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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 79 (1969)

Artikel: Histochemische Untersuchungen über Cytochromoxydase und Peroxydase in Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung von Äpfeln verschiedener Entwicklungsstufen

Autor: Nuotclà, Jon

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-55535

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

Histochemische Untersuchungen über Cytochromoxydase und Peroxydase in Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung von Äpfeln verschiedener Entwicklungsstufen

Von *Jon Nuotclà*
Philosophische Fakultät II der Universität Zürich

Manuskript eingegangen am 23. Juli 1968

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen 94

Chemikalien und ihr Bezugsort 95

1. Einleitung 95

2. Topographie der Apfelgewebe 96

3. Cytochromoxydase 97

3.1 Allgemeines 97
3.2 Material und Methoden 98
3.3 Beschreibung der Versuchsergebnisse 101
3.3.1 Parenchym, Epidermis und Subepidermis 101
3.3.2 Die Perianthleitbündel und die dorsalen Karpelleitbündel 102
3.3.3 Ventrale Karpellappen und deren Leitbündel. Samenanlagen 103
3.3.4 Endokarp und Stielsklereiden 104
3.4 Versuche zur Interpretation der gefundenen Cytochromoxydaseverteilung 104
3.5 Vergleich der Versuchsresultate mit anderen Arbeiten an Äpfeln 108
3.5.1 Die Atmungsintensität im Verlaufe der Apfelentwicklung 108
3.5.2 Kohlenhydratstoffwechsel 110
3.5.3 Der Säurestoffwechsel 111
3.6 Erklärungsmöglichkeiten für den beobachteten Atmungsverlauf und für die Änderung der Cytochromoxydaseaktivität 111
3.7 Diskussion der Hypothese 114
3.8 Cytochromoxydaseaktivität und Stoffeinlagerung 117
3.9 Zusammenfassung 118

4. Peroxydase 119

4.1 Allgemeines 119
4.2 Material und Methoden 120
4.2.1 Alkalische Nadireaktion 120
4.2.2 Benzidinreaktion 121
4.2.3 3-Amino-9-äthylcarbazol-Reaktion 122
4.2.4 2,6-Dichlor-phenolindophenol-Reaktion 123
4.2.5 Aminreaktion nach Burstone 123
4.3 Fehlerquellen 124
4.3.1 Adsorptionsartefakte 124
4.3.2 Pseudoperoxydasereaktion 125
4.3.3 Einfluss von pH-Wert, Reagenz und Gewebe 127

4.4 Resultate, erzielt mit verschiedenen Reagenzien und verschiedenem Pflanzenmaterial . 127
4.4.1 *Tetrastigma voinerianum* 127
4.4.2 Glockenäpfel und Klaräpfel 129
4.4.3 *Petasites albus* 130
4.4.4 *Zea Mays* 131
4.4.5 Vergleich der Versuchsergebnisse 133
4.5 Diskussion der Versuchsergebnisse 133
4.6 Peroxydase in Äpfeln verschiedener Entwicklungsstufen 136
4.6.1 Epidermis 137
4.6.2 Subepidermis 137
4.6.3 Rindenparenchym 138
4.6.4 Markparenchym 140
4.6.5 Parenchym der ventralen Karpellappen 140
4.6.6 Perianthleitbündel und dorsale Karpelleitbündel 140
4.6.7 Ventrale Karpelleitbündel 141
4.6.8 Endokarp 141
4.6.9 Griffelkanalepithel 142
4.6.10 Samenanlagen 142
4.6.11 Zusammenfassende Beschreibung der Befunde mit dem Aminreagenz 142
4.6.12 Zusammenfassung 143
4.7 Peroxydase und Pektinstoffwechsel 143
4.8 Peroxydase in den Zellwänden 144
4.9 Peroxydase und Zellwandmetamorphose 145
4.9.1 Peroxydase und Indol-3-Essigsäure 145
4.9.2 Peroxydase und Streckungswachstum 146
4.9.3 Induktion der Peroxydase durch Zellwandspannungen 147
4.9.4 Einfluss des Cytoplasmas auf den Zellwandstoffwechsel 147
4.9.5 Mittellamelle und Zellwandmatrix 148
4.9.6 Peroxydase und Ligninsynthese 150
4.10 Peroxydase und Polyphenoloxydase 151
4.11 Zusammenfassung 152

Literatur 172

Abkürzungen

A	Aminreagenz nach Burstone
AAC	3-Amino-9-äthylcarbazol als Reagenz
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Benzidin als Reagenz
2,6-D	2,6-Dichlorphenolindophenol als Reagenz
DNP	Dinitrophenol
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
N	Nadireagenz
R	Reaktion

Chemikalien

3-Amino-9-äthylcarbazol	Grade II. Practical	Sigma Chemical Company St. Louis 18, Missouri, USA
p-Amino-azobenzol	puriss.	Fluka AG, Buchs
p-Amino-diphenylamin	puriss.	Fluka AG, Buchs
Cytochrom C aus Pferdeherz	puriss. salzfrei, elektrophoretisch rein	Fluka AG, Buchs
Benzidin zum Blutnachweis	puriss. p. a.	Fluka AG, Buchs
2,6-Dichlor-phenolindophenol	p. a.	Fluka AG, Buchs
Natriumsalz		Fluka AG, Buchs
N,N-Dimethylformamid	puriss.	Bot. Inst. der Universität Zürich
N,N-Dimethyl-p-phenylendiaminhydrochlorid		Dr. Bender u. Dr. Hobein AG Zürich
Katalase aus Rinderleber	pract. Lösung in 30 %igem Glycerin für techn. Zwecke, ca. 260000 E/ml in 10^{-2} m H_2O_2	Fluka AG, Buchs
l-Naphthol	p. a.	Merck AG, Darmstadt
Pectinase	purum standardisiert	Fluka AG, Buchs
Peroxydase aus Meerrettich	purum lyophilisiert salzfrei	Fluka AG, Buchs

1. Einleitung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine histochemische Lokalisierung verschiedener Oxydasen in Äpfeln verschiedener Entwicklungsstufen. Es wurden dazu eine frühreife Apfelsorte (Klaräpfel) und ein Lagerapfel (Glockenäpfel) gewählt. Wie einzelne Stichproben ergaben, kann auch in anderen Sorten weitgehend die gleiche Enzymverteilung beobachtet werden.

Die Versuche wurden in der Vegetationsperiode 1965 begonnen, 1966 überprüft und im Sommer 1967 ergänzt und abgeschlossen. Die wichtigsten Ergebnisse konnten so durch mehrmalige Beobachtungen bestätigt werden. Das Datum, welches öfters bei der Beschreibung der Versuchsergebnisse angegeben wird, ist das Versuchsdatum. Daraus kann nur ungefähr entnommen werden, wann im Verlaufe der Vegetationsperiode die beschriebene Entwicklungsstufe anzutreffen ist, da sich dieser Zeitpunkt je nach Witterung von Jahr zu Jahr etwas verschieben kann.

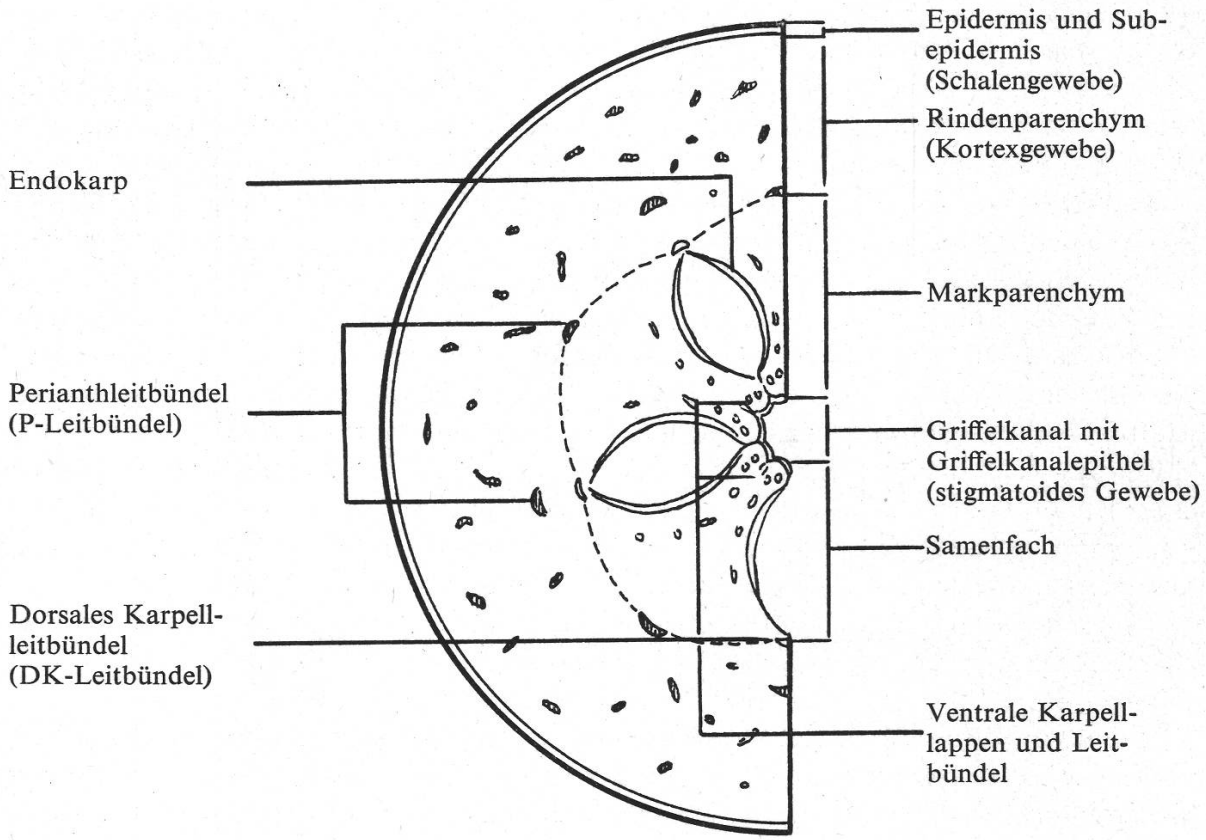
Für den Nachweis von Peroxydase und Cytochromoxydase, welche in dieser Arbeit eingehender untersucht wurden, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Es war ursprünglich beabsichtigt, mit einem bewährten Reagenz verschiedene Entwicklungsstadien der Früchte zu erfassen. Um Artefakte, welche der Methode zuzuschreiben sind, aufzudecken, mussten aber vor allem für Peroxydase verschiedene Reagenzien getestet werden. Vergleichshalber wurde auch anderes Pflanzenmaterial untersucht.

Durch bewährte Hemmungsreaktionen wurde die Spezifität des Reagenzes untersucht. Trotzdem konnten Pseudoenzymreaktionen nicht in allen Fällen mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Bestätigung der Versuchsresultate durch grundsätzlich andere Hilfsmittel und Methoden wurde nicht versucht, wäre aber sehr aufschlussreich. Für Versuche mit Gewebehomogenaten kann eine vorgängige rein histochemische Untersuchung wertvolle Hinweise liefern.

Die histochemischen Ermittlungen dieser Arbeit beruhen auf Farbreaktionen und sind zunächst rein qualitativ. Auf quantitative Vergleiche, beruhend auf verschiedener Farbintensität, konnte jedoch nicht verzichtet werden, da alle Gewebe mehr oder weniger Peroxydase und Cytochromoxydase enthalten. Um verschiedene Enzymaktivitäten zu vergleichen, mussten Ausdrücke wie schwache, starke oder intensive Aktivität beziehungsweise Reaktion gewählt werden. Solche Ausdrücke haben strenggenommen nur einen Sinn, wenn ein Massstab vorhanden ist, woran die Aktivität gemessen werden kann. Im allgemeinen war das Parenchym das Vergleichsgewebe, oder es wurden verschiedene Entwicklungsstadien eines bestimmten Gewebes miteinander verglichen. Einmalige Vergleiche können sehr subjektiv ausfallen. Wenn aber die Farbreaktion allmählich an Intensität zu- beziehungsweise abnimmt und die Beobachtungen über mehrere Wochen in verschiedenen Vegetationsperioden erfolgen, sind solche Angaben kaum zufällig, sondern beruhen vielmehr auf wirklichen Aktivitätsänderungen der Enzyme.

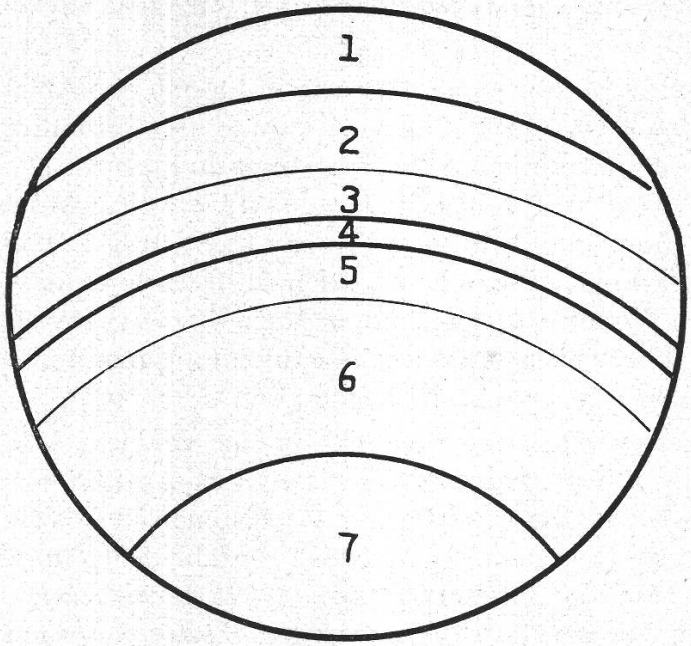
2. Topographie der Apfelgewebe

Die Figuren 1 und 2 erläutern die Ausdrücke, welche in dieser Arbeit gebraucht werden. Das Werk von Esau (1965) und die Arbeiten von Tetley (1930), McArthur und Wetmore (1939, 1941) dienten als Grundlage.



Figur 1

Apfelquerschnitt durch die Zone des Samengehäuses



1. Primäres Phloem (Proto- und Metaphloem) + äussere Leitbündelscheide
2. Sekundäres Phloem
3. Phloemdifferenzierungszone
4. Kambium
5. Xylemdifferenzierungszone
6. Sekundäres Xylem
7. Primäres Xylem + innere Leitbündelscheide

Figur 2

Ausgewachsenes Perianth- und dorsales Karpelleitbündel

Bemerkungen:

Die Abgrenzung von primären und sekundären Geweben ist in den Leitbündeln nicht einfach (Esau, 1965). Als primäres Phloem beziehungsweise Xylem wird hier die Zone aufgefasst, welche schon in der Apfelblüte voll differenziert erscheint. Im Phloem kann die Differenzierung leicht mit Chlorzinkjod festgestellt werden, da vermutlich die Wände der aktiven Siebgefässe eine auffallende graue Farbe annehmen (Tafel 8, Abb. 8). Esau (1965) spricht von einer deutlichen perlmutterartigen Verdickung der Siebgefässwände (nacreous thickening) verschiedener Pflanzenarten, welche positive Zellulosereaktion ergibt. Das Gewebe, welches nach Beginn der Kambiumtätigkeit entsteht, wird in dieser Arbeit als sekundäres Phloem beziehungsweise Xylem aufgefasst. Die Kambiumtätigkeit beginnt wahrscheinlich dann, wenn die Kambiumzone erstmals ausgesprochen intensive Peroxydasereaktion ergibt (1–2 Wochen nach der Blüte).

In der äusseren Leitbündelscheide differenzieren sich nur vereinzelt Sklereiden und Sklereidengruppen.

3. Cytochromoxydase

3.1 Allgemeines

Es kann heute als gesichert gelten, dass die Cytochromoxydase die Atmung von Äpfeln massgebend bestimmt. Webster (1954) hat allerdings die Atmungshemmung CO-behandelter Äpfel durch Belichtung nicht rückgängig machen können. In der betreffenden Arbeit weist er auf seine früheren Versuche hin (Webster, 1952), woraus zu entnehmen ist, dass in dieser Frucht keine nennenswerte Cytochromoxydaseaktivi-

tät im üblichen Sinne vorhanden sein kann. Es wurden dabei über 50 verschiedene Pflanzenarten auf dieses Enzym geprüft.

Nakabayashi (1954) (nach Beevers, 1961) zeigte, dass die Bräunung der Äpfel durch Phenoloxydase verursacht wird. Mit Kohlenmonoxid konnte sie verhindert werden. Durch Belichtung war aber diese Hemmung nicht rückgängig zu machen. Die Hemmung der Sauerstoffaufnahme, welche durch Kohlenmonoxid erzielt wurde, konnte aber im Gegensatz zu den Befunden Websters durch Licht aufgehoben werden. Obwohl die Phenoloxydase in grosser Menge vorhanden ist, folgerte er, dass Bräunung und Atmung in Äpfeln zwei getrennte Vorgänge sind. Nach Beevers (1960) könnte bei den Versuchen von Webster die Sauerstoffaufnahme zur Hauptsache durch Phenoloxydase, welche noch vorhanden war, verursacht worden sein.

Nach diesen sich widersprechenden Versuchsergebnissen sind die Versuche von Liebermann (1958), Tager (1958) u.a. bemerkenswert. Es gelang ihnen, aus Apfelgewebe aktive Mitochondrien zu isolieren. Damit dürfte das Vorkommen der Cytochromoxydase in Äpfeln als gesichert gelten (Hulme u.a., 1963). Verschiedene Autoren, insbesondere Hatch, Pearson, Millerd und Robertson (1959), haben gezeigt, dass im Apfelgewebe Säuren aus dem Krebszyklus oxydiert werden. Sie konnten auch in Mitochondrienfraktionen die Enzyme des Krebszyklus nachweisen. Eindeutig wurden Cytochromoxydase und eine Cytochrom-C-abhängige Succinoxydase nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden später von Hulme u.a. (1963) weitgehend bestätigt. In Schalengewebe aus alternden Äpfeln gelang es aber Neal und Hulme (1958) nicht, durch Fumarat, Pyruvat und Citrat eine Steigerung der O_2-Aufnahme zu erzielen. Diese Autoren halten es für möglich, dass der Krebszyklus in diesem Gewebe unvollständig abläuft, zumal es ihnen nicht gelang, Aconitaseaktivität nachzuweisen.

Nach Barker, Turner, Quartley u.a. (aus Beevers, 1961) verhindert reiner Sauerstoff allmählich die CO_2-Abgabe in Äpfeln. Dabei wird Äthanol angehäuft. Es wird hier eine Hemmung der Aconitase vermutet, was für einen vollständigen TCS-Zyklus sprechen würde.

Da in den aufgeführten Arbeiten durchwegs mit Gewebescheiben oder Homogenaten gearbeitet wurde, ein Apfel histologisch jedoch eine sehr inhomogene Frucht darstellt, füllt eine histochemische Lokalisierung der Cytochromoxydase eine diesbezügliche Lücke.

Eine Arbeit von Brändle und Wanner (1965) ergab eine eigenartige Verteilung der Sauerstoffkonzentration im Apfel. Der auffällige Knick der Kurve des Sauerstoffpartialdruckes in der Zone der Perianthleitbündel dürfte, wie in dieser Arbeit später gezeigt wird, durch die auffällige Cytochromoxydaseaktivität in den Leitbündeln bedingt sein.

3.2 Material und Methoden

Die meisten Cytochromoxydase-Nachweismethoden wurden an tierischem Gewebe getestet. So auch die hier gebrauchte, von Jensen empfohlene Methode von Burstone (1960). Die Nachteile der Nadireaktion (hohe Fettlöslichkeit des Indophenols, nichtenzymatische Reaktionen, Kristallbildungen usw.) wurden dadurch vermieden. In der vorliegenden Arbeit konnte mit dem Aminreagenz nach Burstone die Cytochromoxydase im Apfel eindeutig lokalisiert werden.

Etwa 3–5 mm dicke Gewebescheiben aus Äpfelquerschnitten wurden mit einer 0,5 M Rohrzuckerlösung infiltriert. Dadurch konnten leicht, je nach Alter der Früchte, 40–250 μ dicke Gefrierschnitte hergestellt werden. Obwohl Jensen (1962) frische Schnitte empfiehlt, wurden durchwegs Gefrierschnitte hergestellt. Die Permeabilität wurde dadurch erhöht, ohne dass die Aktivität zu sehr abnahm. Die Rohrzuckerlösung soll einen konservierenden Einfluss auf die Mitochondrien haben (Beevers, 1961). Versuchsweise wurde den gebrauchten Lösungen Rohrzucker zugegeben, so dass die Zuckerkonzentration 0,5 M betrug. Es konnte aber, verglichen mit dest. Wasser als Lösungsmittel, keine Aktivitätssteigerung beobachtet werden.

Um störende Polyphenoloxydasereaktionen auszuschalten, wurden die Gefrierschnitte sofort in 10^{-2} M DIECA(Na-Diäthyldithiocarbaminat)-Lösung gelegt. Eine Aktivitätshemmung der Cytochromoxydase wurde dabei nicht beobachtet; die Schnitte blieben aber weiss. Darauf wurden sie in dest. Wasser ausgewaschen und für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Inkubationslösung

25 mg p-Amino-diphenylamin und 15 mg p-Amino-azobenzol (auch 3-Amino-9-äthylcarbazol [AAC] ergab ausgezeichnete Reaktionen) wurden in 1 ml Alkohol abs. gelöst und 35 ml dest. Wasser zugegeben. Diese Lösung wurde jeweils etwa 2 Stunden vor der Inkubation frisch hergestellt und vor Gebrauch filtriert. Zu 3,5 ml dieser Lösung wurden 1,5 ml Pufferlösung gegeben. Als gut geeignet erwies sich, wie Burstone angibt, 0,2 M Trispuffer von pH 7,4 oder Phosphatpuffer von gleichem pH-Wert. Pro ml dieser Inkubationslösung wurden 1 Tropfen Katalase (Glycerinlösung Fluka) und 1 mg Cytochrom C aus Pferdeherz zugefügt (Chemikalien und ihr Bezugsort siehe Seite 95).

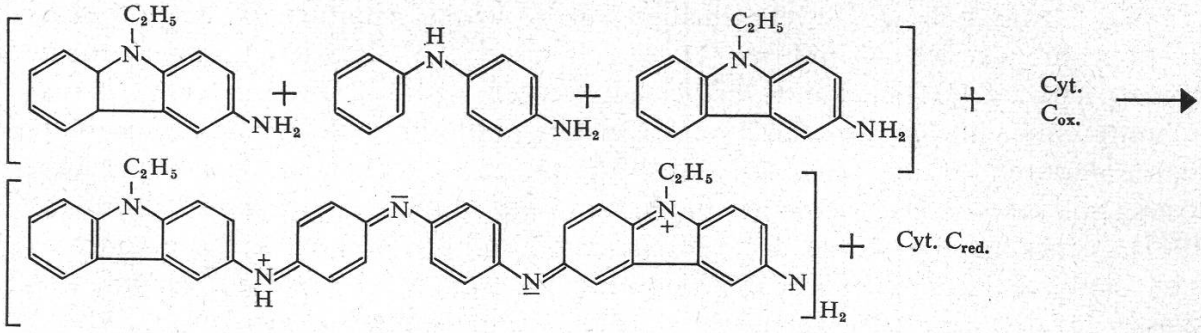
Da das Aminreagenz in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und Peroxydase leicht oxydiert wird und das Gewebe relativ viel endogenes Substrat enthält (vgl. Kap. 4.3.2), schien es ratsam, der Inkubationslösung etwas Katalase beizufügen.

Das reduzierte Cytochrom C wird von der Cytochromoxydase oxydiert. Nach van Fleet (1952) soll das oxydierte Cytochrom C das Nadireagenz oxydieren, was vielleicht auch für das Aminreagenz gilt. Aus gebrochenen Mitochondrien könnte aber das Cytochrom C leicht herausgelöst werden (Beevers, 1961). Aus diesen Überlegungen wurde Cytochrom C der Inkubationslösung beigegeben. Die Stellen stärkster Aktivität, wie etwa die Leitbündel, zeigten auch ohne Cytochrom C intensive Reaktion.

Reaktionsverlauf (Burstone, 1960)

Als Beispiel wird die Reaktion mit p-Amino-diphenylamin und 3-Amino-9-äthylcarbazol gewählt. Mit p-Amino-azobenzol als zweitem Amin dürfte die Reaktion ähnlich verlaufen.

$$\text{Cytochrom } C_{red.} \xrightarrow[+O_2]{\text{Cytochromoxydase}} \text{Cytochrom } C_{ox.}$$



pH-Wert und Farbe der Reaktionsprodukte

Verschiedene pH-Werte zwischen 4 und 8, mit verschiedenen Pufferlösungen (Citratpuffer, Trispuffer und Phosphatpuffer) wurden ausprobiert. Die beste Reaktion ergaben pH-Werte von 6,4 und 7,4. Mit allen drei Pufferarten wurden gute Resultate erzielt. Citratpuffer hatte oft störende Kristallbildung zur Folge. Manchmal war die Farbe der Reaktionsprodukte je nach pH-Wert etwas verschieden. In jungen Äpfeln und im Parenchym aller Entwicklungsstufen waren die Reaktionsprodukte im allgemeinen rötlich bis braun, manchmal aber auch grünblau oder grauschwarz (Tafel 1, Abb. 1, 2, 3, 4 und 5). Die Farbe der Reaktionsprodukte in verschiedenen Geweben dürfte durch verschiedene Gewebeazidität und verschiedene Oxydationsstufen des Reagenzes verursacht (Karrer, 1941) werden. Leitbündel und andere Gewebe starker Aktivität wurden oft schwarzbraun oder grünschwarz angefärbt (Tafel 1, Abb. 2, 3 und 5) (vgl. Kap. 3.3).

Kontrollreaktionen

a) KCN in 10^{-2} bis $3 \cdot 10^{-2}$ M Konzentration hatte vollkommene Hemmung zur Folge, wenn in Phosphatpuffer von pH 6,4, welcher 10^{-2} M an KCN war, 30 Minuten präinkubiert wurde (Tafel 2, Abb. 7; Tafel 4, Abb. 4; Tafel 5, Abb. 6 und 8). Die Inkubationslösung enthielt die gleiche Cyanidkonzentration. Manchmal wurde die Cytochromoxydase in den verholzten Endokarpien unvollständig gehemmt, was wohl auf schlechte Permeabilität des Inhibitors durch die Sklereidenwände zurückzuführen ist.

b) Wurden die Schnitte 30 Minuten in dest. Wasser von 80 °C gelegt, war praktisch keine Cytochromoxydase mehr vorhanden.

Die Aminmethode von Burstone (1960) zeigte befriedigende Resultate. Es wurden deshalb keine weiteren Reagenzien genauer ausprobiert.

In der Vegetationsperiode 1965 wurden alle Schnitte in eisgekühltem Aceton vorfixiert. Da die im Sommer 1965 gefundene schwache Aktivität im Parenchym davon herrühren konnte, wurde im Sommer 1966 und 1967 auf die Acetonfixierung verzichtet, obwohl die Leitbündel auch im fixierten Gewebe sehr intensive Reaktion zeigten.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte kurz in dest. Wasser ausgewaschen und in 10% Kobaltacetat und Formalin gelegt. Die Lösung wurde durch Lösen von Kobaltacetat in 10% Formalin erhalten. Das 10% Formalin wurde durch Verdünnen mit Acetatpuffer von pH 5,2 erhalten. Die Dauer dieser Nachfixierung und Chelatbildung war nicht sehr entscheidend und konnte 2 bis 12 Stunden betragen, ohne dass Unterschiede festgestellt werden konnten.

Nach der Fixierung wurden die Schnitte in dest. Wasser gut ausgewaschen, in 70% Glycerin gelegt und sofort mikroskopisch untersucht und photographiert.

3.3 Beschreibung der Versuchsergebnisse

3.3.1 Parenchym, Epidermis und Subepidermis

In jungen Äpfeln, bis etwa 3 Wochen nach dem Verblühen, zeigte das Parenchym starke Aktivität (Tafel 2, Abb. 1). Eine Behandlung mit 10^{-2} M KCN hatte vollständige Hemmung der Cytochromoxydase zur Folge.

Der pH-Wert, der in dieser Altersstufe die beste Reaktion zeigte, betrug 6,4.

Im Parenchym wurden jetzt schon Stärkekörner gefunden. Sehr wahrscheinlich war es aber Assimilationsstärke (autochthone Stärke).

In diesem Entwicklungsstadium konnten viele Zellen mit Oxalatdrusen beobachtet werden, welche stärkere Aktivität zeigten.

Die Epidermis und das Subepidermalgewebe sowie das Markparenchym (besonders die Karpellappen) ergaben schwarzbraune Reaktionsprodukte (Tafel 1, Abb. 5; Tafel 2, Abb. 1). Zellproliferationen, welche in der äusseren Rindenschicht ein Gewebe bilden, das dem Blattmesophyll ähnlich sieht, enthielten sehr intensiv reagierendes Plasma (Tafel 2, Abb. 2) (vgl. Kap. 4.6.3).

Ein 4 Wochen alter Apfel von 1 cm Durchmesser zeigte im Sommer 1966 schon bedeutend schwächere Parenchymaktivität (Tafel 2, Abb. 3). Bei den Klaräpfeln hatte in diesen Entwicklungsstadien im Rindenparenchym die Stärkeeinlagerung schon begonnen (31.5.66).

Die Epidermis war allgemein etwas aktiver als das übrige Parenchym und die Subepidermis. Mit Citratpuffer von pH 7 wurde in diesen ersten Entwicklungsstadien manchmal recht intensive Enzymaktivität in der Epidermis gefunden (Tafel 2, Abb. 1, 2 und 3). Eindeutig war die Aktivitätsabnahme im Parenchym (Tafel 2, Abb. 3). Geprüft wurde mit pH 4, pH 6, pH 7 (Citratpuffer), pH 6,4 (Phosphatpuffer) und pH 7,4 (Trispuffer). Werte von 4 und 5 ergaben sehr schwache Epidermisaktivität.

Eine Woche später, etwa 5 Wochen nach der Blüte, reagierten das Parenchym, die Epidermis und die Subepidermis auffallend schwach (Tafel 2, Abb. 4). Im Cytoplasma lagen vereinzelt kleine, gefärbte Körnchen. Wahrscheinlich waren es Mitochondrien. Epidermis und Subepidermis reagierten nicht stärker als das Parenchym. Die Stärkeeinlagerung hatte auch im Glockenapfel begonnen (6.6.66). Etwa 3 Wochen später war sie schon recht intensiv. Dieser Zustand schwacher Cytochromoxydaseaktivität und starker Stärkeeinlagerung wurde mehrere Wochen beibehalten.

Am 28.7., also etwa 3 Monate nach dem Verblühen, wurden im Klarapfel (hellgrün, aromatisch riechend) im innersten Markgewebe Anzeichen für eine Stärkeabnahme gefunden. Gleichzeitig schien die Aktivität im Parenchym zugenommen zu haben. Es waren mehr Mitochondrien unterschiedlicher Grösse vorhanden. Die Aktivitätssteigerung setzte sich von Versuch zu Versuch kontinuierlich fort. Stärkste Aktivität zeigten alternde Äpfel vor ihrem Zerfall. Hier wurde die Aktivitätsverteilung im Rinden- und Markparenchym unregelmässig, und oft traten kleine Gewebekomplexe auf, die durch besonders starke Reaktion auffielen. Klar- und Glockenäpfel stimmten in

dieser Reaktionszunahme gut überein, nur dass bei ersteren dieser Zustand schon Ende August erreicht wurde, was bei den Glockenäpfeln erst im November oder auch bedeutend später eintrat. Bei den Glockenäpfeln stieg die Aktivität in der Epidermis und Subepidermis gleichzeitig an. Zuerst wurden in diesen Geweben grünliche Reaktionsprodukte gefunden (Nov.–Dez.) (Tafel 2, Abb. 6), später waren sie rotbraun (Jan. bis zur Fruchtfäulnis im April–Mai). Der Anstieg der Parenchymaktivität erfolgte auch bei den Glockenäpfeln zuerst im zentralen Markgewebe, dem Endokarp entlang sowie um die dorsalen Karpelleitbündel (Tafel 1, Abb. 4). Später wurde dann die beschriebene unregelmässige Verteilung beobachtet. In den Zellen mit starker Aktivität fand man oft helle Blasen, welche von aktivem Plasma umgeben waren. In diesem Zustand enthielten die Zellen oft unzählige kleine rotbraune Kügelchen, wahrscheinlich Mitochondrien, welche unregelmässig verteilt in Plasmaklümpchen lagen.

3.3.2 Die Perianthleitbündel und die dorsalen Karpelleitbündel

Die Perianthleitbündel ergaben von pH 4 bis etwa pH 8 eine starke Reaktion. pH-Werte zwischen 5,5 und 7,5 lieferten allerdings die besten Resultate. Auf KCN waren diese Leitbündel hingegen sehr empfindlich. Eine Konzentration von 10^{-2} M hemmte die Cytochromoxydase in allen Entwicklungsstadien vollkommen (Tafel 2, Abb. 7).

Die Reaktion auf Cytochromoxydase war kurz vor dem Aufblühen in allen Geweben aller Leitbündel etwa gleich (Tafel 2, Abb. 1). Die aktiven Stellen waren rotbraun gefärbt.

In den kambiumnahen Gefässen des Metaxylems wurde stark reagierendes Cytoplasma beobachtet (Tafel 1, Abb. 1).

In den dorsalen Karpelleitbündeln und in den Perianthleitbündeln reagierten Phloem, Kambiumzone und Xylemparenchym zunächst gut (Tafel 2, Abb. 1). In den ersten Wochen nach der Blüte nahm im Xylemparenchym der dorsalen Karpelleitbündel im Gegensatz zu den Perianthleitbündeln die Aktivität rasch ab (Tafel 2, Abb. 1, 3 und 4). Später (Juni) wurde auch im Phloem dieser Leitbündel, verglichen mit dem Rinden- und Markparenchym, keine gesteigerte Reaktion mehr gefunden (Tafel 2, Abb. 3 und 4). Dieser Zustand blieb mehrere Wochen gleich.

An einem Klarapfel von 35 mm Durchmesser wurden am 4. 7., nach etwa 5 Wochen schwacher Aktivität, erste Anzeichen eines Aktivitätsanstieges bemerkt. Die Reaktion wurde dann von Versuch zu Versuch intensiver und erreichte beim Glockenapfel im Verlaufe der Lagerung einen Höhepunkt (Tafel 1, Abb. 4). Gleichzeitig stieg, wie beschrieben, die Aktivität im umliegenden Gewebe. Dieser Entwicklungsverlauf war in allen Karpelleitbündeln gleich (Tafel 2, Abb. 1, 3 und 4; Tafel 4, Abb. 8).

In den Perianthleitbündeln und ihren Abzweigungen, welche das Rindengewebe versorgen, stieg die Cytochromoxydase rasch an (Tafel 2, Abb. 1, 3 und 4; Tafel 1, Abb. 1 und 2). Von diesem Anstieg waren vor allem das primäre Xylemparenchym und das sekundäre Xylemparenchym, die Xylemdifferenzierungszone, das Kambium und die Phloemdifferenzierungszone betroffen (Tafel 1, Abb. 1 und 2; Tafel 8, Abb. 8). Die Reaktionsprodukte waren hier schwarz und füllten praktisch die ganze Zelle. In der Xylemdifferenzierungszone konnte man oft dickwandige Tracheen erkennen, die gefüllt waren mit Reaktionsprodukten (Tafel 1, Abb. 1). Einzelne «Mitochondrien» waren nicht erkennbar.

Die Phloemzone, in der mit Chlorzinkjod Siebgefässe nachgewiesen wurden, lag relativ weit von den Xylemelementen entfernt und ergab zunächst, verglichen mit dem Xylemparenchym, schwache Reaktion (Tafel 1, Abb. 2; Tafel 8, Abb. 8). Die Reaktionsprodukte waren grünblau. Später wurden Kambium und Differenzierungszone schmäler, das heisst, es wurde weiter innen differenziertes Phloem gefunden (vgl. Kap. 2). Alle Phloemelemente ergaben jetzt sehr intensive Reaktion (2.8.66).

Während der Lagerung nahm die starke Aktivität der Kambiumzone nicht wesentlich ab. Nach wie vor blieb das Phloem stark aktiv, wurde aber vom Xylemparenchym in seiner Aktivität übertroffen (Tafel 2, Abb. 5 und 7). Gleichzeitig wie im Parenchym (vgl. Kap. 3.3.1) stieg die Reaktion auch in der äusseren und inneren Leitbündelscheide.

In dieser wurden oft Reste der verholzten Xylemprimanen stark angefärbt. Mit KCN konnte diese Reaktion nicht ausgeschaltet werden (Tafel 2, Abb. 7). Von der inneren Leitbündelscheide der Perianthleitbündel erstreckten sich in diesem späten Entwicklungsstadium radial verlängerte Zellen, welche oft auffallende Aktivität zeigten, zu der äusseren Leitbündelscheide der dorsalen Karpelleitbündel. Diese reagierten jetzt selbst ebenfalls sehr auffällig (Tafel 1, Abb. 4). Die Leitbündel behielten bis zum Fruchtzerfall diese starke Aktivität bei. Kleine Zellen (möglicherweise Geleitzellen) fielen im Phloemgewebe dieser Altersstufe durch starke Färbung auf (Tafel 2, Abb. 5).

3.3.3 Ventrale Karpellappen und deren Leitbündel. Samenanlagen

Ähnlich wie im Parenchym war die Aktivität der ventralen Karpellappen in frühen Entwicklungsstufen sehr ausgeprägt. Die Leitbündel und das Griffelkanalepithel (stigmatoides Gewebe), das auch zwischen den Karpellappen liegt, wurden rotbraun angefärbt (Tafel 2, Abb. 1 und 3; Tafel 1, Abb. 5). Das Grundgewebe war grauschwarz.

Die Samenanlagen reagierten ebenfalls sehr charakteristisch (Tafel 1, Abb. 3). Das Nucellusgewebe war stark rotbraun. Die Aktivität nahm in diesem Gewebe gegen aussen zu. Oft fiel die äusserste Zellschicht durch besonders intensive Reaktion auf. Dies wurde bei etwa 2 bis 4 Wochen alten Äpfeln beobachtet. Das Integument, welches dem Nucellus anliegt, enthielt ebenfalls rotbraune Reaktionsprodukte, wobei die innerste Zellschicht intensivere Farbe zeigte (Tafel 1, Abb. 3) («integumentary tapetum», Esau, 1965). Ähnlich reagierten die inneren Zellen des äusseren Integumentes. Es folgte eine Zone geringerer Aktivität, die weiter aussen in ein Gewebe mit grauschwarzen Reaktionsprodukten überging. In das Gewebe mit erhöhter Oxydaseaktivität (rotbraune Reaktionsprodukte) wurde weniger Stärke eingelagert (Tafel 2, Abb. 8). Im Verlaufe der weiteren Entwicklung nahm die Reaktion der Samenanlagen allgemein stark ab. Ältere Entwicklungsstufen wurden nicht mehr untersucht.

Etwas später als in den dorsalen Karpelleitbündeln nahm die gesteigerte Aktivität im ganzen Gewebe der ventralen Karpellappen ab (Tafel 2, Abb. 3 und 4). Während mehrerer Wochen wurde hier wie dort nur sehr schwache Aktivität beobachtet. Etwa gleichzeitig wie in den dorsalen Karpelleitbündeln begann auch in den Leitbündeln der ventralen Karpellappen der Aktivitätsanstieg. Gegen Ende August war die Reaktion sehr intensiv (Tafel 4, Abb. 8). Besonders bei Glockenäpfeln war auch das Grundgewebe oft sehr aktiv (Tafel 4, Abb. 1 und 8). Diese Aktivität wurde bis zum Fruchtzerfall beibehalten und breitete sich im Verlaufe der Lagerung (den Endo-

karpien entlang) radial gegen das Markgewebe aus. Bei Klaräpfeln war dieser Entwicklungsverlauf nicht so deutlich wie bei Glockenäpfeln.

3.3.4 Endokarp und Stielsklereiden

Die äusserste Zellschicht des Endokarps war in den ersten Entwicklungswochen durch rotbraune Reaktionsprodukte gekennzeichnet (Tafel 2, Abb. 1 und 3). Wie im Parenchym und in der ganzen Markzone sank die Aktivität dann aber sehr stark ab (Tafel 2, Abb. 4). Am 4.7.66 wurde an einem Apfel von etwa 30 mm Durchmesser der Beginn einer neuen Entwicklungsphase beobachtet. Die mittleren Endokarpregionen zeigten mit Phlorogluzinsalzsäure erstmals Ligninreaktion. Jetzt wurde eine starke Cytochromoxydasereaktion festgestellt, welche genau der lignifizierten Zone entsprach. So wie die Lignifizierung fortschritt, nahm die Cytochromoxydaseaktivität zu (Tafel 4, Abb. 1, 2 und 3). Kontrollreaktionen mit KCN haben gezeigt, dass es sich nicht um eine einfache Substratanfärbung durch das Inkubationsmittel handelte (Tafel 4, Abb. 4). Die Sklereiden waren mit braunschwarzen Oxydationsprodukten gefüllt. Diese positive Reaktion ergaben auch die Tüpfelkanäle, welche die dicke Zellwand bis an deren Oberfläche durchsetzen (Tafel 4, Abb. 5).

Ähnliche Feststellungen, wie sie hier an den Endokarpien während der Ligninsynthese gemacht wurden, konnten auch an den Sklerenchymfasern früherer Entwicklungsstadien des Fruchtstieles oder an den vereinzelt in der äusseren Leitbündelscheide auftretenden Sklereiden gemacht werden. Vor allem im Fruchtstiel ergaben die dickwandigen verholzten Sklerenchymzellen starke Reaktion (Tafel 4, Abb. 6).

Während der Weiterentwicklung, das heisst im Verlaufe der Lagerung, nahm die stark positive Reaktion in den dem Samenfach zugekehrten Zellen stark ab und verschwand schliesslich ganz. Die angrenzenden Gewebe behielten ihre starke Aktivität.

Die Zellen, welche durch Endokarpbrüche von tiefergelegenem Gewebe ins Samenfach proliferieren, reagierten nicht nur sehr stark auf Peroxydase, sondern ebensosehr auf Cytochromoxydase (Tafel 4, Abb. 7). Oft wuchsen ähnliche stark aktive Zellwucherungen strauchartig in den Griffelkanal.

3.4 Versuche zur Interpretation der gefundenen Cytochromoxydaseverteilung

Eine Erklärung für die seltsame Reaktionsänderung der Karpelleitbündel, der Karpellappen, der Endokarpien und des Parenchyms ist nicht einfach, da verschiedene Faktoren dafür verantwortlich sein können. Es ergaben sich folgende Erklärungsmöglichkeiten:

Je umfangreicher die Frucht wird, desto schlechter wird die Sauerstoffversorgung. Dies wiederum steigert die Cytochromoxydaseaktivität. Damit könnte auch die starke Reaktion der Sklerenchymzellen erklärt werden. Im kleinen Apfel dürfte durch den Griffelkanal eine wirksame Sauerstoffzufuhr erfolgen (Markley und Sando; Kidd und West, nach Ulrich, 1952). Bei manchen Sorten wird dies teilweise auch im ausgewachsenen Zustand geschehen. So wurde im Klarapfel vielleicht aus diesem Grunde nur selten eine sehr ausgesprochene Cytochromoxydasereaktion im Grundgewebe der Karpellappen gefunden. In alternden Äpfeln, deren Hautgewebe mehr oder weniger ge-

schrumpft erscheint, könnte die Sauerstoffdiffusion schlechter werden und darum die Aktivität ansteigen.

Es wurde beobachtet, dass im Markgewebe der Stärkeaufbau zuletzt einsetzt und der Abbau zuerst beginnt. Es ist denkbar, dass in den Zellen, die durch relativ dicke Zellwände vom übrigen Gewebe isoliert werden, die verwertbaren Stoffe, wie zum Beispiel Glucose-6-phosphat, aufgebraucht werden. Dies könnte vor allem für das Endokarp, die Karpellappen und die beschriebenen Zellwucherungen zutreffen. Letztere dürften ohnehin einen gesteigerten Stoffwechsel zeigen. Die Ligninsynthese im Endokarp ist ebenfalls ein energieverbrauchender Prozess, da vor allem für die Synthese des Phenolringes energiereiche Verbindungen gebraucht werden. Die Folge dürfte ein Anstieg an ADP sein, was, sofern genügend Cytochromoxydase neu gebildet wird, zu einer gesteigerten oxydativen Phosphorylierung führen könnte. Wenn Stärke vorrätig ist, könnten durch Phosphorolyse energiereiche Phosphohexosen gebildet werden.

Um diese Vermutungen zu prüfen, wurden zwei Versuchsreihen ausgeführt.

1. *Versuchsreihe:* Indem die Äpfel mit einer Paraffinschicht überzogen wurden, konnte die Permeabilität künstlich herabgesetzt werden.

Am 27.7.66 wurden mehrere Glockenäpfel am Baum in geschmolzenes Paraffin getaucht, so dass sie vollständig von einer 2–3 mm dicken Paraffinschicht umhüllt waren. Nach 8 Tagen wurde auf Cytochromoxydase und Stärke geprüft, und mit einem nichtbehandelten Apfel verglichen. Die Cytochromoxydaseaktivität im paraffinierten Apfel schien etwas angestiegen zu sein. Ein sicherer Entscheid war aber nicht möglich. Eine Abnahme der Cytochromoxydase hatte aber sicher nicht stattgefunden. Verglichen mit der Kontrolle ergab der paraffinierte Apfel deutlich schwächere Stärkereaktion. Vor allem im Markgewebe hatte die Stärke stark abgenommen. Die Samen waren zur Hälfte kräftig braun, was in der Kontrolle nicht der Fall war.

Am 15.8. war mit den restlichen Äpfeln ein zweiter Versuch beabsichtigt. Alle paraffinierten Äpfel waren vom Baum gefallen und leider weitgehend braun. Charakteristisch war ein starker Trestergeruch, der auf intensive Gärungsvorgänge hinwies. Die Stärke hatte weiterhin stark abgenommen, jetzt aber auch im Kortexgewebe. Eine kreisförmige Zone war um die Fliege eines Apfels noch normal grün. Das Fruchtfleisch war hier noch 2–3 mm tief ungebräunt. Dieses Gewebe wurde auf Cytochromoxydase geprüft. Verglichen mit der Kontrollreaktion durch KCN, zeigte diese Stelle sehr starke Reaktion, so wie sie sonst nur in den Leitbündeln, den Endokarpien und in den Karpellappen gefunden wurde (Tafel 5, Abb. 2, 5 und 6).

Am 14.10.66 wurden ein Tag nach der Ernte zwei relativ grosse Glockenäpfel mit einer Paraffinschicht umhüllt. Der eine Apfel wurde bei Zimmertemperatur, der andere bei etwa 10 °C im Keller aufbewahrt. Schon 10 Tage später war die Schale des ersten Apfels stellenweise braun. Es zeigte sich, dass die braunen Gewebsteile etwa 5–10 mm in das frische Fruchtfleisch hinein ragten. Das Markgewebe und die innere Rindenschicht waren noch frisch. Die «faule» Zone lag also nur oberflächlich. Der Stärkenachweis ergab, dass in diesem Gewebe noch relativ viel Stärke vorhanden war. Im frischen Gewebe fiel der Nachweis negativ aus.

Die Cytochromoxydase war im Gewebe des paraffinierten Apfels deutlich aktiver als in einer unter gleichen Bedingungen gelagerten Kontrollfrucht. Das Cytoplasma

war stellenweise dicht übersät mit Reaktionskörnchen (Mitochondrien). Das braune Gewebe ergab keine Reaktion. Wahrscheinlich waren hier die Zellen schon abgestorben.

Am 28.11.66 konnten am zweiten Apfel die gleichen Beobachtungen gemacht werden. Die Beobachtungen, welche sich genau mit denen im ersten Apfel deckten, waren folgende: Brauner Gewebering an der Oberfläche ohne Cytochromoxydasereaktion, positiver Stärkenachweis in diesem Gewebe und gesteigerte Cytochromoxydaseaktivität im übrigen Fruchtfleisch. Vor allem die Grenzzone zwischen «abgestorbenem» und frischem Gewebe zeigte eindeutig gesteigerte Aktivität. Als Kontrolle wurde auch hier wieder ein gleich gelagerter Apfel ohne Paraffinschicht benutzt.

Versuchsreihe 2: Durch frühzeitiges Pflücken und anschliessende Lagerung bei Zimmertemperatur wurde eine frühzeitige Stärkeabnahme und vielleicht dadurch ein Hungerzustand bewirkt.

Zwei Glockenäpfel wurden am 4.7.66 so unter eine Glasglocke gelegt, dass Luft dazutreten konnte. Um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen und zu starkes Schrumpfen zu verhindern, wurde noch ein kleines Gefäss mit Wasser neben die Äpfel gestellt. Am 5.9.66 und am 3.10.66 wurden diese Äpfel auf Cytochromoxydase geprüft. Sie waren wohl stark geschrumpft, aber noch durchaus frisch. Die Aktivität war auffallend angestiegen (Tafel 5, Abb. 1). Reaktionsstärke und Aktivitätsverteilung waren noch ausgeprägter als bei alternden, stark geschrumpften, aber normal gelagerten Glockenäpfeln. Die Leitbündel reagierten sehr intensiv, wie auch die grosszellige äussere Leitbündelscheide, das Parenchym in Leitbündelnähe, die Karpelleitbündel, Karpellappen und Stellen des Parenchyms (Tafel 5, Abb. 1). Epidermis und Subepidermis wurden grünblau bis braun gefärbt (3.10.66). Interessant ist die intensive Reaktion der Endokarpien, Karpellappen und der dorsalen Leitbündel (Tafel 5, Abb. 1). Der Aktivitätsanstieg ist hier wie bei normalem Entwicklungsverlauf erfolgt. Möglicherweise sind die beschriebenen Änderungen der Cytochromoxydaseaktivität weitgehend genetisch bedingt. Bezeichnend ist, dass die Äpfel absolut keine Stärkereaktion mehr zeigten.

In einem später gepflückten, unreifen Apfel, der nach längerer Lagerung keine Stärke mehr enthielt, wurde eine ähnliche Aktivitätssteigerung gefunden. KCN und Hitzeeinwirkung hemmten vollkommen. Ein Klarapfel, im hellgrünen Zustand gepflückt, wurde später, als er schon einseitig angefault war, auf Cytochromoxydase geprüft. Er reagierte sehr intensiv. Der Stärkenachweis fiel negativ aus. Das Gewebe war stark mazeriert, weshalb kleine Gewebeklötzchen inkubiert wurden. Sie verfärbten sich braunschwarz.

Diese Ergebnisse der zwei Versuchsreihen dürften die gemachten Annahmen teilweise stützen. Eine Stärkeabnahme und damit verbunden ein Anstieg der Cytochromoxydaseaktivität wurde auch in diesen Versuchen beobachtet. Anaerobiose fördert den Stärkeabbau.

Da das Gewebe unter Schorfstellen immer sehr stark reagierte (Tafel 5, Abb. 7 und 8), eine Stärkeabnahme aber nicht beobachtet werden konnte, drängt sich beim Vergleich mit den vorhergehenden Versuchen eine dritte Erklärungsmöglichkeit auf. Die starke Aktivität könnte eine prämortale Erscheinung sein, die mit der Desorganisation der Zellen einhergeht (vgl. Kap. 3.5.1). Dass in den am 14.10. angesetzten Versuchen die «toten» Gewebe noch gehäuft Stärke enthielten, könnte ebenfalls damit zusammen-

hängen. Das Schalengewebe ist vielleicht weniger gut an Sauerstoffmangel adaptiert, so dass ein solcher relativ rasch zur Zelldesorganisation führt. Die Enzyme, welche den Stärkeabbau fördern, werden zerstört, oder die Enzymsynthese wird verunmöglicht. Eine dadurch verursachte Schwächung der Abwehrreaktion könnte eine Infektion durch Pilz- und Bakterienkeime, die auf der Fruchtoberfläche liegen, begünstigen, so dass von hier aus das Gewebe zerstört wird.

Durch die Annahme einer Zelldesorganisation und einer damit verbundenen Zunahme der Cytochromoxydaseaktivität könnten folgende Beobachtungen erklärt werden:

a) die starke Aktivität im Endokarp vor dem Absterben dieser Zellen;

b) die starke Reaktion des Gewebes unter Schorfstellen;

c) die gesteigerte Reaktion des restlichen, noch frischen Gewebes von anaerob gehaltenen Äpfeln;

d) die erhöhte Aktivität in alternden und frühzeitig gepflückten, bei Zimmertemperatur gelagerten Äpfeln.

Verschiedene andere Beobachtungen können aber mit vorhergehender Annahme nicht befriedigend erklärt werden, so zum Beispiel der Anstieg der Aktivität in den Endokarpien während der Ligninsynthese, die auffällige Reaktion der ins Samenfach wachsenden Zellen usw. Möglicherweise könnten aber auch alle drei Hypothesen zusammen in Frage kommen, da keine die andere ausschliesst.

Eine Permeabilitätsänderung der Mitochondrien für das Reagenz könnte einen Aktivitätsanstieg vortäuschen. Es wurden deshalb Gewebe relativ junger Äpfel vor der Inkubation in eine Digitoninlösung gelegt. Durch Behandlung mit diesem oberflächenaktiven Stoff wurde eine Erhöhung der Mitochondrienpermeabilität erhofft (Simon, 1958). Eine Reaktionssteigerung konnte nicht beobachtet werden.

Sehr auffallend ist während der ganzen Fruchtentwicklung die starke Reaktion der Perianthleitbündel. Die gesteigerte Reaktion des Kambiums ist sehr wahrscheinlich mit dem erhöhten Stoffwechsel vor und nach der Zellteilung verbunden.

Um die Cytochromoxydasereaktion in meristematischen Geweben an einem anderen Objekt zu prüfen, wurden Längsschnitte durch Wurzelspitzen des Maises untersucht. Es hat sich gezeigt, dass das Spitzenmeristem, die Initialzellen und das Kalyptrogen sehr intensiv reagieren. Im Protoderm (Epiblem) und im Plerom nimmt diese starke Aktivität wurzelaufwärts nur relativ langsam ab. Dies gilt vor allem für die Leitbündeldifferenzierungszone (Tafel 5, Abb. 4). Das Leitbündelgewebe behält seine starke Aktivität bei. Besonders in den Primordien der Seitenwurzeln, da, wo das Perizykelgewebe wieder meristematisch wird, steigt die Cytochromoxydasereaktion stark an (Tafel 5, Abb. 4).

Schon zirka 0,2 mm von den Initialzellen entfernt fallen im Plerom grosse, sehr aktive Zellen auf. Sie entwickeln sich zu den breitlumigen Tracheen des Metaxylems. Das Periblem (Kortex) fällt durch Zellreihen besonderer Aktivität auf, die von schwächer aktiven Zwischengruppen unterbrochen werden. Vermutlich handelt es sich hier um Zellen kurz vor der Zellteilung, da sie relativ gross und abgerundet erscheinen. Manchmal ist der Zellkern als heller, runder Fleck mitten in der Zelle zu erkennen. Die Wurzelhaube fällt allgemein durch starke Aktivität auf.

Die Beobachtungen an den Apikalmeristemen der Maiswurzel decken sich mit den Beobachtungen am Kambium der Perianthleitbündel im Apfel. Sie erklären auch die starke Reaktion des Apfelgewebes kurz nach der Blüte. Auch hier ist wahrscheinlich der meristematische Charakter (Tetley, 1930; M. McArthur und R. H. Wetmore, 1941) und der damit verbundene Energieumsatz für die gesteigerte Reaktion verantwortlich.

In Leitbündeln aus einem jungen Maisstengel (ca. 7 mm Durchmesser) sind die Zellen um die medianen Tracheen oft durch besonders intensive Reaktion aufgefallen (Tafel 5, Abb. 3). Man kann sie wohl direkt mit dem Xylemparenchym im Apfelleitbündel vergleichen. Möglicherweise haben sie hier auch gleiche Funktionen. Ein Querschnitt durch einen Blattstiel (Apfelbaumblatt) zeigte schwächere Aktivität des Xylemparenchyms als der Apfel selbst. Im Phloem des Maises fielen die Geleitzellen durch besondere Reaktion auf (Tafel 5, Abb. 3). Oft wurde aber auch in den Siebzellen eindeutig Plasma mit positiver Reaktion gefunden. Besonders deutlich konnte dies an Längsschnitten festgestellt werden. Auch diese Lokalisierung deckt sich mit derjenigen im Apfelphloem. Im Leitgewebering der Maiswurzel wurden prinzipiell gleiche Beobachtungen gemacht. Hier fielen manchmal auch Verdickungsleisten der Tracheen auf, welche mit kleinen aktiven Körnchen belegt waren. Man wird hier an die Tracheen der Xylemdifferenzierungszone erinnert, welche gefüllt waren von Reaktionsprodukten. Wenn man bedenkt, dass gerade hier Lignin in die Verdickungsleisten eingelagert wird, ergibt sich eine Parallele zur starken Cytochromoxydasereaktion während der Lignineinlagerung ins Endokarp. Es ist also durchaus möglich, dass der energieverbrauchende Prozess der Ligninsynthese die Aktivitätssteigerung erklärt. Die elektronenmikroskopische Beobachtung von Hepler und Newcomb (1963), (nach Newcomb, 1963) wonach das dichte Cytoplasma, welches die späteren Wandverdickungen überzieht, mitochondrienreich ist, deckt sich mit den beschriebenen Befunden (Esau, 1965).

3.5 Vergleich der Versuchsresultate mit anderen Arbeiten an Äpfeln

3.5.1 Die Atmungsintensität im Verlaufe der Apfelentwicklung

Krotkov (1941), Krotkov und Helson (1946) haben ausführlich die Atmungsintensität von Äpfeln der Sorte McIntosh im Verlaufe ihrer Entwicklung beschrieben. Danach ist die Atmungsintensität kurz nach dem Blütenblattfall noch hoch, fällt dann rasch ab und erreicht unmittelbar vor dem Klimakterium, welches je nach Sorte am Baum oder während der Lagerung durchschritten werden kann (Ulrich, 1952; Spencer, 1965), ein Minimum; während des Klimakteriums steigt die Atmung stark an, nachher nimmt sie wieder ab. Wenige Tage vor dem sichtbaren Gewebezerfall konnte Krotkov eine erneute, plötzliche Steigerung der CO_2-Abgabe feststellen. Ein ähnlicher Verlauf der Atmungskurve wurde von mehreren Autoren gefunden (z.B. Brändle und Wanner, 1965). In verschiedenen Arbeiten wird festgestellt, dass die klimakterische Erhöhung des Gasaustausches vor allem die Kohlendioxidabgabe betrifft und dass darum während dieser Entwicklungsperiode der RQ stark ansteigt. Kidd und West (1938) (nach Hulme u.a., 1963) fanden Werte von 1,25 bis 1,4 für ganze Früchte. Hulme (1961) (nach Hulme u.a., 1963) gibt für Gewebescheiben einen Anstieg des RQ von 1,4 auf 1,8 an. Ein geringer, doch bezeichnender Anstieg der

Sauerstoffaufnahme wurde ebenfalls gefunden (Brändle und Wanner, 1965; M. Spencer, 1965).

Lall und Kidd (1932) (nach Ulrich, 1952) fanden, dass Parasiten die Atmung steigern.

In diesem Zusammenhang sei noch auf einige Beobachtungen hingewiesen, die sich mit dem Gasaustausch der Äpfel befassen. Markley und Sando, Kidd und West (nach Ulrich, 1952) glauben, dass ein Gaswechsel durch die Fliege und durch den Griffelkanal erfolgen kann. Nach Gäumann (1951) ist der Griffelkanal bei manchen Äpfeln der Weg, auf dem die Pilzhyphen ins Kerngehäuse gelangen können, wo sie die Kernhausfäule verursachen.

Während des Reifungsprozesses werden nach Wardlaw und Leonard (1936) (nach Ulrich, 1952) die äusseren Gewebe der Früchte je länger, desto weniger gasdurchlässig. Haylett (1925) fand eine erhöhte Gaspermeabilität durch die gedehnten Schalen vollturgeszenter Äpfel, die bei verminderter Turgeszenz abnahm.

Im Apfelgewebe fanden Brändle und Wanner (1965) einen charakteristischen Verlauf der O_2-Partialdruckkurve. Im Schalen- und äusseren Rindengewebe fällt die Partialdruckkurve rasch ab, wird im inneren Kortexgewebe flacher, um in der Zone der Perianthleitbündel wieder steil abzufallen. In älteren Bismarckäpfeln wurde dieser Kurvenverlauf sehr unregelmässig.

Beim Vergleich der Versuchsresultate der vorliegenden Arbeit mit den zitierten Feststellungen darf auf folgende Punkte hingewiesen werden:

a) Die Cytochromoxydaseaktivität im Parenchym stimmt bis und mit dem klimakterischen Atmungsanstieg mit dem Atmungsverlauf überein. Ob in den hier untersuchten Früchten der klimakterische Atmungsanstieg sich mit der Zunahme der Cytochromoxydase wirklich deckt, kann nicht genau entschieden werden, da keine gleichzeitigen Atmungsmessungen vorliegen. Der Zeitpunkt und das Aussehen der Früchte deuten allerdings darauf hin.

b) Nach dem Klimakterium wurde keine Abnahme der Cytochromoxydaseaktivität beobachtet. Es konnte vielmehr ein kontinuierlicher Anstieg festgestellt werden. Eine Erklärung für diese unerwarteten Befunde könnte die Beobachtung von Buchloch (1960) (nach Spencer, 1965) liefern, wonach in der Reifungsperiode ein Mitochondrienzerfall beobachtet wurde. Dies dürfte die Atmungsabnahme im Postklimakterium erklären, müsste aber nicht eine verminderte enzymhistochemische Cytochromoxydasereaktion ergeben. Für die Oxydation des Reagenzes sind nur die Endglieder des Multienzymsystems verantwortlich. Obwohl eine wirksame Phosphorylierung und ein geordneter Elektronentransport mehr und mehr verunmöglicht wird, könnte die Oxydation des Reagenzes trotzdem, ja vielleicht sogar besser erfolgen.

c) Vor dem Gewebezerfall wurde starke Cytochromoxydaseaktivität gefunden, was vielleicht teilweise die von Krotkov beschriebene starke CO_2-Abgabe verursachen könnte.

d) Die erhöhte Sauerstoffaufnahme im Klimakterium dürfte von der gesteigerten Cytochromoxydaseaktivität herrühren (vgl. Hulme, Jones und Wooltorton, 1963).

e) Die beschriebene Atmungssteigerung durch Parasiten deckt sich mit der starken Cytochromoxydaseaktivität unter Schorfstellen.

f) Der Anstieg der Oxydaseaktivität im Subepidermalgewebe könnte im Zusammenhang mit der Permeabilitätsabnahme der äusseren Gewebe stehen.

g) Ein besserer Gasaustausch durch den Griffelkanal dürfte, nach der später aufgestellten Hypothese, für den geringen Aktivitätsanstieg in den ventralen Karpellappen der Klaräpfel und jungen Glockenäpfel verantwortlich sein.

h) Die rasche Abnahme des O_2-Partialdruckes in der Zone der Perianthleitbündel könnte von der erhöhten Oxydaseaktivität in den Leitbündeln verursacht werden.

i) In älteren Äpfeln wurde im Grundgewebe eine unregelmässige Verteilung der Cytochromoxydase gefunden, was sich mit dem Verlauf der O_2-Partialdruckkurve sehr gut deckt.

3.5.2 Kohlenhydratstoffwechsel

Als charakteristischer Vorgang muss hier die Stärkeeinlagerung und der darauffolgende Abbau erwähnt werden. Auch hier kann die Arbeit von Krotkov (1941) zitiert werden. Er konnte bei der Sorte McIntosh bis am 28.6. noch keine Stärke finden. Am 6.7. wurden die ersten Stärkespuren bemerkt. Vom 11.7.–8.8. wurde sehr viel Stärke sowohl im Mark- wie im Kortexgewebe gefunden. Am 15.8. begann eine stetige Stärkeabnahme, bis am 12.10. schliesslich keine Stärke mehr gefunden wurde.

Er fand, dass vor allem das Rindengewebe ausserhalb der Perianthleitbündel der Stärkeeinlagerung dient. In frühen Entwicklungsstufen wurde hier zuerst Stärke eingelagert. Der Stärkeabbau begann dann auch im Markgewebe und griff später auf die Rindenzone über.

Archbold (1932) (nach Ulrich, 1952) hat gefunden, dass die Stärke erst bei einer gewissen Zuckerkonzentration erscheint und dass sie später trotz hoher Zuckereinlagerung abnimmt. Das Maximum der Zuckerkonzentration wurde bei totalem Stärkeabbau gefunden. Kidd und West (1939) fanden, dass im allgemeinen parallel zum Stärkeabbau der Rohrzucker zunimmt und dass im Verlauf dieses Prozesses ein Maximum erreicht wird.

Nach Krotkov und Helson (1946) steigt die gesamte Zuckerkonzentration unmittelbar nach dem Blütenblattfall stark an. Es handelt sich dabei vor allem um Fruktose und Glucose, wobei die Rohrzuckerkonzentration entweder gleichbleibt oder leicht abnimmt. In der Periode vom 12.6.–12.8. nimmt die Zuckerkonzentration weiter zu. Es handelt sich vor allem um Fruktose und in geringerem Masse um Saccharose. Die Glucosekonzentration bleibt konstant. Von August bis September steigt der Zuckergehalt langsamer an. Vom 24.9.–7.10. erfolgt ein Anstieg des Gesamtzuckers, verursacht durch Fruktose und Invertzucker. Der Zuckeranstieg übersteigt aber die Menge der hydrolysierten Stärke. Im fünften Stadium vom 7.10.–9.12. erreicht die Atmung ihr Maximum. Es verschwindet mehr Zucker als aufgrund der Atmung erwartet würde. Vom 9.12.–28.4. nimmt die Zuckerkonzentration weiter ab. Es verschwindet vor allem Invertzucker. Fruktose und jetzt erstmalig auch Glucose steigen an. Die gebildete Kohlendioxidmenge ist grösser als die gleichzeitig verschwundenen Zucker (die Konzentrationen wurden in Prozent des Frischgewichtes ermittelt).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Beobachtungen von Krotkov über die Stärkeeinlagerung und den Stärkeabbau weitgehend bestätigt. Der Stärkeaufbau begann bei den zwei untersuchten Sorten etwa einen Monat früher, als von Krotkov

für McIntosh beschrieben wird. Folgende Beobachtungen decken sich mit den Angaben dieses Autors:

a) Die Stärkeeinlagerung begann im Rindengewebe und griff erst später auf das Markgewebe über.

b) Der Abbau erfolgte zuerst im Markgewebe und später im Rindengewebe. Dieser Verlauf des Stärkeabbaues wurde auch bei anaerob gehaltenen Äpfeln (paraffinumhüllt) festgestellt.

Die Zuckerkonzentration verschiedener Entwicklungsstufen wurde nicht bestimmt. Die Literaturzitate dürften aber bei der Interpretation der Versuchsresultate von Bedeutung sein.

3.5.3 Der Säurestoffwechsel

Nach Archbold (1932) (nach Ulrich, 1952) steigt in jungen Früchten der Gehalt an freien Säuren kontinuierlich an. Die peripheren Fruchtteile sollen weniger sauer sein als die inneren Gewebe (Gerber: Verhältnis 5:8).

Aus verschiedenen Arbeiten geht hervor, dass im Apfel die Apfelsäure die anderen Säuren in ihrer Konzentration weit übersteigt (Ulrich, 1952; Eggenberger, 1949; Spencer, 1965). Eine Verminderung dieser Säure erniedrigt vor allem die Gesamtsäurekonzentration im Apfel. Nach Hulme, Jones u.a. (1963) nimmt die Apfelsäure besonders während des Klimakteriums ab. Nach Kidd u.a. (1951) erfolgt die Säureabnahme proportional zur jeweils vorhandenen Säurekonzentration, ohne dass diese Vorgänge im Klimakterium beschleunigt würden.

3.6 Erklärungsmöglichkeiten für den beobachteten Atmungsverlauf und für die Änderung der Cytochromoxydaseaktivität

Eine umfassende Interpretation der gefundenen Versuchsresultate muss ein umfangreiches Versuchsmaterial berücksichtigen, da die Cytochromoxydase in alle Stoffwechselvorgänge direkt oder indirekt eingreifen kann. Diese Vorgänge können ihrerseits wieder die Aktivität der Cytochromoxydase beeinflussen. Für den auffälligen Anstieg der Atmung und des RQ im Klimakterium wurden verschiedene Erklärungsmöglichkeiten erwogen. Blackman (nach Krotkov, 1941) vermutet, dass eine gesteigerte Hydrolysierbarkeit die Konzentration der Atmungssubstrate erhöht, wodurch ein Atmungsanstieg verursacht wird. Kidd (nach Krotkov, 1941) vermutet hingegen, dass der Grund im Protoplasma selbst zu suchen sei (Permeabilitätsänderungen). Krotkov (1941) erklärt die Atmungssteigerung mit Änderungen in der Substratkonzentration. Die Atmungsabnahme im Präklimakterium soll durch eine Abnahme des Atmungssubstrates bis zu einem Minimum verursacht sein, worauf ein neues Substrat oder das gleiche Atmungsmaterial aus anderer Quelle mobilisiert wird. Dadurch würde schliesslich der klimakterische Anstieg verursacht. Dieses neue Substrat könnte dann auch wieder aufgebraucht werden. Wenn dies geschieht, ist der Gewebetod die Folge. Eine Pilzinfektion in diesem Stadium ist deshalb viel wahrscheinlicher. Der reduzierte Stoffwechsel und nicht die Pilzinfektion selbst sind dann primär die Ursache des Gewebetodes.

Da die Atmung im Schalengewebe von prä- und postklimakterischen Äpfeln durch Malat und α-Ketoglutarat nicht gesteigert wurde, wohl aber im Schalengewebe älterer Früchte, glauben Neal und Hulme (1958), dass alterndes Gewebe einen Mangel an organischen Säuren aufweist.

Hulme, Jones und Wooltorton (1963) machten folgende Faktoren für den Atmungsanstieg verantwortlich:

a) Es wurde ein Anstieg der Cytochromoxydaseaktivität in Mitochondrienfraktionen beobachtet. Nach dem Klimakterium nahm diese Aktivität dann wieder ab.

b) Die Aktivität des Malatenzyms und der Pyruvatcarboxylase nahm während des Klimakteriums zu. Darauf wurde die Erhöhung der CO_2-Abgabe während dieser Entwicklungsperiode zurückgeführt. Die Pyruvatcarboxylase unterstützt die Wirkung des Malatenzyms, indem das gebildete Pyruvat weiter decarboxyliert wird.

Nach Kidd u.a. (1951) beeinflussen die Faktoren, welche zu einer gesteigerten CO_2-Abgabe im Klimakterium führen, den Apfelsäurestoffwechsel aber nicht. Neuere Untersuchungen von Hulme u.a. (1963) haben gezeigt, dass im Klimakterium sowohl im Schalengewebe wie im Fruchtfleisch eine beschleunigte Apfelsäureabnahme eintritt.

Hulme (1954) hat gefunden, dass im Präklimakterium das Verhältnis Eiweissstickstoff zu Gesamtstickstoff bis zum Klimakterium abnimmt, um mit dem klimakterischen Atmungsanstieg wieder zuzunehmen. Die von Hulme u.a. (1963), Neal und Hulme (1958) gefundene Steigerung der Enzymaktivität steht damit in Einklang. Der Proteinstickstoff nimmt nach dem Klimakterium etwas später als die Atmung wieder ab.

Eine für die vorliegende Arbeit interessante Erklärung der präklimakterischen Atmungsbegrenzung stammt von Hulme (1954) und Pearson und Robertson (1954). Es wird von diesen Autoren angenommen, dass die ADP-Konzentration die Atmung begrenzt. Nach Hulme (1954) soll durch eine gesteigerte Proteinsynthese ADP aus ATP in erhöhter Menge entstehen, so dass dadurch im Klimakterium eine Atmungssteigerung erfolgt. Pearson und Robertson (1954) machen ebenfalls gesteigerte Synthesevorgänge für die Zunahme von ADP verantwortlich. Dieser Hypothese entsprechend soll das ATP/ADP-Verhältnis die Atmungsrate bestimmen.

Eine Verkleinerung des ATP/ADP-Verhältnisses soll die Atmungssteigerung im Klimakterium verursachen. In frühen Entwicklungsstadien muss demnach das ATP/ADP-Verhältnis klein sein. DNP und ATP beeinflussen die Atmung bei entsprechenden Versuchen nur geringfügig. Während der Stärkeeinlagerung wird hingegen die ATP-Konzentration auf Kosten von ADP zunehmen, wodurch das Verhältnis vergrössert, die Atmung aber herabgesetzt wird.

Aufschlussreich sind die Versuche von Neal und Hulme (1958) und Pearson und Robertson mit DNP, woraus hervorgeht, dass im Kortexgewebe des präklimakterischen Apfels durch DNP eine deutliche Atmungsstimulierung erzielt wird, nicht aber im Postklimakterium. Für das Schalengewebe fanden Neal und Hulme (1958) keine Steigerung der O_2-Aufnahme durch DNP. DNP-Versuche mit Avocadofrüchten führten Millerd, Bonner und Biale (1953) zur Hypothese, dass eine Entkopplersubstanz, welche im Klimakterium gebildet wird, jetzt die Wirkung von DNP ausschaltet. Nach Allen (1953) könnte die Entkopplungstheorie möglicherweise die Beziehungen zwi-

schen Parasiten und Wirt erklären. Hulme u.a. (1963) konnten keine Entkopplung in Apfelmitochondrien feststellen. In der gleichen Arbeit wurde allerdings eine schwache Abnahme der Phosphorylierungswirkung, das heisst eine Abnahme des P/O-Verhältnisses für Mitochondrienfraktionen aus dem nachklimakterischen Apfel beobachtet.

Ausser einer Abnahme der Mitochondrienaktivität dürfte auch eine Verminderung der Säuren des TCS-Zyklus, vor allem der Apfelsäure, für den Atmungsabfall nach dem Klimakterium verantwortlich sein (Kidd und West, 1951; Hulme u.a., 1963).

«Die Dauer der Lagerfähigkeit von Äpfeln ist beendet, wenn die Vorräte an Saccharose verbraucht sind. Der Schwund an Saccharose wird von einer Verschiebung innerhalb der Phosphorfraktion begleitet. Die Summe der Gehalte an organisch gebundenem Phosphor sinkt im Verlaufe der Lagerung zugunsten des Gehaltes an anorganischem Phosphor fortlaufend ab und beträgt am Ende der Lagerung nur noch 25 bis 30% des Gehaltes an Gesamtphosphor.» (Lwow und Kalugina, 1959.)

Aus den zitierten Arbeiten geht hervor, dass folgende Faktoren die Atmung im Apfel beeinflussen könnten:

a) Veränderung des Atmungssubstrates, zum Beispiel Abnahme der Säuren und der Saccharose nach dem Klimakterium;

b) Veränderungen des ATP/ADP-Verhältnisses. Dieses Verhältnis ist vor dem Klimakterium gross und verkleinert sich durch ADP-Anstieg im Klimakterium;

c) Veränderung der Enzymaktivität. Steigerung der Mitochondrienaktivität, des Malatenzyms und der Pyruvatcarboxylase im Klimakterium und anschliessende Aktivitätsabnahme.

Aufgrund der histochemischen Lokalisierungsergebnisse in dieser Arbeit kann gefolgert werden, dass Stoffwechselvorgänge, wie sie im Klimakterium an ganzen Äpfeln oder an Gewebescheiben aus Kortexgewebe gefunden wurden, nicht im ganzen Apfel gleichzeitig einsetzen. Die Annahme scheint berechtigt, dass das Mark- oder besser das Karpellgewebe in diesen Vorgängen der Rindenzone vorauseilt. Der relativ frühe Aktivitätsanstieg in diesem Gewebe dürfte ähnlich verursacht werden wie die Reaktionssteigerung im Verlaufe des Klimakteriums im Rindengewebe. Die Aktivität der Leitbündel wird anschliessend genauer diskutiert.

Untersuchungen am klimakterischen Apfel könnten also teilweise eine Erklärung für die in verschiedenen Geweben, zu verschiedenen Zeiten feststellbaren Aktivitätsänderungen liefern. Die gesteigerte Cytochromoxydaseaktivität im jungen Apfel hängt sicher mit dessen meristematischem Charakter zusammen und dürfte die gesteigerte Atmung erklären. Dafür spricht auch der RQ von etwa 1 in diesem Entwicklungsstadium (Brändle und Wanner, 1965). Bemerkenswert ist, dass in Knospen und Wurzelmeristemen der RQ meistens grösser als 1 ist, dass also glycolytische Stoffwechselvorgänge in diesen Geweben eine wichtige Rolle spielen dürften (Betz, 1955). Diese Tatsache spricht aber für die in den nächsten Abschnitten vertretene Auffassung. Dies besonders, wenn man die gefundene starke Cytochromoxydaseaktivität in der Maiswurzelspitze berücksichtigt. Die Proteinsynthese in meristematischen Geweben wird das ATP/ADP-Verhältnis verkleinern, da viel ATP verbraucht wird. Es spielen sich also hier ähnliche Vorgänge ab, wie sie von Hulme, Pearson u.a. für den klimakterischen Apfel angenommen wurden. Nach U. Tetley (1930) ist die meristematische Phase des Apfels von kurzer Dauer. Nach McArthur und Wetmore (1941) ist für McIntosh das Ende der Zellteilungsperiode noch vor Ende Juni anzusetzen.

Schon vor diesem Zeitpunkt hat aber im Glockenapfel die Cytochromoxydaseaktivität ihr Minimum erreicht.

Die Aktivitätsabnahme während der Differenzierung und Stärkeeinlagerung deckt sich mit der beschriebenen Atmungsabnahme, ist aber schwer zu erklären. Ein hohes ATP/ADP-Verhältnis (Pearson und Robertson, 1954), resultierend aus geringerer Proteinsynthese, kann nach Hulme (1954) die reduzierte Atmung und vielleicht indirekt auch die verminderte histochemische Oxydasereaktion erklären. Eine verminderte Oxydation des Indikators, verursacht durch schlechtere Permeabilität durch die Mitochondrienoberfläche, ist unwahrscheinlich; ebenso dürfte eine innigere Kopplung der Oxydase mit dem Phosphorylierungssystem kaum die Reaktion beeinflussen. Wenn dem so wäre, ist nicht einzusehen, warum denn in meristematischen Geweben der Nachweis der Cytochromoxydase sehr positiv ausfällt, wobei gleichzeitig die ATP-Nachfrage gesteigert ist. Man kann wohl annehmen, dass eine effektive Aktivitätsabnahme erfolgt.

Der klimakterische Aktivitätsanstieg deckt sich mit den Beobachtungen von Hulme u.a. (1963). Für die gesteigerte O_2-Aufnahme in diesem Entwicklungsstadium dürfte nicht zuletzt die Zunahme der Cytochromoxydase verantwortlich sein.

Der klimakterische Atmungsanstieg wird von verschiedenen Autoren auf ein verkleinertes ATP/ADP-Verhältnis zurückgeführt. Änderungen des Atmungssubstrates werden ebenfalls erwogen. Wenn man annimmt, dass das ATP/ADP-Verhältnis nach dem Klimakterium weiter abnimmt, könnte die Aktivität der Cytochromoxydase dann gross sein, wenn dieses Verhältnis klein ist und umgekehrt. Das würde bedeuten, dass erhöhte ADP-Konzentration eine Aktivitätssteigerung der Oxydase verursacht. Mit dieser Annahme können folgende Beobachtungen erklärt werden:

a) Aktivitätsabnahme während der Stärkeeinlagerung;
b) Aktivitätsanstieg bei Anaerobiose;
c) Aktivitätsanstieg im Endokarp während der Lignifizierung;
d) Zunahme der Aktivität im Karpellgewebe vor dem Anstieg im Kortexgewebe;
e) Zunahme der Aktivität im Subepidermalgewebe während und nach dem Klimakterium;
f) gesteigerte Aktivität in den proliferierenden Zellen;
g) gesteigerte Reaktion im alternden Gewebe;
h) erhöhte Aktivität unter Schorfstellen.

3.7 Diskussion der Hypothese

Es soll nun geprüft werden, wie man die Beobachtungen a bis h im vorhergehenden Kapitel mit der aufgestellten Hypothese besser erklären kann.

a) Aktivitätsabnahme während der Stärkeeinlagerung

Während der Stärkeeinlagerung könnten dem Parenchym energiereiche Verbindungen in Form von phosphorylierten Stoffen zugeführt werden. Die Glycolyse allein würde dann relativ viel ATP ergeben, da die primäre Phosphorylierung der Glucose wegfallen könnte. Die ATP-Ausbeute pro Molekül Hexose würde statt zwei vier ATP-Moleküle betragen. Möglicherweise kann damit der Stofftransport und die Polymerisierung von Stärke und Zellwandbestandteilen gewährleistet werden, so dass eine

reduzierte Atmungskettenphosphorylierung genügen würde. Das für die Synthese gebrauchte Glucose-1-phosphat könnte aber auch in dieser Form in den Leitbündeln oder in den Parenchymzellen selbst durch Phosphorolyse von Rohrzucker und anschliessende Phosphorylierung der Fruktose beziehungsweise Glucose hergestellt werden. Möglicherweise könnte auch ein Saccharosephosphat durch aktiven Transport von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. Die starke Cytochromoxydasereaktion in den Leitbündeln dürfte jedenfalls auf intensive Phosphorylierungsvorgänge hinweisen.

Dass während der Stärkeeinlagerung kein Anstieg an Glucose, wohl aber an Fruktose und Saccharose bemerkt wurde (Krotkov und Helson, 1946), spricht für einen Saccharosetransport mit anschliessender Phosphorolyse am Bestimmungsort und weiterer Verwendung des Glucosephosphates für Polysaccharidsynthese. Das ATP/ADP-Verhältnis könnte jedenfalls auf diese Art im Parenchym trotz reduzierter Atmungskettenphosphorylierung hochgehalten werden.

Da die Polysaccharidsynthese ein energieverbrauchender Prozess ist, die Atmungskettenphosphorylierung aber aufgrund eines geschwächten Cytochromsystems im Parenchym herabgesetzt ist, dürften entweder energiereiche Verbindungen ins Speichergewebe transportiert werden, oder es müssten glycolytische Vorgänge den ATP-Bedarf decken.

b) Aktivitätsanstieg bei Anaerobiose

Bei Anaerobiose nimmt die Stärkekonzentration in Äpfeln am Baum rasch ab. Wahrscheinlich hört der Nachschub energiereicher Verbindungen auf, und das Gleichgewicht wird darum auf die Seite der Hydrolyse verschoben. Die Konzentration phosphorylierter, energiereicher Verbindungen nimmt ab, was eine Verkleinerung des ATP/ADP-Verhältnisses verursacht. Der Anstieg an ADP dürfte nach Hypothese die gesteigerte Cytochromoxydaseaktivität verursachen. Eine weitere Möglichkeit könnte eine Entkopplung von Phosphorylierung und Atmung sein, so dass darum die ADP-Konzentration ansteigen würde.

c) Aktivitätsanstieg im Endokarp während der Lignifizierung

Die Synthese des Phenolringes ist ein energieverbrauchender Vorgang. Lignin kann als ein Phenylpropanpolymerisat aufgefasst werden. Nach Neish (1964, 1965) sind Phenylalanin und Thyrosin wichtige Ausgangsstoffe für die Ligninsynthese. Für den Aufbau der Phenylbrenztraubensäure braucht es verschiedene energiereiche Verbindungen. Diese werden dem Energiestoffwechsel der Zelle entzogen.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass an den Verdickungsleisten der sekundären Tracheenwände lichtmikroskopisch eine Granulierung festgestellt wurde, die elektronenmikroskopisch als Mitochondrienansammlung identifiziert wurde (Newcomb, 1963). In dieser Arbeit konnten histochemisch an solchen Stellen Ansammlungen cytochromoxydaseaktiver Körnchen festgestellt werden. In Längsschnitten konnte in Tracheen ein Aktivitätsmuster festgestellt werden, das den Spiral- beziehungsweise Ringverdickungen entsprach. Auch hier dürfte die erhöhte Ligninsynthese dafür verantwortlich sein.

Durch die Lignineinlagerung werden die Zellwände der Sklereiden dicker und somit für Sauerstoff und Atmungssubstrate undurchlässiger. Diese Vorgänge verkleinern das ATP/ADP-Verhältnis, was wiederum einen Aufbau des Cytochromoxydasesystems induzieren könnte.

d) Zunahme der Aktivität im Karpellgewebe vor dem Anstieg im Kortexgewebe

Im Markgewebe wird ohnehin weniger Stärke eingelagert als im Rindenparenchym. Die Sauerstoffkonzentration ist hier kleiner als im Rindengewebe (Brändle und Wanner, 1965). Sobald die Zufuhr energiereicher Substrate und die Atmung abnehmen, wird die Stärke hier, wie im anaerob gehaltenen Apfel, abgebaut, und schliesslich wird der ATP-Verbrauch nicht mehr gedeckt, die ADP-Konzentration nimmt zu. Dies wird zuerst in den relativ dickwandigen Zellen in der Nähe des Griffelkanales geschehen, so dass hier zuerst der Anstieg der Cytochromoxydase induziert wird.

e) Zunahme der Aktivität im Subepidermalgewebe während und nach dem Klimakterium

Eine Säureabnahme im Schalengewebe (Neal und Hulme, 1958) könnte ein Anzeichen für eine Abnahme der Glycolysevorgänge sein. Die Folge wäre ein Anstieg der ADP-Konzentration und damit verbunden die Zunahme der Cytochromoxydase. Eine Abnahme der Permeabilität der Epidermis (Haylett, 1925) könnte die O_2-Zufuhr herabsetzen, was sich wieder auf das ATP/ADP-Verhältnis auswirken müsste.

f) Gesteigerte Aktivität in den proliferierenden Zellen

Interessant ist das Verhalten der Zellen, welche strauchartig ins Samenfach vorwachsen. Es dürfte dies eine genetisch verankerte Eigenschaft aller Parenchymzellen des Apfelgewebes sein. Diese Zellwucherungen wurden immer im Kortexgewebe junger Äpfel beobachtet, aber sporadisch auch in grossen schizogen entstandenen Geweberäumen des inneren Markparenchyms. Da diese Zellproliferationen mit einem Materialaufbau verbunden sind, muss wohl die nötige Energie dazu in Form von ATP aufgebracht werden. Das Gleichgewicht verschiebt sich immer wieder auf die ADP-Seite, was nach Hypothese wiederum eine Steigerung der Cytochromoxydase zur Folge hätte. Die starke Aktivität in diesen Zellen dürfte ebensowenig wie in meristematischen Geweben auf Entkopplung von Atmung und Phosphorylierung beruhen.

g) Gesteigerte Reaktion im alternden Gewebe

Dass alterndes Apfelgewebe gesteigerte Aktivität zeigt, könnte auch mit einem Anstieg von ADP verbunden sein. Für die Ursache dieser ADP-Erhöhung gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

1. Im alternden Gewebe könnte als Folge einer allgemeinen Desorganisation eine Entkopplung von Atmung und Phosphorylierung erfolgen. Die Versuche von Neal und Hulme (1958) mit DNP scheinen dies zu bestätigen. Eine solche Entkopplung müsste natürlich das ATP/ADP-Verhältnis stark verkleinern (vgl. auch Kap. 3.5.1).

2. Die Abnahme des Atmungssubstrates kann ebenfalls zu einer Erhöhung der ADP-Konzentration führen. Wie aus der zitierten Literatur hervorgeht (Hulme u.a., 1963; Lwow und Kalugina, 1959), nehmen im alternden Apfel die Apfelsäure und der Rohrzucker stark ab.

h) Erhöhte Aktivität unter Schorfstellen

Die erhöhte Aktivität unter Schorfstellen kann direkt mit der parasitogenen Steigerung der Atmung und Temperatur in Zusammenhang gebracht werden (Gäumann, 1951; Lall, Kidd, nach Ulrich, 1952). Die erhöhte Cytochromoxydaseaktivität dürfte entscheidend die Atmungserhöhung bestimmen. Wodurch die gestei-

gerte Aktivität dieses Enzyms induziert wird, ist schwer zu entscheiden. Sicher könnten vom Parasiten abgegebene Stoffe direkt dafür verantwortlich sein (Gäumann, 1951). Der Einfluss von ADP ist aber auch hier nicht ausgeschlossen. Auf eine Entkopplungsreaktion wurde schon hingewiesen. Diese hätte eine Verkleinerung des ATP/ADP-Verhältnisses, eine gesteigerte Atmung und damit verbunden eine Erhöhung der Temperatur der umliegenden Gewebe zur Folge. Damit könnte auch hier die Steigerung der Cytochromoxydaseaktivität auf das ATP/ADP-Verhältnis zurückgeführt werden.

3.8 Cytochromoxydaseaktivität und Stoffeinlagerung

Die Kenntnisse der Stoffwechselvorgänge, welche beim aktiven Stofftransport mitspielen, sind sehr lückenhaft und hypothetisch. Da während der Stärkeeinlagerung das Parenchym nur schwache Cytochromoxydasereaktion zeigt, dürften die Leitbündel für die Stoffeinlagerung direkt verantwortlich sein. Die ankommenden Assimilate, wahrscheinlich Rohrzucker (Esau u.a., 1957; Kursanov, 1963) sind selbst schon energiereiche Verbindungen. Durch Phosphorylierungsvorgänge könnte nach Glasziou (1960) (nach Kursanov, 1963) der Zucker mit einer Trägersubstanz gekoppelt werden und so über das Cytoplasma durch die Plasmodesmen von Zelle zu Zelle transportiert werden. An Ort und Stelle könnte, wie im vorhergehenden Kapitel ausgeführt, eine Phosphorolyse zu energiereichen, phosphorylierten Verbindungen führen, welche direkt für Polymerisationsreaktionen gebraucht werden können. Die intensiven Atmungsvorgänge in den Perianthleitbündeln sind vielleicht direkt verantwortlich für die Stoffeinlagerung in das «Speichergewebe».

Die Phosphorylierung könnte auch im Xylemparenchym vor sich gehen, von wo aus die Produkte mit dem Xylemstrom durch die Interzellularen und Zellwände in das Parenchym diffundieren könnten. Die gesteigerte Cytochromoxydaseaktivität im Xylemparenchym könnte damit erklärt werden. Eine aktive Wasserresorption ist ebenfalls nicht ausgeschlossen. Ob eine solche überhaupt stattfindet, ist allerdings sehr umstritten (Kozlowski, 1964; Kramer, 1955). Beim Apfel ist möglicherweise die Transpiration zu gering, um einen wirksamen Transpirationsstrom zu ermöglichen; deshalb könnte in fleischigen Früchten eine aktive Wasseraufnahme durchaus möglich sein.

Ebenfalls unsicher ist es, ob durch das Xylem auch Assimilate in den Apfel transportiert werden. Wie Versuche mit Nektarien gezeigt haben (Esau u.a., 1957), scheint es, dass zumindest in diesen Organen der Assimilatstrom vorwiegend, wenn nicht ausschliesslich, durch das Phloem geht (Esau, 1965).

Turkina (nach Kursanov, 1963) fand bei Leitbündeln von *Heracleum* Sosnovski durch Trennung des Xylems vom Phloem, dass auch das Xylem eine grosse Affinität zu Rohrzucker zeigt. Er schloss daraus, dass das Xylem stark aktive Zellen enthalten muss. In einem ähnlichen Versuch wurde von Ziegler (1958) (nach Kursanov, 1963) die Atmung von Phloem und Xylem untersucht. Er fand, dass beide Gewebe etwa gleich intensiv atmen. Man kann daraus schliessen, dass die Leitbündel als Ganzes eine beachtliche physiologische Aktivität zeigen. Nach Kursanov (1963) haben Turkina und Dubinina (1954) und Ziegler (1958) in den Leitbündeln der Zuckerrübe eine starke Cytochromoxydaseaktivität gefunden, während im Stiel-

parenchym und in anderen Geweben derselben Pflanze relativ geringe Cytochromoxydaseaktivität festgestellt wurde.

Die intensive Cytochromoxydaseaktivität im Xylemparenchym lässt also verschiedene Deutungen zu. Dass aber auch in den Leitbündeln das ATP/ADP-Verhältnis letztlich für die gesteigerte Cytochromoxydaseaktivität verantwortlich sein dürfte, zeigt die starke Reaktion der Leitbündel nach der Ernte bis zum Fruchtzerfall. Wenn der Assimilatzustrom aussetzt, fällt der Zustrom energiereicher Verbindungen weg, so dass das ATP/ADP-Verhältnis rasch sinkt und sich auch im umliegenden Parenchym bemerkbar macht. Vielleicht ist das auch die Ursache für die intensive Aktivitätssteigerung während der Lagerung frühzeitig gepflückter Äpfel (Tafel 5, Abb. 1).

Die erhöhte Oxydaseaktivität in den Perianthleitbündeln ist mit der oft gefundenen erhöhten Atmungsintensität der Leitbündel gut zu vereinbaren. Der gesteigerte Energieumsatz kann hier durchaus mit dem Stofftransport zusammenhängen. Um so seltsamer erscheint darum das Verhalten der Karpelleitbündel. Man könnte dies folgendermassen erklären: Der Stofftransport in jungen Früchten, kurz nach der Befruchtung, ist intensiv. Durch die ventralen Karpelleitbündel erfolgt sehr früh die Stoffeinlagerung in den Nucellus, in das Gewebe um die ventralen Karpelleitbündel und in die Integumente und lässt dann frühzeitig nach. In diesen Geweben, vor allem in den Integumenten, wurde kurz nach der Bestäubung Stärke gefunden (Tafel 2, Abb. 8). Vielleicht genügt die frühzeitig in diese Gewebe eingelagerte Stärke zusammen mit aufgelösten Integument- und Nucelluszellen weitgehend für die Entwicklung des Embryos. Möglicherweise spielt das intensiv reagierende innere Integument mit seinem «Tapetum» eine besondere Rolle (vgl. Kap. 3.3.3) (Esau, 1965).

Nach einer längeren Ruheperiode (ca. 7–8 Wochen) wird die Stoffeinlagerung wieder aufgenommen, was einen Anstieg der Leitbündelaktivität verursacht. Die geringere Stärkeeinlagerung ins Markgewebe könnte mit einer verminderten Leitbündelaktivität erklärt werden. Dass der Aktivitätsanstieg gleichzeitig mit der Lignifizierung des Endokarps einsetzt, ist vielleicht ebenfalls nicht zufällig.

Möglicherweise besteht eine Korrelation zwischen Perianth- und Karpelleitbündeln. Diese können im Fruchtstiel von jenen abzweigen, können aber allerdings auch schon an dieser Stelle von den Perianthleitbündeln getrennt sein (McArthur und Wetmore, 1939). Ob die Sauerstoffkonzentration und damit das ATP/ADP-Verhältnis für den Aktivitätsanstieg verantwortlich ist, kann nicht entschieden werden. Möglich ist auch eine hormonale Beeinflussung des ganzen Markgewebes durch die Samenanlagen (Crane, 1964).

3.9 Zusammenfassung

a) Mit dem Aminreagenz nach Burstone konnte in allen Apfelgeweben Cytochromoxydase nachgewiesen werden.

b) Die Aktivität in der Apfelblüte war in allen Geweben relativ intensiv. Alle Leitbündel reagierten gut. Das Wurzelspitzenmeristem und die Wurzelhaube von *Zea Mays* reagierten sehr intensiv auf Cytochromoxydase.

c) In den Perianthleitbündeln stieg die Aktivität sowohl im Phloem wie im Kambium und Xylemparenchym im Verlaufe der Weiterentwicklung rasch an und blieb bis zum Fruchtzerfall konstant. Die Siebgefässe waren von den Geleitzellen in ihrer

Aktivität nicht zu unterscheiden. In Maisleitbündeln aus Wurzel und Spross wurde in den Siebgefässen Cytochromoxydase gefunden.

d) In den Karpelleitbündeln nahm die Aktivität rasch ab und stieg in den Karpelleitbündeln und im Endokarpgewebe während der Lignifizierung des letzteren wieder stark an.

e) Im Parenchym wurde nach anfänglich starker Aktivität eine merkliche Reaktionsabnahme beobachtet. Zusammen mit den Karpelleitbündeln begann das Markgewebe wieder stärker zu reagieren. Dieses konnte also nicht nur morphologisch, sondern auch physiologisch vom Rindengewebe unterschieden werden.

f) Es wurde keine nachklimakterische Reaktionsabnahme beobachtet, sondern vielmehr eine Aktivitätszunahme bis zum Fruchtzerfall. Örtlich gesteigerte Reaktion im Kortexgewebe und starke Aktivität des Schalengewebes waren für alternde Äpfel charakteristisch.

g) Durch Anaerobiose konnte gesteigerte Cytochromoxydaseaktivität erzielt werden. In vorzeitig gepflückten Früchten war die Aktivität nach mehrwöchiger Lagerung, verglichen mit Kontrolläpfeln, ebenfalls sehr intensiv. Auch bei frühzeitig gepflückten Früchten wurden die Gewebe stark angefärbt, welche bei normal gelagerten Äpfeln im Alter intensiv reagierten.

h) Übereinstimmungen in der Stärkebildung und der Cytochromoxydaseaktivität wurden festgestellt.

i) Die Energieumsätze bei der Stoffeinlagerung dürften sich im wesentlichen in den Perianthleitbündeln abspielen.

k) Eine Korrelation zwischen ATP/ADP-Verhältnis und Cytochromoxydaseaktivität wurde diskutiert und als wahrscheinlich befunden.

4. Peroxydase

4.1 Allgemeines

Die Peroxydase gehört zu den Enzymen, welche in pflanzlichem Gewebe histochemisch am besten untersucht sind. Die Stoffwechselvorgänge, welche in vivo von der Peroxydase katalysiert werden, sind sozusagen unbekannt. Sicher ist, dass Wasserstoffperoxid das Oxydationsmittel darstellt. Die katalysierte Reaktion kann durch folgende Gleichung dargestellt werden:

$$XH_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxydase}} 2H_2O + X$$

Verschiedenen Arbeiten ist zu entnehmen, dass Peroxydase in Pflanzen weit verbreitet ist (van Fleet, 1947, 1959, 1962). Sie dürfte bei der Zelldifferenzierung und bei der Histogenese eine entscheidende Rolle spielen (van Fleet, 1947, 1959; Jensen, 1955). Ihr Mitwirken bei der Ligninsynthese wird in mehreren Arbeiten angenommen (Freudenberg u.a., 1952; Siegel, 1955; Jensen, 1955), doch dürfte dies nicht die Hauptaufgabe dieses Enzyms sein. Die weite Verbreitung der Peroxydase in Zellen, deren Wände nicht lignifiziert sind, lässt dies vermuten.

Da Früchte histochemisch noch nicht eingehender auf Peroxydase geprüft wurden, war es naheliegend, zusammen mit der Cytochromoxydase auch dieses Enzym in Äpfeln zu lokalisieren.

Die Ergebnisse der Vegetationsperiode 1965, welche mit α-Naphthol-N,N-Dimethylparaphenylendiaminhydrochlorid (Nadi) erzielt wurden, waren recht unerwartet, so dass zunächst auf Artefakte geschlossen wurde. In den folgenden zwei Jahren wurden deshalb verschiedene Reagenzien ausprobiert. Es wurden Benzidin (B), 3-Amino-9-äthylcarbazol (AAC), 2,6-Dichlorphenolindophenol (2,6-D) und das Aminreagenz nach Burstone (A) als weitere Reagenzien herangezogen. Verschiedenes Pflanzenmaterial wurde vergleichshalber eingehender untersucht. An Quer- und Längsschnitten durch junge Sprosse von *Tetrastigma voinerianum*, durch Mais und Bohnenwurzeln und durch *Petasites albus* wurden die verschiedenen Peroxydasereagenzien getestet. So konnten die Beobachtungen an Glocken- und Klaräpfeln besser interpretiert werden.

Nach van Fleet (1959) nimmt die Peroxydaseaktivität in älterem Gewebe ab, wobei gleichzeitig die Phenolkonzentration und die Phenolaseaktivität ansteigen. Um eine mögliche Korrelation zwischen Polyphenoloxydase und Peroxydase feststellen zu können, wurde auch mit einer 10^{-2} M Brenzkatechinlösung inkubiert (Smyth, 1954, nach Deane u.a., 1960). Im Sommer 1965 konnten aber keine auffallenden Zusammenhänge beobachtet werden, weshalb in den nächsten Vegetationsperioden auf diesen Nachweis weitgehend verzichtet wurde. Nur um einen vermutlichen Zusammenhang mit der Verholzung des Endokarpes nochmals zu überprüfen, wurde die Nachweisreaktion wiederholt.

4.2 Material und Methoden

Für den Peroxydasenachweis stehen relativ viele bewährte Methoden zur Verfügung. Nicht jedes Reagenz eignet sich aber für jedes Gewebe. Wie aus verschiedenen Beobachtungen in dieser Arbeit hervorgeht, dürften auch Gewebe verschiedenen Alters auf verschiedene Reagenzien etwas unterschiedlich ansprechen. So reagierte das Nadireagenz im Phloem der Leitbündel von *Tetrastigma voinerianum* ausnahmsweise schwach. Mit Citratpuffer von pH 4,5 und 6 reagierte Benzidin im Apfelgewebe überhaupt nicht. Mehrere Nachweismittel ergänzen sich deshalb vortrefflich und helfen mit, Artefakte aufzudecken.

Das untersuchte Pflanzenmaterial wurde wie für den Cytochromoxydasenachweis vorbereitet und geschnitten. Die Peroxydaseaktivität wurde durch eisgekühlte Acetonfixierung (5 Min.) nicht wesentlich reduziert, weshalb die Schnitte meistens auf diese Art vorfixiert wurden. Da sie meist sofort mikroskopisch untersucht wurden, konnte auf eine Nachfixierung verzichtet werden.

4.2.1 Alkalische Nadireaktion
(Lillie und Burtner, 1953, nach H. W. Deane u.a., 1960)

Das Verfahren wurde etwas vereinfacht. Auf die «Stabilisierung» des Indophenolblaus wurde verzichtet, da durch Anfärbung des Gewebes die Lokalisation der Reaktionsprodukte erschwert wurde.

Inkubationslösung

60 mg α-Naphthol wurden in 0,6 ml 1 N Natronlauge gelöst und mit 4,4 ml dest. Wasser verdünnt. 70 mg N,N-Dimethyl-p-phenylendiaminhydrochlorid wurden in 5 ml dest. Wasser gelöst.

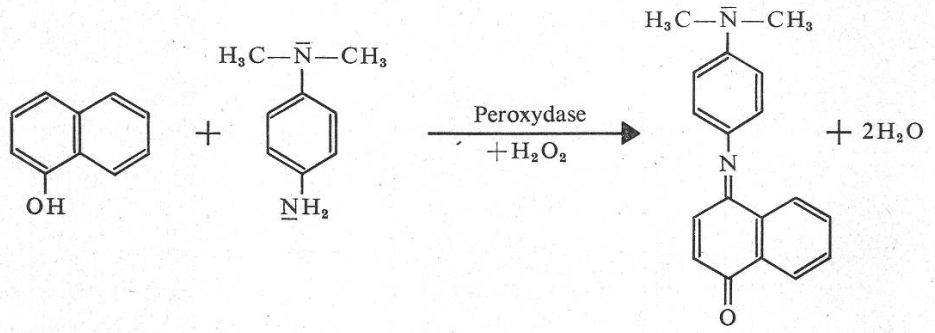
Beide Lösungen wurden etwa 2 Stunden vor Gebrauch frisch hergestellt und zusammengeschüttet. Die Lösung wurde milchig trüb.

Unmittelbar vor Gebrauch wurde filtriert. In 1 ml Inkubationslösung wurde 1 Tropfen 0,3 % Wasserstoffperoxid gegeben.

Inkubationszeit und Nachbehandlung

Die Inkubationszeit betrug im allgemeinen 10 Minuten bei Zimmertemperatur. In jungen Äpfeln wurde mit Vorteil nur 3 bis 5 Minuten inkubiert, um störende Kristallbildung zu vermeiden. Nach der Inkubation musste mehrmals gut mit dest. Wasser gespült werden, um eine grobe Kristallisation zu verhindern. Manchmal konnte diese trotzdem nicht verhütet werden.

Reaktionsverlauf (nach H. W. Deane u.a., 1960



l-Naphthol Dimethyl-p-phenylendiamin Indophenolblau

Bemerkungen

Bei zu hoher Peroxidkonzentration waren die Reaktionsprodukte sehr grobkörnig und eine Kristallisation unvermeidbar. Bei Petasites und Tetrastigma erwies sich die angegebene Konzentration von 0,3 % als zu niedrig, bei jungen Äpfeln eher zu hoch.

4.2.2 Benzidinreaktion (B)
(Isaac und Winch, 1947, nach Jensen, 1962)

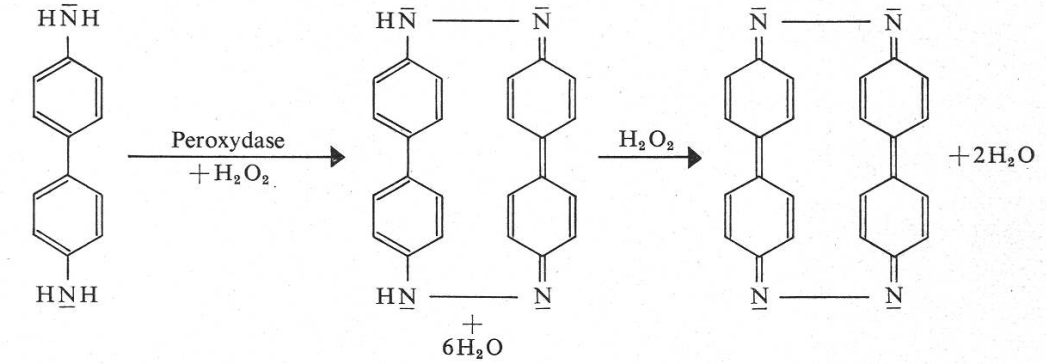
Inkubationslösung

Statt einer 0,01 M Benzidinlösung wurden 10 mg Benzidin in 0,5 ml Alkohol abs. gelöst und mit Pufferlösung auf 10 ml aufgefüllt. Es wurden Phosphatpuffer 0,1 M von pH 6,4 oder Acetatpuffer 0,05 M von pH 5,1 gebraucht. Die Lösung wurde etwa 2 Stunden vor Inkubation frisch angemacht und unmittelbar vor Gebrauch filtriert. Dann wurde zu 1 ml Lösung 1 Tropfen 3 % Wasserstoffperoxid zugegeben.

Inkubation und Nachbehandlung

Es wurde 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und anschliessend gut ausgewaschen. Mit Acetatpuffer genügte eine Inkubationszeit von 10 Minuten.

Reaktionsverlauf (Lison, 1953, nach Deane u.a., 1960)



Benzidin: farblos | Benzidinblau: blau | Benzopurpurin: rostrot

Bemerkungen

Da in Äpfeln die Reaktion auch mit Ammoniumchlorid relativ rasch, ganz oder teilweise zum braunen Reaktionsprodukt führte, wurde auf diesen Zusatz verzichtet (van Duijn, 1955, nach Jensen, 1955).

Mit Phosphatpuffer von pH 6,4 entstand kein Benzidinblau. Wenn mit Acetatpuffer von pH 5,1 inkubiert wurde, färbten sich die Schnitte in den ersten 10 Minuten tiefblau, um dann aber rasch die rotbraune Farbe des Benzopurpurins anzunehmen (Deane u.a., 1960).

4.2.3 3-Amino-9-äthylcarbazol-Reaktion (AAC) (R. C. Graham, u.a., 1965)

Inkubationslösung

4 mg 3-Amino-9-äthylcarbazol wurden in 0,5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Jetzt wurde mit 9,5 ml Acetatpuffer (0,05 M) von pH 5,1 auf 10 ml aufgefüllt.

Die Lösung wurde etwa 2 Stunden vor Inkubation hergestellt und vor Gebrauch filtriert. Die Wasserstoffperoxid-Konzentration war gleich wie bei Benzidin.

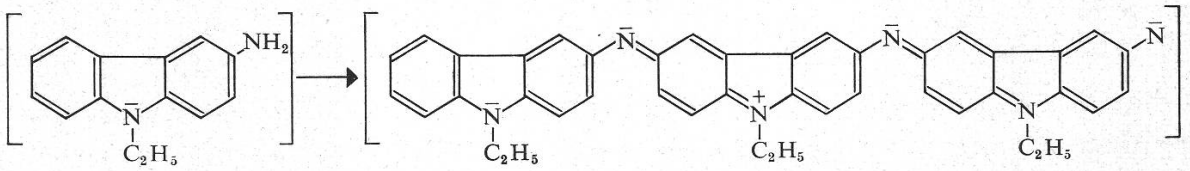
Inkubationszeit und Nachbehandlung

Wie bei Benzidin.

Reaktionsverlauf

Im Kapitel 3.2 wurde gezeigt, dass aus p-Amino-diphenylamin und 3-Amino-9-äthylcarbazol durch oxydative Polymerisation möglicherweise Farbstoffe entstehen,

die dem Emeraldin ähnlich sind. Die Produkte, welche aus 3-Amino-9-äthylcarbazol durch Peroxydasekatalyse hervorgehen, könnten ähnliche Struktur haben.



3-Amino-9-äthylcarbazol Roter Farbstoff

Bemerkungen

Dieses Reagenz ergab mit Acetatpuffer von pH 5,1 ausgezeichnete Reaktionen. Die roten Reaktionsprodukte waren sehr gut lokalisierbar (Tafel 1, Abb. 8; Tafel 3, Abb. 3, 4 und 6). Auch nach der Inkubation war die Lösung praktisch noch farblos. Mit Citratpuffer (0,1 M) von pH 6 wurde nur schwache Reaktion erhalten.

4.2.4 2,6-Dichlor-phenolindophenol-Reaktion (2,6-D) (van Fleet, 1959)

Inkubationslösung

10 mg 2,6-D wurden in 10 ml Phosphatpuffer von pH 6,4 gelöst und mit Ascorbinsäure zur Leukoform reduziert. Zu 1 ml Lösung wurden 2 Tropfen 0,3% Peroxid gegeben.

Inkubationszeit und Nachbehandlung

Es wurde 60 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert und anschliessend gut ausgewaschen.

Bemerkungen

Die Reaktionsprodukte waren braun.

Diese Methode wurde nur selten angewendet, da nur Stellen stärkster Peroxydasereaktion reagierten.

4.2.5 Aminreaktion nach Burstone (Burstone, 1960)

Inkubationslösung

25 mg p-Amino-diphenylamin und 15 mg p-Amino-azobenzol wurden in 1 ml Alkohol abs. gelöst und mit 35 ml dest. Wasser verdünnt. Die Peroxidkonzentration war gleich wie bei Benzidin.

Inkubationszeit und Nachbehandlung

Wie bei der Benzidinreaktion.

Reaktionsverlauf

Die Reaktionsprodukte dürften auch hier, wie im Kapitel 3.2 gezeigt wurde, dem Emeraldin ähnlich sein.

Bemerkungen

Die Reaktion verlief gleich gut, ob mit oder ohne Pufferzusatz. Deshalb wurde ein Puffer weggelassen.

4.3 Fehlerquellen

Bei histochemischer Enzymlokalisierung können verschiedene Faktoren zu Fehlresultaten führen (van Fleet, 1962; Deane u.a., 1960; Jensen, 1962). Es wurde versucht, folgende Fehlerquellen aufzudecken und womöglich auszuschalten:

1. Adsorptionsartefakte
2. Pseudoperoxydasereaktionen
3. Verschiedenheit der Redoxpotentiale je nach pH-Wert, Reagenz und Gewebe.

4.3.1 Adsorptionsartefakte

Nach van Fleet (1959, 1962) werden Chinone und Chinondiimine leicht von basophilen Stoffen, wie etwa Nucleinsäuren, adsorbiert. Vor allem Primordialzellen, welche ohnehin erhöhte Peroxydasereaktion zeigen, binden zudem Chinone besser als ältere Zellen. In Äpfeln ist das Phenolasesystem sehr ausgeprägt, weshalb sich vor allem bei jungen Äpfeln die Schnitte sehr rasch bräunen. Werden Chinone von basophilen Strukturen stärker adsorbiert als von anderen, dürfte, da Chinone das Nadireagenz oxydieren, an diesen Stellen eine Peroxydasereaktion vorgetäuscht werden.

Indophenolblau, das Produkt der Nadireaktion, ist selbst ein chinoider Stoff (vgl. Kap. 4.2.1). Deshalb kann es (van Fleet, 1959) von basophilen Zellstrukturen adsorbiert werden. Zunächst muss darum die Verteilung der Reaktionsprodukte skeptisch beurteilt werden.

Da das Nadireagenz gut lipoidlöslich ist, wurde damit die Kutikula der Äpfel sehr stark angefärbt (Tafel 1, Abb. 6). Es war anzunehmen, dass auch andere Lipoide durch Adsorption eine Peroxydasereaktion vortäuschen konnten. Es wurde dabei vor allem an die Chloroplasten gedacht. Durch Acetonfixierung wurden manche Stoffe herausgelöst, weshalb die Chloroplasten nach dieser Behandlung mit Nadi und AAC keine besondere Reaktion mehr zeigten.

In den Zellwänden wurden wachsartige Stoffe sowie Lipoide vermutet (Roelofsen, 1959, nach Setterfield und Bayley, 1961). Elektronenmikroskopisch konnten keine Lipoidstrukturen gefunden werden (Setterfield und Bayley, 1961). Gundermann u.a. (nach Scott und Lewis, 1953) haben wachsartige Stoffe in jungen Zellwänden festgestellt (Gundermann, Wergin und Hess, nach Frey-Wyssling, 1959). Den Beobachtungen von Scott und Lewis (1953) ist zu entnehmen, dass Interzellularen von «Suberin» ausgekleidet sind. Nach Frey-Wyssling (1959) dürfte es sich um Kutin handeln. Mit Sudan III wurde versucht, solche Stoffe in Äpfeln nachzuweisen. Vor allem die Kutikula, aber auch ein dünnes Häutchen an der Oberfläche der Endokarpien und am Griffelkanalepithel wurden intensiv angefärbt. In allen Zellen wurden sudanophile Körnchen gefunden, deren Grösse und Form den Reaktionsprodukten der Nadireaktion entsprachen. In den Endokarpzellen und in den Leitbündeln wurden sie gehäuft gefunden. Besonders in den Endokarpzellen waren die angefärbten Körnchen in der Nähe der Zellwände gelegen. In den Zell-

wänden, Interzellularen und Interzellularsubstanzen konnten keine sudanophilen Stoffe festgestellt werden.

Sato (1951) (nach van Fleet, 1962) konnte mit KCN und durch Erhitzen die Oxydation von Benzidin zu Benzidinblau in den Zellwänden nicht verhindern. Er vermutet, dass die Zellwandfärbung auf Adsorption beruht.

Durch Anwendung mehrerer Reagenzien wurde versucht, Adsorptionsartefakte womöglich aufzudecken. Es ist kaum anzunehmen, dass alle damit erzielten Reaktionsprodukte von gleichen Strukturen und Substanzen gleich gut adsorbiert werden.

Die gute Lipoidlöslichkeit von Indophenolblau äusserte sich vor allem in der guten nichtenzymatischen Anfärbung der Apfelkutikula und der Wachsschicht. Der Inhalt der Epidermiszellen war auf der Aussenseite oft schwächer gefärbt. Das Indophenolblau wurde hier sehr wahrscheinlich von der Kutikula adsorbiert, denn dort, wo diese losgelöst war, waren die ganzen Epidermiszellen stark gefärbt. Benzidin und AAC ergaben nie eine einseitige Anfärbung der Epidermiszellen. Die Kutikula wurde nicht angefärbt (Tafel 1, Abb. 7 und 8). Vermutlich haben die Reaktionsprodukte eine schlechtere Affinität zu lipophilen Stoffen als Indophenolblau.

Die Primärwände wurden vom Nadireagenz praktisch nicht angefärbt, ergaben aber mit Benzidin und AAC sehr ausgeprägte Farbreaktionen.

4.3.2 Pseudoperoxydasereaktion

Folgender Versuch zeigt, dass Chinone wahrscheinlich mit dem Nadireagenz eine Pseudoperoxydasereaktion ergeben.

Apfelschnitte, welche 12 Stunden vor Versuchsbeginn mit Brenzkatechin inkubiert wurden, so dass sie stark gebräunt waren, wurden für 30 Minuten in eine Katalaselösung gelegt und anschliessend mit Nadi und Katalase inkubiert. Das Nadireagenz wurde oxydiert. Das Indophenolblau konnte gut mit Alkohol herausgelöst werden, nicht aber, wie Kontrollschnitte zeigten, die braunen Reaktionsprodukte. Nach der Indophenolextraktion waren die Schnitte etwas gebleicht, was wohl auf eine Reduktion der Chinone durch das Nadireagenz zurückzuführen ist.

Um eine Pseudoperoxydasereaktion dieser Art zu verhindern, wurden die Schnitte unmittelbar nach dem Schneiden in eine 10^{-2} M Diäthyldithiocarbaminat-Lösung gelegt, so dass die Phenoloxydase vollständig blockiert wurde (Deane u.a., 1960) (vgl. Kap. 4.10). Die Gewebe blieben nach dieser Behandlung weiss. Die Peroxydaseaktivität wurde nicht beeinflusst.

Eine weitere Pseudoperoxydasereaktion, welche durch Fe^{+++}-haltige Verbindungen verursacht werden soll, wurde durch Hitzeinaktivierung untersucht. Da die Pseudoperoxydasereaktion erst bei Temperaturen, die weit über 100 °C liegen, verhindert wird, die Peroxydase aber schon bei Temperaturen unter 100 °C zerstört wird, hat man eine Möglichkeit, um die enzymatische Reaktion zu erkennen (Deane u.a., 1960) (vgl. Kap. 4.5.c).

Mit KCN (10^{-2} M) werden die Peroxydase und die auf Fe^{+++} beruhende Pseudoperoxydasereaktion reversibel gehemmt (Deane u.a., 1960). Trotzdem können Versuche mit KCN wichtige Resultate liefern, wenn entschieden werden soll, ob die Reaktion durch eisenhaltige Enzyme verursacht wird. Die pH-Werte, bei denen Benzidin und AAC die beste Reaktion ergeben, liegen etwas im sauren Bereich. Da jedoch die

Protonierung des Cyanidions bei dieser Wasserstoffionenkonzentration sehr gross ist, wurde das diesbezüglich günstigere Natriumazid als Peroxydaseinhibitor gewählt. In der Tabelle 1 sind die Versuchsresultate zusammengestellt.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass nur relativ hohe NaN_3-Konzentrationen die Stellen stärkster Aktivität hemmen. Trotzdem weist der Versuch auf ein eisenhaltiges Enzym hin, welches die Oxydation des Reagenzes katalysiert.

Nach Reeve (1949) (nach van Fleet, 1962) können auch Aldehyde durch Oxydation von Phenolen zu Pseudoperoxydasereaktionen führen. Nishio (1959) konnte durch Hitze die Reaktion im Xylem nicht blockieren, was ihn zur Annahme einer Pseudoperoxydasereaktion durch Aldehyde führte (nach van Fleet, 1962). Auch Ascorbinsäure kann als Oxydase wirken (van Fleet, 1962).

Tabelle 1

Peroxydaseinaktivierung durch Azid

	1	2	3
Präinkubation	30 Min. in 10^{-2} M NaN_3-Lösung. NaN_3 gelöst in Citratpuffer (0,1 M) von pH 4,5	Wie 1	Keine
Reagenz	AAC und N.AAC-Lösung mit gleichem Puffer von gleichem pH-Wert wie Präinkubation	AAC-Lösung wie 1	AAC-Lösung wie 1, aber pH 5,5
NaN_3-Konzentration der Inkubationslösung	$3–5 \cdot 10^{-2}$ M	10^{-2} M	Kontrolle ohne Azid
Versuchsergebnisse	Sehr schwache R der Interzellularsubstanzen. Schwächere R mit AAC als mit N (Tafel 6, Abb. 2 und 3)	Nur noch die stark aktiven Interzellularsubstanzen reagieren gut. Sonst totale Hemmung	Intensive R der Interzellularsubstanzen in Subepidermis und äusserer Leitbündelscheide. Deutliche Anfärbung aller Gewebe. R aber schwächer als mit Acetatpuffer von pH 5,1 (Tafel 1, Abb. 8)

Wenn die Inkubationslösung kein Wasserstoffperoxid enthält und durch Katalase endogenes Peroxid zerstört wird, können Pseudoperoxydasereaktionen ermittelt werden. In jungen Äpfeln wurde mit Nadi ohne H_2O_2-Zugabe eine relativ intensive Peroxydasereaktion festgestellt. Da eine Vorbehandlung mit Katalase und Zugabe dieses Enzyms zur Reaktionslösung die Reaktion aber vollkommen verhinderte, ist anzunehmen, dass in jungen Äpfeln Peroxid in relativ grosser Konzentration endogen vorhanden ist oder immer wieder neu gebildet wird (Tafel 8, Abb. 2). Eine H_2O_2-unabhängige Pseudoperoxydase ist offenbar nicht vorhanden.

4.3.3 Einfluss von pH-Wert, Reagenz und Gewebe

Nach Zeile (1941) (nach Deane, 1962) ist das pH-Optimum abhängig vom Substrat. Dabei wird nicht jedes Substrat gleich gut oxydiert, was von chemischen Eigenschaften und vom Redoxpotential abhängen dürfte. Nicht zuletzt spielt die Löslichkeit des Reagenzes, die ihrerseits abhängig ist vom pH-Wert, eine entscheidende Rolle. So reagiert das Nadireagenz nur in leicht alkalischer, AAC und Benzidin dagegen nur in leicht saurer Lösung. Auf die unterschiedliche Benzidin- und AAC-Reaktion je nach pH-Wert wurde schon hingewiesen.

Wie van Fleet (1959) gezeigt hat, wird Benzidin je nach Gewebe zu Benzidinblau oder Benzopurpurin verwandelt. Gewebe und substratabhängige Reaktionsschwellen können besser erfasst werden, wenn mit verschiedenen Reagenzien bei verschiedenen pH-Werten geprüft wird.

4.4 Resultate, erzielt mit verschiedenen Reagenzien und verschiedenem Pflanzenmaterial

Anschliessend werden einige Ergebnisse, welche mit verschiedenen Reagenzien erhalten wurden, tabellarisch zusammengestellt und kurz diskutiert. Es lässt sich dann besser entscheiden, ob die in Äpfeln gefundene Lokalisierung eine Ausnahme, ein Artefakt oder vielleicht eine Pseudoperoxydasereaktion darstellt.

4.4.1 Tabelle 2: *Tetrastigma voinerianum*

In dieser Tabelle sind die Ergebnisse zusammengestellt, welche mit *Tetrastigma voinerianum* als Versuchsobjekt erhalten wurden. Es wurden Längs- und Querschnitte durch junge Sprosse untersucht. Alle Schnitte wurden 5 Minuten in eisgekühltem Aceton vorfixiert. Die Beobachtungen entstammen zwei unabhängigen Versuchsreihen. Der Spross der zweiten Versuchsreihe war allerdings weniger differenziert als der der ersten, so dass einzelne Gewebe nicht direkt verglichen werden konnten.

Tabelle 2

Gewebe	1	2	3	4
	Benzidin mit Phosphatpuffer pH 6,4	*3-Amino-9-äthylcarbazol*	*Nadi* H_2O_2 : 0,3 %	*Aminreagenz nach Burstone*
I. Leitbündel 1. Phloem a) Siebgefässe	Wie 2	Stellenweise deutlich erkennbare R-Produkte im schleimigen Zellinhalt. Schwache Anfärbung der Zellwände (Tafel 7, (Abb. 4)	An den Zellwänden wurden überall R-Körnchen gefunden. Im allgemeinen auffallend schwache R	Sehr intensive R des Zellinhaltes (Tafel 7, Abb. 2)

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Gewebe	1	2	3	4
b) Geleitzellen	Stellenweise war der ganze Zellinhalt angefärbt	Wie 1. Ausgesprochen starke R (Tafel 7, Abb. 4)	Sehr unterschiedliche, nicht besonders auffallende R	Sehr ausgeprägte R (wie in den Siebgefässen) (Tafel 7, Abb. 2)
2. Xylem a) Mittellamelle der Tracheen	Scharf konturierte Farbverteilung. Deutliche Aktivität zwischen anliegenden Verdickungsleisten benachbarter Gefässe. Im Längsschnitt konnte keine besondere Aktivität dieser Stellen gefunden werden	Wie 1. In Längsschnitten waren die Wände zwischen den Verdickungsleisten deutlich rot gefärbt	Wie 1. Die Lokalisierung war aber undeutlicher	Wie 3
b) Mittellamelle der Libriformfasern	Oft durchgehend angefärbt. Deutliche Färbung der Tüpfel	Wie 1	Dort, wo mehr als zwei Wände zusammenstossen, deutliche R	Gute R des Zellinhaltes und der Tüpfel
II. Zellinhalt der inneren Bündelscheide	Keine R	Deutliche R	Intensive R	Wie 3
III. Kollenchym	Gleichmässig braun gefärbte Wände. Wandständiges Plasma gelbbraun	Gleichmässig, intensiv rot gefärbte Wände. Gegen den Zellraum waren diese von roten Körnchen überdeckt	Gegen den Zellraum waren die Wände dicht mit Indophenolkörnchen ausgekleidet. Oft waren auch die verdickten Wandstellen von solchen Körnchen dicht übersät. In der Mitte der Wandverdickungen, an der Stelle, wo mehrere Mittellamellen zusammenstossen, wurde oft intensive Aktivität gefunden	Keine R der Zellwand. Gegen das Zellinnere waren die Zellwände von stark angefärbtem Plasma bedeckt
IV. Bastfaserstrang hinter dem Phloem (abaxial vom Phloem)	Zellen dünnwandig. Intensive R der Mittellamelle und des Zellinhaltes	Wie 1	Eindeutige R der Mittellamelle. Zellinhalt ebenfalls von R-Produkten durchsetzt. An das Parenchym grenzende Zellen besonders aktiv	Gute R des Zellinhaltes. Sehr schwache R der Mittellamelle

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Gewebe	1	2	3	4
V. Mark- und Rindenparenchym	Zellwände ganz braun gefärbt	Zellwände ganz rot gefärbt. Dort, wo mehr als zwei Zellen zusammenstossen, besondere Aktivität der Interzellularsubstanz	Zellwände dicht besetzt mit R-Produkten. Selbst nicht angefärbt. Manchmal Mittellamelle mit starker R erkennbar	Keine R der Zellwände und der Interzellularsubstanz. Aktive Plasmabestandteile unregelmässig an den Zellwänden verteilt
VI. Chloroplasten	Gelbbraun	Keine R	Keine besondere R	Deutliche Anfärbung
VII. Epidermis und Trichome	Plasma der Epidermis keine besondere R. Endzelle der Haare oft stark angefärbt	Stellenweise intensive R des Zellinhaltes. Trichome wie 1	Wie 2	Keine besonders auffallende R
VIII. Schliesszellen und darunter liegendes Gewebe	Sehr intensive R	Wie 1	Wie 1	Wie 1
Lignin	Nur die Tracheenverdickungen und der Libriformring ergaben Lignin-R. Die stärkste R wurde in der Mittellamelle gefunden. Dies entspricht der Stelle stärkster Enzymaktivität in diesem Gewebe			
	Zwischen den Bastfaserbündeln und dem Kollenchymgewebe wurde eine parenchymatische Zone gefunden, deren Zellwände mit allen vier Reagenzien nur schwach reagierten			

4.4.2 Tabelle 3: Glockenäpfel und Klaräpfel

Diese Tabelle zeigt Versuchsergebnisse, welche durch verschiedene Nachweisreaktionen an Äpfeln erhalten wurden. Darin sind besonders die Aktivitäten in den Zellwänden und Interzellularen berücksichtigt.

Tabelle 3

Gewebe	1	2	3	4	5
	2,6-D Versuchsdatum: 30.7.66	*Benzidin* pH 6,4 30.7.66	*Nadi* 30.7.66	*3-Amino-9-äthylcarbazol* 21.11.66	*Aminreagenz* 29.7.66
Epidermis, Subepidermis, äussere Leitbündelscheide, Phloem, Rinden- und Markparenchym,	Stellenweise intensive Anfärbung der Interzellularsubstanzen. Keine R im Plasma (Tafel 6, Abb. 4)	Sehr verbreitet starke R der Interzellularsubstanz. Zellwände und Zellinhalt praktisch keine R	Überall sehr ausgesprochene R der Interzellularsubstanz (Tafel 1, Abb. 6; Tafel 3, Abb. 2 und 8;	Wie 3. Die Pektinwarzen waren selbst rot angefärbt (Tafel 1, Abb. 8; Tafel 7, Abb. 7; Tafel 8,	Die in 1–4 beschriebene Verteilung der R-Produkte wurde nie gefunden. Immer reagierte nur

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Gewebe	1	2	3	4	5
ventrale Karpellappen		(Tafel 1, Abb. 7; Tafel 3, Abb. 1 und 7; Tafel 8, Abb. 6)	Tafel 7, Abb. 5 und 8; Tafel 9, Abb. 1). Wandständiges Plasma dicht durchsetzt von Indophenolblaukörnchen. An Pektinwarzen oft gehäuft R-Produkte	Abb. 1 und 7)	der Zellinhalt
		Mit diesen drei Methoden wurden oft linsenartige Erweiterungen der Mittellamellen auffallend aktiv gefunden (Tafel 7, Abb. 6, 7 und 8). In grösseren, tangential gestreckten Interzellularen der äusseren Rindenschicht und Subepidermis reagierte nicht die ganze Interzellulare, sondern nur Stoffansammlungen, welche an den Zellwänden klebten, wurden stark angefärbt. Oft waren es uneben verteilte Klumpen, welche ursprünglich wohl die ganze Interzellulare füllten (Tafel 7, Abb. 8). In grösseren Parenchyminterzellularen wurde dort, wo zwei Zellwände spitzwinklig zusammenlaufen, sehr intensive R festgestellt (Tafel 3, Abb. 2). Diese Beobachtungen entsprechen genau den Befunden im Lückenkollenchym von Petasites (vgl. Tab. 4)			

4.4.3 Tabelle 4: *Petasites albus*

Das Lückenkollenchym im Infloreszenzspross von *Petasites albus* ist in verschiedener Hinsicht dem Subepidermalgewebe der Äpfel ähnlich. Die stark pektinhaltigen, verdickten Zellwände und das charakteristische Auseinanderweichen der Wände an den Stellen späterer Interzellularen liessen ähnliche enzymatische Vorgänge vermuten. Deshalb wurden Querschnitte durch junge Infloreszenzsprosse untersucht. Tabelle 4 enthält die Versuchsergebnisse.

Tabelle 4

Gewebe	1	2	3
	Benzidin Acetatpuffer pH 5,1	*Nadi*	*3-Amino-9-äthylcarbazol*
Epidermis	Deutlich gesteigerte R des Plasmas. Die tangentialen, stark verdickten inneren Zellwände zwischen Epidermis und erster subepidermaler Zellreihe enthielten eine ausserordentlich intensiv reagierende Interzellular-	Wie 1	Wie 1 (Tafel 3, Abb. 4)

Tabelle 4 (Fortsetzung)

Gewebe	1	2	3
	substanz (erweiterte Mittellamellen). Manchmal waren auch die ganzen Zellwände intensiv gefärbt		
Kollenchym	Die Interzellularsubstanz reagierte manchmal sehr intensiv. In grösseren, luftgefüllten Interzellularen reagierte das anhaftende, ursprünglich die ganze Interzellulare füllende Material sehr intensiv. Oft waren aber die verdickten Wände durchgehend gleich gefärbt	Wie 1. Die Zellwände waren aber nicht gefärbt. Manchmal konnte in den Mittellamellen aneinanderstossender Zellen eine Reihe Indophenolblaukörnchen erkannt werden. In den Interzellularen waren die Wände dicht mit R-Produkten besetzt. Auch in den Zellen waren diese von einer ununterbrochenen einschichtigen Lage von Indophenolkörnchen ausgekleidet	Die in 1 und 2 beschriebene Aktivitätsverteilung war sehr ausgeprägt. Manchmal war die Zellwand durchgehend gleich intensiv gefärbt, manchmal nur die Zone der Mittellamelle (Tafel 3, Abb. 3 und 4)
Parenchym	Der Übergang vom Kollenchym zum Parenchym war fliessend, weshalb man hier eine ähnliche Verteilung der R-Produkte wie im Kollenchym fand. In den Zellen konnte man fädige Strukturen mit R-Produkten erkennen	Wie 1. Manchmal reagierte die Mittellamelle etwas intensiver. Starke R kleiner Interzellularen, dort, wo mehrere Zellen zusammenstossen. In der Zelle gleichmässige Verteilung der blauen Körnchen über die ganze Zellwand	Wie 1 und 2. In den quer verlaufenden Zellwänden waren die Tüpfelfelder deutlich erkennbar. Gesteigerte Aktivität in den Zellecken bzw. Interzellularen
Leitbündel	Intensive R des Phloems. Vor allem die Zellwände waren stark angefärbt. Das Xylemparenchym reagierte relativ schwach	In der Phloemleitbündelscheide und im Protophloem fand man stark reagierende Interzellularsubstanz (Tafel 3, Abb. 5). In der inneren Leitbündelscheide mit Phloem starke Aktivität	Wie 1 und 2. Die Stellen, wo mehrere Zellwände zusammentreten, waren durch starke R ausgezeichnet. Innere Leitbündelscheide wie 2 (Tafel 3, Abb. 6; Tafel 6, Abb. 7)
	Bemerkungen: Ein Vergleich mit phloroglucinbehandelten Schnitten hat gezeigt, dass die Gefässe, welche der Kambiumzone genähert sind, bedeutend stärker auf Peroxydase reagierende sekundäre Wandverdickungen haben als die abgewandten. Sie ergaben hingegen keine Lignin-R (Tafel 6, Abb. 7 und 8)		

4.4.4 Tabelle 5: *Zea Mays*

Um die Reaktion der verwendeten Reagenzien in meristematischen Geweben zu untersuchen, wurden Längs- und Querschnitte durch Maiswurzeln inkubiert. Da

relativ viele Untersuchungen an Wurzeln vorliegen (van Fleet, 1947, 1959; Jensen, 1955), konnten die Resultate besser mit der Literatur verglichen werden. Tabelle 5 enthält die Versuchsresultate.

Tabelle 5

Gewebe	1	2	3	4
	Benzidin Acetatpuffer pH 5,1	*3-Amino-9-äthylcarbazol*	*Nadi*	*Aminreagenz*
Kalyptra und Kalyptrogen	Beinahe alle Zellen gefüllt mit R-Produkten	Starke R. Nicht alle Zellen mit R-Produkten gefüllt	Wie 1	Wie 2
Spitzenmeristem	Etwas schwächere R als 3	Intensive R. R-Produkte auffallend wandständig	Intensive R. Ganze Zellen mit R-Produkten gefüllt	Wie 2. R-Produkte aber nicht so deutlich wandständig
Protoderm	Sehr intensive R	Wie 1. Zellen gefüllt mit R-Produkten	Wie 2	Wie 2
Zellteilungszone	Wie Spitzenmeristem	Zellinhalt gefüllt mit R-Produkten	Wie 2	Wie 2
Xylem- und Phloemdifferenzierungszone	Wie 2. Auffallende R der Zellwände	Intensive R. Etwas schwächer als Protoderm	Wie 2	Wie 2
Epidermis etwa 1 cm von der Wurzelspitze entfernt	Keine besondere R	Bedeutend schwächere R als weiter spitzenwärts	Etwas stärkere R als Rindenschicht. Sonst wie 2	Wie 2
Endodermis	Keine besondere R	R unterscheidet sich nicht vom Markparenchym. Deutliche R der Mittellamellen	Stark gesteigerte R. Sehr grobkörnige R-Produkte	Keine besondere R
Perizykel und Parenchym um die Tracheen	Wie 2	Gesteigerte R der Mittellamellen	R-Produkte in den Mittellamellen und an den Zellwänden	Gesteigerte R des Zellinhaltes. Plasmaansammlungen mit starker R. Interzellularsubstanz ohne besondere R
Phloem	Relativ starke R der Mittellamellen	Relativ schwache R der Mittellamellen. An den Zellwänden Plasma mit starker Aktivität	Relativ schwache R	Einzelne Zellen ganz gefüllt mit roten R-Produkten

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Gewebe	1	2	3	4
Übriges Parenchym	Zellwände belegt mit körnigen R-Produkten. Wandsubstanz ebenfalls angefärbt. Zellen durchzogen von Plasmafäden, welche körnige R-Produkte enthalten	Zellwand rötlich angefärbt. An den Zellwänden viele rote Körnchen	Zellwände dicht besetzt mit R-Produkten. Mittellamelle sichtbar	Zellwände ungefärbt. R-Produkte oft dicht an den Zellwänden

Bemerkungen: In Bohnenwurzeln konnten im allgemeinen gleiche Beobachtungen gemacht werden. Die Mittellamellen und Interzellularsubstanzen der Parenchymzellen wurden oft mit Nadi und Benzidin intensiv angefärbt (mit AAC wurde nicht geprüft)

4.4.5 Vergleich der Versuchsergebnisse

Durch Vergleich der in den vorangehenden Tabellen zusammengestellten Resultate kommt man zu folgenden Feststellungen:

a) Gleiche Gewebe reagieren mit allen Reagenzien grundsätzlich gleich.

b) Innerhalb der Gewebe und Zellen findet man aber auffallende Lokalisationsunterschiede. Vor allem das Aminreagenz ergibt oft abweichende Resultate. Das Nadireagenz scheint eine Mittelstellung einzunehmen.

c) Nadi und Aminreagenz haben weniger Affinität zu den Zellwänden als die anderen Nachweismittel. Oft sind aber die Zellwände von stark reagierendem Plasma bedeckt. Mit Benzidin, 2,6-D, AAC und oft auch mit Nadi reagieren die Mittellamellen und Interzellularsubstanzen sehr intensiv.

d) In Äpfeln reagiert das Nadireagenz bedeutend stärker als in *Tetrastigma voinerianum* und *Petasites albus*.

4.5 Diskussion der Versuchsergebnisse

Die im Kapitel 4.4 besprochenen Fehlerquellen berücksichtigend, werden nachstehend die Versuchsergebnisse diskutiert.

a) Adsorptionsartefakte: Man kann kaum die auffallend intensive Anfärbung der Interzellularsubstanzen durch vier Peroxydasereagenzien als Adsorptionsartefakte interpretieren.

Die Adsorption des Indophenolblaus durch die in Kap. 4.3.1 beschriebenen sudanophilen Stoffe in Äpfeln wurde wiederholt beobachtet. In Schnitten älterer Äpfel verschwanden die Reaktionsprodukte in wenigen Tagen vollkommen aus der Epidermis und den angrenzenden Subepidermiszellen. Wahrscheinlich wurden sie von der Kutikula adsorbiert (Tafel 1, Abb. 6) (vgl. Kap. 4.6.1). Die Indophenolblaukörnchen dürften teilweise durch Adsorption des Farbstoffes an die sudanophilen Körnchen in den Zellen entstehen. Es muss aber beachtet werden, dass keine sudanophilen Stoffe in der Interzellularsubstanz der Äpfel festgestellt wurden, dass aber gerade diese

intensive Nadireaktion ergaben. Epidermis und Subepidermis reagierten immer sehr intensiv mit dem Nadireagenz; es wurde hier aber keine besondere Anhäufung sudanophiler Körnchen beobachtet.

Mit Benzidin bei pH 6,4 (Phosphatpuffer) und AAC wurde die Inkubationslösung meistens auch nach 30 Minuten nicht durch Oxydationsprodukte getrübt. Dies zeigt, dass diese offenbar schlecht in das Inkubationsgemisch diffundieren. Anders verhalten sich das Nadi- und das Aminreagenz. Hier wird auch die Inkubationslösung deutlich durch Reaktionsprodukte getrübt. Da könnte eher auf eine Diffusion mit anschliessender Adsorption geschlossen werden. Gerade diese Reagenzien färben aber die Primär- und Sekundärwände schlecht.

Die Carboxylgruppen der Uronsäuren in den Hemizellulosen und Pektinen dürften basophile Eigenschaften haben, was eine Adsorption des Indophenolblaus begünstigen sollte (van Fleet, 1959, 1962). Diese Adsorption wurde aber zum Beispiel im Kollenchym nicht beobachtet.

Durch Einlegen von hitzeinaktivierten Apfelschnitten in die übliche AAC-Inkubationslösung, unter Zusatz von Peroxydase aus Meerrettich (1 mg/ml Lösung) wurde versucht, zu entscheiden, ob eine Adsorption der Reaktionsprodukte durch die Zellwände erfolgt. Dabei wurden einzelne Schnitte vorher 30 Minuten in eine Peroxydaselösung gelegt, um zu untersuchen, ob die Peroxydase eine besondere Affinität zu den Zellwänden besitzt. Andere Schnitte wurden direkt in die Peroxydase enthaltende Inkubationslösung gelegt. Eine Anfärbung der Zellwände oder der Interzellularsubstanz konnte nicht festgestellt werden. Dieses Versuchsergebnis spricht gegen eine Adsorption der Reaktionsprodukte durch die Mittellamellensubstanzen.

Möglicherweise enthält die membranogene Plasmaschicht[1] viele Nucleinsäuren, weshalb das Indophenolblau hier besonders gut festgehalten wird (van Fleet, 1962). Die Oxydationsprodukte des Aminreagenzes dürften ähnliche Eigenschaften haben wie diejenigen, welche mit AAC erhalten werden (Burstone, 1960). Nach Burstone (1960) dürften sie dem Emeraldin nahestehen. Gerade die Zellwände verhalten sich aber diesen zwei Reagenzien gegenüber ganz verschieden.

Aus den aufgeführten Gründen wird eine Adsorption an die Interzellularsubstanzen weitgehend ausgeschlossen.

b) Unterschiedliche Permeabilität der verschiedenen Reagenzien in die Interzellularsubstanzen: Die Pectinpapillen an den Zellwänden der Äpfel reagieren verschieden auf Nadi und AAC. Mit dem Nadireagenz erscheinen sie dicht übersät mit kleinen Indophenolblaukörnchen, mit AAC werden sie rot angefärbt. Möglicherweise dringt AAC besser in die Zellwand ein, wo es mit dem darin vorhandenen Enzym zusammentritt. Es wurde öfters beobachtet, dass Benzidin bei pH 6,4 und AAC die Zellwände besser anfärben als das Nadi- und das Aminreagenz. Für das Aminreagenz ist die auffällige Reaktion des Cytoplasmas bezeichnend.

Die beschriebenen Lokalisationsunterschiede könnten statt mit verschiedener Adsorption auch mit verschiedener Substratspezifität erklärt werden. Es müssten demnach eine Cytoplasmaperoxydase und eine Zellwandperoxydase unterschieden

---

[1] Die hier als membranogene Plasmaschicht bezeichnete Zone könnte mit der Tertiärmembran oder Bildungshaut, wie sie von Frey-Wyssling (1959) beschrieben wird, übereinstimmen.

werden. In der membranogenen Plasmaschicht dürften beide Arten vertreten sein, was aus der Verteilung der Oxydationsprodukte der Nadi- und AAC-Reaktion hervorgeht. Diese Erklärungsmöglichkeit wird als die wahrscheinlichere betrachtet, wenn auch verschiedene Permeabilität nicht ausgeschlossen werden kann. In dieser Arbeit wird vorwiegend die Zellwandperoxydase diskutiert.

c) Pseudoperoxydasereaktion der Mittellamellen und Interzellularsubstanzen: Nach Sato (1951) (nach van Fleet, 1962) wurde bei Anwendung der Benzidinblaumethode die Anfärbung der Zellwand durch Hitze nicht verhindert. Van Fleet (1959, 1962) vermutet, dass sich in älteren Zellen die Hämgruppe vom Protein löst und in die Zellwand diffundiert. Dies könnte zu einer Pseudoperoxydasereaktion in den Zellwänden führen. Allein schon die hier gefundene intensive Reaktion dieser Strukturen scheint aber gegen solche Vorgänge zu sprechen. Mehrere Hitzeversuche, durch die entschieden werden sollte, ob wirklich Pseudoperoxydasereaktionen vorliegen, sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6
Hitzeinaktivierung der Peroxydase

Hitzebehandlung Dauer	Temperatur	Versuchsobjekt	Methode	Reaktion
10 Min.	90±2 °C	*Zea Mays:* Wurzel	N	Geringe Hemmung. Stellenweise deutliche R der Mittellamellen
5 Min.	98±2 °C	*Zea Mays:* Wurzel	N	Sehr starke Hemmung. Sehr schwache R des Parenchyms. Hier keine R der Mittellamellen. Libriformfasern um die grossen Tracheen, schwache Wandfärbung. Mittellamellen sichtbar. Endodermis und Perizykel noch ausgesprochen starke R (Zellwände und Mittellamellen)
10 Min.	90±2 °C	*Zea Mays:* Wurzel	AAC	Geringe Hemmung. Im Perizykel deutliche R der Mittellamellen. Intensive R des Phloems
5 Min.	98±2 °C	*Zea Mays:* Wurzel	AAC	Sehr starke Hemmung. Wie N. Im Perizykel noch deutliche R der Mittellamellen. Phloem auch noch R der Zellwände
10 Min.	90±2 °C	*Tetrastigma voinerianum:* Spross	N	Geringe Hemmung
5 Min.	98±2 °C	*Tetrastigma voinerianum:* Spross	N	Sehr starke Hemmung. Kollenchym und Markstrahlen schwache R
10 Min.	90±2 °C	*Tetrastigma voinerianum:* Spross	AAC	Geringe Hemmung
5 Min.	98±2 °C	*Tetrastigma voinerianum:* Spross	AAC	Wie N. Sehr starke Hemmung. Kollenchymwände und Markstrahlen schwach rot

Tabelle 6 (Fortsetzung)

Hitzebehandlung Dauer	Temperatur	Versuchsobjekt	Methode	Reaktion
15 Min.	80±2 °C	*Petasites albus:* Infloreszenzspross	AAC	Totale Hemmung der ohnehin schwachen R im Xylemparenchym. Phloem noch schwache R. Im übrigen Gewebe keine Hemmung feststellbar (Tafel 3, Abb. 6; Tafel 7, Abb. 1)
10 Min.	98±2 °C	*Petasites albus:* Infloreszenzspross	AAC	Praktisch totale Hemmung in allen Geweben (Tafel 7, Abb. 3)
10 Min.	90±2 °C	Glockenäpfel 9.5.67	N B AAC	Totale Hemmung
10 Min.	90±2 °C	Glockenäpfel 6.7.67	N B AAC	Bis auf einzelne Endokarpstellen vollkommene Hemmung (Tafel 6, Abb. 5 und 6)

Wie die Hitzeinaktivierung gezeigt hat, scheint es, dass die Reaktion in den Zellwänden von einer Peroxydase verursacht wird, die im Temperaturbereich von 80 bis 100 °C inaktiviert wird. Bei *Tetrastigma* und *Zea Mays* hat sich besonders die Temperaturerhöhung von 90 auf 98 °C stark hemmend ausgewirkt. Die Erhitzungszeit dürfte sich allgemein weniger hemmend auswirken als die Temperaturhöhe, wenn auch 5 Minuten offenbar bei *Zea Mays* und *Tetrastigma voinerianum* für eine totale Hemmung nicht ausreichten. Die Hitzeresistenz der Peroxydase scheint gewebeabhängig zu sein.

4.6 Peroxydase in Äpfeln verschiedener Entwicklungsstufen

In diesem Kapitel werden die mit Glocken- und Klaräpfeln erzielten Versuchsergebnisse beschrieben. Die durchgehend angewandte Methode war Nadi. Später hat sich herausgestellt, dass AAC sich eher besser geeignet hätte, weshalb mit diesem Reagenz im Sommer 1967 mehrere Kontrollversuche ausgeführt wurden.

Den Beobachtungen, die mit verschiedenen Reagenzien gemacht wurden, sind in Klammern die Reagenzien beigefügt.

Die Beschreibung ist mehr oder weniger nach Geweben gegliedert. Die römischen Zahlen kennzeichnen folgende Entwicklungsstadien:

I Blüte kurz vor dem Aufblühen bis eine Woche danach

II 1 bis 3 Wochen alte Äpfel. Die Glockenäpfel vergrösserten sich in diesem Zeitraum von 3 mm auf 5 mm Durchmesser

III 3 bis 7 Wochen nach dem Verblühen. Zuwachs der Glockenäpfel auf 25 mm

IV Von ungefähr 7 Wochen nach der Blüte bis zur Essreife

V Alternde Äpfel während und nach der Essreife

Je nach Witterung können die angegebenen Enzymverteilungen um 1 bis 2 Wochen früher oder später in verschiedener Ausprägung erscheinen. Der Übergang von einer Entwicklungsstufe zur nächsten ist fliessend. Die angegebene Aufteilung in Entwicklungsstufen bezweckt bloss eine übersichtliche Stoffanordnung und ermöglicht eine grobe Orientierung.

In der Zeitspanne I (kurz vor der Blüte bis eine Woche danach) ist die Peroxydaseverteilung in den einzelnen Geweben recht heterogen. Zellen, die stark reagieren, können neben solchen mit schwacher Reaktion liegen. Allgemein ist aber die Aktivität sehr gesteigert. Dies mag mit dem meristematischen Charakter der relativ undifferenzierten Fruchtknotengewebe zusammenhängen.

4.6.1 Epidermis

In allen Entwicklungsstadien fiel die Epidermis durch besonders intensive Peroxydasereaktion auf (Tafel 1, Abb. 8). Der ganze Zellinhalt der radial gestreckten Zellen wurde stark angefärbt (I und II) (N, B, AAC, A). In jungen Äpfeln reagierte die Epidermis im allgemeinen auch ohne H_2O_2-Zugabe sehr intensiv, später aber nur, wenn Wasserstoffperoxid zugegeben wurde. Bei der Beurteilung der Ergebnisse mit Nadi war Vorsicht geboten, da die Kutikula, wie erwähnt, die Reaktionsprodukte stark adsorbiert. Wurden die Gewebe sofort nach der Inkubation betrachtet, waren die Zellen mit Reaktionsprodukten gefüllt. Mehrere Stunden später konnten sie ganz oder nur aussen entfärbt sein. Bezeichnend ist, dass im Apfel unmittelbar nach der Blüte diese Beobachtung nicht gemacht werden konnte, da die Kutikula in diesem Entwicklungsstadium noch sehr dünn ist.

4.6.2 Subepidermis

I und II. Die Subepidermis war nur etwa 2 bis 3 Zellreihen breit. Oft wurden besonders in Stielnähe und im Stiel selbst Einzelzellen und Zellreihen mit besonders intensiver Reaktion gefunden. Sie lagen neben solchen, die schwach reagierten. In der Stielsubepidermis wurden oft gestreckte, relativ dickwandige Zellen gefunden, deren Mittellamellen und Interzellularsubstanzen sehr intensiv reagierten (N, B, AAC) (Tafel 7, Abb. 5). Es wurden hier ganze Zellreihen von einer breiten Interzellularsubstanz getrennt, weshalb sie sich beim Schneiden gut voneinander lösten. Manchmal waren auch nur die Interzellularwände von diesem intensiv reagierenden Stoff belegt. Ursprünglich waren wohl auch hier die ganzen Interzellularen damit gefüllt.

III. Die Zellen waren vorerst noch nahezu isodiametrisch. Jetzt wurde auch in der Subepidermis des heranwachsenden Apfels die charakteristische Reaktion der Interzellularsubstanz beobachtet (N, B, AAC) (Tafel 1, Abb. 8). Besonders mit Citratpuffer von pH 5,5 wurden diese Strukturen stark angefärbt (AAC). Mit Benzidin in Phosphatpuffer von pH 6,4 reagierten die Interzellularsubstanzen sehr auffällig. Azid in $3–5 \cdot 10^{-2}$ M Lösung hemmte praktisch vollständig (Tafel 1, Abb. 8; Tafel 6, Abb. 3).

Von der Subepidermis zum Rindenparenchym konnte eine auffallende Reaktionsabnahme festgestellt werden.

IV. Die Zellen waren tangential gestreckt, die Wände stark verdickt, die Interzellularen stark erweitert und mit intensiv reagierendem Material gefüllt (N, B, 2,6-D,

AAC) (Tafel 1, Abb. 6, 7 und 8; Tafel 6, Abb. 4). Das Aktivitätsgefälle gegen das Parenchym war weiterhin charakteristisch.

V. Die starke Aktivität der Interzellularsubstanz war mit Benzidin und AAC vereinzelt noch zu beobachten.

4.6.3 Rindenparenchym

I. Im Rindenparenchym junger Äpfel können zwei verschiedene Gewebekomplexe unterschieden werden: erstens das eigentliche kleinzellige Parenchym, in das die Perianthleitbündel eingebettet sind, von dem aus gegen die Subepidermis papillöse Zellproliferationen vorwachsen; zweitens die Subepidermis, von der aus Zellen gleicher Art vorwachsen und sich mit den Zellproliferationen des Parenchyms vernetzen. So entsteht ein interzellularenreiches Gewebe (Aerenchym) (Tafel 2, Abb. 2). Ähnliche Beobachtungen wurden von McArthur und Wetmore (1941) beschrieben. Bonne (nach McArthur und Wetmore, 1941) spricht von der «zone corticale lacuneuse».

Die vorwachsenden Zellen ergaben sehr ausgeprägte Peroxydasereaktion. Mit AAC wurden vor allem die Wandpapillen rot angefärbt. Mit dem Nadireagenz wurden diese dicht von Indophenolblaukörnchen überdeckt. Das Aminreagenz färbte den Zellinhalt intensiv rotbraun, nie aber die Zellwände mit den Papillen. Manchmal wurden im Parenchym Interzellularen gefunden, die auffallend starke Reaktion zeigten (N).

II. Die aerenchymatische Zone war nicht mehr so gut vom andern Parenchym abgrenzbar. Die Zellproliferationen reagierten aber immer noch stärker als das umgebende Rindenparenchym (N, B, AAC). In diesen wurde vor allem der Zellinhalt stark angefärbt. Einzelne Zellen und Zellgruppen des Parenchyms fielen durch stärkere Reaktion auf (N). Daraus gingen die kleineren Leitbündel des Rindenparenchyms hervor. Ähnlich wie bei der Cytochromoxydase reagierten Zellen mit Kristalldrusen oft auffallend intensiv.

III. Vor allem der Zellinhalt reagierte positiv (N). Eine besondere Aktivität der Interzellularsubstanzen und der Zellproliferationen war nicht zu beobachten (N, B). Mit AAC war die unter IV beschriebene Enzymverteilung schon angedeutet.

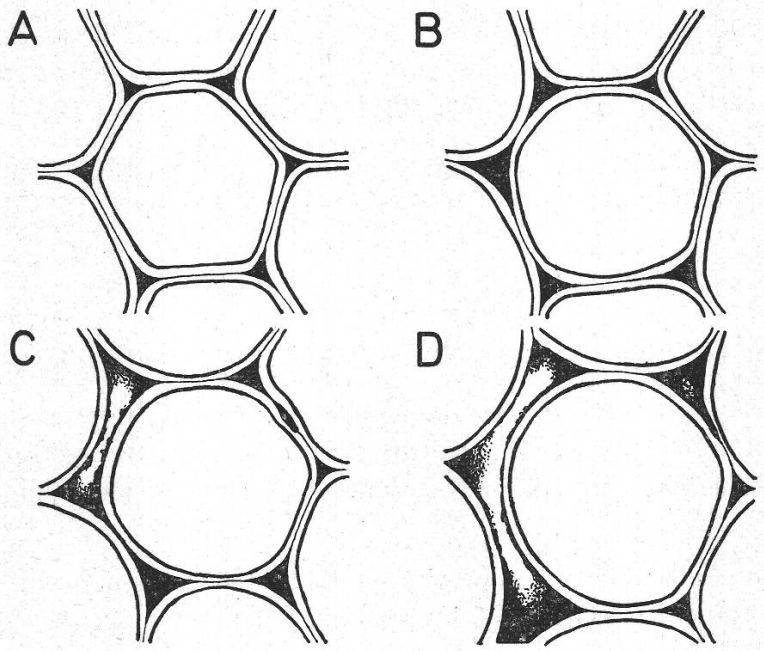
IV. In diesem Entwicklungsabschnitt fiel eine besonders intensive Reaktion der Interzellular- und Mittellamellensubstanz auf (Tafel 3, Abb. 1 und 2; Tafel 7, Abb. 6, 7 und 8; Tafel 8, Abb. 1; Tafel 9, Abb. 1). Kleinere Interzellularen waren ganz gefüllt mit Reaktionsprodukten (Tafel 9, Abb. 1) (Fig. 3 B), in grösseren hingegen wurde nur an den Zellwänden (Tafel 7, Abb. 8) (Fig. 3 C) und besonders dort, wo zwei Zellwände spitzwinklig zusammenstossen, sehr intensiv reagierendes Material gefunden (Fig. 3 D).

Vermutlich handelt es sich um Reste der Interzellular- beziehungsweise Mittellamellensubstanz, welche ursprünglich den ganzen Interzellularraum füllte. Von hier aus wird wahrscheinlich die Mittellamelle weiter gelockert, so dass sich die Parenchymzellen ihrer Oberflächenspannung und Elastizität entsprechend abrunden. Diese Vorgänge können zu einem vollständigen Zerfall des Gewebes in Einzelzellen führen. Je nachdem, wie die kleineren und grösseren Interzellularräume durchschnitten wurden, erschienen die Enzymverteilungen in diesen etwas verschieden. Immer war es

aber die Interzellularsubstanz, die auffällige Reaktion zeigte (N, B, 2,6-D, AAC) (Tafel 7, Abb. 6, 7 und 8).

Die Cytoplasmaschicht, welche unmittelbar der Zellwand anliegt (membranogenes Plasma), war meistens dicht durchsetzt von Indophenolblaukörnchen (N) (Tafel 1, Abb. 6).

Während der Lagerung wurden Zellwände gefunden, die stellenweise eigenartige sichelartige Einbuchtungen zeigten (crescents [Carré und Horne, 1927]). In diesen wurde intensiv reagierendes Material gefunden (AAC) (Tafel 8, Abb. 1). Häufig waren die Zellwände aber auch durch Pektinwarzen verdickt, die mit AAC gut angefärbt wurden und dicht von Indophenolblaukörnchen bedeckt waren (N). Seltener wurden dünnwandige Tüpfelstellen mit sehr ausgeprägter Reaktion verzeichnet. Besonders die Mittellamelle war intensiv gefärbt (N/AAC). Die Mittellamelle der Tüpfel unterschied sich von der übrigen Zellwand auch in ihrer Widerstandsfähigkeit gegen Pektinase. Mit Rutheniumrot angefärbte Zellwände wurden durch Pektinase abgebaut und bis auf die Mittellamellen der Tüpfel entfärbt. Ähnliche Beobachtungen konnten im Parenchym der Stielrinde junger Äpfel und in den Zellwänden der Zwiebelepidermis gemacht werden.



Figur 3

Schizogene Entstehung der Interzellularen. Peroxydaseverteilung in der Interzellularsubstanz schwarz. A: meristematische Zelle aus einer jungen Frucht. B: Beginn der Interzellularenbildung. Gesteigerte Peroxydasereaktion dort, wo mehr als zwei Zellen zusammenstossen. Einlagerung pektinartiger Stoffe. C: an einer Stelle ist die Interzellularsubstanz gerissen. D: Vereinigung mehrerer kleinerer Interzellularen führt zu einer grossen Interzellularen, in deren Ecken intensive Peroxydasereaktion zu finden ist. Zellen nehmen kugelige Gestalt an

V. Die Aktivität in Interzellularenecken und Interzellularsubstanzen verschwand weitgehend. Die relativ schwach aktive Plasmaschicht war stellenweise von den Zell-

wänden gelöst. Carré und Horne (1927) sprechen von einer auffallenden Plasmolyse vieler Zellen. Mit Benzidin (pH 6,4) ergaben diese häutigen Strukturen keine Reaktion. Das Nadireagenz neigte zu starker Kristallbildung, was auf schwächere Adsorption des Enzyms oder der Reaktionsprodukte hinweist. Wahrscheinlich ist die zunehmende Löslichkeit der Pektinstoffe (Carré und Horne, 1927) dafür verantwortlich (vgl. Kap. 4.7).

4.6.4 Markparenchym

I und II. Das Markparenchym war in seiner Aktivität nicht vom Rindenparenchym zu unterscheiden.

III. Jetzt fiel dieses Gewebe zunächst durch stärkere Reaktion auf als das übrige Parenchym. Die Zellwände waren etwas verdickt und wurden von Rutheniumrot stärker angefärbt als die Rindenzellen. Gehäuft konnten kleine Interzellularen mit gut reagierender Interzellularsubstanz beobachtet werden. Oft war das wandständige Material gefärbt. Auch dort, wo die Zellwände spitzwinklig zusammenstossen, konnte gesteigerte Reaktion festgestellt werden (N, AAC). Kristallhaltige Zellen waren öfters dickwandiger (Rutheniumrotfärbung), und deren Zellinhalt reagierte intensiver auf Peroxydase als derjenige anderer Zellen.

IV. Die für die Rinde charakteristische Aktivitätsverteilung dieser Entwicklungszeit war zuerst im Markparenchym, manchmal zuerst an der Grenze zwischen Markparenchym und Rinde zu erkennen (N), breitete sich dann aber rasch auch auf diese aus.

V. Die Beobachtungen, welche für das Rindenparenchym beschrieben wurden, gelten auch hier.

4.6.5 Parenchym der ventralen Karpellappen

I–III. Die Peroxydaseaktivität war recht intensiv. Das Gewebepolster, welches der Mikropyle gegenüberliegt, der Obturator, wurde stark aktiv gefunden. Mit dem Aminreagenz wurde das Grundgewebe der ventralen Karpellappen braunschwarz angefärbt.

IV. Die Zellwände waren stellenweise (vgl. Kap. 4.6.9) ähnlich wie in der Subepidermis verdickt. Mittellamellen und Interzellularsubstanz reagierten intensiv (N, B, AAC) (Tafel 3, Abb. 7 und 8).

4.6.6 Perianthleitbündel und dorsale Karpelleitbündel

Phloem

I und II. Das primäre Phloem ergab ausgeprägte Reaktion. Vor allem die Protophloemelemente zusammen mit verdickten Zellwänden in der äusseren Leitbündelscheide (bundle cap [Esau, 1965]) reagierten sehr auffallend (N, B, AAC) (Tafel 9, Abb. 3). Mit dem Aminreagenz wurden bezeichnenderweise diese Strukturen nicht angefärbt. Rutheniumrot färbte diese Stellen sehr intensiv.

III. und IV. Die äussere Leitbündelscheide und Protophloemzone reagierte nach wie vor recht intensiv. Hier wurden oft Interzellularen mit sehr intensiv reagierender Interzellularsubstanz gefunden (N, B, 2,6-D, AAC).

Spezifische Anfärbung der Siebgefässe durch Chlorzinkjod und Vergleiche mit der Nadireaktion zeigten, dass Sieb- und Geleitzellen des sekundären Phloems stark reagierten (Tafel 8, Abb. 8).

Kambium

I und II. Bis Ende der zweiten Entwicklungswoche wurde die Kambium- und Differenzierungszone mit Nadi eher schwächer angefärbt als das primäre Phloem.

III. und IV. Jetzt stieg die Aktivität rasch an, so dass das Kambium das peroxydaseaktivste Gewebe im Leitbündel wurde (N, A). Auch ohne Peroxidzugabe wurden hier ausgesprochen gute Reaktionen beobachtet (N).

V. Im älteren Apfel wurde die Kambiumzone schmäler, und ihre Aktivität nahm etwas ab. Das wandständige Plasma reagierte nach wie vor sehr intensiv. Die Peroxydaseaktivität war in den Leitbündeln im allgemeinen bis zum Gewebezerfall sehr auffallend.

Xylem

I–IV. Im primären wie im sekundären Xylemparenchym stieg die Peroxydaseaktivität mehr und mehr an. Besonders aktiv war die Xylemdifferenzierungszone. Hier wurden oft Tracheen gefunden, die ganz von Reaktionsprodukten gefüllt waren. Im primären Xylem lagen kollabierte Protoxylemelemente, welche oft intensiv angefärbt wurden. In der inneren Leitbündelscheide konnte etwa gleichzeitig wie in der äusseren auffällige Reaktion der Interzellularsubstanz festgestellt werden (N, B, AAC). Esau (1965) bezeichnet diese Gewebe als kollenchymatisch.

4.6.7 Ventrale Karpelleitbündel

I. Diese Leitbündel zeigten, verglichen mit dem umliegenden Gewebe, noch keine gesteigerte Reaktion.

II–IV. Die Aktivität stieg nach dem Verblühen rasch an (N). Mit dem Aminreagenz wurden die Leitbündel braun angefärbt, so dass sie stark mit dem umliegenden Gewebe kontrastierten, das grünschwarz angefärbt wurde.

4.6.8 Endokarp

I und II. Die äussere Zellschicht des Karpells, welche dem Samenfach zugekehrt ist, fiel noch nicht durch besondere Aktivität auf (N, B, AAC).

III. Im Samenfachepithel war die Aktivität stark gestiegen (Tafel 8, Abb. 2). Allmählich reagierten die benachbarten Zellschichten ebenfalls sehr intensiv (N, B, AAC) (Tafel 6, Abb. 1; Tafel 8, Abb. 3).

IV. Ende Juni setzte die Lignifizierung der äusseren Endokarpschicht ein (Tafel 8, Abb. 4). Mit Benzidin reagierten bei pH 6,4 wie üblich die Zellwände, nicht aber der Zellinhalt. Etwa 3 Wochen später ergaben die Mittellamellen der dem Samenfach abgewandten Zellen mit 2,6-D und Benzidin (pH 6,4) starke Reaktion (Tafel 8, Abb. 6).

Ende Juli, also etwa 12 Wochen nach der Blüte, liess die Peroxydaseaktivität in den äusseren Endokarpzellen oft nach. Ende August wurden Äpfel gefunden, in denen 4 bis 5 Zellschichten des Endokarps praktisch keine Reaktion zeigten (N) (Tafel 8, Abb. 5). Mit Phloroglucin ergaben sie hingegen starke Ligninreaktion. Dieser Zustand wurde im allgemeinen beibehalten. Es wurden aber auch mehrere Monate später Endokarpien gefunden, in denen alle Zellen stark reagierten. Die Zellen, welche dem verholzten Endokarp anliegen, behielten bis zum Fruchtzerfall eine gesteigerte Aktivität bei. Gegen Ende September wurden oft Rissstellen im Endokarp gefunden, durch welche papillöse Zellen ins Samenfach wuchsen. Diese Zellproliferationen reagierten sehr stark, ähnlich denjenigen in der Rindenzone des jungen Apfels. Auch hier waren es die Papillen, die durch intensive Aktivität auffielen (N, AAC) (Tafel 8, Abb. 7).

4.6.9 Griffelkanalepithel

I. Eine Zellreihe aus radial langgestreckten Zellen umgab den Griffelkanal (Griffelkanalepithel). Hier zeigte der Zellteil, welcher dem Griffelkanal zugekehrt ist, starke Nadireaktion. Mit dem Aminreagenz wurden die ganzen Zellen braun angefärbt.

II–IV. Die Reaktion stieg weiter an, so dass der ganze Zellinhalt sehr intensiv angefärbt wurde (N, AAC). Dort, wo die Karpellappen aneinanderstossen, und in deren Einbuchtungen bildet sich aus den ineinanderwachsenden Zellen des Griffelkanalepithels ein kleinzelliges, dickwandiges, recht aktives Gewebe. Durch Wachstum und Vernetzung der Epithelzellen entsteht eine Zellschicht, deren Zellen dickwandig und abgerundet sind. Die Interzellularsubstanz reagierte sehr intensiv auf Peroxydase (N, B, AAC) (Tafel 3, Abb. 7 und 8).

4.6.10 Samenanlagen

Die hier gemachten Beobachtungen gelten nur für die Entwicklung kurz vor und kurz nach der Blüte.

Aminreagenz: Der Nucellus, das innere Integument und der innere Teil des äusseren Integumentes wurden rostrot angefärbt. Die dem Nucellus angrenzende Schicht des inneren Integumentes wurde schwarz, der äussere Teil des äusseren Integumentes graugrün angefärbt. Besonders intensiv war die Aktivität in der äussersten Nucellusschicht.

Nadi und AAC: Die dem Embryo beziehungsweise Embryosack genäherten relativ grossen Zellen des Nucellus sowie die äusserste Zellschicht reagierten meistens besonders aktiv. Ebenfalls starke Reaktion ergaben das erste Integument und die angrenzenden Zellen sowie die äusserste Zellreihe des zweiten Integumentes. Im inneren Integument war manchmal die dem Nucellus anliegende Zellreihe, manchmal diejenige, welche an das äussere Integument grenzt, auffallend aktiv (Tafel 8, Abb. 2).

4.6.11 Zusammenfassende Beschreibung der Befunde mit dem Aminreagenz

Mit dem Aminreagenz erhielt man eine andere Lokalisierung und eine andere Aktivitätsänderung im Verlaufe der Apfelentwicklung. Im jungen Apfel reagierte das Plasma recht gut, so dass rotbraune, braunschwarze und grünblaue Reaktionsprodukte entstanden (vgl. Kap. 3.2).

Die Epidermis wurde braunschwarz, die Subepidermis blaugrün und das Markgewebe braun bis grünschwarz angefärbt. Die Reaktionsprodukte konnten unregelmässig in Form von gefärbten Klumpen in der Zelle liegen oder als kleine Körnchen an den Zellwänden haften. Ersteres wurde vor allem in der Rindenzone und Subepidermis junger Äpfel gefunden (erste Entwicklungswochen). Besonders in der Subepidermis wurde auch die Zellwand grünlichgrau angefärbt. Diese Zellwandfärbung wurde mit weiterer Entwicklung etwas intensiver. Die charakteristische Reaktion der Interzellularen, wie sie mit den anderen Reagenzien gefunden wurde, konnte allerdings nicht beobachtet werden. Rotbraune Reaktionsprodukte wurden immer nur im Cytoplasma gefunden. Vor allem in älteren Äpfeln war diese Anfärbung sehr ausgeprägt, was wohl auf einem Aktivitätsanstieg im Verlaufe der Entwicklung beruht (vgl. auch Kap. 3.2).

Immer reagierte vorwiegend der Zellinhalt. pH-Werte von 4–8 ergaben immer wieder dieselbe Verteilung. Oft wurden stark aktive Plasmaansammlungen, welche Stärkekörnchen enthielten, beobachtet. Vor allem während der Lagerung wurden oft viele kleinere und grössere kugelige Plasmaansammlungen gefunden. Ein schwächer aktives Zentrum wurde von einem stark aktiven Saum umfasst. Nie wurde eine Aktivitätsverteilung wie mit Benzidin und AAC gefunden. Im alternden Apfel waren die Reaktionsprodukte überall in der Zelle verteilt, oder sie lagen papierknäuelähnlich in der Zellmitte (plasmolysierte Zellen) (Carré und Horne, 1927). Ähnliche Beobachtungen wurden auch mit Nadi gemacht.

4.6.12 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Peroxydaseverteilung im Fruchtknoten der Apfelblüte eher gleichmässig war, das heisst, das ganze Gewebe zeigte mehr oder weniger starke Aktivität. Im Verlaufe der Weiterentwicklung kam es zu Aktivitätsänderungen. Besonders stark reagierten folgende Gewebe und Gewebeteile: Epidermis, Subepidermis, Interzellularen, Leitbündel, Endokarp und Teile der Integumente, ventrale Karpellappen mit Griffelkanalepithel.

4.7 Peroxydase und Pektinstoffwechsel

Die auffällige Peroxydasereaktion der Interzellular- und Mittellamellensubstanz liess einen Zusammenhang zwischen pektinartigen Stoffen beziehungsweise Hemizellulosen und Peroxydase vermuten, weshalb mit Rutheniumrot «Pektin» nachgewiesen wurde. Bei der Beurteilung der so erhaltenen Ergebnisse ist Vorsicht geboten, da Rutheniumrot kein spezifisches Pektinreagenz darstellt. Wichtig ist aber in diesem Zusammenhang, dass Uronsäuregruppen und Oxyzellulose auch positive Reaktionen ergeben (Frey-Wyssling, 1959). Überall dort, wo die Zellwände beziehungsweise die Interzellularsubstanzen mit Rutheniumrot stark angefärbt wurden, war die Peroxydasereaktion mit Nadi, Benzidin, 2,6-D und AAC sehr intensiv. Schon in jungen Äpfeln ist diese Übereinstimmung aufgefallen. Erinnert sei an die Aktivität des Markparenchyms kurz nach der Befruchtung und an die Aktivität der Zellwände in der äusseren Leitbündelscheide (Tafel 9, Abb. 4). Ähnliche Übereinstimmungen wurden für die Epidermis und Subepidermis, für die ersten Entwicklungsstadien des Endokarps, für die gefüllten Interzellularen im Parenchym (Tafel 9, Abb. 2) und in der Sub-

epidermis sowie für die Samenanlagen verzeichnet. Gleich verhielt sich das Kollenchym von *Tetrastigma voinerianum* und *Petasites albus*. Auch Zellpapillen wurden stark angefärbt (vgl. auch Tafel 8, Abb. 7). Solche Pektinwarzen wurden auch in anderem Pflanzenmaterial gefunden und eingehend beschrieben (Carlquist, 1956). Interessant ist, dass stellenweise auch der Zellinhalt, nicht nur die Zellwände, rot gefärbt wurde. Diese Beobachtungen gelten vor allem für die Epidermiszellen und das unverholzte Endokarp. In der Subepidermis wurden die Zellwände zuerst verdickt. Die Ähnlichkeit mit einem Plattenkollenchym war offensichtlich (Esau, 1965). Dort, wo mehrere Zellen zusammenstossen, bildeten sich besonders breite Wandstellen, deren Interzellularsubstanz mit Rutheniumrot intensiv angefärbt wurde. Hier fand man immer starke Peroxydaseaktivität. Ähnliches ist auch im Parenchym und im primären Phloem aufgefallen. Solche Einlagerung von pektinartigen Substanzen in Kollenchyminterzellularen wurden von Majumdar und Preston (1941) beschrieben. Im Parenchym wurden stellenweise Zellwände gefunden, die unscharf gegen die Interzellularen abgegrenzt waren.

Dass die mit Rutheniumrot angefärbten Strukturen wirklich Pektin oder pektinähnliche Stoffe (evtl. Protopektin) darstellen, wurde mit Pektinase wahrscheinlich gemacht. Die Zellwände wurden zuerst mit Rutheniumrot stark angefärbt und dann unter dem Mikroskop mit Pektinase behandelt (2 mg/ml). Nach etwa 60 Minuten war die Rutheniumrotfärbung bis auf kleine, linsenförmige Stellen der Mittellamelle verschwunden. Die Zellwandkonturen wurden unscharf, und das umliegende Wasser verfärbte sich rot. Ähnliche Beobachtungen wurden mit Gewebeklötzchen gemacht.

Es scheint, dass die Peroxydase beim Pektinstoffwechsel oder allgemein beim Matrixstoffwechsel der Zellwand eine wichtige Rolle spielt.

In diesem Zusammenhang sind die Befunde von Carré und Horne über Pektine in Äpfeln aufschlussreich. An den Wänden wurden Papillen, Kugeln und sichelförmige Einbuchtungen gefunden, die intensiv mit Rutheniumrot angefärbt wurden. In Interzellularenecken konnte ein Anschwellen des Pektins beobachtet werden. Dass für diese Vorgänge Enzyme, wahrscheinlich Esterasen, in Frage kommen könnten, wurde verschiedentlich vermutet (Ulrich, 1952; Carré und Horne, 1927).

Die «Pektinstrukturen», wie sie von Carré und Horne zeichnerisch wiedergegeben wurden, zeigen eine auffallende Übereinstimmung mit der gefundenen Peroxydaselokalisierung. Ob Peroxydase am Pektinstoffwechsel beteiligt ist, kann nicht entschieden werden. Eine «Lockerung» der Interzellularsubstanz kann entweder Voraussetzung für die Einlagerung von Pektin sein oder einfach eine bessere Anfärbung durch Rutheniumrot verursachen (vgl. Kap. 4.10.5).

4.8 Peroxydase in den Zellwänden

Mit vier Reagenzien wurde in den Mittellamellen und in der Interzellularsubstanz auffallende Peroxydaseaktivität gefunden. In früheren histochemischen Arbeiten werden Lokalisierungen in den Zellwänden wohl erwähnt, aber meistens als Artefakte oder Pseudoperoxydasereaktion aufgefasst (van Fleet, 1959, 1962). Da die vorliegenden Ergebnisse diese Ansicht nicht bestätigen, soll untersucht werden, ob Enzyme, insbesondere ob Peroxydase durch andere Methoden in den Zellwänden gefunden wurde. Nach Newcomb (1963) und Albersheim (1965) wurden in primären Zellwänden verschiedene Enzyme, unter anderem auch Peroxydase, gefunden. Obwohl

nicht bewiesen ist, dass alle Enzyme auch in der intakten Zellwand vorhanden sind, wird nicht bezweifelt, dass in vivo Enzyme in der Zellwand tätig sind (Setterfield und Bayley, 1961; Albersheim, 1965). Die mehrfach in der Zellwand festgestellten Proteine können diese Auffassung nur bestätigen (Setterfield und Bayley, 1961). Siegel (1955) konnte mit gewaschenen Zellwänden aus Eugenol und H_2O_2 «Lignin» synthetisieren. Manche Inhibitoren, welche die Ligninsynthese verminderten, hemmten auch die Peroxydase (Siegel, 1955). Diese Befunde lassen ebenfalls eine innige Koppelung der Peroxydase mit Zellwandsubstanzen vermuten.

Ein Blick auf die Vorgänge bei der Mittellamellenbildung im Phragmoplast (Albersheim, 1965) zeigt, dass das endoplasmatische Reticulum und die Ribosomen bei der Entstehung der neuen Zellwand eine entscheidende Rolle spielen (Porter und Machado, 1959, nach Albersheim, 1965; Newcomb, 1963; Wardrop, 1962). Whaley u.a. (1959) (nach Newcomb, 1963) haben in der Zellwand Fragmente des endoplasmatischen Reticulums gefunden.

Vielleicht gelangen die Enzyme schon bei der Entstehung der Mittellamelle im Phragmoplast in diese Wandbestandteile.

In Kollenchyminterzellularen werden pektinartige Stoffe wahrscheinlich durch die bestehende Zellwand eingelagert (Majumdar und Preston, 1941). Auch in Zellkulturen wurde festgestellt, dass Polysaccharide durch die Zellwand ins Nährmedium gelangen können (G. Becker u.a., 1963, nach Albersheim, 1965). Es ist möglich, dass die Peroxydase, welche in Kollenchyminterzellularen lokalisiert ist, nicht nur dem Enzym entspricht, welches bei der Entstehung der Mutterzelle eingelagert wird, sondern während der Einlagerung der Interzellularsubstanz mit anderen Stoffen aus dem membranogenen Plasma in die Interzellularsubstanz gelangt (Newcomb, 1963; Wardrop, 1962). Auf gleiche Art könnte die Peroxydase auf die Oberfläche von Pektinpapillen an den proliferierenden Zellen im Kerngehäuse der Äpfel «diffundieren». Strauss und Campbel (1963) (nach Varner, 1965) haben Gewebekulturen sechs verschiedener Pflanzenarten auf Enzymsekretion geprüft. Sie haben gefunden, dass nebst anderen Enzymen auch Peroxydase abgegeben wurde.

Es sind bisher keine Anhaltspunkte bekannt, die für eine Synthese von Makromolekülen beziehungsweise Enzymen in der Zellwand selbst sprechen (Albersheim, 1965; Newcomb, 1963).

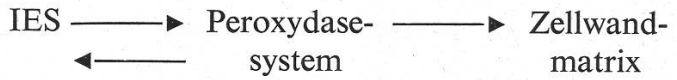
Nach Scott und Lewis (1953) nimmt während der Interzellularenbildung die Anzahl der Tüpfelfelder ab, wobei Plasmodesmenmaterial in die Zellwand gelangen kann (Wardrop, 1962; Esau, 1965). Vielleicht kommen auf diese Art Enzyme in die Zellwände und Interzellularsubstanzen (Newcomb, 1963). Möglicherweise beginnt an diesen Stellen die Anschwellung der Mittellamelle. Den Plasmodesmen wird von Scott und Lewis eine grosse Bedeutung bei Zellwandwachstum und Verdickung zugesprochen. In diesem Zusammenhang ist die intensive Reaktion der Tüpfel interessant, welche mit AAC und Nadi in der Zwiebelepidermis und in Äpfeln erhalten wurde.

4.9 Peroxydase und Zellwandmetamorphose

4.9.1 Peroxydase und Indol-3-Essigsäure

Wenn die Peroxydase den Zellwand- beziehungsweise Mittellamellenstoffwechsel entscheidend beeinflusst, muss sie auch am Zellwachstum beteiligt sein. Hier sind die

Beobachtungen verschiedener Autoren aufschlussreich, wonach IES (Indol-3-Essigsäure) die Peroxydaseaktivität steigert oder sogar induziert (Jensen, 1955; Andreae und Andreae, 1953, nach Siegel, 1955; Galston und Hillmann, 1961). Dass IES die Plastizität der Zellwände erhöht, wurde verschiedentlich berichtet (Setterfield und Bayley, 1961; Thimann und Leopold, 1955; Frey-Wyssling, 1959). Nach Heyn (1940) (nach Frey-Wyssling, 1959) wird durch IES die Hydratation der Membranstoffe geändert. Dabei wird vor allem die Konsistenz der Zellmatrix betroffen. Diese bestimmt aber massgebend das Zellwachstum (Albersheim, 1965). Es ist nun denkbar, dass IES diese Vorgänge nicht selbst verursacht, sondern lediglich das Peroxydasesystem aktiviert, welches seinerseits durch Oxydationsvorgänge die Hydratisierung und damit verbunden die Plastizierung der Zellwand verursacht. Dafür spricht auch die grosse Wirkung sehr kleiner Auxinkonzentrationen. Nach Frey-Wyssling (1959) könnten diese kleinen Konzentrationen durch direkten Einfluss auf die Zellwände niemals so grosse Effekte verursachen. Die möglichen Zusammenhänge gibt nachstehendes Schema wieder:



Mehrfach wird berichtet, dass Peroxydase als IES-Oxydase wirkt (Jensen, 1955; Galston u.a., 1953; Galston und Dalberg, 1954; Galston und Hillmann, 1961). Möglicherweise kann durch Rückkoppelung IES inaktiviert werden, was wiederum die Peroxydaseproduktion beeinflussen würde.

Die Beobachtungen, dass Zwergformen höhere Peroxydaseaktivität zeigen als normalwüchsige Pflanzen gleicher Art (McCune und Galston, 1959), dass Zwergwuchs durch Gibberellin aufgehoben wird und parallel dazu die Peroxydaseaktivität abnimmt, spricht gegen eine Enzyminduktion durch diesen Wuchsstoff. Hayashi, Murakami und Matsunake (nach McCune und Galston, 1959) konnten mit Guajacol als Substrat eine Zunahme der Peroxydaseaktivität bei gibberellinbehandelten Pflanzen beobachten. McCune und Galston (1959) wiederholten die Versuche, indem sie Guajacol statt Pyrogallol als Substrat verwendeten. Sie konnten die Befunde von Hayashi und anderen bestätigen. Sie folgerten, dass die Substratspezifität der Peroxydase durch Gibberellin so verändert wird, dass die Aktivität zu Pyrogallol sinkt, diejenige zu Guajacol zunimmt. Im Zusammenhang mit vorliegender Arbeit scheint es nicht ausgeschlossen, dass mit Guajacol und Pyrogallol zwei verschiedene Peroxydasen nachgewiesen werden und dass möglicherweise durch Gibberellin und andere Wuchsstoffe die Bindung der Peroxydase an Zellwandsubstanzen verändert wird. Wenn mit Gewebehomogenaten, von denen die Zellwandfraktion abgetrennt wurde, gearbeitet wird, muss eine Änderung der Aktivität im Zentrifugat keine effektive Änderung der Enzymaktivität bedeuten.

4.9.2 Peroxydase und Streckungswachstum

Bekanntlich ist für das Streckungswachstum Sauerstoff notwendig (Frey-Wyssling, 1959). KCN hemmt die Wirkung von IES (Setterfield und Bayley, 1961). Diese Hemmungsreaktionen können sehr gut mit obiger Hypothese in Einklang gebracht werden. Danach würde durch Sauerstoffausschluss die Peroxidproduktion unterbunden, durch KCN hingegen die Peroxydase direkt gehemmt. Natürlich dürfte

auch die herabgesetzte Atmung dazu beitragen (Frey-Wyssling, 1959), aber da die Wasseraufnahme weitgehend osmotisch erfolgt (Kramer, 1955; Wardrop, 1962), müsste die Turgeszenz der Zelle noch einige Zeit nach der Atmungshemmung das Streckungswachstum ermöglichen. Nach Frey-Wyssling (1959) erfolgt die Hemmung des Streckungswachstums tatsächlich nicht streng symbat mit der Atmungshemmung, weshalb zwischen Atmung und Streckungswachstum keine direkte Beziehung gefolgert werden kann.

Dass EDTA in höheren Konzentrationen das Wurzelwachstum hemmt, gleichzeitig aber auch die Peroxydaseaktivität herabsetzt, dürfte ebenfalls auf einen entscheidenden Einfluss der Peroxydase bei der Zellstreckung hinweisen (van Fleet, 1959).

4.9.3 Induktion der Peroxydase durch Zellwandspannungen

Wie aus eigenen Beobachtungen an Äpfeln und anderen Geweben sowie aus Beobachtungen von Wardrop und Scaife (1956) im Streckungsholz von Eukalyptus gefolgert werden kann, induzieren möglicherweise Zellwandspannungen die Peroxydaseaktivität des membranogenen Plasmas und der Zellwände. In parenchymatischen Geweben dürften in der Mittellamellensubstanz der Zellkanten spätestens nach Überschreiten des vierzehnflächigen Polyeders (Frey-Wyssling, 1959; Esau, 1965) solche Spannungszonen entstehen. Vor allem im Apfelparenchym und in der inneren und äusseren Leitbündelscheide wurden sehr intensive Peroxydasereaktionen gefunden. Ähnliche Beobachtungen konnten in der Apfelsubepidermis gemacht werden, worin eine tangentiale Streckung angenommen werden kann. Parenchymatische Zellen, welche an prosenchymatisches Gewebe grenzen, ergaben im allgemeinen stärkere Reaktion der Mittellamellen und Interzellularsubstanz als das übrige Parenchym.

4.9.4 Einfluss des Cytoplasmas auf den Zellwandstoffwechsel

Das membranogene Plasma scheint sehr innig mit der Zellwand verbunden zu sein. Mit dem Nadireagenz, mit AAC und Benzidin wurde immer wieder eine besondere Reaktion des Plasmas in unmittelbarer Wandnähe beobachtet. In Äpfeln war in den Ecken der grossen Interzellularen die Peroxydaseaktivität sehr gesteigert. Es scheint, dass der Zellwandstoffwechsel von zwei Seiten her erfolgt, nämlich von der Interzellular- und Mittellamellensubstanz sowie vom membranogenen Plasma her (Frey-Wyssling, 1959). Erst in älteren Apfelzellen wurde die innige Bindung des Plasmas an die Zellwand aufgehoben, so dass dieses sich stellenweise von der Zellwand löste. Ein Zellwand-Cytoplasmakomplex im Sinne von Frey-Wyssling und Mühlethaler konnte jedoch bisher elektronenmikroskopisch nicht bestätigt werden (Newcomb, 1963; Wardrop, 1962; Esau, 1965).

Die Poren der Siebplatten entstehen durch Auflösen der Zellwand, ohne dass das Plasmalemma reisst (Albersheim, 1965). Dabei wird die Gerüstsubstanz aufgelöst. Die Fibrillen werden auf die Seite geschoben (Frey-Wyssling, 1959).

Die sogenannte Tertiärmembran (membranogenes Plasma) (Frey-Wyssling, 1959) scheint aber trotzdem beim Zellwandstoffwechsel eine wichtige Rolle zu spielen.

Histochemisch findet man, wie gesagt, in dieser Zone eine auffällige Peroxydaseaktivität (Tafel 1, Abb. 6; Tafel 3, Abb. 8).

In Äpfeln sowie in der Zwiebelepidermis wurde eine intensive Reaktion der Tüpfel beobachtet. Möglicherweise ist der Kontakt zwischen Wand und Plasma der Plasmodesmen wegen gerade hier sehr innig (Scott und Lewis, 1952), was die gesteigerte Reaktion erklärt.

4.9.5 Mittellamelle und Zellwandmatrix

Bemerkenswert sind mehrere elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung von sekundären Wandstrukturen. Danach sind die ersten Anzeichen für die Spiral- und Ringverdickungen der Tracheen in der Mittellamelle sichtbar (Hepler und Newcomb, 1965, nach Albersheim, 1965; Newcomb, 1963).

Es darf wohl als gesichert gelten, dass von der Mittellamelle und von der Interzellularsubstanz aus wichtige enzymatische Einflüsse den Zellwandstoffwechsel und damit die Zellwanddifferenzierung beeinflussen. Die Peroxydase dürfte dabei eine entscheidende Rolle spielen. So könnte die weite Verbreitung dieses Enzyms in pflanzlichen Geweben erklärt werden.

Nach der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese «lockert» die Peroxydase die Interzellularsubstanz, so dass sich die Zellen ihrer Oberflächenspannung und Elastizität entsprechend abrunden können (Frey-Wyssling, 1959). Dabei reisst offenbar die Interzellularsubstanz auseinander. Reste davon haften noch an den Interzellularwänden. Dies dürfte sich in allen schizogen entstehenden Interzellularen abspielen, wofür das Apfelparenchym und das Lückenkollenchym von Petasites gute Beispiele sind (vgl. Fig. 3). Im Apfel scheint auch die Mittellamellensubstanz an flachen Wandstellen durch Dehnung oder Stoffeinlagerung oder durch beides linsenartig anzuschwellen. Dass im Apfel ganze Zellwände aufgelöst werden, scheint unwahrscheinlich. Von Küster (1927) (nach Frey-Wyssling, 1959) wurden solche Beobachtungen in Perikarpien mitgeteilt. Sicher spielen sich aber während der Fruchtentwicklung im Apfel sehr mannigfaltige Auf- und Abbauvorgänge der Zellwandmatrix ab (Carré und Horne, 1927). Die Peroxydase scheint gerade in diesem Gewebe bei solchen Umwandlungen eine entscheidende Rolle zu spielen. Beim Reifen vieler Früchte dürften von der Peroxydase katalysierte Vorgänge zur Auflösung der Mittellamelle führen. Die Zellen werden gegeneinander verschiebbar und runden sich ab, die Frucht wird mehlig oder weich (Frey-Wyssling, 1959; Carré und Horne, 1927). Dass diese Vorgänge von Enzymen katalysiert werden, ist sehr wahrscheinlich (Roelovsen, 1954, nach Frey-Wyssling, 1959; Carré und Horne, 1927). Vermutlich handelt es sich dabei aber nicht nur um Pektinase, sondern um ein Zusammenwirken mehrerer Enzyme, wobei die Peroxydase eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Die Peroxydase muss den Abbau beziehungsweise Aufbau nicht direkt katalysieren. Sie könnte auch andere Enzyme aktivieren oder das Substrat für den Abbau beziehungsweise Aufbau durch diese vorbereiten. Die Schwellung der Tracheenquerwände vor ihrer Auflösung (Esau, 1965) könnte Voraussetzung für ihren Abbau sein und vielleicht von der Peroxydase katalysiert werden. Genauere Beobachtungen hierüber liegen nicht vor.

Wenn im Verlaufe des Flächenwachstums die Grundsubstanz in den Primarwänden durch Intussusception vermehrt wird (Frey-Wyssling, 1959; Esau, 1965),

könnte eine Lockerung (Plastizierung) des Pektin- und Hemizellulosegerüstes der Stoffeinlagerung vorausgehen.

Von besonderer Bedeutung wird die Peroxydase in prosenchymatischen Geweben sein. Beim Interpositionswachstum (intrusive growth) (Frey-Wyssling, 1959) der Bast-, Holz- und eventuell auch der Kambium- und Kollenchymfasern, welches durch Spitzenwachstum vor sich gehen dürfte (Esau, 1965), ist eine Plastizierung der Mittellamelle oder der ganzen Membran sehr wichtig (Frey-Wyssling, 1959). Die Zellspitzen könnten dann aneinander vorbeigleiten (gleitendes Wachstum). Es dürfte kaum zufällig sein, dass gerade in diesen Geweben die Reaktion der Peroxydase in der Mittellamellensubstanz sehr auffallend ist. Die gesteigerte Reaktion in der Differenzierungszone von Xylem und Phloem, im Protoxylem und Protophloem könnte ähnlich erklärt werden. Die plastischen Eigenschaften der Kollenchymzellwände könnten mit der in diesen beobachteten intensiven Peroxydasereaktion zusammenhängen.

Auch wenn symplastisches «multinet»-Wachstum vorliegt, müssen die Zellulosefibrillen in der Matrix gegeneinander verschoben werden können (Albersheim, 1965; Frey-Wyssling, 1959). Dies dürfte nur dank einer Konsistenzänderung des Grundstoffes möglich sein (Setterfield und Bayley, 1961). Nach Frey-Wyssling (1959) sind zwischen den spärlich vorhandenen Zellulosefibrillen der Primärwand keine Haftpunkte ausgebildet, so dass beim Flächenwachstum nicht das Fibrillengeflecht, sondern die Gerüstsubstanz plastiziert werden muss. Vielleicht wird beim Teilungswachstum (Frey-Wyssling, 1959) durch ähnliche Vorgänge an den Stellen späterer Interzellularen die Matrix der Mutterzellwand plastiziert oder ganz aufgelöst (Esau, 1965). Die Peroxydasereaktion an diesen Stellen ist jedenfalls sehr auffällig.

Es ist gut möglich, dass die Peroxydase aufgrund ihres Einflusses auf die Zellwände die Gewebedifferenzierung beschleunigen kann (Jensen, 1955). Hier wird vor allem eine beschleunigte Interzellularenbildung mit gesteigerter Zellisolierung vermutet, Solche Vorgänge könnten auch den Zellwandstoffwechsel entscheidend beeinflussen. so dass frühzeitig Sekundärwände abgeschieden werden. Dies wiederum könnte Zwergwuchs verursachen. Dass Peroxydase IES oxydiert und dadurch deren Wirksamkeit ausschaltet, steht dazu nicht im Widerspruch (Jensen, 1955; Galston u.a., 1953; Galston und Dalberg, 1954).

Die intensive Reaktion in meristematischem Gewebe könnte vielleicht mit der Synthese von Zellwandmaterial erklärt werden, da auch in meristematischen Zellen eine permanente Synthese dieser Stoffe erfolgt (Albersheim, 1965; Frey-Wyssling, 1959; Newcomb, 1963; Setterfield und Bayley, 1961). Ein grosser Teil des Zellstoffwechsels dürfte in embryonalen Zellen diesem Vorgang dienen, weshalb das gesamte Plasma starke Peroxydaseaktivität zeigt.

Über die chemischen Vorgänge, welche bei den beschriebenen Zellwanddifferenzierungen von der Peroxydase katalysiert werden, ist nichts bekannt. Durch Oxydationsvorgänge könnten neue Hydroxyl-, Carbonyl- oder Carboxylgruppen entstehen. Durch Veresterung der Carboxylgruppen mit Methanol würde zum Beispiel die Hydratationsfähigkeit erhöht (Frey-Wyssling, 1959).

Da Pektinstoffe leicht oxydiert werden können, so dass das Gewebe dabei mazeriert wird, ist man geneigt, eine entsprechende Wirkung der Peroxydase anzunehmen. Mutmassungen über die genaue Peroxydasekatalyse bei der Metamorphose der Pek-

tine und Hemizellulosen sind heute aber kaum möglich. Ob ein hydroxyprolinreiches Protein bei solchen Vorgängen eine besondere Rolle spielt, bleibe dahingestellt (Lamport, 1963, nach Albersheim, 1965). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass bei der Oxydation des Prolins zum Hydroxyprolin, welche in situ erfolgt (Newcomb, 1963), die Peroxydase beteiligt ist. Ginzburg (1958) (nach Setterfield und Bayley, 1961) vermutet, dass die Zellen von einem komplexen Stoff, bestehend aus Protein und anderen von Zellulose abweichenden Substanzen, zusammengekittet werden.

4.9.6 Peroxydase- und Ligninsynthese

Die Ligninsynthese dürfte, wie verschiedenen Arbeiten zu entnehmen ist (Siegel, 1955; Jensen, 1955; Freudenberg, 1952), ein Stoffwechselvorgang sein, bei dem die Peroxydase eine entscheidende Rolle spielt. Um diesen Vorgang zu studieren, sind Äpfel günstige Objekte. Vor allem während der Entwicklung des Endokarps konnte der Zusammenhang zwischen Lignifizierung und Peroxydaseaktivität studiert werden. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Peroxydasereaktion in den Endokarpzellen ausgesprochen intensiv ausfällt, und zwar lange vor einer positiven Ligninreaktion mit Phloroglucin. Wenn die Phloroglucinreaktion für Lignin auch nicht ganz spezifisch ist (Frey-Wyssling, 1959), dürfte sie hier vollkommen genügen, da sie zunächst negativ ausfällt. Es ist kaum anzunehmen, dass die Ligninkonzentration zu klein war, um in frühen Entwicklungsstadien nachgewiesen zu werden. Die Peroxydase dürfte in diesem Gewebe zuerst eine andere Funktion haben. Da die Endokarpien in jungen Äpfeln durch Flächenwachstum die Samenfächer stark vergrössern, wird angenommen, dass die Peroxydase zumindest in frühen Entwicklungsstufen die gleiche Bedeutung hat, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde. Wardrop und Scaife (1956) haben in Zugholzjahrringen starke Peroxydaseaktivität der Zellwände ohne gleichzeitige Lignifizierung gefunden. Sie vermuten, dass die Ligninvorstufen fehlen, weshalb die Verholzung ausbleibt. Dies bedeutet aber nicht, dass die Peroxydase in diesem Gewebe jetzt keine Bedeutung hat. Ihre Aktivitätssteigerung macht im Gegenteil eine besondere Aufgabe dieses Enzyms wahrscheinlich. Im Kapitel 4.9.3 wurde eine Streckung der Zellwände als Induktion der starken Peroxydasereaktion angenommen.

Im Xylem wurde in dieser Arbeit oft eine intensive Reaktion der Mittellamelle zwischen den Tracheen gefunden. Nach Esau (1965) bleiben in den Gefässen gerade diese Strukturen unverholzt.

Es ist also durchaus möglich, dass die Peroxydase nur unter besonderen Umständen bei der unmittelbaren Ligninsynthese mitwirkt. Die Lignineinlagerung erfolgt vorwiegend in die Zellwandmatrix. Sie beginnt im allgemeinen in der Mittellamelle und breitet sich dann in Richtung Zellumen aus (Albersheim, 1965; Frey-Wyssling, 1959; Esau, 1965). Nach Frey-Wyssling (1959) geht der Lignineinlagerung eine Schwellung der Zellwände voraus. Die Peroxydase könnte auch hier durch «Lockerung» der Matrix die Zellwand für die Ligninsynthese vorbereiten. Dadurch würde auch die intensivere Lignifizierung der Mittellamelle in Libriformfasern verständlicher (Tafel 6, Abb. 7 und 8).

Ähnliche Wirkung dürfte die Peroxydase im Zugholz (tension wood) (Esau, 1965) haben. Bayley und Kerr (1937) (nach Esau, 1965) beschreiben die Zellwände die-

ses Gewebes als stark quellend (Frey-Wyssling, 1959) hygroskopisch und gelatinös und beim Trocknen stark schrumpfend. Dass zwischen den Fasern und Tracheiden Interzellularen entstehen, so dass die Zellen sich abrunden (Esau, 1965) kann ebenfalls mit der gesteigerten Peroxydasereaktion in Zusammenhang gebracht werden. In dieses Bild passt auch die Beobachtung am Petasitesxylem, wonach die kambiumnahen Ring- und Spiralverdickungen der Tracheen starke Peroxydasereaktion ergaben, aber keine Ligninreaktion zeigten. Umgekehrt verhielten sich aber die älteren Tracheen. Diese reagierten intensiv mit Phloroglucinsalzsäure, ergaben aber negative Peroxydasereaktion. Nach Hypothese erfolgt also zuerst die Wandverdickung, wofür Peroxydase notwendig ist, worauf die Lignineinlagerung einsetzt (Tafel 6, Abb. 7 und 8).

Wie die Vielzahl der Peroxydasereagenzien zeigt, kann Peroxydase die Oxydation verschiedener Verbindungen katalysieren. Es ist deshalb möglich, dass mit dem Auftreten der Ligninvorstufen die oxydative Polymerisation auch von der Peroxydase katalysiert wird. Interessant ist, dass in den Endokarpien etwa gleichzeitig mit der Lignifizierung auch ein Anstieg der Polyphenoloxydasereaktion mit Brenzkatechin einsetzte (Tafel 9, Abb. 5, 7 und 8). Es sei noch darauf hingewiesen, dass zu diesem Zeitpunkt auch ein Anstieg der Cytochromoxydase in diesem Gewebe festgestellt wurde. Nach Freudenberg (1952) kann auch mit Phenolase aus Coniferylalkohol die Synthese ligninartiger Stoffe erhalten werden (Mason, 1955). Dieses Enzym scheint jedoch weniger wirksam zu sein als Peroxydase.

4.10 Peroxydase und Polyphenoloxydase

Van Fleet (1959) hat gefunden, dass in älteren Zellen Phenole, Naphthole, Anthole und Phenolasen zunehmen, die Peroxydase aber gleichzeitig abnimmt. Es wurden deshalb Gefrierschnitte von Äpfeln 2 Stunden bei 37 °C in einer 0,2% Brenzkatechinlösung inkubiert. Die Schnitte wurden anschliessend für mehrere Stunden, ohne zu spülen, in Leitungswasser übertragen, worauf sie sich intensiv färbten. Wahrscheinlich ging die Oxydation in sauerstoffreichem Wasser weiter. Wenn mit 10^{-2} M DIECA-Lösung (Diäthyldithiocarbaminat) inkubiert wurde, blieb die Reaktion ganz aus (Tafel 9, Abb. 8). Die so behandelten Schnitte wurden mit solchen, die mit Nadi auf Peroxydase geprüft waren, verglichen. Die Beobachtungen von van Fleet konnten nirgends bestätigt werden. In den Epidermiszellen junger Früchte war eine stärkere Polyphenoloxydase in der äusseren Zellhälfte zu beobachten (Tafel 9, Abb. 6). Die Peroxydasereaktion mit Nadi ergab eine umgekehrte Verteilung der Reaktionsprodukte, was aber sehr wahrscheinlich ein Adsorptionsartefakt ist. Im Verlaufe der Entwicklung stiegen Peroxydase- und Polyphenoloxydasereaktion überall etwas an, besonders aber in der Subepidermis. Die Epidermis behielt ihre intensive Reaktion. Auf die Beobachtungen in Endokarpien wurde bereits hingewiesen. Genauere Untersuchungen über Phenoloxydasen wurden nicht vorgenommen.

4.11 Zusammenfassung

a) Mit vier Methoden wurden in verschiedenem Pflanzenmaterial grundsätzlich gleiche Peroxydaselokalisationen gefunden. Ein fünftes Reagenz ergab auffallend abweichende Enzymverteilungen.

b) Durch Hitzeinaktivierung, Azidbehandlung und Inkubation ohne Wasserstoffperoxid wurde wahrscheinlich gemacht, dass für die gefundene Enzymlokalisierung tatsächlich Peroxydase verantwortlich ist.

c) Die Möglichkeit, dass zwei Peroxydasen mit verschiedener Substratspezifität vorhanden sind, wurde erwogen.

d) Gewebe, Zellen und Substanzen, die meistens sehr peroxydasereich befunden wurden, sind: Epidermis und Subepidermis, Kollenchym, Phloem, Kambium, Xylemparenchym, Primordialgewebe, Sklereiden und Sklerenchymzellen während ihrer Differenzierung, Interzellularsubstanzen in der Mittellamelle, in Interzellularen und Interzellularenecken.

e) Eine auffallende Übereinstimmung der Stellen stärkster Peroxydasereaktion mit den Strukturen, welche mit Rutheniumrot intensiv angefärbt werden, wurde beobachtet. Es wird ein besonderer Zusammenhang zwischen Pektin- beziehungsweise Hemizellulosestoffwechsel und Peroxydaseaktivität vermutet.

f) Die Wahrscheinlichkeit, Peroxydase in der Zellwandmatrix zu finden, wurde durch Literaturvergleiche bestätigt.

g) Die Hypothese, wonach Peroxydase zusammen mit anderen Enzymen an der «Lockerung» der Zellwandmatrix beteiligt ist und vielleicht von Wandspannungen induziert wird, wurde diskutiert.

h) Die Hauptaufgabe der Peroxydase kann nicht die Ligninsynthese sein.

i) Eine Korrelation zwischen Phenoloxydasen und Peroxydaseverteilung konnte nicht bestätigt werden.

Dank

Meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. H. Wanner danke ich herzlich für seine wohlwollenden Ratschläge und sein Verständnis für meine besonderen Anliegen.

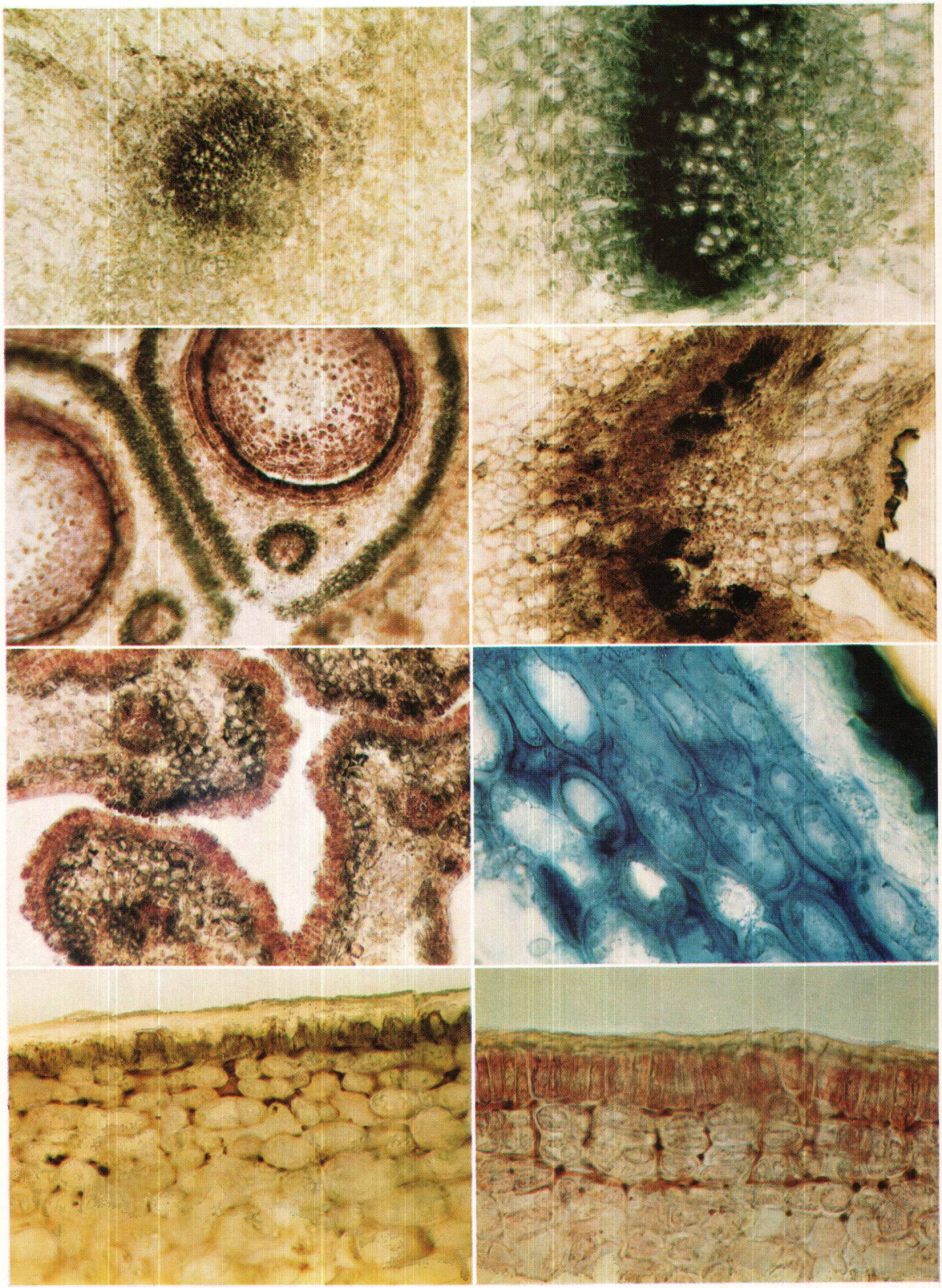
Herrn Dr. H. P. Jaeger, Direktor der Evangelischen Mittelschule in Schiers, wo ich dank reduziertem Lehrpensum meine Arbeit ausführen konnte, danke ich bestens für sein Entgegenkommen.

Zuwendungen aus der Gertrud-Ruegg-Stiftung, der Janggen-Pöhn-Stiftung, aus dem Jacques-Huber-Fonds und kantonale Stipendien haben mir vorliegende Arbeit ermöglicht. Ich danke allen bestens, welche mir zu diesen Beiträgen verholfen haben.

Tafel 1

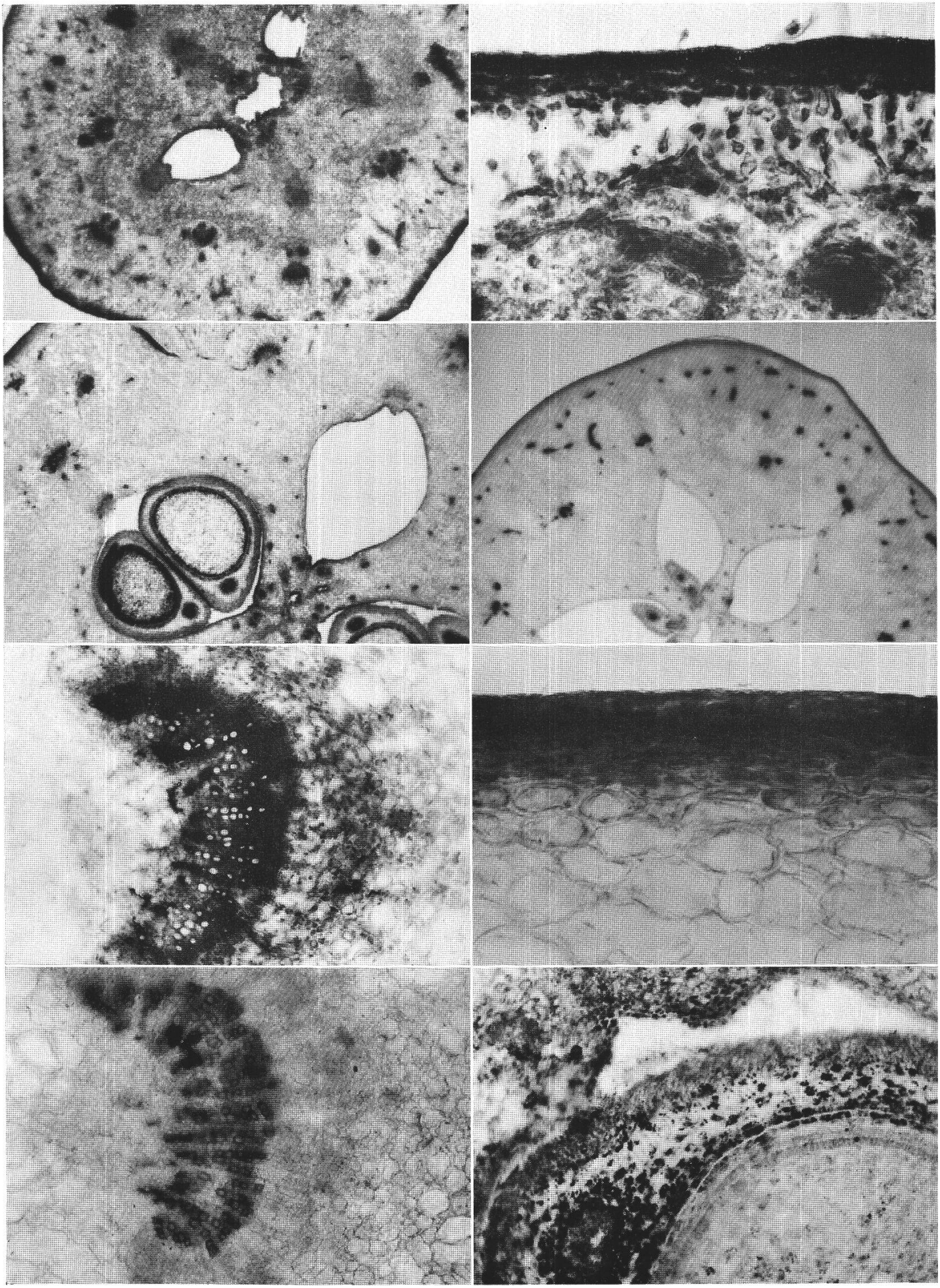
Abb.	Enzym	Reagenz	Versuchs-datum	Ver-grösse-rung	Kommentar
1	Cytochrom-oxydase	A	16. 6. 65	100:1	Perianthleitbündel
2	Cytochrom-oxydase	A	6. 6. 66	200:1	Perianthleitbündel: Auffallend ist die schwarze Farbe der Reaktionsprodukte, verglichen mit Abb. 1 dieser Tafel. Die Reaktion der Differenzierungszonen, des Kambiums und Xylemparenchyms ist sehr intensiv
3	Cytochrom-oxydase	A	25. 5. 67	100:1	Samenanlagen: Rotbraune Reaktionsprodukte sind im Nucellus, im inneren Integument und im Leitbündel zu erkennen. Das äussere Integument reagiert schwächer. Auffallend sind die schwarzen Reaktionsprodukte in der Leitbündelscheide und im äusseren Integumentgewebe (vgl. Tafel 2, Abb. 8)
4	Cytochrom-oxydase	A	25. 11. 65	100:1	Dorsales Karpelleitbündel: Zunahme der Reaktionsintensität nach mehrmonatiger schwacher Aktivität (vgl. Tafel 4, Abb. 1, und Tafel 2, Abb. 4)
5	Cytochrom-oxydase	A	10. 5. 67	150:1	Griffelkanalepithel (stigmatoides Gewebe): Auffallend ist die verschiedene Farbe der Reaktionsprodukte in den verschiedenen Geweben
6	Peroxydase	N	27. 8. 65	400:1	Epidermis und Subepidermis: Typisch ist die intensive Reaktion der Interzellularsubstanz und die kräftige Anfärbung der Kutikula (oben rechts). An den Zellwänden sind dicht aufgeschlossen Reaktionsgranula zu erkennen. Die helle Zone rechts ist vermutlich durch Adsorption der Reaktionsprodukte an die Kutikula entstanden
7	Peroxydase	B pH 6,4	29. 7. 66	200:1	Epidermis und Subepidermis: Intensive Reaktion der Epidermiszellen und der Interzellularsubstanz in der Subepidermis. Man beachte, dass die Kutikula nicht wesentlich angefärbt ist (vgl. Abb. 6 dieser Tafel)
8	Peroxydase	AAC	1. 6. 67	400:1	Epidermis und Subepidermis: Die Übereinstimmung der Lokalisation mit Abb. 7 dieser Tafel und mit Tafel 6, Abb. 4, ist offensichtlich (vgl. Tafel 6, Abb. 3)

Bemerkungen: Wenn im Kommentar zu den Abbildungen keine näheren Angaben gemacht werden, handelt es sich um Apfelgewebe.



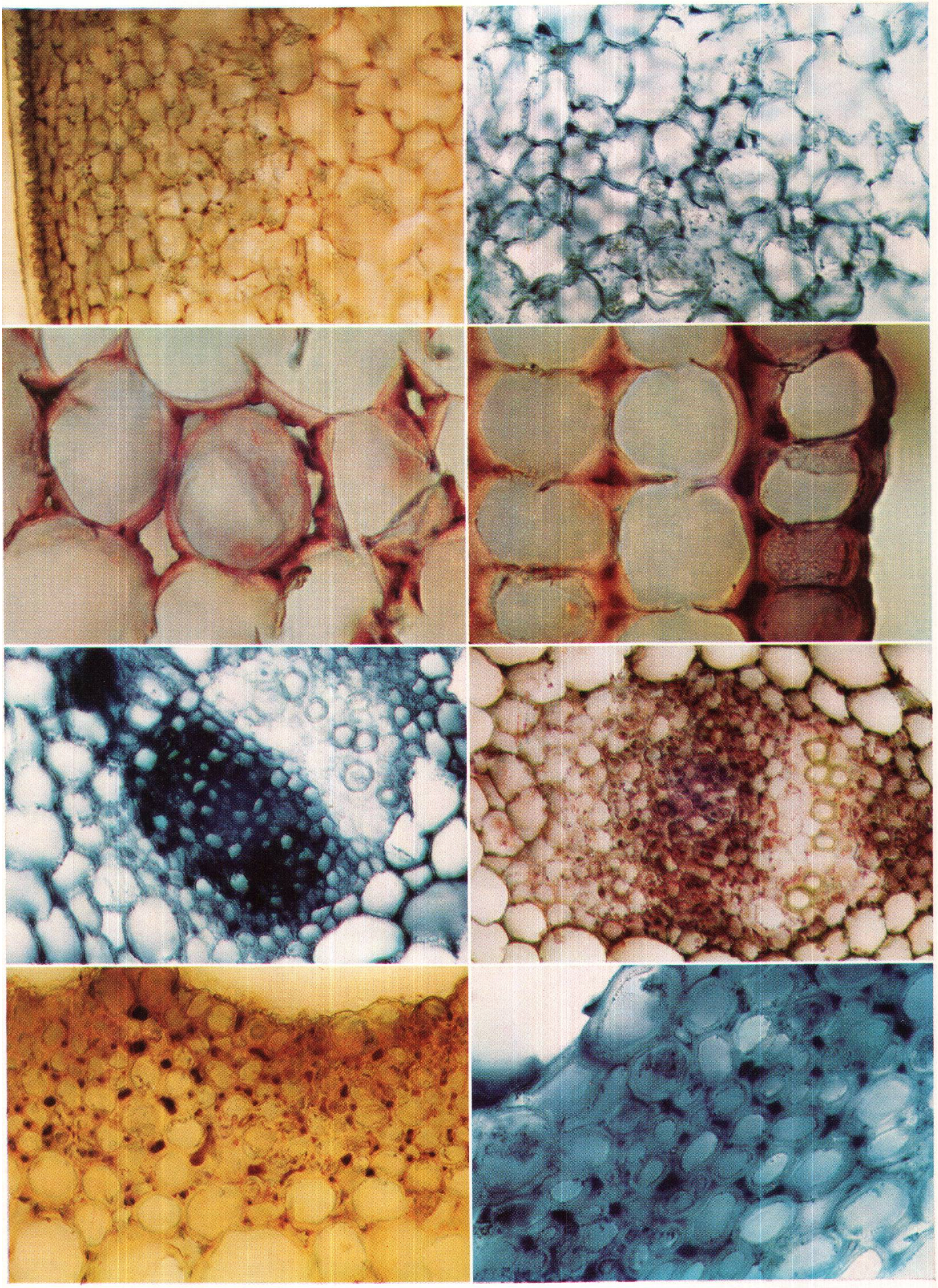
Tafel 2

Abb.	Enzym	Reagenz	Versuchs-datum	Ver-grösse-rung	Kommentar
1	Cytochrom-oxydase	A	23. 5. 66	12,5:1	Junger Glockenapfel: Die Aktivität der Karpell-leitbündel ist nur wenig schwächer als die der Perianthleitbündel. Epidermis und Subepidermis reagieren intensiv (vgl. mit Abb. 2, 3 und 4 dieser Tafel)
2	Cytochrom-oxydase	A	10. 5. 67	150:1	Zellproliferationen in der äusseren Rindenzone: Epidermis und Subepidermis zeigen sehr intensive Reaktion (vgl. Abb. 1 dieser Tafel)
3	Cytochrom-oxydase	A	31. 5. 66	12,5:1	Querschnitt durch einen Apfel: Deutliche Reaktionsabnahme des Parenchyms und der dorsalen Karpelleitbündel, verglichen mit Abb. 1 dieser Tafel
4	Cytochrom-oxydase	A	6. 6. 66	5:1	Apfelquerschnitt: Karpelleitbündel, Parenchym, Epidermis und Subepidermis zeigen nur sehr schwache Reaktion. Typisch ist die auffallend intensive Reaktion der Leitbündel in der Rindenschicht
5	Cytochrom-oxydase	A	25. 11. 65	100:1	Perianthleitbündel: Die Reaktion ist noch auffallend intensiv (vgl. Abb. 7 dieser Tafel)
6	Cytochrom-oxydase	A	21. 12. 65	150:1	Epidermis und Subepidermis: Starker Reaktionsanstieg in diesem Gewebe (vgl. Abb. 4 dieser Tafel)
7	Cytochrom-oxydase	A	25. 11. 65	100:1	Kontrollreaktion mit KCN zu Abb. 5 dieser Tafel. Die Anfärbung der Tracheenwände und der Xylemprimanen muss ein Artefakt sein (vgl. Abb. 5 dieser Tafel)
8		Jod-Jod-kalium	24. 5. 66	100:1	Stärkenachweis mit Jod-Jodkalium. Im äusseren Integument und in den Karpellappen ist auffallend viel Stärke vorhanden. Wo die Cytochromoxydasereaktion intensiv ist (vgl. Abb. 3 dieser Tafel), ist wenig oder keine Stärke eingelagert



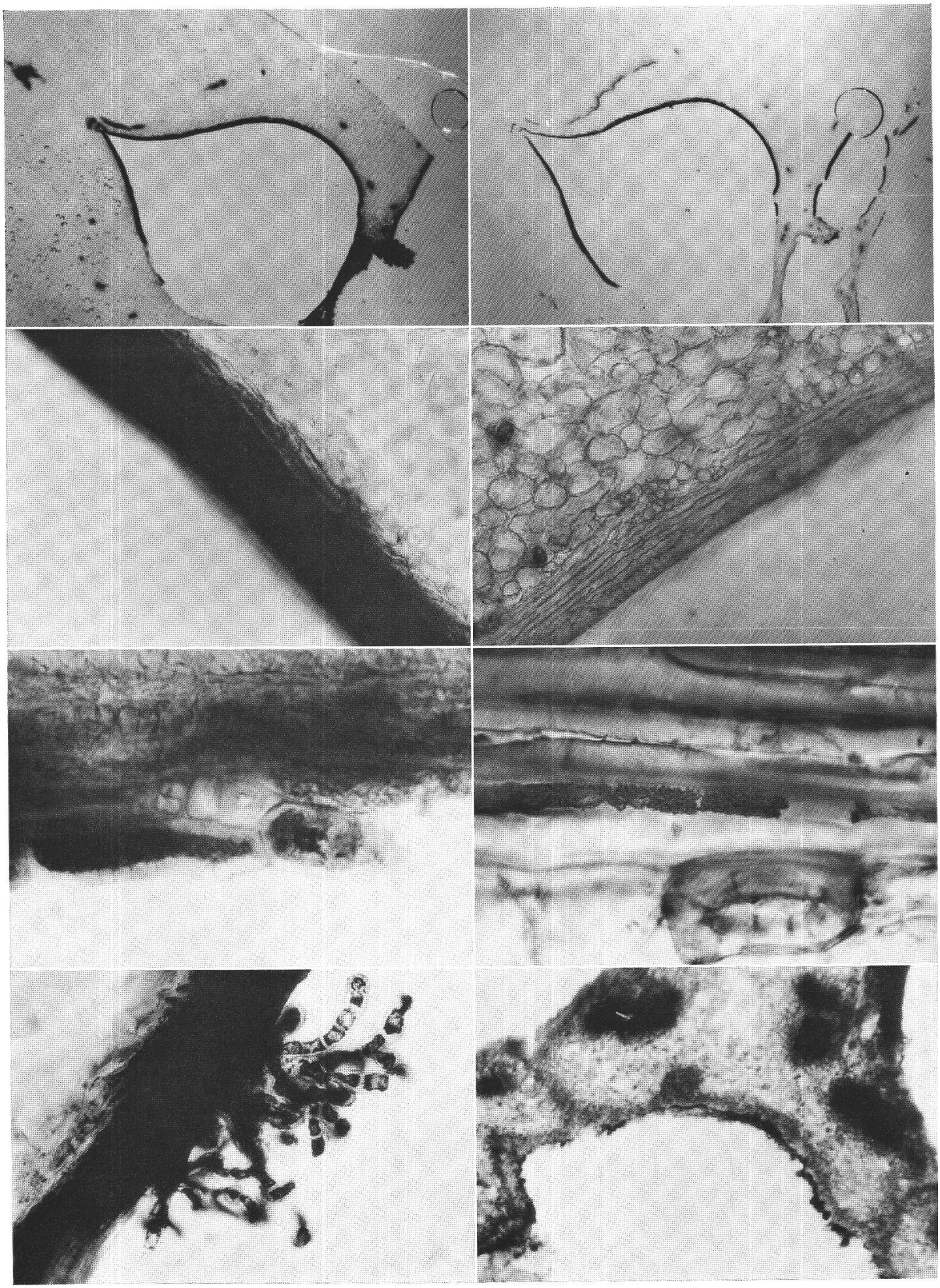
Tafel 3

Abb.	Enzym	Reagenz	Versuchs-datum	Ver-grösse-rung	Kommentar
1	Peroxydase	B pH 6,4	29. 7. 66	200:1	Äussere Rindenschicht: Intensive Reaktion der Interzellularsubstanz in den Ecken der Interzellularen (vgl. Abb. 2 dieser Tafel)
2	Peroxydase	N	29. 7. 66	100:1	Rindenparenchym: Intensive Reaktion der Interzellularsubstanz in den Ecken der Interzellularen (vgl. Abb. 1 dieser Tafel)
3	Peroxydase	AAC	8. 4. 67	600:1	*Petasites albus*-Lückenkollenchym: Intensive Reaktion der Interzellularsubstanz in den schizogen entstandenen Interzellularen
4	Peroxydase	AAC	8. 4. 67	600:1	*Petasites albus*-Epidermis und Kollenchym: Interzellularsubstanz intensiv angefärbt
5	Peroxydase	N	19. 4. 67	300:1	*Petasites albus*-Leitbündel: Das Phloem zeigt sehr starke Reaktion. Das Xylem reagiert auffallend schwach (vgl. Abb. 6 dieser Tafel)
6	Peroxydase	AAC	19. 4. 67	300:1	*Petasites albus*-Leitbündel (vgl. Abb. 5 dieser Tafel sowie Tafel 7, Abb. 1 und 3)
7	Peroxydase	B pH 6,4	29. 7. 66	400:1	Kollenchymatisches Gewebe, welches den Griffelkanal des Apfels umgibt: Intensive Reaktion der Interzellularsubstanz. Die Übereinstimmung mit Abb. 8 dieser Tafel ist offensichtlich
8	Peroxydase	N	29. 7. 66	400:1	Kollenchymatisches Gewebe, welches den Griffelkanal umgibt (vgl. Abb. 7 dieser Tafel). Wie in Tafel 1, Abb. 6, sind auch hier die körnigen Reaktionsprodukte an der Innenseite der Zellwände zu erkennen (membranogenes Plasma?)



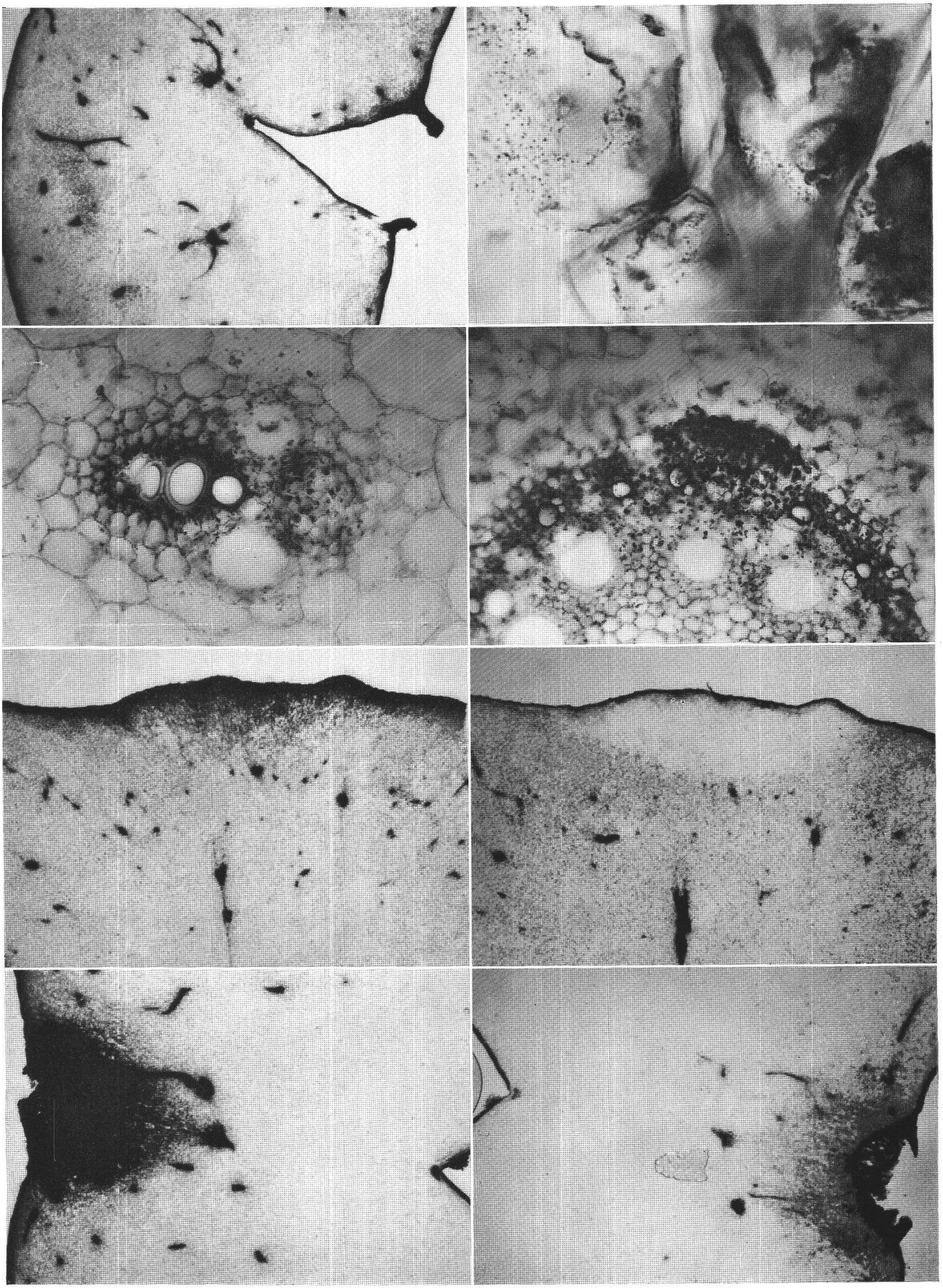
Tafel 4

Abb.	Enzym	Reagenz	Versuchs-datum	Ver-grösse-rung	Kommentar
1	Cytochrom-oxydase	A	28. 7. 66	5:1	Endokarp und Karpellappen: Intensive Reaktion des Endokarpes und der zentralen Karpellgewebe (vgl. Tafel 2, Abb. 4)
2		Phloro-glucin	28. 7. 66	5:1	Ligninnachweis mit Phloroglucin-Salzsäure: Die lignifizierte Zone entspricht der Endokarpschicht mit starker Cytochromoxydasereaktion (vgl. Abb. 1 dieser Tafel)
3	Cytochrom-oxydase	A	10. 8. 65	100:1	Endokarpausschnitt stärker vergrössert
4	Cytochrom-oxydase	A KCN	10. 8. 65	100:1	Endokarp: Kontrollreaktion zu Abb. 3 dieser Tafel. Praktisch vollkommene Hemmung durch KCN
5	Cytochrom-oxydase	A	4. 9. 65	300:1	Sklereiden aus dem Endokarp: Nur der Inhalt der Tüpfel, nicht aber die Zellwände zeigen positive Reaktion
6	Cytochrom-oxydase	A	30. 6. 67	600:1	Stiellängsschnitt: Sklerenchymzelle mit stark aktivem Zellinhalt. Die Granulierung dürfte den Mitochondrien entsprechen
7	Cytochrom-oxydase	A	3. 10. 66	100:1	Zellen, die ins Samenfach proliferieren: Intensive Reaktion
8	Cytochrom-oxydase	A	21. 12. 65	32:1	Karpellappen und Leitbündel; unten Griffelkanal: Intensive Reaktion der Leitbündel und des Randgewebes (vgl. Tafel 2, Abb. 3 und 4)



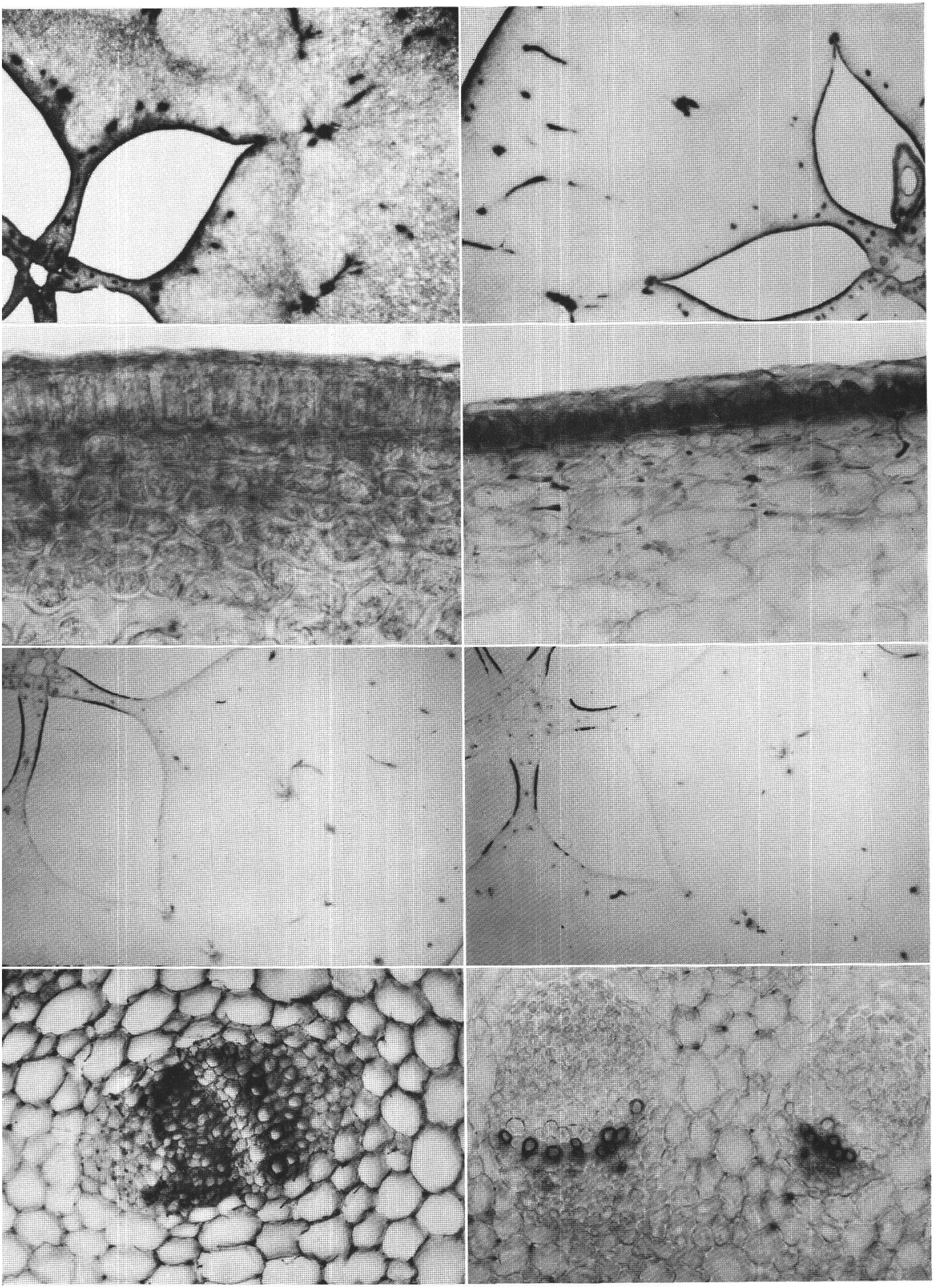
Tafel 5

Abb.	Enzym	Reagenz	Versuchs-datum	Ver-grösse-rung	Kommentar
1	Cytochrom-oxydase	A	5. 9. 66	5:1	Apfel, der am 4.7.66 gepflückt wurde. Allgemein gesteigerte Reaktion (vgl. Tafel 2, Abb. 4)
2	Cytochrom-oxydase	A	16. 8. 66	600:1	Einzelzelle aus dem «frischen» Gewebe von Abb. 5 dieser Tafel. Die feinen Körnchen könnten Mitochondrien sein
3	Cytochrom-oxydase	A		150:1	Querschnitt durch einen jungen Maisstengel. Leitbündel: Gesteigerte Reaktion zeigen die Geleitzellen und besonders das Parenchym um die grossen mittleren Tracheen
4	Cytochrom-oxydase	A		100:1	Querschnitt durch junge Maiswurzel: Intensive Reaktion des meristematischen Gewebes einer Seitenwurzelanlage und des Leitgewebes
5	Cytochrom-oxydase	A	16. 8. 66	5:1	Restliche weisse, «frische» Zone eines mit Paraffin umhüllten Apfels, welche auffallend starke Reaktion ergab (vgl. Abb. 2 und 6 dieser Tafel)
6	Cytochrom-oxydase	A KCN	16. 8. 66	5:1	Kontrollreaktion mit KCN zu Abb. 5 dieser Tafel
7	Cytochrom-oxydase	A	19. 9. 66	5:1	Schorfstelle: Intensive Reaktion der anliegenden Gewebe (vgl. Abb. 8 dieser Tafel)
8	Cytochrom-oxydase	A KCN	19. 9. 66	5:1	Kontrollreaktion mit KCN zu Abb. 7 dieser Tafel



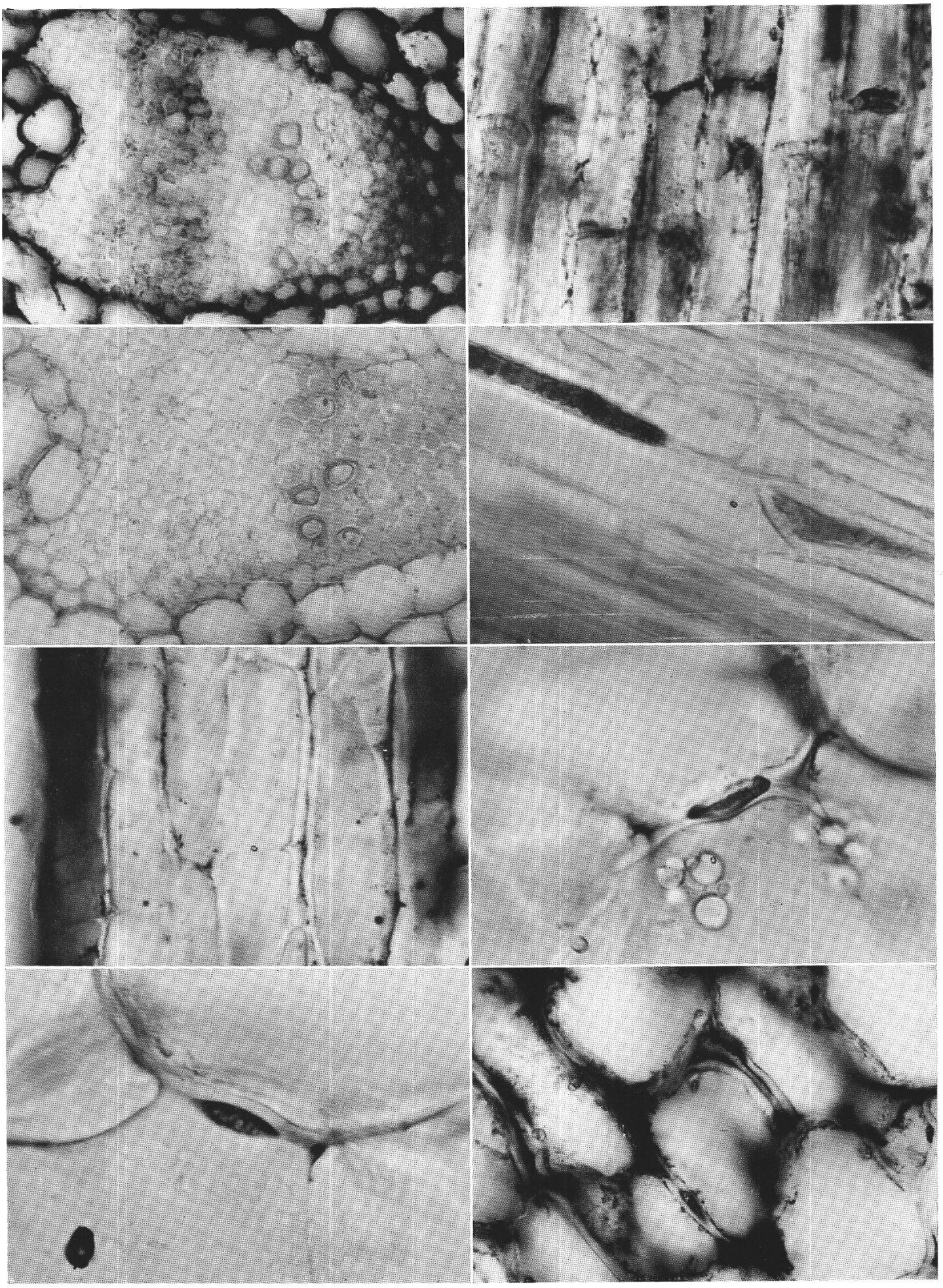
Tafel 6

Abb.	Enzym	Reagenz	Versuchs-datum	Ver-grösse-rung	Kommentar
1	Peroxydase	N	6. 7. 67	5:1	Querschnitt durch einen Glockenapfel: Deutlich sichtbare Grenze zwischen Mark- und Rindengewebe
2	Peroxydase	N NaN_3	6. 7. 67	5:1	Kontrollreaktion mit $5 \cdot 10^{-2}$ M NaN_3: Epidermis, Subepidermis, Leitbündel und Endokarp reagieren immer noch intensiv
3	Peroxydase	AAC	1. 6. 67	400:1	Kontrollreaktion mit $3 \cdot 10^{-2}$ M NaN_3 zu Tafel 1, Abb. 8. Praktisch vollständige Hemmung
4	Peroxydase	2,6-D	29. 7. 66	200:1	Epidermis und Subepidermis: Die Reaktion ist relativ schwach. Bezeichnend ist aber auch mit diesem Reagenz die Reaktion der Interzellularsubstanz (vgl. Tafel 1, Abb. 7 und 8)
5	Peroxydase	AAC	6. 7. 67	5:1	Querschnitt durch einen Glockenapfel: Die Schnitte wurden 10 Minuten in Wasser von 90 °C gelegt. Nur noch in den Endokarpien ist stellenweise eine Reaktion zu beobachten (vgl. Abb. 1, 2 und 6 dieser Tafel)
6	Peroxydase	N	6. 7. 67	5:1	Wie Abb. 5 dieser Tafel (vgl. Abb. 1, 2 und 5 dieser Tafel)
7	Peroxydase	AAC	3. 4. 67	150:1	*Petasites albus*-Leitbündel: Intensive Reaktion der phloemnahen Gefässe und des Phloems (vgl. Abb. 8 dieser Tafel)
8		Phloroglucin	3. 4. 67	150:1	Die phloemnahen Gefässe zeigen keine Lignin-reaktion. Es sind dies die Gefässe, welche starke Peroxydasereaktion ergeben (vgl. Abb. 7 dieser Tafel)



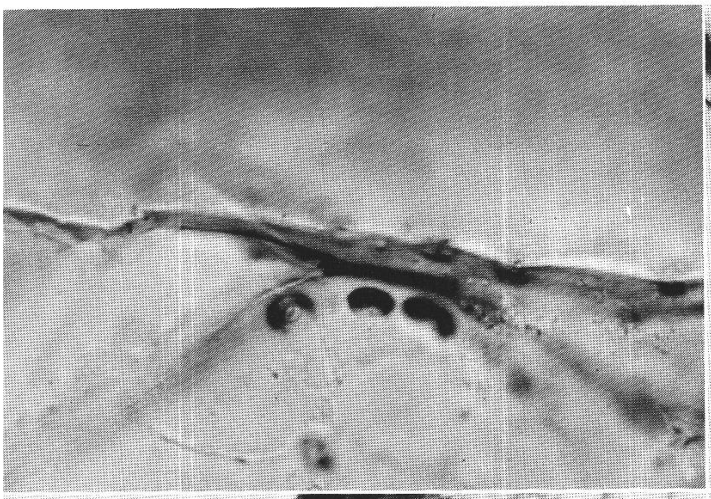
Tafel 7

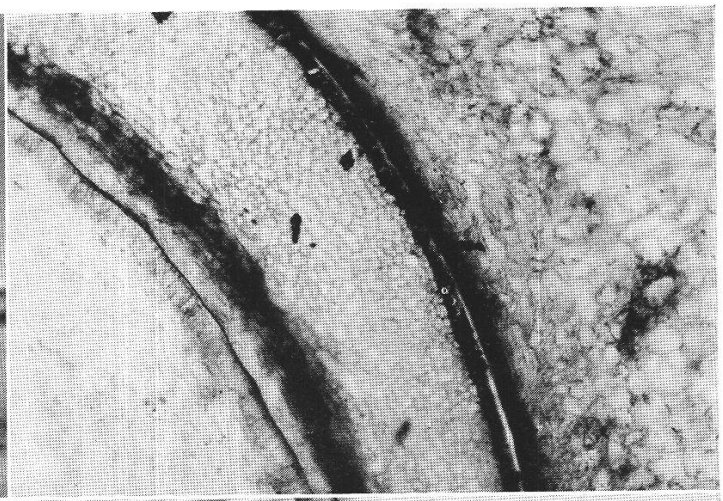
Abb.	Enzym	Reagenz	Versuchs-datum	Ver-grösse-rung	Kommentar
1	Peroxydase	AAC	19. 4. 67	300:1	*Petasites albus*-Leitbündel: Die Schnitte wurden 15 Minuten in Wasser von 80 °C gelegt. Eindeutige Hemmung vor allem im Phloem (vgl. Tafel 3, Abb. 6)
2	Peroxydase	A	3. 4. 67	600:1	*Tetrastigma voinerianum*-Längsschnitt durch das Phloem: Allgemein intensive Reaktion (vgl. Abb. 4 dieser Tafel)
3	Peroxydase	AAC	19. 4. 67	300:1	*Petasites albus*-Leitbündel: Die Schnitte wurden 10 Minuten in Wasser von 98 °C gelegt. Praktisch vollständige Hemmung (vgl. Abb. 1 dieser Tafel und Tafel 3, Abb. 6)
4	Peroxydase	AAC	3. 4. 67	600:1	*Tetrastigma voinerianum*-Längsschnitt durch das Phloem: Relativ schwache Reaktion der Siebgefässe, intensive Reaktion einer Geleitzelle (vgl. Abb. 2 dieser Tafel)
5	Peroxydase	N	9. 5. 66	600:1	Längsschnitt durch die Stielrinde eines Apfels: Intensive Reaktion der Mittellamelle und der Epidermis
6	Peroxydase	B pH 6,4	29. 7. 66	600:1	Klarapfel: Linsenartige Erweiterung der Mittellamelle, welche starke Reaktion zeigt (vgl. Abb. 7 und 8 dieser Tafel)
7	Peroxydase	AAC	21. 11. 66	600:1	Ähnliche linsenartig erweiterte Interzellularsubstanz wie in Abb. 6 und 8 dieser Tafel, welche intensive Reaktion zeigt
8	Peroxydase	N	29. 7. 66	300:1	Äusseres Rindenparenchym: Intensive Reaktion der Interzellularsubstanz. Mitte unten Erweiterung der Mittellamellensubstanz wie in Abb. 6 und 7 dieser Tafel

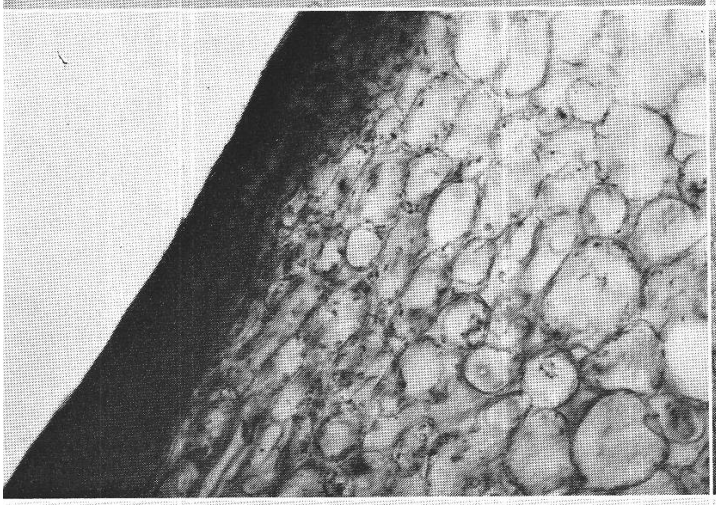


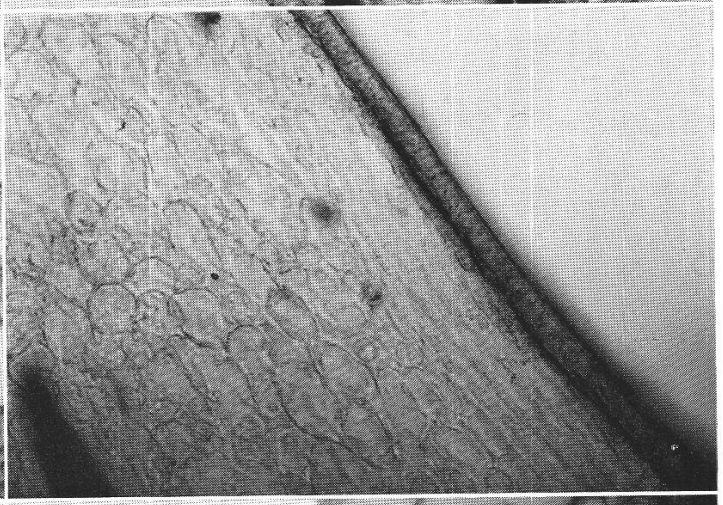
Tafel 8

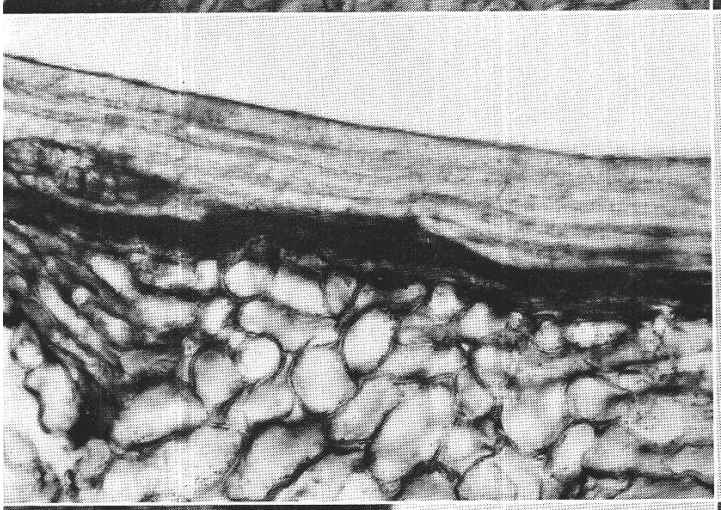
Abb.	Enzym	Reagenz	Versuchs-datum	Ver-grösse-rung	Kommentar
1	Peroxydase	AAC	21. 11. 66	300:1	Apfelparenchym: Interzellularsubstanz und Einbuchtungen der Zellwand, die intensive Reaktion zeigen
2	Peroxydase	N ohne H_2O_2	24. 6. 65	100:1	Samenanlage: Endokarp, äussere Integumentschicht und Übergangsgewebe von äusserem zu innerem Integument zeigen starke Reaktion
3	Peroxydase	N	5. 7. 66	100:1	Endokarp: Sehr intensive Reaktion. Das Samengehäuse liegt links
4		Phloroglucin	5. 7. 66	100:1	Gleiches Endokarp wie in Abb. 3 dieser Tafel: Nur die Zellschicht, welche an das Samenfach grenzt, zeigt in diesem Entwicklungsstadium Ligninreaktion. Die lignifizierte Zone deckt sich nicht mit dem Gewebe stärkster Peroxydaseaktivität (vgl. Abb. 3 dieser Tafel)
5	Peroxydase	N	27. 8. 65	100:1	Endokarp: Abnahme der Reaktion. Die anliegenden Zellen reagieren noch intensiv
6	Peroxydase	B pH 6,4		300:1	Endokarp: Intensive Reaktion der Mittellamellen zwischen den Endokarpsklereiden
7	Peroxydase	AAC	21. 11. 66	150:1	Zellproliferationen ins Samenfach: Zellwandpapillen ergeben starke Reaktion
8		Chlorzinkjod	7. 6. 66	200:1	Zellulosenachweis mit Chlorzinkjod. Perianthleitbündel: Die Siebgefässe treten durch besonders intensive Anfärbung ihrer Wand stark hervor (nacreous thickening) (vgl. Tafel 1, Abb. 2)

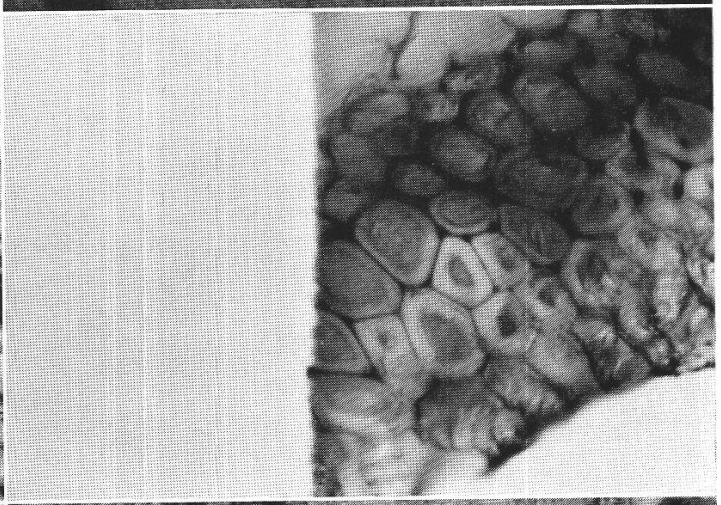


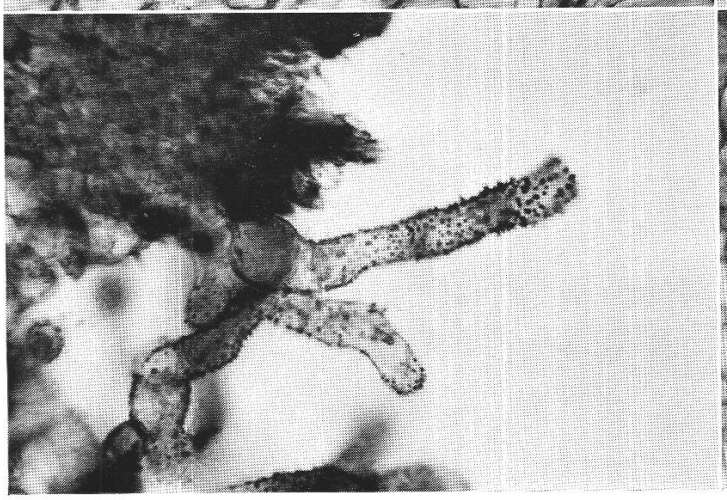


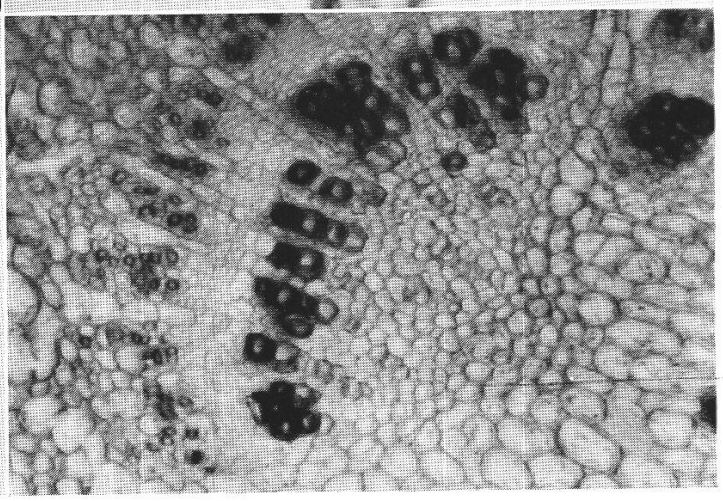








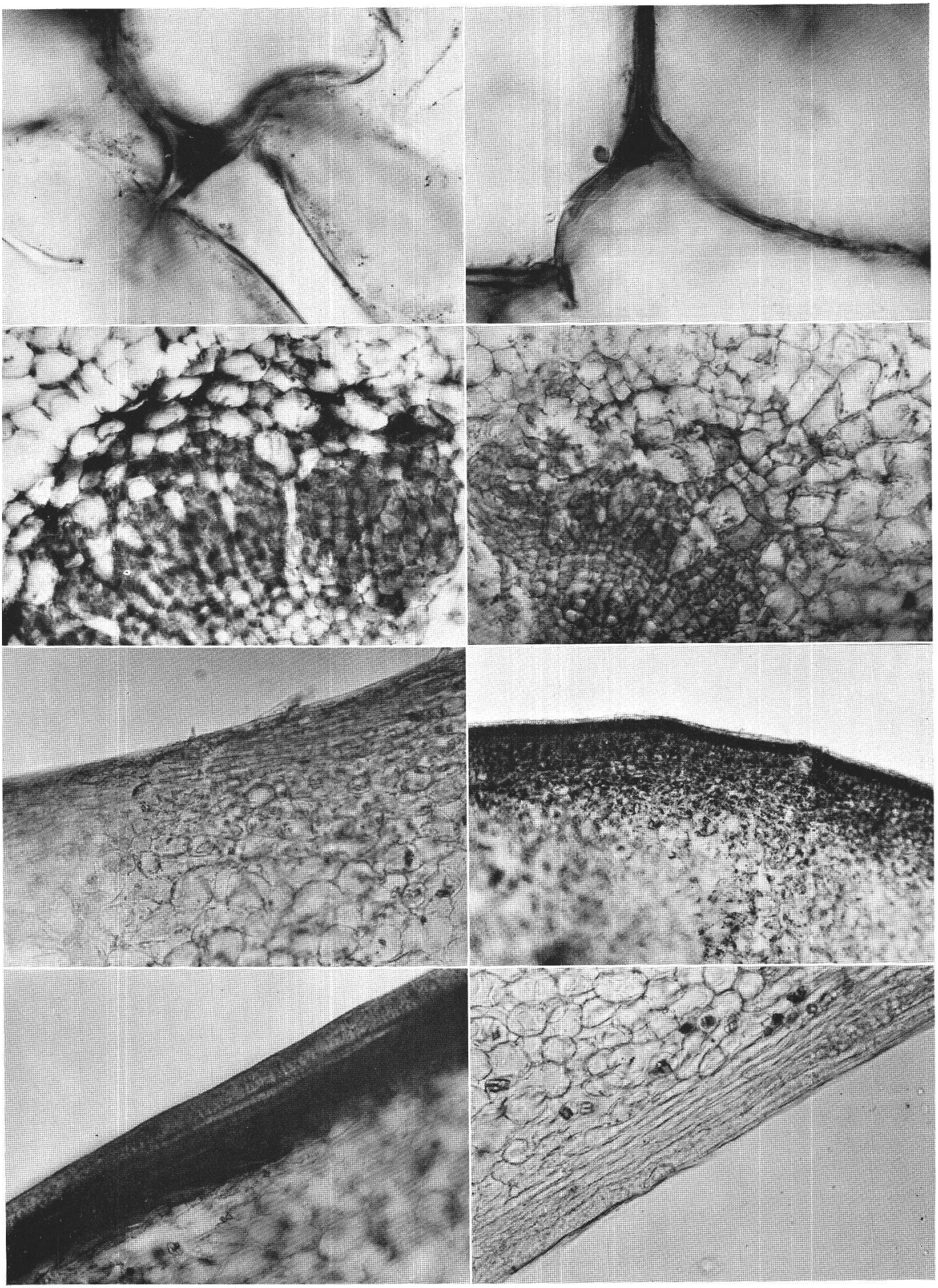




Tafel 9

Abb.	Enzym	Reagenz	Versuchs-datum	Ver-grösse-rung	Kommentar
1	Peroxydase	N	27. 11. 65	400:1	Kleine Interzellularen im Parenchym mit starker Aktivität (vgl. Abb. 2 dieser Tafel)
2		Ruthe-niumrot	29. 7. 66	400:1	Pektinanfärbung mit Rutheniumrot. Intensive Färbung der Interzellularsubstanz in einer kleinen Parenchyminterzellulare (vgl. Abb. 1 dieser Tafel)
3	Peroxydase	AAC	10. 5. 67	300:1	Perianthleitbündel: Intensive Reaktion der verdickten Zellwände in der äusseren Leitbündelscheide (vgl. Abb. 4 dieser Tafel)
4		Ruthe-niumrot	24. 5. 66	200:1	Die verdickten Zellwände der äusseren Leitbündelscheide färben sich mit Rutheniumrot stark an (vgl. Abb. 3 dieser Tafel)
5	Polyphenol-oxydase	Brenz-katechin	12. 7. 65	100:1	Endokarp: Keine besonders intensive Reaktion (vgl. Abb. 7 dieser Tafel)
6	Polyphenol-oxydase	Brenz-katechin	19. 6. 65	100:1	Äussere Rindenschicht: Intensive Reaktion des Schalengewebes samt Epidermis
7	Polyphenol-oxydase	Brenz-katechin	11. 8. 65	100:1	Endokarp: Die Reaktion ist, verglichen mit Abb. 5 dieser Tafel, viel intensiver
8	Polyphenol-oxydase	Brenz-katechin DIECA	11. 8. 65	100:1	Gleiches Endokarp wie in Abb. 7 dieser Tafel. Kontrollreaktion mit DIECA: Vollkommene Hemmung

Weitere Dokumentationsaufnahmen: Die in dieser Arbeit wiedergegebenen Schwarzweissabbildungen sind alle farbig aufgenommen und sind zusammen mit weiteren 137 Farbaufnahmen im Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich deponiert.



Literatur

Albersheim P. 1965. Biogenesis of the cell wall. In: Bonner J. und J.E. Varner. Plant Biochemistry Academic Press, New York, London.

— 1965. The substructure and function of the cell wall. In: Plant Biochemistry.

Allen P.J. 1953. Nach J.B. Biale: Respiration of fruits. Hb. d. Pfl.phys. **XII/2,** 536–592. Springer-Verlag.

Beevers H. 1961. Respiratory metabolism in plants. Row-Peterson Biological Monographs. White Plains, New York.

Betz A. 1955. Die aerobe Gärung in aktiven Meristemen höherer Pflanzen. Hb. d. Pfl.phys. **XII/2,** 87–113. Springer-Verlag.

Brändle R. und H. Wanner. 1965. Die Verteilung der Sauerstoffkonzentration in reifenden Äpfeln. Planta (Berl.) **65,** 65–72.

Burstone M.S. 1960. Histochemical demonstration of cytochrome oxydase with new amine reagents. J. Histochem. and Cytochem. **8,** 63–70.

Carlquist S. 1956. On the occurrence of intercellular pectic warts in Compositae. Amer. J. Bot. **43,** 425–429.

Carré M.H. und A.S. Horne. 1927. An investigation of the behaviour of pectic materials in apples and other plant tissues. Ann. of Bot. **41,** 193–237.

Crane J.C. 1964. Growth substances in fruit setting and development. Ann. Rev. of Plant Phys. **15,** 303–322.

Deane H.W., R.J. Barnett und A.M. Seligman. 1960. Handbuch der Histochemie. Enzyme **VII/1,** Histochemische Methoden zum Nachweis der Enzymaktivität. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.

Eggenberger W. 1949. Biochem. Untersuchungen an Äpfeln während der Entwicklung und Lagerung. Diss. ETH, Zürich.

Esau K. 1965. Plant Anatomy. 2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney.

— H.B. Currier und V.T. Cheadle. 1957. Physiology of Phloem. Ann. Rev. of Plant Phys. **8,** 349–374.

Freudenberg K., H. Reznik, H. Roesenber und D. Ranenack. 1952. The enzyme system participating in lignification. Chem. Ber. **85,** 641.

Frey-Wyssling A. 1959. Die pflanzliche Zellwand. Springer-Verlag, Berlin.

Galston A.W., J. Bonner und S.B. Baker. 1953. Flavoprotein and peroxydase as components of the indoleacetic acid-oxydase system of peas. Arch. of Biochem. Biophys. **49,** 456–470.

— und Y.L. Dalberg. 1954. The adaptive formation and physiological significance of indoleacetic acid-oxidase. Amer. J. Bot. **41,** 373–380.

— und W.S. Hillmann. 1961. The degradation of Auxin. Hb. d. Pfl.phys. **XIV.** Springer-Verlag.

Gäumann E. 1951. Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Verlag Birkhäuser, Basel.

Graham R.C., jr., U. Lundholm und M.J. Karnovsky. 1965. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. J. Histochem. Cytochem. **13,** 150–152.

Hatch M.D., J.A. Pearson, A. Millerd und R.N. Robertson. 1959. Oxidation of Krebscycle acids by tissue slices and cytoplasmic particles from apple fruit. Aust. p. biol. Sci. **12,** 167–174.

Haylett S. 1925. Nach B. Huber und H. Ziegler: Atmung und Wasserhaushalt. Hb. d. Pfl.phys. **XII/2,** 150–169. Springer-Verlag.

Hulme A.C. 1954. Studies in the nitrogen metabolism of apple fruits. J. Exp. Bot. **5,** 159.

— J.D. Jones und L.S.C. Wooltorton. 1963. The respiration climacteric in apple fruit. Proc. Roy. Soc. (London) **158,** 514–535.

Jensen W.A. 1955. The histochemical localization of peroxidase in roots and its induction by indoleacetic acid. Plant Physiol. **30,** 426–432.

— 1962. Botanical Histochemistry. W.H. Freeman & Co., San Francisco, London.

Karrer P. 1941. Lehrbuch der organischen Chemie. 7. Aufl. Georg-Thieme-Verlag, Leipzig.

Kidd F., C. West, D.G. Griffiths und N.A. Potter. 1951. Metabolism of malic acid in apples. J. Hort. Sci. **26**, 169–185.

— und C. West. 1939. The controlling influence of carbon dioxide. VI. The effect of the tension of oxygen and of carbon dioxide in the atmosphere upon the course of chemical change in stored apples. New Phytol. **38**, 105–122.

Kozlowski T.T. 1964. Water metabolism in plants. Harper & Row, Publishers, New York, Evanston, London.

Kramer J.P. 1955. Water relations of plant cells and tissues. Ann. Rev. of Bot. Phys. **6**, 268.

Krotkov G. 1941. The respiratory metabolism of McIntosh apples during ontogeny as determined at 22 °C. Plant Physiol. **16**, 799–812.

— und V. Helson. 1946. Carbohydrate metabolism of McIntosh apples during their development on the tree and in cold storage. Canad. J. Res. C **24**, 126–144.

Kuřsanov A.L. 1963. Metabolism and the Transport of Organic Substances in the Phloem. Adv. in Bot. Res. **1**, 209–274.

Liebermann M. 1958. Isolation of cytoplasmic particles with cytochrome oxidase activity from apples. Science T, Lancaster, Pa., **127**, 189–190.

Lwow und Kalugina. 1959. Nach J. Wolf. Der Säurestoffwechsel fleischiger Früchte. Hb. d. Pfl.phys. **XII/2**, 720–808. Springer-Verlag.

Majumdar G.P. und R.D. Preston. 1941. The fine structure of collenchyma cells in *Heracleum sphondylium*. Roy. Soc. London, Proc. Ser. B, **130**, 201–217.

Mason H.S. 1955. Comparative biochemistry of phenolase complex. Adv. in Enzymol. **4**, 99.

McArthur und R.H. Wetmore. 1939. Developmental studies of the apple fruit in the varieties McIntosh Red and Wagener. I. Vascular anatomy. J. Pomol. and Hort. Sci. **17**, 218–232.

— — 1941. II. An analysis of development. Canad. J. Res. C, Bot. Sci., **19**, 371–382.

McCune D.C. und A.W. Galston. 1959. Inverse effects of Gibberellin on peroxidase activity and growth in dwarf strains of peas and corn. Plant Physiol. **34**, 416–418.

Millerd A., J. Bonner und J.B. Biale. 1953. The climacteric rise in fruit respiration as controlled by phosphorylative coupling. Plant Physiol. **28**, 521.

Neal G.E. und A.C. Hulme. 1958. The effect of 2:4-dinitrophenol on the respiration of apple tissue in relation to the respiration climacteric. J. exp. Bot. **9**, 403–407.

Neish A.C. 1965. Coumarins, Phenylpropanes and Lignin. In: Bonner und Varner. Plant Biochemistry.

Newcomb E.H. 1963. Cytoplasm-cell wall relationships. Ann. Rev. of plant Phys. **14**, 43–93.

Nishio K. 1959. Histochemical studies of lignification. Ronso **1**, 1–13.

Pearson J.A. und R.N. Robertson. 1954. The physiology of growth in apple fruits. VI. The control of respiration rate and synthesis. Aust. J. Biol. Sci. **7**, 1.

Phinney O.B. und Ch.A. West. 1961. Gibberellins and plant growth. Hb. d. Pfl.phys. **XIV**. Springer-Verlag.

Scott F.M. und M. Lewis. 1953. Pits, intercellular spaces and internal "Suberization" in the apical meristems of *Ricinus communis* and other plants. The Bot. Gaz. **114**, 253–264.

Setterfield G. und S.T. Bayley. 1961. Structure and Physiology of cell walls Ann. Rev. Plant Physiol. **12**, 35–62.

Siegel S.M. 1955. On the biosynthesis of lignins. Physiol. Plantarum **8**, 20.

Simon E.W. 1958. The Effect of Digitonin on the Cytochrome C Oxidase Acticity of Plant Mitochondria. The Bioch. J. **69**, 67.

Spencer M. 1965. Fruit repening. In: Bonner und Varner. Plant Biochemistry.

Tager J.M. 1958. Isolation of active mitochondria from apples. Nature **182**, 1521–1522.

Tetley U. 1930. A study of the anatomical development of the apple and some observations on the pectic constituents of the cell walls. J. Pomol. and Hort. Sci. **8**, 153–172.

Ulrich R. 1952. La vie des fruits. Masson & Cie, éd., bd Saint-Germain 120, Paris 6e.

van Duijn P. 1955. An improved histochemical benzidine-blue peroxidase method and a note on the composition of the blue reaction product. Rec. Trav. chim. **74**, 771–778.

van Fleet D.S. 1947. The distribution of peroxidase in differentiating tissues of vascular plants. Biodynamica **6**, 125–140.

— 1952. Histochemical localization of enzymes in vascular plants. Bot. Rev. **18**, 354–398.

— 1959. Analysis of the histochemical localization of peroxidase related to the differentiation of plant tissues. Can. J. Bot. **37**, 449–458.

— 1962. In: Handbuch der Histochemie **VII/2**, Enzyme. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.

Varner J.E. 1965. Enzymes. In: Plant Biochemistry.

Wardrop A.B. 1962. Cell wall organization in higher plants. I. The primary wall. The Bot. Rev. **28**, 242–285.

Wardrop A.B. und E. Scaife. 1956. Occurrence of peroxidase in tension wood of angiosperms. Nature **178**, 867.

Webster G.C. 1952. The occurrence of a cytochrome oxidase in the tissue of higher plants. Amer. Bot. J. **39**, 739–745.

— 1954. Effect of carbon monoxide and light on the respiration of non photosynthetic tissues of some higher plants. Plant Physiol. **29**, 339.