

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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 84 (1974)

Heft: 3

Artikel: Histochemische Untersuchungen an der Kirschenfrucht (*Prunus avium* L.)

Autor: Häuptli, Fritz

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-59258>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. 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. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

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. [Voir Informations légales.](#)

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. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 08.02.2025

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

Histochemische Untersuchungen an der Kirschenfrucht (*Prunus avium* L.)

von *Fritz Häuptli*

Manuskript eingegangen am 28. Februar 1974

Einleitung

Eine Hypothese über die Steinzellenbildung im Fruchtfleisch der Birne (Häuptli, 1971) gab den Anstoss zur vorliegenden Untersuchung. Es war dabei wissenschaftlich wertvoll, ob bei der Verholzung des Endokarps einer Steinfrucht vergleichbare Enzymaktivitäten beobachtet werden und ob sie in der zeitlichen Folge und der räumlichen Verteilung zu einem ähnlichen Differenzierungsmodell führen könnten.

Zahlreiche Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Verholzung eng mit dem Wachstum zusammenhängt (s. Roberts, 1969). Oft wurde gezeigt, dass Enzyme, die bei der Ligninbildung eine Rolle spielen, auch wachstumsregulierende Funktionen haben. Beispielsweise liefern wahrscheinlich *Peroxydasen* und *Phenoloxidasen* nicht nur die Bausteine für die Ligninpolymerisation, sondern sie kontrollieren durch die Oxydierung des Auxins auch das Wachstum. Phenole und ihre Derivate spielen als Substrate der genannten Enzyme dabei eine zentrale Rolle (Engelsma, 1964, Bland und Logan, 1965, Zenk, 1966). Die β -Glukosidase lieferte möglicherweise diese Substrate als Aglukone. Die *Saure Phosphatase* könnte neben andern Funktionen zur Zellwandbildung nötig sein.

Histochemische Untersuchungen – sie fehlen bis heute an Steinfrüchten – helfen diese Wechselbeziehungen von Wachstum und Verholzung klären. Das *Fruchtwachstum* muss beobachtet werden, damit die histochemisch gefundenen Ergebnisse der Fruchtentwicklung zugeordnet werden können.

Material und Methoden

Bei 20 Früchten der Süßkirsche (*Prunus avium* L., Sorte: „Berner Herzkirsche“) wird der mittlere Durchmesser (Kobel, 1937) bestimmt.

$$\text{Mittlerer Durchmesser} = \frac{\text{Länge} + \text{Breite} + \text{Dicke}}{3}$$

5 mm dicke Querschnitte der Früchte werden mit einer 0,5-m-Rohrzuckerlösung infiltriert und danach mit dem Gefriermikrotom geschnitten. Durch die Infiltration wird das Schneiden erleichtert. Kontrollversuche zeigen, dass die Rohrzuckerlösung die Ergebnisse nicht beeinflusst. Anschliessend werden die Schnitte nach folgenden Methoden behandelt:

Saure Phosphatase. Bleisulfidverfahren (Gomori, 1952, nach Jensen, 1962). Geschnittenes Gewebe wird in der Substratlösung bei 37°C während 3 Stunden inkubiert. Inkubationsgemische: 0,15 g Bleinitrat in 100 ml 0,5-m Azetatpuffer (pH 5,0), 10 ml 0,1-m Natriumglycerophosphat. Die Schnitte werden nach der Inkubation gründlich gespült und danach während 5 Minuten in verdünnte Ammoniumsulfidlösung (1%) gebracht. Schliesslich werden sie nochmals gespült und montiert.

Kontrollen: a) Die Schnitte werden während 5 Minuten in heisses Wasser (90°C) gelegt. Die anschliessende Behandlung entspricht dem Testverfahren. b) Die Schnitte werden in Inkubationslösung, die aber kein Glycerophosphat enthält, inkubiert. Die Behandlung des Gewebes bleibt im übrigen gleich wie beim Test.

β-Glukosidase. Die Schnitte werden während 3 Stunden bei 37°C in der Inkubationslösung gehalten. Darauf werden sie gespült und montiert. Inkubationslösung: 2,5 ml wässrige Indikanlösung (2%) + 0,8 ml Phosphatpuffer (m/15), pH-Wert: 6,0.

Kontrolle: Die Schnitte werden vor der Inkubation während 5 Minuten auf 90°C erhitzt.

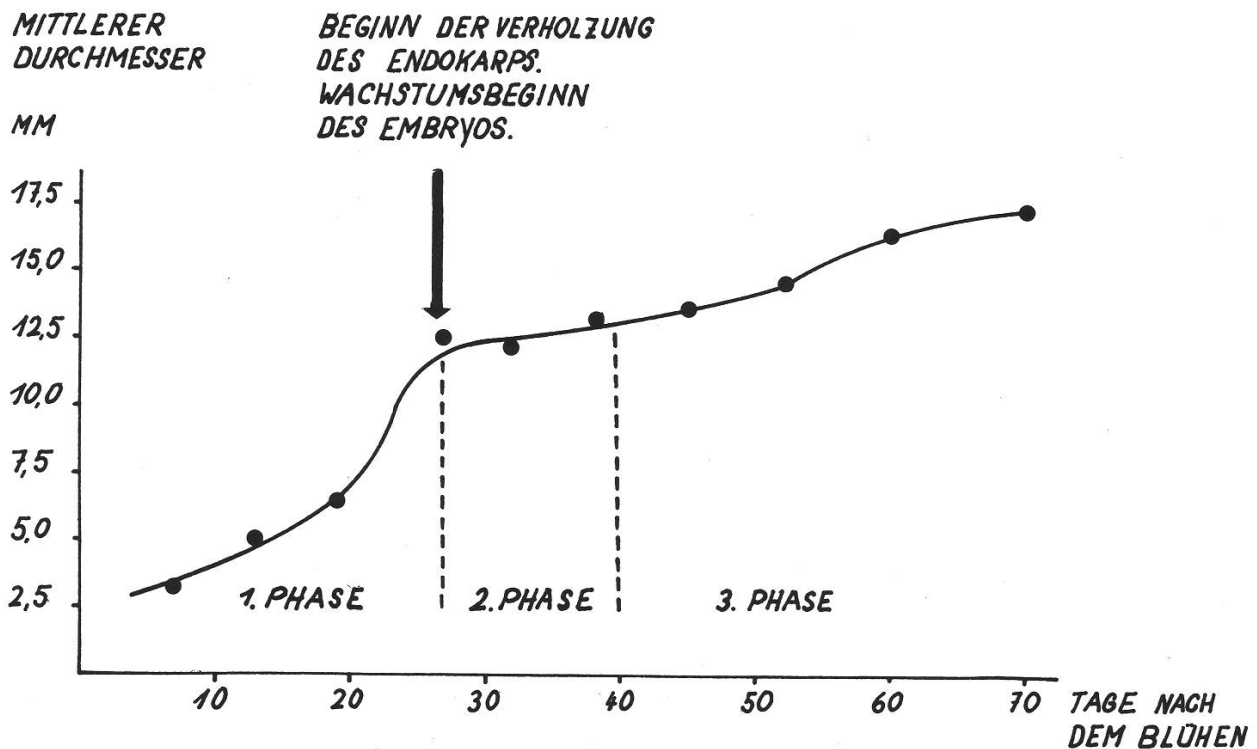


Fig. 1:

Zunahme des mittleren Durchmessers der Kirschenfrucht im Verlaufe der Entwicklung.

Peroxydase. Die Peroxydase wird mit der Methode von Graham et al. (1965) nachgewiesen. Die Schnitte werden dabei während 30 Minuten bei Zimmertemperatur in der Inkubationslösung gehalten. Inkubationslösung: 4 mg 3-Amino-9-Aethylcarbazol werden in 0,5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst und anschliessend mit 9,5 ml Azetatpuffer (0,05-m) von pH 5,1 gemischt. Die Lösung wird vor Gebrauch filtriert. Danach wird dazu 1 ml Wasserstoffperoxyd (3%) gegeben.

Kontrollen: a) Die Schnitte werden vor dem Inkubieren während 5 Minuten in heissem Wasser (90°C) gehalten. b) Der Inkubationslösung wird kein Wasserstoffperoxyd zugefügt.

Phenoloxydase. (Bloch, 1917, nach Deane et al., 1960). Inkubationslösung: 5 ml Dopalösung (0,3%) werden mit 1,6 ml Phosphatpuffer (m/15) von pH 6,8 vermischt. Inkubationsdauer: 3 h. Inkubationstemperatur: 37°C.

Kontrollen: a) Die Schnitte werden für 5 Minuten in Wasser von 90°C inaktiviert. b) Der Inkubationslösung wird 1 ml Diäthyl-dithiocarbamat (Dieca, 10⁻¹-m) als Inhibitor beigegeben.

Ergebnisse

1. Wachstum

Die Ergebnisse sind in Figur 1 festgehalten. Der mittlere Durchmesser ändert sich nach einer starken Zunahme während rund 2 Wochen kaum mehr. Anschliessend bis zur Fruchtreife wächst er wieder stärker. Die Wachstumskurve lässt sich also in 3 Abschnitte gliedern. Zu Beginn der zweiten Phase verholzt das Endokarp sehr rasch. Auch beginnt dann das Embryowachstum.

2. Saure Phosphatase (Fig. 2–4)

Während der Fruchtentwicklung nimmt die Aktivität ab. Anfänglich (1. Woche nach dem Blühen) findet sich im innern Teil des Mesokarps eine Zone mit starken Sulfidniederschlägen. Das Endokarp zeigt keine Reaktionsprodukte, grenzt somit diese Mesokarpzone gegen innen deutlich ab. Bald darnach (2./3. Woche nach dem Blühen) finden sich jedoch über den ganzen Querschnitt feinkörnige Reaktionsprodukte. Schwache Enzymaktivität ist nur im Exokarp und im Nuzellus festzustellen.

Die granulären Bleisulfidniederschläge sind insbesondere in der Wandnähe zu finden. Dies bleibt während der ganzen Beobachtungsperiode sehr auffällig. Allerdings sind auch stets im Zellinnern Reaktionsprodukte zu beobachten.

Während der 3. und 4. Woche nach dem Blühen sind die Reaktionsprodukte ganz besonders auf der Innenseite der Zellwand lokalisiert. Die Enzymaktivität ist dann sehr gross. Allerdings ist sie gegenüber dem Mesokarp und den Integumenten nicht derart, dass – wie bei den Birnensklereiden – nur aufgrund dieser Aktivität auf später verholzende Zellen geschlossen werden kann.

Nach 5 Wochen – die Verholzung im Endokarp beginnt – zeigt sich folgendes Bild: Exokarp und Mesokarp schwache, gegen innen zunehmende Reaktion. Das verholzende Exokarp weist nur noch Reaktion in den Tüpfelkanälen auf.

Um die Leitbündel im Mesokarp und in den Integumenten gibt es viel Reaktionsprodukte. Der Nuzellus reagiert nur schwach. Während der nächsten zwei Wochen ändert sich an diesem Bild nichts. In den letzten drei Wochen der Fruchtentwicklung geht die Enzymaktivität stark zurück.

3. Peroxydase (Fig. 6–9)

Die bemerkenswerteste Beobachtung ist die sehr grosse Aktivität im Endokarp kurz vor dem Beginn der Verholzung (4./5. Woche nach dem Blühen). Sie hebt sich deutlich von andern Geweben ab. Die Reaktionsprodukte sind im Zellumen verteilt. Zwar zeigt das Endokarp schon von Anfang an eine auffällige Peroxydaseaktivität, die aber vorerst vergleichbar ist mit derjenigen der Integumente. Das äussere Integument reagiert schwächer als das innere.

Im Nuzellus ist in den Zellwänden eine Reaktion vorhanden. Auch weist die Haustorialscheide eine Enzymaktivität auf.

Nach dem Beginn der Endokarpverholzung zeigt der ganze Querschnitt nur noch eine Reaktion in den Interzellularen und in den Zellwänden der Subepidermis, in den Leitbündeln und im Nuzellus. Eine Woche später nimmt die Aktivität in den Integumenten wieder zu. Es bleibt dann die stärkste Reaktion des Querschnitts bis zur Fruchtreife.

4. Phenoloxydase (Fig. 5)

Die Phenoloxydaseaktivität unterscheidet sich deutlich von der Peroxydaseaktivität in den einzelnen Geweben. Während der ganzen Beobachtungszeit ist im Mesokarp und im Exokarp eine sehr starke Aktivität festzustellen. Im Endokarp dagegen fehlt jede Reaktion. Einzig die Integumente zeigen ausser der Peroxydase auch eine mittlere Phenoloxydaseaktivität, ebenso die Haustorialscheide. Im Nuzellus findet sich nur schwache Reaktion.

Fig. 2–4: Saure Phosphatase.

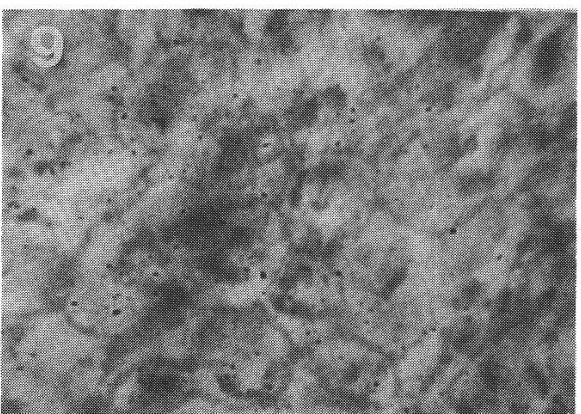
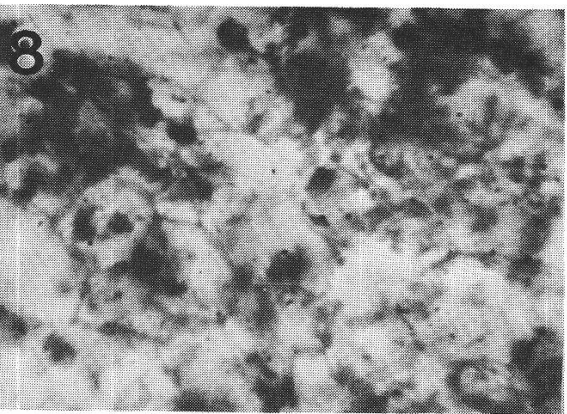
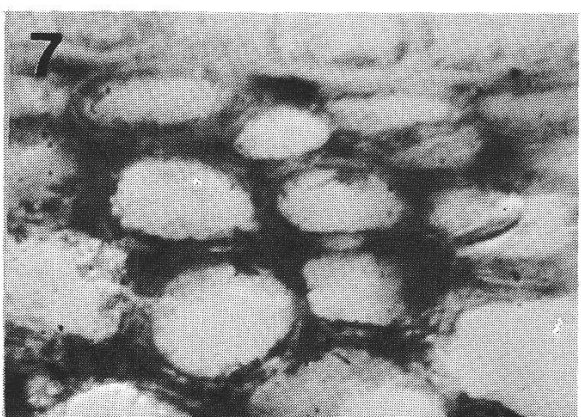
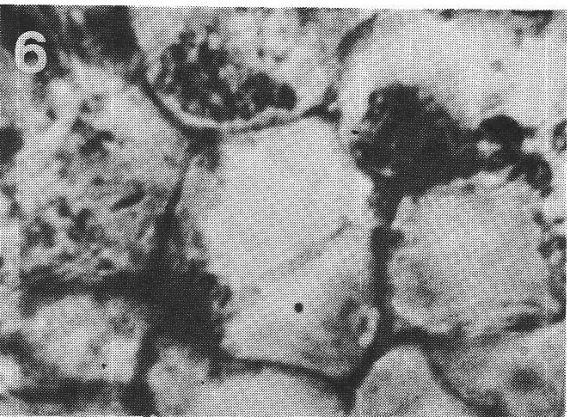
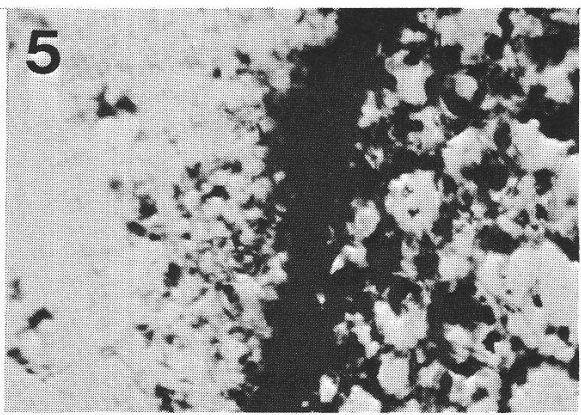
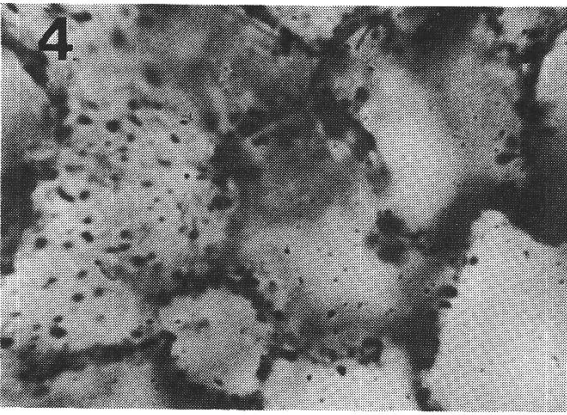
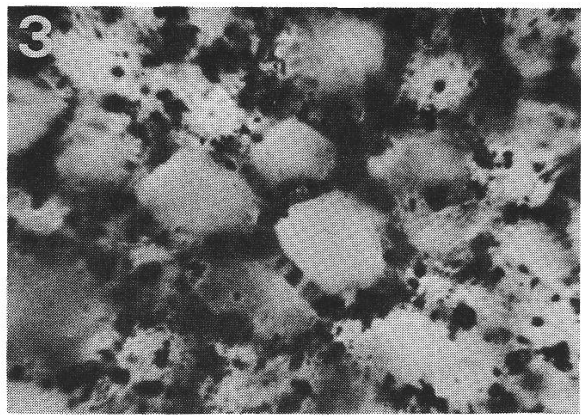
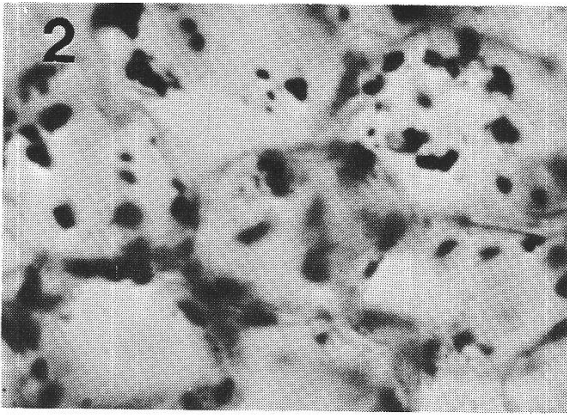
Fig. 2: Integumentzellen. Reaktionsprodukte im Zellinnern. 5. Woche nach dem Blühen. 820 x. – *Fig. 3:* Endokarp. Verholzende Zellen. Reaktionsprodukte in den Tüpfelkanälen. 5. Woche nach dem Blühen. 330 x. – *Fig. 4:* Inneres Mesokarp. Wandständige Reaktionsprodukte. 6. Woche nach dem Blühen. 330 x.

Fig. 5: Phenoloxydase.

Grenzzellen zwischen Mesokarp (rechts) und Endokarp (links) mit starker Reaktion. 4. Woche nach dem Blühen. 144 x.

Fig. 6–9: Peroxydase.

Fig. 6: Enzymaktivität in den Zellen des Endokarps. 3. Woche nach dem Blühen. 820 x. – *Fig. 7:* Reaktion in den Interzellularen der Subepidermis. Epidermis (oben) ohne Reaktion. 7. Woche nach dem Blühen. 330 x. – *Fig. 8:* Endokarpzellen kurz vor der Verholzung mit starker Reaktion im Zellinnern. 4. Woche nach dem Blühen. 330 x. – *Fig. 9:* Kontrolle zu Fig. 8. 4. Woche nach dem Blühen. 330 x.



Die Plastiden und die Zellwände sind dunkel. Der Vergleich mit den Kontrollen weist eindeutig auf eine Enzymaktivität hin. Reaktionsprodukte kommen aber auch im Zellumen vor.

Vor der Verholzung des Endokarps zeigen die Grenzzellen des Mesokarps ein deutliches Aktivitätsoptimum. Im ganzen nehmen die Niederschlagsprodukte im Mesokarp gegen innen jedoch ab. Die kleinsten Zellen des Gewebes zeigen die grösste Aktivität. Die Grenzzellen des äusseren Integuments gegen aussen und die des inneren Integuments gegen innen weisen eine stärkere Aktivität als die übrigen Integumentzellen auf.

Die Phenoloxydaseaktivität bleibt während der Fruchtentwicklung in den einzelnen Geweben unverändert.

5. β -Glukosidase

Nur in den beiden Integumenten finden sich gegen den Schluss der Fruchtentwicklung Indigoniederschläge. Sonst konnten während der ganzen Beobachtungsperiode keine Reaktionsprodukte gefunden werden.

Diskussion

Das *Wachstum* der Kirschenfrucht in drei Abschnitten wurde verschiedentlich beobachtet (s. Kozlowski, 1971) und darf als gesichert gelten. Einzig die Dauer der einzelnen Phasen wechselt je nach Klima und Sorte (Stösser, 1966).

Die physiologische Funktion der *Sauren Phosphatase* ist noch unbekannt. Schon sehr früh wurde eine mögliche Rolle des Enzyms beim Stofftransport diskutiert (Wanner, 1952). Neuerdings wurde dieser Gedanke aufgrund von elektronenoptisch gefundenen, intrazellulären Befunden wieder aufgegriffen (Figier, 1968, Gahan und McLean, 1969). Allerdings dürfen andere Funktionen nicht ausser acht gelassen werden. Beispielsweise könnte das Enzym auch – wie einleitend schon bemerkt – der Zellwandbildung dienen. In Sklereiden wurde nämlich vor der Verholzung bei einer starken Zellwandverdickung eine starke Saure Phosphataseaktivität festgestellt (Mia und Pathak, 1968, Häuptli, 1971). In der vorliegenden Untersuchung fehlt im verholzenden Endokarp eine aussergewöhnliche Enzymaktivität. Möglicherweise kann dies damit erklärt werden, dass einerseits die Aglukone, resultierend aus der β -Glukosidaseaktivität, wegfallen, andererseits die Zellwände vor der Verholzung sich nicht wesentlich verdicken. Der Materialbedarf für den Aufbau der Zellwand scheint also nicht grösser als in Zellen anderer Gewebeteile. Für den Wandaufbau und den Stofftransport ist nach den dargelegten Beobachtungen ein Mitwirken der Sauren Phosphatase möglich. Dies um so mehr, als während des Hauptwachstums der Frucht die grösste Saure Phosphataseaktivität beobachtet werden konnte.

Histochemische Untersuchungen der Birnenfrucht zeigten ein Zusammenwirken der *Phenoloxydase* und der *Peroxydase* (Hauptli, 1971). Pilet et al. (1970) fanden Phenoloxydase-, Peroxydase- und Indolessigsäureoxydaseaktivität in der gleichen Fraktion nach einer Gel-Chromatographie. Sheen und Calvert (1969) vermuten, dass im Blattextrakt von Tabakpflanzen die Peroxydase und die Phenoloxydase in einem Proteinkomplex verbunden sein könnten. Auch in den Integumenten der Kirschenfrucht sind beide Enzyme aktiv. Deshalb überrascht es um so mehr, als eindeutige räumliche Aktivitätsunterschiede der Phenoloxydase und der Peroxydase im Mesokarp bzw. im Endokarp der Kirsche beobachtet werden.

Eine Erklärung dafür böte vielleicht eine Untersuchung über die Sauerstoffkonzentration in den verschiedenen Geweben der Frucht. Wäre es doch möglich, dass der Sauerstoff- bzw. der Wasserstoffperoxydgehalt der Gewebe die Aktivität der beiden Enzyme begrenzen.

Die Zellen im Endokarp vergrössern sich vor der Verholzung nicht wesentlich. Die Peroxydase oxydierte also im vorliegenden Fall hauptsächlich die Ligninbausteine zu freien Radikalen. Ein Mangel an Indolessigsäure im Endokarp – im Gegensatz zum Mesokarp – erklärte das Ausbleiben einer Wirkung dieser Oxydation auf das Zellwachstum. Die Phenoloxydase bliebe im Endokarp inaktiv, weil der Sauerstoff als Elektronenakzeptor fehlte.

Eine ganz andere Situation liegt wahrscheinlich im Mesokarp vor. Die Synthese der Polyphenole im chloroplastenreichen Gewebe (Harborne, 1964, Delaveau und Paris, 1961) und eine grössere Sauerstoffkonzentration bewirkt die starke Phenoloxydaseaktivität. In der Konkurrenz mit den gleichen Substraten zöge die Peroxydase, eventuell auch mangels Wasserstoffperoxyd, den kürzern. Ob die Oxydationsprodukte dabei zur Verholzung im Endokarp verwendet werden, kann nicht entschieden werden.

Die β -Glukosidase liefert phenolische Aglukone (van Fleet, 1961). Das Fehlen einer β -Glukosidaseaktivität führt zur Annahme, dass keine Substrate der Peroxydase und der Phenoloxydase von ausserhalb der Frucht stammen.

Zusammenfassung

Während der Entwicklung der Kirschenfrucht wurden die Aktivität und die Verteilung der 4 Enzyme, Saure Phosphatase, Peroxydase, Phenoloxydase und β -Glukosidase histochemisch untersucht.

Die Frucht wächst in drei Abschnitten. Die Verholzung des Endokarps beginnt am Anfang des zweiten Abschnitts. In dieser Wachstumsperiode wächst die Frucht als Ganzes kaum.

Während der Fruchtentwicklung nimmt die Aktivität der Sauren Phosphatase ab. In den ersten Wochen finden sich über den ganzen Fruchtquerschnitt Reaktionsprodukte. Sie sind insbesondere in der Wandnähe zu beobachten. Die Aktivität der Peroxydase ist im Endokarp kurz vor der Verholzung sehr gross. Nach dem Beginn der Endokarpverholzung nimmt die Aktivität, ausgenommen in den Integumenten, stark ab.

Von den Integumenten abgesehen, unterscheidet sich die Phenoloxydaseaktivität deutlich von der Peroxydaseaktivität. Sie bleibt während der Fruchtentwicklung in den einzelnen Geweben unverändert. Im Mesokarp und im Exokarp ist eine sehr starke, in den Integumenten eine mittlere Aktivität festzustellen. Sie fehlt im Endokarp ganz. Eine leichte Reaktion der β -Glukosidase kann nur am Ende der Fruchtentwicklung in den Integumenten nachgewiesen werden. Die mögliche Funktion der 4 Enzyme und die Unterschiede ihrer Aktivität werden diskutiert.

Summary

Distribution and activity of the four enzymes (acid phosphatase, peroxidase, phenoloxidase, and β -glucosidase) of the cherry fruit have been investigated during growth by histochemical methods. The fruit grows in three stages. Lignification of the endocarp begins in the early stage II, where the fruit as a whole does not become bigger. The activity of acid phosphatase decreases during the development of the fruit. In the first weeks it is to be found everywhere; the end products are deposited mainly near the cell walls. Peroxidase is most active in the endocarp just before lignification. Except in the integuments it is only slightly effective in stages II and III. Phenoloxidase activity in the single tissues (except in the integuments) differs sharply from peroxidase activity. Phenoloxidase activity does not change at all during the development of the fruit. It is very active in the mesocarp, medium in the integuments and it is lacking in the endocarp. A slight reaction of the β -glucosidase seems to appear only at the end of the development of the fruit in the integuments. The possible role of the four enzymes and their differences in activity is discussed.

Literatur

- Bland D.E. und A.F. Logan. 1965. The properties of springyl, guaiacyl and p-hydroxyphenyl artificial lignins. *Biochem J.* 95, 515–520.
- Deane H.W., R.J. Barnett und A.M. Seligman. 1960. Histochemische Methoden zum Nachweis der Enzymaktivität. In: Graumann W. und K.H. Neumann (eds.). *Handbuch der Histochemie VII/1*. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Delaveau P. und R. Paris. 1961. Importance physiologique des composés polyphénoliques et en particulier des flavonoïdes. *Bull. Soc. franç. physiol. vég.* 7, 24–33.
- Engelsma G. 1964. Destruction of hydroxycinnamic acids coupled to oxidation of indolyl-3-acetic acid by peroxidase as a possible mechanism for adaptive changes of indolyl-3-acetic acid oxidase activity. *Nature* 202, 88–89.
- Figier J. 1968. Localisation infrastructurale de la phosphomonoestérase acide dans la stipule de *Vicia faba* L. au niveau du nectaire. *Planta (Berl.)* 83, 60–79.
- Gahan P.B. und J. McLean. 1969. Subcellular localization and possible functions of acid β -glycerophosphatases and naphthol esterases in plant cells. *Planta (Berl.)* 89, 126–135.
- Graham R.C., U. Lundholm und M.J. Karnovsky. 1965. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. *J. Histochem. Cytochem.* 13, 150–152.
- Häuptli F. 1971. Die Sklereidendifferenzierung in *Pyrus communis*. Morphologische, anatomische und histochemische Untersuchungen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 81, 273–319.
- Harborne J.B. 1964. *Biochemistry of phenolic compounds*. Acad. Press, New York.
- Jensen W.A. 1962. *Botanical histochemistry*. W.H. Freeman & Co., San Francisco, London.
- Kobel F. 1937. *Die Kirschensorten der deutschen Schweiz*. Bern.
- Kozlowski T.T. 1971. *Growth and development of trees II*. Acad. Press, New York.
- Mia A.J. und S.M. Pathak. 1968. A histochemical study of the shoot apical meristem of *Rauwolfia* with reference to differentiation of sclereids. *Can. J. Bot.* 46, 115–120.
- Pilet P.E., P. Lavanchy und S. Sevhonkian. 1970. Interactions between peroxidases, polyphenoloxidases and auxin-oxidases. *Physiol. Plant.* 23, 800–804.
- Roberts L.W. 1969. The initiation of xylem differentiation. *Bot. Rev.* 35, 201–250.
- Sheen S.J. und J. Calvert. 1969. Studies on polyphenol content, activities and isozymes of polyphenol oxidase and peroxidase during air-curing in three tobacco types. *Plant Physiol.* 44, 199–204.
- Stösser R. 1966. *Befruchtungsbioologische und embryologische Untersuchungen bei der Süßkirsche (Prunus avium L.)*. E. Ulmer, Stuttgart.
- Van Fleet D.S. 1961. Histochemistry and function of the endodermis. *Bot. Rev.* 27, 165–220.
- Wanner H. 1952. Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. *Planta (Berl.)* 41, 190–194.
- Zenk M.H. 1966. Wachstum. *Fortschr. Bot.* 28, 89–97.

Dr. F. Häuptli
Kunzenhubel
CH-5742 Kölliken