

Phyton (Horn, Austria)	Vol. 30	Fasc. 1	173–185	29. 6. 1990
------------------------	---------	---------	---------	-------------

Cytochemische Untersuchungen an Einschlüssen in Plastiden der Blätter von *Taraxacum officinale*

Von

Manfred GAILHOFER, Thomas KÄFERBÖCK und Irmtraud THALER*)

Mit 13 Abbildungen

Eingegangen am 29. September 1989

Key words: Plastids, membrane bound inclusions, cytochemistry, *Taraxacum officinale*.

Summary

GAILHOFER M., KÄFERBÖCK Th. & THALER I. 1990. Cytochemistry of inclusions in plastids of leaves of *Taraxacum officinale*. – *Phyton* (Horn, Austria) 30 (1): 173–185, 13 figures. – German with English summary.

Epidermal plastids of leaves of *Taraxacum officinale* contain up to four amorphous membrane bound bodies connected with a poorly developed thylakoid system and in the stroma a crystalline inclusion without surrounding membrane. In mesophyll chloroplasts crystalline inclusions occur in dilated thylakoids. However membrane bound crystalline inclusions in chloroplasts disappear during development, membrane bound bodies in epidermal plastids persist.

Treatment with pepsin alters the structure of membrane bound body without complete disintegration. Both membrane bound and not membrane bound crystalline inclusions are completely digested by treatment with pepsin. 3,3-Diaminobenzidine (DAB) staining of the thylakoid space of mesophyll chloroplasts is a result of photo-oxidation, whereas staining of the membrane bound body, the thylakoid space of epidermal plastids and the membrane bound crystalline inclusion of chloroplasts is not. After treatment with a DAB-medium for catalase activity aminotriazole or sodium azid in the incubation medium do not inhibit oxidation of DAB. Only potassium cyanide inhibits oxidation of DAB. Membrane bound body, thylakoid space of epidermal plastids and membrane bound crystalline inclusion accumulate substrate independent ceriumperhydroxid after incubation in a medium for glycolate oxidase activity. DAB and CeCl_3 oxidation caused by a protein with strong oxidase activity, probably involved in electrontransfer processes, is discussed.

*) Univ.-Doz. Dr. M. GAILHOFER, Prof. Dr. I. THALER, Dr. Th. KÄFERBÖCK, Institut für Pflanzenphysiologie der Karl-Franzens-Universität Graz, Schubertstraße 51, A-8010 Graz (Austria, Europa).

Zusammenfassung

GAILHOFER M., KÄFERBÖCK Th. & THALER I. 1990. Cytochemische Untersuchungen an Einschlüssen in Plastiden der Blätter von *Taraxacum officinale*. – Phytion (Horn, Austria) 30 (1): 173–185, 13 Abbildungen. – Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

Die Epidermisplastiden der Blätter von *Taraxacum officinale* enthalten bis zu vier amorphe membranumgebene Körper, ein wenig entwickeltes Thylakoidsystem und kristalline Einschlüsse ohne umgebende Membran. In dilatierten Thylakoiden der Chloroplasten des Mesophylls treten kristalline Einschlüsse auf. Diese verschwinden während der Entwicklung der Chloroplasten, während die membranumgebenen Körper in Epidermisplastiden persistieren.

Pepsin verändert die Feinstruktur der membranumgebenen Körper ohne sie ganz aufzulösen. Membranumgebene und frei im Stroma vorkommende Kristalle werden komplett aufgelöst. Photooxidation von DAB findet nur im Thylakoidsystem der Chloroplasten im Mesophyll statt. Im membranumgebenen Körper und den damit verbundenen Thylakoiden der epidermalen Plastiden und im membranumgebenen Kristall wird DAB auch im Dunkel oxidiert. Bei Inkubation im DAB-Medium zum Nachweis von Katalaseaktivität wird die Oxidation von DAB durch Aminotriazol oder Azid nicht gehemmt. Die Oxidation von DAB war mit Kaliumcyanid hemmbar. Im membranumgebenen Körper und im damit verbundenen Thylakoidsystem und im membranumgebenen Kristall tritt nach Inkubation in einem Medium zum Nachweis von Glycolatoxidase ein substratunabhängiger Niederschlag von Cerperhydroxid auf. Im membranumgebenen Körper und im Thylakoidsystem der Epidermisplastiden sowie im membranumgebenen Kristall in Chloroplasten des Mesophylls wird ein Protein mit starker Oxidaseaktivität, der Elektronentransportprozesse vermittelt, angenommen.

Einleitung

Plastideneinschlüsse können frei oder von einer Membran umgeben im Stroma vorkommen. Ihre innere Struktur kann amorph, kristallin oder tubulär sein (Ref. THOMSON & WHATLEY 1980). Die membranumgebenen Einschlüsse treten in den meisten Plastidentypen auf; als persistierende Strukturen findet man sie in oberirdischen Organen nur in der Epidermis verschiedener Pflanzen (PLATT-ALOIA & THOMSON 1979, GAILHOFER 1983a, BOSABALIDIS 1987). Amorphe membranumgebene Körper (mKp) in den Plastiden der Epidermis ausgewachsener Laubblätter von *Taraxacum officinale* wurden von MARTIN & LARBALESTIER 1977 erstmals beschrieben. KÄFERBÖCK 1989 findet die mKp in den Plastiden der Epidermen verschiedener Organe: junger und alter Laubblätter, Keimblätter, grüner Blütenhüllblätter, Blütenstiele und in der Fruchtwand. In vielen Chloroplasten des Mesophylls junger Laubblätter wurden membranumgebene Kristalle (mKr) beobachtet.

Die chemische Zusammensetzung der membranumgebenen Einschlüsse scheint in verschiedenen Pflanzen unterschiedlich zu sein. So werden für die mKp phenolische Substanzen, Lipide, Lipoproteine und Proteine als Hauptbestandteile angegeben (FLEMION & al. 1967, GIFFORD & STEWART

1968; SRIVASTAVA & PAULSON 1968, NEWCOMB 1967, AMES & PIVORUN 1974). Aufgrund der positiven 3,3'-Diaminobenzidin-Reaktion (DAB) der mKp der Plastiden von *Nicotiana* werden Peroxidasen angenommen (HENRY 1975, HURKMAN & KENNEDY 1977). Die gleiche Reaktion geben auch die mKp der Leukoplasten von *Origanum dictamnus*. BOSABALIDIS 1987 nimmt an, daß dieses Protein mit Katalase übereinstimmt. Die Proteinbodies der Proteinoplasten in den Wurzeln von *Nicotiana* werden von VIGIL & RUDDAT 1985 für Hämprotein mit starker Oxidaseaktivität gehalten.

In der folgenden Arbeit wird zwecks näherer Identifizierung der membranumgebenen Einschlüsse der Plastiden von *Taraxacum officinale* die DAB- und Cer-Technik eingesetzt. Außerdem wird ein Abbau mit Pepsin versucht.

Material und Methode

Als Versuchspflanzen dienten im Freiland gewachsene und während der Wintermonate im Gewächshaus kultivierte Exemplare von *Taraxacum officinale* WEB. s. I.

Von jungen und ausdifferenzierten Blättern werden 0,5 bis 1 mm³ große Gewebestücke 1,5 Stunden mit 3%igem Glutardialdehyd in 0,05 M Phosphatpuffer bei pH 7,2 und Zimmertemperatur fixiert, 1 Stunde ausgewaschen und 1,5 Stunden mit 1%igem OsO₄ in 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 7,2 fixiert. Die Proben werden in einer Äthanolreihe entwässert und über Propylenoxid in Polarbed 812 eingebettet.

Die Ultradünnschnitte werden mit Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert und im Philips Elektronenmikroskop CM 10 untersucht.

Proteolytischer Abbau mit Pepsin (vgl. MONNERON & BERNHARD 1966)

Schnittbänder von Ultradünnschnitten werden in Kunststoffschlingen 30 Minuten bei 37° C mit 5%iger Perjodsäure behandelt und mit aq.bidest. gewaschen. Danach werden sie bei 37° C mit 0,5%igem Pepsin (Boehringer, Mannheim) gelöst in aq.bidest. mit 160 mg Cysteinchlorid pro 10 ml bis zu 4 Stunden inkubiert und mit aq. bidest. gewaschen. Die Schnittbänder werden auf Kupfernetzchen montiert, kontrastiert und untersucht. Als Kontrolle dient ein Ansatz ohne Enzym.

Nachweis der Katalaseaktivität nach FREDERICK & NEWCOMB 1969

Fixiert wird 1,5 Stunden mit 3%igem Glutaraldehyd in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 6,8) bei Raumtemperatur. Anschließend wird 30 Minuten im selben Puffer ausgewaschen und 1 Stunde bei einer Temperatur von 37° C inkubiert. Das Reaktionsgemisch (End pH 9,0) besteht aus: 10 mg 3,3'-Diaminobenzidin. 4HCl (Serva, Heidelberg), 5 ml 0,05 M Propandiolpuffer (2-Amino-2-Methyl-1,3-Propandiol; Fluka, Buchs) pH 10 und 0,1 ml 3%iges H₂O₂. Als Kontrollen dienen: Proben, die mit dem Reaktionsmedium ohne H₂O₂ inkubiert werden. Proben, die mit 0,01 M KCN oder mit 0,02 M 3-Amino-1,2,4-Triazol (Fluka, Buchs) oder mit 0,01 M NaN₃ gelöst in Propandiolpuffer 30 Minuten bei 37° C vorinkubiert werden. Danach werden diese Proben im Reaktionsmedium mit den entsprechenden Hemmstoffen bei 37° C inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Proben in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 6,8) ausgewaschen, 2 Stunden mit 1%igem OsO₄ in 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 6,8 fixiert, entwässert und eingebettet. Die Ultradünnschnitte werden unkontrastiert untersucht.

Photooxidation von DAB nach NIR & SELIGMAN 1970

Es werden 1 mm³ Blattstücke mit 1%igem Glutaraldehyd in 0,06 M Phosphatpuffer (pH 7,2) 1,5 Stunden bei 4° C in Dunkelheit fixiert und im gleichen Puffer gewaschen. Alle weiteren Arbeitsvorgänge werden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Proben werden nach dem Waschen 30 Minuten im Dunkeln im DAB-Medium vorinkubiert. Das DAB-Medium wird etwas verändert (GAILHOFER 1983b) und enthält 1 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidin. 4HCl, 0,1 mM 3-(3,4 Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (Serva, Heidelberg) 1 mM NaN₃ gelöst in Phosphatpuffer (pH 7,2). Inkubiert wird eine Stunde bei einer Lichtintensität von 7000 Lux oder bei Dunkelheit. Nach der Inkubation werden alle Versuchsansätze im Dunkeln gründlich mit Puffer gewaschen. Anschließend wird mit 1%igem OsO₄ in Phosphatpuffer (pH 7,2) nachfixiert, entwässert und in Polarbed 812 eingebettet. Die Ultradünnschnitte werden unkontrastiert beobachtet.

Nachweis der Glycolatoxidase (vgl. KAUSCH & al. 1983)

Es werden ca. 1 mm³ große Gewebestückchen von Blättern 7 Minuten mit 3%igem Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 7,2 und Raumtemperatur fixiert. Die Proben werden im selben Puffer ausgewaschen und 20 Minuten in 0,1 M Tris-Maleatpuffer bei pH 7,5, 0,05 M Aminotriazol und 0,005 M CeCl₃·7H₂O (Merck, Darmstadt) vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wird 15 Stunden im oben beschriebenen Medium, das zusätzlich 0,05 M Glycolat (Glycolsäure-Natriumsalz; Baker, Phillipsburg) als Substrat enthält, in einer CO₂-freien Atmosphäre bei Zimmertemperatur inkubiert. Es wird in Phosphatpuffer ausgewaschen und 1,5 Stunden mit 1%igem OsO₄ im 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 7,2 fixiert, entwässert und eingebettet in Polarbed 812. Als Kontrolle dienten Gewebeproben, die im Reaktionsmedium ohne Glycolat inkubiert werden.

Abkürzungen: mKp = membranumgebener Körper, mKr = membranumgebener Kristall.

Ergebnisse

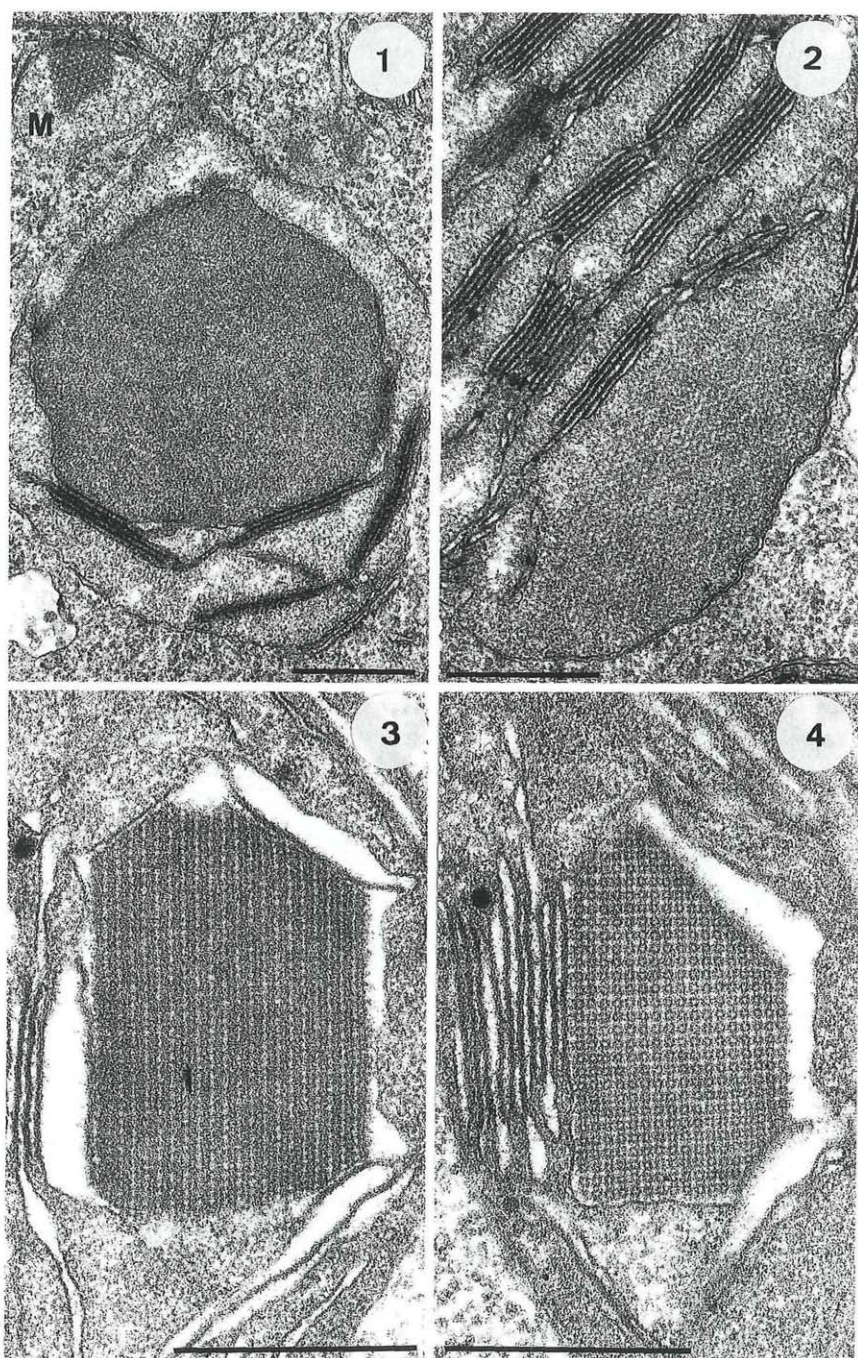
Die Plastiden der Epidermen oberirdischer Organe von *Taraxacum officinale* besitzen ein mäßig entwickeltes Thylakoidsystem, ein bis vier mKp und meist ein bis zwei frei im Stroma liegende Kristalle. Die mKp haben einen Durchmesser von 0,2–2,2 µm. Sie können schon vor der Bildung eines Prolamellarkörpers auftreten. Die Tubuli dieses Körpers stehen mit der Membran des mKp häufig in Verbindung. In den ausdifferenzierten Plastiden erscheint der mKp als ein dilatiertes Thylakoid dem mehrere Thylakoide anliegen (Abb. 1). Der Thylakoidraum und der Inhalt des mKp

Abb. 1–13. Laubblatt von *Taraxacum officinale*; Maßstab entspricht 0,5 µm.

Abb. 1. Epidermis; Plastide mit membranumgebenem Körper und anliegenden Thylakoiden. M = Microbody.

Abb. 2. Schwammparenchym; Chloroplast mit frei im Stroma liegendem Kristall.

Abb. 3, 4. Palisadenparenchym; Chloroplasten mit membranumgebenen Kristallen, die Kristalle sind in verschiedenen Schnittrichtungen getroffen.



besitzen meist dieselbe Struktur und elektronenoptische Dichte. In jungen Plastiden sind sie elektronendicht im ausdifferenzierten Zustand werden sie transparenter; der Inhalt ist immer granulär.

Viele Plastiden der Epidermis junger und ausdifferenzierter Laubblätter enthalten jeweils einen frei im Stroma liegenden Kristall. Er tritt meist mit einem mKp auf und ist auch gemeinsam mit dem Prolamellarkörper in sehr jungen Epidermen zu beobachten. Die gleichen Kristalle treten auch in vielen Chloroplasten des Mesophylls junger wie ausdifferenzierter Laubblätter auf (Abb. 2). Die Gestalt des Kristalls ist im Schnitt annähernd rhombisch oder rechteckig ohne deutliche Abgrenzung zum Stroma. Er liegt meist an der Peripherie der Plastide. Die Länge beträgt ca. 0,2–0,8 μm , die Breite ca. 0,3–0,9 μm . Der Kristall besteht aus gitterartig überkreuzten Linien, die ca. 7 nm breit sind und einen Abstand von ca. 11 nm besitzen.

In Chloroplasten des Mesophylls von Keimblättern und junger Laubblätter treten mKr auf. Diese und die frei im Stroma vorkommenden wurden nicht gemeinsam in eine Plastide beobachtet.

Der mKr liegt im Thylakoidraum und an seiner Membran grenzen Thylakoidstapel an (Abb. 4). Die durchschnittliche Größe der mKr beträgt ca. 0,1–0,8 μm . Die ihm umgebende Membran liegt entweder eng an oder kann auch deutlich abgehoben sein (Abb. 3, 4). Je nach Orientierung des Präparates erscheint der Kristall als Quadrat, Rechteck oder Sechseck. Es lassen sich folgende Strukturen erkennen: 20 nm breite parallelliegende Linien, der Abstand von Mittelpunkt der Linien bis zum Mittelpunkt der nächsten beträgt 26 nm (Abb. 3), kubisch angeordnete tubuliähnliche Elemente ($\varnothing$ = ca. 20 nm), deren Mittelpunktabstand 26 nm beträgt (Abb. 4). Der proteolytische Abbau wurde mit Pepsin an Ultradünnschnitten durchgeführt. Nach der Behandlung mit Perjodsäure sind die Einschlüsse gut erkennbar, nur das Thylakoidsystem ist gebleicht. Nach einstündiger Behandlung mit Pepsin ist der mKr ebenso aufgelöst wie alle Membranen des Thylakoidsystems (Abb. 5). Der frei im Stroma liegende Kristall ist nach einer Stunde Inkubationszeit teilweise angegriffen (Abb. 6) und nach zwei

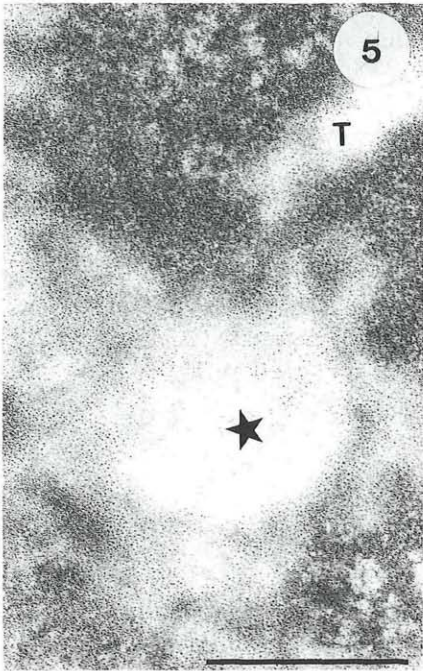
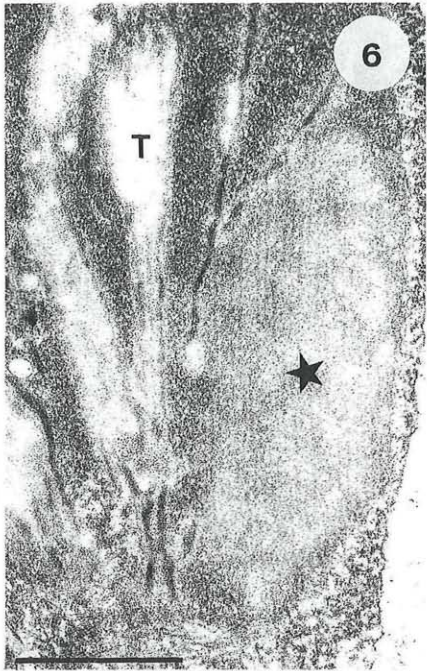
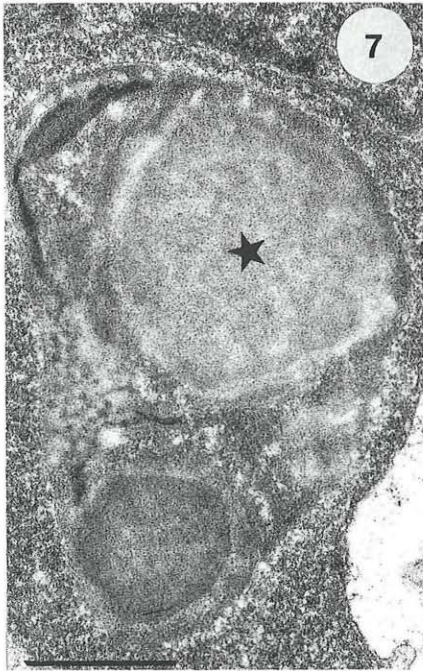
Abb. 5, 6, 7. Abbau mit Pepsin.

Abb. 5. Palisadenparenchym; Chloroplast, membranumgebener Kristall (★) und Thylakoidsystem (T) aufgelöst.

Abb. 6. Epidermis; Plastide, der frei im Stroma liegende Kristall (★) und das Thylakoidsystem (T) sind unvollständig abgebaut.

Abb. 7. Epidermis; Plastide mit zwei membranumgebenen Körpern, nur einer (★) ist in der Struktur deutlich verändert. Der Inhalt des Thylakoidsystems ist zum Teil unverändert.

Abb. 8. DAB-Reaktion nach FREDERICK & NEWCOMB, Epidermis; Plastide, oxidiertes DAB im membranumgebenen Körper und im Thylakoidraum.



Stunden ebenso wie die Kristalle der Microbodies zur Gänze abgebaut. Der Inhalt der mKp erscheint nach zweistündiger Inkubation sehr unterschiedlich. So kann in einer Plastide der eine mKp eine deutliche Strukturänderung zeigen, während der andere kaum angegriffen ist. Auch der Inhalt des Thylakoidraumes erscheint teilweise aufgelöst (Abb. 7). Ein vollständiger Abbau ist auch nach längerer Enzymeinwirkung nicht festzustellen. Nach zweistündiger Inkubation im Kontrollmedium ohne Enzym sind die Hüll- und die Thylakoidmembranen unspezifisch aufgelöst, nur die Einschlüsse waren gut erkennbar.

Nach der Inkubation im DAB-Medium nach FREDERICK & NEWCOMB 1969 zeigen Microbodies Aktivität von Katalase. Das elektronendichte Reaktionsprodukt tritt im mKp, im Thylakoidraum der Plastiden in der Epidermis, sowie im mKr der Chloroplasten im Mesophyll auf (Abb. 8, 9). Die Reaktion wird durch Zugabe von Aminotriazol oder Natriumazid zum Inkubationsmedium nicht beeinträchtigt. Auch im Inkubationsmedium ohne H_2O_2 ist die Reaktion positiv. Nur nach Inkubation im DAB-Medium mit KCN tritt kein Reaktionsprodukt auf. Im DAB-Medium nach NIR & SELIGMAN 1970 tritt das Oxidationsprodukt als Folge von Photooxidation nur bei Licht im Thylakoidraum der Chloroplasten der Mesophyllzellen auf. Sowohl nach Inkubation im Licht als auch im Dunkeln wird DAB im mKp, im Thylakoidraum der Epidermis-Plastiden (Abb. 10) und im mKr der Chloroplasten des Mesophylls oxidiert. Das Oxidationsprodukt tritt unabhängig von der Belichtung auch im Thylakoidraum der Chloroplasten der ausdifferenzierten Schließzellen auf, in diesen wird kein mKp beobachtet (Abb. 11).

Beim Nachweis der Glycolatoxidase in Microbodies mit Hilfe der Cer-Technik fällt auf, daß Cerperhydroxid auch im mKp und den damit verbundenen Thylakoiden, sowie im mKr und geringfügig im Thylakoidsystem der Chloroplasten lokalisiert ist (Abb. 12, 13). Der Niederschlag tritt auch nach Behandlung im Kontrollmedium, das nur $CeCl_3$ und Aminotriazol jedoch kein Substrat enthält, auf.

Abb. 9. DAB-Reaktion nach FREDERICK & NEWCOMB, Palisadenparenchym; Plastide, oxidiertes DAB am membranumgebenen Kristall.

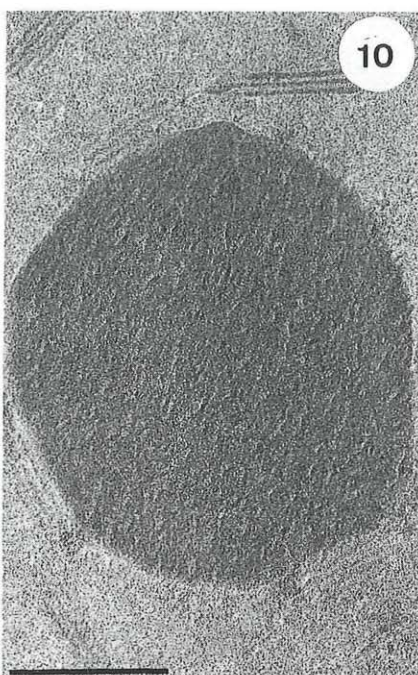
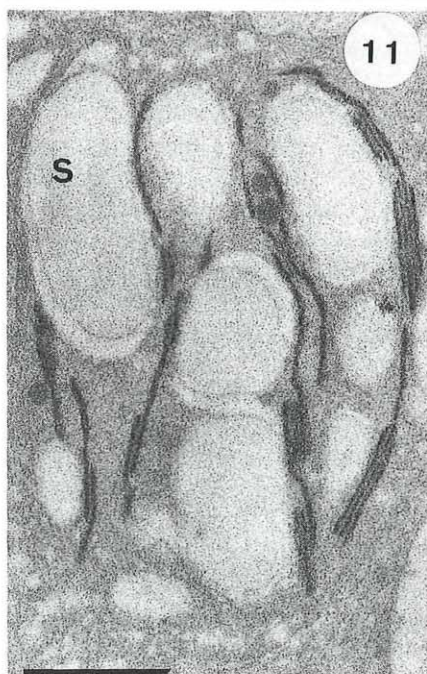
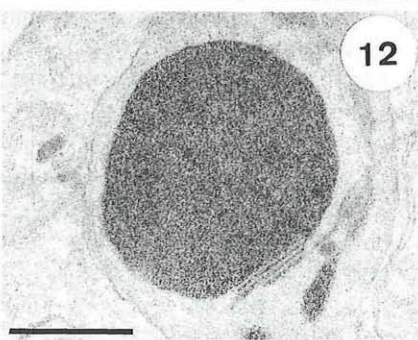
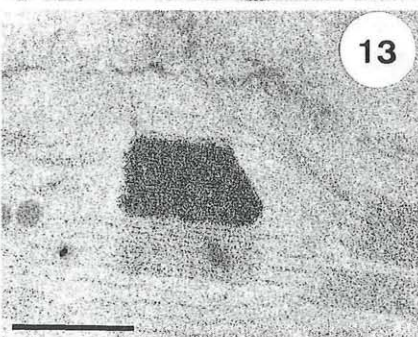
Abb. 10, 11. DAB-Reaktion nach NIR & SELIGMAN.

Abb. 10. Epidermis; Plastide, oxidiertes DAB im membranumgebenen Körper und im Thylakoidraum, nach Inkubation im Dunkeln.

Abb. 11. Schließzelle; Plastide, oxidiertes DAB im Thylakoidraum, nach Inkubation im Dunkeln. S = Stärke.

Abb. 12. Epidermis; Plastide, Cerperhydroxid-Niederschlag im membranumgebenen Körper und im Thylakoidraum.

Abb. 13. Palisadenparenchym; Chloroplast, Cerperhydroxid-Niederschlag im membranumgebenen Kristall und im geringen Ausmaß im Thylakoidraum.



Diskussion

In den Plastiden der Epidermis junger Blätter von *Taraxacum officinale* kommen mKp schon vor der Bildung eines Prolamellarkörpers vor. Dies wird auch für die Plastiden von *Ranunculus bulbosus* angegeben (GAILHOFER 1983a). Im ausdifferenzierten Zustand der Plastide ist der mKp von *Taraxacum* ohne Zweifel ein Teil des Thylakoidsystems, wie dies bereits von MARTIN & LARBALESTIER 1977 beschrieben wurde. Eine Veränderung dieser Körper im Laufe der Entwicklung wurde nicht festgestellt, sie scheinen eine persistente Struktur zu sein.

In jungen Chloroplasten des Mesophylls treten neben dem Prolamellarkörper bereits kleine mKr auf. Man erkennt deutlich ihre Lage innerhalb eines erweiterten Thylakoids. In ausdifferenzierten Chloroplasten werden sie nicht mehr gefunden. Die mKr in jungen Chloroplasten verschiedener Palmen werden ebenfalls während der Differenzierung aufgelöst (GAILHOFER & THALER 1974). Eine Umwandlung von mKp in einem mKr, wie es in *Sesamum indicum* von PLATT-ALOIA & THOMSON 1977 beschrieben wird, scheint bei *Taraxacum* nicht vorzukommen; es treten in einem erweiterten Thylakoid nie amorphe und kristalline Bereiche gemeinsam auf.

Allgemein bestehen die mKr aus globulären Untereinheiten, während die von *Taraxacum* aus 20 nm breiten tubulähnlichen Strukturen aufgebaut sind. Die frei im Stroma liegenden Kristalle kommen in den Plastiden der Epidermis und den Chloroplasten des Mesophylls von Blättern vor. Diese Kristalle bestehen aus globulären Untereinheiten und sind den Kristallen des Fraktion I-Proteins ähnlich, das durch Behandlung mit hypertoner Mannitlösung induziert wird (TAKEBE & al. 1973. WRISCHER 1973, GAILHOFER & THALER 1978).

Die Proteolyse der drei verschiedenen Plastideneinschlüsse mit Pepsin erbrachte unterschiedliche Ergebnisse. Die frei im Stroma liegenden Kristalle und die mKr lassen sich nach 1–2 stündiger Behandlung mit Pepsin vollständig abbauen. WRISCHER 1967 gibt für frei liegende Stromakristalle der Plastiden von *Phaseolus* ebenfalls einen Abbau mit Pepsin an, während eine Behandlung mit Trypsin unwirksam bleibt. Die mKr in den Chloroplasten von *Viscaria* lassen sich mit Trypsin abbauen (TSEKOS & SCHNEPF 1974). Ein Pepsinabbau der mKr in den Plastiden verschiedener Palmen beobachten THALER & GAILHOFER 1974.

Die mKp von *Taraxacum* werden durch Pepsin deutlich in der Struktur verändert, sie werden aber nicht ganz abgebaut. Die mKp der Plastiden von *Nicotiana tabacum* werden nur durch Pepsin verändert, Pronase, Protease, Papain und Trypsin bleiben wirkungslos (AMES & PIVORUN 1974). Die mKp in den Plastiden der Milchröhren von *Papaver somniferum* lassen sich weder mit Pepsin noch mit Chymotrypsin abbauen (NESSLER & MAHLBERG 1979), die mKp der Plastiden von *Ranunculus bulbosus* werden mit Pepsin und Pronase nicht verändert (GAILHOFER 1983a). Der mKp von *Origanum*

hingegen verschwindet nach Pepsin-Behandlung vollständig (BOSABALIDIS 1987). In mKp verschiedener Pflanzen scheinen unterschiedliche Substanzen gespeichert zu werden. Der frei im Stroma liegende und der mKr in *Taraxacum officinale* sind durch Pepsin abbaubar, sie bestehen wohl aus Protein. Beim mKp hingegen muß außer Protein eine gegen Pepsinabbau sensitive Komponente angenommen werden.

Im Medium nach NIR & SELIGMAN 1970 findet Photooxidation von DAB im Thylakoidraum der Chloroplasten aus dem Mesophyll statt. Nach Inkubation im Licht oder Dunkel findet sich oxidiertes DAB am mKr der Chloroplasten aus dem Mesophyll, im mKp und im Thylakoidsystem der Plastiden der Epidermis sowie im Thylakoidraum der Chloroplasten in den Schließzellen. Das Inkubationsmedium enthielt Azid und kein H_2O_2 . Oxidation von DAB durch Aktivität von Peroxidase wird daher nicht angenommen. Oxidation von DAB im mKp und dem damit verbundenen Thylakoidsystem, und am mKk tritt im Medium nach FREDERICK & NEWCOMB 1969 auch dann auf, wenn dem Inkubationsgemisch Aminotriazol oder Azid zugefügt wurde, oder wenn ohne Zusatz von H_2O_2 inkubiert wurde. Daher wird Aktivität von Katalase in diesen Kompartimenten ausgeschlossen. Oxidation von DAB konnte in diesen Kompartimenten nur nach Zugabe von KCN zum Inkubationsmedium gehemmt werden. BOSABALIDES 1987 erhält nach der Methode von FREDERICK & NEWCOMB oxidiertes DAB im mKp der Leukoplasten von *Origanum* und schließt, ohne Kontrollen durchzuführen, auf Aktivität von Katalase. HENRY 1975, HURKMAN & KENNEDY 1977 finden oxidiertes DAB in mKp der Chloroplasten der Trennungszone von Blütenstielen und der Blätter von *Nicotiana*, VIGIL & RUDDAT 1985 in Proteinkörper der Leukoplasten von *Nicotiana*-Wurzeln. HENRY nimmt Aktivität von Peroxidase in mKp und Photooxidation in den Thylakoiden an, HURKMAN & KENNEDY vermuten ein hämenthaltendes Protein, wahrscheinlich Peroxidase im mKp und in den anliegenden Thylakoiden. VIGIL & RUDDAT 1985 nehmen Hämproteine mit starker Oxidaseaktivität, nicht aber Peroxidase, in den Proteinkörpern der Leukoplasten an. Beim Nachweis der Glycolatoxidase mit CeCl_3 in Microbodies wird auch im mKp, den anliegenden Thylakoiden und dem mKr in den Chloroplasten oxidiertes Cer lokalisiert. Dieser Niederschlag tritt auch in Kontrollmedien auf, die nur CeCl_3 und Aminotriazol, jedoch kein Substrat enthalten. KAUSCH & al. 1983 führen den substratunabhängigen Cer-Niederschlag im Thylakoidraum auf die Wirkung von endogenem H_2O_2 zurück. Superoxidradikale oder H_2O_2 entstehen im Thylakoidsystem während der Photosynthese durch Reduktion von Sauerstoff durch die Elektronentransportkette (EGNEUS & al. 1975).

Im mKp und dem angeschlossenen Thylakoidsystem und im mKr der Chloroplasten wird zumindest DAB auch im Dunkel oxidiert, photosynthetische Aktivität kann daher nicht angenommen werden. Die Oxidation von DAB und CeCl_3 wird durch ein Protein verursacht, der mKr, der das Reaktionsprodukt zeigt, wird durch Pepsin vollständig aufgelöst, beim mKp

die Eiweißkomponente. Es wird ein Protein mit starker Oxidaseaktivität angenommen. Die Oxidation findet sowohl im erweiterten als auch im nicht erweiterten Thylakoidraum und nie im Stroma statt. Der mKr verschwindet bei der Chloroplastendifferenzierung, kristallisiertes Protein kann daher als Speicherstoff betrachtet werden, eine Vorstufe einer in der Elektronentransportkette aktiven Substanz wird nicht ausgeschlossen.

Herrn Ing. G. GRAGGABER sei für technische Assistenz herzlich gedankt.

Literatur

- AMES I. H. & PIVORUN J. P. 1974. A cytochemical investigation of a chloroplast inclusion. – Amer. J. Bot. 61: 794–797.
- BOASSON R., LAETSCH W. M. & PRICE I. 1972. The etioplast-chloroplast transformation in tobacco: Correlation of ultrastructure, replication, and chlorophyll synthesis. – Amer. J. Bot. 59: 217–223.
- BOSABALIDIS A. M. 1987. Origin, differentiation and cytochemistry of membrane-limited inclusion bodies in leucoplasts of leaf epidermal cells of *Origanum dictamnus* L. – Cytobios 50: 77–88.
- EGNEUS H., HEBER U., MATTHIESEN U. & KIRK M. 1975. Reduction of oxygen by the electron transport chain of chloroplasts during assimilation of carbon dioxide. – Biochim. Biophys. Acta 408: 252–268.
- FLEMION F., DENGLE R. E., DENGLE N. G. & STEWART K. D. 1967. Ultrastructure of the shoot apices and leaves of normal and physiologically dwarfed peach seedlings. I. Plastid development. – Contr. Boyce Thompson Inst. Plant Res. 23: 331–334.
- FREDERICK S. E. & NEWCOMB E. H. 1969. Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes). – J. Cell Biol. 43: 343–353.
- GAILHOFER M. 1983a. Die Feinstruktur der Plastideneinschlüsse von *Ranunculus bulbosus*. – Phytol. (Horn, Austria) 23: 197–210.
- 1983b. Die Lokalisation von 3,3'-Diaminobenzidin in Plastiden von *Ranunculus bulbosus*. – Phytol. (Horn, Austria) 23: 211–219.
- GAILHOFER M. & THALER I. 1974. Eiweißkristalle in den Plastiden der Keimpflanzen einiger Palmen. – Phytol. (Horn, Austria) 15: 251–258.
- & — 1978. „Stromazentrum“ in Leukoplasten der Epidermis von *Asphodelus microcarpus*. – Phytol. (Horn, Austria) 19: 97–102.
- GIFFORD E. M. jr. & STEWART K. D. 1968. Inclusions of the proplastids and vacuoles in the shoot apices of *Bryophyllum* and *Kalanchoe*. – Amer. J. Bot. 55: 269–279.
- HENRY E. W. 1975. Peroxidase in tobacco abscission zone tissue. – J. Ultrastruct. Res. 52: 289–299.
- HURKMAN W. J. & KENNEDY G. S. 1977. Development and cytochemistry of the thylakoidal body in tobacco chloroplasts. – Amer. J. Bot. 64: 86–95.
- KAUSCH A. P., WAGNER B. L. & HORNER H. T. 1983. Use of the cerium chloride technique and energy dispersive x-ray microanalysis in plant peroxisome identification. – Protoplasma 118: 1–9.
- KÄFERBÖCK Th. 1989. Ultrastrukturelle und cytochemische Untersuchungen an Microbodies und Plastiden von *Taraxacum officinale*. – Diss. Univ. Graz.

- MARTIN E. S. & LARBALESTIER G. 1977. A membrane-bound plastid inclusion in the epidermis of leaves of *Taraxacum officinale*. – Can. J. Bot. 55: 222–225.
- MONNERON A. & BERNHARD W. 1966. Action de certaines enzymes sur des tissus inclus en epon. – J. Microscop. 5: 697–714.
- NESSLER C. L. & MAHLBERG P. G. 1979. Plastids in laticifers of *Papaver*. I. Development and cytochemistry of laticifer plastids in *P. somniferum* L. (*Papaveraceae*). – Amer. J. Bot. 66: 266–273.
- NEWCOMB E. H. 1967. Fine structure of protein-storing plastids in bean root tips. – J. Cell Biol. 33: 143–163.
- NIR I. & SELIGMAN A. M. 1970. Photooxidation of diaminobenzidine (DAB) by chloroplast lamellae. – J. Cell Biol. 46: 617–620.
- PLATT-ALOIA K. A. & THOMSON W. W. 1977. Chloroplast development in young sesame plants. – New Phytol. 78: 599–605.
- & — 1979. Membrane bound inclusions in epidermal plastids of developing sesame leaves and cotyledons. – New Phytol. 83: 793–799.
- SRIVASTAVA L. M. & PAULSON R. E. 1968. The fine structure of the embryo of *Lactuca sativa*. II. Changes during germination. – Can. J. Bot. 46: 1447–1453.
- TAKEBE I., OTSUKI Y., HONDA Y., NISHIO T. & MATSUI C. 1973. Fine structure of isolated mesophyll protoplasts of tobacco. – Planta 113: 21–27.
- THOMSON W. W. & WHATLEY J. M. 1980. Development of nongreen plastids. – Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 375–394.
- TSEKOS I. & SCHNEPF E. 1974. Der Feinbau der Drüsen der Pechnelke *Viscaria vulgaris*. – Biochem. Physiol. Pflanzen 165: 265–270.
- VIGIL E. L. & RUDDAT M. 1985. Development and enzyme activity of protein bodies in proteinoplasts of tobacco root cells. – Histochemistry 83: 17–27.
- WRISCHER M. 1967. Kristalloide im Plastidenstroma. – Planta 75: 309–318.
- 1973. Protein crystalloids in the stroma of bean plastids. – Protoplasma 77: 141–150.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1990

Band/Volume: [30_1](#)

Autor(en)/Author(s): Gailhofer Manfred Karl, Käferböck Thomas, Thaler Irmtraud

Artikel/Article: [Cytochemische Untersuchungen an verschiedenen Einschlüssen in den Plastiden der Blätter von Taraxacum officinale. 173-185](#)