

# Cyto- und histochemische Lokalisation verschiedener Dehydrogenasen in den Vegetations- und Fortpflanzungsorganen einer monokotylen und einer dikotylen Pflanze

Autor(en): **Gradwohl, Pierre R.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **78 (1968)**

PDF erstellt am: **25.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-54880>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# **Cyto- und histochemische Lokalisation verschiedener Dehydrogenasen in den Vegetations- und Fortpflanzungsorganen einer monokotylen und einer dikotylen Pflanze**

Von *Pierre R. Gradwohl*

(Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich)

Manuskript eingegangen am 1. Februar 1968

## **Inhaltsverzeichnis**

- I. Einleitung
- II. Material und Methode
- III. Ergebnisse
  - A. Allgemeine und unterschiedliche Merkmale der Dehydrogenasenaktivität und -lokalisierung
  - B. Vorkommen der Dehydrogenasen in den Organen
  - C. Intracelluläre Lokalisation der Dehydrogenasen
  - D. Verbreitung der Dehydrogenasen in den Geweben
- IV. Interpretation und Diskussion
- V. Zusammenfassung
- Literaturverzeichnis

## **Verzeichnis der Abkürzungen**

ATP	Adenosintriphosphat
BT	Blue-Tetrazolium
DNS	Desoxyribonucleinsäure
GADH	Glycerinaldehyddehydrogenase
GDH	Glutaminsäuredehydrogenase
G-6-PDH	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
ICDH	Isozitroneisäuredehydrogenase
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NAD-MDH	NAD-Äpfelsäuredehydrogenase
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADP-MDH	NADP-Äpfelsäuredehydrogenase («Malic enzyme»)
NBT	Nitroblue-Tetrazolium
NTC	Neotetrazolium-Chlorid
RNS	Ribonucleinsäure
SDH	Bernsteinsäuredehydrogenase
TTC	Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid

## I. Einleitung

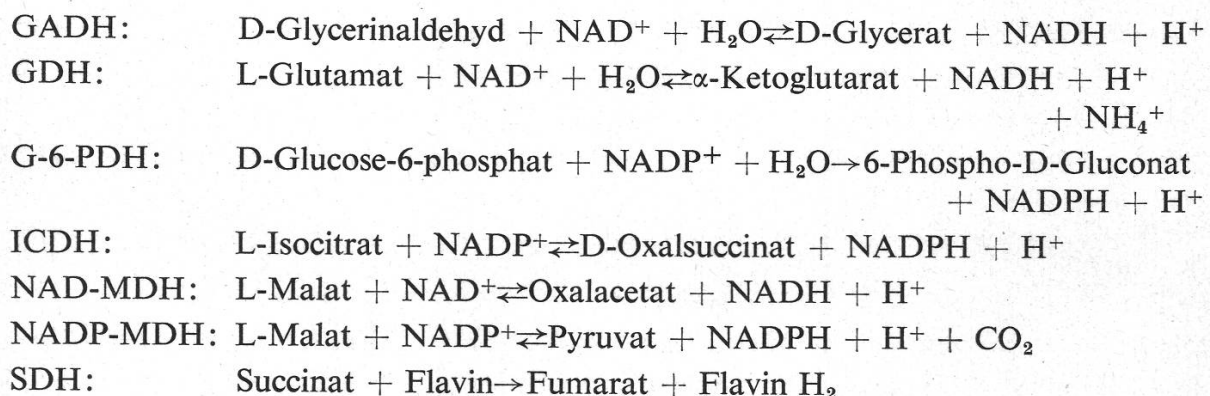
Die Eigenschaft der Tetrazoliumsalze, in reduziertem Zustande wasserunlösliche Pigmente zu bilden, hat die histochemische Forschung in den beiden letzten Jahrzehnten zur inter- und intracellulären Lokalisation der Dehydrogenasen benutzt. Wiederholt hat man auch bei pflanzlichen Geweben davon Gebrauch gemacht (eine Übersicht gibt Van Fleet, 1952 und 1962). Fast immer begnügte man sich allerdings mit der Prüfung einer unspezifischen Dehydrogenasenaktivität, indem man die bekanntlich zumeist substratspezifischen Dehydrogenasen von nicht näher identifizierten endogenen Substraten zehren liess.

Nur selten und nie in grösserem Rahmen sind einzelne Dehydrogenasen genauer untersucht worden, so die SDH (Satô, 1953 und 1956; Tiefel, 1957; Avers, 1958; Avers und King, 1960) und einige NAD- und NADP-abhängige Dehydrogenasen (Avers, 1961; Avers und Tkal, 1963).

Es schien darum verlockend, einmal in einer umfassenderen Studie die Aktivität und Verbreitung verschiedener Dehydrogenasen zu erforschen und mit dem Entwicklungs- und Funktionszustand der Zellen und Gewebe zu vergleichen.

Diesem Vorhaben stellte sich als schweres Hindernis entgegen, dass pflanzliche Gewebe bedeutende Mengen endogener Substrate enthalten können. Es gelang nicht, diese Substrate aus frischen Handschnitten befriedigend herauszuwaschen oder durch Aushungern ganzer Geweblöckchen aufzubrauchen; überdies litt die Enzymaktivität unter dem langdauernden Hungern und der Anwesenheit von Antibiotica in der Hungerlösung. Es stellte sich nun heraus, dass aus Gefrierschnitten die endogenen Substrate vollständig herausgewaschen werden konnten, ohne dass die Enzymaktivität allzu bedenklichen Schaden nahm. Ausserdem gestattete das Gefriermikrotom, die Schnittdicke konstant und genügend niedrig zu halten. Damit wurde es möglich, die Wirkungsstätte und den Wirkungsgrad einzelner Dehydrogenasen zu beschreiben.

In der folgenden Liste sind die untersuchten Dehydrogenasen und die von ihnen katalysierten Reaktionen aufgezeichnet.



## II. Material und Methode

Als Untersuchungsobjekte wurden *Zea mays* L. und *Cucurbita pepo* L. gewählt. Verschieden alte Freilandpflanzen der Jahre 1962 und 1963 sowie verschieden lang

gequollene Samen von *Zea mays* L. und *Cucurbita pepo* L. dienten als Untersuchungsobjekte.

#### A. Allgemeiner Verlauf der Experimente

Die zu untersuchenden Pflanzenabschnitte wurden von Hand in Scheibchen zerlegt, die Scheibchen sodann entweder direkt oder nach einer 30 Minuten dauernden Vorbehandlung mit 6 °C kalter, phosphatgepufferter (0,1 m/pH 7,6), isotonischer (0,25 m) Saccharoselösung auf dem Gefriermikrotom längs- und quergeschnitten.

Die Schnittdicke schwankte zwischen 15  $\mu$  und 30  $\mu$ . 15  $\mu$  dicke Schnitte konnten besonders nach der Saccharosevorbehandlung mit gutem Erfolg inkubiert werden. Zum Nachweis der SDH schienen mindestens 30  $\mu$  dicke Schnitte empfehlenswert (Seligman und Rutenburg, 1951; Padykula, 1952; Shelton und Schneider, 1952; Rogers, 1953; Rutenburg et al., 1953).

Ungewaschene Gefrierschnitte pflegten in Inkubationsmedien, welche Cofermente, aber kein Substrat enthielten, das NBT stark zu reduzieren, ein Umstand, der auf die Anwesenheit endogener Substrate schliessen liess. Das Vorhandensein von zum Teil beträchtlichen Mengen endogener Substrate bezeugen auch die Arbeiten jener Autoren, die ohne Zugabe von Substraten zum Inkubationsmedium in ganzen Pflanzen oder frischen, handgeschnittenen Pflanzenteilen eine intensive Reduktion des Tetrazoliumsalzes erzielten (Lakon, 1942; Dufrenoy und Pratt, 1948; Roberts, 1950 und 1951; Bauer, 1953; Betz, 1953; Dyar, 1953; Satô, 1953; Currier et al., 1955; Roberts und Lucchese, 1955; Currier und Van der Zweep, 1956; Sorokin, 1956; Sorokin und Sorokin, 1956). Die für den Nachweis der NAD- und NADP-Dehydrogenasen bestimmten Schnitte gelangten zunächst in je nach Bedarf ein bis mehrere Male gewechselte Waschlösungen und verblieben darin 1 bis 5 Stunden bei Zimmertemperatur. Danach wurden sie inkubiert. Die dem Nachweis der SDH vorbehaltenen Schnitte gingen andere Wege (s. u.). Als Waschlösungen fanden die auch im Inkubationsmedium gebrauchten Puffer Verwendung (Phosphat- bzw. Triäthanolamin-HCl-Puffer, 0,1 m/pH 7,6) (Goddard und Seligman, 1952). Vorversuche hatten gezeigt, dass die Fermentaktivität selbst nach längeren Waschzeiten keine merkliche Einbusse erleidet. Das reichliche Vorkommen von endogenen Substraten in Samen erforderte Waschzeiten von 5 bis 18 Stunden. In solchen Fällen hielt ein regelmässiger Luftstrom die Waschflüssigkeit in ständiger Bewegung.

In genügend ausgewaschenen und ohne Substrate inkubierten Kontrollschnitten unterblieb jegliche Formazanbildung. Ein negativer Ausfall der Tetrazoliumreaktion in den Kontrollen galt als unerlässlich, wenn eine allfällige spezifische Aktivität und Verbreitung der einzelnen Atmungsfermente erkannt werden sollte.

Die ausgewaschenen Gefrierschnitte wurden in die weiter unten beschriebenen Inkubationsmedien übertragen und im Dunkeln in der Regel bei 37 °C während eines Zeitraums von 30 Minuten bis zu 12 Stunden anaerob (1962) oder aerob (1963) bebrütet. Anaerobie wurde so erzielt, dass die Thunberg-Röhrchen, in denen sich die mit frei schwebenden Schnitten versehenen Medien befanden, zweimal evakuiert und mit Stickstoff gefüllt wurden. Anaerobie und Aerobie ergaben übereinstimmende Resultate (Nachlas et al., 1957; Nachlas et al., 1960).

Auf die Inkubation folgte die Formalinfixierung. Die Schnitte verweilten 1 Tag bis 3 Wochen in 4 °C kaltem, 10prozentigem, mit 0,1 m Phosphatpuffer von pH 7,0

versetztem Formalin. Schliesslich wurden sie in Glyceringelatine eingebettet und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. So gelagerte Präparate waren nahezu unbeschränkt haltbar (Padykula, 1952).

Bei manchen Schnitten, besonders bei chlorophyllhaltigen, schien es zweckmässig, einzelne Proben vor der Einbettung während 5 Minuten in heisses Methanol zu legen; dabei löste sich, wie die Rotfärbung des Extraktes zeigte, jeweils auch bei der Inkubation gebildetes Monoformazan. Dieses scheint weniger durch unvollständige Reduktion des NBT als vielmehr durch Reduktion eines Monotetrazoliums Salzes zu entstehen, das, nach Walker und Seligman (1961), dem von der Nutritional Biochemicals Corporation verkauften NBT als Verunreinigung beigemischt ist.

Die kühl gelagerten Präparate lieferten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Einbettung die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit veröffentlichten Photographien. Ein Zeiss-Photomikroskop, zwei Blaufilter und AGFA-IFF-Isopan-13-DIN-Filme bildeten die photographische Ausrüstung.

## *B. Spezielle Versuchsansätze zum Nachweis der einzelnen Dehydrogenasen*

### 1. Nachweis der SDH

Die im Verlauf dieser Arbeit benutzte Methode wendet zum Nachweis der SDH die schon oben beschriebene Saccharosevorbehandlung an. Die vorbehandelten Pflanzenteile werden auf dem Gefriermikrotom geschnitten, die Schnitte sogleich, das heisst ungewaschen, in die Inkubationsmedien übertragen. Diese setzen sich entsprechend den Vorschriften von Seligman und Rutenburg (1951) zusammen (Na-Succinat: 0,5 m statt 0,2 m). Kontrollversuche laufen in zwei verschiedenen Medien: im einen fehlt das Substrat, im anderen ist es durch 1,0 m Malonsäure ersetzt.

Die Inkubation findet zunächst in Abwesenheit des NBT statt (Satô, 1953); nach einer Stunde wird der Redoxindikator hinzugefügt; spätestens nach weiteren 45 Minuten muss man die Inkubation beenden (Satô, 1953).

Die Saccharosevorbehandlung bietet, wie zugestanden sein soll, keine vollständige Gewähr, die SDH in jedem Falle zuverlässig nachzuweisen; sie hat sich aber als einigermassen brauchbar bewährt (eine Ursache für die günstige Wirkung der Saccharosevorbehandlung dürfte wohl in der osmotischen Protektion der Zellorganellen zu erblicken sein). Erst nach Abschluss der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass der Nachweis der SDH wesentlich verbessert werden kann, wenn das Inkubationsmedium Phenazinmethosulfat in einer Endkonzentration von 0,01 % und 20prozentigen Polyvinylalkohol enthält. Phenazinmethosulfat wird wohl, ähnlich wie Methylenblau und Pyocyanin, die Übertragung der Elektronen vom SDH-Enzymsystem auf das gebundene NBT erleichtern (vgl. Farber et al., 1956b; Walker und Seligman, 1961), während 20prozentiger Polyvinylalkohol vermutlich durch Erhöhung der Viskosität die Diffusion löslicher Enzymkomponenten vermindert.

### 2. Nachweis der NAD- und NADP-abhängigen Dehydrogenasen

Alle Inkubationsmedien werden vor jedem Experiment aus den einzelnen, in der Tiefkühltruhe konservierten Lösungen frisch bereitet. Cystein und Cofermente bringt man erst kurz vor Versuchsbeginn in Lösung.

a) Allgemeine Komponenten der Standard-Inkubationsmedien

Puffer (pH 7,6/0,1 m) (0,5 m, wenn L[-]Äpfelsäure Substrat ist) .....	0,4 ml
Substrat (0,1 m) (Glucose-6-phosphat: 0,01 m) .....	0,2 ml
NBT (0,1 %) .....	0,2 ml
Coferment (3 mg/ml) .....	0,1 ml
L-Cystein (1/600 m) .....	0,1 ml
Cofactoren beziehungsweise Aqua dest. ....	0,2 ml
	total 1,2 ml

Anmerkungen

Die Cofermente stellen einen absolut notwendigen Bestandteil des Inkubationsmediums dar, da ohne ihre Zufuhr von aussen keine Reaktion im Innern der Gewebe erfolgt (Farber et al., 1954 und 1956 a). Rogers (1953) bemerkte, dass in Gefrierschnitten (als Folge des Gefrierens und Auftauens?) Coenzyme und Cofactoren aus den Zellen hinausdiffundieren.

Aus biochemischen Experimenten (z. B. von Koppel und Olwin, 1954) gewonnene Einsichten legen es nahe, auch im histochemischen Test die funktionellen SH-Gruppen der Apofermente mit Cystein zu aktivieren. Farber et al. (1954 und 1956 a) haben allerdings zu hohe Konzentrationen verwendet. Die Endkonzentration darf den Wert von 1/7200 m nicht überschreiten. 1/120 m Cysteinlösungen reduzieren das NBT spontan bei Zimmertemperatur und pH 7,6. Selbst 1/1200 m Cysteinlösungen rufen in gut ausgewaschenen und ohne Substrat inkubierten Gefrierschnitten (mit Hilfe einer Cystein-Desulfhydrase?) noch Färbung hervor. Farber et al. (1954) beanspruchen für den Nachweis des NADP-Dehydrogenasen-Diaphorase-Systems Cystein als unentbehrlichen Cofactor. Eigene Versuche beweisen jedoch eindeutig, dass Cystein weder für die Funktion der NADP- noch für diejenige der NAD-abhängigen Dehydrogenasen unbedingt erforderlich ist (die beispielsweise den Abb. 13, 29, 33 und 34 zugrunde liegenden Präparate entstammen cysteinfreien Inkubationsmedien).

b) Besondere Komponenten der einzelnen Inkubationsmedien

GADH:	Triäthanolamin-HCl-Puffer; D(+)Glycerinaldehyd; NAD <sup>+</sup> Cofactoren: MgCl <sub>2</sub> (0,005 m) : 0,1 ml Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> (0,005 m) : 0,1 ml
GDH:	Phosphatpuffer; Na-L(+)Glutamat; NAD <sup>+</sup> Cofactor: Semicarbazid (0,1 m) : 0,1 ml
G-6-PDH:	Triäthanolamin-HCl-Puffer; Glucose-6-phosphat (Monobariumsalz); NADP <sup>+</sup> Cofactoren: MgCl <sub>2</sub> (0,005 m) : 0,1 ml NaF (0,2 m) : 0,1 ml
ICDH:	Triäthanolamin-HCl-Puffer; Tri-Na-Citrat; NADP <sup>+</sup> Cofactoren: Semicarbazid (0,1 m) : 0,1 ml MnCl <sub>2</sub> (0,005 m) : 0,1 ml
NAD-MDH:	Phosphatpuffer; L(-)Äpfelsäure; NAD <sup>+</sup> Cofactor: Semicarbazid (0,1 m) : 0,1 ml

NADP-MDH: Phosphatpuffer; L(—)Äpfelsäure; NADP<sup>+</sup>  
Cofactoren: Semicarbazid (0,1 m) : 0,1 ml  
MnCl<sub>2</sub> (0,005 m) : 0,1 ml

Kontrolle: NAD-Standardmedium ohne Substrat und Cofactoren

#### Anmerkungen

Mg<sup>++</sup>- und Mn<sup>++</sup>-Ionen wirken in den entsprechenden Enzymreaktionen als Aktivatoren (Farber et al., 1954 und 1956 a; Long et al., 1961). Semicarbazid soll Verbindungen, die Carbonylgruppen enthalten, entfernen, wo immer solche als Reaktionsprodukte auftreten, und damit das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung dieser Produkte verschieben (Farber et al., 1954 und 1956 a). Fluorid hemmt die Glucose-6-phosphatase (Deane et al., 1960, S. 120) und blockiert zugleich die Glycolyse.

Saccharosevorbehandlung scheint den Nachweis der ICDH ausserordentlich zu begünstigen (vgl. Tab. 1), Phosphat- oder Veronalpuffer verhindern ihn. Das zum Nachweis verwendete Inkubationsmedium setzt Gegenwart und Funktion der Aconitase in der Zelle voraus.

Ursprünglicher Zweck des GADH-Mediums war es, die Verbreitung der 3-Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase in den Geweben zu veranschaulichen. Glycerinaldehyd vertritt das natürliche Substrat (Triosephosphat stand nicht zur Verfügung). Der Test ahmt den bei biochemischen Untersuchungen üblichen nach: Arseniat nimmt die Stelle des Phosphats ein; statt der 1,3-Diphosphoglycerinsäure entsteht die labile, rasch zerfallende 1-Arseno-3-phosphoglycerinsäure; der Vorgang läuft irreversibel ab (Rauen, 1959; Leuthardt, 1961, S. 500). Aus den Spezifitätstests geht nun allerdings hervor, dass das mit Glycerinaldehyd histochemisch ermittelte Enzym wohl kaum die 3-Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase repräsentieren dürfte: Präinkubation und Inkubation in Monojodacetat (Endkonzentration: 1/120 oder 1/60 m) legen die Enzymaktivität nicht lahm; das Ferment dehydriert das Substrat, auch wenn Arseniat fehlt; Phosphatpuffer an Stelle des Triäthanolamin-HCl-Puffers und des Arseniates hat keinen Einfluss auf das Gesamtbild. Himmelhoch und Karnovsky (1961) beobachteten demgegenüber keine NBT-Reduktion, wenn sie das Glycerinaldehyd-3-phosphat durch Glycerinaldehyd ersetzten, die Schnitte mit SH-Reagentien (Monojodacetat; p-Chloromercuribenzoat) behandelten oder das Phosphatanion aus dem Inkubationsmedium weglassen. Die mit Glycerinaldehyd erhaltenen Ergebnisse spiegeln also wahrscheinlich die Tätigkeit einer Aldehyddehydrogenase wider, welche den Glycerinaldehyd spezifisch oder unspezifisch verwertet. Es ist aber immer zu beachten, dass sich die Eigenschaften eines Fermentes in vivo von denen unterscheiden können, die es in vitro aufweist.

Folgende Substrate schieden in Vorversuchen als unwirksam aus: Äthanol (Endkonzentration: 0,83%);  $\alpha$ -Glycerophosphat; Formiat; Fructose-1,6-diphosphat; Pyruvat. Ob mit einer Saccharosevorbehandlung oder Formalinpräfixierung die Resultate zu verbessern wären, müsste noch überprüft werden.

#### C. Das Eindringen des unreduzierten NBT in Gewebe und Zellen und seine Bindung darin

Es ist denkbar, dass in Inkubationsmedien von verschiedener Zusammensetzung eine selektive Bindung des Tetrazoliumsalzes an einzelne Zellen erfolgt, so dass völlig

unabhängig von der Aktivität spezifischer Enzyme ein unterschiedliches Farbverteilungsmuster sichtbar würde (Farber et al., 1956 b) oder dass in einem bestimmten Inkubationsmedium gewisse Zellen oder Zellbestandteile das NBT nicht einzulassen oder zu binden vermögen. Um diese Frage abzuklären, wurden ausgewaschene Gefrierschnitte von keimenden Maissamen und Kürbiswurzelspitzen in SDH- und NAD-MDH-Medien, aus denen die entsprechenden Substrate entfernt worden waren, inkubiert. Nach der Inkubation wurden die ungefärbten Schnitte kurz in Phosphatpuffer gewaschen, damit das ungebundene NBT beseitigt würde (Farber et al., 1956 b), und anschliessend in eine stark alkalische Cysteinlösung getaucht. Alle Schnitte färbten sich innerhalb weniger Sekunden.

#### *D. Entfernung der Lipide durch Acetonpräfixierung*

Angesichts der von verschiedenen Autoren vermerkten Tendenz der Formazane, sich in Fetten zu lösen (Dufrenoy und Pratt, 1948; Shelton und Schneider, 1952; Seligman und Rutenburg, 1951; Padykula, 1952; Betz, 1953; Neumann und Koch, 1953; Rutenburg et al., 1953; Nachlas et al., 1957; Wattenberg, 1958), und speziell des Nitro-Blue-Formazans, sich wenn auch nicht in Fetten zu lösen, so doch an Fett-Wasser-Grenzflächen zu akkumulieren (Wattenberg, 1958; Novikoff et al., 1961; Hitzeman, 1963), schien es ratsam, von einzelnen, zum Teil fettreichen Geweben zu Vergleichszwecken Präparate herzustellen, aus welchen die Lipide vor der Inkubation extrahiert worden waren. Gefrierschnitte von keimenden Maissamen und von Kürbiswurzelspitzen wurden vor der Inkubation in NAD-MDH-Medien 15 bis 30 Minuten lang in 0 °C kaltem Aceton fixiert. Der Fettgehalt der Gewebe wurde vor und nach der Acetonfixierung parallel zu den inkubierten Schnitten mit Sudan III ermittelt. Die Aktivität der NAD-MDH hatte – selbst nach 30 Minuten – unter der Acetonfixierung nicht wesentlich gelitten. Mikroskopisch liessen sich die Lipide in Gestalt grösserer oder kleinerer Kugeln vor der Acetonfixierung innerhalb des Maissamens im Aleuron, Scutellumepithel und -parenchym (besonders in den an das Epithel angrenzenden Zellschichten), in den Procambiumsträngen des Scutellums und Keimlings, in Coleorhiza, Wurzel und Blättern des Keimlings, sowie gleichmässig verteilt in der ganzen Kürbiswurzelspitze nachweisen. Nach 15 Minuten dauernder Acetonfixierung waren gelegentlich noch im Aleuron, Scutellumepithel und in den Procambiumsträngen des Scutellums Lipide feststellbar, nach 30 Minuten nur noch im Aleuron und Scutellumepithel.

NBT wurde von der Nutritional Biochemicals Corporation (USA) erworben; NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, Äpfelsäure, Fructose-1,6-diphosphat, Glucose-6-phosphat, Glutamat, Glycerinaldehyd und Semicarbazid stammten von der Fluka AG (Buchs SG).

### **III. Ergebnisse**

#### *A. Allgemeine und unterschiedliche Merkmale der Dehydrogenasenaktivität und -lokalisation*

##### **1. Makroskopische Beobachtungen**

###### *a) Inkubationslösungen*

Nach längeren Inkubationszeiten erscheinen die GADH- und GDH-Inkubations-



medien oft rot bis violett gefärbt, während die SDH-Inkubationsmedien eine rote bis violette Trübung zeigen.

#### *b) Schnitte*

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen schreitet die Färbung bei in Glucose-6-phosphat und Äpfelsäure + NAD<sup>+</sup> inkubierten Schnitten am raschesten, bei in Glycerinaldehyd inkubierten am langsamsten voran.

## 2. Mikroskopische Beobachtungen

#### *a) Aktivität*

##### *α) Fermentaktivität*

Die mikroskopische Untersuchung bestätigt die von bloßem Auge wahrgenommene Reaktionsträgheit der GADH. Die Schnitte bleiben auch nach langer Inkubationszeit vorwiegend rot gefärbt. Wird das Monoformazan heiss extrahiert, so tritt oft keine oder nur eine schwache blaue Farbe zutage. Bei den übrigen Fermenten gleichen sich anfängliche Unterschiede der Färbungsintensität in der Regel im Verlaufe der Inkubation wieder aus, sobald die Formazanbildung vermutlich einen gewissen Sättigungsgrad errungen hat.

##### *β) Gewebsaktivität*

Der Ausfall der Farbreaktion wird durch das Entwicklungsalter der Gewebe, nicht durch das Alter der Pflanze bestimmt. So reagieren verschieden differenzierte Blattscheidenleitbündel gleich alter Pflanzen unterschiedlich (vgl. Abb. 26 und 27), während das Procambium in verschiedenen Sprosssteilen verschieden alter Pflanzen gleich stark reagiert.

#### *b) Lokalisation*

Das unreduzierte NBT dringt, wie die unter II C beschriebenen Experimente zeigen, sowohl im SDH- als auch im NAD-MDH-Medium in alle untersuchten Gewebe ein und wird darin von allen lebenden Zellen, ja sogar von toten Zellstrukturen, wie der Samenschale, festgehalten.

Alle untersuchten Dehydrogenasen stimmen im Muster ihrer intercellulären Verteilung überein. Anders als in tierischen Geweben verraten die beiden Gruppen der NAD- und NADP-abhängigen Dehydrogenasen in Pflanzengewebe keine voneinander divergierende Lokalisation.

Innerhalb der Zellen und Gewebe gehorcht die Verbreitung der Atmungsfermente einem charakteristischen Schema. Dieses bleibt in Pflanzen verschiedener Jahre unverändert gewahrt und drückt sich auch in einander entsprechenden Geweben der beiden untersuchten Pflanzenarten grundsätzlich gleich aus.

### *B. Vorkommen der Dehydrogenasen in den Organen*

Über das Vorkommen der Dehydrogenasen in den Organen von Mais und Kürbis unterrichtet die Tabelle 1.

Die negativen oder zweifelhaften Resultate des ICDH-Tests (in Wurzel, Maisstengel

und Maisblattscheide) wurden, im Gegensatz zu den positiven (in Blüten und Samen), durch Schnitte hervorgebracht, die nicht mit Saccharose vorbehandelt worden waren. Ältere Abschnitte des Kürbisstengels, Kürbisblattstiel und Maisblattspreite reagierten auch nach der Saccharosevorbehandlung negativ.

Tabelle 1

Vorkommen der Dehydrogenasen in den Organen. Z = *Zea mays*, C = *Cucurbita pepo*. + = Nachweis gelungen, — = Nachweis nicht gelungen, ? = fraglich, / = kein Nachweisversuch, \* = schwächer als NAD-MDH, \*\* nur in jungen Stengelabschnitten +. Sch = Scheide, St = Stiel

	Wurzel		Stengel		Blatt				Blüte				Samen	
	Z	C	Z	C	Sch	St	Spreite		männlich		weiblich		Z	C
					Z	C	Z	C	Z	C	Z	C	Z	C
GADH	+	+	+	+**	+	—	—	/	+	+	—	+	+	/
GDH	+	+	+	+**	+	+	+	?	+	+	+	+	—	+
G-6-PDH	+	?	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	+	/
ICDH	?	/	—	+**	—	—	—	/	/	+	+	+	+	/
NAD-MDH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NADP-MDH	+*	+*	+	+	—	+	+	+	/	/	+	+	/	/
SDH	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+

### C. Intracelluläre Lokalisation der Dehydrogenasen

#### 1. Adsorption des unreduzierten NBT

Das eingedrungene und adsorbierte NBT kann mit Hilfe der unter II C beschriebenen Methode sowohl im Cytoplasma als auch im Kern sichtbar gemacht werden. Die Färbung erscheint diffus, im Cytoplasma überdies granulär. Die Kernmembran sticht durch stärkere Färbung hervor. Im Kern sind der Nucleolus und von ihm ausgehend zur Kernmembran sich hinziehende Fäden oder Stränge gefärbt; die übrigen Kernpartien sind farbfrei.

#### 2. Vorkommen der Dehydrogenasen im Kern

In allen Schnitten, unfixierten und acetonpräfixierten, sind Nucleus und Nucleolus frei von histochemisch nachweisbaren Dehydrogenasen (Abb. 15, 16, 19 und 20). Nur ein einziges Mal, nämlich in Calyptrazellen einer 14tägigen Kürbispflanze, stellte sich im NAD-MDH-Medium eine deutliche Kernfärbung ein. Da dieser Tatbestand nicht reproduzierbar war, sei er hier als Ausnahme nur am Rande mitgeteilt.

Es hat hie und da, besonders in Geleitzellen und Zellen meristematischer Gewebe, den Anschein, als würde an der Kernmembran eine enzymatische Reduktion des Tetrazoliumsalzes stattfinden (Abb. 20). Allerdings mag auch der in solchen Zellen stets beobachtete Kranz von eng um den Kern gescharten enzymatisch wirksamen Partikeln eine aktive Randzone vortäuschen.

### 3. Verbreitung der Dehydrogenasen im Cytoplasma

Mono- und Diformazan können im Cytoplasma sowohl diffus als auch in umschriebenen Bezirken verteilt sein.

#### a) Diffuse Färbung

«Schlauchköpfe» der sekundär gebildeten Siebzellen von *Cucurbita*, *Cucurbita*-Geleitzellen, die Zellen der Drüsenhaare und des Narbenepithels von *Cucurbita*, gewisse Zellen in der parenchymatischen Leitbündelscheide der Blattspreite von *Zea* (Abb. 30, DIF), Aleuron, Scutellumepithel und -parenchym (Abb. 15 und 33), dann überhaupt embryonale und meristematische Gewebe fallen durch ihren Reichtum an diffus verteiltem Mono- und Diformazan auf. Die NAD-MDH, die als einzige Dehydrogenase daraufhin untersucht wurde, kommt auch nach der Acetonfixierung noch diffus zerstreut im Cytoplasma zum Vorschein. Dass die NADP-abhängigen Enzyme etwa weitgehend oder ausschliesslich diffus im Cytoplasma verbreitet wären, kann anhand der vorliegenden Präparate nicht behauptet werden (Abb. 13, 21, 29 und 33). Der diffuse Charakter mag am ehesten noch bei der G-6-PDH deutlich werden (Abb. 33), während die SDH und die ICDH vorzugsweise an Partikeln zu haften scheinen (Abb. 13 und 21).

#### b) Färbung cytoplasmatischer Einschlüsse

Bei allen untersuchten Dehydrogenasen kann das gebildete Formazan die Gestalt von kreisrunden, ovalen, stäbchenförmigen, filamentösen oder amöboid gelappten Partikeln annehmen. Die Partikelgrösse schwankt zwischen  $0,3 \mu$  und mehr als  $3 \mu$ . Der überwiegende Teil aller schwach gefärbten Partikeln bewegt sich in der Grössenordnung von  $0,3-0,6 \mu$ , derjenige der stark gefärbten im Bereich von  $0,6-1,2 \mu$ . Apicale Meristeme, junges Grundgewebe, junge Epidermis (Abb. 13), sich differenzierendes Leitgewebe (Abb. 16 und 17), Aleuron, Scutellum- und Narbenepithel zeichnen sich durch eine auffallend hohe Zahl an grossen, stark gefärbten Partikeln aus. Diese Gewebe pflegen sich deutlich von der Umgebung mit kleineren Partikeln abzuheben (Abb. 17). Innerhalb eines bestimmten Gewebes brauchen die Partikeln einer bestimmten Grössenklasse nicht bei allen Dehydrogenasen gleich häufig in Erscheinung zu treten. So macht die Wirkung der ICDH in Narbenepithel und junger Blütenstielepidermis von *Cucurbita* eine Fülle  $0,8-1,5 \mu$  grosser Partikeln neben zahlreichen kleinen und kleinsten Teilchen ( $0,4 \mu$ ) sichtbar (Abb. 13), während dieselben Gewebe nach einer Inkubation im G-6-PDH-Medium nur mit einer Unsumme dieser kleinen und kleinsten Partikeln übersät sind. Es ist aber fraglich, ob hierbei ausschliesslich eine andere Organellenpopulation wirksam gewesen ist, denn im Phasenkontrast sieht es manchmal danach aus, als würde nicht jede einzelne Farbpartikel, sondern eine ganze Partikelgruppe einer Zellorganelle entsprechen.

Die Partikeln lassen häufig einen dunkel gefärbten, bei den grösseren bis  $0,4 \mu$  dicken Rand erkennen, der eine helle Innenfläche umfasst (Abb. 13 und 17, Pfeile). Der Ring, welcher die kreisrunden Partikeln begrenzt, ist mitunter nicht völlig geschlossen, sondern säumt als Halbmond den hellen Binnenraum (Abb. 13, Doppelpfeil). Das körnige Aussehen mancher Ränder (Abb. 17, Doppelpfeile) berechtigt zur Frage, ob wirklich alle gefärbten Gebilde einheitliche Partikeln darstellen oder ob sie nicht auch dadurch zustande kommen konnten, dass sich einige kleinere Teilchen, zum Beispiel um ein Fetttröpfchen, mehr oder weniger kompakt zusammenschlossen.

Stärkeeinschlüsse, welche die Identifikation der enzymatisch aktiven Zellorganellen erleichtern würden, haben mittels polarisierten Lichts nirgends entdeckt werden können. Es ist jedoch sehr wohl möglich, dass etwa vorhandene Stärke im Verlaufe der Experimente unter den gegebenen Bedingungen entfernt oder abgebaut worden ist.

Man muss die Annahme in Frage stellen, sämtlichen im Cytoplasma beobachteten umschriebenen Farbbezirken lägen Zellorganellen von lichtoptisch wahrnehmbarer Grösse zugrunde. Lokale Formazanansammlungen, sei es in der cytoplasmatischen Grundsubstanz oder an dicht beisammen liegenden Membranen des endoplasmatischen Reticulums, vermöchten ebenfalls den Eindruck gefärbter Zellorganellen von lichtmikroskopischer Grösse zu vermitteln. Diesen Umstand hat man speziell bei schwächer gefärbten und daher weniger scharf umrissenen Farbbezirken zu beachten (vgl. Abb. 22: Inneres der Siebzelle, Pfeile).

Chloroplasten. Die Antwort auf die Frage, welche der geprüften Dehydrogenasen den Chloroplasten zu Gebote stehen, stösst auf Schwierigkeiten. Einmal fällt der Durchmesser der Grana ( $0,3-0,7 \mu$ ) mit dem bei Partikeln gemessenen zusammen, zum andern sind die Chloroplasten oftmals förmlich in eine Hülle von Partikeln verpackt (Abb. 28, Doppelpfeile). Gelegentlich in partikelfreier Umgebung isoliert angetroffene Chloroplasten (Abb. 28, Pfeile) gestatten es, die oben geäusserte Frage mit gebührendem Vorbehalt zu beantworten.

Die Maischloroplasten verfügen demnach über eine G-6-PDH, NADP-MDH und NAD-MDH, die Kürbischloroplasten wahrscheinlich bloss über eine G-6-PDH und NADP-MDH. Die anderen Dehydrogenasen vermag die hier angewandte Nachweismethode nicht zu entdecken. Die nachgewiesenen Enzyme sind entweder streng auf die Grana beschränkt (Abb. 28, Pfeile) oder lückenlos über den ganzen Chloroplasten zerstreut (Abb. 30, CL). Im zweiten Fall bleibt offen, ob ausserdem das Stroma (Lamellen) oder nur eine grössere Zahl von Grana mit dem betreffenden Enzym ausgestattet ist.

Übrigens kommen inmitten einer Population immer wieder zahlreiche Chloroplasten vor, die das NBT nicht reduziert haben. Ein eigentümliches Verhalten offenbaren die Mesophyllchloroplasten einiger in Glucose-6-phosphat inkubierter Schnitte der Maisblattspreite: hier enthalten vornehmlich die adaxialen, der Blattoberseite und damit dem Licht zugewandten Chloroplasten den reduzierten Indikator. Ob diesem Verhalten eine tiefere Bedeutung zukommt, wäre weiterhin abzuklären.

Zuletzt sei noch angemerkt, dass der Eingriff des Gefrierens und Auftauens die photochemische Primärreaktion verunmöglicht. Werden Gefrierschnitte der Maisblattspreite in Standardkontrollmedien, denen entweder  $\text{NADP}^+$  oder  $\text{NAD}^+$  zugeetzt worden ist, während 4 Stunden bei Zimmertemperatur von einer 400-Watt-Lampe belichtet, so bleibt in den Mesophyllchloroplasten jede Reduktion des NBT aus, obgleich sowohl Apodehydrogenasen als auch Diaphorasen, die den Wasserstoff von den Cofermenten zum NBT übertragen, vorhanden sind, wie die Reduktion im Dunkeln in Anwesenheit von Substraten beweist.

Die nicht zur Photosynthese befähigten Stärkechloroplasten in der parenchymatischen Scheide der Maisblattspreitenbündel üben in G-6-PDH-, NADP-MDH- und NAD-MDH-Medien eine uniforme, schwache Reduktion des NBT aus. Die Reduktion scheint in denjenigen Scheidenzellen, die durch diffuse Färbung des Cytoplasmas hervorstechen, verstärkt zu sein (Abb. 30, Doppelpfeile). Ob die in der Parenchym-

scheide verschieden stark gefärbten Granula zu den Stärkechloroplasten gehören oder selbständige, mit diesen möglicherweise eng verflochtene Partikeln darstellen, kann aufgrund der vorliegenden Präparate nicht mit Sicherheit entschieden werden (Abb. 28; Abb. 30, Pfeile).

#### *D. Verbreitung der Dehydrogenasen in den Geweben*

Es ist vorzuschicken, dass sich die Beschreibung der Dehydrogenasenaktivität einzelner Gewebe auf grobe Schätzungen stützt. Um die in den Zellen beobachtete Aktivität genauer berechnen zu können, müsste man sie in Beziehung zur gegebenen Plasmamenge setzen.

##### 1. Bildungsgewebe

Meristeme ragen durch die Fülle der in ihnen waltenden Dehydrogenasen hervor. Dies gilt für apicale und – begrenzt – für Restmeristeme.

###### *a) Apicalmeristeme*

###### *α) Spross*

Tunica und Corpus der End- und Seitenknospen erzeugen eine gleichmässige, basalwärts über das Grundmeristem kontinuierlich abnehmende Färbung (Abb. 1 und 5). Die Tunica mag gelegentlich stärker gefärbt sein (Abb. 1). Abbildung 2 weist auf eine betontere Farbreaktion im Bereich der präsumptiven Blattanlage innerhalb des Flankenmeristems hin; Abbildung 3 zeigt einen Vegetationskegel mit seitlich gegen ein Blattprimordium verschobener Aktivitätszone. Blattprimordien und jüngste Blättchen sind vollständig gefärbt (Abb. 5; Abb. 6, BL), bei älteren Blättchen ist der Farbstoff apical (Abb. 4), marginal (Abb. 6, MAR) oder adaxial an der Basis (Abb. 3, linke untere Bildecke; Abb. 6, AD) konzentriert.

Die Sprossvegetationspunkte sind schon in jüngsten Keimlingen eine Stätte hoher enzymatischer Reduktion des Tetrazoliumsalses.

Das sich differenzierende Procambium hebt sich durch dunklere Tönung vom umliegenden Grundgewebe ab (Abb. 6, PC).

###### *β) Wurzel*

Quellende Maissamen sparen im Wurzelvegetationskegel einen Raum aus, in welchem die Enzyme des Tricarbonsäurezyklus relativ schwächer vertreten zu sein scheinen (Abb. 7). Es sieht danach aus, als bestünde zu Beginn der Keimung ein enzymatisches Ruhezentrum, das den Bezirk der Initialzellen umfasst. Mit fortschreitender Keimung verschwindet es. Die G-6-PDH breitet sich schon in jüngsten Keimlingen gleichmässig über den ganzen Wurzelapex aus.

Figur 1 gibt schematisch den Grad der enzymatischen NBT-Reduktion in der Maiswurzelspitze wieder. Danach sinkt die Reduktion im Grundmeristem stetig, während sie in Protoderm und Procambium ansteigt. Im Cortex der Differenzierungszone sind die an die Rhizodermis angrenzenden Zellen durch tiefere Färbung gekennzeichnet (vgl. auch Abb. 11), in der Calyptra die mittleren Zellschichten (vgl. auch Abb. 8).

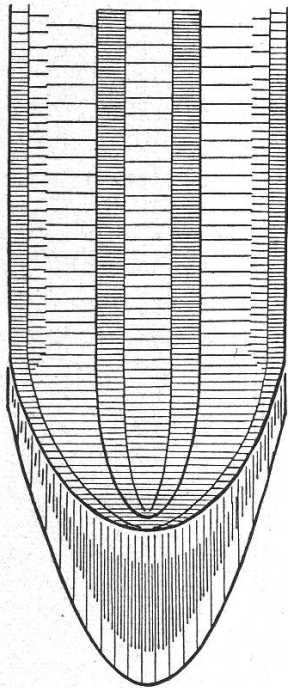


Fig. 1

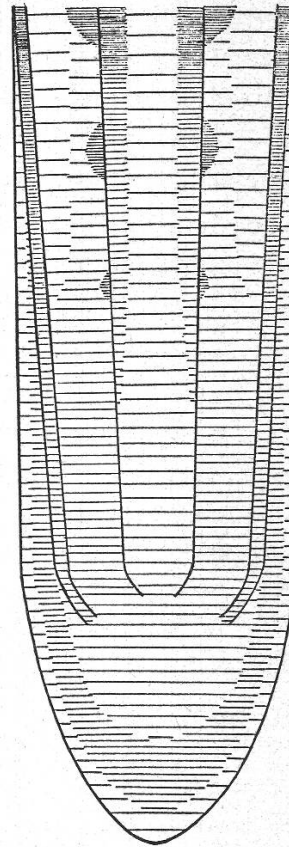


Fig. 2

Figur 1

Schema der enzymatischen NBT-Reduktion in der Wurzelspitze von *Zea mays*. Die Bildung des Diformazans nimmt im Grundmeristem stetig ab, während sie in Protoderm und Procambium ansteigt. Im Cortex der Differenzierungszone sind die an die Rhizodermis angrenzenden Zellschichten durch tiefere Färbung gekennzeichnet, in der Calyptra die mittleren Zellschichten

Figur 2

Schema der enzymatischen NBT-Reduktion in der Wurzelspitze von *Cucurbita pepo*. Die Region der zukünftigen Rinde reagiert deutlich stärker als diejenige der Initialen, des späteren Marks und der inneren Calyptra. Ein Mantel von etwas dichter gefärbten Cortezellen umgibt in der Differenzierungszone den Zentralzylinder, die Farbdichte steigert sich im Bereich einer Nebenwurzelsanlage

Über die Verhältnisse in der Kürbiswurzelspitze orientieren Figur 2 und Abbildung 9. Die Region der zukünftigen Rinde reagiert deutlich stärker als diejenige der Initialen, des späteren Marks und der inneren Calyptra. Ein Mantel von etwas dichter gefärbten Cortezellen umgibt in der Differenzierungszone den Zentralzylinder, die Farbdichte steigert sich im Bereich einer Nebenwurzelsanlage (s. auch Abb. 24, NW).

#### b) Restmeristeme

##### α) Intercalares Meristem (Mais)

Die ungefärbten meristematischen Zellreihen der intercalaren Wachstumszone, welche Grund- und Leitgewebe formen, beginnen sich, zunächst spärlich, zu färben, sobald sie in den Differenzierungsprozess eingetreten sind. Die zahllosen sich differen-

zierenden Leitbündel bieten mit ihrer fulminanten Formazanproduktion ein eindrucksvolles Bild (Abb. 31). Die inneren, bereits differenzierteren, zum Teil undurchsichtig dicht gefärbten Zellen eines Procambiumstranges werden jeweils von lockerer gefärbten, weniger weit entwickelten umrahmt.

β) Meristem des primären Dickenwachstums (Mais)

Dieses Gewebe ist im Ruhezustand wie das intercalare Meristem ungefärbt. Wenn es Grundgewebe abzusondern anfängt, färbt es sich mässig.

γ) Meristem des sekundären Dickenwachstums: Cambium (Kürbis)

Es überrascht nicht, Cambium, das seine Funktionen offensichtlich noch nicht aufgenommen hat, frei von Formazanniederschlägen zu sehen. Doch auch in Geweben, in denen sich ein ausgedehntes Dickenwachstum abspielt, kann man eine Reduktion des Tetrazoliumsalzes nur an den Orten höchster Stoffwechselaktivität konstatieren. Diese Orte mögen sich über einen relativ grossen Cambiumbereich erstrecken (Abb. 32, besonders an den Flanken des Leitbündels), können aber auch auf eine enge Zone beschränkt sein. Aus Abbildung 10 wird ersichtlich, dass bloss die späteren Begleitzellen (Terminus nach Resch, 1955) der hier noch nicht sekundär verdickten Gefässe eine rege Tätigkeit entfalten.

## 2. Abschluss- und Ausscheidungsgewebe

### a) Innere Abschlussgewebe

#### α) Endodermis und Perizykel

Der histochemische Nachweis der Dehydrogenasen äussert sich in der Endodermis nicht anders als in den übrigen Cortexzellen (Abb. 23); der Betrag an Formazan verringert sich in der Masse, wie die Zellen ihre endgültige Ausgestaltung erfahren; er erreicht schliesslich im Tertiärstadium einen verschwindenden Umfang.

Der Perizykel bringt in der Differenzierungszone unmittelbar beim Protophloem (Abb. 23, PCL) und Protoxylem (*Cucurbita*: Induktion der Nebenwurzeln; Abb. 24) eine gesteigerte Enzymtätigkeit zum Ausdruck. Diese klingt ab, je mehr sich der Perizykel dem sklerifizierten Zustande nähert.

#### β) Bündelscheide (Mais)

In der Scheide der Stengel- und Blattscheidenleitbündel vermindert sich die Fähigkeit zur enzymatischen NBT-Reduktion ebenfalls mit zunehmendem Alter; sie sinkt in den sekundär verdickten, sklerenchymatischen Zellen auf ein Minimum (vgl. Abb. 25–27 und Abb. 31). Die parenchymatische Scheide der Spreitenleitbündel hält dagegen ein hohes Reduktionsniveau aufrecht (Abb. 28 und 30). Möglicherweise entfällt ein Teil der an Granula gebundenen enzymatischen Aktivität auf die Stärkechloroplasten; einzelne Zellen geben überdies, wie schon erwähnt, eine starke diffuse Färbung des Cytoplasmas zu erkennen.

### b) Äussere Abschlussgewebe

#### α) Epidermis

Epidermis, die sich differenziert, gehört zu den prominentesten Tetrazoliumreduktoren überhaupt. Das gilt gleicherweise für die Rhizodermis (Abb. 7, 8 und 11;

Fig. 1 und 2) wie für die Stengel-, Blatt- (Abb. 6 und 26) oder Fruchtblattepidermis (Abb. 12). In der jungen Maisepidermis besitzen Stomata (Schliess- und Nebenzellen) und Korkzellen eine weitaus höhere Reduktionsrate als das umgebende Hautgewebe. Junge Kürbisepidermis fesselt durch die ungewöhnlich tiefe Färbung der Haare, insbesondere der Drüsenhaare.

Wurzelhaare zeigen hingegen keine auffallende Reaktion.

In junger Mais- und Kürbisepidermis kommen reichlich die früher (unter III C 3 b) beschriebenen grossen und dunkel gefärbten Partikeln vor. Ihre Zahl scheint mit fortschreitender Entwicklung des Gewebes zurückzugehen (Abb. 13).

Epidermis, die ihre Entwicklung abgeschlossen hat, beantwortet einzig noch in den Stomata (beim Kürbis nur in den Schliesszellen) und allenfalls in Kork- und Haarzellen den Tetrazoliumtest positiv (Abb. 30).

#### β) Abschlussgewebe mit sekretorischer oder resorptiver Funktion

Die Drüsenepithelien von Narbe und Scutellum und das Aleuron fallen durch eine markante Tetrazoliumreduktion auf (Abb. 14 und 15). Im Aleuron vergrössert sich die Reduktion während der Keimung; man begegnet freilich immer wieder einzelnen kaum aktiven Zellen. Noch in 13 Tage alten Keimlingen hält die reduzierende Wirkung von Aleuron und Scutellumepithel ungeschmälert an (Abb. 15).

### 3. Leitgewebe

#### a) Xylem

Das Xylem der beiden untersuchten Pflanzenarten reagiert grundsätzlich gleich. In den unreifen Proto- und vor allem Metaxylemgefässen von Wurzel und Spross laufen kräftige Dehydrierungsvorgänge ab (Abb. 23, PX; MX; Abb. 16; Abb. 24, PX). Es sind Ringgefässe in Wurzel und Spross von *Zea* beobachtet worden, in welchen die enzymtragenden Partikeln den späteren sekundären Wandverdickungen entlang angesiedelt waren.

In den Begleitzellen schwillt die Dehydrogenasenaktivität während der sekundären Verdickung der Gefässwände an, strebt aber ihrem Höhepunkt erst zu, wenn der Prozess der Sekundärwandbildung bereits abgeschlossen ist (Abb. 25, 26, 31 und 32); sie dauert im Protoxylem selbst dann noch an, wenn die Tracheiden schon zerstört sind (Abb. 27). Die Entwicklungsphase der Maissprossleitbündel, die der Differenzierung des Metaphloems und -xylems vorangeht, ist dadurch charakterisiert, dass fast die gesamte Dehydrogenasentätigkeit im Protoxylem versammelt ist (Abb. 25).

In den Begleitzellen der Tüpfeltracheen von Mais und Kürbis kann man eine Konzentration der dehydrierenden Fermente über den Tüpfeln bemerken. In der Maiswurzel bekundet nur das Begleitparenchym der unreifen Gefässe eine ausgesprochene Aktivität, dasjenige der reifen ist davon fast vollständig frei.

Die Leitbündel der Coleoptile und des 1. Internodiums junger sowie der verholzenden Internodien älterer Maispflanzen zeigen ein gänzlich ungefärbtes Xylem.

Im sekundären *Cucurbita*-Xylem behaupten die Begleitzellen, was die Färbungsintensität angeht, den Vorrang vor den übrigen Holzparenchymzellen und den nur gering gefärbten Fasern.



## b) Phloem

Die NBT-Reduktion wächst rapid an, sobald das Procambium Phloem auszusondern beginnt. Anhand der Abbildungen 18 bis 21 kann nun verfolgt werden, wie sie sich während der Entwicklung der primären Sieb- und Geleitzellen des *Cucurbita*-Sprosses kundgibt. Danach scheint sich die Konzentration des Farbstoffes in den Siebzellen bis zum Reifestadium sukzessiv zu verkleinern. Immerhin kann auch noch die ontogenetisch reife Siebzelle über eine stattliche Anzahl von Partikeln mit nachweisbarer Dehydrogenasenaktivität gebieten (Abb. 21). Allerdings zeigen unter den ausdifferenzierten Sieb- und Geleitzellensystemen hin und wieder die älteren, die sich an der Peripherie der Leitbündel befinden, nur noch eine schwache oder gar keine Reduktion mehr.

Die Reduktion nimmt in Sieb- und Geleitzellen gleichsinnig ab. Ausnahmsweise lässt sie sich in Siebröhren, die durch Calloseverschluss der Siebplatten unwegsam geworden sind, noch feststellen, während sie aus den dazugehörigen Geleitzellen bereits vollständig geschwunden ist, eine Beobachtung, die im Hinblick auf einen autonomen Energiehaushalt der Siebröhren mitteilenswert erscheint.

In jungen Siebelementen kann man die Enzymträger um den Kern (Abb. 18), in jungen und reifen an den Querwänden (Abb. 18) oder an der den Geleitzellen zugewandten Seite angehäuft finden. Eine perinucleäre Anordnung findet sich nicht selten auch in Geleitzellen (Abb. 19 und 20).

Die Geleitzellen bewirken im Rahmen des primären Phloems die augenfälligsten Formazanniederschläge. Innerhalb der Zellen einer Reihe mögen dabei beträchtliche Unterschiede bestehen. Phloemparenchymzellen manifestieren – ausser im Proto-phloem der Wurzel, das noch keine Geleitzellen kennt (Abb. 24, PP) – ein erheblich schwächeres Reduktionsvermögen als Geleitzellen (Abb. 19 und 32).

Für das sekundäre *Cucurbita*-Phloem gilt wie für das primäre: stärkste Reaktion in den Geleitzellen, schwächste im Parenchym; auch hier funktioniert in den reifen Siebröhren der enzymatische Apparat der Atmung (Abb. 22). Der an den Siebröhren akkumulierte «Schleim» färbt sich rot an (Monoformazan).

Bei *Zea* markieren die Parenchymzellen des Proto-phloems (Abb. 23, PP-PAR) beziehungsweise die Geleitzellen des Metaphloems (Abb. 26, 27, 29 und 31) in Wurzel und Spross die absolut intensivste Formazanproduktion. In reifen Siebröhren (Abb. 29) und in Metaphloemparenchym kann die Anwesenheit dehydrierender Enzyme aufgedeckt werden.

### 4. Festigungsgewebe: vergleiche auch Abschlussgewebe

Collenchyme und junge, noch wenig verdickte Sklerenchyme reagieren positiv, differenzierte Sklerenchyme negativ (vgl. Entwicklung der Bündelscheide: Abb. 25–27).

### 5. Grundgewebe: Xylem- und Phloemparenchym siehe unter Leitgewebe

Das Grundgewebe wachsender Wurzel- und Sprossabschnitte (Rinde, Mark u. a. m.) bildet bedeutend mehr Formazan als dasjenige ausgewachsener Pflanzenteile. Querschnitte des Maissprosses oberhalb des Vegetationspunktes stellen diesen Unter-

schied besonders anschaulich dar: das farbstoffreichere Grundgewebe der inneren, jüngeren Blätter kontrastiert deutlich mit dem farbstoffärmeren der äusseren, älteren (Abb. 26 und 27).

Die Parenchyme, die mit besonderen Aufgaben betraut sind, seien kurz beschrieben: die innerste Zellschicht der Kürbisstengelrinde, die als Stärkescheide differenziert ist, übertrifft die übrigen Cortexzellen an Formazangehalt. Das Speicherparenchym des Maisscutellums ist vorwiegend in der Nachbarschaft des Epithels und rings um epithelnahes Procambium gefärbt (Abb. 33). Das reife Maisendosperm bleibt, vom Aleuron abgesehen, vollkommen blank. Beim Kürbissamen fällt in den Kotyledonen das subepidermale Parenchym durch stärkere Aktivität auf. Die Parenchyme von Narbe (sog. stigmatoides Gewebe) und Nektarium betreiben eine starke Reduktion des Redoxindikators (Abb. 14). Assimilationsparenchyme verdanken das ausgiebig gebildete Formazan neben den Chloroplasten den zahlreichen anderen, häufig eng um diese gelagerten Zellorganellen.

#### 6. Gewebe der sexuellen Reproduktion

Mikro- und Makrosporen, Eiapparat (Antipoden ebenfalls?), die inneren Zellschichten der Pollensackwand und der Nucellus weisen eine grosse Farbdichte auf (Abb. 34 und 35). Der Nucellusbereich, der sich von der Embryosackzelle oder vom Embryosack zur Mikropyle erstreckt, und die tapetumartige Nucelluswand des Embryosackes sind häufig durch tiefere Färbung hervorgehoben.

### IV. Interpretation und Diskussion

#### *A. Besprechung der allgemeinen Beobachtungen über Aktivität und Vorkommen der untersuchten Dehydrogenasen*

Folgende Faktoren können einen schwachen oder negativen Reaktionsausfall bedingen: 1. tatsächlich schwache oder fehlende Leistung oder Abwesenheit des betreffenden Enzymsystems (Dehydrogenase oder Diaphorase) (Cascarano und Zweifach, 1959); 2. partieller oder totaler Verlust der Apodehydrogenase oder Diaphorase; 3. ungenügender oder mangelnder Zutritt einzelner Testreagentien zum Enzym (Jámbor, 1960); 4. Untauglichkeit des Inkubationsmediums, beruhend auf inadäquatem pH (Hess et al., 1958), unpassendem Substrat usw. Dabei ist es durchaus denkbar, dass die Faktoren, welche einen schwachen oder negativen Reaktionsausfall verursachen, von Zelle zu Zelle, von Gewebe zu Gewebe oder von Pflanze zu Pflanze wechseln können.

Die beobachtete Reduktionsschwäche der GADH könnte in ungeeigneten Versuchsbedingungen begründet liegen. Dafür spricht auch der träge Reaktionsverlauf. Möglicherweise ist das Substrat oder das pH schlecht gewählt. Die NAD-gebundenen Aldehyddehydrogenasen wirken *in vitro* optimal bei pH 8,7 (Long et al., 1961, S. 321). Allerdings waren Schnitte, die einmal bei pH 8,6 inkubiert worden waren, nicht stärker als die bei pH 7,6 inkubierten gefärbt. Vielleicht handelt es sich bei dem als GADH bezeichneten Ferment in Wirklichkeit um eine unspezifische Aldehyddehydrogenase, die den Glycerinaldehyd nur schlecht zu verwenden vermag. Die häufige Rot- bis Violettfärbung des Inkubationsmediums lässt auch eine Diffusion des Fer-

menten in Betracht ziehen. Wie dem auch sei, solange diese Dehydrogenase nicht klar identifiziert ist, erübrigt es sich, die mögliche stoffwechselphysiologische Bedeutung ihres Vorkommens oder Fehlens in Geweben und Organen näher zu ergründen. Ihr Nachweis lohnt sich vor allem deshalb, weil dabei die Stellen stärkerer Aktivität besonders deutlich hervortreten (vgl. Abb. 2, 3, 4 und 23).

Die trübe Färbung des Succinatmediums kündigt Löslichkeit und Diffusion der SDH an.

Obwohl die G-6-PDH bei Zentrifugaten aus den löslichen Fraktionen gewonnen wird und Hess et al. (1958) einen totalen Verlust des Fermentes registrieren mussten, wenn sie ihre Schnitte vor der Inkubation für 10 Minuten bei 20 °C in hypotonische Puffer- oder isotonische (0,25 m) Saccharoselösung tauchten, vermochte in den hier unterbreiteten Experimenten niemals (auch nicht nach längeren Waschzeiten) ein negatives und einzig in der Kürbiswurzel ein unsicheres Ergebnis (schwache, nur bis zum Monoformazan gediehene Reduktion) wahrgenommen zu werden. Welche Bewandnis es mit diesem ungewissen Resultat hat, bedürfte weiterer Abklärung; da auch die NADP-MDH in Kürbiswurzelschnitten schwächer als sonst reagierte, wäre die Möglichkeit eines Defekts der NADP-Diaphorase nicht ausgeschlossen. Wie dem auch sei, die G-6-PDH zählt jedenfalls unter den untersuchten Dehydrogenasen zu den am lebhaftesten reagierenden und am weitesten verbreiteten. Dieses Verhalten passt gut zur Rolle, die dem Pentosephosphatzyklus, als dessen Initiatorin die G-6-PDH figuriert, im Stoffwechselgeschehen allgemein zugesprochen wird: die Zelle zwar weniger mit Energie, dafür aber um so reichlicher mit reduziertem, für die Synthese von Fettsäuren, Ascorbinsäure, Carotinoiden und anderen sekundären Pflanzenprodukten unumgänglichem NADP, mit den zur Synthese der Nucleotide benötigten Pentosen und allenfalls schliesslich mit dem CO<sub>2</sub>-Akzeptor Ribulose-1,5-diphosphat zu versorgen.

Die mehrfach selbst nach Saccharosevorbehandlung demonstrierten negativen Befunde des ICDH-Tests fordern eine Erläuterung. Sollten diese Befunde einem tatsächlichen Mangel des Fermentes entsprechen, so würde das besagen, dass dadurch in den Zellen der betreffenden Gewebe der Krebszyklus nicht mehr funktioniert.

Doch auch andere Faktoren als natürliche Abwesenheit der ICDH wären in der Lage, einen negativen Testbefund auszulösen: 1. die Aconitase, welche das zugegebene Citrat in Isocitrat umwandelt, oder die ICDH selber könnten artefiziell (z. B. durch den Eingriff des Gefrierens und Auftauens) von ihren Bindungsorten freigesetzt worden und anschliessend abhanden gekommen sein; 2. anstatt NADP<sup>+</sup> könnte NAD<sup>+</sup> in den fraglichen Organen und Geweben als Coferment der ICDH fungieren.

Was den missglückten Nachweis der GDH in Gefrierschnitten von Maissamen anbelangt, so ist, besonders in Anbetracht der langen Waschzeiten, natürlich stets die Möglichkeit einer vollständigen Diffusion des Enzyms in die Waschflüssigkeit ins Auge zu fassen. Da aber auch Gefrierschnitte anderer Pflanzenabschnitte oftmals während langer Zeit (bis zu 5 Stunden) in den Waschbädern verharrten und danach im GDH-Medium eine tiefblaue Farbe annahmen (wenngleich die nach langer Inkubationsdauer zuweilen aufgetretene Färbung des Mediums auf eine gewisse Diffusion hindeutete), so besteht wenig Grund zur Vermutung, der missglückte Nachweis der GDH in Maissamen sei durch einen künstlich herbeigeführten, vollständigen Austritt des Enzyms bedingt gewesen. Bereits Jensen et al. (1951) haben in Maisembryoextrakten die GDH vergeblich nachzuweisen versucht. Sie erklären den Fehl-

schlag damit, dass die GDH, würde sie auch zur Stelle sein, unfähig wäre, den von ihnen benützten Indikator (TTC) zu reduzieren, weil dessen Redoxpotential unter demjenigen des Enzyms läge. Es gibt nun aber Hinweise darauf, dass jedes Tetrazoliumsalz stets an einer dafür bezeichnenden Stelle der Atmungskette reduziert wird, ungeachtet der je spezifischen Dehydrogenase. Aufgrund der Angaben von Farber et al. (1954 und 1956 a) und Nachlas et al. (1958 a), wonach im Falle der NAD- und NADP-abhängigen Dehydrogenasen sowohl das BT als auch das NBT von den jeweiligen Diaphorasen reduziert werden, darf man wohl annehmen, dass das TTC, welches im SDH-System übrigens wie das BT die Elektronen von der Cytochromoxydase empfängt (Nachlas et al., 1960), in gleicher Weise, das heisst von den Diaphorasen reduziert wird. Die Erklärung von Jensen et al. mutet daher im Lichte dieser Annahme wenig wahrscheinlich an. Es leuchtet nicht ein, weshalb gerade die GDH, obgleich vorhanden, nicht nachweisbar sein sollte, wenn doch der Nachweis anderer NAD-abhängiger Dehydrogenasen offenbar keinerlei Mühe bereitet. Nun zeigen auch die im Kapitel III der vorliegenden Arbeit zusammengefassten Versuchsergebnisse, dass die NAD-Diaphorase in Maissamen vorkommen muss, denn das NBT wurde durch Substratwasserstoff, den die NAD-MDH und GADH erschlossen haben, reduziert. Die GDH ihrerseits konnte einesteils in Samenanlagen, andernteils in Scutellum, Aleuron, Wurzel und Spross 13tägiger Maispflanzen entdeckt werden. Man darf darum folgern, dass dieses Enzym in Samen und jüngsten Keimlingen fehlt oder inaktiviert ist und erst im Laufe der Keimung neugebildet oder reaktiviert wird.

Die Schlüsselposition, welche die GDH im Proteinstoffwechsel innehat, könnte diesen Vorgang der Regeneration oder Reaktivierung verständlich machen. Das Enzym vermag, indem es  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure reduktiv zu Glutaminsäure aminiert, den aus dem Boden aufgenommenen Stickstoff zu fixieren und damit die rapide Eiweissvermehrung, die in den Meristemen vonstatten geht, zu gewährleisten. Die GDH darf also in Samen und jüngsten Keimlingen ruhig schlummern, muss jedoch spätestens zu dem Zeitpunkt wieder in Aktion treten, in dem die Eiweissvorräte in den Speicherorganen erschöpft sind und der Keimling darauf angewiesen ist, Stickstoff aus dem Boden zu beziehen.

Die bisher besprochenen Differenzen zwischen einzelnen Dehydrogenasen betrafen das generelle Vorkommen in Gefrierschnitten verschiedener Pflanzenteile und nicht etwa die Lokalisation innerhalb bestimmter Gewebe. Wo immer nämlich in pflanzlichen Organen ein positiver Nachweis sämtlicher Dehydrogenasen gelang, brachte er hinsichtlich der Gewebslokalisierung in der Regel keine Unterschiede einzelner Fermente ans Licht; die Stärke der Formazanproduktion als Ausdruck der vorhandenen Enzymaktivität und -menge änderte sich je nach Entwicklungsalter und Funktionszustand der Gewebe bei allen Dehydrogenasen gleichsinnig. Diese Beobachtungen stehen in deutlichem Gegensatz zu den an tierischen Organismen gemachten, wo innerhalb der Gewebe ein und desselben Organes nicht nur zwischen der NAD-Diaphorase, der NADP-Diaphorase und dem SDH-Enzymkomplex, sondern auch zwischen den verschiedenen NAD- bzw. NADP-abhängigen Dehydrogenasen Lokalisations- und Aktivitätsunterschiede ausgemacht werden konnten (Rogers, 1953; Strominger und Lowry, 1955; Farber et al., 1954 und 1956a; Hess et al., 1958; Nachlas et al., 1958 a und b; Wattenberg, 1958; Cascarano und Zweifach, 1959).

Aus der gleichartigen Verbreitung der Dehydrogenasen in pflanzlichen Geweben folgt nicht zwingend eine solche der NAD- und NADP-Diaphorasen, das heisst der unmittelbar das NBT reduzierenden Enzyme. Die Tätigkeit einer Transhydrogenase könnte das Fehlen einer der beiden Diaphorasen verbergen. Da es nach neueren Forschungen zweifelhaft ist, ob die Oxydation des reduzierten NADP durch die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und die anschliessenden Glieder der Atmungskette mit Phosphorylierungen gekoppelt ist, und jedenfalls eine mit der NADP-Isozitrone Säuredehydrogenase vergesellschaftete Transhydrogenase gefunden werden konnte (Kaplan et al., 1956; Ernster und Navazio, 1957), muss man stets die Möglichkeit einer enzymatischen Übertragung des Wasserstoffs vom reduzierten NADP auf das oxydierte NAD berücksichtigen. Selbst bei unterschiedlicher Lokalisation der beiden Diaphorasen könnte in diesem Falle das Bild einer einheitlichen Reduktion des Tetrazoliumsalzes resultieren.

### *B. Bedeutung der cytochemischen Befunde*

#### 1. Kern

Verschiedene Autoren, wie Padykula (1952), Neumann und Koch (1953), Rutenburg et al. (1953) und Nachlas et al. (1957), gaben bekannt, dass die Zellkerne in ihren in SDH-Medien inkubierten Schnitten ungefärbt blieben. Nachlas et al. (1957) betonen jedoch, daraus dürfe nicht unbedingt auf Abwesenheit des Enzyms geschlossen werden, denn es sei möglich, dass die benutzten Tetrazoliumsalze nicht in den Kern eintreten oder dort nicht gebunden werden. In der Tat haben Farber et al. (1956 b) demonstrieren können, dass unreduziertes BT – zumindest im Bereich der von ihnen geprüften Gewebe der Rattenniere – in den Zellkernen nicht gebunden wird. Nun haben aber bereits früher Neumann und Koch (1953) und neuerdings Tewari und Bourne (1962a und b) durch SDH bedingte Formazan-niederschläge in den Kernen (z. T. in den Nucleolen) von Grosshirnganglienzellen beziehungsweise Spinalganglienzellen und Neuronen gefunden. Ebenso berichten Chatterjee und Mitra (1962) über eine nucleoläre Lokalisation der SDH in normalen und carcinomatösen Zellen der menschlichen Cervix. Die Erscheinung einer gestaffelten Reduktion des Tetrazoliumsalzes, gepaart mit einem eigentümlich strukturierten Formazanmuster, wie sie die Photographien von Tewari und Bourne dokumentieren, sowie die Tatsache, dass sich das Reduktionsprodukt des sowohl von Tewari und Bourne als auch von Chatterjee und Mitra verwendeten NBT nicht sekundär verlagert (Nachlas et al., 1957), weisen den Gedanken an ein Artefakt zurück.

All diese Befunde mahnen zur Vorsicht gegenüber Auffassungen, welche dem Zellkern ganz allgemein die Fähigkeit, unreduziertes Tetrazolium zu binden, absprechen. Das Bindungsvermögen könnte sehr wohl je nach Zellart oder Tetrazoliumsalz variieren.

Die unter III C 1 und 2 referierten Beobachtungen machen klar, dass das NBT in pflanzlichen Zellkernen – soweit untersucht – zwar durchaus gebunden, niemals aber enzymatisch reduziert zu werden pflegt. Man darf annehmen – und es gibt keine Anhaltspunkte für eine gegenteilige Annahme –, dass es ebenfalls von nucleären Fermentproteinen gebunden wird. Es ist nun denkbar, dass allfällige Dehydrogenasen beziehungsweise Diaphorasen im Nucleus nur lose verankert sind und durch das

Gefrieren und Auftauen von ihren Ankerplätzen losgelöst und ins wässrige Medium hinausgeschwemmt werden. Gegen diese Annahme spricht, dass auch in acetonpräfixierten Schnitten keine Kerndehydrogenasen nachweisbar waren. Würden die Kernenzyme allerdings überhaupt keiner Struktur verhaftet sein, dann vermöchte auch die Acetonpräfixierung nichts mehr auszurichten, und die Enzyme verschwänden restlos, falls wässrige Medien zur Anwendung kämen. Stern und Mirsky (1953 und 1954) haben in der Tat gefunden, dass Ratten- und Kalbslebernuclei in wässrigen Extrakten (0,25 m Saccharose) löslicher Enzyme, wie der G-6-PDH, der Adenosindesaminase und der Nucleosidphosphorylase, verlustig gehen, Weizenkeimnuclei hingegen, die in nichtwässrigen, organischen Lösungsmitteln isoliert werden, sich als der Ort der höchsten glycolytischen Aktivität entpuppen. Nuclei des Kalbsthymus bewahren auch in wässrigen Extrakten ihre löslichen Enzyme.

Nach Stern und Mirsky (1954) scheint die Fähigkeit des Zellkerns, lösliche Proteine zurückzuhalten, von inneren strukturellen Faktoren, wie der DNS-Konzentration, abzuhängen. Kalbsthymusnuclei enthalten 26 % DNS, diejenigen der Kalbsleber dagegen nur 15 %. Die beiden Autoren glauben, dass die Thymusnuclei in Saccharosemedien ein zäheres Gel bilden und dadurch einen Grossteil, wenn nicht gar die gesamte Menge aller löslichen Proteine zurückhalten.

Betz (1953), der ganze Maiskeimlinge 12 Stunden lang in TTC-Lösungen einlegte und darauf Handschnitte durch die gefärbten Wurzelspitzen anfertigte, gibt an, Formazankörnchen in geringer Zahl innerhalb des Kernes, besonders am Rande gegen den Nucleolus zu, doch nie im Nucleolus selber, bemerkt zu haben, und zwar mit Sicherheit nur in solchen Zellen, bei denen nicht nur der Nucleolus, sondern auch die äussere Begrenzung des Zellkerns deutlich zu erkennen gewesen sei, was bei lebenden meristematischen Zellen als ein Zeichen beginnender Desintegration gelten müsse und seiner Meinung nach von der Präparation herrühren dürfe, denn er habe es stets nur in wenigen Zellreihen eines Schnittes beobachten können.

Im Vergleich zur Gefrierschnittmethode verbürgt Betzens schonende Untersuchung intakter Keimpflanzen zweifellos eine getreulichere Wiedergabe wirklicher Verhältnisse. Immerhin bleibt fraglich, ob Betz tatsächlich nucleuseigene Dehydrogenasen entdeckt hat. Das im Kern abgelagerte Formazan könnte nämlich dreifachen Ursprungs gewesen sein: 1. Das Formazan ist im Kern selber der reduzierenden Wirkung von nucleuseigenen Dehydrogenasen und Diaphorasen entsprungen. Dann müsste man voraussetzen, dass unreduziertes TTC entweder die unverletzte, wenn gleich poröse Kernmembran nicht zu passieren oder, was wahrscheinlicher wäre, in intakten Zellkernen nicht festgehalten zu werden vermag. Die Betzschen Versuche, bei denen der Wasserstoff einer unbestimmten Vielzahl endogener Substrate völlig unspezifisch auf das TTC übertragen worden sein kann, sagen selbstverständlich nichts Näheres über Art und Anzahl der an der Wasserstoffübertragung beteiligten Dehydrogenasen aus; es können ebensowohl glycolytische und Krebszyklusdehydrogenasen als auch nur solche des Nucleinsäurestoffwechsels wie Dihydroorotsäure- und Inosinsäuredehydrogenase am Werke gewesen sein. 2. Das Formazan ist im Kern selber aus der reduzierenden Wirkung von sekundär in den Kern gedrungenen cytoplasmatischen Dehydrogenasen und Diaphorasen hervorgegangen. 3. Das Formazan ist im Cytoplasma entstanden und erst nachträglich in den Kern gelangt.

Übrigens hat vielleicht auch bei dem unter III C 2 mitgeteilten Sonderfall von Kernfärbungen eine Infiltration degenerierender Calyptrazellkerne mit cytoplasma-

tischer NAD-MDH und eventuell NAD-Diaphorase stattgefunden. Wahrscheinlicher aber ist nach dem Gesagten, dass dank besonders günstigen kolloidalen Verhältnissen die löslichen Enzyme ausnahmsweise im Kern verblieben sind.

Fassen wir kurz zusammen: Man hat guten Grund, innerhalb des Nucleus pflanzlicher Zellen lösliche Dehydrogenasen der verschiedensten Stoffwechselbahnen (möglicherweise auch solcher des aeroben Zuckerabbaus) zu vermuten. Diese Enzyme entgehen jedoch einem Nachweisverfahren, das seinen Weg über Gefrierschnitte und wässrige Medien nimmt.

Inwiefern die Kernmembran mit Dehydrogenasen besetzt ist, ist schwer zu entscheiden. Das unreduzierte NBT wird jedenfalls in verstärkter Masse an die Membran adsorbiert (s. III C 1). Sharma und Bourne (1963) haben gelegentlich bei wenigen Individuen älterer Kulturen von *Trichomonas vaginalis* alle SDH-Aktivität um den Kern konzentriert gefunden (vgl. ihre Abb. 7, Pfeil L). Sie stellen allerdings die Frage, ob die Kernmembran selber aktiv sei oder ob die Färbung nicht viel eher von rings um den Kern konzentrierten, mitochondrienähnlichen Granula herrühre (S. 630). Wie dem auch sei, die perinucleäre Region beherbergt offensichtlich eine rege Stoffwechsellätigkeit. Literaturangaben bekräftigen diese Auffassung. Goddard und Seligman (1952) färbten Rattenschilddrüsenschnitte supravital mit BT in SDH-Medien an und erblickten den reduzierten Indikator zuerst in Dictyosomen und diesen benachbarten Mitochondrien, darauf in den unmittelbar den Kern umgebenden und zuletzt in den restlichen Mitochondrien. Antopol et al. (1955) beobachteten an lebenden Präparaten, dass die Formazankristalle zuerst in der Gegend um den Kern abgelagert wurden. Auch nach Betz (1953), Rutenburg et al. (1953) und Tewari und Bourne (1962a und b) bildet sich dort oftmals reichlicher Formazan als sonstwo im Cytoplasma. Die zuletzt genannten Autoren konnten anhand der Regaudschen Mitochondrienfärbung feststellen, dass der sich zuweilen gleichfalls anfärbende Nucleolus immer dann die Kernmembran berührte, wenn sich die Mitochondrien rings um den Nucleus scharten. Überdies zeigten ausser der SDH und der Cytochromoxydase eine Reihe weiterer Fermente wie die Cholinesterase, die Glucose-6-phosphatase und die 5-Nucleotidase zeitweilig eine perinucleäre Konzentration. Daraus leiten diese Autoren eine enge Arbeitsgemeinschaft zwischen Nucleolus und Mitochondrien ab. Zwischen den beiden Organellen bestehe ihrer Ansicht nach ein «chemical trade», ein Austausch von Metaboliten (wie  $\text{NAD}^+$  zu den Mitochondrien, ATP zum Kern). Da gemäss biochemischen Befunden weder Kern noch cytoplasmatische Partikeln das volle enzymatische Rüstzeug zur Nucleinsäuresynthese besitzen, müsse auch an einen Austausch der zur Synthese nötigen Vorstufen gedacht werden.

Die Hypothese von Tewari und Bourne gewinnt weiterhin an Überzeugungskraft, wenn man sich in Erinnerung ruft, dass bei höheren Pflanzen eine auffallende perinucleäre Konfiguration der enzymtragenden Partikeln vorwiegend in meristematischen Zellen, jungen Siebelementen und Geleitzellen zu geschehen pflegt (s. III C 2 und III D 3 b), in Zellen also, die einerseits sich zur Teilung anschicken oder Differenzierungsaufgaben obliegen, andererseits, wie die Geleitzellen, vermutlich für den Unterhalt kernloser Schwesterzellen mindestens teilweise aufkommen müssen. Da die enzymatisch aktiven Zellorganellen zunächst um den Nucleus, in der Folge aber auch an Querwänden (Siebzellen), längs späterer Wandverdickungen (Tracheidenelemente)

und über Tüpfeln (Tracheenbegleitzellen) in einer Weise angeordnet sind, die man nicht mehr zufällig, sondern schon planvoll nennen möchte, darf man wohl mit einigem Recht fragen, ob der Nucleus nach einem immanenten Plan die Zellorganellen lenkt und mit ihrer Hilfe Formveränderungen der Zelle, wie Teilung, Wachstum, Ausgestaltung, steuert oder die Erhaltung bestehender Strukturen überwacht. Eine Antwort auf diese Fragen scheint sich durch die neuesten Forschungen auf dem Gebiet der physiologischen Genetik anzubahnen.

## 2. Cytoplasma

### a) *Bedeutung der diffusen Färbung*

Folgende Umstände könnten zu einer diffusen Färbung des Cytoplasmas führen: 1. primär im Cytoplasma heimische, 2. sekundär aus Zellorganellen dorthin diffundierte Dehydrogenasen und Diaphorasen; 3. nichtenzymatische Reduktion des NBT («nothing dehydrogenase»); 4. nachträgliche Lösung des Monoformazans in Lipiden oder einheitliche Maskierung von Lipiden durch in der Nähe gebildetes Diformazan; 5. mehr oder weniger eng beieinanderliegende, locker gefärbte und somit nicht scharf umrissene Partikeln. In diesem Falle würde eine schwache, aufgelockerte diffuse Färbung erscheinen. Dicht gefärbte Partikeln sind jeweils deutlich konturiert (vgl. Hitzeman, 1963) und können auch in Ansammlungen gut voneinander unterschieden werden. Punkt 3 kommt als Ursache der diffusen Färbung nicht in Betracht; denn ohne exogenes Substrat inkubierte Kontrollschnitte reagierten negativ, wenn sie von endogenen Substraten vollständig geleert worden waren. Nach Hitzeman (1963) tritt die nichtenzymatische Reduktion des NBT durch reaktive SH-Gruppen erst ab pH 8,5 in Erscheinung.

Dem unter Punkt 4 aufgezählten Missstand, der eine genaue intracelluläre Lokalisation der Dehydrogenasen erschwert, kann man vorbeugen, indem man vor der Inkubation die Lipide extrahiert. Es stellt sich heraus, dass acetonpräfixierte, lipidfreie Schnitte dasselbe Bild der intracellulären Farbstoffverteilung wie unfixierte, lipidhaltige bieten, wenn sie in NAD-MDH-Medien inkubiert worden sind: das NBT-Diformazan ist sowohl in Partikeln als auch zerstreut im übrigen Cytoplasma zu finden.

Dass man die diffuse Färbung des Cytoplasmas nicht einfach als Erzeugnis cytoplasmatischer Dehydrogenasen und Diaphorasen bewerten darf, sondern mit einer artefiziellen Diffusion dieser Enzyme aus Zellorganellen rechnen muss, geht schon aus den unter IV A erläuterten Beobachtungen hervor. Verschiedene Forscher haben darauf aufmerksam gemacht, dass heftige Temperaturwechsel, wie sie beim Gefrierschnittverfahren unvermeidlich sind, oder ungünstige osmotische Bedingungen (Hypotonie) die Membranstruktur der Zellorganellen empfindlich verletzen und daran haftende Enzyme loslösen können (Hess et al., 1958; Scarpelli und Pearse, 1958; Walker und Seligman, 1961; Williams und Whiteley, 1963). Van Die (1962) notierte einen fast vollständigen Verlust der GDH, wenn er grobe Mitochondrienpräparationen aus Tomatenwurzeln einige Male einfrieren und auftauen liess.

Obwohl man also einen künstlich bedingten Austritt dehydrierender Enzymsysteme aus Zellorganellen ins restliche Cytoplasma in Kauf nehmen muss, darf doch auch wiederum die Möglichkeit einer primär im Ergastoplasma und vielleicht sogar in der cytoplasmatischen Grundsubstanz lokalisierten Dehydrogenasen- und Diaphorasen-



aktivität nicht von vornherein ausgeklammert werden. Die fraktionierte Zentrifugation tierischer Homogenate hat im Gegenteil ergeben, dass die NAD-Diaphorase sowohl in Mitochondrien als auch in löslichen Zellfraktionen vorkommt. Hitzeman (1963) hat in acetonfixierten Gefrierschnitten des Mäusehodens mit Substraten zum Nachweis der NAD-Diaphorase und verschiedener NAD-gebundener Dehydrogenasen eine sowohl granuläre als auch diffuse cytoplasmatische Färbung, mit solchen zum Nachweis der NADP-Diaphorase und zweier NADP-gebundener Dehydrogenasen sogar eine ausschliesslich diffuse Färbung bekommen. Er schliesst daraus auf eine mitochondriale und mikrosomale beziehungsweise rein mikrosomale Aktivität der betreffenden Enzyme.

Dass die diffuse cytoplasmatische Färbung pflanzlicher Zellen wohl mindestens partiell der Wirkung von Enzymen zuzuschreiben sein dürfte, die ihren Ursprung im Ergastoplasma (und eventuell in der cytoplasmatischen Grundsubstanz) haben, erhellt auch daraus, dass sie in denjenigen Zellen auffallend verstärkt ist, die für ihren besonders intensiven intermediären oder sekundären Stoffwechsel bekannt sind (vgl. III C 3 a). Es verwunderte nicht, wenn der erhöhte Energieverbrauch solcher Zellen unter anderem dadurch wettgemacht würde, dass in Mikrosomen und an Membranen des endoplasmatischen Reticulums die Produktion energiereicher Phosphate ungewöhnlich ansteige.

Sind etwa auch die NADP-gebundenen Dehydrogenasen pflanzlicher Zellen ausschliesslich mit submikroskopischen Strukturen verknüpft, wie Hitzeman dies für diejenigen der Leydigischen Zellen behauptet hat, und ist die granuläre Färbung unfixierter, fetthaltiger Gewebe ein blosses Artefakt? Überlegungen, die im nächsten Abschnitt angestellt werden, erlauben es, die zweite Frage mit Vorbehalten zu verneinen. Mögen also die gefärbten Granula echte Zellorganellen und nicht lediglich maschierte Fetttröpfchen repräsentieren, so will das dennoch nicht besagen, die Färbung verkörpere ohne weiteres effektiv in den Zellorganellen befindliche NADP-gebundene Dehydrogenasen. Auch hier, auf intracellulärer Ebene, könnte nämlich eine Transhydrogenase den wahren Sachverhalt verschleiern. Es wäre möglich, dass die NADP-gebundenen Dehydrogenasen zusammen mit der NADP-Diaphorase tatsächlich auf das Ergastoplasma beschränkt sind, der Wasserstoff des reduzierten NADP jedoch enzymatisch an oxydiertes, in den Organellen vorhandenes NAD abgegeben und damit einem Oxydationssystem zugeführt wird, das eine grössere Energieausbeute verspricht. Um den unterschiedlichen Charakter der bei den einzelnen NADP-abhängigen Dehydrogenasen aufgetretenen Färbung befriedigend erklären zu können (G-6-PDH ergab eine stärkere diffuse Färbung als ICDH), müsste man überdies annehmen, die enzymatische Wasserstoffverschiebung zwischen den zwei Cofermenten erreiche bei den einzelnen Enzymen ein verschiedenes Ausmass, das heisst, bei der ICDH, einem Krebszyklusferment, finde sie in grösserem Umfange statt als bei der G-6-PDH. (Vielleicht sind ICDH und Transhydrogenase zu einem engen Enzymkombinat vereint.)

#### *b) Bedeutung der granulären Färbung und Identifikation der substratveratmenden Zellorganellen*

Ein Identitätsnachweis soll über folgende Fragen Auskunft geben:

1. Repräsentieren alle umschriebenen Farbbezirke enzymatisch aktive Zellorganellen?

2. Sind alle enzymatisch aktiven Zellorganellen bloss durch einen einzigen umschriebenen Farbbezirk repräsentiert?

3. Repräsentiert jeder umschriebene Farbbezirk bloss eine einzige enzymatisch aktive Zellorganelle?

4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Farbintensität und Enzymaktivität einerseits und zwischen Farbintensität und Organellengrösse andererseits?

5. Wie viele Arten von Zellorganellen sind enzymatisch aktiv?

Die Antworten lauten folgendermassen:

1. Nicht allen umschriebenen Farbbezirken müssen überhaupt enzymatisch aktive Zellorganellen zugrunde liegen. Hitzeman (1963) macht darauf aufmerksam, dass schon nach einer 10 Minuten dauernden Inkubation bis zu  $1 \mu$  grosse Fetttröpfchen durch das Nitroblue-Diformazan völlig maskiert werden, so dass man sie mit Mitochondrien verwechseln kann. Wird ein solches Fetttröpfchen in der Medianebene betrachtet, so sieht man es von einem Formazanring umgeben. Die in III C 3 b beschriebenen Ringstrukturen stellen nun aber nicht zwangsläufig Fetttröpfchen dar. Erstens sind selbst nach längerer Inkubationszeit nicht alle Ringe geschlossen (s. Abb. 13), und zweitens entdeckt man auch unter den ovalen, stäbchenförmigen und amöboiden Partikeln solche mit hellem Hof und dunkel gefärbter Umrandung. Die Farbbezirke, deren Ränder ein körniges Aussehen besitzen (Abb. 17, Doppelpfeile), könnten ebensowohl von einem Kranz kleinerer Teilchen umringte Fetttröpfchen oder sonstige Partikelgruppierungen widerspiegeln als auch Zellorganellen mit mehreren hervorragenden Reduktionszonen.

2. Man muss sich hüten, von vornherein jede Farbpartikel mit je einer Organelle gleichzusetzen. Im Phasenkontrast hat es nicht selten den Anschein, als könnten zwei oder mehrere umschriebene Farbbereiche derselben Zellorganelle angehören. Sorokin und Sorokin (1956) haben beobachten können, wie innerhalb von stabförmigen Mitochondrien lebender Narzissenepidermiszellen das NTC an mehreren separaten, geradlinig angeordneten Loci reduziert wurde. Solche separaten Loci scheinen auch, trotz dem Einwand von Novikoff et al. (1961), die Arbeiten englischer Wissenschaftler zu belegen (Hess et al., 1958; Scarpelli et al., 1958; Pearse und Scarpelli, 1959).

3. Wenn umgekehrt ein einzelner Farbbezirk mehrere Zellorganellen umschlüsse, wäre dies im Lichtmikroskop nicht feststellbar. Ein Zusammenschluss von Zellorganellen kann aber, wie Avers und Tkal (1963) mit Hilfe elektronenoptischer Aufnahmen demonstrierten, als Folge der Inkubation eintreten (clumping of mitochondria after histochemical incubation). Zusammenschlüsse werden erwartungsgemäss um so häufiger stattfinden, je dichter eine Zelle mit Organellen besiedelt ist. So könnte die in jungen, sich differenzierenden Geweben erfolgende Vermehrung der grossen Farbpartikeln teilweise durch einen Zusammenschluss der hier zahlreicher vorhandenen Zellorganellen verursacht sein. Allerdings nicht ausschliesslich. Denn die Zusammenschlüsse müssten im ganzen Gewebe regelmässig vorkommen, die grossen Partikeln erscheinen jedoch nicht stets in sämtlichen Zellen, selbst wenn überall kleinere Partikeln reichlich vorhanden sind (s. Abb. 13). Die Möglichkeit eines artefiziellen Zusammenschlusses von Zellorganellen sollte daher nicht überschätzt werden.

4. Chemisch, osmotisch oder temperaturbedingte Beschädigungen der Organellenmembran können dazu führen, dass a) in den Organellen mehr Formazan gebildet wird, weil Tetrazoliumsalz und Substrat besser einzudringen vermögen, und b) die Organellen selber beträchtlich aufquellen (swelling) (vgl. z. B. Scarpelli und Pearse, 1958; Walker und Seligman, 1961; Portugalov et al., 1962; Williams und Whiteley, 1963). Zum Schutz vor solchen Schäden werden Formalinpräfixierung, leichte Hypertonie des Inkubationsmediums, Zugabe von Adeninnucleotiden zum Inkubationsmedium und Standardisierung der Gefrierzeit empfohlen. Williams und Whiteley (1963) haben nachgewiesen, dass Hypertonie die Zellorganellen (Mitochondrien) nur beschränkt vor osmotischer Schädigung bewahren kann, da die Gefrierzeit kritisch ist: nach einer Gefrierzeit von 1 Minute seien zwar in den ungeschützten Gefrierschnitten alle Mitochondrien, das heisst sowohl die angeschwollenen, abnorm grossen (von 0,6-1,4  $\mu$  Länge) als auch die normalen, kleineren (von 0,25 bis 0,5  $\mu$  Länge), in den geschützten dagegen hauptsächlich die angeschwollenen mässig stark gefärbt gewesen, doch habe verlängerte Gefrierzeit (4 Minuten) zur Folge gehabt, dass nunmehr auch in den osmotisch geschützten Schnitten zahllose Mitochondrien angeschwollen seien und vermehrt Formazan gebildet haben.

Besteht nun die im Abschnitt III C 3 b der vorliegenden Arbeit beschriebene Population grosser, stark gefärbter Partikeln aus artefiziell vergrösserten Zellorganellen und hängt die intensivere Färbung nicht mit stärkerer Enzymaktivität, sondern mit einer artefiziell vergrösserten Permeabilität der Organellenmembran zusammen? Wohl kaum. Das durch die Partikelfärbung dargebotene Bild gibt sehr wahrscheinlich die natürlichen Verhältnisse wieder, das heisst, grössere Partikeln bilden von Natur grössere Zellorganellen ab, stärkere Färbung entspricht stärkerer Enzymtätigkeit. Diese Behauptung stützt sich vor allem darauf, dass man in gewissen Geweben und Zellen eindeutig und weitaus mehr grosse, stark gefärbte Partikeln als in angrenzenden zählen kann (vgl. Abb. 13, 16 und 17), während doch zu erwarten wäre, dass eine wie immer geartete membranaffizierende Noxe ein über alle Gewebe und alle Zellen eines Gewebes wahllos verteiltes Anschwellen der Zellorganellen verursachen würde.

5. Nach Gestalt und Grösse zu urteilen, könnte es sich bei den mit Formazan gefärbten cytoplasmatischen Zellorganellen ausser den mit Sicherheit identifizierten Chloroplasten zum Teil um Mitochondrien, Proplastiden, Leukoplasten, Sphärosomen und Dictyosomen handeln.

Dictyosomen sind, soweit dem Autor dieser Arbeit bekannt, nur ein einziges Mal in der histochemischen Literatur als Träger einer Dehydrogenase erwähnt worden (Goddard und Seligman, 1952). Das Vorkommen betraf ein spezialisiertes Gewebe (Thyreoidea) und hat wahrscheinlich singuläre Bedeutung.

Sphärosomen zeigten in den Versuchen von Sorokin und Sorokin (1956) nicht die geringste Spur einer Formazanbildung.

Als Träger der Dehydrogenasen kämen deshalb noch Mitochondrien, Proplastiden und Leukoplasten (Amyloplasten) in Frage. Proplastiden und Mitochondrien weisen im Beginn ihrer Entwicklung nahezu dieselbe Ultrastruktur auf (Mühlethaler und Frey-Wyssling, 1959), in ihrer Form sehen sie sich sehr ähnlich, Proplastiden nehmen aber schliesslich einen bedeutend grösseren Umfang an (vgl. Strugger, 1954: Tab. 1, S. 131).

Zahlreiche Histochemiker haben die Mitochondrien tierischer und pflanzlicher Zellen als Stätte der Substratveratmung identifiziert, und zwar durch Vergleich mit

Form und Grösse von Zellorganellen, die vital oder fixiert dank spezifischen Färbemitteln als Mitochondrien kenntlich gemacht worden waren (Goddard und Seligman, 1952; Satô, 1956; Sorokin, 1956; Sorokin und Sorokin, 1956; Pearse und Scarpelli, 1959; Novikoff et al., 1961; Tewari und Bourne, 1962 a). Überdies haben Shelton und Schneider (1952) in isolierten Zellfraktionen, Barrnett (1959), Sedar und Rosa (1961), Sedar et al. (1962) und Avers und Tkal (1963) im Elektronenmikroskop Formazanniederschläge in Verbindung mit, beziehungsweise innerhalb von Mitochondrien direkt nachweisen können.

Eine Proplastidenaktivität wird einzig von Sorokin (1956) mitgeteilt. Sie konnte in runden und amöboiden, aber niemals in fadenförmigen Proplastiden oder zusammengesetzten Stärkeplastiden lebender Erbsenkeimlingszellen eine Farbzone von 1–2  $\mu$  Durchmesser wahrnehmen. Diese Zone repräsentiert ihrer Ansicht nach vielleicht das Struggersche Primärgranum und «could possibly indicate the localization of dehydrogenase activity during the developmental stages of plastids». Reife Chloroplasten blieben in ihren Versuchen stets formazanfrei (vgl. auch Sorokin und Sorokin, 1956). Man muss allerdings hinzufügen, dass das Primärgranum (d. h. der Prolamellarkörper) nur in Ausnahmefällen – bei ungenügender Belichtung – gebildet wird (Mühlethaler und Frey-Wyssling, 1959).

Avers und Tkal (1963) untersuchten mit Hilfe des Elektronenmikroskops Wurzelmeristemzellen von *Phleum*-Keimlingen, die sie in Medien zum Nachweis der NADH-Tetrazolium-Reduktase (= NAD-Diaphorase) inkubiert hatten, und fanden das Nitroblue-Diformazan auf die zum Teil zusammengeballten Mitochondrien beschränkt; Proplastiden und andere Zellorganellen schienen das fragliche Enzym demnach nicht zu besitzen.

Die Behauptung, dass nun alle Farbpartikeln ausschliesslich eine Organellenart, nämlich Mitochondrien, repräsentieren und dass aus diesem Grunde die innerhalb sich differenzierender sowie mit spezifischen Funktionen betrauter Gewebe erfolgende Zunahme des Partikelumfanges und der Farbstärke einem Wachstum der Mitochondrien und diesem entsprechenden Anstieg der Dehydrogenasenaktivität gleichkomme, bliebe nur dann unwidersprochen, wenn überall dort, wo kleinste und grösste Formen nebeneinander auftreten, auch alle Zwischengrössen angetroffen würden. Das ist aber nicht stets der Fall. Wie berichtet, lassen in ICDH-Medien inkubierte Narbenepithel- und Blütenstielepidermiszellen von *Cucurbita* zwei in ihrer Grösse deutlich auseinanderklaffende Partikelpopulationen sichtbar werden (0,4  $\mu$  und 0,8–1,5  $\mu$ ; s. Abb. 13). Man könnte nun annehmen, die kleinere der beiden stelle Mitochondrien dar, während die grössere Proplastiden und Leukoplasten (Amyloplasten) umfasse. Übrigens würde das bei den grösseren Partikeln zutage tretende Muster der Formazanablagerung in einer bis 0,4  $\mu$  dicken Randzone eher zu der von elektronenoptischen Bildern her bekannten Ultrastruktur der Proplastiden und einfachen Amyloplasten als derjenigen der Mitochondrien passen: dort umschliessen eine Doppelmembran und gegebenenfalls parallel dazu verlaufende Lamellenschichten ein unstrukturiertes Inneres, wogegen bei voll entwickelten Mitochondrien – und Mitochondrien von 0,8–1,5  $\mu$  Länge pflegen voll entwickelt zu sein – Cristae oder Mikrotubuli sich weit ins Innere vorstülpen. Durch die Wirkung der membranverhafteten enzymatischen Tetrazoliumreduktoren kämen daher im Lichtmikroskop die Proplastiden und Amyloplasten als vorwiegend am Rand gefärbte, die Mitochondrien als mehr oder weniger vollständig gefärbte Partikeln zum Vorschein.

Zwanglos ergibt sich somit die Vorstellung, dass – vielleicht vornehmlich in wachsenden Sprossabschnitten – auch Proplastiden (vermutlich von der Art der stärkeführenden) und Amyloplasten über einen eigenen oxydativen Stoffwechsel verfügen und dadurch imstande sind, die gespeicherte Stärke selber abzubauen und zu veratmen. Boichenko (1957; zit. nach Weier und Stocking, 1952) hat auf biochemischem Wege Krebszyklus- und andere Dehydrogenasen in den Leukoplasten chlorophyllfreier Gewebe gefunden. Die Proplastiden vermöchten die aus der Stärkeveratmung gewonnene Energie zum Aufbau des Grana- und Stromalamellengerüsts zu verwenden. Gegen das Ende ihrer Entwicklung hin würden sie allmählich den Übergang vom oxydativen Stoffwechsel in den ausgesprochen reduktiven der reifen Chloroplasten vollziehen. Enzyme, die eine reduktive Carboxylierung und eine Reduktion von Ketogruppen ermöglichen (NADP- und NAD-MDH), können – in Übereinstimmung mit biochemischen Befunden (Vishniac und Ochoa, 1952) – auch cytochemisch, wie hier referiert, in Chloroplasten nachgewiesen werden. Die für die Synthese des CO<sub>2</sub>-Akzeptors wichtige G-6-PDH ist ebenfalls cytochemisch in Chloroplasten lokalisierbar. Ihre Aktivität wird möglicherweise durch das einfallende Sonnenlicht direkt oder indirekt über lichtabhängige Faktoren beeinflusst. Eine ungenügende Lichtmenge setzt eventuell das Enzym und damit die Kohlenstoffassimilation ausser Betrieb. Die in einigen Fällen beobachtete negative Reaktion der abaxialen, dem Licht stärker abgewandten Chloroplasten der Maisblattspreite erföhre so eine plausible Erklärung.

### *C. Bedeutung der histochemischen Befunde*

Zu den das Nitroblue am auffälligsten reduzierenden Geweben gehören: 1. alle jungen, in Teilung, Wachstum und Differenzierung begriffenen Gewebe (embryonale, meristematische, sexuell reproduzierende Gewebe); 2. Sekretions- und Resorptionsgewebe (Drüsenhaare; Nektariengewebe; Drüsenepithelien und subepitheliale Gewebe; Aleuron); 3. Leitgewebe. Weil die Dichte der Formazanfärbung ein Mass ist für die Aktivität des ATP-, das heisst des energieliefernden Enzymsystems, scheinen alle diese Gewebe aussergewöhnlich viel Energie zu erzeugen. Man geht wohl nicht fehl in der Annahme, diese hohe Energieproduktion entspreche einem unmittelbaren Bedarf und weise auf eine besonders intensive Arbeitsleistung hin. Was wird mit der geleisteten Arbeit vollbracht?

1. In jungen Geweben synthetisieren endergonische Reaktionen die Verbindungen, welche die dynamisch veränderlichen Strukturen der spezifisch differenzierten Protoplasten und die mehr oder weniger starren der Zellwände aufbauen. Die im ATP gespeicherte Energie wird in Struktur verwandelt.

Energiebedarf und Sauerstoffverbrauch steigern sich merklich, wie uns die Entwicklungsphysiologie der Tiere gelehrt hat (vgl. Lehmann, 1945: S. 131), wenn sich Oberflächen stark ausdehnen. Darin mag ein Grund für die hervorragende Tetrazoliumreduktion liegen, welche die Entwicklung äusserer Abschlussgewebe begleitet. Bezeichnenderweise hat Van Fleet (1959) auch für die Peroxydase eine ausserordentlich intensive Reaktion im Protoderm feststellen können.

In diesem Zusammenhang verdient auch die Beobachtung erwähnt zu werden, dass bei den apicalen Meristemen des Sprosses die dehydrierende Enzymaktivität der

Tunica diejenige des Corpus zuweilen überwiegt. Vielleicht besagt dies, dass sich hierbei der ganze Apex noch ausweitet. In einem solchen Falle wird man ja die stärkste Aktivität in den oberflächennächsten Zellschichten erwarten, weil darin die meisten Zellteilungen vorkommen und sich die Oberfläche relativ zum Zellvolumen am stärksten vergrößert.

Die Entstehung neuer Blattanlagen kündigt sich schon im voraus durch eine stärkere Farbreaktion innerhalb des Flankenmeristems an. Bezüglich der Peroxydase hat Van Fleet (1959) ein gleiches Verhalten gefunden.

Ferner geht in der Kürbiswurzel innerhalb des perizyklisch-corticalen Bereiches der präsumptiven Nebenwurzelanlage eine vermehrte Tetrazoliumreduktion der klar ersichtlichen Wurzelbildung voraus – ein Phänomen, das schon Roberts (1950) bei *Phaseolus* ausführlich besprochen hat.

Morphologisch gleichartige Gewebe geben Wachstums- und Differenzierungsprozesse unmittelbar durch eine tiefere Färbung zu erkennen: junge Blätter zeigen apical oder basal an den Orten des akroplasten oder basiplasten Wachstums distinkte Areale grösserer Farbdichte; das Cambium reagiert dort, wo es Phloem- oder Xylemzellen aussondert, bedeutend lebhafter; das Procambium der primären Dicken- und der intercalaren Wachstumszonen ist ungefärbt, wenn es sich offenbar noch im Ruhezustand befindet, bildet jedoch Farbe, sobald es in die Teilungs- und Differenzierungsphase eintritt.

Übereinstimmend mit Roberts (1950) und Avers (1958) darf man also feststellen, dass die enzymatisch katalysierte Tetrazoliumreduktion eine physiologische Differenzierung der Gewebe sichtbar macht, noch ehe morphologische Veränderungen erscheinen.

Es ist übrigens interessant, dass in den extremen Bezirken der Wurzelapices jüngster Maiskeimlinge die Krebszyklusdehydrogenasen noch kaum nachweisbar sind, also eine Art Ruhezentrum der Atmung besteht, während die G-6-PDH bereits von Anfang an eine intensive Farbreaktion ergibt. Zwischen diesem während der Keimung verschwindenden Ruhezentrum der Atmung und dem von Clowes (1958) beschriebenen «quiescent centre» der DNS-Synthese, das sich erst im Laufe der Keimung herausbildet, liesse sich folgende Korrelation denken: zu Beginn der Keimung findet im Wurzelpol eine umfangreiche Nucleinsäuresynthese statt; die Pentosephosphate liefert der bereits funktionierende Pentosephosphatzyklus; das zur Synthese benötigte energiereiche Phosphat stammt womöglich aus dem Aleuron und den scutellären Zentren der oxydativen Phosphorylierung (Epithel und subepitheliales Parenchym). Die DNS setzt über die RNS die Enzymsynthese in Gang: es werden die Krebszyklusfermente zusammen mit dem elektronenübertragenden und energieliefernden Enzymsystem geschaffen. In der Masse, wie der Wurzelapex im weiteren Umkreis der Initialzellen eine eigene Produktionsstätte energiereicher Phosphate errichtet und in der Lage ist, die Aufgabe eines Energiereservoirs zu übernehmen, verschiebt sich die Region der ATP-abhängigen DNS-Synthese – und damit der Kern- und Zellteilungen – basalwärts. Das würde bedeuten, dass im speziellen Fall der Maiswurzel, vermutlich aber ganz allgemein, oxydative Phosphorylierungen und eine Speicherung der dabei gewonnenen energiereichen Phosphate der Karyo- und Cytokinese vorangehen.

2. Bei den Pflanzen findet sich genau wie bei den Tieren (vgl. Padykula, 1952; Neumann und Koch, 1953; Rutenburg et al., 1953) eine erhöhte Dehydrogenasenaktivität in den Zellen resorbierender und sezernierender Gewebe, das heisst dort, wo – mit den Worten von Neumann und Koch (1953) – «dem Grundstoffwechsel ein zusätzlicher, an eine spezifische Aufgabe geknüpfter Spezialstoffwechsel überlagert ist».

Es fällt auf, dass in solchen Geweben auch die Aktivität saurer Phosphatasen verstärkt ist (Frey, 1954). Zu den Phosphatasen des pflanzlichen Stoffwechsels, welche in saurem Milieu das Glycerophosphat unspezifisch zu spalten vermögen, rechnet Frey (1954) neben der Phosphomonoesterase II und IV unter anderem die ATP-ase und Phytase.

Der beobachtete Parallelismus zwischen der Dehydrogenasen- und Phosphatasenaktivität scheint darauf hinzuweisen, dass in jenen Geweben die während der Oxydation des Substratwasserstoffes aufgebauten energiereichen Phosphatbindungen, zumindest in beschränktem Umfange, sogleich wieder gespalten werden, weil die in ihnen gespeicherte Energie an Ort und Stelle für synthetische Reaktionen gebraucht wird.

Die synthetisierten Produkte schliessen schleimige, zuckerreiche Sekrete, ätherische Öle und möglicherweise reservestoffabbauende Enzyme ein. Man rufe sich auch in Erinnerung, dass die Reservestoffe bei der Mobilisierung in eine transportfähige Form umgewandelt werden müssen und dass die beiden wichtigen Transportverbindungen Glutamin und Saccharose im Aleuron beziehungsweise Scutellumepithel nur unter Energiezufuhr synthetisiert werden können.

Zudem ist es nicht ausgeschlossen, dass sich im Aleuron die Phosphorreserve (Phytin) über den unmittelbar hier herrschenden Bedarf hinaus in energiereiches Phosphat umsetzt und der Überschuss während der Keimung zu den Zentren des embryonalen Treibstoffverbrauchs hinfliesst.

Schliesslich kann man mit Frey (1954) noch die Möglichkeit erwägen, dass die Epithelzellen des Scutellums die Abbauprodukte der Stärke unter Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen resorbieren – ein weiterer Grund für das koordinierte Auftreten der Dehydrogenasen und Phosphatasen.

3. Seit jeher hat die histochemische Forschung ein besonderes Augenmerk auf die Leitgewebe gerichtet, in der Hoffnung, zum Verständnis der Transportmechanismen beizutragen.

Was die Dehydrogenasen anbelangt, so ist die hohe SDH-Aktivität des Wurzel- und Sprosscambiums hervorgehoben worden (Satô, 1956; Tiefel, 1957). Zahlreiche Autoren haben Cambium, Holzparenchym und fertiges Phloem (vor allem die Geleitzellen) als Schauplätze einer intensiven, unspezifischen TTC-Reduktion charakterisiert (Roberts, 1950; Hewitt und Agarwala, 1952; Bauer, 1953; Currier et al., 1955; Roberts und Lucchese, 1955).

Die im Abschnitt III D 3 a der vorliegenden Arbeit geschilderte rege Dehydrogenasenaktivität der Holzparenchymzellen, insbesondere der Gefässbegleitzellen, wird verständlich, wenn man sich das Bild aneignet, das Resch (1955) aus cytologischer Sicht von der Bedeutung und Funktion dieser Zellen entworfen hat. Die von Resch genannten Arbeitsleistungen, wie Mithilfe beim Bau der Gefässwände oder Wasseraufnahme aus den Gefässen beziehungsweise Wasserabgabe an diese mittels Osmose,

erheischen Energie. Falls die Begleitzellen eine «Salzatmung» kennen, wären sie imstande, mit ihrer Hilfe die Absorption der Elektrolyte aus dem Gefässwasser so zu regulieren, dass die Salzkonzentration in ihrem Innern den gewünschten osmotischen Druck ergibt. Diesen Druck vermöchten sie aber auch dadurch herzustellen, dass sie, analog den Schliesszellen der Stomata, aus einem Vorrat osmotisch inaktiver Anelektrolyte (Stärke) osmotisch aktive (Saccharose) in der erforderlichen Konzentration synthetisieren, und dann je nach Bedarf die aktiven wieder in inaktive überführen. Diese gegenseitige Umwandlung verbraucht ebenso wie der Aufbau eines Vorrats osmotisch inaktiver Substanz Energie. Ein Längstransport der zum Aufbau des Vorrats nötigen Assimilate kann, wie Perkins et al. (1959) gezeigt haben, im Xylem selber erfolgen. Möglicherweise nimmt das Holzparenchym aktiv, das heisst unter Energieaufwand, daran teil.

Manche der heute geläufigen Modelle aktiver Transportvorgänge versuchen darzustellen, wie anorganische oder organische Stoffe unter Aufwand chemischer Energie selbst gegen ein Konzentrationsgefälle durch Membranschränken hindurchgeschleust werden können. Danach sollen energiereiche Gruppen, zum Beispiel Phosphatgruppen, entweder auf die Stoffe selber oder auf sogenannte Membrancarriers, die sich mit den Stoffen verbinden, übertragen und davon wieder abgespalten werden. Ein Carrier kann, gemäss Netter (1961), jeder in der Membran frei vorhandene Stoff oder jeder hier vorliegende bewegliche Molekülabschnitt sein. Als Beispiel dafür könnte man das von Danielli (1953) vorgeschlagene kontraktile Protein nennen, dessen Enzymzentrum eine Phosphatase oder Phosphokinase bildet. Wanner und Frey (1952) vertreten die Auffassung, dass die Zucker in der Blattspreite unter der Einwirkung phosphorylierender und dephosphorylierender Enzymsysteme von Zelle zu Zelle wandern. Denselben Mechanismus eines fermentativ gesteuerten Stoffaustausches zieht Danielli (1953) bei der Sekretion in Betracht.

Es ist klar, dass sich ein Transport in der von diesen Hypothesen dargestellten Art nur dann reibungslos abzuwickeln vermag, wenn für einen ständigen Nachschub energiereicher Phosphate gesorgt wird. Das setzt ein zahlreiches Vorkommen aller mit der Energiegewinnung beschäftigten Fermente innerhalb oder in der Nachbarschaft jener Zellen voraus, die als aktiv am Transport beteiligt gelten. Histochemisch sollte dies unter anderem an einer starken Tetrazoliumreduktion erkennbar sein.

Das ist, wie schon gesagt, beim Xylemparenchym der Fall. Da man hier ausserdem eine erhebliche Phosphatasentätigkeit verzeichnen kann (Frey, 1954), steht einem aktiven Transport im Sinne der oben dargelegten Anschauungen nichts im Wege.

Was das Phloem betrifft, so ist seit langem besonders die Frage umstritten, ob die Siebröhren selber die enzymatische Grundlage für eine aktive Assimilatbeförderung besitzen oder ob sie dazu der uneingeschränkten Unterstützung durch den Fermentapparat anliegender Zellen (Geleit- oder Parenchymzellen) bedürfen.

Saure Phosphatasen haben sich nicht nur in den Geleitzellen, sondern auch in den Siebelementen in beachtlicher Menge nachweisen lassen; der Testniederschlag erscheint oft an den Siebplatten und Siebporenfeldern gehäuft (Frey, 1954; Braun und Sauter, 1964).

Wie ist es nun um die Energieversorgung bestellt?

Esau und Cheadle (1962) diskutieren ihre elektronenoptischen Untersuchungen über die Mitochondrien des Kürbisphloems im Licht der Vergleiche, die in der Litera-



tur zwischen Struktur und Funktion der Mitochondrien gezogen werden, und kommen zum Schluss, «that, as energy sources, the mitochondria of mature sieve elements of *Cucurbita* are less efficient than those of normal nucleate cells, but that possibly they are not completely inactive». Einige Jahre zuvor haben sich die gleichen Autoren freilich umsonst bemüht, in den reifen Siebröhren verschiedener Dikotylen (darunter *Cucurbita*) eine unspezifische Dehydrogenasenaktivität zu ermitteln (Currier et al., 1955). Vor ihnen haben jedoch schon Dufrenoy und Pratt (1948) beim Zuckerrohr an den Poren der Siebplatten auffällige Formazanniederschläge finden können.

In der vorliegenden Arbeit ist nunmehr mit dem Nachweis einzelner Dehydrogenasen der Beweis erbracht, dass die ontogenetisch reifen Siebröhren von Mais und Kürbis über die Voraussetzungen zu einem eigenen Energiehaushalt verfügen und damit in der Lage wären, aktiv am Stofftransport teilzunehmen.

Im Falle eines aktiven Transportes können also unter den fertig differenzierten Siebröhren nur diejenigen effektiv stoffleitend sein, deren energieliefernder Fermentapparat nachweislich noch funktioniert. Weil der Betrieb eines solchen Apparates zu einem guten Teil dem Kern unterstellt ist (vgl. Bourne, 1962), resultiert daraus eine starke Abhängigkeit der kernlosen Siebelemente von ihren kernhaltigen Nachbarzellen, namentlich den Geleitzellen. Wohl vermögen die Siebröhrenglieder selber energiereiche Phosphate aufzubauen, man vergesse aber nicht, dass die Adenylsäure – nach heutigen Kenntnissen – im Kern synthetisiert wird; aus diesem Grunde können auch die Pyridin- und Flavincofermente, wenigstens deren adeninhaltige Bestandteile, nur im Kern neu gebildet werden. Ferner stehen die Synthese der Fermentproteine und die Aktivierung oder Hemmung der Enzyme unter der Kontrolle des Kerns, wie umgekehrt vom Cytoplasma aktivierende oder hemmende Einflüsse auf die Gene des Kerns ausgeübt werden. Solche Wechselbeziehungen zwischen Kern und Cytoplasma dürften für das gleichzeitige Erlöschen der Dehydrogenasenfunktion in Sieb- und Geleitzellen verantwortlich sein. Es hat sich somit bewahrheitet, was Resch (1954) vermutete: Geleitzelle und Siebröhrenelement sind nicht nur zu einer cytologischen, sondern auch physiologischen Einheit verschmolzen.

Anschliessend sei noch die Möglichkeit erörtert, dass kontraktile Proteine die Geschwindigkeit und Richtung des Saftstromes bestimmen, in welchem die Assimilate gelöst sind. Kontraktile Eiweissfibrillen kommen in der Natur nicht nur im Muskelgewebe vor; neuerdings hat Wohlfarth-Bottermann (1962) in den Plasmodien des Schleimpilzes *Physarum polycephalum* Plasmafilamente entdeckt, die wie das Actomyosin des Muskels durch ATP zur Kontraktion veranlasst werden und dabei einen Überdruck erzeugen, der die Plasmaströmung in Gang hält. Vermutlich wird bei der Kontraktion vom ATP durch eine ATP-ase ein Phosphorsäurerest abgespalten; vielleicht wirkt die Plasmafaser selber, analog dem Actomyosin, als ATP-ase.

Es ist denkbar, dass solche Mechanismen allgemein verbreitet sind und vor allem auch bei der Beförderung gelöster Stoffe über weite Strecken eine bedeutende Rolle spielen. Sollte der Stofftransport in den Schläuchen des endoplasmatischen Reticulums erfolgen, so könnte man sich gut vorstellen, dass kontraktile Proteine, in regelmässigen Abständen in die elastische Membran eingebaut, eine wellenförmig sich fort-pflanzende Kontraktion und Dilatation, das heisst eine Art Peristaltik der Schläuche ermöglichen. Durch dieses Pumpsystem vermöchte der Verkehr der Transportstoffe in beliebiger Richtung und mit beliebiger Geschwindigkeit gelenkt zu werden.

Gibt es Anzeichen dafür, dass in Siebröhren Mechanismen dieser Art wirksam sind?

Die elektronenmikroskopische Forschung hat in den vergangenen Jahren die Existenz eines feinfädigen Netzwerkes in Vacuole und Cytoplasma von Siebzellen sichtbar gemacht (Kollmann, 1960; Eschrich, 1963). «Plasmafäden» sollen – ohne Verdichtung zu Strängen bei *Cucurbita ficifolia* (Eschrich) oder in lückenlos dichter Anordnung bei *Passiflora coerulea* (Kollmann) – die Plasmabrücken in den Siebporen durchziehen. Das endoplasmatische Reticulum wird bei *Cucurbita ficifolia* als rudimentär beschrieben (Eschrich), bei *Cucurbita maxima* soll es während der Siebröhrenentwicklung blasig zerfallen (Esau und Cheadle, 1962). Nach Kollmann und Schumacher (1961) durchläuft es in den Siebzellen des Ruhephloems von *Metasequoia Glyptostroboides* das Grundcytoplasma in einer Vielzahl sehr englumiger, ausschliesslich längsgestreckter Röhren. Während der Reaktivierung des Phloems im Frühjahr kommt es zu einer starken Erweiterung dieser Röhren, zu einem vielfachen Fusionieren der erweiterten Röhrenstrukturen und stellenweise zu einem blasigen Zerfall (Kollmann und Schumacher, 1962 b). Der Zerfall sei möglicherweise eher als Präparationseffekt denn als Symptom einer Plasmadegeneration zu beurteilen, da die Hydratisierung der Phloemzellen im Frühjahr eine erhöhte Labilität des ohnehin sehr empfindlichen Siebzellenprotoplasten bewirke. Feine Röhren des endoplasmatischen Reticulums durchqueren sowohl die Plasmodesmen als auch die Plasmastränge in den Siebporen, diese jedoch in weitaus grösserer Zahl (Kollmann und Schumacher, 1962 a).

Man kann also einerseits, wie aus den elektronenoptischen Untersuchungen hervorgeht, eine Vermehrung feinstruktureller Elemente, sei es von sogenannten «Plasmafäden», sei es von Endomembranen, in den Siebporen feststellen, andererseits cytochemisch, wie berichtet, an den Siebporen eine Ansammlung nicht näher bestimmter, doch sehr wahrscheinlich auch ATP-spaltender saurer Phosphatasen sowie verschiedener Dehydrogenasen beobachten, das heisst gerade derjenigen Fermente, die für die Funktion kontraktiler Proteine unentbehrlich sind. Diese cytologischen und cytochemischen Beobachtungen passen gut zur Hypothese, wonach im Plasma der Siebzellen, und zwar besonders in den Plasmasträngen der Siebporen, kontraktile Proteine vorhanden sind, die – zu Plasmafäden verdichtet oder in Endomembranen eingelagert – als «Assimilatpumpen» wirken.

## V. Zusammenfassung

1. Sieben Dehydrogenasen (GADH, GDH, G-6-PDH, ICDH, NAD-MDH, NADP-MDH, SDH) wurden in den Vegetations- und Fortpflanzungsorganen verschieden alter Mais- und Kürbispflanzen histochemisch untersucht. Als Redoxindikator diente das NBT, das reduziert ein wasser- und fettunlösliches Pigment (Diformazan) bildet. Die Gewebeproben wurden – entweder nativ oder mit kalter, isotoni-scher Saccharoselösung vorbehandelt – auf dem Gefriermikrotom 15–30  $\mu$  dick geschnitten. Die endogenen Substrate mussten vor der Inkubation aus den Gefrierschnitten ausgewaschen werden. Lipide wurden gelegentlich durch Acetonpräfixierung entfernt. Die Inkubation fand bei 37 °C während 30 Minuten bis 12 Stunden statt. Exogene Zufuhr der Cofermente war zum Nachweis der NAD- und NADP-abhängigen Dehydrogenasen unbedingt erforderlich. In den Kontrollmedien fehlten Substrat und

Cofactoren. Die Schnitte wurden in kaltem, neutralem, 10prozentigem Formalin postfixiert, eventuell mit heissem Methanol nachbehandelt und in Glyceringelatine eingebettet.

2. Alle untersuchten Dehydrogenasen stimmten im Muster ihrer intercellulären Verteilung überein. Der Ausfall der Farbreaktion wurde durch das Entwicklungsalter der Gewebe, nicht durch das Alter der Pflanze bestimmt.

3. Im Nucleus und Nucleolus war keine enzymatische Reduktion des NBT nachzuweisen.

Das Cytoplasma zeigte eine sowohl diffuse als auch in umschriebenen Bezirken lokalisierte Färbung. Diffuse Färbung kam besonders in Geweben mit intensivem intermediärem oder sekundärem Stoffwechsel vor (embryonale, meristematische, sezernierende und resorbierende sowie Transportgewebe). Der in distinkten Arealen abgelagerte Farbstoff hatte die Gestalt von kreisrunden, ovalen, stäbchenförmigen, filamentösen oder amöboid gelappten Partikeln. Die Partikelgrösse schwankte zwischen  $0,3 \mu$  und mehr als  $3 \mu$ . Im Bereich von  $0,3-0,6 \mu$  häuften sich die schwach gefärbten, in demjenigen von  $0,6-1,2 \mu$  die stark gefärbten Partikeln. Diese fanden sich, ähnlich der diffusen Färbung, hauptsächlich in stoffwechselfysiologisch aktiven Geweben.

Die Bedeutung der diffusen und granulären Färbung und die Identifizierung der Partikeln mit Mitochondrien, Proplastiden und Amyloplasten wurde ausführlich dargetan.

Maischloroplasten wiesen sich in den hier durchgeführten Tests über eine G-6-PDH, NADP-MDH und NAD-MDH, Kürbischloroplasten dagegen bloss über eine G-6-PDH und NADP-MDH aus.

4. Grösste Diformazanausbeute ergaben alle jungen, in Teilung, Wachstum und Differenzierung befindlichen Gewebe, Sekretions- und Resorptionsgewebe sowie Leitgewebe.

Physiologische Differenzierungen, welche morphologischen Veränderungen (Bildung von Blatt und Nebenwurzel) anscheinend vorausgehen pflegen, waren in einer verstärkten NBT-Reduktion widergespiegelt.

Die Leitbündel liessen auch im Reifezustand in den Begleitzellen der Gefässe, in den Geleitzellen der Siebröhren und in den Siebröhren selber eine starke Dehydrogenasenaktivität erkennen. In jungen Siebelementen und in Geleitzellen waren die substratveratmenden Zellorganellen häufig um den Kern herum, in jungen und reifen Siebzellen den Querwänden und der den Geleitzellen zugewandten Seite entlang anzutreffen. Die Dehydrogenasenfunktion erlöschte in Sieb- und Geleitzellen gleichzeitig.

Die Bedeutung dieser histochemischen Befunde wurde eingehend besprochen.

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Wanner am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich. Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Wanner für die Überlassung des höchst anregenden Themas und für die Aufmerksamkeit, mit der er den Fortgang der Arbeit verfolgte.

Für Abschrift und Durchsicht des Manuskriptes sei meiner Frau auch an dieser Stelle herzlichst gedankt.

## Summary

1. A histochemical method has been applied to describe the activity and distribution of seven dehydrogenases among the vegetative and reproductive organs of maize and pumpkin. The dehydrogenases investigated were the glyceraldehyde dehydrogenase, glutamic dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, isocitric dehydrogenase, NAD and NADP malic dehydrogenase, and succinic dehydrogenase. Nitroblue Tetrazolium (NBT) which forms a water and lipid insoluble blue diformazan after reduction was used as redox indicator. The tissue samples were sectioned on a freezing microtome. Endogenous substrates had to be washed out from the frozen sections in order to allow only the exogenous substrates to be acted upon by the dehydrogenases tested. Incubation took place at 37 °C during a period varying from 30 minutes to 12 hours. In some instances, pretreatment of the tissue samples with cold isotonic sucrose had been shown to be useful while in others, it seemed advisable to remove abundant lipids by means of cold acetone before incubation. The presence of NAD and NADP within the incubating medium could be revealed as a necessary prerequisite for the demonstration of NAD- and NADP-dependent dehydrogenases. Control media lacked substrates and cofactors. After the incubation, the sections were fixed in cold neutral 10% formalin and then imbedded in glycerin jelly.

2. All dehydrogenases tested exhibited the same pattern of intercellular distribution. The developmental stage of the tissues determined the extent of the staining reaction, whereas the age of the plants did not influence it at all.

3. Nucleus and nucleolus proved to be free from histochemically detectable reducing enzymes.

In the cytoplasm, the dye was spread out diffusely as well as deposited in fine, distinct areas. Diffuse staining occurred especially in tissues known for their high metabolic activity (i.e. in embryonic, meristematic, secretory, resorptive, and conductive tissues). The distinct areas were outlined as circular, oval, rodshaped, filamentous or ameboid-like particles, their size ranking between 0.3 micra and more than 3 micra. The weakly stained particles could be shown for the most part to measure 0.3–0.6 micra, while a large amount of those being deeply stained, ranged from 0.6 to 1.2 micra. Similar to the diffuse staining, the latter were found most frequently in metabolically active tissues. The particles were assumed to represent mitochondria, proplastids, and amyloplasts.

The chloroplasts of *Zea* were demonstrated to contain glucose-6-phosphate dehydrogenase, NAD and NADP malic dehydrogenase, those of *Cucurbita* lacked the NAD malic dehydrogenase.

4. All tissues wherein the cells were still dividing, growing, and differentiating as well as secretory, resorptive, and conductive tissues yielded the greatest reduction of the NBT.

Physiological differentiations that occurred prior to morphological changes such as the formation of leaves and lateral roots were reflected by a heavier staining reaction.

The mature vascular bundles retained a strong dehydrogenase activity in the accompanying cells which surround the vessels, in the companion cells of the sieve

tubes, and in the sieve tubes themselves. A perinuclear configuration of the stained particles frequently occurred in immature sieve elements as well as in companion cells. Both in undeveloped and in already fully developed sieve-tube members these particles often accumulated on the side contiguous to the companion cell. In sieve tubes and companion cells, the dehydrogenases ceased functioning simultaneously.

A detailed discussion of these histochemical results is presented.

#### Literatur

- Avers C. J. 1958. Histochemical Localization of Enzyme Activity in the Root Epidermis of *Phleum pratense*. Am. J. Bot. **45**, 609–613.
- 1961. Histochemical Localization of Enzyme Activities in Root Meristems. Am. J. Bot. **48**, 137–143.
- und King E. E. 1960. Histochemical Evidence of Intracellular Enzymatic Heterogeneity of Plant Mitochondria. Am. J. Bot. **47**, 220–225.
- und Tkal M. M. 1963. Intracellular Mitochondrial Variation in Enzyme Activity as Shown by Histochemical Studies Using Light and Electron Microscopy. J. Histochem. Cytochem. **11**, 157–162.
- Barrnett R. J. 1959. The Demonstration with the Electron Microscope of the End-Products of Histochemical Reactions in Relation to the Fine Structure of Cells. Exp. Cell Res., Suppl. **7**, 65–89.
- Bauer L. 1953. Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. Planta **42**, 367–451.
- Betz A. 1953. Untersuchungen über Verhalten und Wirkung der Vitalfarbstoffe Prune Pure und Akridinorange sowie Beobachtung über das Reduktions-Oxydations-Potential in Zellen höherer Pflanzen. Planta **41**, 323–357.
- Boichenko. 1957. Biokhimiya **12**, 153–162. Zit. nach Weier T. E. und Stocking C. R. 1952. The Chloroplast: Structure, Inheritance, and Enzymology. II. Bot. Rev. **18**, 14–75.
- Bourne G. H. 1962. Division of Labor in Cells. Academic Press, New York, London.
- Braun H. J. und Sauter J. J. 1964. Phosphatase-Lokalisation in Phloembeckenzenellen und Siebröhren der Dioscoreaceae und ihre mögliche Bedeutung für den aktiven Assimilattransport. Planta **60**, 543–557.
- Cascarano J. und Zweifach B. W. 1959. Factors Influencing the Histochemical Demonstration of Coenzyme-Dependent Dehydrogenases and Diaphorases. J. Biophys. Biochem. Cytol. **5**, 309–318.
- Chatterjee R. und Mitra S. 1962. Nucleolar Localization of Succinic Dehydrogenase. J. Histochem. Cytochem. **10**, 6–7.
- Clowes F. A. L. 1958. Development of Quiescent Centres in Root Meristems. New Phytol. **57**, 85–88.
- Currier H. B., Esau K. und Cheadle V. I. 1955. Plasmolytic Studies of Phloem. Am. J. Bot. **42**, 68–81.
- und Van der Zweep W. 1956. Plasmolysis and the Tetrazolium Reaction in *Anacharis canadensis*. Protoplasma **45**, 125–132.
- Danielli J. F. 1953. Cytochemistry, a Critical Approach. Wiley, New York.
- Deane H. W., Barrnett R. J. und Seligman A. M. 1960. Enzyme, 1. Teil, im «Handbuch der Histochemie», Band VII/1, herausgegeben von W. Graumann und K. Neumann. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Dufrenoy J. und Pratt R. 1948. Histo-Physiological Localization of the Site of Reducing Activity in Stalks of Sugar Cane. Am. J. Bot. **35**, 333–334.
- Dyar M. T. 1953. Studies on the Reduction of a Tetrazolium Salt by Green Plant Tissue. Am. J. Bot. **40**, 20–25.
- Ernster L. und Navazio F. 1957. Studies on TPN-Linked Oxidations. I. Pathways of Isocitrate Oxidation in Rat Liver Mitochondria. Biochim. Biophys. Acta **26**, 408–415.
- Esau K. und Cheadle V. I. 1962. Mitochondria in the Phloem of *Cucurbita*. Bot. Gaz. **124**, 79–85.
- Eschrich W. 1963. Beziehungen zwischen dem Auftreten von Callose und der Feinstruktur des primären Phloems bei *Cucurbita ficifolia*. Planta **59**, 243–261.

- Farber E., Sternberg W. H. und Dunlap C. E. 1954. Tetrazolium Stains for DPN-Diaphorase and TPN-Diaphorase in Animal Tissue. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **86**, 534-537.
- Sternberg W. H. und Dunlap C. E. 1956 a. Histochemical Localization of Specific Oxidative Enzymes. I. Tetrazolium Stains for Diphosphopyridine Nucleotide Diaphorase and Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase. J. Histochem. Cytochem. **4**, 254-265.
- Sternberg W. H. und Dunlap C. E. 1956 b. Histochemical Localization of Specific Oxidative Enzymes. III. Evaluation Studies of Tetrazolium Staining Methods for Diphosphopyridine Nucleotide Diaphorase, Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase, and the Succindehydrogenase System, J. Histochem. Cytochem. **4**, 284-294.
- Frey G. 1954. Aktivität und Lokalisation von saurer Phosphatase in den vegetativen Teilen einiger Angiospermen und in einigen Samen. Ber. Schweiz. Böt. Ges. **64**, 390-452.
- Goddard J. W. und Seligman A. M. 1952. Intracellular Topography of Succinic Dehydrogenase in the Thyroid of the Albino Rat. Anat. Record **112**, 543-556.
- Hess R., Scarpelli D. G. und Pearse A. G. E. 1958. The Cytochemical Localization of Oxidative Enzymes. II. Pyridine Nucleotide-Linked Dehydrogenases. J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**, 753-760.
- Hewitt E. J. und Agarwala S. C. 1952. Reduction of Triphenyltetrazolium Chloride by Plant Tissues and its Relation to Molybdenum Status. Nature **169**, 545-546.
- Himmelhoch S. R. und Karnovsky M. J. 1961. The Histochemical Demonstration for Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity. J. Biophys. Biochem. Cytol. **9**, 573-581.
- Hitzeman J. W. 1963. Observations on the Subcellular Localization of Oxidative Enzymes with Nitro Blue Tetrazolium. J. Histochem. Cytochem. **11**, 62-70.
- Jámbor B. 1960. Tetrazoliumsalze in der Biologie. Gustav-Fischer-Verlag, Jena.
- Jensen C. O., Sacks W. und Baldauski F. A. 1951. The Reduction of Triphenyltetrazolium Chloride by Dehydrogenases of Corn Embryos. Science **113**, 65-66.
- Kaplan N. O., Swartz M. N., Frech M. E. und Ciotti M. M. 1956. Phosphorylative and Nonphosphorylative Pathways of Electron Transfer in Rat Liver Mitochondria. Proc. Nat. Acad. Sciences **42**, 481-487.
- Kollmann R. 1960. Untersuchungen über das Protoplasma der Siebröhren von *Passiflora coerulea*. Planta **55**, 67-107.
- und Schumacher W. 1961. Über die Feinstruktur des Phloems von *Metasequoia Glyptostrobooides* und seine jahreszeitlichen Veränderungen. I. Mitteilung: Das Ruhephloem. Planta **57**, 583-607.
- und Schumacher W. 1962 a. Über die Feinstruktur des Phloems von *Metasequoia Glyptostrobooides* und seine jahreszeitlichen Veränderungen. II. Mitteilung: Vergleichende Untersuchungen der plasmatischen Verbindungsbrücken in Phloemparenchymzellen und Siebzellen. Planta **58**, 366-386.
- und Schumacher W. 1962 b. Über die Feinstruktur des Phloems von *Metasequoia Glyptostrobooides* und seine jahreszeitlichen Veränderungen. III. Mitteilung: Die Reaktivierung der Phloemzellen im Frühjahr (Februar-März). Planta **59**, 195-221.
- Koppel J. L. und Olwin J. H. 1954. Dehydrogenase Activities of Human Platelets. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **86**, 641-645.
- Lakon G. 1942. Topographischer Nachweis der Keimfähigkeit von Mais durch Tetrazoliumsalze. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **60**, 434-444.
- Lehmann F. E. 1945. Einführung in die Physiologische Embryologie. Verlag Birkhäuser, Basel.
- Leuthardt F. 1961. Lehrbuch der Physiologischen Chemie, 14. Auflage, berichtigter Nachdruck. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- Long C., King E. J. und Sperry W. M. 1961. Biochemist's Handbook. E. & F. N. Spon Ltd., London.
- Mühlethaler K. und Frey-Wyssling A. 1959. Entwicklung und Struktur der Proplastiden. J. Biophys. Biochem. Cytol. **6**, 507-512.
- Nachlas M. M., Tsou K. C., de Souza E., Cheng C. S. und Seligman A. M. 1957. Cytochemical Demonstration of Succinic Dehydrogenase by the Use of a New p-Nitrophenyl Substituted Ditetrazole. J. Histochem. Cytochem. **5**, 420-436.
- Walker D. G. und Seligman A. M. 1958 a. A Histochemical Method for the Demonstration of Diphosphopyridine Nucleotide Diaphorase. J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**, 29-38.
- Walker D. G. und Seligman A. M. 1958 b. The Histochemical Localization of Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase. J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**, 467-474.

- Nachlas M. M., Margulies S. I. und Seligman A. M. 1960. Sites of Electron Transfer to Tetrazolium Salts in the Succinoxidase System. *J. Biol. Chem.* **235**, 2739–2743.
- Netter H. 1961. Mögliche Mechanismen und Modelle für aktive Transportvorgänge. In «Biochemie des aktiven Transports», 12. Kolloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie vom 13. bis 15. April 1961 in Mosbach/Baden. S. 15–53. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Neumann K. und Koch G. 1953. Übersicht über die feinere Verteilung der Succino-Dehydrogenase in Organen und Geweben verschiedener Säugetiere, besonders des Hundes. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiol. Chemie* **295**, 35–61.
- Novikoff A. B., Shin W. Y. und Drucker J. 1961. Mitochondrial Localization of Oxidative Enzymes: Staining Results with two Tetrazolium Salts. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 47–61.
- Padykula H. A. 1952. The Localization of Succinic Dehydrogenase in Tissue Sections of the Rat. *Am. J. Anat.* **91**, 107–145.
- Pearse A. G. E. und Scarpelli D. G. 1959. Intramitochondrial Localization of Oxidative Enzyme Systems. *Exp. Cell Res. Suppl.* **7**, 50–64.
- Perkins H. J., Nelson C. D. und Gorham P. R. 1959. A Tissue-Autoradiographic Study of the Translocation of C<sup>14</sup>-Labelled Sugars in the Stems of Young Soybean Plants. *Can. J. Bot.* **37**, 871–877.
- Portugalov V. V., Dovedova E. L. und Skrebitsky V. G. 1962. On Some Mechanisms Regulating the Chemical Activity of the Neuron Mitochondria. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 213–221.
- Rauen H. M. 1959. *Biochemisches Taschenbuch*. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- Resch A. 1954. Beiträge zur Cytologie des Phloems. Entwicklungsgeschichte der Siebröhrenglieder und Geleitzellen bei *Vicia faba* L. *Planta* **44**, 75–98.
- 1955. Beiträge zur Cytologie des Xylems. *Planta* **45**, 307–324.
- Roberts L. W. 1950. A Survey of Tissues that Reduce 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride in Vascular Plants. *Bull. Torr. Bot. Club* **77**, 372–381.
- 1951. Survey of Factors Responsible for Reduction of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride in Plant Meristems. *Science* **113**, 692–693.
- und Lucchese G. 1955. Sulfhydryl Localization and Tetrazolium Reduction. 1. Reversible Inhibition of its Reduction by N-Ethyl Maleimide. *Stain Techn.* **30**, 291–298.
- Rogers G. E. 1953. The Localization of Dehydrogenase Activity and Sulphydryl Groups in Wool and Hair Follicles by the Use of Tetrazolium Salts. *Quart. J. Microscop. Science* **94**, 253–268.
- Rutenburg A. M., Wolman M. und Seligman A. M. 1953. Comparative Distribution of Succinic Dehydrogenase in Six Mammals and Modification in the Histochemical Technic. *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 66–81.
- Satô S. 1953. The Histochemical Detection of Succinic Dehydrogenase with 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride. (In Japanese with an English Summary.) *Bot. Mag. Tokyo* **66**, 277–285.
- 1956. The Distribution of Succinic Dehydrogenase and Mitochondria in the Embryos of *Phaseolus vulgaris*. (In Japanese with an English Summary.) *Bot. Mag. Tokyo* **69**, 137–141.
- Scarpelli D. G., Hess R. und Pearse A. G. E. 1958. The Cytochemical Localization of Oxidative Enzymes. I. Diphosphopyridine Nucleotide Diaphorase and Triphosphopyridine Nucleotide Diaphorase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 747–752.
- und Pearse A. G. E. 1958. Physical and Chemical Protection of Cell Constituents and the Precise Localization of Enzymes. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 369–376.
- Sedar A. W. und Rosa C. G. 1961. Cytochemical Demonstration of the Succinic Dehydrogenase System with the Electron Microscope Using Nitro-Blue Tetrazolium. *J. Ultrastruct. Res.* **5**, 226–243.
- Rosa C. G. und Tsou K. C. 1962. Tetranitro-Blue Tetrazolium and the Electron Histochemistry of Succinic Dehydrogenase. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 506–508.
- Seligman A. M. und Rutenburg A. M. 1951. The Histochemical Demonstration of Succinic Dehydrogenase. *Science* **113**, 317–320.
- Sharma N. N. und Bourne G. H. 1963. Studies on the Histochemical Distribution of Oxidative Enzymes in *Trichomonas vaginalis*. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 628–634.
- Shelton E. und Schneider W. C. 1952. On the Usefulness of Tetrazolium Salts as Histochemical Indicators of Dehydrogenase Activity. *Anat. Record* **112**, 61–81.

- Sorokin H. P. 1956. Studies on Living Cells of Pea Seedlings. I. Survey of Vacuolar Precipitates, Mitochondria, Plastids, and Sphaerosomes. *Am. J. Bot.* **43**, 787-794.
- und Sorokin S. 1956. Staining of Mitochondria with Neotetrazolium Chloride. *Am. J. Bot.* **43**, 183-190.
- Stern H. und Mirsky A. E. 1953. The Isolation of Wheat Germ Nuclei and Some Aspects of their Glycolytic Metabolism. *J. Gen. Physiol.* **36**, 181-200.
- und Mirsky A. E. 1954. Soluble Enzymes of Nuclei Isolated in Sucrose and Non-Aqueous Media. *J. Gen. Physiol.* **37**, 177-187.
- Strominger J. L. und Lowry O. H. 1955. The Quantitative Histochemistry of Brain. IV. Lactic, Malic and Glutamic Dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **213**, 635-646.
- Strugger S. 1954. Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Hérit. *Protoplasma* **43**, 120-173.
- Tewari H. B. und Bourne G. H. 1962 a. Histochemical Evidence of Metabolic Cycles in Spinal Ganglion Cells of Rat. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 42-64.
- und Bourne G. H. 1962 b. Some New Aspects of the Nucleo-Cytoplasmic Relationship in Neurons of Rat. *J. Histochem. Cytochem.* **10**, 767-768.
- Tiefel R. M. 1957. Histochemical Differentiation of Meristems. Thesis, University of Missouri. Zusammenfassung in Dissertation Abstracts, Vol. XVII/7, 2133-2134.
- Van Die J. 1962. The Distribution of Glutamic Dehydrogenase Activity and  $\alpha$ -Ketoglutarate in Various Parts of the Tomato Plant. *Acta Bot. Neerl.* **11**, 1-10.
- Van Fleet D. S. 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. Histochemistry of Enzymes in Plant Tissues. *Enzyme*, 2. Teil. Im «Handbuch der Histochemie», Band VII/2, herausgegeben von W. Graumann und K. Neumann. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Vishniac W. und Ochoa S. 1952. Fixation of Carbon Dioxide Coupled to Photochemical Reduction of Pyridine Nucleotides by Chloroplast Preparations. *J. Biol. Chem.* **195**, 75-93.
- Walker D. G. und Seligman A. M. 1961. Formalin Fixation in the Cytochemical Demonstration of Succinic Dehydrogenase of Mitochondria. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 415-427.
- Wanner H. und Frey G. 1952. Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. *Planta* **41**, 190-194.
- Wattenberg L. W. 1958. Microscopic Histochemical Demonstration of Steroid-3 $\beta$ -ol Dehydrogenase in Tissue Sections. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 225-232.
- Weier T. E. und Stocking C. R. 1952. The Chloroplast: Structure Inheritance, and Enzymology. II. *Bot. Rev.* **18**, 14-75.
- Williams D. und Whiteley H. J. 1963. Variations in Formazan Production in Mitochondrial Dehydrogenase Studies on Osmotically Protected Fresh Frozen Sections. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 89-95.
- Wohlfarth-Bottermann K. E. 1962. Weitreichende fibrilläre Protoplasmadifferenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung. *Protoplasma* **53**, 514-539.



## Tafel I

### Abbildung 1

GDH. *Cucurbita pepo*, 62 Tage alt. Seitenknospe; Längsschnitt. Tunica stärker als Corpus gefärbt. Färbung des Corpus nimmt gegen Basis ab. Vergrößerung 290mal

### Abbildung 2

GADH. *Cucurbita pepo*, 55 Tage alt. Sprossvegetationspunkt; Längsschnitt. Betontere Farbreaktion im Bereich der späteren Blattanlagen (BA). Vergrößerung 300mal

### Abbildung 3

GADH. *Cucurbita pepo*, 62 Tage alt. Sprossvegetationspunkt; Längsschnitt. Apex in Nachbarschaft des hochaktiven Blattprimordiums stärker gefärbt. Linke untere Bildecke: basale Färbung eines jungen Blattes weist auf basioplastes Wachstum hin. Vergrößerung 120mal

### Abbildung 4

GADH. *Cucurbita pepo*, 55 Tage alt. Blütenknospe; Längsschnitt. Mit Methanol nachbehandelt. Spitzenfärbung der Sepalen kündigt akroplastes Wachstum an. Vergrößerung 120mal

### Abbildung 5

G-6-PDH. *Zea mays*, 67 Tage alt. Sprossvegetationspunkt; Längsschnitt. Gleichmässige, gegen Basis abnehmende Färbung des Apex; Blattprimordien und jüngste Blättchen vollständig gefärbt. Vergrößerung 120mal

### Abbildung 6

GDH. *Zea mays*, 54 Tage alt (Gewächshauspflanze). Seitenknospe: weiblicher Blütenstand; Querschnitt. Vollständige Färbung der Blattprimordien und jüngsten Blättchen (BL); marginale (MAR) und adaxiale (AD) Konzentration des Farbstoffes in den Blättern an den Orten des grössten Wachstums; Procambium (PC) und Epidermis durch dunklere Tönung hervorgehoben. Vergrößerung 165mal

### Abbildung 7

NAD-MDH. *Zea mays*, 24 Stunden lang gequollener Samen. Wurzel; Längsschnitt. Mit Saccharose vor-, mit Methanol nachbehandelt. Starke Färbung des Protoderms. Deutlich schwächere Reaktion im Bereich der Initialzellen von Zentralzylinder und Calyptra (enzymatisches Ruhezentrum). Vergrößerung 48mal

### Abbildung 8

NAD-MDH. *Zea mays*, 73 Tage alt. Wurzelspitze; Längsschnitt. Gleichmässige NBT-Reduktion im Wurzelapex; zunehmende Reduktion im Protoderm. In der Calyptra sind die mittleren Zellschichten am aktivsten. Vergrößerung 48mal

## Tafel II

### Abbildung 9

NAD-MDH. *Cucurbita pepo*, 14 Tage alt. Wurzelspitze; Längsschnitt. Zukünftige Rinde reagiert stärker als Initialen, späterer Zentralzylinder und innere Calyptra. Vergrößerung 70mal

### Abbildung 10

NAD-MDH. *Cucurbita pepo*, 55 Tage alt. Hypokotyl: Cambium negativ; Begleitzellen der sekundären Gefässe positiv. Vergrößerung 300mal

### Abbildung 11

G-6-PDH. *Zea mays*, 67 Tage alt. Wurzel; Längsschnitt. Rhizodermis und angrenzende Cortezellen reagieren am stärksten positiv. Vergrößerung 150mal

### Abbildung 12

NAD-MDH. *Cucurbita pepo*, 62 Tage alt. Fruchtknoten; Querschnitt. Fruchtblattepidermis zeigt tiefste Färbung. Vergrößerung 48mal

#### Abbildung 13

ICDH. *Cucurbita pepo*, 79 Tage alt. Epidermis des Fruchtknotenstiels; Schnitt parallel zur Oberfläche. Mit Saccharose vor-, mit Methanol nachbehandelt. Kleinste und grösste Partikeln; kreisförmig mit fast geschlossener Umrandung (Pfeile) oder halbmondförmig (Doppelpfeil). Vergrößerung 950mal

#### Abbildung 14

GDH. *Cucurbita pepo*, 55 Tage alt. Narbe; Längsschnitt. Mit Methanol nachbehandelt. Stärkste Aktivität im Epithel und subepithelialen Parenchym. Vergrößerung 75mal

#### Abbildung 15

GADH. *Zea mays*, 13 Tage alt. Falte des Scutellumepithels; Querschnitt. Kerne negativ. Cytoplasma der Epithelzellen diffus gefärbt. Vergrößerung 386mal

#### Abbildung 16

SDH. *Zea mays*, 65 Tage alt. Wurzel (Differenzierungszone); Längsschnitt. Mit Saccharose vorbehandelt. Metaxylemgefässelement mit zahllosen grossen Partikeln; Kern negativ. Vergrößerung 950mal

#### Abbildung 17

GDH. *Zea mays*, 76 Tage alt. Jüngster Stengelabschnitt; Längsschnitt. Sich differenzierender Procambiumstrang mit grossen Partikeln von der Umgebung mit kleinen Partikeln abgehoben. Grosse Partikeln mit glatter (Pfeile) und körniger (Doppelpfeile) Umrandung. Vergrößerung 765mal

#### Abbildung 18

NAD-MDH. *Cucurbita pepo*, 73 Tage alt. Fruchtknotenstiel; Längsschnitt. Sich differenzierende Siebröhre: Partikeln perinucleär (PN) und an den Querwänden (QW) konzentriert. Vergrößerung 300mal

### Tafel III

#### Abbildung 19

NAD-MDH. *Cucurbita pepo*, 79 Tage alt. Fruchtknoten; Längsschnitt. Mit Saccharose vor-, mit Methanol nachbehandelt. Sieb-, Geleitzellen und Parenchymzellen des primären externen Phloems. Kerne negativ. Perinucleäre Konfiguration (PN) der Partikeln in den Geleitzellen. Vergrößerung 740mal

#### Abbildung 20

NAD-MDH. *Cucurbita pepo*, 79 Tage alt. Fruchtknoten; Längsschnitt. Mit Saccharose vor-, mit Methanol nachbehandelt. Geleitzellen des primären externen Phloems: Kerne negativ; perinucleäre Konzentration der Partikeln (Kernmembran aktiv?). Vergrößerung 740mal

#### Abbildung 21

ICDH. *Cucurbita pepo*, 79 Tage alt. Kelchblatt einer weiblichen Blütenknospe; Längsschnitt. Mit Saccharose vor-, mit Methanol nachbehandelt. Reife Sieb- und Geleitzellen des primären externen Phloems. Beachte die zahlreichen enzymatisch aktiven Zellorganellen in den Siebzellen. Vergrößerung 740mal

#### Abbildung 22

GDH. *Cucurbita pepo*, 55 Tage alt. Cotyledo; Längsschnitt. Mit Methanol nachbehandelt. Sieb- und Geleitzelle des sekundären Phloems. In der reifen Siebzelle (dicke, hydratisierte Nacré-Zellwand) fallen neben scharf umrissenen zahllose weniger scharf begrenzte Farbbezirke auf (Pfeile). Vergrößerung 485mal

#### Abbildung 23

GADH. *Zea mays*, 73 Tage alt. Wurzel (Differenzierungszone); Querschnitt. MPSZ = Metaphloemsiebzelle; MX = Metaxylem; PCL = Perizykel; PP-PAR = Protophloemparenchymzelle; PPSZ = Protophloemsiebzelle; PX = Protoxylem. Vergrößerung 380mal

Abbildung 24

NAD-MDH. *Cucurbita pepo*, 50 Tage alt. Wurzel (Differenzierungszone); Querschnitt. PP = Protophloem; PX = Protoxylem. Perizykel bildet beim Protoxylem Nebenwurzeln (NW). Vergrößerung 74mal

Abbildung 25

GDH. *Zea mays*, 13 Tage alt. Scheide eines sehr jungen Blattes; Querschnitt. Leitbündel: stärkste Aktivität in den Begleitzellen der Gefäße. Vergrößerung 480mal

Abbildung 26

NAD-MDH. *Zea mays*, 24 Tage alt. Scheide eines jungen Blattes; Querschnitt. Markanteste NBT-Reduktion in den Begleitzellen der Gefäße, in den Geleitzellen des Metaphloems und in der Epidermis. Vergrößerung 120mal

Abbildung 27

NAD-MDH. *Zea mays*, 24 Tage alt. Scheide eines älteren Blattes; Querschnitt. Leitbündel: grösste Aktivität im Metaphloem; Bündelscheide negativ. Vergrößerung 300mal

Abbildung 28

NAD-MDH. *Zea mays*, 79 Tage alt. Blattspreite; Querschnitt. Mit Saccharose vor-, mit Methanol nachbehandelt. Intensive Formazanproduktion in der parenchymatischen Leitbündelscheide. Grana der Chloroplasten gefärbt (Pfeile); Chloroplasten von enzymatisch aktiven Zellorganellen umhüllt (Doppelpfeile). Vergrößerung 740mal

Abbildung 29

NADP-MDH. *Zea mays*, 79 Tage alt. Blattspreite; Querschnitt. Mit Saccharose vor-, mit Methanol nachbehandelt. Phloem eines grossen Leitbündels: Geleitzellen (GZ) tief gefärbt; aktive Zellorganellen im Plasmawandbelag der reifen Siebzellen (SZ). Vergrößerung 740mal

Tafel IV

Abbildung 30

G-6-PDH. *Zea mays*, 67 Tage alt. Blattspreite; Längsschnitt. Mit Methanol nachbehandelt. Einzelne Zellen der parenchymatischen Leitbündelscheide diffus gefärbt (DIF). Lückenlose Färbung der Chloroplasten (CL). Schwach bis stark diffuse (Doppelpfeile) und möglicherweise granuläre (Pfeile) Färbung der Stärkechloroplasten. Vergrößerung 306mal

Abbildung 31

NAD-MDH. *Zea mays*, 24 Tage alt. Basis des 2. Internodiums; Querschnitt. Höchste Enzymaktivität ist im Xylemparenchym und in den sich differenzierenden, horizontal verlaufenden Leitbündeln lokalisiert. Vergrößerung 157mal

Abbildung 32

NAD-MDH. *Cucurbita pepo*, 79 Tage alt. Stengel; Querschnitt. Mit Saccharose vor-, mit Methanol nachbehandelt. Leitbündel: Begleitzellen der Gefäße tief gefärbt; Cambium mässig aktiv. Vergrößerung 142mal

Abbildung 33

G-6-PDH. *Zea mays*, 27 Stunden gequollener Samen. Scutellum; Längsschnitt. Mit Saccharose vor-, mit Methanol nachbehandelt. Speicherparenchymzelle: sowohl starke, diffuse als auch partikelgebundene Färbung. Vergrößerung 1170mal

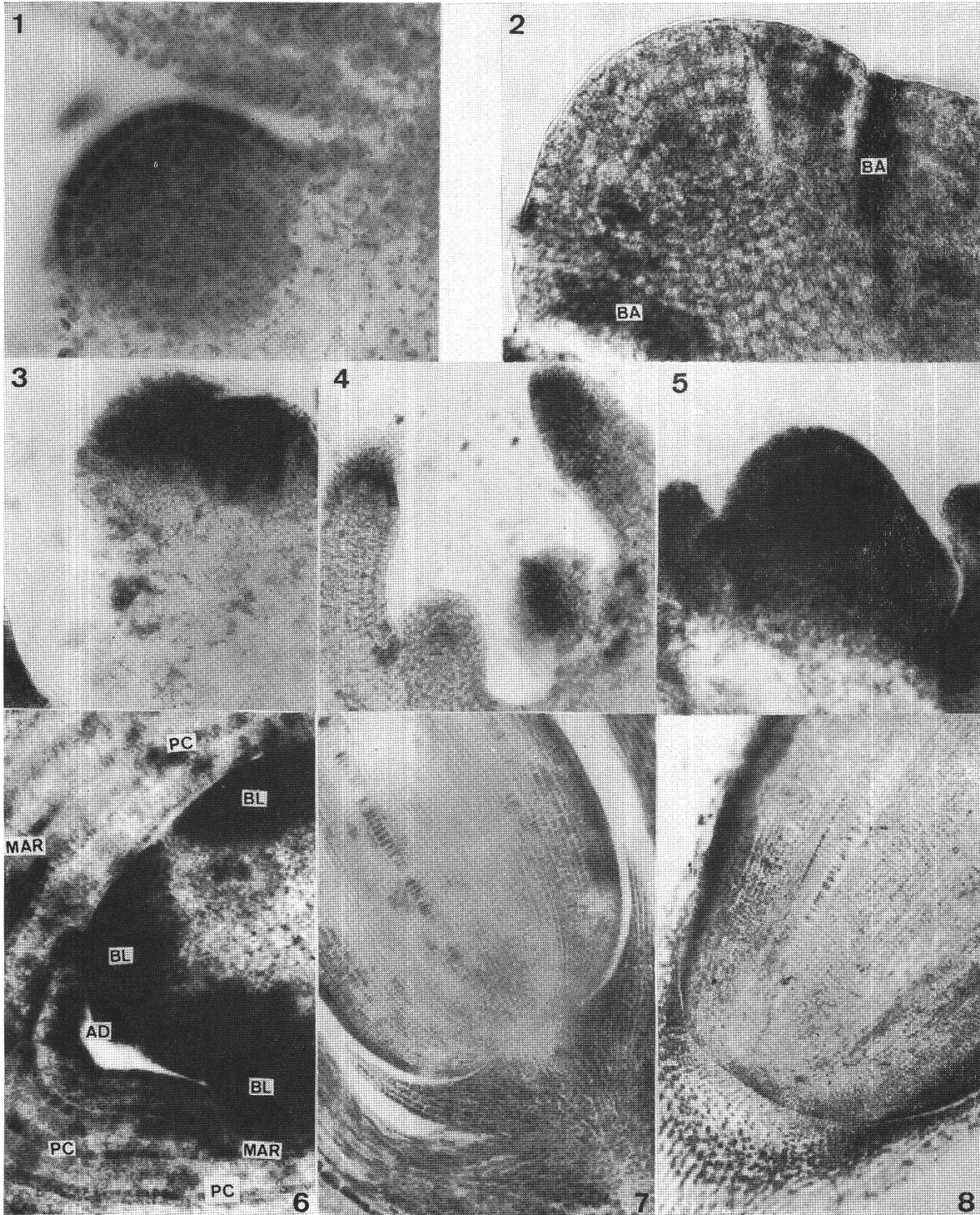
Abbildung 34

G-6-PDH. *Cucurbita pepo*, 79 Tage alt. Samenanlage; Längsschnitt. Mit Saccharose vor-, mit Methanol nachbehandelt. Die Embryosackzelle und der von ihr zur Mikropyle sich erstreckende Nucellusbereich zeigen verstärkte Enzymtätigkeit. Vergrößerung 120mal

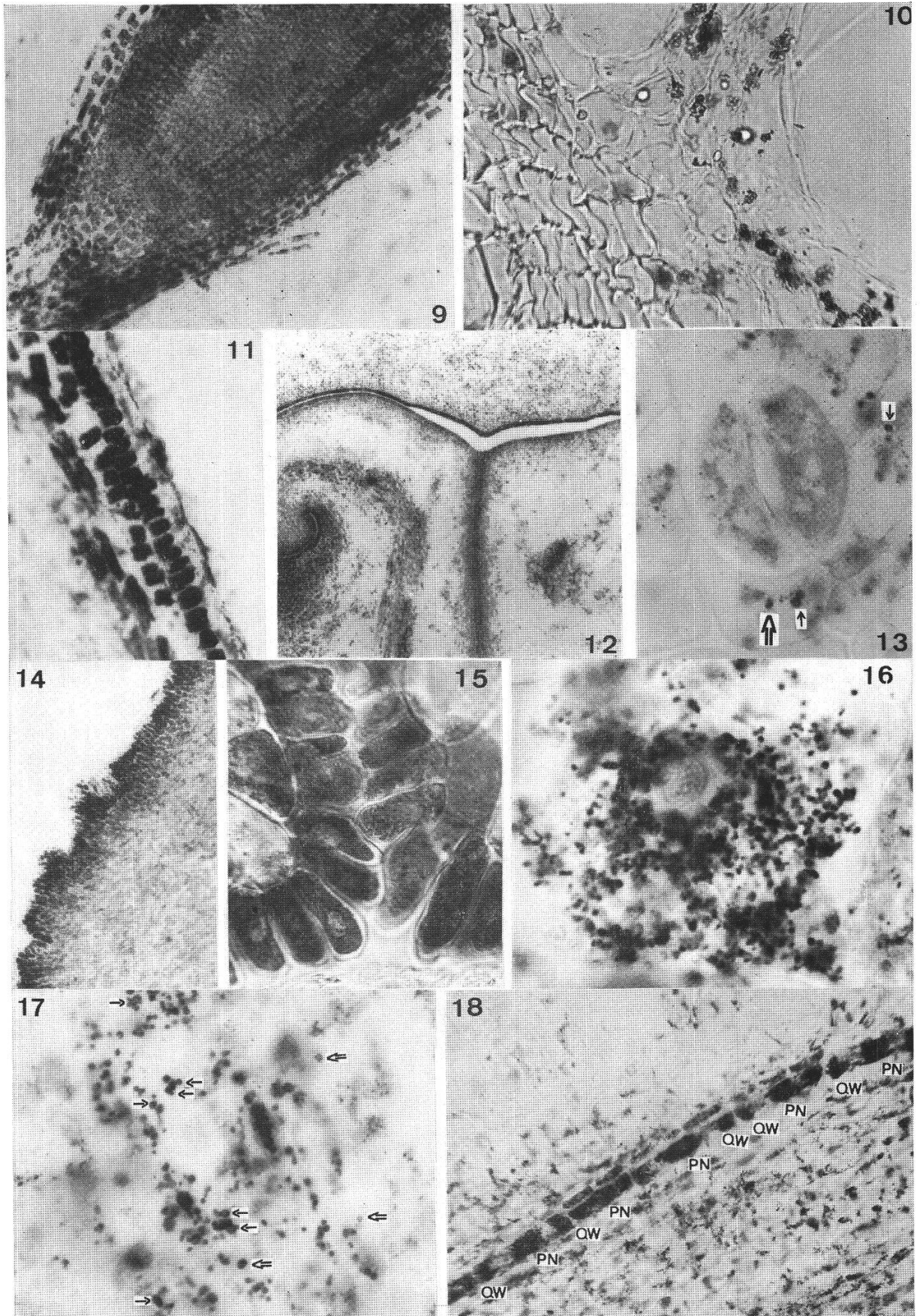
Abbildung 35

GDH. *Cucurbita pepo*, 62 Tage alt. Samenanlage mit Embryosack; Längsschnitt. Der Eiapparat und der von der Embryosackzelle zur Mikropyle sich hinziehende Bereich des Nucellus manifestieren eine erhöhte NBT-Reduktion. Vergrößerung 300mal

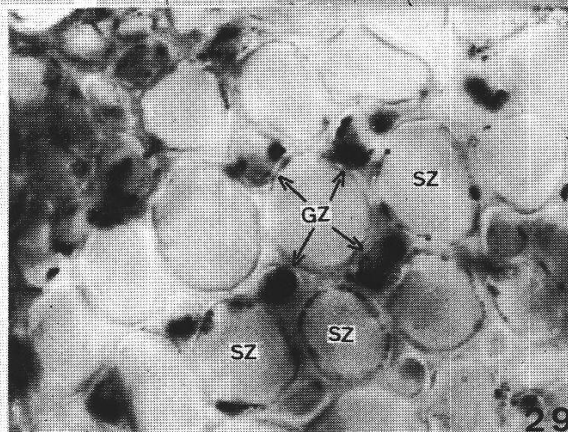
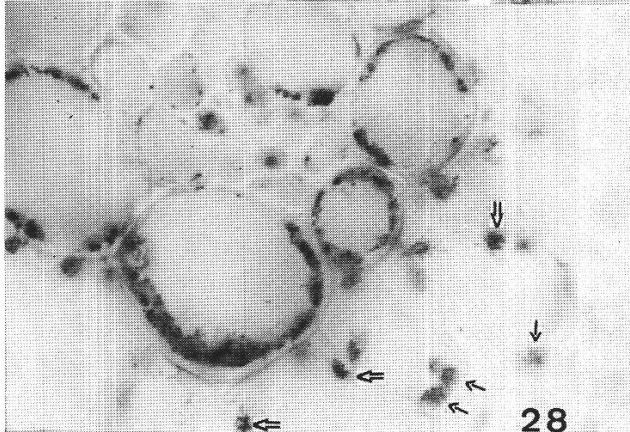
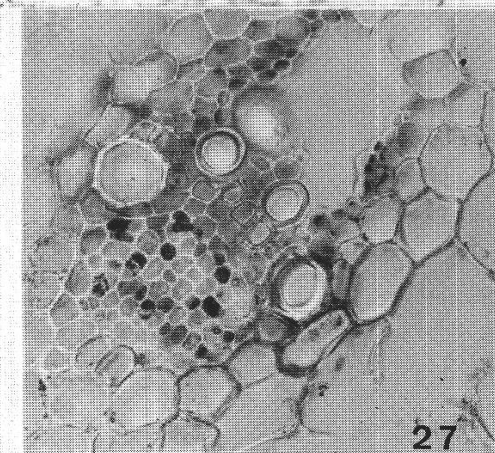
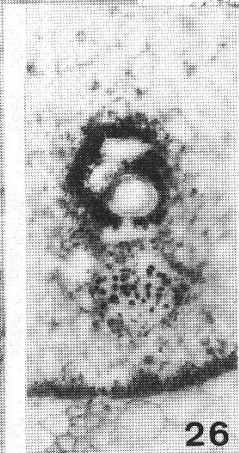
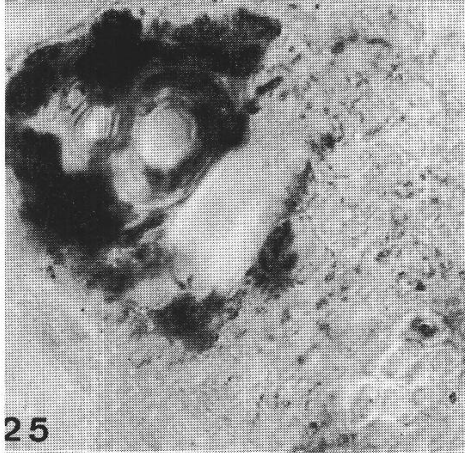
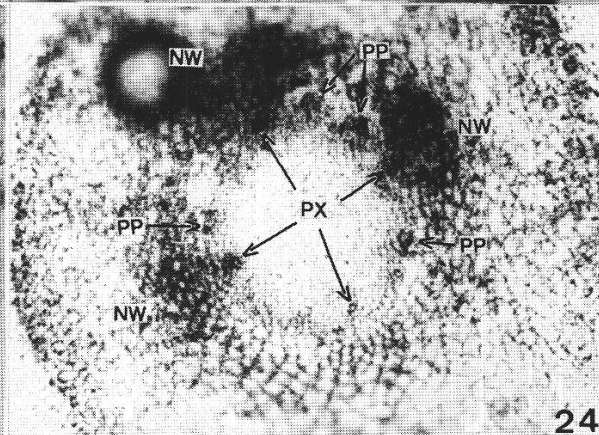
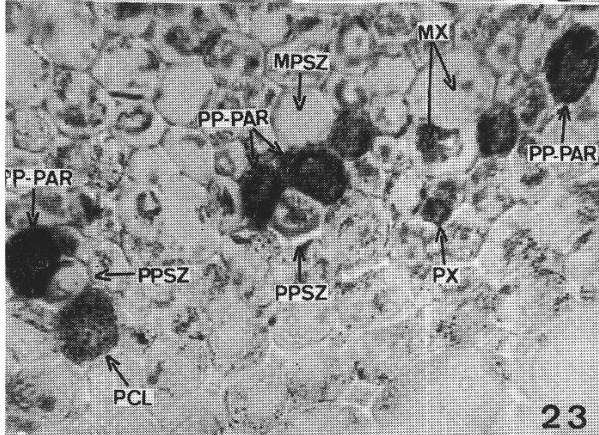
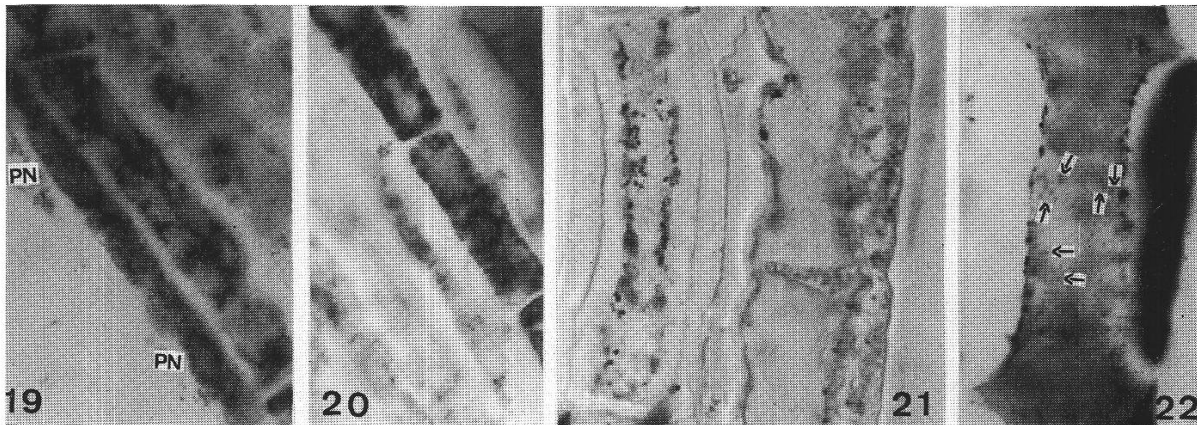
Tafel I



Tafel II



Tafel III



Tafel IV

