollphosphat. Alle Parenchymzellen sind mit Stärkekörnern prall gefüllt, und ihre Membranen weisen großflächige primäre Tüpfelfelder (möglicherweise Siebfelder) auf.

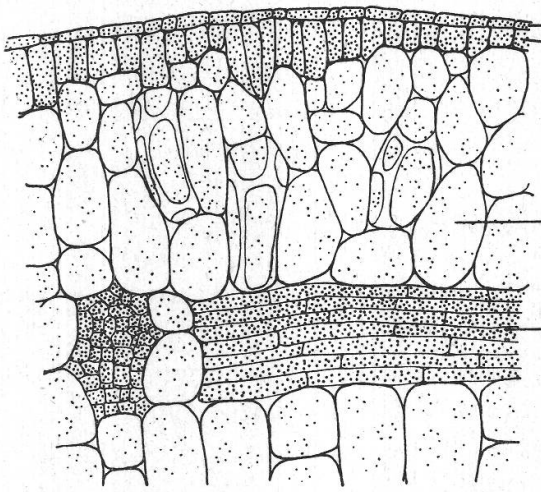
Phosphatase in den Geweben des Hilums

Es handelt sich teils um sklerenchymatische Zellen, teils um die hier in mehrere Schichten entwickelte Subepidermis. Letztere Zellen enthalten auch reichlich Eiweiß. Die Phosphatase mag hier auch eine Rolle gespielt haben zur Zeit der Reservestoffeinlagerung, denn das

Hilum ist ja diejenige Stelle, welche die Stoffe beim Eintritt in die Samenanlage passieren müssen.

b) Vergleich verschiedener Keimungsstadien

Es werden Samen, welche 2, 4 und 16 Tage gekeimt haben, verglichen. In der Epidermis und Subepidermis steigt der Gehalt an Kontrollphosphat vom zweiten auf den vierten Tag und nimmt nachher wieder ab. Die Phosphatase-Aktivität nimmt hingegen ständig zu. Offenbar wird in diesen Zellen Phosphat freigesetzt, und die Phosphatquelle erschöpft sich allmählich. Im Parenchym ist Kontrollphosphat stets in solchen Zellen vorhanden, welche auch Phosphatase-Aktivität zeigen. Der Abbau der Reservestoffe schreitet von den Prokambium-



strängen aus gegen die Peripherie und gegen das Zentrum fort. Entleerte Zellen zeigen keine Phosphatase-Aktivität mehr (gleiche Beobachtung im Endosperm von *Allium Cepa!*).

V. Meristematische Gewebe in Keimlingen und ausgewachsenen Pflanzen

Alle Gewebe mit aktivem Wachstum zeigen Phosphatase-Aktivität. Es ist dies festgestellt worden beim Embryo im keimenden Maiskorn, insbesondere für Koleoptile und darin eingeschlossene Primärblättchen, Koleorhiza, Kalyptra (nur bei jungen Keimlingen kontrolliert) Wurzelspitzengebiet. Analoges gilt für den Embryo von *Triticum, Pisum, Allium, Phoenix* (vgl. Abbildung 33: Spitzenpartie der Kotyledos und Haustorialfuß). In der jungen Wurzel ist das Periblem stärker aktiv als das Plerom (erst später zeigt sich das Maximum in den Leitbündeln).

Das Kambium im Sproß von *Solanum tuberosum* wies schwächere Phosphatase-Aktivität auf, offenbar weil es seine Tätigkeit schon weitgehend eingestellt hatte, denn der Sproß war voll entwickelt. In dieses Kapitel sind wohl auch die in Differenzierung stehenden Prokambiumstränge einzureihen. In allen Samen waren sie während der ersten (1 bis 2) Keimungstage inaktiv, worauf eine steigende Aktivität einsetzte.

VI. Universelle Lokalisation

In geringem Maß kann Phosphatase-Aktivität in sämtlichen Zellen, welche nicht verletzt sind, festgestellt werden. Wesentlich ist die Wahl der Schnittdicke. Damit sicher eine unverletzte Zell-*Lage* erfaßt wird, müssen die Schnitte mindestens doppelte Dicke eines Zelldurchmessers haben.

So konnte festgestellt werden, daß in allen Zellen der Schalenzwiebel sowie des Markes und des Rindenparenchyms in den Sprossen von *Zea Mays, Heracleum Sphondylium* und *Solanum tuberosum* eine (wenn auch zum Teil sehr geringe) Phosphatase-Aktivität besteht. Offenbar enthalten alle lebenden Zellen das Ferment im Zytoplasma.

VII. Intrazelluläre Lokalisation, Polarisation

In den vorangehenden Kapiteln sind Angaben gemacht worden über die Phosphatase-Lokalisation in bzw. auf Zellkernen, Chloroplasten, Stärkekörnern, Eiweißkörnchen, Aleuronkörnern, kugeligen Eiweißplastiden in *Ricinus*-Kotyledonen, Siebplatten und Perforationenplatten bei *Cucurbita* und Siebfeldern in Zellen des Maiskotyledos sowie über Polarisationserscheinungen in Prokambiumstrangzellen, Kotyledonarepithelien und Sekretgangscheiden. Diese Ergebnisse können zur Kenntnis genommen werden, aber es ist zu betonen, daß es sich wegen intrazellulärer Diffusion und Adsorption des Bleiphosphates oder des Bleisulfides um Artefakte handeln kann.

VIII. Glukose-1-phosphat und Fruktose-6-phosphat als Substrat

In der Testreaktion wurde das Glyzerophosphat durch Glukose-1-phosphat in äquimolarer Konzentration ersetzt. Damit wurden folgende Objekte geprüft: Blattspreite, Blattstiel und Sproßachse von *Solanum tuberosum* und *Zea Mays,* junge Knollen von *Solanum tuberosum,* 2 Tage gekeimtes Maiskorn und *Ricinus*-Samen (Keimungsstadium: 18 mm Hypokotyllänge). Es ergab sich genau dieselbe Lokalisation der Phosphatase und mit denselben Aktivitätsabstufungen wie mit Glyzerophosphat. Schnitte aus der Sproßachse von *Zea Mays* wurden auch mit Fruktose-6-phosphat kontrolliert. Auch dieses Substrat wurde in denselben Zellen wie Glyzerophosphat gespalten, aber in geringerer Intensität.

TEIL B

Physiologische Bedeutung der Aktivität saurer Phosphatase

Im natürlichen Stoffwechsel der Pflanzen muß die physiologische Bedeutung der sauren Phosphatase in den meisten Geweben eine andere sein als die Spaltung von Glyzerophosphat, denn dieses tritt ja nur in geringem Maß auf (beim Abbau von Phosphatiden und als Nebenprodukt in der Glykolyse). Besonders starke Aktivität ist streng gewebespezifisch lokalisiert, erscheint aber doch in sehr verschiedenen Geweben und kann deshalb nicht bloß eine oder zwei, sondern muß mehrere Bedeutungen haben im größeren Zusammenhang des Stoffwechsels. Um die Problematik der Deutung der Phosphatase-Aktivität darzulegen, sei im folgenden eine kurze Betrachtung über Spezifität sowie Hydrolyse-, Synthese- und Phosphokinasewirkung der Phosphatasen angestellt.

I. Spezifität der Phosphatasen

Es ist bekannt, daß die Phosphatasen allgemein und besonders die Phosphomonoesterasen (Klassifikation nach Roche [1951]) weitgehend substratunspezifisch wirken. Dementsprechend konnten auch so zahlreiche Phosphorsäureester in den verschiedenen Testmethoden auf saure Phosphatase verwendet werden: α- und β-Glyzerophosphat, β-Naphtholphosphat, *p*-Nitrophenylazo-α-Naphtholphosphat, Phenylphosphat, Phenolphthaleinphosphat, Eosinphosphat und Fluoreszeinphosphat. Mit dem in den vorliegenden Untersuchungen angewandten Glyzerophosphattest wurden sicher Phosphomonoesterasen, und zwar innerhalb der vier isodynamischen Typen durch die Pufferung auf *pH* 5,1 die Typen II und IV, evtl. aber weitere Fermente erfaßt. Bei der Phosphomonoesterase des Maisblattes handelt es sich — entsprechend der Indifferenz gegenüber Mg^{+2} — um den Typ II. Courtois et al. (1950) haben in wässerigen Extrakten in Blättern von *Aesculus, Hedera* und *Syringa* die Typen II und III festgestellt. Bei den zahlreichen weiteren Lokalisationen wurde nicht mehr geprüft, ob Typ II oder IV vorlag, denn diese Identifikation bringt ja keine weitere Erkenntnis als eben die, ob Mg^{+2} aktivierend oder indifferent wirkt.

Es wurde also nicht *ein* bestimmtes Ferment erfaßt, sondern die *Aktivität* saurer Phosphatasen, mit andern Worten: es wurden diejenigen Zellen und Gewebe festgestellt, in denen Phosphatasen vorkommen, welche in saurem Milieu Glyzerophosphat zu spalten vermögen. Für die Interpretation der Bedeutung dieser Phosphatase-Aktivität sind also zwei Punkte zu beachten:

1. Welche weiteren Phosphate des pflanzlichen Stoffwechsels fallen außer Glyzerophosphat als Substrat in Betracht?

2. Welche biochemischen Reaktionen in den betreffenden Zellen spielen sich ab, durch andere Fermente (als die Phosphomonoesterase II oder IV) katalysiert, welche eine Wirkung auf Glyzerophosphat ausüben könnten?

Beispiele zu 1.: Die verschiedenen Zuckerphosphate der Glykolyse, alle Phosphomono-, evtl. auch -di- und -polyester, Pyrophosphate, ATP (Glick et al. [1945]), ferner Nukleotide, Aminosäure-Phosphorsäure-Verbindungen, Abbauprodukte von Phospholipoiden usw.

Für 2. fallen in Betracht: ATP-ase, Phytase, Nukleotidasen, evtl. weitere Phosphoesterasen. Zum Beispiel ist in Kürbis von Stumpf (1952) ein Ferment gefunden worden, welches von Adenylsäure Phosphorsäure abspaltet. Phosphodiesterasen, Pyrophosphatasen, Phosphoamidasen und Phosphoacylasen sind wohl auszuschließen, denn nach Roche (1951) sollen diese Fermente spezifisch auf die durch ihren Namen bezeichneten Bindungen wirken.

Um Hinweise auf die Spezifität zu gewinnen, waren Glukose-1-phosphat und Fruktose-6-phosphat als Substrat verwendet worden. Glukose-1-phosphat war in allen Zellen, welche Glyzerophosphat zu hydrolysieren vermochten, gleich gut wie letzteres gespalten worden, Fruktose-6-phosphat hingegen weniger gut. Letztere Aktivitätsverminderung kann ihre Ursache in einem anderen *p*H-Optimum für Fruktose-6-phosphat haben oder darin, daß das Ba-Salz verwendet wurde, während Glyzerophosphat und Glukose-1-phosphat als Na-Salz vorlagen. Es ist möglich, daß alle drei Substrate durch dasselbe Ferment gespalten wurden. Es kann sich aber auch um (stets) vergesellschaftete Enzyme handeln.

II. Hydrolytische, synthetische und Phosphokinase-Wirkung saurer Phosphatasen

Man ist versucht, auf Grund des Verlaufes der Testreaktion ohne weiteres auf hydrolytische Wirkung der sauren Phosphatasen zu schließen. Es muß deshalb betont werden, daß das Auftreten des Bleiphosphatniederschlages kein Beweis ist für spaltende Wirkung des Enzymsystems unter den in der lebenden Zelle normalerweise herrschenden Bedingungen: durch das Fermentsystem wird das Gleichgewicht zwischen Glyzerophosphat einerseits und Glyzerin + Phosphorsäure anderseits katalysiert. Durch die Anwesenheit von Pb^{+2} im Substratgemisch wird die Phosphorsäure gefällt und somit ständig aus dem Gleichgewicht entzogen, weshalb sie nach dem Massenwirkungsgesetz auch ständig wieder nachgeliefert wird durch Spaltung von Glyzerophosphat. Ob Hydrolyse- oder Synthesewirkung der Phosphatasen eines bestimmten Gewebes vorliegt, müßte von Fall zu Fall durch quantitative Phosphor-

säurebilanz festgestellt werden. In dieser Arbeit ist für das keimende Maiskorn eine solche Untersuchung durchgeführt worden: In vier Fraktionen ergab sich hydrolytische Wirkung. (Für die Aleuronschicht war dies nicht festzustellen, weil zufolge der geringen Fermentmenge die Reaktion offenbar noch nicht genügend weit fortgeschritten war.) Es ist aber schon von verschiedenen Autoren synthetische Wirkung von saurer Phosphatase bekanntgegeben worden (Roche et al. [1937, 1944, 1945 *a, b*]; Kay [1928, 1932]; Kursanov et al. [1938]; Courtois [1938]). Roche et al. (1944, 1945 *a, b*) haben sogar aus Extrakten vieler pflanzlicher und tierischer Gewebe einen modifizierenden Faktor isoliert, welcher sonst hydrolytisch wirkenden Phosphatasen synthetisierende Wirkung verleiht. Schließlich können Phosphatasen nach Axelrod (1948) sowie Meyerhoff und Green (1950) gelegentlich auch Phosphokinase-Wirkung haben.

Zufolge der Substratunspezifität, hydrolytischen, synthetischen und Phosphokinase-Wirkung der Phosphatasen ist es unmöglich — auf Grund der vorliegenden Untersuchungen — die Phosphatase-Aktivität einer Zelle einer bestimmten biochemischen Reaktion zuzuordnen. Das Auftreten der Aktivität in verschiedenen Zellen (oder Geweben) gleicher physiologischer Funktion gibt aber — wie im folgenden gezeigt werden soll — doch Hinweise für bestimmte Deutungen. Synthese- und Phosphokinase-Wirkung werden in XIV. besonders berücksichtigt.

III. Beziehung der Phosphatase-Lokalisation zum Stärkevorkommen

Stärke wird in den meisten pflanzlichen Zellen aus Glukose-1-phosphat durch das Ferment Phosphorylase aufgebaut. In einigen Spezialfällen mögen andere Wege bestehen (Hehre [1948]).

Der Abbau kann, außer durch α- und β-Amylasen, Q- und Z-Enzym, auch durch die Phosphorylase erfolgen, wobei wieder Glukose-1-phosphat entsteht. Somit könnte die saure Phosphomonoesterase eine Bedeutung haben im Stärkeabbau, indem sie das Glukose-1-phosphat hydrolysieren würde. Es sind nun tatsächlich zahlreiche Phosphatase-Lokalisationen aufgezeigt worden an Orten, wo Stärke auftritt: Stärketeil des Endosperms des Weizenkorns, Scutellum-Speicherzellen, Stomata-Schließ- und Nebenzellen, Leitbündelscheide in der Blattspreite von *Zea Mays,* stärkere Aktivität in Stärkeblättern als in Zuckerblättern; Markstrahlen, Stärkescheide, Xylemparenchym und einzelne Phloemparenchymzellen, Speicherzellen in Erbsenkotyledonen und Kartoffelknollen, *Ricinus*-Kotyledonen. Die Phosphatase-Aktivität fällt aber nur bei einem Teil obiger Lokalisationen mit dem *Abbau* der Stärke zusammen: Endosperm der Gramineen, Speicherzellen in den Scutellen und Erbsenkotyledonen, Markstrahlen, Stärkescheide. Die Aktivität ist zudem in Markstrahlen, Stärkescheide und Speicherzellen der Erbsenkotyledonen

nicht sehr hoch. Es ist möglich, daß die Phosphatase hier eine Rolle spielt für den Stärkeabbau über Glukose-1-phosphat.

Die Phosphatase wird aber sicher eine Bedeutung haben im Abbau phosphorsäurehaltiger Komponenten der Stärke. Daß Kartoffelstärke (insbesondere Grenzdextrine) Phosphorsäure in Esterbindungen enthalten, ist durch Corvaisier (1950) sehr wahrscheinlich gemacht worden durch den Abbau dieser Substrate unter dem Einfluß von Phosphatasen. Fernandez (1948) hat in der Stärke zahlreicher Samen Phosphatide, zum Teil auch Phytin nachgewiesen. Auch Cedrangolo (1942), Waldschmidt et al. (1937) und Thomas et al. (1950) haben aus Getreide- und Kartoffelstärke durch sog. Amylophosphatase und Z-Enzym Phosphorsäure freigesetzt. Bonner (1950) beschreibt in Anlehnung an Waldschmidt und Mayer (1935) in seinem Buch ein «stärkeschmelzendes» Enzym, eine dritte Amylase, welche zugleich auch Phosphatase-Aktivität besitzt und insbesondere Glyzerophosphat spaltet.

In diesen Stärke abbauenden Zellen könnte die Phosphatase auch in einen intrazellulären Phosphorsäurezyklus eingeschaltet sein: Phosphorolyse der Stärke, Hydrolyse der Phosphatester durch die Phosphatase (bzw. Phosphatasen), erneute Verwendung der abgespaltenen Phosphorsäure für die Phosphorolyse.

Interessanterweise war in der *Stärkescheide* während des Stärkeaufbaus und während des Speicherungszustandes keine Phosphatase-Aktivität festzustellen. Es ist dies deshalb sinnvoll, weil aktive Phosphatase durch Abbau von Glukose-1-phosphat und der Dextrinphosphate der Speicherung und dem Aufbau entgegenwirken müßte.

Sonderbarerweise wurde aber auch hohe Phosphatase-Aktivität festgestellt *in Geweben, welche Stärke einlagern:* junge Kartoffelknollen, *Ricinus*-Kotyledonen und Markstrahlen. Zudem entstand der Testniederschlag im Beispiel der Kartoffelknolle auch bei der Inkubation mit Glukose-1-phosphat. Dies ist hier aber kein Beweis für die Spaltung von Glukose-1-phosphat durch die *Phosphatase,* denn Phosphorsäure muß auch frei werden beim Stärkeaufbau durch Phosphorylase. Diese Phosphorsäure wird natürlich ebenfalls durch die im Substratgemisch vorhandenen Pb^{+2}-Ionen gefällt. Aus den Versuchen geht also nur hervor, daß an den Orten des Stärkeaufbaues die Phosphatase auf Glyzerophosphat wirkt; ob sie auch das Glukose-1-phosphat hydrolysiert, muß dahingestellt bleiben. Glukose-1-phosphat kann der Phosphatase-Wirkung dadurch entzogen sein, daß Phosphatase und Phosphorylase intrazellulär verschieden lokalisiert sind. Nach Brachet und Jeener (1948), Jeener (1946 und 1948) ist die Phosphatase in Ribonukleinsäurekörnern, nach Yin und Sun (1947) die Phosphorylase in den stärkebildenden Leukoplasten lokalisiert. Es besteht nun die Möglichkeit, daß die Ribonukleinsäurekörner für Glyzerophosphationen per-

meabel, für die größeren Glukosephosphationen hingegen impermeabel sind. Glyzerophosphat würde dann durch die Phosphatase gespalten, während Glukosephosphat für die Stärkesynthese zur Verfügung stünde. Stärkeaufbau aus Glukose-1-phosphat ist aber auch möglich, wenn die Phosphatase die Phosphorylase konkurrenziert, weil 1. die Stärke als Niederschlag aus dem Reaktionsgleichgewicht verschwindet, 2. die Phosphorylase-Reaktion möglicherweise mit größerer Geschwindigkeit abläuft als die Phosphatase-Reaktion, 3. das *p*H *in vivo* vielleicht so liegt, daß die Phosphatase praktisch inaktiviert, die Phosphorylase-Wirkung aber doch noch möglich ist (zum Beispiel *p*H 7).

Schließlich wäre noch in Erwägung zu ziehen, ob die Phosphatase in diesen Geweben nicht Synthese- oder Phosphokinase-Wirkung hat, ferner ob die Stärkesynthese nicht von einem anderen Stoff als Glukose-1-phosphat ausgehen könnte (Hehre [1948]). (Auch Bailey et al. [1951] haben bei der Gewinnung von Phosphorylase aus Kartoffelknollen mit diesem Ferment saure Phosphatase vergesellschaftet vorgefunden.)

Die Lokalisation der Phosphatase im Scutellumepithel der Gramineen drängt einem den Gedanken auf, daß diesem Gewebe eine analoge Funktion zukomme wie dem alkalische Phosphatase enthaltenden Epithel der Darmschleimhaut: Resorption von phosphorylierten Zuckern unter Spaltung in Zucker + Phosphorsäure. Die Phosphorolyse der Stärke im Endosperm könnte durch Phosphorsäure aus der Aleuronschicht ermöglicht sein (siehe X.). Daß Glukose-1-phosphat im Scutellumepithel tatsächlich gespalten werden kann, wurde unter A, VIII., gezeigt.

Sonderbarerweise konnten aber bisher unter den Endospermabbauprodukten nur Spuren von Zuckerphosphaten nachgewiesen werden. Außerdem stellte Dahm (1924) bei Versuchen über die Endospermentleerung von Maiskörnern, wobei die Scutellen entfernt worden waren, eine Hemmung des Stärkeabbaues fest, wenn an der Basis der Körner Phosphorsäure zugesetzt wurde! Es erscheint somit doch wieder wahrscheinlich, daß der Stärkeabbau im Gramineen-Endosperm (wenigstens vorwiegend) durch die Amylasen erfolgt. Die Phosphatase im Scutellumepithel könnte aber immer noch eine Bedeutung haben in der Resorption phosphorsäurehaltiger Komponenten der Stärke (vgl. auch XI.).

In sämtlichen Geweben, welche Stärke enthalten, tritt auch Phosphatase-Aktivität auf. Als sichere Funktion dieser Phosphatase kann aber nur die Hydrolyse von phosphorsäurehaltigen Komponenten der Stärke genannt werden. Außerdem gibt es aber zahlreiche Phosphatase-Lokalisationen, wo keine Stärke vorhanden ist, die Bedeutung des Fermentes also eine andere sein muß.

IV. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität in der Photosynthese und deren unmittelbaren Folgeprodukten

Das Vorhandensein der Phosphatase-Aktivität in sämtlichen Chlorenchymen (Palisaden- und Schwammparenchym des Blattes, Leitbündelscheide im *Zea Mays*-Blatt, chloroplastenhaltige Rindenparenchymschichten und Xylemparenchym) läßt eine Bedeutung in der Photosynthese vermuten. Aus neueren Untersuchungen (Calvin et al. [1952], Wintermans et al. [1952] und Kandler [1950]) geht hervor, daß in der Photosynthese zahlreiche Phosphorsäureester auftreten. Die meisten Phosphate verlieren aber den Phosphorsäurerest beim Übergang in andere Verbindungen nicht, oder er wird durch Transphosphatasen weitergegeben. Freie Phosphorsäure tritt nur in einer Teilreaktion sicher auf: Überführung der 1,3-Diphosphoglyzerinsäure in Gegenwart von DPN in 3-D-Phosphoglyzerinaldehyd + freies PO_4^{-3} (Vislmiac et al. [1952]). Wenn das Enzym substratunspezifisch wirkt, spaltet es in der Testreaktion das Glyzerophosphat.

Aus den Versuchen von Kandler (1950), der auf eine Blattbelichtung während 30 Sekunden eine Dunkelperiode von 90 Sekunden folgen ließ, während der eine Vermehrung des anorganischen Phosphates um 30 % eintritt, geht hervor, daß in der Photosynthese Phosphatasen mitbeteiligt sein müssen.

Eine Rolle spielen kann Phosphomonoesterase in der Saccharosesynthese. Nach Calvin et al. (1952) wird wahrscheinlich aus Uridindiphosphoglukose und Fruktosephosphat Uridindiphosphat und Saccharosephosphat aufgebaut. In Phloemsäften (Untersuchungen von H. Wanner) konnten aber keine Zuckerphosphate, hingegen freier Rohrzucker festgestellt werden. Das Saccharosephosphat muß also irgendwo dephosphoryliert werden. Diese Hydrolyse kann in den Chlorenchymen, der Leitbündelscheide, den Geleitzellen oder evtl. beim Eintritt in die Siebröhren erfolgen. Die Phosphatase in den Siebröhren könnte bewirken, daß keine erneute Phosphorylierung der Saccharose eintritt (Schutzfunktion der Phosphatase). Sollte aber der Rohrzucker, wie Kursanov et al. (1950) postulieren, durch Übertragung eines Glukoserestes aus 1,4-α-glykosidischem Polysaccharid auf Fruktose unter Wirkung einer Transglykosidase gebildet werden, so müßte Phosphatase erst das in der Photosynthese sicher entstehende Fruktose-1,6-diphosphat, evtl. Fruktose-6-phosphat dephosphorylieren.

Weitere Indizien für die Beteiligung der Phosphatase in der Saccharosesynthese sind: F^- und gewisse Konzentrationen von Phosphorsäure hemmen, Mg^{+2} fördert die Rohrzuckerbildung (Meeuse [1952]). Nach Kursanov et al. (1939) sowie Virtanen et al. (1934) verlieren Blätter mit Phosphatmangel die Fähigkeit zur Saccharosebildung aus Hexosen, aber durch Phosphorsäure-Verabreichung kann die Syn-

thesefähigkeit wieder hergestellt werden. Die Menge von synthetisierter Saccharose wird in vielen Pflanzen begrenzt durch die Menge von vorhandenem Fruktosemonophosphat (Kursanov et al. [1939], Hartt [1943]).

V. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität in Chloroplasten-Frühstadien

Es ist gezeigt worden, daß die Chloroplasten der Stärkescheide vor Beginn der Stärkeeinlagerung wahrscheinlich Phosphatase-Aktivität aufweisen. Das Enzym könnte hier eine Rolle in der Chloroplastenentwicklung spielen, denn in diesen werden unter anderem ja Phospholipoide aufgebaut. Es kann auch ein Zusammenhang bestehen mit dem Eiweißaufbau.

VI. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität in der Mobilisation von Reservezellulose

Die Ergebnisse der Versuche mit Samen von *Allium Cepa* und *Phoenix dactylifera* lassen die Möglichkeit einer Bedeutung saurer Phosphatasen in der Mobilisation der Reservezellulose zu. Anorganisches Phosphat in den Endospermen für die Phosphorylierung steht während der Keimung zur Verfügung. Die absorbierenden Kotyledonarepithelien weisen in beiden Fällen Phosphatase-Aktivität auf. Über den Abbau von Reservezellulose durch Hemizellulasen ist noch wenig Sicheres bekannt. Vor allem fortgeschrittene Keimungsstadien von Dattelsamen demonstrieren die Möglichkeit von Phosphorylierung der Reservezellulose (vgl. Abbildung 37).

Im peripheren Endosperm ist Phosphatase-Aktivität vorhanden. Dadurch wird offenbar das festgestellte anorganische Phosphat freigesetzt. Sofern diese Phosphorsäure nicht in den gleichen Zellen wieder in andere Verbindung eingeht, müßte sie auf dem Weg ins Kotyledonarhaustorium die weiße Zone passieren. Hier sind die Zellen weitgehend entleert und im wesentlichen nur noch die Reservezellulosemembranen zu erkennen. Da hier aber kein freies Phosphat in Erscheinung tritt, liegt die Vermutung nahe, daß es in Phosphorylierungsvorgängen der Reservezellulose verschwindet. Dabei würden Hexosephosphate (zum Beispiel Mannosephosphat, Galaktosephosphat) und evtl. Pentosephosphate entstehen, welche bei der Resorption in der Haustorialepidermis wieder gespalten würden. In den Zwiebelsamen ist aber im gesamten Endosperm Phosphatase aktiv. Die Zuckerphosphate müßten also höchst wahrscheinlich schon dort gespalten werden. Somit müßte der Phosphatase in der Haustorialepidermis doch eine andere Funktion zukommen (siehe XI.).

VII. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität in der Fettresorption?

Die beim Abbau des Fettes im Endosperm des *Ricinus*- und Zwiebelsamens entstehenden wasserunlöslichen Fettsäuren müssen für den Abtransport umgewandelt werden. Es entstehen über unbekannte Intermediärprodukte wahrscheinlich wanderungsfähige Kohlenhydrate. Die Lokalisation von Phosphatase im absorbierenden Kotyledonarepithel des *Ricinus*-Samens läßt eine Bedeutung in der Resorption phosphorylierter Intermediärstoffe zu. Mahler (1952) hat gezeigt, daß bei der Oxydation von Fettsäuren (in tierischem Gewebe) Pyrophosphat frei wird. Dies entspricht einer Phosphatase-Aktivität. Wenn die Oxydation im *Ricinus*-Samen gleich verläuft, ist hier ein Enzymsystem vorhanden, welches wahrscheinlich auch auf Glyzerophosphat wirksam ist. Über andere mögliche Funktionen der Phosphatase im *Ricinus*-Samen vergleiche VIII., X. und XI.

VIII. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität im Eiweiß-Stoffwechsel

Auf Grund des Auftretens der Phosphatase-Aktivität in allen jungen, aktiv wachsenden sowie in absterbenden Zellen, ferner in den aleuronhaltigen Zellen (Gramineensamen; Erbsenepidermis und -subepidermis sowie Speicherzellen in den Kotyledonen; sämtliche Gewebe im *Ricinus*-Samen) läßt es sich überlegen, ob diese Aktivität durch Enzyme bedingt sein kann, welche am Auf- oder Abbau von Eiweißen beteiligt sind. In Betracht fallen vor allem die Phospho- und Nukleoproteide. Es ist bekannt, daß *beim Abbau* der Nukleoproteide Mononukleotide entstehen, welche durch Nukleotidasen (eine besondere Gruppe von Phosphatasen) in Nukleoside und Phosphorsäure zerlegt werden (Greenstein [1942]). Phosphatasen aus Samen, Keimlingen und Blättern können diese Nukleotidasereaktion katalysieren (Brederecke [1938]). Ferner gibt es auch Nukleophosphatasen, welche direkt aus Nukleinsäuren Phosphorsäure herausspalten. Daß Nukleinsäuren in absterbenden Zellen abgebaut werden, bestätigen Versuche von Fries (1952), der vor dem Laubfall einen Rückgang des Nukleinsäurephosphors um 20 bis 40 % feststellte.

Es ist auch gelungen, mit Phosphatasen aus Kartoffeln die Phosphoproteide Ovalbumin und Plakalbumin zu spalten (Perlmann [1952]). Der Abbau verschiedener Phosphoproteide erfolgt durch Proteasen zu Phosphopeptonen, und diese werden weiter durch Phosphatasen zerlegt (Rimington und Kay [1926], Rimington [1927]).

Alle oben erwähnten Phosphatasen können mit größter Wahrscheinlichkeit auch das im hier durchgeführten Test verwendete Glyzerophosphat spalten. Dies würde die vorgefundene Phosphatase-Aktivität in alten Trachealelementen, letzter Abbauphase in *Ricinus*- und

Zwiebelendospermen sowie den Festigungsgeweben (Kollenchymstränge, Libriform, Holz- und Bastfasern, sklerenchymatische Zellen) erklären. Bei Autolyse können möglicherweise auch Phosphatasen gebildet oder aktiviert werden, welche die weitere Zersetzung der verschiedensten Phosphate bewirken. *Beim Aufbau* der Phospho- und Nukleoproteide dürften Phosphatasen wohl eher eine indirekte Rolle spielen, indem sie aus Phosphorsäure-Donatoren die Phosphorsäure zur Verfügung stellen würden. Diese Bedeutung kann der Phosphatase-Aktivität in allen meristematischen Geweben zukommen (vgl. A, V.), in Prokambiumsträngen und jungen Trachealelementen, im Beispiel der Datteltracheide (A, IV., 3 *a*), Dattelhaustorium (Subepidermis, Epidermis) und *Ricinus*-Kotyledonen. Schließlich kann die an den obigen Orten sich zeigende Phosphatase-Aktivität auch auf die Tätigkeit gewisser Fermente der Aminosäure-Synthese zurückzuführen sein; zum Beispiel setzt die Glutaminsäure-Synthetase Phosphorsäure frei (Stumpf [1952]). Moog (1946) weist darauf hin, daß Proteide vielleicht aus phosphorylierten Intermediärstoffen aufgebaut werden. Die oft beobachtete Akkumulation des Testniederschlags auf dem Zellkern junger Zellen mag ihre Ursache darin haben, daß sich im Zytoplasma enthaltene Phosphatase während des Aufbaus der (zytoplasmatischen) Ribonukleinsäuren um deren Bildungsort konzentriert (cf. XIV.).

IX. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität im Abbau von Phospholipoiden

Außer den Phospholipoiden in absterbenden Chloroplasten fallen vor allem die Phosphatide in Keimblättern der Getreidesamen in Betracht. Letztere enthalten vor allem Lezithin (Hoffmann [1933]). Der Abbau von Lezithin führt durch die Fermente Lezithinase A und B zu Glyzerophosphat, und dieses wird natürlich durch saure Phosphomonoesterase gespalten. Daß die Phosphatide bei der Keimung im Scutellum abgebaut werden, ist sicher, denn im Keimling erscheint bei weitem keine entsprechende Menge an Phosphatiden (Channon et al. [1943]; Jordan et al. [1933]; Houget et al. [1934]. Die Phosphatase-Aktivität in den Scutellumspeicherzellen des Mais- und Weizenkeimlings hat also sicher die Bedeutung der Hydrolyse von Glyzerophosphat aus Phosphatiden (vgl. auch nächstes Kapitel).

X. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität im Abbau von Phytin

Das Auftreten der Phosphatase-Aktivität in der Aleuronschicht der Getreidesamen, der Erbsenepidermis, -subepidermis und -speicherzellen, ferner in sämtlichen Geweben des keimenden *Ricinus*-Samens sowie im Scutellum der Getreidesamen und im Zwiebelsamenendosperm zeigt diesen Zusammenhang. Die Aleuronkörner enthalten im Globoid Phy-

tin. Mit der Hydrolyse des Phytins (bzw. Phytinsäure) durch Phosphatasen haben sich eingehend befaßt: Courtois (1951), Fleury et al. (1947), Perez (1949), Albaum et al. (1943) und zahlreiche weitere Forscher (Referate siehe in den eben zitierten Arbeiten).

Aus den Untersuchungen von Courtois und Mitarbeitern geht hervor, daß es eine «Phosphomonoesterase banale» gibt, welche zahlreiche Phosphorsäuremonoester spaltet (darunter auch Glyzerophosphat), aber ohne Wirkung ist auf Phytin (bzw. Phytinsäure). Mit diesem Enzym war in allen untersuchten Fällen (insbesondere auch Getreidekörnern) eine sog. Phytophosphatase vergesellschaftet, welche zusätzlich zu den Phosphorsäuremonoestern (darunter Glyzerophosphat) auch Pyrophosphate spaltet *und Phytin.*

In den oben aufgeführten Geweben hat die Phosphatase somit offenbar die Funktion der Phytinhydrolyse. Die weitere Bedeutung liegt in der Freisetzung einerseits der Phosphorsäure für die verschiedensten Stoffwechselvorgänge (in der Aleuronschicht möglicherweise für die Phosphorylierung der Stärke des Endosperms) und vor allem den Nukleinsäureaufbau in jungen Keimpflanzen, und anderseits des Mesoinosits = Bios I, welcher als Wuchsstoff wirkt (nachgewiesen in Erbsenkeimlingen von Fleury et al. [1952]).

XI. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität im Stofftransport

Überblickt man alle die in dieser Arbeit aufgezeigten Lokalisationen saurer Phosphatasen, so fällt einem auf, daß ein Großteil der Zellen und Gewebe mit besonders hoher Aktivität auch eine besondere Stellung im Stofftransport einnehmen, sei es über lange Distanzen, wie in Siebröhren, oder kürzere, wie in Übergangszellen, Prokambiumsträngen, in den Markstrahlen (*Solanum tuberosum* zur Zeit starker Assimilationstätigkeit), im Hilum *(Pisum),* im Chlorenchym der Blätter und in den zwischen Subepidermis und Prokambiumsträngen gelegenen Zellen des Dattelhaustoriums, ferner in resorbierenden Geweben, wie Wurzelendodermis und den Kotyledonarepithelien, außerdem in besonderen Durchgangspforten, wie Siebplatten, Tüpfel, Perforationenplatten *(Cucurbita),* Siebfelder der Speicherzellen im Maisscutellum, Enden der Prokambiumstrangzellen und insbesondere in sezernierenden Zellen, wie Sekretgangscheide *(Heracleum),* Geleitzellen, Drüsenhaaren, Leitbündelscheide (Maisblatt) und Kotyledonarepithelien.

Man gewinnt den Eindruck, daß die Phosphatase (bzw. Phosphatasen) direkt oder indirekt in die Vorgänge des aktiven Transportes eingeschaltet sei. Nach Taggart (1952) kann man sich das Schema des aktiven Transportes folgendermaßen vorstellen: Der zu transportierende Stoff A geht mit einer Zellkomponente X vorübergehend eine Verbindung AX ein (erster Schritt) und wird in einem zweiten Schritt wieder

gespalten. In einem der beiden Schritte wird Energie verbraucht. Die Phosphorsäure kann nun diese verbindungsbildende Zellkomponente X sein, oder sie kann eine indirekte Rolle spielen, indem durch Spaltung intrazellulärer, hochenergiereicher Phosphate Energie für die beiden Reaktionsschritte freigesetzt wird. Dies würde vor allem eine Erklärung für die Funktion der Phosphatase beim Resorptionsvorgang in den Kotyledonarepithelien ergeben, für den Fall, daß beim Reservestoffabbau im Endosperm nicht direkt Phosphate gebildet werden (im Maisendosperm ergaben sich ja nur Spuren von Zuckerphosphaten, ferner hemmt nach Dahm [1924] die Zufuhr von Phosphorsäure ins Endosperm dessen Entleerung; auch im Zwiebel-, Dattel- und *Ricinus*-Endosperm ist die Bildung von Phosphorsäureestern als Mobilisationsprodukte der Reservestoffe durchaus fraglich). Die Phosphatase könnte dann an der Zelloberfläche gebildete Phosphate (AX) spalten oder im indirekten Vorgang der Energiebeschaffung beteiligt sein. Daß die Permeation der Zucker durch Phosphorylierungsvorgänge unter der Wirkung von Enzymen, welche an der Zytoplasma-Außenfläche sitzen, gesteuert wird, haben Versuche von Hurwitz et al. (1951) wahrscheinlich gemacht.

Die Möglichkeit des fermentativ gesteuerten Stoffaustausches von Zelle zu Zelle haben auch Moog (1946), Yao (1950), Rosenberg et al. (1952), Johnson (1953) und Danielli (1953 *b*) erwogen.

Auch in den Parenchymen der Blattspreite kann somit die Phosphatase-Aktivität eine Bedeutung haben für den Assimilattransport (Wanner und Frey [1952]). Die Zucker können unter Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Zelle zu Zelle wandern. Da in den Siebröhren und Geleitzellen die Phosphatase-Aktivität höher ist als im Chlorenchym, stellt sich ferner das Gleichgewicht zwischen Zuckerphosphat einerseits und Zucker + Phosphorsäure anderseits in den Leitbündeln stärker auf die Spaltungsseite als in den Zellen des Chlorenchyms (kein chemisches Gleichgewicht im hergebrachten Sinn, da ständig Stoffe zu- und weggeführt werden!). Somit ergibt sich ein Gefälle für die Zuckerphosphate zu den Geleitzellen hin.

Besondere Beachtung darf noch der Hypothese von Danielli (1953 *b*) geschenkt werden, wonach alkalische Phosphatasen (im Tierreich) das Enzymzentrum kontraktiler Proteine darstellen und an deren Transportfunktion beteiligt sein sollen. Diese Rolle kann im Pflanzenreich natürlich auch der sauren Phosphatase zufallen. Das Postulat würde vor allem auch eine Erklärungsmöglichkeit für den Transportmechanismus in den Siebröhren und einen direkten Zusammenhang zwischen der hohen Phosphatase-Aktivität und der Transportfunktion der Siebröhrenglieder geben. Die Hypothese paßt auch sehr gut zum erhöhten Auftreten der Phosphatase-Aktivität auf den Siebplatten, Perforationenplatten, Tüpfeln, Siebfeldern der Maisscutellum-Speicher-

zellen, in den Enden der Prokambiumstrangzellen, in den resorbierenden Epithelien, Wurzelendodermis, Hilum und Markstrahlen. (Es darf aber nicht vergessen werden, daß der Testniederschlag auf den Siebplatten, Tüpfeln, Perforationenplatten, Siebfeldern der Maisscutellum-Speicherzellen und an den Enden der Prokambiumstrangzellen ein Artefakt sein kann, weil das Glyzerophosphat hauptsächlich an diesen Stellen eindringt, ferner das Ammonsulfid zunächst ein hypertonisches Außenmedium schafft, das Wasser aus den Zellen saugt, wobei der Bleiphosphatniederschlag in die Durchgangspforten geschleppt werden kann.)

Phosphatasen können aber offenbar auch eine Aufgabe erfüllen bei der Sekretion bzw. Exkretion verschiedener Stoffe. Auf diese Funktionen weist das Phosphatase-Vorkommen in Zellen mit Drüsenfunktion hin: Sekretgangscheide, Drüsenhaare; auch die Geleitzellen erfüllen wahrscheinlich Drüsenfunktion; nach Esau (1953) sind sie durch primäre Tüpfelfelder und Siebareale mit den Siebröhrengliedern verbunden und charakteristischerweise nicht vakuolisiert, wie übrigens auch die Zellen der Kotyledonarepithelien. Das Maisscutellumepithel weist ferner ja auch typische Drüsenfalten auf, und der Endospermabbau vom Scutellum aus zeigt, daß im intakten Maiskorn wahrscheinlich doch Stoffe vom Scutellum ins Endosperm abgegeben werden, wenn diese auch — nach Dahm (1924) und Pfeffer (1893) — nicht unbedingt notwendig sind für die Endospermentleerung. Beispiele aus dem Tierreich für diese Funktion sind die Nierentubuli, ferner Seide sezernierende Drüsen (Danielli [1953 *a*]).

XII. Bedeutung von Phosphatase-Aktivität in der Anthozyan-Synthese

In A, III., 1 *d*, ist auf häufiges Auftreten von Phosphatase-Wirkung in anthozyanhaltigen Zellen hingewiesen worden. Es wäre vielleicht möglich, daß das Ferment in der Biosynthese dieser Stoffe, wobei wahrscheinlich Glyzerinaldehyd (Robinson [1935]) und sicher Zucker eingebaut werden, eine Rolle in der Nutzbarmachung von phosphorylierten Produkten spielt. Ein Zusammenhang mit dem Phosphorsäure-Stoffwechsel besteht, denn nach Bonner (1950) ist die Anthozyanbildung in Pflanzen mit Phosphatmangel erhöht.

XIII. Das universelle Vorkommen der Phosphatase-Aktivität

Spuren von Phosphatase-Aktivität sind praktisch in jeder unverletzten Zelle gefunden worden. Das kann seine Ursache darin haben, daß auch Enzyme des Atmungsstoffwechsels eine gewisse Wirkung auf Glyzerophosphat auszuüben vermögen. In der Glykolyse kann ja als Nebenprodukt Glyzerophosphat entstehen. Ferner steht jede Zelle mit ihren Nachbarzellen in einem gewissen Stoffaustausch, in dessen Mechanismus Phosphatasen gemäß XI. höchst wahrscheinlich eine Funk-

tion ausüben (vgl. auch XIV.). Die oben erwähnten Phosphatasespuren können aber auch einfach Reste aus dem meristematischen Stadium der Gewebe sein.

XIV. Bedeutung der Phosphatase-Aktivität bei Synthese- und Phosphokinase-Wirkung

Wenn auch die sauren Phosphatasen — soviel bisher bekannt geworden ist — in den meisten Fällen hydrolytisch wirken, so muß doch nochmals hervorgehoben werden, daß die Möglichkeit von synthetischer und Phosphokinase-Wirkung besteht. Diese beiden Wirkungsweisen würden eine sinnvolle Erklärung der Phosphatase-Aktivität in all jenen Geweben zulassen, wo

1. folgende Stoffe aufgebaut werden:
   a) Stärke (Bildung von Glukose-1-phosphat): junge Kartoffelknolle, Markstrahlen, Kalyptra des Weizenkeimlings (Glick et al. [1946]), Xylemparenchym, Schließzellen der Stomata; junge Gewebe, wo transitorische Stärke eingelagert wird: Parenchym des Zwiebel- und Dattelhaustoriums, der *Ricinus*-Kotyledonen, Koleoptile und Blättchen in frühen Entwicklungsstadien beim Maiskeimling;
   b) *Membranstoffe* (evtl. Bildung von Pentose- und Hexosephosphaten): Festigungsgewebe;
   c) Eiweiß (Synthese von Nukleinsäuren für Nukleoproteide sowie Aminosäure-Phosphorsäure-Verbindungen für Phosphoproteide): alle embryonalen Gewebe, Zellkerne;
   d) Phospholipoide: Chloroplasten-Frühstadien;
2. Stoffe resorbiert werden (nach Danielli [1953 *b*] soll nach der Aufnahme eines Stoffes in eine Zelle dessen Rückdiffusion durch Phosphorylierung verhindert werden): Kotyledonarepithelien, evtl. auch weitere der unter XI. aufgezählten Gewebe;
3. die Photosynthese erfolgt.

Das universelle Vorkommen der Phosphatase-Aktivität könnte durch die Atmung bedingt sein, wobei ja zahlreiche Einzelreaktionen durch Phosphokinasen katalysiert werden.

Überblickt man nochmals alle Erwägungen über die Bedeutung der Phosphatase-Aktivität in ihren verschiedenen Lokalisationen, so kommt man zum Schluß, daß sie zweifellos in zahlreiche verschiedene biochemische Reaktionen und physiologische Vorgänge eingeschaltet ist und somit viel mehr Funktionen erfüllt, als Pfannkuch (1936) und Yin (1945) angenommen haben. Eine der wichtigsten Funktionen liegt aber wahrscheinlich in der Beteiligung am Transport der verschiedensten Stoffe.

Zusammenfassung

Die Aktivität der in saurem Bereich wirkenden Phosphatasen wird untersucht im Blatt von *Zea Mays* in ihrer Abhängigkeit von verschiedenen modifizierenden Faktoren (*p*H: Optimum 5,1 bei der gewählten Substratkonzentration; Temperatur: Optimum bei 38° C; F^- hemmt, Mg^{+2} wirkt indifferent, Quellungs- und jahresrhythmischer Einfluß) und histochemisch lokalisiert nach vereinfachter Methode von Gomori in den vegetativen Organen mehrerer Angiospermen und in typischen Vertretern verschiedener Reservestoff speichernder Samen während der Keimung (Körner von *Zea Mays* und *Triticum,* Samen von *Phoenix dactylifera, Allium Cepa, Ricinus communis* und *Pisum sativum*). Mit Körnern von *Zea Mays* wurden auch quantitative Bestimmungen durchgeführt. Hohe Aktivität der Phosphatase wird gefunden:

im Blatt: in Geleitzellen (Maximum), Siebröhrengliedern, Übergangszellen und jungen Trachealelementen, Schließ- und Nebenzellen der Stomata; etwas schwächere Aktivität im Chlorenchym, in Haaren und Emergenzen;

in Blattstiel und Sproßachse: im Phloem: Geleitzellen (Maximum), Siebröhren, Siebplatten, interfaszikuläre Siebröhren; im Xylem: junge und in Differenzierung stehende Trachealelemente, Tüpfel, Perforationenplatten und Xylemparenchym (sehr stark); in Kambium, Markstrahlen, Stärkescheide, Sekretgangscheide, Festigungsgeweben (Kollenchymstränge, Bastfasern, Holzfasern, Libriform, inneren und äußeren perizyklischen Fasern), Chlorenchym, Haaren und Emergenzen; (sehr geringe Aktivität in Rinden- und Markparenchym);

in der entwickelten Wurzel: in Leitbündeln, Endodermis; etwas weniger stark im perizyklischen Parenchym; in Protoxylem und Wurzelhaaren;

in jungen Kartoffelknollen: in den Stärke einlagernden Zellen sowie Siebröhrengliedern;

in den keimenden Samen: in der embryonalen Wurzel: stärker im Periblem als im Plerom; in Kalyptra und Koleorhiza; im Sproßteil: in Koleoptile und Primärblättern; in den Prokambiumsträngen tritt die Aktivität erst nach ein bis drei Tagen ein und steigt dann fortwährend; in den Kotyledonen: in den Samen mit Endosperm in den resorbierenden Epithelien (jedoch erst nach Erreichen eines gewissen Quellungsgrades); bei den Getreiden, *Ricinus communis, Allium Cepa* und *Pisum sativum* in den reservestoffhaltigen Zellen der Kotyledonen; bei *Pisum* auch in Epidermis und subepidermalen Zallen, bei *Phoenix dactylifera* anfänglich im

ganzen Haustorium, später hauptsächlich in der Subepidermis; allgemein in den Prokambiumsträngen; in den Endospermen: bei den Getreiden nur in der Aleuronschicht und den dieser benachbarten zwei bis drei stärkehaltigen Zellschichten (und sehr gering in ans Scutellum angrenzenden Zellen), bei *Ricinus c.* und *Allium C.* in sämtlichen Endospermzellen bis zur völligen Entleerung; bei *Phoenix d.* im Zellinhalt der nicht entleerten Zellen, jedoch nicht in den das Haustorium umgebenden Zellen, welche praktisch nur noch Reservezellulose aufweisen.

Der Wechsel der Aktivität im Verlauf der Keimung wird kontrolliert und im allgemeinen eine Zunahme festgestellt.

Verwendung von Glukose-1-phosphat und Fruktose-6-phosphat bei verschiedenen Objekten ergibt gleiche Lokalisation, in bezug auf letzteres Substrat allerdings eine schwächere Aktivität.

In Teil B wird die physiologische Bedeutung der Phosphatase-Aktivität diskutiert. Es bestehen Beziehungen zum Vorkommen von

1. Stärke (Funktion von Phosphatasen beim Abbau phosphorsäurehaltiger Komponenten der Stärke, evtl. von durch Phosphorylase gebildetem Glukose-1-phosphat und damit bei der Resorption der Stärkeabbauprodukte);
2. Chlorophyll (somit Beziehung zur Photosynthese, insbesondere Saccharosesynthese), evtl. Funktion beim Aufbau der Chloroplasten;
3. Aleuronkörnern (sicher Funktion von Phosphatasen bei der Mobilisation von Phytin bzw. Phytinsäure und damit Bedeutung für die Beschaffung von Phosphorsäure und dem Wuchsstoff Bios I = Mesoinosit für den wachsenden Keimling);
4. Anthozyanen in jungen Blättern (Funktion bei der Anthozyansynthese).

   Als weitere Bedeutungen der Phosphatase-Aktiviät werden erkannt:
5. Im Eiweiß-Stoffwechsel: Abbau von Nukleo- und Phosphoproteiden (somit Bedeutung bei der Plasmadesintegration); indirekte Beteiligung beim Aufbau von Nukleo- und Phosphoproteiden, Wirkung beim Aufbau gewisser Aminosäuren und somit Bedeutung beim Plasmaaufbau in meristematischen Geweben;
6. Abbau von Phospholipoiden, insbesondere Lezithin;
7. direkte oder indirekte Funktion im biochemischen Transportsystem (Resorption und Sekretion bzw. Exkretion), wobei dahingestellt bleiben muß, ob bei der Mobilisation der Reservestoffe (Stärke, Reservezellulose und Fett) schon in den Endospermen Phosphorylierungsprodukte entstehen oder diese erst in der Zyto-

plasmaaußenfläche der resorbierenden Epithelzellen gebildet werden.

8. Die universell vorkommende schwache Phosphatase-Aktivität kann durch Enzyme des Atmungsstoffwechsels bedingt sein.
9. Für gewisse Gewebe ist auch Synthese- und Phosphokinase-Wirkung der Phosphatase in Erwägung zu ziehen.

Literaturverzeichnis

Albaum, A. G., und Umbreit, W. W., 1943: Phosphorus transformations during the development of the oat embryo. Am. J. of Bot., **30,** 553.

Arwin, 1953: Uptake of Dyes into Cut Leaves. Nature, **171**, 435.

Axelrod, 1948: A new mode of enzymatic phosphate transfer. J. Biol. Chem., **172,** 1.

Bailey, J. M., Thomas, G. J., und Whelan, W. J., 1951: Selektive Hemmung von enzymatischen Verunreinigungen, welche mit Kartoffel-Phosphorylase vergesellschaftet sind. Biochem. J., 49 (Proc.), L VI bis L VII.

Bauer, L., 1953: Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze. Planta, **42,** 367.

Benson, A. A., Bassham, J. A., Calvin, M., Hall, A. G., Hirsch, H. E., Kawaguchi, S., Lynch, V., und Tolbert, N. E., 1952: Der Weg des Kohlenstoffes bei der Photosynthese. J. of Biol. Chem., **196,** 703.

Berenblum und Chain, 1938: An improved method of the colorimetric determination of phosphate. Biochem. J., **32,** 295.

Bessenich, F., 1924: Untersuchungen über die Endospermentleerung von *Zea Mays*. Jahrb. f. wiss. Bot., **63,** 231.

Bonner, J., 1950: Plant Biochemistry (New York).

Brachet, J., und Jeener, R., 1948: Recherches sur le rôle de la phosphatase alcaline des noyaux. Biochim. et Biophys. Acta, **2,** 423.

Bredereck, H., 1938: Nukleasen. Erg. Enzymforsch., **7,** 105.

Bünning, E., 1948: Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze (Berlin).

Calvin, M., Buchanan, J. G., Bassham, J. A., Benson, A. A., Bradley, D. F., Daus, L. L., Goodmann, M., Hayes, P. M., Lynch, V. H., Norris, L. T., und Wilson, A. T., 1952: The path of carbon in photosynthesis. In Elroy, W. D. M., und Glass, B.: Phosphorus metabolism.

Cedrangolo, F., 1942: Relation between activation of alkaline phosphatase by Mg and the concentration of the enzyme and of the substrate. Chem. Zentr., II, 668.

Channon, H. J., und Foster, C., 1934: The Phosphatides of the wheat germ. Biochem J., **28,** 853.

Corvaisier, Le, H., 1950: Die Phosphatasen bei der Hydrolyse von Stärkekleister. Bull. Soc. Chim. Biol., **32,** 333.

Courtois, J. M., 1951: Conférence des IIe Journées Biochimiques Franco-Suisses: Les esters phosphoriques de l'Inositol (Lons-le-Saunier: Declume).

Dahm, P., 1924: Untersuchungen über die Abhängigkeit der Endospermentleerung bei *Zea Mays*. Jahrb. f. wiss. Bot., **63,** 273.

Danielli, J. F., 1950: Zytologischer Nachweis der alkalischen Phosphatase. Nature, **165,** 762.
— 1953 *a*: Function and location of enzymes in cells. Nature, **171,** 815.
— 1953 *b*: Cytochemistry, a critical approach (New York).
Esau, K., 1953: Plant Anatomy (New York).
Favarger, P., 1949: Der Anteil der Phospholipoide bei der Resorption der Fette in den verschiedenen Teilen des Darmkanals beim Hund. Helvet. physiol. Acta, **7,** 371.
Feigin, J., Wolf, A., und Kabat, E. A., 1950: Histochemische Studien über Gewebsenzyme und die Schwierigkeiten der histochemischen Lokalisation der alkalischen Phosphatase in Kernen. Amer. J. Path., **26,** 647.
Fernandez, O., 1948: Chemical study of various starches I. Jon, **8,** 293.
Fischer, A., 1885: Studien über die Siebröhren der Dikotylenblätter. Berichte d. math.-physik. Classe sächs. Akad. Wissensch., **37,** 245.
Fleury, P., und Courtois, J. M., 1947: Cinétiques comparées de l'hydrolyse du glycérophosphate et de l'inositohexaphosphate par le son de blé. Biochim. et Biophys. Acta, **1,** 256.
— und Deysson, G. und M., 1952: Die Wirkung verschiedener Inosite und einiger verwandter Verbindungen auf das Wachstum von *Pisum sativum* L.-Keimpflanzen. Bull. Soc. Chim. Biol., **34,** 388.
Fries, N., 1952: Unterschiede im Gehalt an Phosphor, Nukleinsäuren und Adenin in den Blättern einiger laubabwerfender Bäume während des Herbstes. Plant. a. Soil, **4,** 29.
Glick, D., und Fischer, E. E., 1945: Methods for histochemical localization of ATP-ase, thiaminepyrophosphatase and glycerophosphatase in grains and sprouts. Arch. Biochem., **8,** 91.
— 1946: Localisation of phosphatases in wheat grain and in epicotyl and roots of germinated grain. Arch. Biochem., **11,** 65.
— 1949: In Glick, D., Techniques of Histo- and Cytochemistry (New York).
Goetsch, J. B., und Reynolds, P. M., 1951: Obtaining uniform results in the histochemical technic for acid phosphatase. Stain Techn., **26,** 145.
Gomori, G., 1939: Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med., **42,** 23.
Greenstein, J. P., 1942: Federation Proc., **1,** 113.
Haberlandt, G., 1896: Physiologische Pflanzenanatomie, 242 (Leipzig).
Haeckel, A., 1951: Beitrag zur Kenntnis der Pollenfermente, Planta, **39,** 431.
Hartt, C. E., 1943: The synthesis of sucrose in the sugar-cane plant. Hawaiian Planter's Record, **47,** 155.
Hayward, H. E., 1938: The structure of economic plants, 543 (New York).
Hoffmann, C. A., 1933: Developmental morphology of *Allium Cepa*. Bot. Gaz., **95,** 279.
Houget, J., 1943: Sur le mécanisme de la transformation des lipides en glucides au cours de la germination du Ricin. Compt. rend. Séances Acad. Sciences, **216,** 821.
Hurwitz, L., und Rothstein, A., 1951: Das Verhältnis der Zelloberfläche zum Stoffwechsel. J. Cellul. a. Comp. Physiol., **38,** 437.
Jacoby, F., und Martin, B. F., 1949 *a*: Der histochemische Nachweis alkalischer Phosphatase. Nature, **163,** 875.
— 1949 *b*: Ein Diffusionsphänomen, das den histochemischen Nachweis der alkalischen Phosphatase kompliziert. J. of Anat., **83,** 351.

Jeener, R., 1948: Acides nucléiques et phosphatases au cours de phénomènes de croissance provoqués par l'oestradiol et la prolactine. Biochim. et Biophys. Acta, **2,** 439.

— 1946: Sur les liens de la phosphatase alcaline avec les nucléoprotéides du noyau cellulaire et des granules cytoplasmiques. Experientia, **2,** 458.

Johnson, F. R., 1953: Function and location of enzymes in cells. Nature, **171,** 815.

Jordan, R. C., und Chibnall, A. C., 1933: Observations on the fat metabolism of Leaves. II. Fats and phosphatides of the Runner Bean. Ann. Bot., **47,** 163.

Kandler, O., 1950: Über die Beziehung zwischen Phosphathaushalt und Photosynthese I. Z. Naturforsch., **5,** 423.

Kay, H. D., 1928: The phosphatases of mammalian tissues. Biochem. J., **22,** 855.

— 1932: Phosphatase in growth and disease of bone. Physiol. Rev., **12,** 384.

Koch, A., 1884: Über den Verlauf und die Endigungen der Siebröhren in Blättern. Bot. Zeitung.

Kugler, O. E., und Bennett, E. H., 1947: Histochemical localization of acid phosphatase in germinating Maize kernels. Stain Techn., **22,** 9.

Kursanov, A. L., und Kryukova, N. N., 1938: Die synthetische und hydrolytische Aktivität der Phosphatasen in lebenden Geweben höherer Pflanzen. Biokhimiya, **3,** 529.

— 1939: Participation of phosphatase in the synthesis of sucrose. Ibid., **4,** 229.

— 1948: Zitat in Bünning, Entwicklungs- u. Bew.-Physiol. d. Pfl., 39.

— und Pavlinova, O. A., 1950: Über die nächsten Vorläufer der Saccharose in Pflanzen. Biokhimiya, **15,** 52.

Macdowall, F. D. H., 1953: Absence of acid phosphatase from Chloroplasts of spinach and *Iris*. Plant Physiol., **28,** 317.

Mahler, H. R., 1952: Fatty acid oxydation in soluble enzyme preparations. In «Symposium on phosphorus metabolism» von Elroy, W. D. M., und Glass, B., 286.

Mathies, J. C., Gaebler, O. H., und Palm, L., 1949: Die Wirkung von Wachstumshormon auf saure und alkalische Phosphatase in Leber und Niere. Endocrinology, **45,** 480.

Meeuse, B. J. D., van der Eijk, A., und Latuasan, H. E., 1952: Saccharosesynthese in höheren Pflanzen und Hochenergie-Phosphate. Biochim. et Biophys. Acta, April 1952.

Meyerhof, O., und Green, H., 1950: Synthetische Wirkung von Phosphatase. Transphosphorylation by alkaline phosphatase in the absence of nucleotides. J. of. biol. Chem., **183,** 377.

Moe, H., 1951: Le facteur temps corrélatif à la détection histochimique des glycérophosphatases alcalines.

Moog, F., 1946: The phosphomonoesterases. Biol. Rev., **21,** 41.

Nobak, C. R., und Paff, G. H., 1951: Localization of acid phosphatase in fibroblasts.

Novikov, A. B., 1951: The validity of histochemical phosphatase methods on the intracellular level. Science, **113,** 321.

Paech, K., und Krech, E., 1953: Über die Stärkebildung in den Plastiden. Planta, **41,** 391.

Perez, Ch., 1949: Fractionation of the phosphatases of rye. Bull. Soc. Chim. Biol., **31,** 1229.

Perlmann, G. E., 1952: Enzymatic dephosphorylation of ovalbumin and plakalbumin. J. Gen. Physiol., **35,** 711.
— Enzymatic Dephosphorylation of Casein. J. Am. Chem. Soc., **74,** 3191.
Pfannkuch, 1936: Bedeutung der Phosphatase. Z. physiol. Chem., **241,** 37.
Pfeffer, 1893: Über die Ursachen der Entleerung von Reservestoffen aus Samen. Berichte der mathematisch-physik. Classe der Königl.-Sächsisch. Gesellsch. d. Wissenschaften zu Leipzig.
Rimington, C., und Kay, D. H., 1926: The liberation of phosphorus from Caseinogen by enzymes and other agents. Biochem. J., **20,** 777.
— 1927: Isolation of a phosphorus-containing Peptone from tryptic digests of Caseinogen. Biochem. J., **21,** 1179.
Robinson, R., 1935: Formation of anthocyanins in plants. Nature, **137,** 172.
Roche, J., 1951: Phosphatases, in: Sumner, J. B., und Myrbäck, K. The Enzymes I, Part 1, 478 und 484 (New York).
— und Latreille, M., 1937: Sur la spécificité des phosphoestérases. Enzymologia, **3,** 75.
— Nguyen-van-Thoai, und Danzas, E., 1944: Sur l'existence et les caractères d'un activateur naturel de la synthèse des esters phosphoriques par les phosphatases. Bull. Soc. Chim. Biol., **26,** 411.
— 1945 *a*: Sur les activateurs des synthèses enzymatiques II. Ibid., **27,** 401.
— 1945 *b*: Activation of enzymic synthesis of phosphoric esters (glycerophosphoric acid) by amino acids and peptides. Compt. rend. Soc. biol., **139,** 807.
Rogers, H. T., Pearson, R. W., und Pierre, W. H., 1942: Source and Phosphatase activity of exoenzyme systems of maize and tomato roots. Soil. Sci., **54,** 353.
Rosenberg, Th., und Wilbrandt, W., 1952: Enzymatic processes in cell membrane penetration. Internat. Rev. Cytol., **1,** 65.
Ross, M. H., Ely, J. O., und Archer, J. G., 1951 *a*: Alkaline phosphatase activity and *p*H optima. J. Biol. Chem., **192,** 561.
— und Ely, J. O., 1951 *b*: Alkalische Phosphatase in Pflanzenzellen. Exp. Cell Research, **2,** 339.
Sachs: Gesammelte Abhandlungen über Pflanzenphysiologie I (Leipzig 1892):
1862 *a*: Zur Keimungsgeschichte der Gräser, 624.
1862 *b*: Zur Keimungsgeschichte der Dattel, 630.
Scott, M. F., 1949: Plasmodesmata in Xylem Vessels. Bot. Gaz., **110,** 492.
Stöger, E. M., 1950: Zur Permeabilität der Schließzellen. Protoplasma, **39,** 588.
Stumpf, P. K., 1952: Phosphate assimilation in higher plants. in: McElroy, W. D., and Glass, B.: Symposium on phosphorus metabolism, Vol. II, 29.
Taggart, J. V., 1952: Ibid., 732.
Thomas, G. J., Whelan, W. J., und Peat, S., 1950: The role of Z-enzyme in β-amylolysis. Biochem. J., **47,** XL (Proc.).
Verzar, F., und MacDougal, 1936: Absorption from the Intestine (Longmans, Green; London).
— 1951: Beeinflussung phosphorylierender Fermente durch Corticosteroide in vitro. Ann. New York Acad. Sci., **54,** 716.
— Sailer, E., und Richterich, R., 1952: Einfluß der Nebennierenrinde auf die alkalische Phosphatase der Dünndarmschleimhaut. Helv. Physiol. et Pharm. Acta, **10,** 231.

Virtanen, A. J., und Nordlund, M., 1934: Bioch. J., **28,** 1729.
Vislmiac, W., und Ochoa, S., 1952: In Elroy, W. D. M., und Glass, B.: Phosphorus Metabolism.
Waldschmidt-Leitz, E., und Mayer, K., 1935: Über Amylophosphatase aus Gerste. Z. physiol. Chem., **236,** 168.
— 1937: Enzymatische Dephosphorylierung von Weizenstärke. Ibid., **250,** 192.
Wanner, H., und Frey, G., 1952: Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. Planta, **41,** 190.
Wildmann, S. G., und Bonner, J., 1947: The proteins of green leaves I. Arch. Biochem., **14,** 381.
— und Campbell, J. M., 1949: Unpublished report, California Inst. of Techn., in Bonner, J.: Plant Biochemistry, 266 (1950) (New York).
Wintermanns, J. F. G. M., und Tjia, J. E., 1952: Einige Beobachtungen über die Eigenschaften von Phosphatverbindungen bei Chlorella und deren Beziehung zu Photosynthesebedingungen. Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch., Ser. C, **55,** 34.
Yao, T., 1950: Die Lokalisation alkalischer Phosphatase während der postembryonalen Entwicklung von Drosophila melanogaster. Quart. J. Microsc. Sci., **91,** 89.
Yin, H. C., 1945: A histochemical study of the distribution of phosphatase in plant tissues. The new Phytologist, **44,** 191.
— und Sun, C. N., 1947: Histochemical method for detection of phosphorylase in plant tissues. Science, **105,** 650.
Yokoyama, H. O., Stowell, R. E., und Mathews, R. M., 1951: Evaluation of histochemical alkaline phosphatase techniques. The Anatom. Rec., **109,** 139.