©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Zellphysiologische Untersuchungen an der Zwiebelschuppe von *Hippeastrum*

Von

Irmtraud THALER

Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen, Universität Graz

Mit 7 Abbildungen

Eingelangt am 15. Jänner 1966

An Zwiebeln von *Hippeastrum* treten nicht selten grellrote Flecken auf. Herr Prof. WIDDER machte mich auf eine solche Zwiebel aufmerksam, die aus den Kulturen in den Gewächshäusern des Botanischen Gartens der Universität Graz stammte. Obwohl *Hippeastrum* sehr häufig von einem Pilz *(Stagonospora Curtisii)* befallen wird, auf den die roten Flecken zurückgeführt werden (PETRAK 1930, KOTTHOFF 1942), waren an unserer Pflanze weder Sporen noch Hyphen zu finden. Die Rotfärbung dürfte daher wohl auf andere Ursachen zurückgehen.

Es ist von vielen Pflanzen bekannt, daß an Wundstellen, gleichgültig ob durch Insektenstiche, Pilze oder durch mechanisches Verletzen hervorgerufen, ein rotes Pigment auftritt. Dieses ist meist nicht mit Anthocyan identisch (vgl. GÄUMANN 1951).

Ein näheres Literaturstudium ergab, daß bereits PALLADIN 1911 an den Zwiebeln und Blättern von *Amaryllis vittata* (= *Hippeastrum hybridum*) rote Flecken beobachtet hatte. Er nannte diesen Farbstoff Vittatin und stellte fest, daß dieser nur in toten Zellen, in der Zellwand, bei feuchter Atmosphäre und genügendem Luftzutritt gebildet wird. „Er entsteht als das Ergebnis einer postmortalen Oxydation des Chromogens, obgleich als Anstoß zu seiner Bildung die durch die Verletzung hervorgerufene erhöhte Lebenstätigkeit lebender Zellen einzusetzen ist" (PALLADIN 1911: 135).

Es war daher anzunehmen, daß *Hippeastrum* einen spezialisierten Stoffwechsel besitzt, so daß es lohnend erschien, diese Pflanze näher zu untersuchen. Zugleich wurde eine chemische Untersuchung des Farbstoffes begonnen. Diese ist jedoch noch nicht abgeschlossen; über ihre Ergebnisse wird später gesondert berichtet.

In der untersuchten Pflanze handelt es sich um das häufig kultivierte *H. aulicum* HERB.

Volle Zellsäfte der unteren Epidermis der Zwiebelschuppe

Die äußere Zwiebelepidermis zeigt weder mit Eisenchlorid noch mit Coffein eine Gerbstoffreaktion. Die Reaktion auf Flavonderivate mit

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Ammoniak nach MOLISCH 1923 verläuft positiv. Es tritt eine leichte Gelbfärbung auf. In den Dämpfen rauchender Salzsäure (KLEIN 1922) bilden sich allerdings keine Flavonkristalle. Da die Form der Speicherung basischer Farbstoffe in den Zellsäften nach KINZEL & BOLAY 1962 Hinweise auf die Art des Inhaltsstoffes zu geben vermag, wurde mit Acridinorange 1 : 10 000 gefärbt.

Die Vakuolen der äußeren Epidermis wie auch die der darunterliegenden Zellen zeigen nach kurzer Färbezeit im UV-Licht eine blaugrüne diffuse Fluoreszenz. Wir haben es hier mit „vollen" Zellsäften im Sinne HÖFLERS 1947 zu tun. Die Zellsäfte der inneren Epidermis leuchten rot und sind daher „leer". Durch Zusatz von n/100 Ammoniak tritt in der unteren Epidermis sofort eine tropfige Entmischung ein, die nach Absaugen des Ammoniak und Zugabe eines Puffers von pH 2 wieder verschwindet. Die Kugeln leuchten rot, während das übrige Zellinnere stark hellblau fluoresziert. Nach längerem Färben mit Acridinorange tritt auch ohne Ammoniakzusatz eine Entmischung auf. Färbt man mit einer ammoniakhaltigen Acridinorangelösung 1 : 10 000 (die Stammlösung wurde statt mit H_2O mit n/100 NH_3 verdünnt), so fallen im hellblau fluoreszierenden Zellsaft Dendriten, am Schnittrand auch Tropfen aus. Die blaue Fluoreszenz des Zellsaftes, die besonders schön nach Ammoniakzusatz auftritt, scheint auf ein Alkaloid zurückzugehen. Denn auch im Chromatogramm des Preßsaftes erscheint ein ähnlich blau fluoreszierender Fleck, der mit DRAGENDORFFschem Reagens eine positive Reaktion gibt.

HÄRTEL 1951 vermutet bereits, daß Phloroglukotannoide eine der Ursachen der „vollen" Zellsäfte sind; KINZEL 1959 nimmt an, daß außer diesen Stoffen noch Flavonderivate diesen Effekt hervorrufen. Die eingehenden histochemischen Untersuchungen von BOLAY 1960 haben ergeben, daß die „volle" Natur eines Zellsaftes nur durch Stoffe aus der Flavon-Gerbstoffgruppe bestimmt wird. Eine echte (entmischbare) „Diffusfärbung voller Zellsäfte oder eine tropfige bzw. kristallinische Entmischung deuten auf einen Gehalt an Flavonoiden hin, während fein krümelige oder submikroskopische Ausfällung (unechte Diffusfärbung) einen Gehalt an Gerbstoffen vermuten lassen". Nach KINZEL & BOLAY 1962 : 200 entmischen sich flavonhaltige Zellsäfte leicht mit Ammoniak zu Tröpfchen oder Körnchen. Es kann also angenommen werden, daß auch bei *Hippeastrum* Flavonoide die Ursache der vollen Zellsäfte sind.

Sphärite in der unteren Epidermis der Zwiebelschuppe

Mit Seesand abgeriebene und feucht gehaltene Zwiebelschuppen enthalten nach 24 Stunden in den abgestorbenen Epidermiszellen wandständige Sphärite (Abb. 1a, 1b); nur den Schließzellen fehlen sie. Sie lassen einen radialen Bau erkennen, zeigen im polarisierten Licht das schwarze Kreuz und sind auf den Radius bezogen negativ doppelbrechend.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Ein Schmelzpunkt dieser Gebilde konnte nicht ermittelt werden, da die Sphärite verschmoren. Im UV-Licht erscheinen sie milchig blau. Färbt man die Schnitte 12 Stunden in einer Acridinorange-Lösung 1:10 000, so leuchten sie im UV-Licht rot wie die Zellwand. Am Rande der Sphärite treten kleine, rotgefärbte Tröpfchen auf.

Im kochenden Wasser lösen sie sich auf, im kalten verschwinden sie erst nach einigen Tagen. In Alkohol, Glycerin und in Chloroform bleiben sie erhalten.

In wenig verdünnten Mineralsäuren (HCl, H_2SO_4, HNO_3) lösen sie sich, ohne aufzubrausen, während sie in schwacher Schwefelsäure sichtbar bleiben und sich im Zentrum violett färben. In Eisessig bleiben sie eine Zeitlang doppelbrechend, später verquellen sie. In Ammoniak sind sie unlöslich. Mit Sudan geben die Sphärite keine Reaktion. In Jod-Jodkalium bleiben sie doppelbrechend und werden gelblich.

Mit Chlorzinkjod quellen die Sphärite und nehmen vorübergehend eine hellblaue Farbe an.

In Millonreagens lösen sie sich, wohl durch die Salpetersäure, auf und die ganze Zelle zeigt eine positive Reaktion.

In α-Naphthol-Schwefelsäure (Molisch-Reaktion auf Zucker) löst sich der Kristall farblos, während der Inhalt der Zelle violett wird.

Die Kristalle ähneln in ihrer Form sehr den Inulinsphäriten, sie lassen sich aber durch die oben angeführte Methode oberflächlichen Verletzens nicht mit Sicherheit reproduzieren. Auch in Alkohol treten sie nicht auf, ebensowenig sind sie in Herbarmaterial nachweisbar. Dagegen erscheinen sie sofort und mit Sicherheit nach Eintauchen der Schnitte in essigsaure Benzidinlösung; dies weist aber auf Inulin hin (Tunmann/Rosenthaler 1931). Die mit diesem Reagens erhaltenen Sphärite kommen gleichfalls nur in den Epidermiszellen, nicht aber in den Schließzellen und auch nicht im darunterliegenden Parenchym vor. Ihr Ausbleiben in Alkohol könnte daher damit erklärt werden, daß das Polysaccharid nur in der Epidermis enthalten ist und daher bei Alkoholzutritt diffundiert, ehe sich Sphärite bilden können. Um Hesperidin kann es sich nicht handeln, da sich dieses in heißem Wasser nicht und in Alkalien mit gelber Farbe löst. Auch Calzium-Oxalat ist auszuschließen, da in Schwefelsäure keine Gipsnadeln entstehen.

Die Fehlingsche Probe mit Epidermen verläuft negativ, die Probe nach Seliwanoff dagegen stark positiv. Es muß demnach Fruktose in nicht reduzierender Form, also als Polysaccharid vorliegen, was gleichfalls auf einen inulinartigen Stoff hinweist.

Schließlich wurde versucht, diesen Stoff chromatographisch darzustellen. Epidermisschnitte wurden teils in heißem Wasser, teils in heißer 2,5% HCl extrahiert und je ein Tropfen der Extrakte auf Chromatographiepapier aufgetragen. Auf die gleiche Startlinie kamen noch Inulin, Fruktose und Glukose. Es wurde absteigend chromatographiert; als Laufmittel diente n-Butanol-Essigsäure-Wasser 4 : 1 : 5 (organische Phase), als

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Sprühreagens Benzidin-Trichloressigsäure (LINSKENS 1959). Das reine Inulin wandert nicht und gibt mit dem Sprühreagens einen braunen Fleck an der Startlinie. Einen braunen Rand findet man auch dort, wo Tropfen des wässrigen Extraktes aufgetragen wurden. Der Extrakt des hydrolysierten Schnittes gibt keinen braunen Fleck am Start, wohl aber intensive Glukose- und Fruktose-Flecken. Durch die Hydrolyse ist also das Inulin in Fruktose aufgespalten worden; die Glukose stammt offenbar aus der im unhydrolysierten Schnitt nachweisbaren Saccharose.

In WEHMER 1929 wird für die Familie der Amaryllidaceen vereinzelt Inulin angegeben, so z. B. für *Narcissus*. Für *Hippeastrum* ist Inulin allerdings nicht angeführt.

Im Benzidin-Reagens entstehen in der Zwiebel von *Leucojum*, *Galanthus* und *Narcissus* ähnliche Sphärite. Es ist wahrscheinlich, daß es sich hier auch um inulinähnliche Stoffe handelt.

Zum Vorkommen von Saponin

Die Zwiebelschuppe schäumt beim Kochen sehr stark auf. Konzentrierte Schwefelsäure gibt eine gelbliche, nach einer halben Stunde eine rote, und schließlich violette Färbung. Diese Reaktion weist zwar auf Saponin hin, doch geben viele andere Stoffe eine ähnliche Reaktion (TUNMANN/ROSENTHALER 1931). Da aber die Blutgelatine-Methode nach FISCHER (vgl. FISCHER 1952 *)), die die hämolysierende Wirkung des Saponin anzeigt, negativ verlief, muß angenommen werden, daß kein Saponin in der Zwiebel von *Hippeastrum* vorhanden ist.

Karyologische Notizen

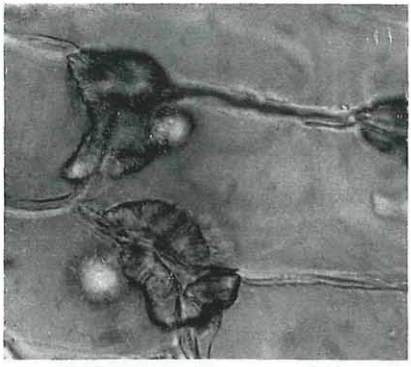
In der ausgebildeten unteren Epidermis von *Hippeastrum*-Zwiebelschuppen wurden oft Mitosen beobachtet, die verschieden orientiert sind. Verwundung durch Pilze oder durch mechanische Einwirkung ist wohl ihre Ursache. Nach dem Ausheilen der verwundeten Stelle verbleiben oft merkwürdige Leisten, Reste der ursprünglichen Zellwände. Die Chromosomenzahl variiert in den Epidermiszellen zwischen 19 und 23. Ähnliche Angaben für somatische Gewebe von *Hippeastrum* machen bereits SHARMA & JASH 1958. TRAUB 1963 gibt für *Hippeastrum*-Sippen (für welche er den Gattungsnamen *Amaryllis* beibehält) die Chromosomenzahlen $2n = 22, 44, 66, 77$ an. Unsere Pflanzen gehören demnach einer diploiden Sippe an.

Wenn man die untere Epidermis rasch abzieht, kann man an dem relativ jungen Gewebe der Schuppenbasis sehr häufig Kernübertritte von einer Zelle in die benachbarte beobachten. Diese merkwürdige Erscheinung wurde zum ersten Mal von MIEHE 1901 in der Epidermis von *Allium nutans* beobachtet und seither öfters an Monokotylen (vgl. SCHÜRHOFF 1906,

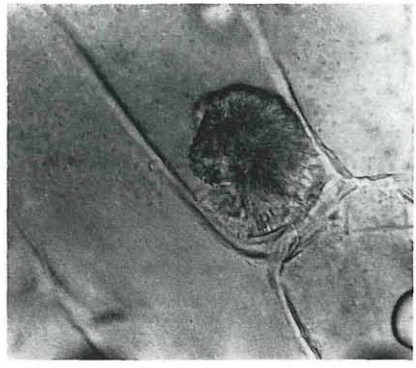
---

*) Für die Durchführung der Untersuchung danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. R. FISCHER, Pharmakognostisches Institut Graz.

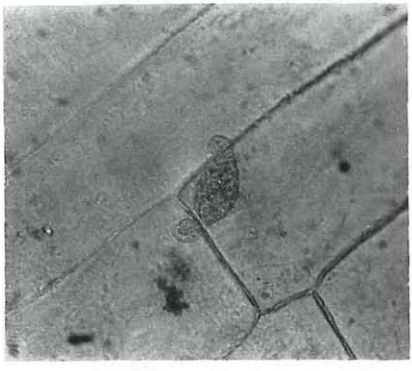
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at



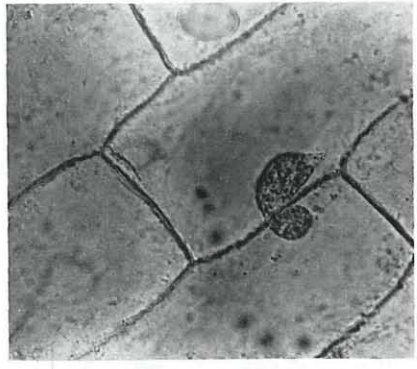
1a



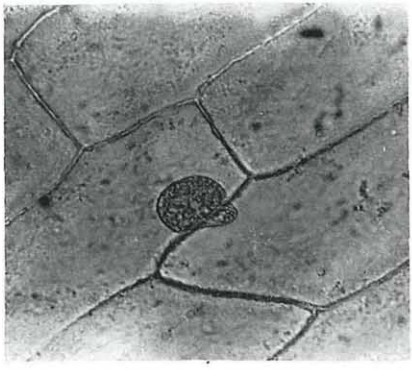
1b



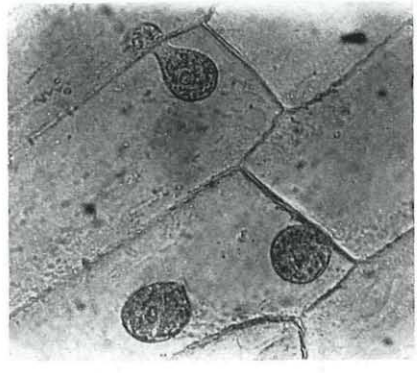
2a



2b



2c



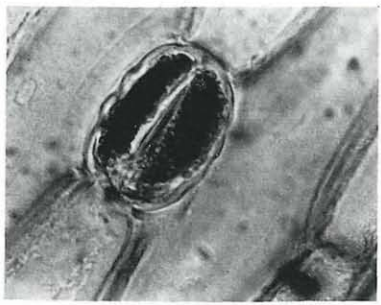
2d

Abb. 1 und 2. *Hippeastrum*-Zwiebelschuppe. — Abb. 1a und 1b. Untere Epidermis mit wandständigen Sphäriten. — Abb. 2a bis 2d. Untere Epidermis der Schuppenbasis; a bis c, Kernübertritt von einer Zelle in die benachbarte; d, Kernübertritt, in der Nachbarzelle 2 Kerne. — (Vergrößerung aller Abb. 280×).

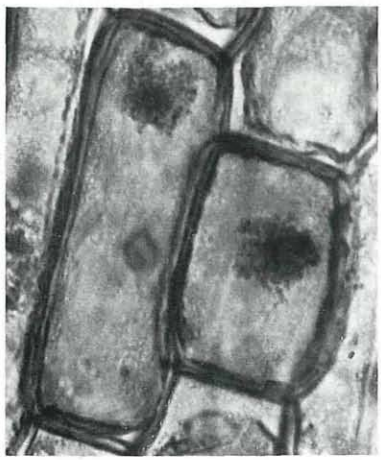
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

3

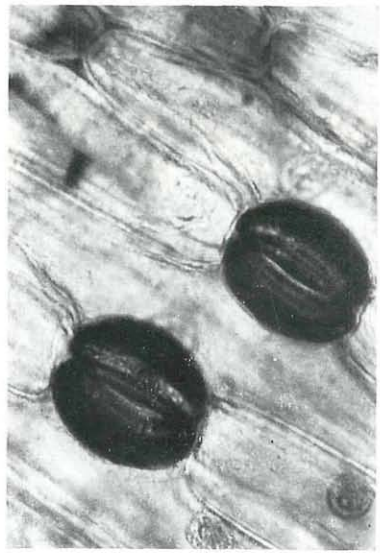
6



4



5



7

Abb. 3 bis 7. *Hippeastrum*-Zwiebelschuppe (Abb. 3, 5, 6) bzw. -Blatt (Abb. 4, 7), untere Epidermis. — Phosphataseaktivität in den Nebenzellen (Abb. 3), in den Schließzellen (Abb. 4). — DOPA-Reaktion, Phenoloxydaseaktivität in Plastiden und Kern (Abb. 5), in den Elaioplasten (Abb. 6), in den Schließzellen (Abb. 7). — (Vergrößerung aller Abb. 280×).

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

KÜSTER 1939). Da in der Literatur offenbar noch keine photographischen Belege für solche Kernübertritte vorliegen, sei dies an Hand eines so günstigen Objektes nachgeholt (Abb. 2a, b, c, d).

Die Form der übertretenden Kerne ist sehr verschieden; manche sehen normal aus, andere sind lang ausgezogen und scheinen ganz deformiert. Sie lassen auch eine Verlagerung ihres Inhaltes erkennen (Abb. 2d). KÜSTER 1939 gibt an, daß diesen Kerntransporten grobe Zerreißungen der Zellwand vorausgehen.

In Epidermiszellen, die von frischen Zwiebelschuppen abgezogen waren, zeigen die kernlosen wie die doppelkernigen Zellen keinerlei Plasmolyse mehr. Wässert man jedoch die Zwiebelschuppen vor der Präparation einige Stunden, so kann eine stark zerrissene Konkavplasmolyse auftreten, wie sie KÜSTER 1939 für *Tradescantia tricolor* und *Zea mays* beschreibt. Acridinorange wird in diesem Zustand nicht mehr gespeichert; nur Zellwand und Kern leuchten rot, verhalten sich demnach gegenüber dem Farbstoff wie in toten Zellen. Da der Kernübertritt unmittelbar nach dem Abziehen zu sehen ist, muß er sich sehr rasch vollziehen, was gleichfalls auf mechanische Einwirkung und weniger auf eine aktive Reaktion des Kernes hinweist. Allerdings konnten Kernübertritte auch bei lichtmikroskopisch intakten Zellwänden beobachtet werden, wie dies auch die beigegebenen Photos belegen. Der Kernübertritt sollte daher noch weiter untersucht werden.

Histochemische Untersuchungen

Der nach Verwunden des Gewebes auftretende rote Farbstoff findet sich nicht gleichmäßig im Gewebe verteilt, sondern er tritt zunächst lokalisiert auf. Legt man einige Millimeter dicke Schnitte des Blütenschaftes und der Zwiebel von *H.* auf Filtrierpapier aus, so erscheint der rote Farbstoff nach einigen Tagen zuerst im Bereich der Gefäßbündel und in den Zellen unter der Epidermis.

Da es sich offenbar um eine Oxydation handelt, wurde zur ersten Orientierung der „Apfeltest", der zum qualitativen Nachweis von Oxydasewirkungen dient (URSCHLER 1959), angewandt. Legt man auf einen Brei von gekochten Äpfeln Schnitte von *Hippeastrum*-Blütenstengeln und -Zwiebelschuppen, so färben sich am zweiten Tag die Gefäßbündel braun. Läßt man die nun etwas bräunlichen Schnitte auf mit Wasser befeuchtetem Filtrierpapier liegen, so färben sie sich nach weiteren 2 Tagen rot. Daraus kann geschlossen werden, daß die Phenoloxydasen in den *Hippeastrum*-Schnitten vorerst die phenolartigen Substanzen aus dem Apfel oxydieren und dann erst die Farbstoffvorstufen angreifen.

Es war von Interesse, zu prüfen, ob diese Verteilung des Farbstoffes mit der Lokalisation von Enzymen übereinstimmt.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Saure Phosphatase

Wegen ihrer großen Bedeutung für den Energieumsatz wurde zunächst die Verteilung der sauren Phosphatase in der Zwiebel, der Wurzel, dem Blütenstiel und dem Blatt von *Hippeastrum* nach der Methode von GOMORI 1941 in der von FREY 1954 modifizierten Form untersucht. Die Reaktion beruht auf der Fähigkeit der Phosphatasen, Phosporsäureester hydrolytisch zu spalten. Durch das Enzym werden aus dem im Testsubstrat befindlichen Natrium-α-Glycero-Phosphat PO_4-Ionen freigesetzt, die als weißes Bleiphosphat ausgefällt und durch Ammonsulfid als schwarzes unlösliches Bleisulfid lokalisiert werden können. Im Kontrollsubstrat ohne Natrium-α-Glycerophosphat werden die freien Phosphatgruppen in den Zellen nachgewiesen. Es wurden frische und in Alkohol fixierte Schnitte benutzt.

Bereits nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten waren die Gefäßbündel und die Zellen der Subepidermis stark geschwärzt. Der braunschwarze Niederschlag ist innerhalb der Gefäßbündel im Phloem hauptsächlich in den Geleitzellen und im Xylem, in den Parenchymzellen und Tracheiden gleichmäßig verteilt. Die Siebröhren erscheinen in den Querschnitten leer. Die Epidermiszellen selbst lassen auch nach mehreren Stunden Inkubationszeit nur einen hellbraunen Cytoplasmaschlauch erkennen. Die Nebenzellen des Spaltöffnungsapparates sind in der Zwiebelschuppe oft stark geschwärzt (Abb. 3), doch kann bei manchen Stoma-Apparaten die Niederschlagsbildung nur auf die Schließzellen beschränkt sein. Auffallenderweise sind die Tüpfel in den Zellen der oberen Epidermis schon in der Kontrolle stark gefärbt. Vermutlich sind in ihnen freie Phosphationen vorhanden; es wäre auch möglich, daß das Substrat bevorzugt an den Tüpfelstellen eindringt und sich dort die Reaktionsprodukte anhäufen (vgl. SAUTER 1964).

Bei langer Inkubationszeit des Substrates färben sich die Zellkerne der Epidermis und Subepidermis dunkelbraun bis schwarz. Nicht selten tritt der Nukleolus durch seine noch dunklere Färbung hervor. Nach der Blütezeit jedoch bleiben Zellkerne und Nukleolen farblos. SAUTER 1964 nimmt an, daß die Kernmembran zu manchen Zeiten eine sehr hohe Phosphatase-Aktivität zeigt. Häufig sieht man in der Epidermis von *Hippeastrum* neben dem stark schwarz gefärbten Zellkern noch ein stark granuliertes Häufchen, das ebenfalls schwarz ist und daher wohl Phosphatase enthalten dürfte. Es handelt sich hiebei um die in Abbau begriffenen Elaioplasten (vgl. POLITIS 1911). Die obere Epidermis der Zwiebelschuppe zeigt in der Ruhezeit besonders viel Phosphatase.

Im jungen Laubblatt sind in der Epidermis nur die Schließzellen regelmäßig stark geschwärzt (Abb. 4). Ganz allgemein wurde in allen Organen die höchste Aktivität der Phosphatase in den Geleitzellen, in den Trachealelementen, im Parenchym des Xylems, in den Schließzellen, in

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

der Zwiebel auch in den Nebenzellen beobachtet. Eine etwas schwächere Aktivität wurde in den Zellschichten unter der Epidermis, im Palisaden- und Schwammparenchym gefunden. Sehr geringe Niederschlagsbildung zeigt das Rindengewebe des Blütenschaftes. In der Wurzel kommt saure Phosphatase im Protoxylem, im Phloem und in der Endodermis vor, weniger im Rindengewebe und in den Wurzelhaaren.

Der rote Farbstoff in der Zwiebel und im Blütenschaft tritt demnach in den Zellen mit der höchsten Phospataseaktivität bevorzugt auf. Möglicherweise spielt das Ferment bei der Biosynthese dieser Stoffe eine Rolle, indem es phosphorylierte Verbindungen in der Zelle nutzbar macht (Robinson 1936).

Es wurde auch versucht, die Aktivität der sauren Phosphatase an homogenisierten Zwiebelschuppen quantitativ zu bestimmen, und zwar nach der Methode von Huggins & Talalay 1945 in der von Kloft 1960a, b abgeänderten Form.

Sie beruht darauf, daß durch die Phosphatase Phenolphthaleinphosphat gespalten und der entstehende Farbstoff bei alkalischer Reaktion photometrisch bestimmt wird.

Für die obere Epidermis der Zwiebelschuppe ergab sich auf diese Weise eine Extinktion (bei 1 cm Schichtdicke) von E = 0,95, für die untere nur eine solche von E = 0,54. Die Extinktion des Extraktes aus der ganzen Schuppe entsprach mit E = 0,98 ungefähr dem Wert der oberen Epidermis. Die untere Epidermis zeichnet sich somit durch eine deutlich geringere Phosphataseaktivität aus.

Phenoloxydasen

„Der Terminus Phenoloxydase umfaßt zunächst alle die Enzyme, welche die Oxydation von Phenolen und ihren Derivaten, ob Mono-, Di- oder Polyphenole katalysieren" (Franke 1960: 402). Dazu gehören z. B. die Tyrosinase, Polyphenoloxydase, DOPA-Oxydase, Kartoffel-Oxydase, Brenzkatechinoxydase, Laccase u. a. m. Als Wirkgruppe ist in den Phenoloxydasen Kupfer vorhanden.

Quantitativ wurde die Phenoloxydase mit der kolorimetrischen Methode von Smith & Stotz 1949 nachgewiesen. Als Maß der Enzymaktivität dient dabei die Geschwindigkeit der Oxydation von reduziertem 2,3′,6-Trichloroindophenol (Na-Salz) durch die Phenoloxydasen. Die Zunahme der Extinktion pro Minute beträgt unter gleichen Versuchsbedingungen bei der Zwiebelschuppe 0,54, beim Blatt 0,67. Das Blatt enthält also mehr Phenoloxydase als die Zwiebelschuppe.

Die Lokalisation der Phenoloxydase wurde mit Dihydroxyphenylalanin (DOPA) nach der Vorschrift von Glick 1949 erbracht. Die in 5%igem Formol fixierten Schnitte wurden im dest. Wasser ausgewaschen und bei 37° C mit einer 0,1%igen DOPA-Lösung, die auf 7,4 gepuffert wurde (0,1 M Phosphatpuffer) 2—5 Stunden inkubiert.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

In der Zwiebelschuppe sind vor allem die Gefäßbündel und die Raphidenidioblasten stark geschwärzt, in der Epidermis die schwach grünen Plastiden und die Elaioplasten (Abb. 5, 6).

Die Schließzellen des Laubblattes sind auffallend geschwärzt, während die übrigen Epidermiszellen farblos erscheinen, nur deren Kerne sind oft auffallend schwarz (Abb. 7). Die Kerne im Schwammparenchym und auch die Chloroplasten bleiben unverändert. In der Nähe eines Wundrandes sind die Zellen intensiv geschwärzt, weil bekanntlich Verletzungen das Phenolasesystem besonders aktivieren.

Maercker 1965 untersuchte anthocyanhaltige Epidermen verschiedener Pflanzen auf Phenoloxydase. In allen Fällen konnte sie eine stark positive Reaktion mit DOPA nur in den anthocyanfreien Schließzellen feststellen. Sie wirft die Frage auf, ob die Phenoloxydaseaktivität in den Schließzellen mit ihrem Flavon(ol)gehalt und mit ihrer Anthocyanfreiheit zusammenhängt. Das Blatt von *Hippeastrum* zeigt auch nur in den Schließzellen die hohe Phenoloxydaseaktivität, obwohl die Epidermiszellen kein Anthocyan enthalten. Wohl aber besitzen Schließzellen als auch Epidermiszellen Flavonderivate. Fluorochromiert man nämlich die Epidermiszellen mit Acridinorange 1 : 10 000, so tritt nach kurzer Zeit eine Tröpfchenspeicherung in beiden Zelltypen auf. Die Vakuolen der Epidermiszellen, mit Ausnahme der der Schließzellen, zeigen eine auffallend hellblaue Primärfluoreszenz, die wohl durch den Alkaloidgehalt verursacht wird (vgl. S. 246).

Peroxydase

Peroxydasen sind Enzyme, die aus Peroxyden Sauerstoff abspalten und auf andere oxydable Stoffe übertragen.

Zum Nachweis der Peroxydase wurden die Schnitte in ein Gemisch von einer 1%igen alkoholischen Benzidinlösung und von 3%igem Wasserstoffperoxyd gelegt (Tunmann/Rosenthaler 1931). Blau bis schwarz färben sich die Gefäßbündel, blau die Epidermis, besonders an den Stellen, wo die Ausbildung des roten Farbstoffes bereits begonnen hat. Die Peroxydase ist in der Zellwand, im Cytoplasma, Kern und in den Sphärosomen lokalisiert. Quantitativ wurde die Peroxydase mit der kolorimetrischen Methode von Smith, Robinson & Stotz 1949 nachgewiesen. Der Vorgang ist der gleiche wie beim Nachweis der Phenoloxydase, statt Catechin dient Wasserstoffperoxyd als Substrat.

Die Zunahme der Extinktion pro Minute beträgt bei der Zwiebelschuppe 0,29, beim Blatt 0,59.

Besprechung der Ergebnisse

Alle Proben weisen übereinstimmend darauf hin, daß die Lokalisation der Enzyme mit der des ersten Auftretens des roten Farbstoffes über-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

einstimmt. Es sind dies allerdings Orte, die allgemein als solche von höherer Enzymaktivität bekannt sind; andererseits handelt es sich bei den geprüften Enzymen um solche mit sehr breiten Wirkungsspektren. Trotzdem ist es möglich, daß die Farbstoffproduktion mit der erhöhten Enzymaktivität zusammenhängt.

Die Entstehung des Vittatins ist von der Feuchtigkeit, dem Sauerstoff und auch vom pH der umgebenden Lösung und von der Art des Verletzens abhängig. Der Farbstoff bildet sich nur in Geweben, die nicht durch Hitze oder durch Narkotika, wie Chloroform oder Äther abgetötet wurden. Wohl aber entsteht er in Schnitten bei pH 2 verhältnismäßig rasch, über pH 9 wird kein Farbstoff mehr gebildet. Es konnte auch bestätigt werden, daß im Gewebebrei das Vittatin nicht entsteht (vgl. Palladin 1911).

Wie bereits einleitend bemerkt, ist die Konstitution des roten Farbstoffes derzeit noch unbekannt; er trennt sich im Chromatogramm z. T. in mehrere unbeständige Farbstoffkomponenten. Erste Untersuchungen (u. a. IR-Spektrum) zeigen, daß der Farbstoff jedenfalls eine phenolische Komponente besitzt, so daß Phenoloxydasen an seinem Aufbau beteiligt sein könnten. Hegnauer 1963 führt für Amaryllidaceen einen hohen Tyrosingehalt an. Nach Sizer 1953 sollen Phenoloxydasen auch Tyrosinreste in verschiedenen Proteinen anzugreifen vermögen. Durch das Einwirken der Fermente auf o-Diphenole können gefärbte hochpolymere Produkte entstehen.

Es wäre denkbar, daß zwischen der Bildung des roten Farbstoffes von *Hippeastrum* und dem Auftreten von Flavonen in den leeren Zellsäften der oberen Epidermis von *Allium Cepa* bei Luftzutritt (Hölzl & Bancher 1965) Zusammenhänge bestehen. Der rote Farbstoff wird auch nur bei Sauerstoffzutritt und in etwa der gleichen Zeit (2—3 Tage) wie die Flavone gebildet. Durch Verwundung könnte bei Sauerstoffzutritt die Gleichgewichtslage von Reaktionspartnern in der Zelle derart verändert werden, daß nunmehr (genügend Luftfeuchtigkeit vorausgesetzt), Farbstoffe entstehen, die normal nicht auftreten. Auch der Ausfall des „Apfeltests" könnte so gedeutet werden. Trifft dies zu, so müßte der rote Farbstoff der Flavonfamilie zuzurechnen sein. Einige bereits durchgeführte Proben könnten für ein Chalkon sprechen. Darüber soll aber in anderem Zusammenhang berichtet werden.

Zusammenfassung

1. Das auffallende Vorkommen eines roten Farbstoffes an verwundeten Zwiebeln von *Hippeastrum* war Anlaß zu einigen histochemischen und zellphysiologischen Untersuchungen.

2. Die untere Epidermis der Zwiebelschuppe besitzt volle Zellsäfte, deren Ursache Flavonderivate sind.

3. Negativ doppelbrechende Sphärite wurden in der oberflächlich

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

verletzten unteren Epidermis beobachtet, die als Inulin angesprochen werden. Ähnliche Sphärite entstehen im Benzidin-Reagens in der Zwiebel von *Hippeastrum, Leucojum, Galanthus* und *Narcissus*.

4. Die Chromosomenzahlen variierten in der unteren Epidermis der Zwiebelschuppe von 19—23; ähnliche Angaben machten bereits SHARMA & JASH 1958. In der abgezogenen Epidermis sind Kernübertritte von einer Zelle in die andere leicht zu beobachten.

5. Saponin konnte in der Zwiebel nicht nachgewiesen werden.

6. Folgende Enzyme wurden qualitativ und quantitativ getestet: Saure Phosphatase, Phenoloxydasen und Peroxydase.

Die untersuchten Fermente haben ihre größte Aktivität in den Gefäßbündeln und in den verletzten Zellen dort, wo auch der rote Farbstoff, das sogenannte Vittatin, zuerst gebildet wird.

7. Mögliche Zusammenhänge zwischen Enzymaktivität und Farbstoffbildung werden kurz diskutiert.

Schrifttum

BOLAY E. 1960. Die Vitalfärbung voller Zellsäfte und ihre cytochemische Interpretation. — S. B. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl. Abt. I, 169: 269—317.

FISCHER R. 1952. Praktikum der Pharmakognosie. — Wien.

FRANKE W. 1960. Phenoloxydasen und Ascorbinsäureoxydase. In: Handb. Pflanzenphysiol. 12/1: 301—455.

FREY G. 1954. Aktivität und Lokalisation von saurer Phosphatase in den vegetativen Teilen einiger Angiospermen und in einigen Samen. — Ber. schweiz. bot. Ges. 64: 390—452.

GÄUMANN E. 1951. Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. — Basel.

GLICK D. 1949. Techniques of histo- und cytochemistry. — New York.

GOMORI G. 1941. Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathologic conditions. — Arch. Path. 32: 189—199.

HÄRTEL O. 1951. Gerbstoffe als Ursache „voller" Zellsäfte. — Protoplasma 40: 338—347.

HEGNAUER R. 1963. Chemotaxonomie der Pflanzen. 2. — Basel und Stuttgart.

HÖFLER K. 1947. Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? — Mikroskopie 2: 13—29.

HÖLZL J. & BANCHER E. 1965. Zur anaeroben Lipophanerose und aeroben Flavonolsynthese der Zwiebel-Innenepidermis von *Allium cepa*. — Flora 156: 332—343.

HUGGINS Ch. & TALALAY P. 1945. Sodium Phenolphthalein phosphate as a substrate for Phosphatase tests. — J. biol. Chem. 159: 399—410.

KINZEL H. 1959. Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe. — Protoplasma 50: 1—50.

— & BOLAY E. 1962. Über die diagnostische Bedeutung der Entmischungs- und Fällungsformen bei Vitalfärbung von Pflanzenzellen. — Protoplasma 54: 179—201.

KLEIN G. 1922. Der histochemische Nachweis der Flavone. — S. B. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl. Abt. I, 131: 23—46.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

KLOFT W. 1960a. Wechselwirkungen zwischen pflanzensaugenden Insekten und den von ihnen besogenen Pflanzengeweben. Teil I. — Z. angew. Ent. 45: 337—381.

— 1960b. Wechselwirkungen zwischen pflanzensaugenden Insekten und den von ihnen besogenen Pflanzengeweben. Teil II. — Z. angew. Ent. 46: 42—70.

KOTTHOFF P. 1942. Der rote Brenner der *Amaryllis*. — Die kranke Pflanze 19: 106—107.

KÜSTER E. 1939. Über Plasmapfropfungen. — Jena.

LINSKENS H. F. 1959. Papierchromatographie in der Botanik. 2. Aufl. — Berlin—Göttingen—Heidelberg.

MAERCKER U. 1965. Beiträge zur Histochemie der Schließzellen. — Protoplasma 60: 173—191.

MIEHE H. 1901. Ueber die Wanderungen des pflanzlichen Zellkernes. — Flora 88: 105—142.

MOLISCH H. 1923. Mikrochemie der Pflanze. 3. Aufl. — Jena.

PALLADIN W. 1911. Die Bildung roten Pigments an Wundstellen bei *Amaryllis vittata*. — Ber. dtsch. bot. Ges. 29: 132—137.

PETRAK F. 1930. Über eine neue Amaryllisskrankheit. — Die Gartenbauwissenschaft 3: 74—78.

POLITIS I. 1911. Sugli elaioplasti nelle mono- e dicotiledoni. — Atti Ist. bot. Univ. Pavia 14: 1—27.

ROBINSON R. 1936. Formation of anthocyanins in plants. — Nature 137: 172—173.

SAUTER J. J. 1964. Histologische, cytologische und histochemische Untersuchungen an Holzstrahlen von *Populus*. — Diss. Freiburg i. Br.

SCHÜRHOFF P. 1906. Das Verhalten des Kernes im Wundgewebe. — Beih. bot. Cbl. 19: 359—382.

SHARMA A. K. & JASH M. 1958. Further investigation on the cytology of the *Amaryllidaceae*. — Phyton (Argent.) 11: 103—110.

SIZER J. W. 1953. Oxydation of proteins by tyrosinase and peroxidase. — Advanc. Enzymol. 14: 129—161 (zit. n. FRANKE W. 1960).

SMITH F. G., ROBINSON W. B. & STOTZ E. 1949. A colorimetric method for the determination of peroxidase in plant material. — J. biol. Chem. 179: 881—889.

— & STOTZ E. 1949. A colorimetric method for the determination of phenol oxidase in plant material. — J. biol. Chem. 179: 865—889.

TRAUB H. P. 1963. The genera of *Amaryllidaceae*. 1. ed. — Lajolla.

TUNMANN/ROSENTHALER 1931. Pflanzenmikrochemie. 2. Aufl. — Berlin.

URSCHLER I. 1959. Der „Apfeltest" zum qualitativen Nachweis von Oxydasewirkungen. — Phyton 8: 69—73.

WEHMER C. 1929. Die Pflanzenstoffe. 2. Aufl. 1. Band. — Jena.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1966

Band/Volume: 11_3_4

Autor(en)/Author(s): Thaler Irmtraud

Artikel/Article: Zellphysiologische Untersuchungen an der Zwiebelschuppe von Hippeastrum. 245-255