

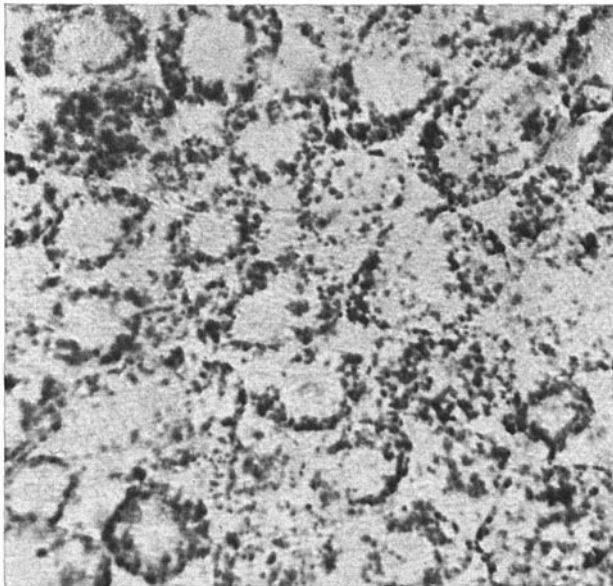
PRO EXPERIMENTIS

Histochemical Demonstration of Succinic Dehydrogenase in Cryostat Sections of Fresh-Frozen Plant Tissues

Succinic dehydrogenase (SDH), an important enzyme of the citric acid cycle, catalyzes the dehydrogenation of succinate to fumarate. Intracellularly the enzyme is localized in the mitochondria; this was shown on plants both biochemically, by the isolation of the enzyme from mitochondria¹, and electron microscopically².

ROBERTS et al.³ investigated the SDH histochemically in cryostat sections of plant tissues. Freezing inactivated the enzyme. The activity could be restored by phenazine methosulphate (PMS) if cryostat sections were prepared only after the histochemical demonstration of SDH in unsectioned tissue blocks. We tried to reproduce the results of ROBERTS and compared them with our earlier investigations⁴.

Pieces of unfixed root meristems were embedded in fresh animal tissue as a supporting medium, frozen with CO₂, and sectioned in a cryostat at -17°C (14–16 µ)⁴. Similarly to ROBERTS, we used a modified tetrazolium salt method according to NACHLAS et al.^{5,6} to show SDH activity. Sections were incubated in the substrate at 37°C for 1 h with the tetrazolium salt tetra-nitro-BT (TNBT)⁷.



Intracellular localization of succinic dehydrogenase in the mitochondria without addition of phenazine methosulphate to the incubation medium (cryostat section through the root meristem of *Zea mays*). × 650.

Without PMS in the incubation medium, the SDH is localized in the mitochondria (Figure). The intensity of staining is greatly enhanced by PMS. Moreover, a diffuse staining appears in cytoplasm. HASHIMOTO et al.⁸ achieved similar results with animal material. These authors have suggested that the mitochondria are damaged during histochemical procedure, then a hydrogen-carrier is released and reduces PMS, resulting in unspecific formation of formazan in the cytoplasm. Therefore, one has to add PMS only by weak enzyme activities. In this case, a short incubation time must be allowed to avoid unspecific staining in the cytoplasm. Furthermore, it must be mentioned that an exact localization of SDH is only possible with the tetrazolium salt TNBT.

ROBERTS incubated his sections at 20°C. Warmth gives the activation energy for the enzyme reaction. The optimal temperature for SDH activity is about 37°C; therefore ROBERTS was able to demonstrate weak activities of SDH at 20°C only by adding PMS to the substrate.

It follows that the SDH is not inactivated by freezing, its activity is only diminished. PMS works as a mediator or hydrogen-carrier for the transfer of hydrogen to the tetrazolium. Reduced PMS reduces TNBT directly and not enzymatically.

The cryostat technique for fresh plant tissues⁴ guarantees an exact localization of SDH in the mitochondria and is very suitable for the demonstration of other dehydrogenases and the aliesterase⁴, and also for the acid phosphatase⁹.

Zusammenfassung. Die Bernsteinsäuredehydrogenase in Pflanzen ist histochemisch in den Mitochondrien nachweisbar. Die Darstellung sehr schwacher Enzymaktivitäten gelingt unter Zusatz von Phenazinmethosulfat. Dieses wirkt als Wasserstoffträger für die H₂-Übertragung auf das Tetrazolsalz.

A. LÄUCHLI

Botanical Institute, University of Basel (Switzerland),
2nd November 1966.

¹ A. J. HIATT, Pl. Physiol., Lancaster 35, Suppl. xi (1960).

² C. J. AVERS and M. M. TKAL, J. Histochem. Cytochem. 11, 157 (1963).

³ L. W. ROBERTS, S. BABA and K. URBAN, Pl. Cell Physiol., Tokyo 7, 177 (1966).

⁴ A. LÄUCHLI, Planta 70, 13 (1966).

⁵ M. M. NACHLAS, K. C. TSO, E. DE SOUZA, C. S. CHENG and A. M. SELIGMAN, J. Histochem. Cytochem. 5, 420 (1957).

⁶ A. G. E. PEARSE, *Histochemistry, Theoretical and Applied*, 2nd Edn (J. and A. Churchill, London 1960).

⁷ W. MEIER-RUGE, Histochemie 4, 438 (1965).

⁸ T. HASHIMOTO, J. S. KALUZA and M. S. BURSTONE, J. Histochem. Cytochem. 12, 797 (1964).

⁹ A. LÄUCHLI, Naturwissenschaften 53, 533 (1966).

Die Probeentnahme in kinetischen Stoffwechseluntersuchungen mit Wasserlinsen *Lemna minor* L. (Lemnaceen)

Auf die Vorzüge der Lemnaceen als Laborpflanzen wurde bereits mehrfach hingewiesen¹⁻⁴. Über ihre Ver-

wendung in Gaswechsel- und Photosyntheseuntersuchungen werden wir an anderer Stelle berichten. Als besonders geeignetes Versuchsmaterial für kinetische Stoffwechseluntersuchungen nehmen diese kleinsten der Angiospermen wegen der raschen vegetativen Vermehrung und der leicht erzielbaren genetischen und physiologischen Homo-

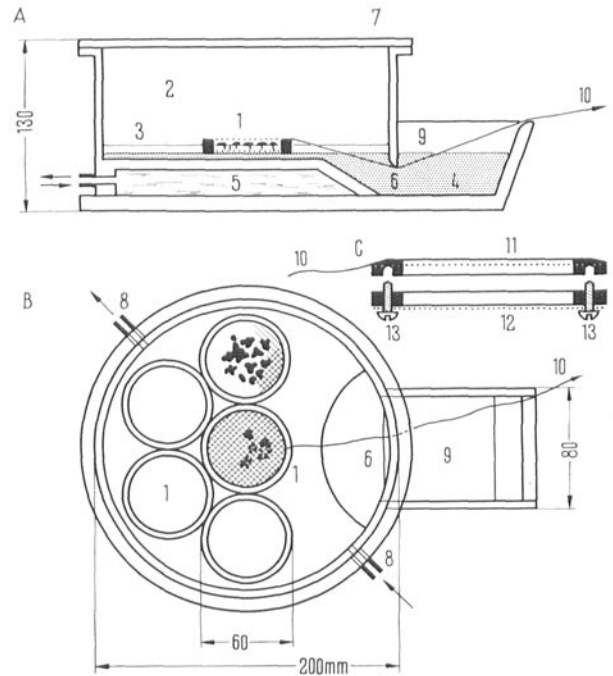
genität⁵ eine hervorragende Stellung unter den höhern Pflanzen ein. Ein spezielles Problem stellt jedoch die Probeentnahme aus einem geschlossenen System dar. Das gilt vor allem für Experimente in $C^{14}O_2$ -Atmosphäre.

Wir berichten hier über eine einfache Lösung für eine kleine Anzahl von Proben, die sich für C^{14} -Einbauversuche in einem geschlossenen Gas- und/oder Nährlösungskreislauf eignet. Das Prinzip der Methode lässt sich wie folgt beschreiben (siehe Figur): Die Wasserlinsen werden in niedrige Zylinder (Ringe aus Kunststoff) (1) gebracht, welche oben und unten mit einem feinen Netz bespannt sind (11, 12) und bis zur halben Höhe in die Nährlösung (3) eintauchen. So können sich die Glieder frei auf der Wasseroberfläche ausbreiten. Mehrere solche Ringe befinden sich in einer zylindrischen Kammer aus Plexiglas (2), deren Boden mit Quecksilber (4) bedeckt ist. Letzteres verschliesst eine der Ringgrösse angepasste Öffnung in der Zylinderwand (6) und sperrt den Durchgang zu einem kleinen auf der Kammeraußenseite angebrachten offenen Trog (9). Die Ringe mit den Wasserlinsen lassen sich nun leicht und rasch an einem Nylonfaden (10) durch die Sperrflüssigkeit hindurch aus der Kammer herausziehen, ohne dass Verluste an Gas oder Nährlösung befürchtet werden müssen. Das Versuchsmaterial lässt sich augenblicklich inaktivieren oder abtöten, indem man den Ring weiter über die Kante des Troges herauszieht und in flüssigen Stickstoff bzw. heissen Methylalkohol fallen lässt. So kann eine Wasserlinsenkultur ohne Schwierigkeiten portionenweise aus der stets geschlossenen Kulturkammer in das Inaktivierungsmittel gebracht werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass innerhalb der Beobachtungsperiode von 48 h Wachstum und Gaswechsel der *Lemna minor* L. durch das Quecksilber nicht verändert werden.

Nachfolgend beschreiben wir einige Einzelheiten einer nach diesem Prinzip gebauten Einrichtung. Die Ringe (Plexiglas, Aussendurchmesser 60 mm, Innendurchmesser 48 mm, Dicke 7 mm) bestehen aus zwei Hälften, Boden (12) und Deckel (11), die durch Nylonschrauben mit den Köpfen nach unten (13) zusammengehalten werden. Als Netz dient ein äusserst feines Haarnetz (Maschenweite ca. 2,5 mm). Die Oberseite des Ringes ist so gestaltet, dass sich dieser trotz dem starken Auftrieb im Quecksilber ohne Mühe durch die Öffnung ziehen lässt. Ein doppelter Kammerboden mit trichterförmiger Abschrägung gegen die Öffnung hin, wie ihn die Figur zeigt, verkleinert die Menge des notwendigen Quecksilbers. Der Hohlraum (5) wird mit einem Zirkulationsthermostaten verbunden und dient als Wasserbad zur Aufrechterhaltung der Temperatur im Innern der Kammer. Zum Einlegen der Ringe wird der Plexiglas-Deckel (7) abgeschraubt.

In Photosyntheseexperimenten belichtet man von oben. Eine Erhöhung der Temperatur muss jedoch verhindert werden durch Einbringen von geeigneten Wärmefiltern zwischen Lampe und Kammer. Mit den seitlichen Anschlüssen (8) wird die Kammer an einen Gaskreislauf mit Membranpumpe und Instrumenten zur Messung der Radioaktivität und der CO_2 - und O_2 -Spannung angeschlossen. Sie besitzt ausserdem Anschlüsse zur Erneuerung der Nährlösung oder zur Erzeugung eines Nährlösungskreislaufes mit Einrichtungen zur pH-Registrierung oder -Stabilisierung. Die Übertragungszeit u eines Ringes von der Kammer ins Aktivierungsmittel wurde mit 0,5 sec $< u < 1$ sec ermittelt. Ein mit *Lemna minor* maximal beladenes Netz enthält ca. 0,35 g Frischmaterial, entsprechend ca. 30 mg Trockengewicht. Bei 30000 Lux Beleuchtungsstärke wurde eine CO_2 -Fixierungsrate von 0,05 $\mu M/min$, bei 5000 Lux eine solche von 0,018 $\mu M/min$ je mg Trockengewicht gemessen. Da die Verdoppelungs-

zeit dieser *Lemna*-Species bei 5000 Lux, 28°C und 0,03% CO_2 40–48 h beträgt, muss die Wachstumsrate bei Versuchen von mehreren Stunden Dauer mitberücksichtigt werden⁶.



Kulturkammer für Lemnaceen mit Schleuse zur Probeentnahme. A, Aufriss; B, Aufsicht; C, Schnitt durch den Ring. (1) Kunststoff-ring, beidseitig mit feinem Netz bespannt, die Lemnaceenglieder enthaltend; (2) zylindrische Kammer aus Plexiglas; (3) Nährlösung; (4) Quecksilber als Sperrflüssigkeit; (5) Thermostat; (6) Öffnung in der Kammerwand (Schleuse); (7) Kammerdeckel aus Plexiglas; (8) Anschlüsse an den Belüftungskreislauf; (9) Trog; (10) Nylonfaden, mittels welchem die Ringe herausgezogen werden; (11) obere Hälfte des Ringes mit Haarnetz und abgerundeten Kanten; (12) untere Hälfte des Ringes mit Netz; (13) Nylonschrauben.

Summary. A suitable sample technique for duckweed (Lemnaceae) in kinetic studies of photosynthesis or other metabolic processes is described. It enables one to remove plants from a culture chamber in a closed gas and/or nutrient solution circuit without disturbing the system.

K. H. ERISMANN und CH. BRUNOLD

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern (Schweiz), 17. Oktober 1966.

- ¹ R. A. STEINBERG, J. agric. Res. 62, 423 (1941); Chronica bot. 7, 420 (1943).
- ² E. LANDOLT, Ber. schweiz. bot. Ges. 67, 271 (1957).
- ³ W. S. HILLMAN, Bot. Rev. 27, 221 (1961).
- ⁴ R. KANDELER, Ber. phys.-med. Ges. Würzb. 70, 81 (1960–61).
- ⁵ K. H. ERISMANN, in Vorbereitung.
- ⁶ Die Apparate wurden von Herrn H. LÄUFFER gebaut; für die sorgfältige Arbeit sind wir ihm zu Dank verpflichtet.