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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 72 (1962)

Artikel: Über die quantitative Messung der Phosphataseaktivität in Nektarien

Autor: Cotti, Tonio

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-50861

Nutzungsbedingungen

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

Conditions d'utilisation

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

Terms of use

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

Download PDF: 11.07.2025

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

Über die quantitative Messung der Phosphataseaktivität in Nektarien

Von *Tonio Cotti*

Eingegangen am 10. November 1962

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung 307
1. Bedeutung der Phosphatasen im Zuckerstoffwechsel 307
2. Möglichkeiten des Phosphatasenachweises 308
3. Problemstellung 309

B. Material und Methoden 309
1. Versuchspflanzen 309
2. Bestimmung der Phosphataseaktivität 310
   a) Homogenat 310
   b) Infiltrationsversuche 310
   c) Histochemische Methode 311
3. Bezugsgrößen 311
4. Papierchromatographische Bestimmung der Nektarzucker 312

C. Resultate 312
1. Vorversuche 312
   a) pH-Abhängigkeit der Phosphatasen 312
   b) Versuche mit verschiedenen Substraten 313
   c) Eindringungsvermögen von Glyzerophosphat 314
2. Phosphataseaktivität in Nektarien 315
   a) Morphologie der verwendeten Nektarien 315
   b) Histochemischer Phosphatasenachweis 316
   c) Phosphataseaktivität im Homogenat 319
   d) Phosphataseaktivität im intakten Gewebe 322
3. Phosphataseaktivität im Nektar 323
   a) Nachweis der Aktivität 323
   b) Zusammensetzung der Nektarzucker 324

D. Diskussion 325
1. Überblick über die Resultate 325
2. Hypothese 326
3. Ursachen der Divergenzen 326

E. Zusammenfassung 329

Literatur 330

A. Einleitung

1. Bedeutung der Phosphatasen im Zuckerstoffwechsel

Der Zuckerstoffwechsel nimmt im allgemeinen Zellgeschehen eine hervorragende Stellung ein. An ihn gliedern sich die Assimilations- und Dissimilationsvorgänge sowie die Polysaccharidsynthesen. Obwohl in allen lebenden Zellen zu finden, tritt er in bestimmten Geweben stärker in den Vordergrund. So haben im Verlaufe der phylogenetischen Entwicklung in der Pflanze insbesondere zwei Gewebe hinsichtlich der Zuckerverschiebung und des Zuckerumbaus eine besondere Bedeutung erlangt: das Phloem und das Nektargewebe.

Phloem. Die im Blatt gebildeten Assimilate wandern als Zuckerphosphate intrazellulär ins Phloem. Der Zuckereintritt in die Siebröhren ist von charakteristischen metabolischen Prozessen begleitet. So werden die ankommenden Zuckerphosphate dephosphoryliert. Parallellaufend findet aus den Monosen, wahrscheinlich über Uridindiphosphat (Ziegler, 1960), eine Saccharosesynthese statt, wobei das zunächst gebildete Saccharosephosphat wiederum durch Phosphatasen gespalten wird. Im frisch gewonnenen Siebröhrensaft können daher nur freie Saccharose (Wanner, 1953a), in einzelnen Fällen daneben noch Oligosaccharide (Zimmermann, 1954), jedoch nie freie Monosen gefunden werden. Beim Zuckeraustritt aus den Siebröhren wird die Saccharose rephosphoryliert und wandert als energiereiche Phosphatverbindung ihrem Verbrauchsort zu. Diese Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse sowie die Saccharosesynthese werden nach Ziegler (1956) enzymatisch gesteuert und finden vorwiegend in den Geleitzellen statt. Die Geleitzellen fallen durch ihr dichtes Plasma und ihre großen Kerne auf und sind, da sie direkt den kernlosen Siebröhren anliegen, auch durch ihre Lage für die enzymatischen Zuckerumwandlungen prädestiniert. Unterstützt wird diese Tatsache durch die hohe Phosphataseaktivität (Wanner, 1952; Frey, 1954) und die erhöhte Atmung (Kursanov und Turkina, 1952a, 1952b) in den Leitbündeln, vorab in den Geleitzellen. Demgegenüber nehmen die Siebröhren eine Sonderstellung ein: ihr stark reduzierter Plasmabelag ist sehr wenig phosphataseaktiv und weist überdies ein lückenhaftes glykolytisches Enzymsystem auf (Wanner, 1953b).

Nektargewebe. Wie die Leitbündel, so sind auch die Nektarien mit einer hochaktiven Phosphatase ausgestattet (Ziegler, 1955; Frey-Wyssling und Häusermann, 1960). Die zugeleiteten Zuckerphosphate werden im Nektargewebe dephosphoryliert, so daß nur die freien Zucker zur Ausscheidung gelangen, während das abgespaltene Phosphat weitgehend zurückbehalten wird (Ziegler, 1956). Im Gegensatz zu den Siebröhren, in welchen sich vorwiegend Saccharose als Wanderform durch-

gesetzt hat, treten im Nektar daneben auch Glukose und Fruktose auf. Diese Saccharosespaltung geschieht durch Invertasewirkung, wobei als Zwischenstufen des Saccharoseabbaues zuweilen Oligosaccharide auftreten (Zimmermann, 1954), so daß auch diese im ausgeschiedenen Nektar nachgewiesen werden können. In nur ganz wenigen Fällen ist Saccharose der einzige Nektarzucker, zum Beispiel bei *Centaurea montana*, *Rhododendron ferrugineum* und bei gewissen *Paeonia*-Arten. Die physiologische Leistung des Nektargewebes findet bei den gestalteten Nektarien ihren Ausdruck in der morphologischen Differenzierung: die Zellen des Nektargewebes sind klein, plasmareich und großkernig. Wie Ziegler (1955) an *Abutilon* zeigen konnte, ist die Atmung dieses Drüsengewebes gegenüber der Umgebung erhöht.

Beide «Brennpunkte» des Zuckerstoffwechsels, der Eintritt der Assimilate in die Leitbahnen und der Austritt des durch das Nektargewebe geschleusten Phloemsaftes als Nektar, sind durch gemeinsame Merkmale gekennzeichnet: in morphologischer Hinsicht durch die Ausbildung plasmareicher, großkerniger Zellen, in physiologischer Hinsicht durch eine erhöhte Atmung sowie eine hohe Phosphataseaktivität, die zweifellos mit den Dephosphorylierungsvorgängen in Zusammenhang gebracht werden muß.

Bei den hier zur Diskussion stehenden Enzymen handelt es sich um «saure» Phosphatasen, deren Aktivitätsoptimum bei pH 5,5 liegt (siehe S. 313).

2. Möglichkeiten des Phosphatasenachweises

Der histochemische Phosphatasenachweis hat weite Verbreitung gefunden. Diese Methode erwies sich in vielen Fällen zur Umgrenzung physiologisch wichtiger Gewebe als ein überaus wertvolles Hilfsmittel. Durch seinen qualitativen Charakter ist dieses Nachweisverfahren jedoch etwas beschränkt und daher einseitig; es fehlen ihm Vergleichsmöglichkeiten. Es ist daher notwendig, die Resultate des histochemischen Nachweises mit den Resultaten anderer Methoden vergleichen zu können. Für die quantitative Messung der Phosphataseaktivität stehen prinzipiell verschiedene Wege offen:

Mit Hilfe der Interferenzmikroskopie könnte beispielsweise die Zunahme des Bleiphosphatniederschlages in der Zelle in Funktion der Zeit gemessen werden. Die Schwierigkeit dieser Methode liegt darin, für die Messung einzelne Zellen oder Gewebe von genau definiertem Ausmaß zu erhalten.

Die in dieser Arbeit benützte quantitative Methode besteht in der Messung der Phosphataseaktivität in Zellhomogenaten. Durch Vergleich

der Aktivität verschiedener Homogenate erhält man Aufschluß über die Enzymausstattung der entsprechenden Gewebe.

Um mit diesem Verfahren lebende Zellen zu untersuchen, können die zu vergleichenden Gewebe zunächst durch Infiltration inkubiert und erst anschließend homogenisiert werden. Hierauf wird die Phosphatabspaltung im Homogenat gemessen.

Endlich ist denkbar, die Phosphatase aus pflanzlichen Homogenaten rein darzustellen (eventuell durch Elektrophorese) und in den erhaltenen Enzympräparaten die Aktivität zu messen.

3. Problemstellung

Histochemische Reaktionen auf Schnitten durch Nektarien zeigen im Nektargewebe eine hohe Phosphataseaktivität, während angrenzende Gewebe negativ reagieren. Diese Enzymaktivität im Nektargewebe ist schon in frühen Entwicklungsstadien zu beobachten und hält bis zum Welken an. Es handelt sich somit nicht nur um ein vorübergehendes Auftreten der Phosphatase etwa im Zusammenhang mit der Nektarsekretion, sondern um eine bleibende, fest vererbte Eigenschaft des Nektargewebes. Der Gedanke, Phosphataseaktivität und Zuckerausscheidung in ein Abhängigkeitsverhältnis zu bringen, ist zwar naheliegend. Er widerspricht aber der Tatsache, daß das Enzym während der ganzen Organentwicklung hindurch bis zum Welken erhalten bleibt, während die eigentliche Sekretion nur kurzfristig ist und bisweilen sehr launisch erfolgt.

Es muß die Frage gestellt werden, ob die festgestellten Unterschiede zwischen Nektar- und Grundgewebe eventuell methodisch bedingt sind. Es soll daher versucht werden, diese Aktivitätsunterschiede auch durch andere Methoden zu erfassen. Von den angegebenen Möglichkeiten zur quantitativen Bestimmung der Phosphataseaktivität in Nektargeweben wurde in der vorliegenden Arbeit die Homogenatstechnik und die Infiltrationsmethode zur Lösung des gestellten Problems herangezogen.

Die Arbeit wurde im Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie der ETH auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Frey-Wyssling durchgeführt.

B. Material und Methoden

1. Versuchspflanzen

Sämtliche Versuchspflanzen für Nektaruntersuchungen stammten aus dem Gewächshaus des Institutes für Allgemeine Botanik der ETH mit Ausnahme von *Centaurea montana*, die in den Glarner Bergen gesammelt

wurde. Für die Nektarienuntersuchungen von *Euphorbia pulcherrima* Willd. wurden nebst den institutseigenen noch besonders starke Exemplare von der Gärtnerei Haller, Brugg, verwendet.

2. Bestimmung der Phosphataseaktivität

a) Homogenat

Prinzip. Als Maß für die Aktivität der Phosphatase in einem Gewebehomogenat dient die Menge des in der Zeiteinheit aus Na-α-glycerophosphat freigesetzten Phosphats.

Zubereitung des Homogenates. Die Gewebestücke wurden zunächst mit H_2O dest. gründlich gewaschen, dann in einer kleinen Porzellanschale mit gereinigtem Quarzsand zerrieben, in wenig H_2O dest. aufgenommen und in einer Laborzentrifuge zweimal 10 min bei 4000 g zentrifugiert. Das Überstehende wurde mit Azetatpuffer von pH 5,5 auf 20 ml ergänzt; die Endkonzentration des Puffers betrug 0,08 *m*. Oft war eine weitere Klärung des Extraktes unumgänglich; dazu verhalf eine Filtration durch hochgereinigtes Zellulosepulver. Aktivkohle war zur Entfernung der kolloidal gelösten Blattpigmente ungeeignet, da sie beträchtliche Mengen Phosphat enthielt.

Inkubation des Homogenates. Die Inkubation erfolgte durchwegs bei 38 °C im Wärmeschrank. Die Inkubationszeit variierte je nach Homogenat zwischen 1 und 2 h. Das als Substrat verwendete käufliche Na-α-glycerophosphat enthielt geringe Mengen freies Phosphat, welches ein für allemal bestimmt werden mußte. Im Testversuch wurden 4 ml gepufferte Homogenatlösung mit 0,5 ml 3,2 % Substratlösung versetzt. Im Kontrollversuch war das Substrat durch eine gleiche Menge H_2O dest. ersetzt. Die Phosphataseaktivität ergab sich dann als Phosphatdifferenz dieser beiden Ansätze, wobei noch der freie Phosphatgehalt des Substrates in Abzug kam. Das Abstoppen der Versuche erfolgte durch kurzfristiges Erhitzen (2–3 min) im Wasserbad (98 °C) oder zu Vergleichszwecken durch Zugabe einer 10^{-3} *m* NaF-Lösung. Anschließend wurden die Proben filtriert.

Ermittlung des Phosphates. Die Phosphatbestimmung wurde nach der Methode von Berenblum und Chain (1938), die Ausmessung des Molybdänblaus im Pulfrich-Photometer bei 729 mμ vorgenommen und mit einer Eichkurve verglichen.

b) Infiltrationsversuche

Prinzip. Frische Gewebestücke werden zunächst auf dem Wege der Infiltration mit Glyzerophosphat inkubiert, dann abgetötet und homo-

genisiert. Hierauf wird im Homogenat das durch Enzymeinwirkung freigesetzte Phosphat quantitativ gemessen.

Präparation der Gewebe. Die gewünschten Gewebepartien wurden mit einer Rasierklinge aus den Nektarien und aus den Vergleichsgeweben herausgeschnitten und mit H_2O dest. zwecks Entfernung des Zellinhaltes aus angeschnittenen Zellen mehrmals gewaschen.

Inkubation der Gewebe. Die Inkubation der gewaschenen Gewebestücke dauerte 1½ h bei 38 °C. Die Ansätze in bedeckten Glasschälchen enthielten im einzelnen: Gewebestücke in 7,5 ml H_2O dest. + 2 ml 0,4 *m* Azetatpuffer von pH 5,5 + 0,5 ml 3,2% Glyzerophosphatlösung. Im Kontrollversuch war das Substrat durch 0,5 ml H_2O dest. ersetzt. Unter Umgehung dieser Kontrolle konnte die stündlich abgespaltene Phosphatmenge auch aus der Differenz von zwei verschieden lang (½ h und 1½ h) inkubierten Ansätzen berechnet werden. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden die Versuche durch kurzes Aufkochen über der Bunsenflamme abgestoppt (Hitzedenaturierung der Phosphatasen).

Homogenisation der inkubierten Gewebe. Die Homogenisation der abgetöteten Gewebe erfolgte wiederum in der Reibschale mit gereinigtem Quarzsand. Die Homogenate wurden zentrifugiert (zweimal 10 min bei 4000 g) und das Obenstehende für die nachfolgende Stickstoff-, Trockengewichts- und Phosphatbestimmung auf 20 ml aufgefüllt.

Die beiden beschriebenen Methoden erlauben, jede auf ihre Art, eine quantitative Aussage über die Phosphataseaktivität. Ihnen steht als wertvolle Ergänzung eine dritte qualitative Methode gegenüber: der histochemische Phosphatasenachweis.

c) Histochemische Methode

Prinzip. Frische Gewebestücke werden mit Glyzerophosphat in Gegenwart von Blei-Ionen inkubiert. Das Substrat dringt in die intakten Zellen ein. Wo Phosphatase ist, wird Phosphat abgespalten, wobei das freigesetzte Phosphat mittels der ebenfalls eingedrungenen Blei-Ionen an Ort und Stelle gefällt wird. Zugegebenes Ammonsulfid setzt das weiße Bleiphosphat in braunschwarzes Bleisulfid um. Aktive Gewebe erscheinen daher im mikroskopischen Bild je nach Maß ihrer Aktivität mehr oder weniger geschwärzt.

Ausführung. Im einzelnen wurde bei der Ausführung des histochemischen Testes nach den Angaben von Glick (1949) und Frey (1954) vorgegangen.

3. Bezugsgrößen

Es zeigte sich in vergleichenden Versuchen immer wieder die Schwierigkeit, die gemessene Phosphatabspaltung auf eine vernünftige Basis zu

beziehen. Am natürlichsten schien es, nach Größen zu suchen, die aus dem Homogenat ermittelt werden konnten. So fiel die Wahl in erster Linie auf den Stickstoffgehalt und auf das Trockengewicht des Homogenates. Abweichend von der Praxis, wurde das Trockengewicht auf der Basis des Homogenates berechnet, weil auf diese Weise der höhere Proteingehalt des Nektargewebes gegenüber Vergleichsgeweben gut hervortrat. Als weitere Bezugsgrößen kamen das Frischgewicht und das Gewebevolumen in Betracht.

Stickstoffbestimmung. Die Messung des N-Gehaltes im Homogenat geschah durch ein Mikro-Kjeldahl-Verfahren nach Parnas (1938) und Fresenius (1938).

Trockengewichtsbestimmung. Ein Teil des Homogenates wurde bis zur Gewichtskonstanz im Wärmeschrank erhitzt (6–8 h/110 °C). Die Wägungen erfolgten auf einer Mettler-Waage, wobei das in die Wägung eingegangene Azetat des Puffers vom Gewicht in Abzug gebracht werden mußte.

Frischgewichtsbestimmung. Die feuchtgehaltenen Gewebestücke wurden auf Filterpapier gewälzt, bis sie keine Feuchtigkeit mehr abgaben, und anschließend gewogen.

4. Papierchromatographische Bestimmung der Nektarzucker

Die papierchromatographischen Untersuchungen der Nektarzucker erfolgten auf Whatman-I-Papier im absteigenden Verfahren, mit *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) als Laufmittel. Es war von Vorteil, das Gemisch vor Gebrauch längere Zeit stehenzulassen (partielle Veresterung des Butanols mit der Essigsäure). Zum Entwickeln der Chromatogramme wurde Anilin-Oxalsäure (Partridge und Westhall, 1948; vgl. auch Cramer, 1952) verwendet als Universalreagens auf Aldo- und Ketohexosen, Oligosaccharide und Pentosen.

C. Resultate

1. Vorversuche

a) pH-Abhängigkeit der Phosphatasen

Jedem Enzym kann ein pH-Wert oder pH-Bereich zugeordnet werden, bei welchem es optimal wirksam ist. Die in der Literatur sich findenden Angaben über pH-Optima der sauren pflanzlichen Phosphatase schwanken zwischen pH 4,9 und 5,6. Der an Kelchblatthomogenaten von

Abutilon ermittelte Wert beträgt pH 5,5. Bei pH 4,7 und 6,3 ist die Enzymaktivität je auf die Hälfte des Maximalwertes abgesunken. Der Kurvenverlauf ist aus Abbildung 1 ersichtlich. Als Folge davon sind alle Aktivitätsmessungen in Homogenaten bei pH 5,5 ausgeführt worden.

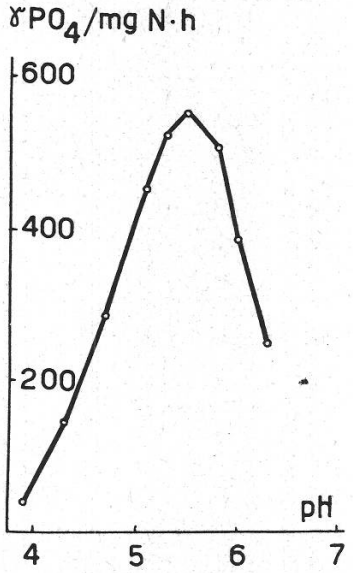

Abbildung 1

pH-Abhängigkeit der sauren Phosphatase(n) im Homogenat des Kelchblattgewebes von *Abutilon striatum*.

b) Versuche mit verschiedenen Substraten

In den Kelchblattgeweben von *Abutilon* liegen vermutlich verschiedene Phosphatasen (mit ähnlichen Eigenschaften) vor. Es ist deshalb von Interesse, Aufschluß über die Spezifität dieser Phosphatasen zu erhalten. Wahrscheinlich ist diesen Enzymen im lebenden Gewebe ein viel engerer Spezifitätsbereich eigen als im desintegrierten Zustand des Homogenates. Dennoch stellt sich die Frage, in welchem Maß die Phosphatasen im Homogenat verschiedene Substrate zu unterscheiden vermögen.

Im Versuch wurden Kelchblätter von *Abutilon* zirka 1 mm über dem Nektarium entzweigeschnitten und die Homogenate des proximalen und des distalen Kelchblatteils mit vier verschiedenen Substraten inkubiert. Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Darin bedeuten: F-1,6-P Fruktose-1,6-diphosphat, Ca-Salz; Glyc-P Na-α-glycerophosphat; ATP Adenosintriphosphat, Na-Salz; G-1-P Glukose-1-phosphat, K-Salz. Die Substratkonzentration im Homogenat betrug 0,2 %. Der Test enthielt das gesamte nach der Inkubation im Homogenat gemessene Phosphat, die Kontrolle die Summe des freien Phosphates im Substrat und im Homogenat.

Tabelle 1

Einwirkung der sauren Phosphatase im Homogenat des proximalen (prox.) und des distalen (dist.) Kelchblatteils von *Abutilon striatum* auf verschiedene Substrate. Erklärung im Text.

Substrat	Gewebe	γPO_4/mg N je h			prox./dist.	γPO_4/100 mg FG je h			prox./dist.
		Test	Kon-trolle	Diffe-renz		Test	Kon-trolle	Diffe-renz	
F-1,6-P	prox.	330	65	265	0,64	140	26	114	1,03
	dist.	465	50	415		124	14	110	
Glyc-P	prox.	575	110	465	0,74	246	46	200	1,20
	dist.	705	75	630		186	20	166	
ATP	prox.	785	270	515	0,68	282	50	232	1,22
	dist.	980	220	760		215	25	190	
G-1-P	prox.	105	20	85	0,65	42	8	34	1,03
	dist.	145	15	130		37	4	33	

Ergebnis. In der globalen Gegenüberstellung der beiden Kelchblatthälften ergibt sich für den distalen Teil, bezogen auf den Stickstoffgehalt (N), eine größere, bezogen auf das Frischgewicht (FG), etwa gleiche Aktivität. Von den angebotenen Substraten wird Glukose-1-phosphat eindeutig am schlechtesten umgesetzt.

Die Homogenisation eines Gewebes ist meist mit einer Änderung der spezifischen Eigenschaften der Enzyme verbunden. So hat die Desintegration des Homogenates zur Folge, daß darin die Spaltung einer Phosphatverbindung kaum als Einzelleistung einer hiefür spezifischen Phosphatase aufzufassen ist, wie dies im lebenden Gewebe der Fall sein könnte. Vielmehr scheint die Substratspaltung im Homogenat unspezifisch durch das Zusammenwirken verschiedener Einzelenzyme zustande zu kommen. Dabei kann der Beitrag der einzelnen Enzyme durchaus verschieden sein. Wenn in der Folge die Spaltung von Glyzerophosphat gemeinhin als Phosphataseaktivität bezeichnet wird, so ist dieser Ausdruck immer in dem hier wiedergegebenen Sinn zu verstehen.

c) Eindringungsvermögen von Glyzerophosphat

Als Vorversuche für den histochemischen Test und seine Abwandlungen ist es unumgänglich, das Eindringungsvermögen von Glyzerophosphat in pflanzliche Gewebe zu studieren. Da von den im Inku-

bationsgemisch angebotenen Substanzen das Glyzerophosphat nachweisbar am langsamsten in lebende Zellen eindringt, kann für ein einheitlich reagierendes Gewebe die mit zunehmender Zeit fortschreitende Schwärzung als Maß für die Permeationsgeschwindigkeit gewertet werden.

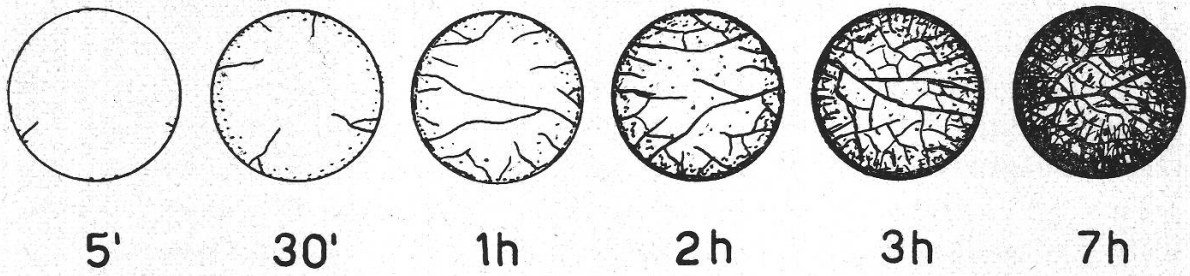

Abbildung 2

Eindringungsvermögen von Glyzerophosphat in Blattgewebe von *Abutilon* bei verschiedenen Inkubationszeiten (5 min bis 7 h). Erklärung im Text.

Im Versuch wurden aus jungen *Abutilon*-Blättern Scheiben mit einem Kreisdurchmesser von 1 cm herausgeschnitten, in H_2O dest. mehrmals gewaschen und anschließend inkubiert. Durch die Wahl verschiedener Inkubationszeiten ergab sich eine Schwärzungsfolge, die in Abbildung 2 angedeutet ist. Neben der zentripetalen Ringschwärzung traten vor allem die Leitwege als schwarze Linien hervor. Das Substrat konnte nur vom Rand her eindringen, da die flächenbegrenzenden Epidermen wasserabstoßend sind.

Versuche mit Blattstreifen von 2 cm Länge und 1 mm Breite ergaben analoge Resultate. Das Ersetzen der Interzellularenluft durch Wasser im Vakuum brachte keine wesentliche Beschleunigung der Permeation.

Bei dünnen Handschnitten durch die Nektarien von *Abutilon* und *Euphorbia* genügte für die Schwärzung erwartungsgemäß eine Inkubationszeit von 10 min, da hier das Substrat in erster Linie von den Schnittflächen her eindringen kann.

2. Phosphataseaktivität in Nektarien

a) Morphologie der verwendeten Nektarien

Eine ausführliche Beschreibung der Nektarien von *Abutilon striatum* und *Euphorbia pulcherrima* findet sich bei Agthe (1951). Hier sei deshalb nur kurz auf die wichtigsten morphologischen Merkmale hingewiesen.

Nektarien von *Abutilon striatum*. Die Kelchblätter besitzen auf ihrer Innenseite ein Trichomfeld von samtartigem Aussehen, welches mit vielen

Drüsenhaaren besetzt ist. Diese Drüsenhaare scheiden sehr reichlich Nektar aus und bilden somit ein eigentliches Ausscheidungsgewebe. Sie sind mehrzellig, typisch «drüsig» und enden mit einer Kugelzelle, die auch im submikroskopischen Bau von den übrigen Trichomzellen abweicht (Eggmann, 1962; unveröffentlichte Diplomarbeit, ETH). Unter diesem Ausscheidungsgewebe epidermaler Herkunft liegen wenige Schichten aus kleineren, plasmareichen und großkernigen Zellen, welche in ihrer Gesamtheit als Nektargewebe bezeichnet werden. In dieses Nektargewebe münden feinste xylemfreie Leitbündelaufzweigungen. Diese haben sich vom Hauptnerv abgespalten, der im tieferen Teil des Kelchblattes gegen dessen Spitze hinzieht. Im mittleren Teil (wie auch in anderen vegetativen Teilen der Pflanze) sind viele lysigene Schleimbehälter oder einzelne mit Schleim gefüllte Zellen ausgebildet, was für die Reihe der Kolumniferen charakteristisch ist.

Nektarien von *Euphorbia pulcherrima*. Hier findet sich die gleiche Unterscheidung in Ausscheidungs- und Nektargewebe wie bei *Abutilon*, wenn auch in abweichender morphologischer Ausgestaltung. Das von unten ins Nektarium führende Leitbündel spaltet sich kurz vor der von oben tief eingesenkten Nektartasche auf, wobei die beiden Äste beidseits der Tasche emporziehen, diese umgreifend. Die Tasche selber wird von einer Palisadenepidermis ausgekleidet, die als Ausscheidungsgewebe funktioniert. Das Gebiet zwischen der Leitbündelaufzweigung und der epidermalen Palisadenschicht bildet das eigentliche Nektargewebe, das vor allem in der Nähe des Taschengrundes stark «drüsig» ausgebildet ist.

b) Histochemischer Phosphatasenachweis

Auf dem Gebiet der Nektarien hat der histochemische Nachweis der sauren Phosphatase eine sinnvolle Anwendung gefunden. Vor allem hat er sich dort bewährt, wo keine erkennbare morphologische Differenzierung der Nektarzellen gegenüber den Zellen des Grundgewebes stattgefunden hat (Frey-Wyssling und Häusermann, 1960). Somit ist eine Möglichkeit gegeben, das Nektargewebe von ungestalteten Nektarien physiologisch zu charakterisieren. Der Test berechtigt auch zur Aussage, ob und wo unter den speziellen Reaktionsbedingungen aktive Phosphatase vorhanden ist, nicht aber schlechthin zur Alternative: phosphatasehaltig oder phosphatasefrei.

Der hier abgebildete Phosphatasenachweis bei *Abutilon* (Abbildung 3) zeigt wesentliche Unterschiede gegenüber der Abbildung bei Ziegler (1956). Viele Untersuchungen an verschiedenen Entwicklungsstadien zeitigten in den wenigsten Fällen eine größere Phosphataseaktivität in den ausscheidenden Trichomen. Trotz der physiologisch wichtigen Funk-

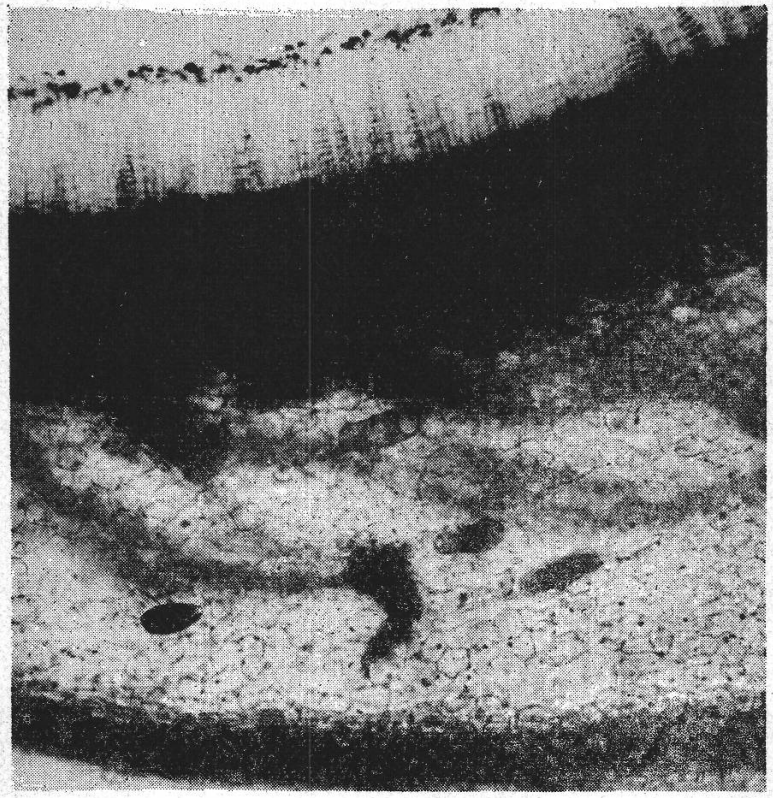

Abbildung 3

Histochemischer Nachweis der sauren Phosphatase im Kelchblattgewebe von *Abutilon striatum*. Aktive Gewebe geschwärzt. Vergr. 70mal.

tion als sezernierendes Gewebe tritt hier die histochemisch erfaßbare Aktivität gegenüber dem tiefschwarz gefärbten Nektargewebe merklich zurück. Einzig die terminalen Kugelzellen weisen auf hohe Aktivität hin. Diese aktiven Endzellen treten allerdings sehr unregelmäßig auf. Vermutlich kommt ihre Aktivität nur in einem zeitlich sehr eng begrenzten Entwicklungsabschnitt, etwa im Zusammenhang mit einer bestimmten Sekretionsphase, zum Ausdruck. Die im Bild hervortretenden dunkeln Zellen des Mesophylls sind Schleimzellen. Die Schwärzung der unteren Epidermis ist nur zum kleineren Teil auf Phosphataseaktivität zurückzuführen; denn auch bei Kontrollschnitten (Inkubation ohne Glyzerophosphat) tritt starke Bräunung auf. Dies deckt sich mit dem Befund von Frey (1954), der in den Blattepidermen von *Zea Mays* nur geringe oder keine Enzymaktivität, dafür viel Kontrollphosphat fand.

Bei *Euphorbia pulcherrima* (Abbildung 4) umschließt die Aufgabelung des zuführenden Leitbündels das Nektargewebe. Wie auf Querschnitten durch das Nektarium ersichtlich ist, erstreckt sich die histochemisch erfaßbare Phosphataseaktivität auf beiden Seiten der Tasche bis ins obere Nektariumdrittel hinein. Auch hier tritt die Aktivität in der ausscheidenden Palisadenepidermis offensichtlich zurück.

Abbildung 4

Histochemischer Nachweis der sauren Phosphatase im Längsschnitt durch das Nektarium von *Euphorbia pulcherrima*. Aktive Gewebe geschwärzt. Vergr. 70mal.

Überblickt man Form und Funktion der gestalteten Nektarien von *Abutilon* und *Euphorbia*, so drängt sich zu ihrer klareren Erfassung eine morphologisch wie physiologisch gegebene Trennung in ein Nektargewebe und ein Sekretionsgewebe auf (Frey-Wyssling und Häusermann, 1960). Einerseits lassen die Nektarien zwischen dem Ort, zu welchem der Phloemsaft zunächst hingeleitet und umgewandelt wird, und dem Ort, an welchem der veränderte Phloemsaft als Nektar ausgeschieden wird, eine scharfe morphologische Differenzierung erkennen. Anderseits wird dieser Unterschied physiologisch sinnvoll bestätigt durch die in diesen beiden Geweben verschieden stark zum Ausdruck kommende Phosphataseaktivität. Die anfallenden Zuckerphosphate würden somit im eigentlichen Nektargewebe dephosphoryliert (Matile, 1956, fand in den Nektarien von *Euphorbia* Saccharosephosphat, Glukose-6-phosphat und ein Fruktosephosphat). An dieses stark phosphataseaktive Drüsenparenchym grenzt ein phosphataseärmeres Sekretionsgewebe im engern Sinn, dem mehr die aktive (oder passive ?) Ausscheidung des Nektars obliegt.

Bei ungestalteten Nektarien kann eine Trennung in diese beiden Gewebearten nicht vorgenommen werden, weil hier ein eigentliches

Sekretionsgewebe fehlt, da der Nektar zumeist durch Spaltöffnungen nach außen tritt (Zimmermann, 1932).

Es soll an dieser Stelle noch eine methodische Bemerkung zum Phosphatasenachweis gemacht werden. Die schon von Frey (1954) geforderte Alkoholvorbehandlung der Schnitte zur Abklärung des Eindringungsvermögens von Glyzerophosphat erwies sich auch für die Nektarienuntersuchungen als sinnvoll. Durch den Alkoholeinfluß wird das Gewebe ohne Aktivitätseinbuße narkotisiert. Dadurch wird die Semipermeabilität der Zellen aufgehoben, so daß ein rasches Eindringen des Substrates gewährleistet ist. Allerdings darf die Reaktion nicht mehr als eine vitale Leistung des Gewebes aufgefaßt werden, zumal Alkohol durch Wasserentzug eiweißfällend wirkt. Nach Frey (1954) hat die Alkoholvorbehandlung den Sinn, die Frage abzuklären, inwiefern Schwärzungsunterschiede auf Permeationsunterschiede von Glyzerophosphat zurückgeführt werden müssen. Als weiterer wesentlicher Punkt muß hinzugefügt werden, inwiefern ganz allgemein Chemikalien, wie zum Beispiel Alkohol, den histochemischen Phosphatasenachweis zu modifizieren vermögen.

Im Versuch ergaben die in Alkohol eingelegten Schnitte gegenüber nicht vorbehandelten durchwegs abweichende Reaktionsbilder sowohl des Testes als auch der Kontrolle. Statt der einstündigen Fixation in Alkohol 50 % wurde ein zehnminutiges Eintauchen der Schnitte in Alkohol 70 % als zweckmäßiger erachtet. Ganz allgemein zeigten die narkotisierten Schnitte eine Intensivierung sowohl der Test- als auch der Kontrollreaktion. Oftmals war die Intensivierung in den Kontrollschnitten so stark, daß die Schwärzungstiefe der Testreaktion erreicht wurde. In Kontrollschnitten durch *Euphorbia*-Nektarien traten im Nektargewebe rund um die Sekretionstasche herum reproduzierbar körnige Bleisulfidniederschläge auf. Vielleicht ist es möglich, diese schwarzen Körner auf eine Anlagerung von Bleisulfid an die durch Alkoholeinwirkung körnig gewordenen Plasmastrukturen zurückzuführen. Es möchte mit dieser Ausführung lediglich gezeigt werden, daß durch bestimmte Gewebsveränderungen die Resultate des histochemischen Testes stark abgewandelt werden können. Inwiefern nun die Modifizierung des histochemischen Phosphatasenachweises durch Alkoholeinfluß von Belang ist, müssen allerdings weitere Studien abklären.

c) Phosphataseaktivität im Homogenat

Für diese Versuche ist der Gedanke wegleitend, die histochemisch sichtbaren Aktivitätsunterschiede mit der Homogenatstechnik quantitativ zu erfassen. Dies kann durch eine Gegenüberstellung der Homogenate von histochemisch aktiven und nichtaktiven Geweben erreicht

werden, was eine einwandfreie Abtrennung dieser Gewebe voraussetzt. Im folgenden ist dieser Vergleich an den Nektarien von *Abutilon* und *Euphorbia* durchgeführt worden.

Isolierung des Nektar- und Sekretionsgewebes Ne (Abbildung 5, vgl. auch S. 315) bei *Abutilon*. Pro Versuch mußten die Kelchblätter von etwa 6 Blüten (kurz vor oder nach dem Öffnen der Staubbeutel) herangezogen werden. Das aktive Gewebe wurde erhalten durch Entfernen der unteren äußeren Kelchblatthälfte bis zum hellgrünfarbenen, kompakten Nektargewebe. Als Vergleich dienten einerseits das obere Kelchblattdrittel R, 4 mm oberhalb des Nektarfeldes durchschnitten, anderseits das Kronblattgewebe Kr. Die Resultate gehen aus Tabelle 2 hervor.

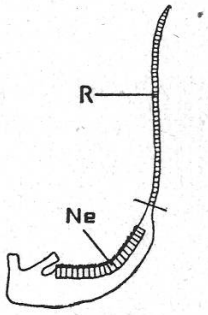

Abbildung 5

Schematischer Längsschnitt durch das Kelchblatt von *Abutilon striatum*. Ne = Nektar- und Sekretionsgewebe; R = Vergleichsgewebe.

Tabelle 2

Spaltung von Glyzerophosphat in Homogenaten des Kelch- und Kronblattgewebes von *Abutilon striatum*. Ne = Nektar- und Sekretionsgewebe; R = Vergleichsgewebe; Kr = Kronblattgewebe; TG = Trockengewicht; N = Stickstoff; FG = Frischgewicht.

							γPO_4/100 mg TG je h	Ne/R
Ne	528	R	519	Kr	210			1,8
	468		587		251			0,8
							γPO_4/mg N je h	Ne/R
Ne	480	R	877	Kr	394			0,5
	585		1062		420			0,5
							γPO_4/100 mg FG je h	Ne/R
Ne	151	R	115	Kr	24			1,3
	139		130		32			1,1

Isolierung des Nektar- und Sekretionsgewebes Ne (Abbildung 6, vgl. auch S. 316) bei *Euphorbia*. Hier waren je Versuch etwa 18 Nektarien (kurz nach Sekretionsbeginn) nötig. Der mittlere Bereich eines jeden Nektariums wurde in drei bis vier Längsscheiben zerlegt und aus diesen mit der Rasierklinge unter dem Binokular mit größtmöglicher Vorsicht die Ne-, R_1- und R_2-Anteile herauspräpariert. Die Ergebnisse der Homogenatsvergleiche dieser Gewebestücke sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3

Spaltung von Glyzerophosphat in Nektarienhomogenaten von *Euphorbia pulcherrima*. Abkürzungen siehe Tabelle 2.

	γPO_4/mg N je h			Ne/R
Ne	494	R_1	113	4,4
	475		120	4,0
	510	R_2	100	5,1
	551		109	5,1
	γPO_4/100 mg FG je h			Ne/R
Ne	170	R_1	26	6,5
	158	R_2	24	6,6

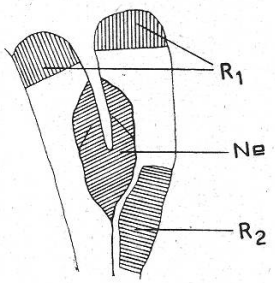

Abbildung 6

Schematischer Längsschnitt durch das Nektarium von *Euphorbia pulcherrima*. Ne = Nektar- und Sekretionsgewebe; R_1, R_2 = Vergleichsgewebe.

Als weitere Bezugsgröße diente neben dem Stickstoff N und dem Frischgewicht FG noch das Volumen des Frischgewebes, das angenähert mit Hilfe der Wasserverdrängungsmethode bestimmt wurde. Bezogen auf dieses Volumen, ergab sich im Homogenat beider Objekte eine rund sechsmal größere Aktivität des Nektargewebes gegenüber Vergleichsgeweben.

Als wichtigstes Ergebnis obiger Versuche muß festgehalten werden, daß im Homogenat die histochemischen Aktivitätsunterschiede nicht *(Abutilon)* oder nur schwach *(Euphorbia)* zum Ausdruck kommen. Wenn auch die Bezugsgrößen diskutabel sind (siehe Diskussionsteil), so wäre doch in den gewählten Geweben eine unterschiedlichere Phosphatabspaltung zu erwarten gewesen.

d) Phosphataseaktivität im intakten Gewebe

Einen Einblick in das vitale Zellgeschehen vermitteln die Homogenatsversuche nicht; denn im Homogenat ist die Zellordnung aufgehoben. Da mit diesem Verfahren die Resultate des histochemischen Testes nicht bestätigt werden konnten, war es naheliegend, den histochemischen Phosphatasenachweis mit der quantitativen Homogenatstechnik zu kombinieren. Der zugrunde liegende Gedanke ist folgender: die herauspräparierten Gewebestücke (es handelt sich wiederum um Nektar- und Vergleichsgewebe) werden nach histochemischer Vorschrift (vgl. Frey, 1954) mit Glyzerophosphat, aber ohne Zusatz von Bleinitrat, inkubiert und erst nach beendeter Inkubation abgetötet und homogenisiert. Darnach erfolgt die Messung des freigesetzten Phosphates im Homogenat.

Durchführung der Versuche. Die Präparation der Nektar- und Vergleichsgewebe bei *Abutilon* und *Euphorbia* ist im Prinzip gleich geblieben, nur sind die Ne- und R-Anteile (siehe Abbildungen 5 und 6) in noch kleinere Scheiben zerlegt worden, um ein möglichst rasches Eindringen des

Tabelle 4
Phosphatabspaltung in Gewebestücken des Kelch- und Kronblattes von *Abutilon striatum*.
Abkürzungen siehe Tabelle 2.

							Ne/R
			γPO_4/mg N je h				
Ne	203	R	325	Kr	158		0,6
	169		284		148		0,6
	190		272				0,7
			γPO_4/100 mg TG je h				Ne/R
Ne	198	R	111	Kr	128		1,8
	162		91		140		1,8
	205		134				1,5
			γPO_4/100 mg FG je h				Ne/R
Ne	55	R	32	Kr	14		1,7
	54		26		12		2,1

Substrates zu gewährleisten. Für *Abutilon* wurde wiederum als weitere Vergleichsmöglichkeit das Kronblattgewebe Kr herbeigezogen. Die Resultate sind für *Abutilon*- und *Euphorbia*-Nektarien getrennt in Tabellen 4 und 5 angeführt.

Tabelle 5

Phosphatabspaltung in Gewebestücken von *Euphorbia*-Nektarien, die mit Glyzerophosphat infiltriert wurden. Abkürzungen siehe Tabelle 2.

	γPO_4/mg N je h			Ne/R
Ne	257	R_1	200	1,3
	282		206	1,4
	283	R_2	141	2,0
	298		175	1,7

	γPO_4/100 mg FG je h			Ne/R
Ne	90	R_1	43	2,0
	87	R_2	46	1,9

Die Ergebnisse sind unzweifelhaft: obwohl bei dieser Methode ein intaktes Gewebe wie beim histochemischen Nachweis mit Glyzerophosphat inkubiert wird, nähern sich die damit gewonnenen Resultate stark denjenigen der Homogenatsversuche. Beide Wege, die Homogenatstechnik sowie die Infiltrationsmethode, lassen erkennen, daß auch im Homogenat histochemisch inaktiver Gewebe eine erhebliche Phosphataseaktivität nachweisbar ist.

3. Phosphataseaktivität im Nektar

a) Nachweis der Aktivität

Enzyme sind im ausgeschiedenen Nektar durchaus keine Seltenheit. So sind bis jetzt schon eine ganze Reihe von Invertasen bekannt geworden (Zimmermann, 1953, 1954; Frey-Wyssling et al., 1954). Diesen Untersuchungen liegt die Arbeit von Bealing und Bacon (1953) zugrunde, welche die Wirkung der Invertase von *Aspergillus*- und *Penicillium*-Extrakten auf Saccharose erforschten. Es war deshalb naheliegend, die Frage abzuklären, inwieweit auch Phosphatasen mit dem Nektar ausgeschieden werden.

Methode. Die eingesammelten frischen Nektarproben wurden je nach ihrer Menge mit H_2O dest. verdünnt, so daß etwa zweiprozentige Zucker-

lösungen entstanden. Die Inkubationszeit dauerte im Gegensatz zu den Homogenats- und Infiltrationsversuchen bis zu 15 h bei 38 °C.

Tabelle 6

Zuckerzusammensetzung und Phosphataseaktivität im ausgeschiedenen Nektar. gest. = gestaltete, ungest. = ungestaltete Nektarien. Weitere Erklärungen im Text.

Pflanze	Ort und Art der Nektarien	Nektar-zucker	Aktivität
Centaurea montana	Blütenhüllblatt, ungest.	S	+
Hoya carnosa	Nebenkrone, ungest.	S, F, O	+
Hevea brasiliensis	Blattstiel, gest.	S, G, F	++
Clerodendron fallax	Kelch, ungest.	S, G, F	+
Euphorbia pulcherrima	Cyathium, gest.	S, G, F	+++++
Abutilon striatum	Kelchblatt, gest.	S, G, F	++++
Impatiens Holstii	Blattstiel, gest.	S	—
Philodendron thaliafolium	Blattscheide, ungest.	S, G, F	+
Sansevieria zeylanica	Blütentragblatt, ungest.	S, G, F	+
Cattleya percivaliana	junge Blätter, ungest.	S, G, F	+

Die Phosphatdifferenz zwischen Test- und Kontrollreaktion galt wiederum als Maß für die Phosphataseaktivität. Die Resultate sind in Tabelle 6 zusammengestellt: darin bedeuten 5 Pluszeichen größte, 1 Pluszeichen geringste und Minuszeichen nach 15stündiger Inkubation noch keine deutlich erkennbare Phosphataseaktivität. Die Erläuterung zu diesen Ergebnissen ist am Schluß des Diskussionsteils angeführt.

b) Zusammensetzung der Nektarzucker

«Nektar ist ausgeschiedener Phloemsaft.» Dies wurde in neuerer Zeit physiologisch (Agthe, 1951) und morphologisch (Frei, 1955) nachgewiesen. Diese Erkenntnis erfuhr zusätzlich eine Vertiefung durch die Feststellung, daß der Phloemsaft im Nektargewebe charakteristischen Umwandlungen unterliegt (Zimmermann, 1953, 1954; Frey-Wyssling et al., 1954; Frey-Wyssling, 1955). Nektar ist somit «aufgearbeiteter» Phloemsaft. Eine Auftrennung der einzelnen Zuckerkomponenten im Nektar ergibt deshalb einen gewissen Aufschluß über die «Aufarbeitung» des Phloemsaftes im Nektargewebe. Die Resultate der papierchromatographischen Untersuchung sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Auffallend ist der obligate Rohrzuckergehalt (S) des Nektars, was auf seine Herkunft aus dem Phloem hindeutet. In den meisten Fällen treten daneben noch Glukose (G) und Fruktose (F) auf. Dieser Zerfall des Rohrzuckers in seine Bausteine Glukose und Fruktose wird auf Invertasewir-

kung zurückgeführt. Als Zwischenstufen des Abbaues können Oligosaccharide (O) entstehen, indem je nach Invertaseart (Transglukosidase, Transfruktosidase) der Glukose- oder der Fruktoserest auf Saccharose übertragen wird (Zimmermann, 1954). In diesem Sinne scheint im Nektargewebe von *Hoya carnosa* eine solche Transglukosidierung stattzufinden, indem im frischen Nektar wohl Fruktose, aber keine Glukose zu finden ist; dafür tritt erwartungsgemäß ein Oligosaccharid auf. In vereinzelten Fällen kann die Invertase fehlen, dann wird nur Saccharose ausgeschieden, was bereits Matile (1956) für *Impatiens*- und Lüttge (1961) für *Centaurea*-Nektar nachgewiesen haben.

D. Diskussion

1. Überblick über die Resultate

Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigen in den Nektarien von *Abutilon* und *Euphorbia* klare Unterschiede zwischen der Epidermis und dem darunterliegenden Nektargewebe, das als Drüsenparenchym ausgebildet ist. Die Epidermis von *Abutilon* hat sich zu einem Trichomfeld weiterentwickelt, während die Epidermis von *Euphorbia* als Palisadenschicht ausdifferenziert ist. Auch physiologisch können die obgenannten Gewebe durch ihre unterschiedliche Phosphataseaktivität auseinandergehalten werden. Neuerdings lassen die Plastidenentwicklung, die Ausbildung des endoplasmatischen Retikulums sowie die Verteilung der Mitochondrien auch eine submikroskopische Unterscheidung zu (Eggmann, 1962; unveröffentlichte Diplomarbeit, ETH). Ebenfalls die topographischen Verhältnisse legen eine Abstufung in zuckertransformierendes Nektargewebe und zuckerausscheidende Epidermis nahe. Auf Grund dieser Beobachtungen ist es notwendig, diesen Unterschieden auch terminologisch Rechnung zu tragen und die Epidermis als *Sekretionsgewebe* vom *Nektargewebe* abzusondern.

Die Interpretation der mit einer bestimmten Methode gefundenen Phosphataseaktivitäten bietet prinzipiell keine Schwierigkeiten. Solche treten erst im Zusammenhang mit einer sinnvollen Koordination der Ergebnisse verschiedener Untersuchungsmethoden auf. Der histochemische Phosphatasenachweis zeigt eindrücklich die hohen Aktivitätsunterschiede zwischen Nektar- und Vergleichsgeweben. Diese Differenzen kommen im Homogenat der entsprechenden Gewebe nur schwach oder gar nicht zum Ausdruck. So ist bei *Euphorbia* die Homogenatsaktivität des Nektargewebes hinsichtlich aller Bezugsgrößen rund fünfmal größer gegenüber Vergleichsgeweben. Bei *Abutilon* ist das histochemisch aktive Gewebe im Homogenat Vergleichsgeweben gegenüber sogar unterlegen.

Die Infiltrationsversuche ergeben für beide Objekte ebenfalls kein signifikantes Aktivitätsmehr für das Nektargewebe. Wiederum ist, auf Stickstoff bezogen, das Nektargewebe von *Abutilon* weniger aktiv als das umliegende Kelchblattgewebe. Es ist schwierig, aus diesen Widersprüchen auf die tatsächlichen Verhältnisse zu schließen.

2. Hypothese

Zieht man zunächst die Homogenatstechnik und den histochemischen Nachweis in Betracht, so stellen sich zwei Fragen: 1. Wie läßt sich die histochemisch hohe Aktivität im Nektargewebe gegenüber benachbartem Gewebe erklären? 2. Warum ergeben Aktivitätsmessungen im Homogenat dieser beiden Gewebe keine Unterschiede von Bedeutung?

Zur Lösung dieses Widerspruches kann unter Hinweglassung einer Kritik der Methoden folgende Hypothese vorgebracht werden: die histochemisch erfaßbare hohe Phosphataseaktivität im Nektargewebe ist nicht so sehr auf ein Mehr an Enzym zurückzuführen, sondern darauf, daß hier eine Enzymgruppe lokalisiert ist, die volle Aktivität entwickeln kann. Dabei könnten Ort und Art der Bindung oder intramolekulare Gegebenheiten eine Rolle spielen. Man muß im Nektargewebe Phosphatasen annehmen, die histochemisch besonders leicht ansprechen. Im übrigen Gewebe muß eine adäquate Enzymmenge in einer histochemisch wenig aktiven Form vorliegen. Es ist leicht einzusehen, daß im histochemischen Test nur die aktive Form der Phosphatase reagiert, während im Homogenat auch die in lebenden Zellen unwirksame Form gemessen wird. Denn durch das Homogenisieren werden die feinen Zellstrukturen zerstört, die inaktive Form geht in Lösung und erlangt dort ihre volle Wirksamkeit.

Verfolgt man die Gewebedifferenzierung unter der gut fundierten Annahme, daß alle Zellen im embryonalen Zustand phosphataseaktiv sind, so ergibt sich aus der Hypothese folgender Entwicklungsverlauf: jede Zelle behält während des Wachstums ihre embryonale Enzymausstattung bei und stellt sie im Falle der spezialisierten Nektar- und Phloemgewebe in den Dienst des Zuckerstoffwechsels; im Falle von nichtspezialisierten Geweben aber wird sie in eine histochemisch inaktive Form übergeführt, die erst im Zellhomogenat in Erscheinung tritt.

3. Ursachen der Divergenzen

Will man den Ursachen der Divergenzen nachgehen, so müssen sowohl die Methoden als auch die Bezugsgrößen des Phosphatasenachweises einer Kritik unterzogen werden.

Homogenatstechnik. Die Homogenatstechnik sagt nichts aus über die Phosphataseaktivität in den lebenden Zellen. Sie mißt nur die Enzymaktivität im desorganisierten Gewebezustand, wobei zum Beispiel durch die Desintegration Spezifitätsunterschiede in der Phosphatasewirkung eintreten können (vgl. Sanwal und Krishnan, 1960).

Infiltrationsversuche. Die Ergebnisse der Infiltrationsversuche lassen sich nicht recht in das gewonnene Bild einfügen; denn obwohl bei dieser Methode ein intaktes Gewebe wie beim histochemischen Nachweis mit Glyzerophosphat inkubiert wird, verhält sich die Phosphataseaktivität eher wie in einem Homogenat. Eine Deutung ist daher nicht so einfach. Das Problem bei diesen Infiltrationsversuchen wie auch beim histochemischen Test liegt darin, daß die verwendeten Handschnitte während der Inkubation einerseits durch ihre Isolation, anderseits durch den Einfluß der Chemikalien sicher im Absterben begriffen sind. Die histochemische Phosphatabspaltung wird zwar als eine vitale Leistung des Gewebes aufgefaßt, dabei werden eine geringe Anzahl intakter Zellagen während 15 min in Gegenwart von Blei-Ionen inkubiert. Bei den Infiltrationsversuchen dauert die Inkubation zwar sechsmal länger, dafür fehlen die Schwermetallionen; zudem sind die verwendeten Handschnitte mindestens doppelt so dick, was für eine längere Lebensdauer bürgt. Bezüglich der Vitalität der Gewebe müssen wohl beide Methoden gleich beurteilt werden.

Histochemischer Phosphatasetest. Wie schon aus den Übersichtsarbeiten von Van Fleet (1952) und Gomori (1953) hervorgeht, ist der histochemische Nachweis nicht durchwegs befriedigend als Methode zur Erfassung aller phosphatabspaltenden Enzyme. Es gibt nämlich Phosphatasen, die unter den gegebenen Reaktionsbedingungen keine Aktivität zeigen. Die beiden folgenden Abschnitte möchten auf zwei Besonderheiten des histochemischen Testes hinweisen.

Ein wenigbeachtetes Merkmal bildet die Tatsache, daß bei längeren Inkubationszeiten (zum Beispiel 12 h oder 24 h) auch «inaktives» Gewebe geschwärzt wird. Dies weist deutlich auf eine Phosphataseausstattung auch derjenigen Gewebe hin, die im histochemischen Test unter den gegebenen Bedingungen nicht reagieren.

Nach Vis (1958) ist die Phosphataseaktivität in Nektarien nicht nur auf das Nektargewebe beschränkt. So fand er mit seiner Methode (er verwendete Paraffinschnitte und inkubierte bei pH 4,3; vgl. dazu Abbildung 1) bei *Trifolium repens* eine positive Schwärzung, die über das Nektargewebe hinaus auch benachbartes Gewebe erfaßte. Bei *Euphorbia splendens* reagierten Nektargewebe und Palisadenepidermis sogar negativ, während das darunterliegende Parenchym positive Reaktion zeigte. Diese

merkwürdigen Abweichungen zwingen zur Frage, in welchem Maß hier die Phosphataseaktivität mit dem Zuckerstoffwechsel des Nektargewebes in Zusammenhang gebracht werden kann.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit resultiert eine ähnliche Fragestellung, da auch histochemisch inaktive Gewebe in ihren Homogenaten eine erhebliche Phosphataseaktivität aufweisen. Es darf wohl der Schluß gezogen werden, daß die histochemisch zum Ausdruck kommende hohe Phosphataseaktivität des Nektargewebes nicht mit Notwendigkeit mit dem Zuckermetabolismus in ursächlichem Zusammenhang stehen muß. *Vielmehr scheint die histochemisch erfaßbare intensive Enzymaktivität ein Merkmal eines Gewebes zu sein, das ganz allgemein über einen erhöhten Stoffwechsel verfügt.*

Kritik der Bezugsgrößen. Die Frage, worauf die Phosphataseaktivität bezogen werden soll, spielt eine wesentliche Rolle. Stickstoff als Bezugsbasis ist fragwürdig, da bekanntlich das Nektargewebe sehr plasmareich und großkernig ist (Deufel, 1954), was schon lichtmikroskopisch bestätigt werden kann. Somit dürfte im Nektargewebe der Stickstoffgehalt (in erster Linie Proteinstickstoff) pro Volumeneinheit wesentlich höher liegen als in Vergleichsgeweben. Dennoch erfüllt die Stickstoffbasis ihren Zweck, wenn es einfach darum geht, das Verhältnis des Enzyms zum Stickstoff festzustellen, ohne mit Stickstoff offensichtlich verschieden dotierte Gewebe vergleichen zu wollen. Ähnliches ist über die Herbeiziehung des Trockengewichts (TG) als Basis zu sagen; denn es wird durch den Plasmareichtum des Gewebes ebenfalls beeinflußt. Dies dürfte allerdings nicht

Tabelle 7

Gegenüberstellung der Homogenatstechnik (Hom) und des histochemischen Nachweises (Hist).

Inkubation	Hom Hist	1–2 h, 38 °C ¼ h, 38 °C
Gewebezustand	Hom Hist	strukturloses, wässeriges Milieu lebende (prämortale ?) Schnitte
Auswertung	Hom Hist	abgesp. PO_4 quantitativ gemessen abgesp. PO_4 in PbS übergeführt
Bezugsgrößen	Hom Hist	N, TG, FG, Vol. Schwärzungsvergleich

sehr ins Gewicht fallen, zumal in den Versuchen das Trockengewicht aus eingetrocknetem Homogenat ermittelt wurde. Einwandfreier ist der Aktivitätsbezug auf die einzelne Zelle oder das Gewebevolumen. Die Zelle als Bezugsmöglichkeit muß hier fallengelassen werden angesichts der sehr unterschiedlichen Zellgröße in den zu vergleichenden Geweben. Dagegen kann die Aktivität auf das Volumen bezogen werden. Hier kommt bei beiden untersuchten Pflanzen eine rund vier- bis sechsmal größere Aktivität des Nektargewebes gegenüber Vergleichsgeweben zum Ausdruck. Das Frischgewicht endlich wird durch den wechselnden Wassergehalt des Gewebes zum vornherein zu einer Hilfsgröße gestempelt.

Zusammenfassend sind die wesentlichen methodischen Unterschiede zwischen der Homogenatstechnik und dem histochemischen Phosphatasenachweis in Tabelle 7 wiedergegeben.

E. Zusammenfassung

1. Die Nektarien von *Abutilon* und *Euphorbia* werden in histochemisch phosphataseaktive und nichtphosphataseaktive Gewebe zerlegt und im Homogenat dieser Gewebe die Phosphataseaktivitäten quantitativ gemessen.

2. Bei *Euphorbia* ergibt das Homogenat des Nektargewebes hinsichtlich aller verwendeten Bezugsgrößen eine rund fünfmal größere Aktivität gegenüber dem Homogenat des Vergleichsgewebes.

3. Bei *Abutilon* resultiert aus dem Homogenatsvergleich kein signifikantes Aktivitätsmehr im Nektargewebe. Auf den Stickstoff bezogen, ist die Aktivität im Nektargewebe sogar nur halb so groß wie im Kelchblattoberteil.

4. Mit der Infiltrationsmethode (Inkubation intakter Gewebestücke aus *Euphorbia*- und *Abutilon*-Nektarien) kommen die Aktivitätsunterschiede (Schwärzungsunterschiede) des histochemischen Nachweises ebenfalls nicht zum Ausdruck.

5. Es scheint, daß in intakten Geweben inaktive Phosphatasen vorkommen, die bei der Homogenisierung oder durch genügend lange Inkubierung (24 h) aktiviert werden.

6. Auf Grund von morphologischen, physiologischen und submikroskopischen Unterschieden wird in den Nektarien von *Abutilon* und *Euphorbia* eine Trennung in Sekretionsgewebe (ausscheidende Epidermis) und Nektargewebe (zuckertransformierendes Drüsenparenchym) bestätigt.

7. Bei neun von zehn Pflanzen kann Phosphataseaktivität im ausgeschiedenen Nektar nachgewiesen werden. Der Nektar von *Abutilon* und *Euphorbia* ist sehr phosphataseaktiv, der Nektar von *Impatiens* inaktiv. Allgemein scheiden in den untersuchten Fällen die gestalteten Nektarien einen phosphataseaktiveren Nektar aus als ungestaltete.

Literatur

Agthe C. 1951. Über die physiologische Herkunft des Pflanzennektars. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **61**, 240–273.

Bealing F.J., Bacon J.S.D. 1953. The Action of Mould Enzymes on Sucrose. Biochem. J. **53**, 277–285.

Berenblum J., Chain E. 1938. An Improved Method for the Colorimetric Determination of Phosphate. Biochem. J. **32**, 295–298.

Cramer F. 1952. Papierchromatographie. Verlag Chemie, Weinheim.

Deufel J. 1954. Zytologische Untersuchungen an sezernierenden Zellen. Naturwiss. **41**, 41–42.

Eggmann H. 1962. Elektronenoptische Untersuchungen von Nektargeweben. Unveröffentlichte Diplomarbeit aus dem Institut für Allgemeine Botanik der ETH, Zürich.

Frei E. 1955. Die Innervierung der floralen Nektarien dikotyler Pflanzenfamilien. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **65**, 60–114.

Fresenius R. 1938. Zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl mit dem Apparat von Parnas J.K. Zschr. anal. Chem. **114**, 275–278.

Frey-Wyssling A. 1955. The Phloem Supply to the Nectaries. Acta Bot. Neerl. **4**, 358 bis 369.

— Häusermann E. 1960. Deutung der gestaltlosen Nektarien. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **70**, 150–162.

— Zimmermann M., Maurizio A. 1954. Über den enzymatischen Zuckerumbau in Nektarien. Experientia **10**, 490–492.

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.

Glick D. 1949. Techniques of Histo- and Cytochemistry. New York.

Gomori G. 1953. Microscopic Histochemistry. 2. Auflage. Chicago.

Kursanov A.L., Turkina M.W. 1952a. Die Atmung der Leitbündel. Dokl. Akad. Nauk SSSR **84**, 1073–1076.

— — 1952b. Die Atmung der Leitgewebe und der Transport der Saccharose. Dokl. Akad. Nauk SSSR **85**, 649–652.

Lüttge U. 1961. Über die Zusammensetzung des Nektars und den Mechanismus seiner Sekretion. Planta **56**, 189–212.

Matile Ph. 1956. Über den Stoffwechsel und die Auxinabhängigkeit der Nektarsekretion. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **66**, 237–266.

Parnas J.K. 1938. Über die Ausführung der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl in der Modifikation nach Parnas und Wagner. Zschr. anal. Chem. **114**, 261–275.

Partridge S.M., Westhall R.G. 1948. Filter-paper Partition Chromatography of Sugars. Biochem. J. **42**, 238–250.

Sanwal G.G., Krishnan P.S. 1960. Diurnal Variation in Aldolase and Phosphatase Activity in the *Cactus* Plant. Nature **188**, 664–665.

Van Fleet D.S. 1952. Histochemical Localization of Enzymes in Vascular Plants. Bot. Rev. **18**, 354–398.

Vis J.H. 1958. The Histochemical Demonstration of Acid Phosphatase in Nectaries. Acta Bot. Neerl. **7**, 124–130.

Wanner H. 1952. Phosphataseverteilung und Kohlehydrattransport in der Pflanze. Planta **41**, 190–194.

— 1953a. Die Zusammensetzung des Siebröhrensaftes: Kohlenhydrate. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **63**, 162–168.

— 1953b. Enzyme der Glykolyse im Phloemsaft. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **63**, 201–212.

Ziegler H. 1955. Phosphataseaktivität und Sauerstoffverbrauch des Nektariums von *Abutilon striatum* Dicks. Naturwiss. **42**, 259–260.

— 1956. Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. Planta **47**, 447–500.

— 1958. Über die Atmung und den Stofftransport in den isolierten Leitbündeln der Blattstiele von *Heracleum Mantegazzianum* Somm. et Lev. Planta **51**, 186–200.

— 1960. Über den Nachweis von Uridindiphosphatglukose (UDPG) im Phloem von *Heracleum Mantegazzianum* Somm. et Lev. Naturwiss. **47**, 140.

Zimmermann J.G. 1932. Über die extrafloralen Nektarien der Angiospermen. Beih. Bot. Cbl. **49**, I, 99–196.

Zimmermann M. 1953. Papierchromatographische Untersuchungen über die pflanzliche Zuckersekretion. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **63**, 402–429.

— 1954. Über die Sekretion saccharosespaltender Transglukosidasen im pflanzlichen Nektar. Experientia **10**, 145–146.