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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 81 (1971)

Artikel: Histochemische Muster beim Blattfall

Autor: Hagemann, Peter

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-57129

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: 02.10.2025

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

Ber. Schweiz. Bot. Ges. *81*, 97–138 (1971)

Histochemische Muster beim Blattfall

Von *Peter Hagemann*

Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich

Manuskript eingegangen am 10. November 1970

Inhalt

	Seite
1. Einleitung	97
2. Material und Methoden	98
3. Untersuchungen an *Coleus Blumei*	101
4. Versuche an weiteren Objekten	116
5. Diskussion	121
6. Zusammenfassung	128
7. Summary	128
8. Literatur	136

1 Einleitung

Für praktisch alle Pflanzenorgane ist eine gelegentliche und/oder periodische Abtrennung beobachtet worden. Dieser Vorgang kann natürlicherweise oder pathologisch erfolgen. Seine Bedeutung reicht vom Abwurf unnützer, besonders durch Parasiten bedrohter Teile (z. B. Borke) über Verbreitung von Fortpflanzungskörpern bis zu exkretorischen Funktionen. Der letztere Aspekt trifft in erster Linie beim Abstossen alter Blätter zu, in denen sich Exkrete und Rekrete angesammelt haben, die nun durch die Zersetzung in der Laubstreu dem Nährstoffkreislauf wieder zugeführt werden.

Die morphologisch orientierte Botanik des 19. Jahrhunderts hat sich vor allem mit den histologisch fassbaren Vorgängen beim Blattfall befasst und hat ein enormes Tatsachenmaterial zusammengetragen, das im vergleichend-anatomischen Werk von Pfeiffer (1928) gipfelt. Seit der Entdeckung der Phytohormone hat sich das Interesse vorwiegend der hormonalen Auslösung und Kontrolle des Blattfalls zugewendet (z. B. Jacobs, 1955; Rubinstein und Leopold, 1964) und hat einen weiteren Block von Kenntnissen erbracht, die besonders durch Addicott (1965) zusammengefasst worden sind. Neben dem wissenschaftlichen Interesse sind für diese Schwerpunktsverlagerung in der Blattfallforschung auch ökonomische und militärische Gründe massgebend gewesen. Ein Beispiel dafür ist die Baumwolle, wo die ersten Einsätze von Erntemaschinen stets zu einer Verfärbung der Rohbaumwolle durch den Saft beschädigter Blätter führten. Erst die künstliche Defoliation mit Endothal ermöglichte den Grosseinsatz mechanischer Erntemethoden. Ebenso wichtig sind Defoli-

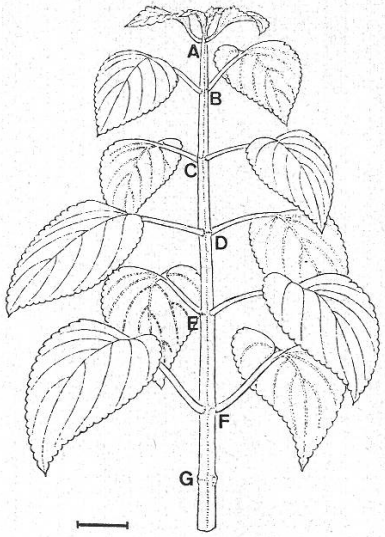
antien bei der Kontrolle der Tsetsefliege im tropischen Afrika: *Glossina* ist ein stenotherm-stenohygrisches Warmfeuchtluft-Insekt, das in buschigen, schattigen Habitaten lebt. Durch Anwendung von 2,4,5-T kann das Insekt zwar nicht ausgerottet, aber wirksam dezimiert werden. Seit den Unruhen in Malaia in den fünfziger Jahren haben Defoliantien schliesslich einen Anwendungsbereich gefunden, der gegenwärtig den Verbrauch für alle übrigen Zwecke weit übersteigt (Osborne, 1968) und den synthetischen Phytohormonen zu einer traurigen Berühmtheit verholfen hat: die Entlaubung des Dschungels in den ostasiatischen Kriegsgebieten zur Entlarvung gegnerischer Verstecke, die nun seit einigen Jahren in grossem Stil im Vietnam-Konflikt betrieben wird.

Zwischen einer morphologischen Tatsache und ihrer hormonalen Ursache liegt ein Bereich von Stoffwechselvorgängen, die beim Blattfall erst wenig bekannt sind (Addicott, 1965, S. 1100). Sie lassen sich gedanklich in zwei Gruppen einteilen, nämlich einerseits die enzymatischen Prozesse, die zur Zellwandauflösung führen, andererseits das Zusammenspiel all jener Faktoren, die örtlich verschiedene Entwicklungsbedingungen schaffen (Kühn, 1965) und so die entsprechenden Funktionszustände von Zellen und Geweben herbeiführen. Das Ziel der Blattfallforschung muss es sein, diese Korrelationen in molekularen Begriffen kausal erklären zu können. Aus anderen Bereichen der Biologie liegen bereits vielversprechende Ansätze zur Analyse solcher Systeme vor: Im Säugerorganismus zum Beispiel konnten mitosehemmende, gewebsspezifische Glycoproteide gefunden werden, die sogenannten Chalone (Bullough, 1967). Der Autor formulierte eine Hypothese (S. 122), wonach solche Chalone durch Umschalten von einem «mitosis operon» zu einem «ageing operon» Zellen auf ihren Weg zur aktiven Funktion und schliesslich zum Tod hinführen sollen. Chalone wären also autoregulative Produkte, Co-Repressoren eines Mitose-Operons im Sinne von Jacob und Monod. Diese Begriffe liessen sich beim Blattfall gut auf die Bedeutungsspaltung der Gewebe in der Blattfallzone in Schutzschicht und Trennschicht anwenden; dazu fehlen jedoch noch experimentelle Daten. In der vorliegenden Arbeit wird eine Hypothese über eine mögliche Rolle der Peroxidase bei der Einstellung der ausschliesslichen Reaktionskompetenz alter Blattfallzonen auf Auxin formuliert. Daneben wurden aus der zweiten der angedeuteten Problemgruppen enzymatische Vorgänge und stoffliche Veränderungen bei der Differenzierung der Blattfallzone untersucht, wofür histochemische Methoden in besonderem Masse geeignet sind. In dieser Hinsicht konnten Resultate erbracht werden, die analoge biochemische Untersuchungen (z.B. Morré, 1968) in der topographischen Dimension ergänzen und präzisieren.

Als Objekt diente in erster Linie *Coleus*, ein recht bald verholzendes Kraut. Zum Vergleich wurden Vertreter weiterer Lebensformen herangezogen, so eine immergrüne *(Coffea)* und eine saisonal laubwechselnde *(Annona)* Holzpflanze, *Phaseolus* und *Begonia* als ausgesprochene Kräuter, und schliesslich *Plumeria* als Beispiel einer pachykaulen, saisonal laubwechselnden Lebensform.

2 Material und Methoden

Pflanzen: Als Objekte dienten ein Klon einer *Coleus-Blumei*-Hybride (Fig. 1), *Phaseolus vulgaris* var. *nanus* (L.) Aschersh. «Ideal» (Pflanzen mit zwei entwickelten trifoliaten Blättern), *Begonia sanguinea* Raddi, *Coffea arabica* L. «Bourbon» (4jährige Bäume), *Annona squamosa* L. (7jährige Pflanze), *Plumeria acutifolia* Poir. (4jährige Pflanzen). Alle Pflanzen wurden im Gewächshaus bei Tageslicht und 20–25 °C gehalten.



Figur 1

Coleus. Skizze der Versuchspflanzen mit der verwendeten Bezeichnung der Knoten (verändert nach Jacobs, 1955). Massstrich = 2 cm

Schnitte: Um vergleichbare Resultate zu erhalten, wurden alle Untersuchungen an unfixierten Gefrierschnitten durchgeführt. Die Schnittdicke betrug bei *Coleus* 90–120 μm, bei *Phaseolus*, *Begonia* und *Plumeria* 90 μm, bei *Coffea* und *Annona* 60 μm. Diese Werte ergaben sich vor allem aus der Überlegung von Arnold (1968), dass ein Schnitt mindestens zwei Zelldurchmesser dick sein muss, um wenigstens eine Lage unbeschädigter Zellen zu enthalten. Die Schnittrichtung war fast immer sagittal, und zwar mehr oder weniger median-sagittal. Ausnahmen sind besonders erwähnt.

Zeichnerische Rekonstruktionen: Die Darstellungen des Leitbündelverlaufes bei *Coleus* wurden mit Hilfe des Perspektomaten hergestellt (Hagemann, 1971) und die Untersuchungen an aufgehellten Totalpräparaten (Gurr, 1965, S. 299) ergänzt.

Zeichnungen: Zellgetreue Zeichnungen wurden mit Hilfe eines Zeiss-Zeichenapparates hergestellt.

Fotografien: Für die Mikroaufnahmen wurde ein Zeiss-Fotomikroskop eingesetzt. Die Präparate wurden unter Verwendung entsprechender Farbfilter auf Orwo NP 15 fotografiert und die Filme in Microdol-X entwickelt.

Für die histochemische Arbeit galten allgemein die Kautelen von Arnold (1968). Histochemie an unfixierten Gefrierschnitten ist grundsätzlich Gewebshistochemie. Intrazellulär kann die Lokalisation von Stoffen nicht weiter differenziert werden. Neben der fehlenden Fixierung führt vor allem das langsame Einfrieren zu einem schlechten Erhaltungszustand des Plasmas. Unter diesen Umständen ist es müssig, irgendwelche gefärbten Körnchen im knäuelartig deformierten Protoplasten etwa als Mitochondrien bezeichnen zu wollen. Solche willkürlichen Zuordnungen sollen in der vorliegenden Arbeit vermieden werden; Reaktionsprodukte können entweder im Plasma, in der Zellwand oder in Interzellularen lokalisiert werden.

Calcium: Calcium wurde nach McGee-Russell (1955) mit Kernechtrot nachgewiesen. Dieses Reagens erfasst nur gelöstes Ca^{++}, während gebundenes Calcium nicht gefällt wird. Beim Abbau von Pektinen dürfte das salzartig an die Carboxylgruppen gebundene Calcium in Lösung gehen, so dass eine verstärkte Kernechtrot-Reaktion in der Wand auf Pektinabbau hindeuten könnte.

Pektin: Gewisse Anhaltspunkte ergaben sich jeweils aus der einfachen Färbung mit Rutheniumrot (Jensen, 1962). Bekanntlich handelt es sich aber dabei um ein Gruppenreagens auf saure Polysaccharide und nicht um eine spezifische Nachweismethode. Rutheniumrot ist jedoch sehr verträglich, im Gegensatz zur spezifischen Reaktion mit alkalischem Hydroxylamin (Jensen, 1962), deren aggressive Reagenzien in manchen Geweben starke Schrumpfungen verursachen. Ungünstig ist bei der zweiten Färbung die gelb-rote Farbe des Reaktionsproduktes, die auch bei hohen Pektinkonzentrationen oft relativ blass bleibt, zumal nur methylierte Pektine nachgewiesen werden.

Cellulose: Chlorzinkjod ergibt nicht nur eine verschiedene Färbung für Cellulose und Lignin/Suberin, sondern erlaubt bei farbfotografischer Protokollierung dank ausgeprägter Metachromasie

Rückschlüsse auf nicht direkt sichtbare Veränderungen der Wände. Frey-Wyssling (1959) diskutiert den Mechanismus der Färbung.

Lignin: Wo eine Gelbfärbung mit Chlorzinkjod eintrat, wurde mit Phloroglucin-HCl zwischen Suberin und Lignin entschieden.

Lipide: Auch hier ergab stets Chlorzinkjod die ersten Hinweise. Die üblichen fettlöslichen Diachrome sind zu wenig empfindlich, um beispielsweise die Anfänge von Lipiddepositionen nachzuweisen. Besser geeignet ist ammoniakalisches Gentianaviolett nach Strasburger (1913). Die besten Resultate können mit der Methode von Scott (1950) erhalten werden, wobei Schnitte nach Infiltration in Jod-Jodkali-Lösung mit 80 % Schwefelsäure behandelt werden. Der Verlauf des Verquellens der Wände wird beobachtet, wobei auch dünnste Lipidlamellen gelb hervortreten und sich vom Blau der Polysaccharide scharf abheben.

Peroxidase: Dieses Enzym wurde meist nach Graham et al. (1965) mit 3-Amino-9-aethylcarbazol (= AAC, pract. Sigma) nachgewiesen. Alle Nachweise wurden auf eine Inkubationszeit von 10 min standardisiert, indem die H_2O_2-Konzentration variiert wurde. Diese musste meist 5- bis 10mal höher als in der Originalpublikation gewählt werden, da jene Vorschrift auf exogene, injizierte Peroxidase in wesentlich höherer Konzentration als die hier nachzuweisende endogene zugeschnitten ist. Zum Vergleich wurde jeweils die Aminmethode nach Burstone (1960) mit 1,4-Aminodiphenylamin und 1,4-Amino-azobenzol herangezogen. H_2O_2-Konzentration und Inkubationszeit waren gleich wie bei AAC. Beide Reaktionen wurden bei Zimmertemperatur in Acetatpuffer 0,05 m von pH 5,0 durchgeführt. Die alkalische Nadireaktion und die Benzidinreaktion wurden wegen ihrer bekannten Nachteile vermieden.

Auch in dieser Arbeit wurden gewisse Lokalisationsunterschiede zwischen AAC und dem Amineagens festgestellt (Nuotclà, 1969), so zwar, dass zum Beispiel bei einem gegebenen Stadium von *Coleus*, bei dem AAC eine Lokalisation in der Wand und im Plasma ergab, das Aminreagens neben dem Plasma nur einzelne Wände anfärbte. Zwangloser als es Nuotclà mit der Annahme verschiedener Substratspezifität tut, kann diese Beobachtung durch folgende Feststellung auf methodische Gegebenheiten zurückgeführt werden:

Das Aminreagens ergibt bedeutend grobkörnigere Reaktionsprodukte als AAC. Bei jenem entsteht nun offenbar innerhalb der Inkubationszeit in der Zellwand nicht immer genügend Reaktionsprodukt für eine Fällung, und/oder eine solche ist aus räumlichen Gründen in der Zellwand selbst gar nicht möglich.

Die genannten Reagenzien können alle auch durch Cytochromoxidase oxidiert werden. Dieses Enzym ist indessen viel empfindlicher als Peroxidase und wird unter anderem auch durch Austrocknenlassen inaktiviert (Deane et al., 1960). Es wurden von jedem Objekt einige Kontrollschnitte erst nach kurzem Austrocknen inkubiert. In keinem Fall wurde die Reaktion dadurch signifikant beeinträchtigt. Somit wurde sie jedenfalls nicht durch Cytochromoxidase verursacht.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle sind Aldehyde, die ebenfalls die Nachweisreagenzien zu oxidieren vermögen. Auf die Anregung von Reeve (1949) hin wurde folgender Test ausgearbeitet und damit jedes Objekt überprüft:

	Ansatz Peroxidase	Ansatz Aldehyde
1.	—	Schnitte in 5 ml Lösung A infiltrieren
2.	Schnitte in 10 ml Lösung B infiltrieren	10 ml Lösung B zugeben
3.	5 ml Lösung C zugeben	5 ml Lösung C zugeben

Lösung A: Essigsäure, 4 m

Lösung B: 1,4-Phenylen-diamin, 0,2 m in Acetatpuffer 0,05 m pH 5,0

Lösung C: H_2O_2, 0,2 m

Resultat: Bei positivem Ausfall gelbbraune bis braunschwarze, unlösliche Färbung. Die Unterscheidung beruht darauf, dass im Aldehydansatz die Essigsäure (Endkonzentration 1 m, pH 2,3) das Enzym hemmt, nicht aber die nichtenzymatische Reaktion.

Bei allen Objekten wurde eine positive Aldehydreaktion nur in den verholzten Teilen erhalten, ausser bei *Annona*, wo auch die Blattfallzone schwach reagierte (Abb. 1). Die intensive Peroxidasereaktion dürfte aber kaum nur von diesen Aldehyden herrühren.

Als Kontrollreaktion kommt die klassische Cyanidhemmung eisenhaltiger Enzyme nicht in Frage, da bei pH 5 das CN^- praktisch nicht existenzfähig ist. Natriumazid hemmte weitgehend, sofern die Schnitte 10 min in einer 0,01 m Lösung präinkubiert wurden und der Hemmstoff auch im Inkubationsgemisch 0,01 m vorlag. Eine vollständige Hemmung der Reaktion trat stets ein, wenn H_2O_2 im Inkubationsgemisch fehlte. Adsorptionsartefakte waren mit den verwendeten Reagenzien weniger als beispielsweise mit Nadi zu befürchten, da ihre Reaktionsprodukte weniger lipophil sind. Die von Nuotclà (1969) beobachtete Oxidation der Reagenzien durch Chinone spielte bei den hier untersuchten Objekten keine Rolle, da sich einzig die Schnitte durch *Annona* spontan etwas bräunen, während bei den anderen Objekten die Schnitte weiss bleiben, also anscheinend keine endogenen Chinone aufweisen. Bei *Annona* wurden vor der Inkubation die braunen Produkte durch Auswaschen jeweils weitgehend entfernt. Nuotclà (1969) diskutierte weitere mögliche Fehlerquellen und machte ihre Unerheblichkeit wahrscheinlich. Schliesslich bleibt zu bemerken, dass nach Hitzeinaktivierung (10 min in kochendem Wasser) in allen Objekten höchstens eine geringe Pseudoperoxidaseaktivität (Deane et al., 1960) auftrat, die keinesfalls für die beobachteten drastischen Enzymaktivitäten aufkommen kann.

Die Reaktionsprodukte sind in organischen Lösungsmitteln löslich, weshalb die Präparate nicht entwässert werden können. In Glycerin sind Präparate mit dem Aminreagens recht gut haltbar, während das Reaktionsprodukt von AAC vielfach nach einiger Zeit in Form von Nadeln und Nadelbüscheln auskristallisiert.

Cytochromoxidase: Hier wurde vorwiegend nach der Vorschrift von Burstone (1960) mit 1,4-Amino-diphenylamin und 1,4-Amino-azobenzol gearbeitet. Die Inkubation erfolgte in Phosphatpuffer 1/15 m von pH 7,4 während 30 min bei 37 °C. Ein Zusatz von Katalase war unnötig, da offenbar in keinem Objekt viel endogenes Wasserstoffperoxid vorhanden ist, mit dem die Peroxidase das Reagens oxidieren könnte. Anfänglich wurde auch das Nadireagens verwendet (Arnold, 1968), doch war das Aminreagens an Substantivität überlegen.

Phenoloxidase: Das Enzym EC 1.10.3.1, das über ein halbes Dutzend verschiedene Namen trägt, wird hier gemeinhin als Phenoloxidase bezeichnet. Es wurde nach Chayen et al. (1969) mit Dopa oder Brenzkatechin nachgewiesen. DL-Dopa (Hoffmann-La Roche) ergab eine deutlichere Reaktion als Brenzkatechin. Das Substrat war immer 0,01 m in Phosphatpuffer 1/15 m von pH 7,4. Die Inkubation erfolgte während 3 h bei 37 °C. Eine unvollständige Hemmung wurde mit folgender Kontrollreaktion erreicht: 10 min Präinkubation in Natriumdiäthyldithiocarbamat 0,01 m mit anschliessender Inkubation in Gegenwart von 0,01 m Hemmstoff.

Phosphatase: Die saure Phosphatase wurde mit der Azofarbstoff-Methode nach Arnold (1968) nachgewiesen. Als Diazoniumsalz wurde Echtblausalz B (Fluka) verwendet.

Pektinase: Mit Pektinase wurden einige Simulationsversuche durchgeführt. Das Enzym (purum, Fluka) wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml in Acetatpuffer 0,1 m von pH 4,0 verwendet. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei 37 °C.

Die Präparate wurden mit Ausnahme derjenigen mit Chlorzinkjod in Glycerin eingeschlossen. Wegen ihrer beschränkten Haltbarkeit wurde eine Sammlung von Belegaufnahmen auf farbigem Diapositivfilm angelegt, die auch die Kontrollreaktionen der Enzymnachweise enthält. Sie ist im Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich deponiert.

3 Untersuchungen an Coleus Blumei

3.1 Anatomische Untersuchungen

Frühere Arbeiten (Pfeiffer, 1928; Myers, 1940) haben drei Fragen offengelassen:

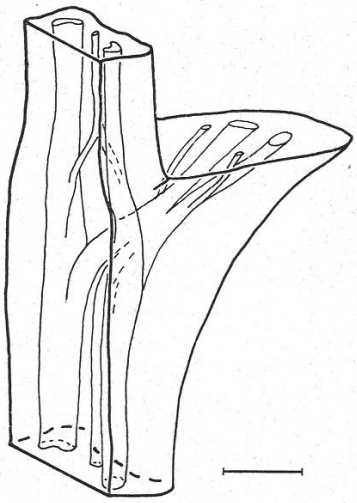
- Steht der Leitbündelverlauf im Zusammenhang mit Lage und Orientierung der Blattfallzone?
- Handelt es sich beim «Blattfallgewebe» um ein primäres oder um ein sekundäres Meristem?
- Wo und wie beginnt der Trennungsprozess?

3.1.1 Der Leitbündelverlauf im jungen Knoten

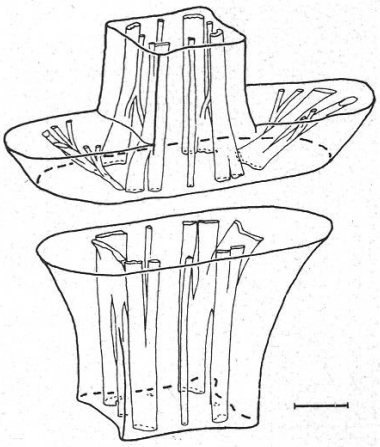
Als Arbeitshypothese gelte, dass die spezifische Anordnung der Leitbündel an der Blattstielbasis Ort und Gestalt der Anlage des «Blattfallgewebes» bedinge.

Der Querschnitt durch den krautigen Stengel des Internodiums A–B zeigt vier kräftige Kantenleitbündel und in der Mitte der Stengelseiten je ein geringer entwickeltes Flächenleitbündel. Mit zunehmender Dicke des Stengels differenzieren sich akzessorische Stränge (oft xylemfrei), und zwar jeweils mitten zwischen zwei bestehenden Bündeln. 40 Messungen an den Internodien A–B, B–C, C–D ergaben für den Zwischenraum zwischen zwei Leitbündeln einen Wert von 245 ± 46 μm. Obwohl im untersuchten Bereich der Umfang des Stengels von ca. 6,4 mm auf das Doppelte zunimmt, bleibt der durchschnittliche Zwischenraum zwischen zwei Leitbündeln konstant. Offenbar hemmen die bestehenden Leitbündel in einem bestimmten Umkreis die Anlage von weiteren. Sobald jene durch das Streckungswachstum über die Hemmdistanz hinaus voneinander entfernt werden, kommt es zur Bildung akzessorischer Bündel. Unterhalb der Knoten D bzw. E schliesst sich das Kambium zum Ring und leitet das sekundäre Dickenwachstum ein.

Die Blattspuren laufen bis etwa zur Mitte des nächstunteren Internodiums längs der Kantenbündel hinunter, bevor sie ganz mit diesen verschmelzen (Fig. 2, 3, 4). Wenige Millimeter unterhalb ihres Knotens wenden sich beidseits die je 2 Spurstränge spitzbogenförmig einander zu. Mit ihnen vereinigen sich das dazwischen liegende Flächenleitbündel und allfällige akzessorische Bündel in der Knotenebene zu einer breiten Platte (Fig. 3), die nun brüsk im rechten Winkel nach aussen biegt. Bereits auf der Höhe der Stengeloberfläche, also nach wenigen Zehntelsmillimetern, teilt sich die Platte in die beiden Hauptstränge des Blattstiels auf. Die Platte dient anscheinend nur der Neuverteilung der drei Spurstränge auf die beiden Hauptleitbündel des Blattstiels. Obwohl nicht jede Siebröhre und jedes Gefäss verfolgt werden konnten, ist wohl die Annahme erlaubt, dass die ursprünglichen Lagebeziehungen erhalten bleiben, das heisst, dass keine Überkreuzungen stattfinden. Kaum sind die beiden Blattstielleitbündel gebildet, gliedern sie gegen oben und aussen je einen Teilstrang ab, der sich bald zweiteilt. Im Blattstiel liegen definitiv zwei Hauptleit-



Figur 2



Figur 3

Figur 2

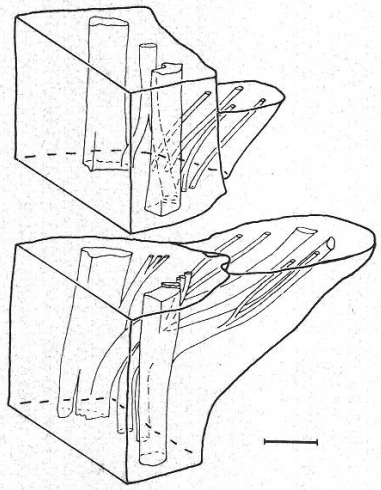
Coleus. Knoten A, rechte Hälfte. Betrachtungswinkel 20°. Massstrich = 1 mm

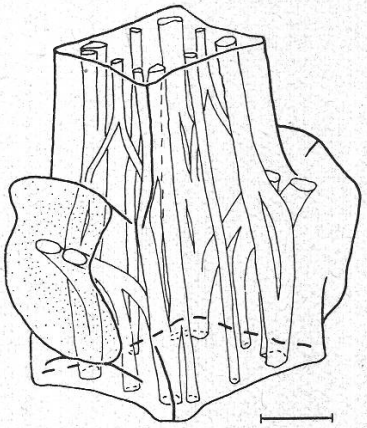
Figur 3

Coleus. Knoten B, zeichnerisch in Blöcke zerlegt. Betrachtungswinkel 20°. Massstrich = 1 mm

bündel (zentral, abaxial) vor, die beidseits von je 2 bis 3 dünneren Strängen begleitet werden. Das «Blattfallgewebe» wird stets im Bereich zwischen der beschriebenen Platte und dem Abzweigen der akzessorischen Stielleitbündel angelegt (Fig. 5). Selten werden die letzteren durch die Narbe angeschnitten. Beim Blattfall werden die Leitbündel mechanisch abgeschert. Dies ist für 2 basal im Blattkissen liegende Stränge leichter möglich als für die Vielzahl der Leitbündel im Blattstiel, die über den ganzen Querschnitt verteilt sind. Dass das Abscheren der Leitbündel an einer strukturell schwachen Stelle erfolgt, erklärt aber noch nicht, dass schon weit vor der Beendigung der Blattdifferenzierung ein «Blattfallgewebe» an ebendieser Stelle angelegt wird.

Figur 4





Figur 5

Figur 4

Coleus. Knoten F, rechte Hälfte. Hinzugekommen ist die Leitbündelversorgung des Seitenzweiges, der sich aus der Achselknospe entwickelt hat. Betrachtungswinkel 20°. Massstrich = 1 mm

Figur 5

Coleus. Knoten B. Narben nach induziertem Blattfall. Betrachtungswinkel 20°. Massstrich = 1 mm

3.1.2 Morphologische Natur der Schutzschicht

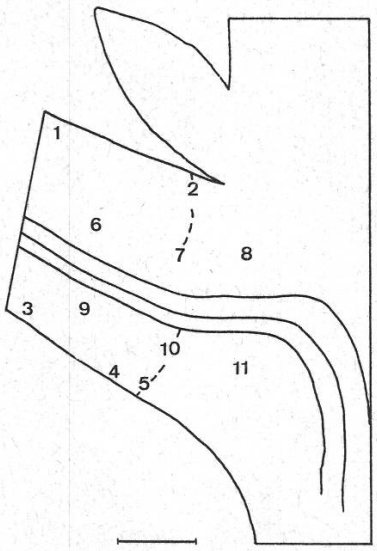
Die Interpretation von Tabelle 1 erlaubt folgende Feststellungen:

- Im Knoten A sind keinerlei Gestalt- oder Grössenunterschiede zwischen Zellen in der prospektiven Blattfallzone und den angrenzenden Geweben zu erkennen. Die beiden Schichten der Blattfallzone gehen aus einem einheitlichen Parenchym hervor. Diese Bedeutungsspaltung wird in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 durch histochemische Befunde genauer belegt.
- Im Knoten B zeigt es sich, dass alle Zellen in alle Richtungen gleichmässig gewachsen sind. Dieses Streckungswachstum wird bis zu den ältesten Stadien anhalten. Die direkte mikroskopische Untersuchung lässt einzelne Querteilungen in der Subepidermis erkennen.
- Das «Blattfallgewebe» Pfeiffers (1928), von dem noch oft in Lehrbüchern die Rede ist, entspricht der prospektiven Schutzschicht (Gawadi und Avery, 1950). Es handelt sich um ein interkalares Meristem im Sinne von Esau (1965). Blattfall

Tabelle 1

Coleus. Zelldimensionen auf Sagittalschnitten verschiedenen Alters. «Länge» ist die Ausdehnung in Richtung des Blattstieles. Messstellen gemäss Figur 6. * im Bereich der prospektiven Schutzschicht. (Mittelwerte aus jeweils 10 Messungen)

Knoten	Ausdehnung in μm (Länge × Breite) an den Messstellen:										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	83 × 23			74 × 22			26 × 55			36 × 60	
B	113 × 33			121 × 32			45 × 83			49 × 72	
C	146 × 38	27 × 40	126 × 38		33 × 36		52 × 105			53 × 92	
D	141 × 41	29 × 41	135 × 46		39 × 40		66 × 128		63 × 105	45 × 87	94 × 116
E					24 × 49		56 × 139		57 × 108	35 × 80	89 × 146
G	118 × 57	36 × 50	124 × 49	77 × 61	25 × 56	59 × 175	33 × 151	55 × 128	85 × 119	27 × 77	93 × 132
		*			*		*			*	



Figur 6

Coleus. Skizze eines Sagittalschnittes durch die Hälfte des Knotens D. Massstrich = 1 mm
Eingetragen sind die Messstellen für Tabelle 1:

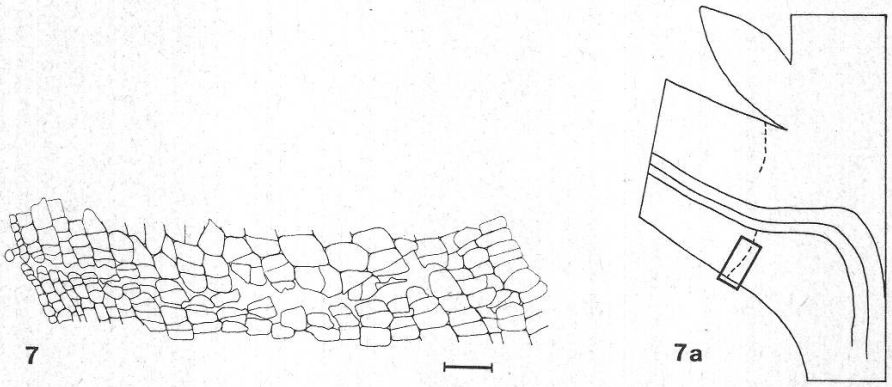
1, 2 adaxial, subepidermal
3, 4, 5 abaxial, subepidermal
6, 7, 8 adaxial, Grundgewebe
9, 10, 11 abaxial, Grundgewebe

bedeutet also hier – wie übrigens in den meisten anderen Fällen auch – die Anlage einer gut sichtbaren prospektiven Schutzschicht, gefolgt von der Differenzierung einer Trennschicht distal von jener. Die Bildung der Trennschicht ist wenig augenfällig (vgl. aber die histochemischen Kriterien im Abschnitt 3.2.2) und erfolgt erst kurz vor dem Blattfall, so dass früher vielfach angenommen wurde, die Teilungstätigkeit des «Blattfallgewebes» führe zur Separation.

- Bis zum Knoten C sind in die meisten subepidermalen Zellen 3 bis 4 Querwände eingezogen worden (Messstellen 2 und 5). Bereits treten nun auch im anschliessenden Grundgewebe einzelne Querteilungen auf, die sich allerdings in den Zahlenwerten noch nicht manifestieren.
- Auf der Höhe des Knotens D ist im abaxialen Parenchym durchschnittlich eine Querwand eingezogen; im adaxialen Parenchym hebt sich die prospektive Schutzschicht noch nicht ab.
- Erst im Knoten E und den älteren Stadien ist auch im adaxialen Parenchym durchwegs mindestens eine Querwand pro Zelle eingezogen. Im abaxialen Parenchym sind es 2 bis 3 Querwände, in den subepidermalen Schichten nach wie vor 3 bis 4. Die Zone der Teilungen reicht abaxial bis zum Leitgewebe, adaxial bleiben 2 bis 3 Zellschichten längs des Leitbündels unberührt. Leitbündel und Stärkescheide werden auch in keinem späteren Stadium bis zum Blattfall von morphologisch sichtbaren Veränderungen betroffen.
- In der Epidermis treten erst in den ältesten Stadien (F, G) einzelne Querteilungen auf. Deshalb ist die Epidermis wie auch das Leitgewebe in der Tabelle weggelassen.
- Die beschriebenen Ereignisse liefen stets in derselben Reihenfolge ab; das chronologische und in einem gewissen Masse auch das physiologische Alter, in dem ein bestimmter Entwicklungsstand erreicht ist, variiert stark und ist vor allem saisonalen Schwankungen unterworfen.

3.1.3 Histologische Analyse des Trennungsprozesses

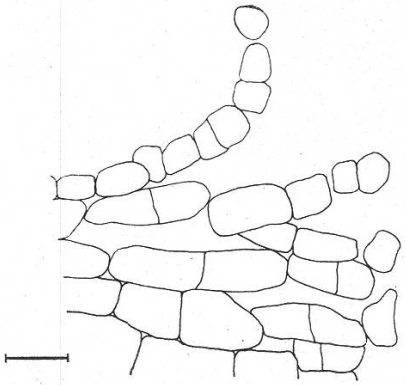
Untersucht wurden Knoten E, also Knoten mit ausgewachsenen Blättern und wohldifferenzierter, auch äusserlich erkennbarer Blattfallzone. Der Blattfall wurde durch Entfernen der Spreite induziert. Nach 24 h zeigen sich in den subepidermalen, abaxialen Schichten die ersten deutlichen Interzellularen. Die angrenzenden Zellen zeigen bald Eindellungen und runden sich ab (Abb. 2). Diese Interzellularen entstehen schizolytisch im Sinne von Pfeiffer (1928); es konnten in keinem Falle Zelltrümmer als Reste einer histolytischen oder rhexolytischen (durch Zerreissen) Entstehung beobachtet werden. Neben einer lokalen Auflösung der Mittelschicht ist an der Bildung und Ausweitung dieser Spalträume eine Verminderung des Turgors in den angrenzenden Zellen und deren entsprechende Schrumpfung beteiligt (Myers, 1940). Ein analoges Stadium bei *Coffea* zeigt Abbildung 3. Etwa um diese Zeit, also



Figur 7

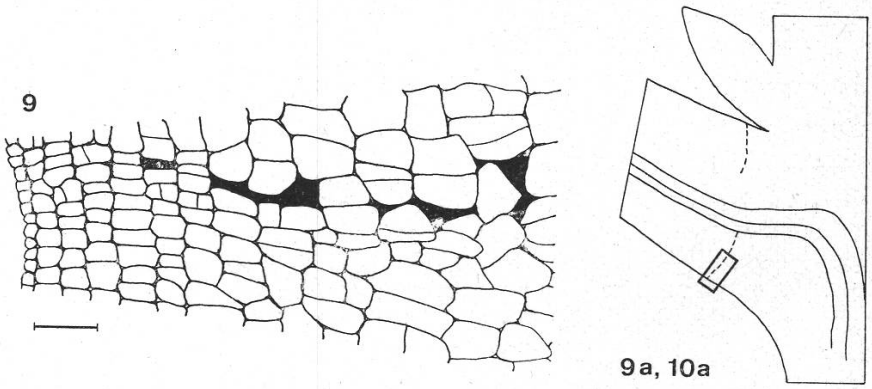
Coleus. Knoten E. Spaltbildung 36 h nach Entfernung der Spreite. Massstrich = 100 μ

deutlich später als abaxial, treten auch auf der adaxialen Seite in den subepidermalen Schichten Spalträume auf. Abaxial und adaxial dehnt sich nun der Spalt schizolytisch nach beiden Seiten aus. Bald wird auch die Epidermis aufgetrennt. Auch wenn beidseits der Spalt in der Epidermis und den äusseren Rindenschichten weit klafft, hat er die inneren Rindenschichten noch nicht erreicht (Fig. 7). Im weiteren Verlauf des Prozesses schreitet die Spaltbildung einerseits nach innen weiter vor, andererseits werden die bereits geschaffenen Spalträndер durch Auflösung angrenzender Mittellamellen stark zerklüftet (Fig. 8). Schliesslich erreicht der abaxiale und kurz darauf der adaxiale Spalt die Stärkescheide des Leitbündels. Wie bereits erwähnt, treten hier keine sichtbaren Veränderungen auf, und nach kurzer Zeit wird das Leitbündel mechanisch abgeschert.



Figur 8

Coleus. Knoten E. Distaler, abaxialer Spaltrand 48 h nach Entfernung der Spreite. Epidermis aufgeworfen, weitgehende Isolation der an den Spaltrand grenzenden Zellen. Massstrich = 50 μ

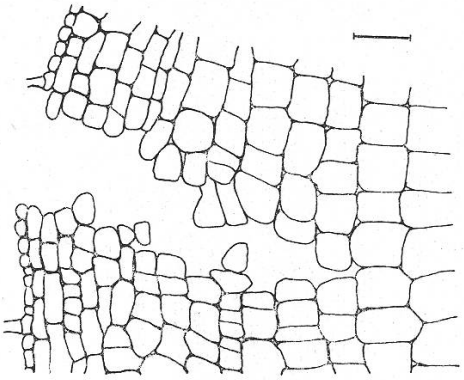


Figur 9

Coleus. Knoten B. Interzellularenbildung 48 h nach Entfernung der Spreite ohne Ausbildung einer Schutzschicht. Massstrich = 100 μ

Mit diesen Beobachtungen beim induzierten Blattfall stimmt der Verlauf des natürlichen Blattfalls völlig überein. Ein anderes Bild zeigt sich jedoch, wenn man bei jungen, noch nicht ausdifferenzierten Blättern durch Entfernen der Spreite den Abwurf des Stiels anregt: Nach einer Anlaufsphase von 48 h, während der keine histologischen Veränderungen zu beobachten sind, setzt abaxial auf breiter Front eine

Interzellularenbildung in Subepidermis und anschliessendem Grundgewebe ein. Eine prospektive Schutzschicht wird nicht ausgebildet (Fig. 9). Wenig später finden dieselben Vorgänge auch adaxial statt. Nach 60 h klafft beidseits ein tiefer Spalt (Fig. 10). Der weitere Verlauf der Trennung ist derselbe wie oben beschrieben. Von der Bedeutung dieser Beobachtung wird im nächsten Abschnitt die Rede sein.



Figur 10

Coleus. Knoten B. Spaltbildung 60 h nach Entfernung der Spreite ohne Ausbildung einer Schutzschicht. Massstrich = 100 μ

3.1.4 Ergebnisse und Probleme der anatomischen Untersuchungen

1. Die Blattfallzone besteht aus einer prospektiven Schutzschicht – einem interkalaren Meristem – und der Trennschicht, die hier unmittelbar distal angrenzt. Dieselben Verhältnisse wurden von Gawadi und Avery (1950) für *Poinsettia* beschrieben. In dieser bedeutungsvollen Arbeit beweisen die Autoren, dass das «Trenngewebe», auf dem die ausführliche Klassifikation von Pfeiffer (1928) aufbaut, in Tat und Wahrheit die Anlage einer Schutzschicht darstellt. Pfeiffer klassifizierte vor allem Holzpflanzen. Er bemerkte indessen (S. 33), dass die meisten dikotylen Kräuter vermutlich ein sekundäres Meristem (s) aus tafelförmigen Zellen (t) mit Cellulosewänden (z) als Trennungsgewebe entwickelten, schematisch also s-t-z. Diese Gewebebeschreibung trifft in der Tat für *Coleus* zu, nur ist eben dieses Meristem kein Trennungsgewebe, sondern vielmehr ein sekundäres Abschlussgewebe, das für die Vernarbung angelegt wird.

2. Der Beweis dafür, dass dieses Meristem nichts mit der Trennung zu tun hat, wird durch die Untersuchung junger Blätter erbracht: Diese weisen noch keine meristematischen Querwände auf, fallen aber nach Entfernen der Spreite prompt ab. Sie holen dabei die Querteilungen nicht etwa vor dem Abfallen schnell nach, sondern bilden erst nachher eine Narbe aus.

3. Der Ort der Blattfallzone ist streng mit dem Leitbündelverlauf korreliert, so zwar, dass die Blattfallzone immer an der strukturell schwächsten Stelle der Blattbasis angelegt wird, wo die Leitbündel zu einer Platte vereinigt sind.

4. Zum Zeitpunkt der Anlage der prospektiven Schutzschicht stehen die Blattstiele steil aufrecht; die Schicht wird rechtwinklig zur Stielachse angelegt und ist also um ca. 60° zur Stengelachse nach abwärts geneigt. Ein stengelseitiger morphogenetischer Einfluss wäre somit geometrisch schwer zu verstehen. Vielmehr muss das teilungsauslösende Hormon in Form einer Front durch das Parenchym des *Stiels*

basalwärts wandern. Nur so lässt sich die Anlage der prospektiven Schutzschicht als Scheibe quer zur Längsachse des Blattstiels verstehen. Weshalb dieses Gewebe allerdings mit der beobachteten Präzision an stets derselben Stelle angelegt wird, ist ein noch völlig offenes Problem. Darüber hinaus hat diese Schutzschicht eine distinkte Form: Sie zeigt stets eine charakteristische Verwerfung, indem sie abaxial 0,3–0,4 mm proximaler liegt als adaxial. Kausaldeterministisch heute noch nicht erklärbar ist schliesslich die Tatsache, dass die prospektive Schutzschicht bereits angelegt wird, wenn das Blatt erst zur Hälfte ausgewachsen ist.

5. Die Trennschicht schliesst unmittelbar distal an die Schutzschicht an. Dafür, dass sie trotzdem das Resultat eigener ortsbestimmender Einflüsse ist, sprechen die Versuche mit jungen Blättern, wo die Trennschicht auch beim Fehlen einer Schutzschicht stets an der «richtigen» Stelle ausgebildet wurde. Andererseits deuten die beobachteten Schrumpfungen auf Wasserknappheit im Grundgewebe hin, was eine Interpretation der Schutzschicht als physiologische Barriere und Induktor der Vorgänge in der Trennschicht nahelegt. Auch Pfeiffer (1928) spricht von einer «Verschiebung des Betriebswasser-Gleichgewichts als causa morbi» (S. 3). Indessen konnten keine Thyllen gefunden werden wie etwa bei *Phaseolus* (Scott et al., 1964).

6. Es gilt nun mit histochemischen Methoden abzuklären:
- worin die physiologischen Korrelate zu den beobachteten histologischen Vorgängen in Schutzschicht und Trennschicht bestehen, und
- wie eine hormonale Kontrolle wirksam werden kann.

3.2 Histochemische Untersuchungen

3.2.1 Die Bildung der Schutzschicht vor dem Blattfall

Parallel zur histologischen Analyse wurden die Knoten von unbehandelten Pflanzen in bezug auf Verteilung und Reaktionsintensität von Peroxidase, Phenoloxidase, Cytochromoxidase, Pektin, Calcium und Suberin untersucht.

In den Knoten A und B lässt sich aus der Verteilung aller untersuchten Enzyme und Substanzen die Anlage der zukünftigen Blattfallzone noch nicht erkennen (Abb. 4 als Beispiel für Peroxidase). Die Peroxidaseaktivität zeigt folgende histologische Differenzierung: Sie ist am stärksten im Leitgewebe und in allen Meristemen (z.B. Achselknospe in Abb. 4), etwas schwächer in der Epidermis, ist aber auch in jeder parenchymatischen Zelle in geringem Masse nachweisbar. Eine Phenoloxidasereaktion tritt mit derselben Verteilung, aber quantitativ schwächer auf. Über die Cytochromoxidase bemerkt van Fleet (1962): «Cytochrome oxidase is clearly one of the first of many enzymes in the sequence of conversion of resting cells to dividing cells.» Im vorliegenden Stadium ist die Reaktion sehr stark im Phloem und besonders im Xylem, bedeutend schwächer in der Epidermis, während in allen übrigen Zellen uniform eine sehr geringe Grundaktivität festzustellen ist. Die Erwartung, dass am Ort der prospektiven Schutzschicht schon vor dem Beginn der Querwandbildung gesteigerte Cytochromoxidaseaktivität herrscht, trifft also nicht ein. Zellulär kommen alle drei Enzyme im Plasma vor. Peroxidase kann mit AAC stets, mit dem Aminreagens teilweise auch in der Zellwand und in kleinen Interzellularen nachgewiesen werden. Die Pektinreaktion mit Hydroxylamin ist bei diesem Objekt nicht sehr signifikant, da sich die dünnen, braunrot gefärbten Zellwände schlecht abheben. Mit Rutheniumrot weicht die Färbung der Wände in der zukünftigen Schutzschicht

in keinem Stadium von der des anschliessenden Gewebes ab. Dasselbe gilt für Calcium. Lignin- und Suberinnachweis fallen stets negativ aus.

Mit der vom Knoten C an einsetzenden Differenzierung der prospektiven Schutzschicht schiebt sich auf dem ganzen Umfang des Blattstiels eine schmale, keilförmige Zone erhöhter Peroxidaseaktivität vom Rand her gegen das Zentrum vor (Abb. 5). Mit der Verbreiterung des Meristemringes ist eine Zunahme der peroxidasepositiv reagierenden Zone korreliert, wobei freilich stets zunächst die Teilungen erfolgen und erst mit einer gewissen Verzögerung die Aktivität lokal ansteigt (Abb. 6). Bald erfasst die gesteigerte Peroxidaseaktivität scheibenförmig die ganze Blattfallzone (Abb. 7). Charakteristisch ist nicht nur für die Peroxidase, sondern auch für die beiden anderen Enzyme, dass sich der Aktivitätsanstieg über eine breite, unscharf begrenzte Zone proximal und auch etwas distal der eigentlichen Blattfallzone erstreckt, wobei allerdings ein deutliches Maximum auf die prospektive Schutzschicht fällt. Die Aktivitätszunahme der Phenoloxidase im Verlauf der Bildung der prospektiven Schutzschicht erfasst besonders die distalsten Zellen dieser Schicht. Sie ist auch in den ältesten Stadien auf etwa den halben Durchmesser der Blattfallzone und besonders die Epidermis in diesem Bereich beschränkt (Abb. 8). Dieses Enzym hinkt also noch weiter hinter den morphologisch fassbaren Vorgängen nach, während sich die Cytochromoxidase etwa gleich wie die Peroxidase verhält (Abb. 9, 10). Die zelluläre Lokalisation aller drei Enzyme erfährt während der Bildung der Schutzschicht keine Änderungen.

Die untersuchten Substanzen zeigen keine Korrelation mit der Aktivitätszunahme der Enzyme. Daraus muss geschlossen werden, dass diese an deren Stoffwechsel nicht direkt beteiligt sind.

Ebensowenig sind die Enzyme offenbar am Cellulosestoffwechsel der neu eingezogenen Querwände beteiligt, da ja das charakteristische Nachhinken ihrer Aktivitätszunahme gegenüber den histologischen Vorgängen zu beobachten ist. Die mögliche Natur der tatsächlich in Frage kommenden Substrate und Reaktionen wird weiter unten diskutiert werden.

3.2.2 Die Trennschicht

Die auffälligste histologische Beobachtung ist die Bildung von Interzellularen als Einleitung des Trennungsprozesses. Sind physiologische Korrelate dieses Vorganges histochemisch zu erfassen?

Lipide: Interzellularenbildung bedeutet die Exposition zusätzlicher Zelloberflächen an die Luft. Nach Scott et al. (1948) und besonders Scott (1950) sind alle Zell-Luft-Grenzen mit einer dünnen Cutin- bzw. Suberinlamelle überzogen. Scott deutet diese Tatsache als Wundreaktion auf das Zerreissen von Plasmodesmen bei der Interzellularenbildung. Als Arbeitshypothese wurde hier angenommen, dass eine Cutinausscheidung direkt als Ursache von Interzellularenbildung und schliesslich Blattfall zu betrachten sein könnte. Scott (1950) stellte nämlich fest, dass in alten Blättern die ganze Zellwand samt Mittellamelle mit Lipiden imprägniert ist. Eine lokal forcierte Lipidausscheidung könnte die Mittellamelle schmierig werden lassen und damit der Abrundungstendenz der angrenzenden Zellen Raum geben.

Es wurden Schnitte durch Knoten E zu verschiedenen Zeiten nach Entfernung der Spreite mit der empfindlichen Methode von Scott (1950) untersucht. Intakte Blatt-

fallzonen zeigen keine Spur von Lipiden in oder an den aufgequollenen Wänden. Das Plasma der prospektiven Trennschicht fällt durch stark positive Lipidreaktion auf, die wohl als prämortale Lipophanerose gedeutet werden darf. Im ganzen Verlauf des Trennprozesses konnte in keinem Gewebe weder in den Interzellularen noch in der Mittellamelle Cutin bzw. Suberin einwandfrei nachgewiesen werden. Gelegentlich wurden zwar Perlschnüre aus gelben, stärker lichtbrechenden Körnchen in der Mittellamelle angetroffen. Da sie jedoch nicht regelmässig auftraten, dürfte es sich um verschlepptes Material aus den angeschnittenen Zellen handeln. Den normalen Habitus eines frischen Spaltrandes zeigt Abbildung 11, während Abbildung 12 das Gewebe einige Zellschichten proximal vom Spalt wiedergibt.

Pektine: Die Zellwände ergeben mit Hydroxylamin in allen Knoten einer unbehandelten Pflanze eine gleichmässig positive Reaktion. Es kann infolge ihrer geringen Dicke keine Schichtung festgestellt werden. Nach Induktion des Blattfalls sind zunächst keine Veränderungen zu beobachten. Erst mit der Interzellularenbildung verarmen die unmittelbar beteiligten Zellen an Pektin (Abb. 13). Der aufklaffende Spalt grenzt mit 1 bis 2 Schichten pektinfreier, abgerundeter Zellen an die Luft (Abb. 14). In diesem Fall zeigt die Fotografie weniger als die direkte Beobachtung: Damit die beschriebenen, farblosen Zellen überhaupt abgebildet werden, ist eine starke Abblendung erforderlich, wodurch der Grauwertunterschied zu den pektinpositiv reagierenden anschliessenden Zellen trotz entsprechender Lichtfilterung zu gering ausfällt.

Calcium: Für den sehr geringen nachweisbaren Calciumgehalt trifft sachlich und methodisch das für Pektin Gesagte ebenfalls zu. In den letzten Stadien des Blattfallprozesses verarmt die Trennschicht also gänzlich an Calcium. Frey-Wyssling (1959) vermutet, dass eine solche Entfernung des Kations aus dem Calciumpektat eine Voraussetzung für die Schizolyse darstelle. Weitere Versuche im Abschnitt 3.5 sollen die Frage nach der Kausalität dieses Calciumschwundes abklären.

Lignin: In keinem Stadium konnte eine Lignifizierung festgestellt werden.

Stärke: Im allgemeinen ist die Schutzschicht arm an Stärke, während in der Trennschicht in den letzten Stadien vor der Separation oft auffallend Stärke akkumuliert wird (Addicott, 1965). In der Tat fehlt bei *Coleus* Stärke in der prospektiven Schutzschicht völlig; erntet man jedoch Blätter der Knoten G oder H am Abend und direkt im Gewächshaus, so können oft bedeutende Stärkekonzentrationen in der Trennschicht beobachtet werden (Abb. 15). Induziert man in solchen Fällen den Blattfall, so bleibt diese Stärke in den äussersten, sich abrundenden Zellen liegen (Abb. 16). Diese Beobachtung ist ein Indiz für die eingangs erwähnte Vermutung, die prospektive Schutzschicht sei schon früh als physiologische Scheide für gewisse Stoffe anzusehen.

Pektinase: Es ist noch kein histochemischer Pektinasenachweis bekannt. Aus Modellversuchen sind immerhin gewisse Hinweise auf die physiologische Wirkung des Enzyms zu erwarten. Schnitte durch unbehandelte Knoten A bzw. F wurden in Pektinase inkubiert. Nach der Inkubation hatte das jüngere Objekt zwar seine äussere Gestalt noch beibehalten, die Zellwände waren jedoch gequollen, weitgehend aufgelöst und hoben sich kaum mehr von den Protoplasten ab. Das Gewebe glich einem uniformen Brei. Beim älteren Objekt blieben die Zellwände deutlich erkennbar; sie waren ebenfalls stark gequollen und hatten an Kontrast gegenüber den Protoplasten verloren. Bei vielen Zellen war eine Abrundung und Interzellularenbildung zu be-

obachten (Abb. 17). Dieser Modellversuch zeigt also, dass junge Zellen mit noch geringer Celluloseeinlagerung in der Sekundärwand ein gegenüber dem physiologischen abweichendes Verhalten zeigen. Bei älteren Zellen, die ohnehin zum baldigen Blattfall disponiert sind, weisen Modellversuch und tatsächlicher Blattfall eine bessere Übereinstimmung auf. Aber auch hier fehlt beim tatsächlichen Blattfall die auffällige Zellwandquellung des Modellversuchs. Diese Beobachtungen sind ein Hinweis dafür, dass am natürlichen Trennvorgang Pektinase wohl beteiligt sein dürfte, ihre Wirkung aber durch andere Faktoren modifiziert wird.

Mit exogener Pektinase ist es ausserdem möglich, die Wirkung des Pektinabbaues auf die Calciumfreisetzung zu prüfen. Im Abschnitt 2 wurde die Erwartung formuliert, dass bei Pektinhydrolyse auch das salzartig gebundene Calcium abgespalten würde. Das müsste zu einer Zunahme der freien Calciumionen führen, die mit Kernechtrot spezifisch nachweisbar sind. Schnitte durch den Knoten E wurden 30 min in Kernechtrot bzw. 1 h in Pektinase und anschliessend 30 min in Kernechtrot bzw. 1 h in einer Lösung aus gleichen Teilen Pektinase und Kernechtrot inkubiert. Erwartungsgemäss stellte sich im ersten Ansatz eine schwache Färbung ein, die der geringen Menge an freiem Calcium im unbehandelten Gewebe entspricht. Eine kräftige Färbung war im dritten Ansatz zu beobachten, während die Intensität im zweiten Ansatz intermediär war. Dieses Resultat entspricht der Erwartung. Dass im Ansatz mit nachträglicher Calciumfällung eine geringere Färbungsintensität als in jenem mit gleichzeitiger Fällung auftrat, erklärt sich daraus, dass bei sukzedaner Fällung ein Teil der freigesetzten Ionen vor der Reaktion mit Kernechtrot bereits ausgewaschen worden war.

Cytochromoxidase: Die Aktivität dieses Enzyms ist in der Trennschicht älterer, unbehandelter Knoten (Abb. 10) sowie nach Induktion des Blattfalls deutlich erhöht. Die Lokalisation ist rein plasmatisch; weder in Zellwänden noch Interzellularen konnte das Enzym gefunden werden. Nach erfolgtem Blattfall zeigte sich eine besondere Aktivität im Plasma der nun exponierten Zellen der Trennschicht.

Phenoloxidase: Die ganze Blattfallzone weist eine gegenüber der Umgebung erhöhte Aktivität mit unscharfer Begrenzung auf. Die Lokalisation der stärksten Reaktion in der Schutzschicht wurde dort beschrieben. In fliessendem Übergang nimmt die Aktivität distalwärts ab. Am Ende des Trennungsprozesses verarmt die Trennschicht an Enzym, so dass die abgerundeten Zellen der frischen Narbe praktisch phenoloxidasefrei sind (Abb. 18). Das Enzym ist stets plasmatisch lokalisiert.

Peroxidase: Eine analoge Entwicklung wie die Phenoloxidase macht die Peroxidase durch: Breite Aktivitätszunahme in der ganzen Blattfallzone während deren Entwicklung mit einem Maximum in der Schutzschicht, Aktivitätsabnahme in den letzten Phasen des Trennprozesses, so dass die exponierten Zellen an Peroxidase verarmt erscheinen (Abb. 19). Die Lokalisation des Enzyms ist in der Trennschicht gleich wie in der Schutzschicht, also hauptsächlich im Plasma, aber auch in der Wand und in den sich bildenden Interzellularen. In grösseren Interzellularen fehlt es. Etwa 5 % aller Zellen der Trennschicht weisen enorm gequollene Wände mit starker Peroxidaseaktivität auf (Abb. 20). Wegen ihrer Seltenheit kann diese Erscheinung nicht für den entscheidenden Prozess bei der Separation angesehen werden, was die Richtigkeit der Lockerungshypothese von Nuotclà (1969) bestätigen würde.

Die abgefallenen Blattstiele verdorren bald. Summarisch seien einige Beobachtungen an frisch gefallenen Stielen erwähnt:

Mit Rutheniumrot kann auch hier eine totale Verarmung an Pektin in den äussersten Zellen festgestellt werden. Mit dem Aufklaffen des Spaltes hatte sich unmittelbar unter der Trennschicht durch Einziehen von Querwänden ein schmales Wundmeristem gebildet. Auch im Stiel ist diese Differenzierung mit gesteigerter Peroxidaseaktivität verbunden, wobei das Enzym ebenfalls nicht nur im Plasma, sondern auch in Mittellamelle und Interzellularen nachgewiesen werden kann (Abb. 21). Wie im Blattkissen erscheinen auch im Stiel die exponierten, abgerundeten Zellen an Peroxidase verarmt (Abb. 19).

Blattstielnarbe und Blattkissennarbe weisen also im Moment des Blattfalls ein spiegelbildliches histochemisches Muster auf. Das bestätigte auch ein einzelner Test auf saure Phosphatase, der in beiden Fällen folgende Lokalisation ergab: Während pie prospektive Schutzschicht eine stark erhöhte Enzymaktivität aufweist, die nach droximal fliessend abnimmt, erscheint die Trennschicht völlig an Enzym verarmt (Abb. 22). Die Lokalisation ist stets ausschliesslich plasmatisch.

3.2.3 Vernarbung

Bei einer Anzahl von Versuchspflanzen wurde im Frühsommer durch Entfernen der Spreite aller Blätter A–F der Blattfall ausgelöst und die Vernarbung induziert.

Bald nach erfolgter Trennung setzen in den jüngeren Knoten wenige Zellschichten unter der Narbe Teilungen ein. Mit diesem Einziehen von Querwänden wird also ein Vorgang nachgeholt, der in den älteren Knoten schon lange vor der Trennung abgelaufen war. Dasselbe Verhalten beschrieben Gawadi und Avery (1950) für *Poinsettia*. Mit der Querwandbildung ist eine Zunahme der Peroxidaseaktivität korreliert, wie dies für die normale Ausbildung der prospektiven Schutzschicht bereits beschrieben worden ist. Damit weisen alle Narben histologisch uniforme Verhältnisse auf. In allen greifen nun Verkorkungsvorgänge Platz, die nach ca. zwei Wochen abgeschlossen zu sein scheinen (Abb. 23, 24). Der erste Nachweis einer Verkorkung gelingt einige Tage nach der Trennung. Mit Phloroglucin kann gezeigt werden, dass keine Lignifizierung stattfindet. Peroxidase ist unverändert stark aktiv in der Schutzschicht. Trotzdem kann das Enzym kaum für die Adkrustation verantwortlich gemacht werden, da es ja bereits im unbehandelten Knoten Wochen vor der Verkorkung mit erhöhter Aktivität nachzuweisen ist. Interessant ist auch, dass in den geschrumpften Zellen der ehemaligen Trennschicht immer noch eine positive Peroxidasereaktion zu beobachten ist (Abb. 25). Die scheinbar sogar verstärkte Aktivität in diesem Bereich rührt daher, dass infolge der Austrocknung der Vakuolen nun pro Volumeneinheit eine viel grössere Menge von positiv reagierendem Plasma vorhanden ist.

Fünf Wochen nach dem Blattfall sind an der Narbe keine Änderungen gegenüber den eben beschriebenen Verhältnissen eingetreten, obwohl die Peroxidaseaktivität nach wie vor erhöht ist. Dagegen treten im Stengel jetzt sekundäres Dickenwachstum und Verholzung auffällig in Erscheinung. Die Verholzung verschont unter der Blattbasis und dem Ansatz des Achselsprosses eine im Querschnitt mandelförmige Blattlücke, deren Gestalt durch den Verlauf von Blatt- und Seitensprossleitbündeln bestimmt wird (Fig. 2–4). Darum herum sind besonders die seitlichen verholzten Ränder nach aussen aufgewölbt, wodurch sie sich bis auf zirka 20–30 Zellschichten der Narbe nähern. Peroxidaseaktivität ist auffällig unmittelbar innerhalb des Kambiums

in den jungen, sich differenzierenden Elementen sowie in einzelnen grösseren Gefässgruppen des sekundären Xylems (Abb. 26). Die Aktivität ist in den Zellwänden lokalisiert.

Im folgenden Monat ergreift die Verholzung auch die erwähnte Blattlücke, wobei das interfaszikuläre Kambium wie ein Zirkuszelt an den beiden Hauptleitbündeln des ehemaligen Blattstiels über die Lücke gespannt wird, das heisst, es berührt an der Durchtrittsstelle dieser Leitbündel nahezu die Narbe und weicht gegen die Ränder von dieser zurück. Mit dieser Anordnung wird die Narbe in den Stengel integriert und wird auch von dessen Dilatationswachstum betroffen. Die Narbe zerreisst, und eine zweite Schutzschicht wird durch erneute, unmittelbar darunter liegende Quer- und einzelne Längsteilungen gebildet. Dieser Prozess ist begleitet von einer Verarmung der ursprünglichen Schutzschicht an Peroxidase und einer starken Aktivitätszunahme des Enzyms im Bereich der neuen Schutzschicht (Abb. 27). Wiederum ist Peroxidase in charakteristischer Weise in den kleinen Interzellularen und im Plasma lokalisierbar, während das Enzym in der Wand selbst nur teilweise gefunden werden kann (Abb. 28).

Damit erscheint nach rund drei Monaten die definitive Ausgestaltung der Narbe erreicht zu sein; weitere Untersuchungen 15 und 20 Wochen nach dem Blattfall ergaben keine Veränderungen gegenüber den beschriebenen Verhältnissen.

3.3 Experimentelle Beeinflussung des Blattfalls

Calcium: Wenn Calcium tatsächlich der entscheidende Faktor für den Zusammenhalt von Zellen ist, so muss sich durch eine Entfernung dieses Kations der Blattfall vorzeitig induzieren bzw. durch Calciumzufuhr verhindern lassen. Dass Calcium in der Trennschicht bei der Separation abnimmt, wurde im Abschnitt 3.2.2 beschrieben.

In einer ersten Versuchsreihe wurde Calciumnitrat unter Zusatz von 0,1 % Triton X-100 äusserlich auf Blattfallzonen appliziert und der Blattfall durch Entfernen der Spreite induziert. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Bei einer Dauer bis zum Blattfall von 4 ½ d verzögert Ca^{++} um durchschnittlich ½ d.
2. Nur 0,1 m Lösungen sind wirksam. Stärker konzentrierte wirken toxisch, schwächere sind unwirksam.
3. Die Behandlung ist nur dann erfolgreich, wenn die erste Applikation einige Stunden vor der Entfernung der Spreite erfolgt und wenn sie mehrmals wiederholt wird, bis die Stielstümpfe schliesslich abfallen.

Damit wird evident, dass Zufuhr von Calcium zwar einen geringen verzögernden Einfluss hat, dass es aber keineswegs von entscheidender Bedeutung für den Trennvorgang sein kann.

Immerhin sollte kontrolliert werden, ob etwa mangelhaftes Eindringen nur zu derart schwacher Wirkung geführt hat. Mittels einer feinen Injektionsnadel wurden je 10 μl Calciumnitrat 0,1 m bzw. Wasser direkt in die Blattfallzonen injiziert. Es ergaben sich folgende Resultate:

1. Alle Injektionsversuche, sei es mit Aqua dem. oder mit der Calciumlösung, führten zu einer Verzögerung des Blattfalls von 20–40 % gegenüber den Kontrollpflanzen, deren Spreite gleichzeitig entfernt worden war. Dabei wirkte Wasser eher stärker als Calcium.

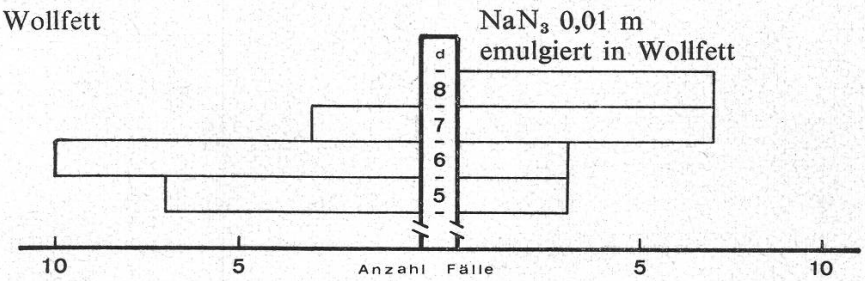
2. Anscheinend wird also die tatsächliche, aber schwache Calciumwirkung durch Einflüsse des Wundreizes überlagert und verdeckt.

In einer dritten Versuchsreihe wurde schliesslich der Einfluss einer vermehrten Entfernung von Calcium durch Oxalat (Ammoniumoxalat 0,2 m unter Zusatz von 0,1 % Triton X-100) geprüft (Frey-Wyssling, 1959). Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei den ersten Versuchen mit Calciumzufuhr. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuch und Kontrolle.

Alle diese Hinweise erlauben den Schluss, dass Calcium keinesfalls ein kausales Agens des Blattfalles sein kann. Vielmehr ist sein Schwund als Folge des Pektinabbaues zu interpretieren.

Peroxidase: Wenn Peroxidase tatsächlich das Enzym der Matrixlockerung im Sinne von Nuotclà (1969) wäre, dann müsste eine Hemmung des Enzyms den Blattfall verzögern.

Es wurde an Knoten E und F gleichzeitig mit der Entfernung der Spreite Wollfettpaste auf die Blattfallzone aufgebracht, die emulgiert Natriumazid enthielt. Wie aus Figur 11 hervorgeht, vermag diese Behandlung den Blattfall nicht signifikant zu verzögern. Dieses Resultat unterstützt die Vorstellung, dass Peroxidase nicht direkt in den Trennprozess eingreift. Vielmehr muss geschlossen werden, dass das Enzym wohl in einer initialen Phase (z.B. bei der Bildung der Schutzschicht) eine Rolle spielt, beim eigentlichen Trennvorgang aber funktionslos ist, so dass seine Hemmung irrelevant ist.



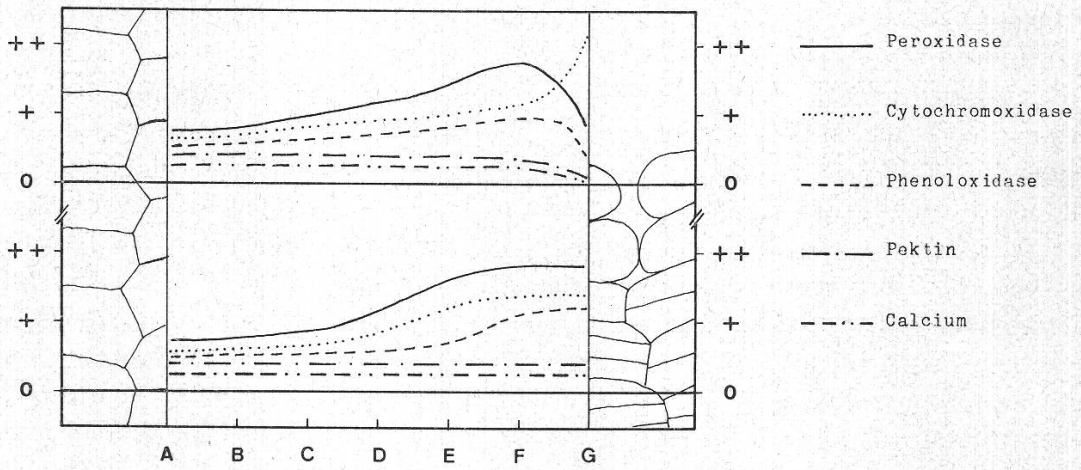
Figur 11

Coleus. Dauer in Tagen (Ordinate) bis zum Blattfall nach Entfernung der Spreite bei Knoten D und E

3.4 Vorläufige Diskussion

Diese Diskussion hat den Zweck, das als unwahrscheinlich Erkannte auszuscheiden und jene Befunde herauszuarbeiten, die durch weitere Untersuchungen an anderen Objekten genauer zu belegen sind. Sie basiert auf der qualitativen Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse (Fig. 12). Aus dieser Figur wird deutlich, dass Schutzschicht und Trennschicht aus ursprünglich identischer Anlage eine divergente Entwicklung erleben. Während mit der Differenzierung der Blattfallzone in ihrer ganzen Ausdehnung ein allgemeiner Aktivitätsanstieg aller Enzyme einhergeht, zeigen die letzten Stadien vor dem Blattfall (Knoten F, G) eklatante Unterschiede zwischen Schutzschicht und Trennschicht. Diese Beobachtungen können so interpretiert werden, dass die Schutzschicht juvenilisiert wird, während die Trennschicht beschleunigt altert. Die Lokalisation der sauren Phosphatase unterscheidet besonders klar zwischen den meristematischen Zellen der Schutzschicht und den alternden Zellen der

Trennschicht (Abb. 22). Ebenso lassen sich die Beobachtungen an der Cytochromoxidase am besten mit diesem Konzept erklären: Die auffällige Zunahme in der Trennschicht gegen Ende des Trennvorganges beruht wohl auf einem progressiven Zerfall der Mitochondrien, wie er von Spencer (1965) in alternden Apfelzellen nachgewiesen werden konnte. Ohne die hemmenden Membranen tritt die Aktivität des Enzyms stärker in Erscheinung (vgl. Diskussion über Enzymaktivität kontra Strukturerhaltung bei Chayen et al., 1969, S. 14).



Figur 12

Coleus. Qualitatives Schema der histochemischen Muster beim Blattfallprozess. Reaktionsintensität (Ordinate) in den Stadien A–G (Abszisse). Bedeutungsspaltung zwischen Schutzschicht (unten) und Trennschicht (oben). Der Vergleich bezieht sich auf die Schnittpunkte der Null-Linien durch die topographischen Skizzen

Die Beobachtung, dass die Peroxidaseaktivität vor dem Blattfall in der Schutzschicht wie in der Trennschicht, also in zwei Geweben von durchaus verschiedener prospektiver Bedeutung, erhöht ist, führte zur «Cutinhypothese». Danach würde Peroxidase in den Stoffwechsel der Oxyfettsäuren eingreifen und in der Schutzschicht zu einer frühzeitigen Suberinadkrustation führen. Derselbe Reaktionsschritt in der Trennschicht würde zu einer Cutinexkretion führen, die Mittellamelle schmierig machen und damit die Trennung einleiten. Es steht fest, dass Peroxidase eine bedeutende Rolle im Cutinstoffwechsel spielt (Heinen und van den Brand, 1963; Heinen, 1963; Crisp, 1965, nach Martin und Juniper, 1970). Freilich ist das Enzym bisher ausschliesslich beim Abbau von Cutin nachgewiesen worden. Beim Aufbau dagegen wurde die Verbindung von Fettsäureketten über Peroxidbrücken durch Lipoxidase als entscheidende Vorstufe der Polymerisation erkannt (Heinen und van den Brand, 1963). Peroxidase könnte hier durch Spaltung der Peroxidbrücken allenfalls eine regulatorische Funktion haben. Experimentell konnte indessen weder in der Trennschicht (Abb. 11) noch in der Schutzschicht (Abb. 12) vor der Separation ein positiver Lipidnachweis erbracht werden. Die angedeutete «Cutinhypothese» muss somit verworfen werden. Abbildungen 11 und 12 sind Ausschnitte aus demselben Präparat, die unmittelbar nacheinander fotografiert wurden. Auffällig ist, dass die gequollene Zellwand in Abbildung 12 zirka 5mal dicker ist als in Abbildung 11, ein Hinweis auf den weitgehend erfolgten Abbau von Wandpolysacchariden in der Trennschicht.

Eine Bestätigung erfährt die Vorstellung von der Rolle der Peroxidase bei der Ligninbildung durch folgende Beobachtungen: Zellen im Zustand des Verholzens (z. B. Sklerenchymfasern, sekundäres Xylem) zeigen auf der ganzen Dicke der Zellwand eine intensive Peroxidaseaktivität (Abb. 26, 29). Im sekundären Xylem reagiert eine Zone sich differenzierender Holzelemente unmittelbar innerhalb des Kambiums positiv. Innerhalb dieser zirka 6–8 Zellen breiten Zone ist die Lignifikation abgeschlossen (Freudenberg und Neish, 1968, S. 98, Fig. 1), und die Peroxidasereaktion fällt negativ aus. Positiv reagieren weiterhin einzelne grosse Gefässe, in denen offenbar die Inkrustation fortgesetzt wird (Abb. 26). Analoge Befunde sind von Nuotclà (1969) unnötig kompliziert gedeutet worden: Peroxidase könne deshalb nicht an der Ligninsynthese beteiligt sein, sondern nur eine vorgängige Lockerung der Matrix bewirken, weil an Stellen intensiver Peroxidasereaktion die Phloroglucinfärbung schwach ausfällt. Bekanntlich läuft die Kondensation von Phloroglucin an Koniferylaldehyd nicht stereotyp ab, sondern nur unter spezifischen, im einzelnen noch ungeklärten Bedingungen, die im Moment der Biosynthese offenbar nicht gegeben sind. Auch bei anderen Objekten versagt Phloroglucin oft ganz unerklärlich. Seit der erstmaligen Veröffentlichung der angedeuteten Vorstellungen von der Ligninbiosynthese durch Siegel (1953) konnte wiederholt gezeigt werden, dass fertig lignifizierte Zellen peroxidasefrei sind, ihre unmittelbaren ontogenetischen Vorläufer aber starke Aktivität zeigen. Es scheint in der Tat eine der Funktionen von Peroxidase zu sein, Koniferylalkohol zu dehydrogenieren und damit die freien Radikale zu schaffen, die sich dann nichtenzymatisch zum Polymer verbinden (Neish, 1965).

Beim vorliegenden Objekt scheint also die Rolle der Peroxidase beim Blattfall vor allem im Zusammenhang mit der Bildung der Schutzschicht zu stehen. Diese Vorstellung soll an einigen anderen Objekten verifiziert werden. Die Lokalisation von Enzymen und Substanzen im Bereich von Zellwänden und Interzellularen kann lichtmikroskopisch bei *Coleus* nicht weiter vorangetrieben werden, da die Wände dünn, die Interzellularen spärlich sind. EM-optisch liegt die histochemische Untersuchung von Bornman (1967) vor, die bei *Coleus* den Abbau von Pektin in der Mittellamelle unter Bildung von lysigenen Spalträumen belegt. Für die weiteren Untersuchungen wurden deshalb teilweise Objekte mit dicken Zellwänden ausgewählt, um auch lichtmikroskopisch einen gewissen Einblick in schizolytische Vorgänge zu erhalten.

4 Versuche an weiteren Objekten

4.1 Coffea arabica

Bei *Coffea* lässt sich der Blattfall durch Entfernen der Spreite nur unzuverlässig induzieren. Fast alle Stielstümpfe verbleiben einige Tage unverändert am Zweig und verdorren dann allmählich, während das Blattkissen eine normale Narbe ausbildet. Die nachstehenden Versuche beziehen sich alle auf unbehandelte Zweige; sie geben die Veränderungen in den Blattfallzonen als Funktion des physiologischen Alters wieder.

Unter den vorhandenen Bedingungen bildet eine 3- bis 4jährige Pflanze jedes Jahr etwa drei Blattpaare pro Zweig aus. In der folgenden Vegetationsperiode verholzt das betreffende Zweigstück, und in ihrem dritten Altersjahr vergilben die Blätter und fallen ab. Eine Blattfallzone ist äusserlich bereits vor Beginn der Verholzung

deutlich erkennbar. Die Verholzung erfasst das Blattkissen nicht, so dass nach dem Blattfall die Narbe auf einem grünen Höcker sitzt. Dieser wird später «abgeschliffen», wie dies Pfeiffer (1928) für viele Holzgewächse nachgewiesen hat. Die beiden interpetiolaren Nebenblätter jedes Knotens laufen als häutiger Kragen zwischen Achselknospe und Blattbasis rings um den Stengel herum. Sie sind auf Abbildungen 31 bis 33 im Längsschnitt zu erkennen. Mit zunehmendem Alter füllen Klumpen von Kristallsand eine immer grössere Zahl von Parenchymzellen in Blattstiel und Stengelrinde. Dieses Material konnte als Calciumoxalat identifiziert werden.

Der junge Knoten lässt keine histologische noch histochemische Differenzierung an der Stelle der prospektiven Blattfallzone erkennen. Chlorzinkjod färbt uniform schwarzviolett. Die Pektinreaktion ist gleichmässig im ganzen Parenchym der Blattbasis (Abb. 30), dasselbe gilt vom Calciumnachweis. Die Phenoloxidasereaktion ist uniform positiv (Abb. 31). Die Aktivität ist im Plasmawandbelag lokalisiert, Zellwände und Interzellularen bleiben ungefärbt. Dieselben Feststellungen gelten für die Peroxidase.

Diese Beobachtungen treffen auch für die zweite Vegetationsperiode zu, ja in mancher Hinsicht sogar für das vergilbende Blatt der dritten Vegetationsperiode (Abb. 32). Selbst an einem fast völlig vergilbten Blatt zeigen sich histologisch keine Anzeichen des bevorstehenden Blattfalls, das heisst, es treten weder Querteilungen noch Interzellularenbildung ein, noch können im Leitgewebe etwa Thyllen beobachtet werden. Die Reaktion mit Chlorzinkjod ergibt eine uniforme Violettfärbung über die ganze prospektive Blattfallzone hinweg. Die Phenoloxidaseaktivität ist stärker als im jungen Organ, aber nach wie vor nur im Plasma lokalisiert. Auch diese Reaktion fällt im Parenchym der ganzen Blattstielbasis uniform aus. Ein ebenso gleichmässiges Bild ergeben die Pektinnachweise. Einzig Peroxidase zeigt im Blattstiel eine etwas höhere Aktivität als im Blattkissen, wo die Reaktion gleich wie im jungen Blatt ausfällt. Der Übergang ist fliessend. Das Enzym ist unverändert plasmatisch lokalisierbar.

Erst wenn das Blatt an den Rändern zu verdorren beginnt, werden histologische und histochemische Veränderungen gegenüber den jugendlichen Verhältnissen deutlich: Zuerst zeigt sich in einem etwa 10 Zellen breiten Ring an der prospektiven Blattfallzone eine Ausdünnung der Ca-Oxalat-Massen (Abb. 33). Sie kommt dadurch zustande, dass in der dritten Vegetationsperiode lokal eine weitere Exkretion unterbleibt. Im selben Bereich tritt eine auffällige Verarmung an Peroxidase ein (Abb. 34).

In diesen Zellwänden sind Tüpfel zu erkennen, die von Plasmodesmen mit positiver Peroxidasereaktion durchzogen werden (Abb. 35). Solche Tüpfel sind indessen auch im angrenzenden Parenchym vorhanden, doch fallen sie dort infolge der starken Allgemeinreaktion nicht auf. Einzelne Interzellularen können sowohl in der Blattfallzone wie auch im Nachbargewebe beobachtet werden. Sie sind stets peroxidasefrei (Abb. 3). In der Trennschicht fallen nun Pektin- und Ca-Nachweis negativ aus (Abb. 36). Die Pektinausdünnung beginnt zentral, wobei manche Zellwände eine gewisse Schwellung aufweisen. Anschliessend weichen an derselben Stelle die Zellen schizolytisch auseinander (Abb. 37). Sie behalten dabei ihre Gestalt. Es bildet sich ein schmaler, linsenförmiger Hohlraum, der sich schliesslich bis zur Epidermis erweitert, worauf der Blattfall eintritt. Mit Chlorzinkjod fällt die Violettfärbung beidseits des Spaltes besonders intensiv aus (Abb. 38). Nach dem Abbau der Pektine

ist offenbar die Quellung der Cellulosefibrillen erleichtert, was ihre Färbbarkeit verstärkt.

Gleichzeitig mit diesen Vorgängen leiten Querteilungen mehrere Zellagen proximal der Trennschicht die Bildung einer Schutzschicht ein (Abb. 39). Diese Teilungen beginnen adaxial-subepidermal. Es konnte noch nicht abgeklärt werden, ob die Schutzschicht später mit dem Stengelperiderm (Abb. 40) in Verbindung tritt, dessen Differenzierung zu diesem Zeitpunkt ebenfalls einsetzt.

Trennschicht und Schutzschicht sind bei diesem Objekt räumlich getrennt. Zeitlich erfolgt die Differenzierung beider Gewebe spät, erst kurze Zeit vor dem Blattfall, wenn das ganze Blatt bereits völlig vergilbt und teilweise verdorrt ist. Der Peroxidasegehalt des *Coffea*-Gewebes ist allgemein höher als bei *Coleus*. Eine Beteiligung des Enzyms am Trennprozess erscheint ausgeschlossen. Aufgrund der Beobachtungen dürfte vielmehr die Pektinmethylesterase bzw. die Pektinase eine entscheidende Rolle spielen.

4.2 Annona squamosa

Annona squamosa ist eine wichtige Nutzpflanze, die heute zirkumtropisch angebaut wird und den «sugar-apple» liefert, eine apfelgrosse, süsse Frucht, die auch als «Eierrahmfrucht» bezeichnet wird.

In jeder Blattachsel sind neben der sichtbaren Achselknospe serial absteigend meist drei Beiknospen vorhanden. Diese sind in eine Höhle eingeschlossen, die durch das Blattkissen gebildet wird und sich adaxial öffnet. Die Blattfallzone wird an der dünnsten Stelle der Höhlenwand hufeisenförmig angelegt. Während bei *Coffea* kein Zusammenhang zwischen der Struktur des Blattkissens und dem Ort der Blattfallzone nachzuweisen ist, fällt hier – ähnlich wie bei *Coleus* – die Korrelation zwischen den anatomisch-morphologischen Gegebenheiten und dem Ort der Blattfallzone auf. Und zwar wird hier noch deutlicher als bei *Coleus* der strukturell schwächste Bereich zur Blattfallzone. Histologisch ist deren Anlage bereits im jüngsten, halb ausgewachsenen Blatt eines Zweiges erkennbar: Eine 5 bis 10 Zellen breite Schicht unterscheidet sich durch ihren Plasmareichtum vom angrenzenden Parenchym. Die frischen Schnitte bräunen sich bald und ausschliesslich in dieser Zone, ein Hinweis für die lokale Anwesenheit von Phenolen und Phenoloxidasen.

Im jungen Blatt fällt der Peroxidasenachweis in allen Zellen positiv aus, in der prospektiven Blattfallzone eher schwächer als im benachbarten Gewebe. Das Enzym ist plasmatisch lokalisiert, die Wände bleiben ungefärbt. Die Verteilung von Calciumoxalatdrusen in der Leitbündelscheide und Steinzellgruppen im Parenchym zeigt keine Rücksicht auf die Anlage der Blattfallzone. Ebensowenig sind in dieser Zone Teilungen oder sonstige histologische Unterschiede gegenüber dem Grundplasma zu beobachten. Bei diesem Objekt stören zeitweilig grosse Schleimmengen, die aus den angeschnittenen Zellen austreten und sich mit fast allen Reagenzien anfärben.

Im jungen Blatt ist die Blattfallzone vor allem marginal deutlich. Bald durchsetzen aber die plasmareichen Zellen die ganze Wandbreite der Knospenhöhle.

Damit im Zusammenhang steht wohl das Ausbleiben einer weiteren Rekretdeposition im Bereich der Blattfallzone. Wiederum aber wird das Leitgewebe von keinen sichtbaren Veränderungen betroffen. Drastische Veränderungen greifen erst Platz, wenn gegen Ende der zweiten Vegetationsperiode der Blattfall fällig ist. Nun kommt in den Zellen der Blattfallzone zu einer erhöhten Phenoloxidaseaktivität (Abb. 41)

eine intensive Peroxidasereaktion hinzu (Abb. 42). Peroxidase ist vorwiegend plasmatisch lokalisiert, daneben reagieren aber auch viele Interzellularen deutlich positiv (Abb. 43); Phenoloxidase ist ausschliesslich plasmatisch. Im Blattstiel ist eine leichte Verarmung an Peroxidase zu beobachten, die unmittelbar distal der Blattfallzone am ausgeprägtesten ist. Auch in diesem Stadium, also unmittelbar vor dem Blattfall, ergibt Hydroxylamin noch immer eine uniforme Pektinverteilung.

Nun setzt am abaxialen Stielrand die Spaltbildung ein, eine Schizolyse, die sich mitten durch die 3- bis 4schichtige peroxidasereiche Zone zieht. Das Leitgewebe wird mechanisch abgeschert. Gleichzeitig und auch noch anschliessend an die Trennung setzen unmittelbar unter der exponierten Narbenfläche in und proximal der peroxidasereichen Zone Querteilungen ein, die die Bildung einer Schutzschicht einleiten. Deren Zellen verkorken bald. Im Vergleich mit *Coleus* ist vor allem hervorzuheben, dass es sich bei *Annona* nicht um eine artreine Schizolyse handelt, sondern dass auch rhexolytische Vorgänge eine Rolle spielen. Weitere Unterschiede in bezug auf räumliche Gliederung der Gewebe und «timing» der Vorgänge werden später gesamthaft diskutiert werden.

4.3 Phaseolus vulgaris

Anatomie und Histochemie des Blattfalls bei der Bohne sind ungewöhnlich gut erforscht (Brown und Addicott, 1950; Scott et al., 1964; Scott et al., 1967; Webster, 1968, und besonders Rasmussen und Bukovac, 1969). Die letztgenannten Autoren untersuchten die Blattfallzone des Primärgelenks und fanden als Vorboten des Blattfalls Schwellungen der Pektinmatrix in den Zellen der Trennschicht, gefolgt von einer Auflösung cellulosischer und nichtcellulosischer Wandkomponenten. Sie erkannten den Trennprozess als Nebeneinander schizolytischer und histolytischer Vorgänge. Es galt nun abzuklären, ob Peroxidase mit der beobachteten Pektinschwellung korreliert ist, wie dies nach Nuotclà (1969) zu erwarten wäre, und/oder ob das Enzym auch bei diesem Objekt in besonderem Masse mit der meristematischen Schutzschicht verknüpft ist.

Es wurden Primärblätter von Pflanzen mit drei trifoliaten Blättern verwendet. Der Blattfall wurde wie in der Arbeit von Rasmussen und Bukovac (1969) durch Entfernen der Spreite induziert. An unbehandelten Blattbasen kann weder die Anlage einer Schutzschicht noch einer Trennschicht beobachtet werden. Alle Zellen weisen eine gewisse Peroxidaseaktivität auf. Bei den Teilungen, die bald nach der Entfernung der Spreite einsetzen und zur Bildung einer Schutzschicht führen (Webster, 1968, Abb. 24), ist das Enzym in erhöhtem Masse vorhanden (Abb. 44). Wie in den übrigen Zellen ist es auch hier vermutlich vorwiegend im Plasmawandbelag, aber auch in der Wand selbst und in Interzellularen lokalisiert. Unmittelbar distal der Schutzschicht spielen sich in der Trennschicht die von Rasmussen und Bukovac (1969) beschriebenen Vorgänge ab. Entgegen den Erwartungen zeigen die etwas gequollenen Zellwände weder eine stärkere Reaktion noch eine andere Lokalisation der Peroxidase als die benachbarten (Abb. 45). Die scheinbar intensive Reaktion in den äussersten Zellen in Abbildung 45 ist insofern ein Artefakt, als dort mehrere Zellagen zusammengeschrumpft sind, wodurch sich ihre Reaktionen lokal addieren. In einzelnen Fällen können analoge Bilder wie Abbildung 20 bei *Coleus* beobachtet werden, wo starke Peroxidaseaktivität in blasenförmig aufgetriebenen Wänden herrscht. Wie dort kann auch hier diese Erscheinung wegen ihrer Seltenheit keines-

falls als kausale Grundlage des Trennungsprozesses angesehen werden. Peroxidase dürfte also auch bei *Phaseolus* eine Rolle bei der Bildung der Schutzschicht, nicht aber beim eigentlichen Trennvorgang spielen.

Es ist eigenartig, dass gerade die Bohne ein so gutes Modell für Blattfallstudien darstellt. Bei dieser einjährigen Pflanze spielt natürlicherweise der Blattfall kaum eine Rolle. Einzig einige der ältesten Blätter können gegen Schluss der Vegetationsperiode durch die Anlage eines sekundären Abschlussgewebes irisblendenartig abgeschnürt werden, die meisten Blätter verdorren aber, ohne abzufallen, mit dem ganzen Rest der Pflanze zusammen. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Kompetenz zum Abwurf von Organen weiter verbreitet ist, als es den Anschein macht, dass aber oft erst im Experiment die entsprechenden inneren und äusseren Bedingungen gegeben sind, die zur Auslösung des Vorganges führen.

4.4 Begonia sanguinea

Auch bei dieser Pflanze ist vom eben erwachsenen Blatt an die Blattfallzone schon äusserlich gut erkennbar. Histologisch handelt es sich wie bei *Coleus* um die Anlage einer prospektiven Schutzschicht. Dieses Meristem bildet eine zirka 5 bis 8 Zellen breite Scheibe, die besonders marginal deutlich differenziert ist. Alle Zellen der Blattbasis geben eine kräftige Peroxidasereaktion, die Schutzschicht hebt sich nicht ab. Das Enzym wird sowohl im Plasma wie in den Wänden gefunden, wobei die Frage «an oder in der Wand» wiederum angesichts der geringen Wanddicke nicht schlüssig beantwortet werden kann.

Drei Tage nach Entfernung der Spreite zeigen sich noch keine Unterschiede in bezug auf Histologie und Peroxidaseverteilung. Die Anfärbung mit Chlorzinkjod fällt indessen in der prospektiven Schutzschicht schwächer aus als im angrenzenden Parenchym und weist einen deutlichen Gelbstich auf.

Zehn Tage nach Entfernung der Spreite hebt sich mit Chlorzinkjod die Schutzschicht in einem gelbbraunen Farbton vom übrigen Gewebe ab. Histologie und Peroxidasereaktion sind unverändert. Mit ammoniakalischem Gentianaviolett kann bestätigt werden, dass zentral bereits eine gewisse Verkorkung der Wände in der Schutzschicht stattgefunden hat. Zu diesem Zeitpunkt fallen die ersten Stielstümpfe ab, die letzten zwei Tage später. Die Narbe ist glatt. Ihre Oberfläche wird durch eine Lage abgerundeter Zellen gebildet, die unmittelbar distal an die Schutzschicht anstossen. Die Topographie ist also gleich wie bei *Coleus*. Die Schizolyse in der Trennschicht erfolgt indessen plötzlich und scheinbar ohne Vorbereitungen. In dieser Schicht sind die Wände rein cellulosisch, während in der Schutzschicht die Verkorkung nach erfolgter Trennung noch deutlicher in Erscheinung tritt.

Coleus und *Begonia* zeigen eine weitgehende Übereinstimmung in bezug auf Histologie und Histochemie des Blattfallprozesses. Unterschiedlich ist indessen der zeitliche Ablauf der einzelnen Vorgänge. Besonders deutlich ist dies bei der Verkorkung der Schutzschicht, die bei *Begonia* bereits vor dem Blattfall einsetzt und als eigentlicher Promotor der Trennung betrachtet werden muss.

4.5 Plumeria acutifolia

Die im Gewächshaus des Institutes gedeihenden Exemplare von *Plumeria* werfen alljährlich im Herbst alle Blätter ab, nachdem diese zuvor samt Blattstiel völlig ver-

gilbten. Das junge, zirka 13 cm lange Blatt zeigt eine ungewöhnlich hohe Allgemeinaktivität an Peroxidase. Alle Zellen reagieren uniform, wobei jeweils die H_2O_2-Konzentration auf $^1/_{10}$ der üblichen gesenkt werden musste, um klare Bilder zu erhalten. Die Reaktionsprodukte werden an den Wänden im Plasmawandbelag, teilweise auch in den Wänden gefunden.

Dieselben Feststellungen treffen für das ausgewachsene Laubblatt zu. Auch das allmählich vergilbende Blatt zeigt keinerlei histologische oder histochemische Veränderungen in der prospektiven Blattfallzone. Diese ist äusserlich bereits in den jüngsten Blättern als deutliche Einschnürung am Übergang Blattkissen–Blattstiel klar erkennbar. Mit dem fortschreitenden Vergilben bildet diese Einschnürung auch die Grenze zwischen dem satten Grün des Stammes und dem Gelb des Blattstieles. Von dieser Phase an schieben sich vom Rand her 3 bis 4 Zellen breite Keile erhöhter Peroxidaseaktivität irisblendenartig gegen das Zentrum vor. Diese peroxidasereiche Scheibe liegt unmittelbar distal der prospektiven Trennungsschicht (Abb. 46). Ihre Zellen zeigen keinerlei Gestaltunterschiede gegenüber ihren Nachbarn. Die Lokalisation des Enzyms ist unverändert (Abb. 47).

In einer wenig späteren Phase ist proximal der beschriebenen Zone eine gewisse Ausdünnung der Peroxidase zu beobachten. Dort werden die Zellwände gleichzeitig kontrastärmer und zeigen eine schwächere Reaktion mit Hydroxylamin. Ein Verquellen ist dabei nicht festzustellen. In einem letzten Stadium, unmittelbar vor dem Blattfall, setzt anschliessend proximal ebenfalls eine verstärkte Peroxidaseaktivität ein, die sich auf etwa 4 bis 5 Zellagen beschränkt (Abb.48). Der Blattfall greift schizo- und teilweise histolytisch in der peroxidasearmen Schicht zwischen den beiden peroxidasereichen Zonen Platz. Mit Chlorzinkjod erweist sich alles Gewebe im Moment der Trennung als unverholzt. Nach der Trennung setzen in der proximalen peroxidasereichen Zone Querteilungen ein. Es bildet sich ein Wundperiderm, das bald verkorkt.

5 Diskussion

5.1 Vergleich der beobachteten Blattfallmodi

Es konnte keine klare Korrelation zwischen Lebensform und Blattfallmodus nachgewiesen werden. Daraus wird deutlich, dass der Unterschied zwischen einem laubwechselnden und einem immergrünen Baum eben kein qualitativer ist, sondern nur das «timing» des Blattfalls betrifft. Ferner steht fest, dass auch einjährige Kräuter die Fähigkeit zum Blattabwurf nicht verloren haben; es müssen einzig die richtigen äusseren und inneren Bedingungen zu dessen Auslösung geschaffen werden.

Histologisch ist die Hauptkomponente des Trennungsprozesses bei allen untersuchten Arten eine Schizolyse. Bei *Begonia* tritt Rhexolyse hinzu, bei *Phaseolus* Histolyse (Webster, 1968). Dass dabei in allen Fällen, besonders deutlich bei *Coffea*, eine lokale Auflösung von Pektinen stattfindet, bestätigt frühere Deduktionen (Pfeiffer, 1928), EM-optische Untersuchungen, die Spalträume in Mittellamelle und Primärwand zeigen (Bornman, 1967; Jensen und Valdovinos, 1967; Valdovinos und Jensen, 1968) sowie biochemische (Morré, 1968) und histochemische (Stösser et al., 1969) Befunde an analogen Objekten. Histochemisch kann vorläufig nur das Verschwinden der Substanz, nicht aber die Wirkung der entsprechenden Enzyme, ge-

zeigt werden. Parallel zu den Pektinen nimmt auch Calcium ab. In biochemischen Untersuchungen konnten an verschiedenen Objekten ebenfalls sowohl die Abnahme an Ca^{++} (Stösser et al., 1969) und Pektinmethylesterase (Osborne, 1958) wie auch die Zunahme an Pektinase (Morré, 1968) nachgewiesen werden. Zwei Möglichkeiten der Pektinauflösung sind denkbar: Vollständig methylierte Uronide werden durch Pektinase nicht umgesetzt (Frey-Wyssling, 1959); andererseits sind sie leicht wasserlöslich, so dass bei Hemmung der Pektinmethylesterase von selbst eine Verflüssigung eintritt (Yager, 1960). Werden dagegen Pektinmethylesterase und Pektinase gefördert, so wird eine Hydrolyse der Uronide ermöglicht.

Deutliche Unterschiede zeigten sich im Habitus der Trennschicht: Während bei *Coleus* und *Coffea* als Auftakt der Trennung Interzellularen auftreten, bleibt in den übrigen Arten der Gewebezusammenhang erhalten. Besonders bei den dickwandigen Objekten konnte lediglich die oft beschriebene Schwellung der Wände (z.B. Rasmussen und Bukovac, 1969) beobachtet werden. Diese Verhältnisse deuten auf Unterschiede in bezug auf Art und Ausmass der Zellwandauflösung hin. Dass überhaupt Trennung nicht einfach mit Pektinasewirkung gleichgesetzt werden darf, geht auch aus den Simulationsversuchen (Abschnitt 3.2.2) hervor.

Zwar wurden Hinweise dafür gefunden, dass die Anlage der Trennschicht durch die Schutzschicht bedingt wird: Jene liegt vielfach unmittelbar distal von dieser und wird nach ihr angelegt, Stärkedeposition in der Trennschicht deutet auf eine Funktion der Schutzschicht als physiologische Scheide hin, Alterungsvorgänge in der Trennschicht können als Folge gestoppter Wasser- und Salzzufuhr vom Stengel her interpretiert werden. Indessen fanden Gawadi und Avery (1950) bei *Impatiens*, dass dort eine Trennschicht ohne Schutzschicht ausgebildet wird. In dieser Arbeit ergab sich dasselbe Resultat natürlicherweise bei *Plumeria* und *Annona*, experimentell beim induzierten Blattfall von jüngsten Blättern bei *Coleus*, wo eine Schutzschicht noch nicht angelegt war. Auch im letzteren Falle erfolgte die Anlage der Trennschicht stets an der «richtigen» Stelle. Beide Schichten der Blattfallzone sind somit durch eigene morphogenetische Determinanten ausgezeichnet. Dieser Schluss wird durch die Verhältnisse bei *Coffea* bestätigt, wo die Trennschicht räumlich getrennt von der Schutzschicht und zeitlich weit vor dieser angelegt wird.

Das Konzept von «Trennschicht» und «Schutzschicht» (Gawadi und Avery, 1950) trifft durchaus auch auf die hier untersuchten Arten zu. Beide Schichten gehen aus ursprünglich identischem Parenchym durch Spaltung ihrer prospektiven Bedeutung hervor. Die Schutzschicht wird meristematisch (z.B. saure Phosphatase und Peroxidase als Enzyme der Wandbildung und Differenzierung [van Fleet, 1959, 1962] bei *Coleus*), die Trennschicht altert (z.B. Pektinabbau). Die räumliche Anordnung der beiden Schichten und die zeitliche Gliederung ihrer Differenzierung (Tab. 2) sind bei den einzelnen Objekten verschieden. Bei *Coleus*, *Phaseolus*, *Begonia* und *Plumeria* liegt die Trennschicht unmittelbar distal der Schutzschicht. Bei *Coffea* entsteht diese 20 bis 30 Zellagen proximal von jener. Bei *Annona* sind die beiden Schichten ineinander verschachtelt, eine klare histologische Differenzierung fehlt.

Peroxidase und Phenoloxidase sind mit Anlage und Differenzierung der Schutzschicht verknüpft. Besonders bei der Peroxidase ist die beobachtete Aktivitätszunahme meist unscharf begrenzt und erfasst in breiter Streuung auch die angrenzenden Gewebe. Liegt die Trennschicht unmittelbar distal der Schutzschicht *(Coleus, Begonia, Phaseolus)* oder sind die beiden Schichten überhaupt nicht klar getrennt *(Annona)*,

Tabelle 2

Vergleich der zeitlichen Staffelung in der Differenzierung von Schutzschicht und Trennschicht bei allen untersuchten Gattungen

Stadium	Anlage der Trennschicht	Anlage der Schutzschicht	Verkorkung der Schutzschicht	Bemerkungen
Junges Blatt		*Coleus*		[1] Der frühe Zeitpunkt der Verkorkung legt eine Interpretation als kausalen Faktor nahe. [2] Die Schutzschicht bei *Coffea* verkorkt noch später, plausibel, da ja die breite, absterbende Parenchymscheibe zwischen Trennschicht und Schutzschicht einen ersten Wundverschluss sicherstellt.
Erwachsenes Blatt		*Begonia*		
Seneszentes Blatt		*Phaseolus*		
Unmittelbar vor dem Blattfall	alle		*Begonia*[1]	
Unmittelbar nach dem Blattfall		*Annona* *Plumeria* *Coffea*	*Coleus* *Phaseolus*	
Einige Tage nach dem Blattfall			*Annona* *Plumeria*[2]	

so täuscht die positive Peroxidasereaktion in der Trennschicht eine Beteiligung des Enzyms am Separationsprozess vor. Die vorliegenden Untersuchungen gingen denn auch von der Hypothese von Nuotclà (1969) aus, wonach die Hauptfunktion der Peroxidase eine Lockerung der Matrix sein soll. Zwei Tatsachen schienen diese Auffassung zunächst zu unterstützen, nämlich die gelegentlich auftretenden gequollenen Wände mit starker Peroxidaseaktivität in der Trennschicht von *Coleus* (Abb. 20) und *Phaseolus* sowie die peroxidasepositiven Plasmodesmen in der Trennschicht von *Coffea*. Gerade diese letztere Beobachtung hätte sich gut mit den EM-Aufnahmen von Jensen und Valdovinos (1967) korrelieren lassen, auf denen in der Trennschicht von *Nicotiana* Tüpfel zu sehen sind, die sich in der Mittellamelle verzweigen. Indessen weisen auch die angrenzenden Zellen bei *Coffea* derartige Tüpfel auf, die freilich wegen der allgemein höheren Enzymaktivität viel schlechter sichtbar sind. Dass Peroxidase in Plasmodesmen solcher Tüpfel vorkommt, kann angesichts der in jeder Zelle vorhandenen plasmatischen Aktivität nicht überraschen. Diese Tatsache beweist noch nicht, dass das Enzym direkt die Matrix abbaut. Gegen die Lockerungshypothese spricht vor allem, dass auch Nuotclà (1969) kein mögliches Substrat für die Peroxidase in der Matrix hat nennen können. Eindeutig ist ferner die histochemische Beobachtung, dass bei *Coffea*, wo ein breiter Zwischenraum zwischen Schutzschicht und Trennschicht liegt, die Trennung unter ausgesprochener Peroxidaseverarmung erfolgt.

5.2 Die Rolle der Peroxidase

Die exponierte Narbenfläche bedarf nicht nur des Verdunstungsschutzes, sondern auch der Abwehr von Infektionserregern. Nun ist aus der medizinischen Forschung bekannt, dass ein System aus Peroxidase, Wasserstoffperoxid und einem Halid (Jodid,

Bromid, Chlorid) ausgezeichnete viruzide, bakterizide und fungizide Eigenschaften hat (Belding et al., 1970). Das dürfte eine mögliche Rolle der Peroxidase im Eiter andeuten und könnte eventuell auch bei pflanzlichen Vernarbungsvorgängen von Bedeutung sein.

Interessante Daten zur Anwesenheit von Peroxidase in der Zellwand stammen von Lamport (1970): Das Enzym kann Tyrosinreste der Zellwandproteine durch ein «intermolecular cross link» zu Dityrosin verbinden. Dieses Produkt wurde in der hydroxyprolinreichen Glycopeptidfraktion sekundärer Wände tatsächlich gefunden. Diese Vorstellungen lassen sich gut mit der hier nachgewiesenen Enzymlokalisation in den neu eingezogenen Querwänden der prospektiven Schutzschicht vereinbaren. Ferner berichtet Lamport (1970) über den Befund, dass von 445 Aminosäuren der Apoperoxidase deren 12 Hydroxyprolin sind, und interpretiert, dass das Enzym über eine «Extensinbrücke» an die Wand gebunden sei. Neuerdings ist indessen mit verfeinerter Methodik nachgewiesen worden, dass wachsende Zellwände zwar geringe Anteile an Peptiden, jedoch keine Proteine und überhaupt kein Hydroxyprolin enthalten (Steward et al., 1970). Der normale Mechanismus des Zellwandwachstums erfordert nach diesen Autoren keine Proteine. Solche könnten allenfalls als Alterserscheinung in die Wand einwandern. Somit ist die Diskussion über Anwesenheit und Funktion in der Zellwand von Proteinen im allgemeinen und Peroxidase im besonderen noch durchaus im Fluss.

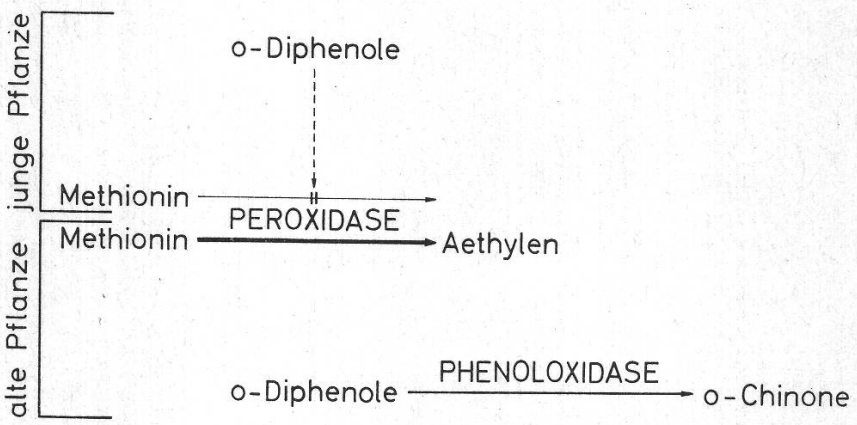
Peroxidase ist auch nach erfolgtem Blattfall in der Schutzschicht nachweisbar (z.B. Abb. 25), vielfach auch in abgestorbenen, geschrumpften Zellen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den allgemeinen Prinzipien der Enzymregulation in Pflanzen (Varner, 1965): Enzymaktivität wird kaum durch Enzymabbau, vielmehr durch Anwesenheit und Konzentration von Aktivatoren und Inhibitoren kontrolliert. In diesem Sinne dürfte die einmal gebildete Peroxidase wohl einfach liegenbleiben und durch einen Inhibitor physiologisch inaktiviert werden. Nach Glasziou (1969) ist gerade Peroxidase ein Enzym mit «unendlicher» Lebensdauer. Im histochemischen Versuch dürfte der Inhibitor ausgewaschen werden, so dass die latente Enzymaktivität manifest wird.

Peroxidase in Interzellularen: Weil das Enzym in jedem Gewebe, das reich an plasmatischer Peroxidase ist, auch in Interzellularen und teilweise in der Mittellamelle vorkommt, muss ein allgemeiner Grund für diese Anwesenheit vorliegen. De Jong (1967) meint, diese Lokalisation sei rein zufällig und bedeutungslos. Dafür ist sie aber allzu konstant, wie auch die Resultate von Nuotclà (1969) zeigen. Bekanntlich ist das Enzymmolekül leicht permeabel und wird aus diesem Grunde nach exogener Zugabe als «marker» für licht- (Straus, 1960) und EM-optische (Graham und Karnowsky, 1966) intrazelluläre Lokalisations- und Transportuntersuchungen in Tieren verwendet (Rouiller et al., 1968, S. 51). Überdies wurde auch in Zellkulturen gefunden, dass das Enzym aus intakten Zellen hinausleckt (Straus und Campbell, 1963, nach Varner, 1965). Solch unkontrollierte Diffusion scheint nach den vorliegenden Resultaten auch im intakten Gewebe überall dort vorzukommen, wo das Enzym in beträchtlicher Konzentration vorhanden ist.

Für die Rolle der plasmatischen Peroxidase bei der Regulation des Blattfalls lassen sich anhand der bisherigen Arbeiten folgende Vorstellungen formulieren:

- Äthylen wird heute als der direkteste «trigger» des natürlichen Blattfalles angesehen (Jackson und Osborne, 1970). Ebenso funktionieren praktisch alle künst-

lichen Defoliantien via Äthylenentwicklung (Pratt und Goeschl, 1969). Die Biosynthese von Äthylen geht von Methionin aus, was den blattfallfördernden Effekt dieser Aminosäure erklärt (Addicott, 1965). Methionin wird zunächst durch eine Transaminase oxidativ zur Ketosäure desaminiert, worauf dann aus dieser durch Peroxidase in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid Äthylen abgespalten wird (Mapson, 1970). Möglicherweise wird die Ketosäure vorgängig noch zu Methional decarboxyliert (Yang, 1968). Dabei aktivieren Monophenole die Peroxidasewirkung, o-Diphenole inhibieren sie (Yang, 1967). Oxidation von o-Diphenolen durch Phenoloxidase hebt die Hemmung auf. In Figur 13 ist die Äthylenbildung in der Blattfallzone unter Berücksichtigung des allmählichen Anstiegs der Aktivitäten von Peroxidase und Phenoloxidase mit zunehmendem Alter dargestellt. Herrero und Hall (1960) fanden in Baumwollblättern eine erhebliche Stimulation der Aktivität von Peroxidase, Pektinmethylesterase und Katecholase durch Äthylen. Gahagan et al. (1968) bestätigten diesen Befund, was die Peroxidase anbelangt (die anderen Enzyme wurden nicht untersucht). Die Äthylensynthese scheint also mit einem positiven Rückkoppelungseffekt ausgestattet zu sein.



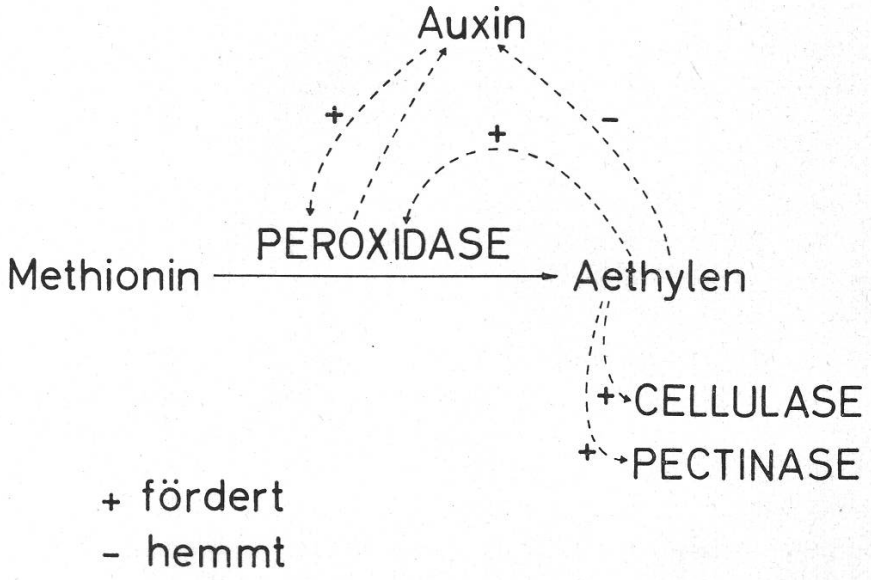
Figur 13

Schema der gesteigerten Äthylenproduktion in der seneszenten Pflanze unter Berücksichtigung des Anstiegs an Peroxidase und Phenoloxidase bei der Entwicklung der Blattfallzone

– Über die Frage, wie nun Äthylen wirkt, herrscht allerdings noch wenig Klarheit. Abeles und Holm (1966) fanden, dass nur ein seneszentes Organ überhaupt reaktionskompetent ist, bei jungen Organen tritt keine Wirkung auf Äthylen ein, ein Schluss, der durch de la Fuente und Leopold (1968) bestätigt werden konnte. Ferner stellten Abeles und Holm (1966) fest, dass mit der Blattfallförderung durch Äthylen eine gesteigerte RNS- und Proteinsynthese korreliert ist, die sich durch Actinomycin-D hemmen liess. Sie betrachten demzufolge Äthylen als hormonalen Effektor. Die Berechtigung dieses Schlusses wird zwar von Burg (1968) bezweifelt, doch brachte Abeles (1968) neue Daten zur Unterstützung seiner Hypothese, so vor allem eine erhöhte Cellulaseaktivität nach Äthylenbehandlung. Dass dann Cellulase tatsächlich mit erhöhter Aktivität am Blattfallprozess beteiligt ist, wurde von Horton und Osborne (1968), Ratner et al. (1969) sowie Abeles (1969) nachgewiesen. Morré (1968) zeigte eine analoge Induktion von Pektinase durch Äthylen. Als weitere Äthylenwirkung diskutierte Burg (1968) die verschiedenen Effekte

auf Auxin: Hemmung des polaren Transports, Induktion der IES-Oxidase (Hall und Morgan, 1964), Senkung des Gehaltes an diffusiblem Auxin. Diese Befunde deuten auf einen weiteren «feed-back loop» hin, der vom Äthylen auf dasjenige System ausholt, das durch eine Stimulation der Peroxidase überhaupt die Äthylensynthese in Gang bringt.

- Es konnte in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden, dass Auxin die Äthylensynthese stimuliert (Abeles und Rubinstein, 1964; Abeles, 1966; Abeles, 1967; Burg und Burg, 1968). Abeles (1966) konnte sogar zeigen, dass diese Stimulation über eine DNS-abhängige Enzymsynthese verläuft. In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese vertreten, dass dieses induzierte Enzym die Peroxidase sei. Diese Vorstellung wird durch die Arbeiten von Jensen (1955) und Lavee und Galston (1968) gestützt. In einer weiteren Arbeit konnten Galston et al. (1968) nachweisen, dass Auxin in einem differenzierten Muster je nach Entwicklungszustand einzelne Isoperoxidasen induziert, andere reprimiert. In dieses Bild passen auch Resultate von Datko und Maclachlan (1968), die eine IES-stimulierte Förderung von Cellulase und Pektinase fanden. Die Auxinwirkung wäre dabei nach der hier diskutierten Vorstellung nicht direkt, sondern eben via Peroxidase- und Äthylenstimulation. Dass Auxin überhaupt auf dem Niveau von Transskription und Translation wirkt, wird durch viele Resultate erhärtet, die von Thimann (1969) zusammengefasst worden sind.
- Die zitierten und die eigenen Resultate führen zur folgenden Hypothese vom Regulationssystem in der seneszenten Blattfallzone (Fig. 14):
  Im Schema ist eine bisher noch nicht erwähnte Beziehung zwischen Peroxidase und Auxin angedeutet. Ob es sich um einen fördernden oder hemmenden «feed-back loop» handelt, ist noch Gegenstand der Diskussion. Wohl kann Peroxidase in vitro als IES-Oxidase wirken, aber ob diese Oxidation in vivo zur Zerstörung des Auxins führt (Bastin, 1966; Thimann, 1969) oder gerade zu dessen Aktivie-



Figur 14

Dieses Schema fasst die postulierte Stellung der Peroxidase im Regulationssystem des Blattfalls qualitativ zusammen. Nicht berücksichtigt ist die in Figur 13 skizzierte Rolle der Phenoloxidase

rung (Meudt, 1967), ist noch nicht klar. Schwertner und Morgan (1966) sehen in der IES-Oxidase, die von diesen Autoren als Inaktivator betrachtet wird, den zentralen Kontrollfaktor der Blattfallregulation.

- Viel Auxin hemmt den Blattfall in jungen Knoten, wenig Auxin in alten Knoten fördert ihn (Gaur und Leopold, 1955). Die diskutierte Hypothese erfordert als Voraussetzung, dass nur das seneszente Organ reaktionskompetent ist, dass in Trennschicht und Schutzschicht eine unterschiedliche prospektive Bedeutung festgelegt ist, dass modifizierende Faktoren nur im seneszenten Organ die betreffenden Gene für Auxin potentiell aktiv werden lassen und dass Auxin auch beim Blattfall eine Konzentrationswirkungskurve besitzt, in der geringe Konzentrationen fördernd, höhere hemmend wirken. Hinweise auf solche Einflüsse gehen aus den Arbeiten von Abeles und Holm (1966) sowie Jacobs (1968) hervor. Der letztere Autor stellte fest, dass Auxin die Ausbildung einer Trennschicht so lange hemmt, als es basal transportiert wird. Im Laufe des Alterungsprozesses nimmt jedoch der polare Transport bis gegen Null ab. Auch dieser Effekt kann möglicherweise als «feedback loop» von Äthylen aufgefasst werden (Morgan et al., 1968).

Es ist einleuchtend, dass ein Korrelationsphänomen wie der Blattfall nicht als Ausdruck der Funktion eines einzigen Hormons zu erklären ist. Auxin dürfte aber wohl mit Sicherheit eine zentrale Rolle spielen, während andere Hormone wohl eher eine modifikatorische Funktion ausüben, etwa in dem Sinne, wie van Overbeek et al. (1968) Hinweise für den Wirkungsmechanismus von Abscissinsäure als allosterischer Inhibitor der DNS-Synthese gefunden haben, und Phytokinine allosterische Effektoren sein sollen.

Abschliessend sei nochmals auf die ungelösten Probleme hingewiesen:

Bis vor kurzem schien die dominierende Stellung von Auxin auf dem obersten Niveau der Blattfallkontrolle (Fig. 14) unbestritten. Die Ergebnisse von Smith et al. (1968) und Böttger (1970) legen indessen nahe, dass die tatsächliche Auslösung des Blattfalls auf dem Zusammenspiel von Auxin mit einem Antagonisten beruht. Dieser Gegenspieler scheint die Abscissinsäure zu sein. Während der Auxingehalt bereits lange vor dem Blattfall niedrig, aber konstant ist, ist der Übergang zur Seneszenz gekennzeichnet durch eine Zunahme des Abscissinsäuregehaltes auf das Dreissigfache (Böttger, 1970). Das Verhältnis der beiden Hormone zueinander ist nichtkompetitiv (Smith et al., 1968). Über den Wirkungsmechanismus der Abscissinsäure herrscht freilich noch wenig Klarheit; das Konzept van Overbeeks (1968) kann nicht überzeugen, denn die von diesem Autor vorgeschlagene Rolle des Hormons als allosterischer Inhibitor der DNS-Synthese ist allzu unspezifisch, als dass sie im Netzwerk der Blattfallregulation sinnvoll integriert werden könnte. Immerhin deuten van Overbeeks Resultate auf eine auf dem Niveau der DNS ansetzende Wirkung von Abscissinsäure hin. Dieses Hormon könnte also mit dem im vorigen Absatz postulierten Effektor identisch sein, der in der seneszenten Blattfallzone für Auxin potentiell aktive Gene de-reprimiert.

Während also anstelle des vagen Begriffes «Seneszenz» allmählich klarere Vorstellungen von zeitlichen und räumlichen Veränderungen in den die Separation kontrollierenden Regulationsnetzen treten, ist zum Schluss nochmals auf den noch völlig ungelösten Problemkomplex hinzuweisen, der am Anfang aller Blattfallforschung steht, auf die Frage nämlich nach den morphogenetischen Faktoren, welche die Anlage der Blattfallzone induzieren und deren Gestalt und Orientierung bestimmen.

6 Zusammenfassung

1. Es wurden Verteilungsmuster von Enzymen und Substanzen bei der Differenzierung der Blattfallzone und in frühen Stadien der Vernarbung untersucht. Das Hauptgewicht lag auf dem Nachweis der Peroxidase. Als Objekte dienten Arten der folgenden Gattungen: *Coleus*, *Coffea*, *Annona*, *Plumeria*, *Phaseolus*, *Begonia*.

2. Bei *Coleus* und *Annona* besteht eine strenge Korrelation zwischen der spezifischen Anatomie des Blattkissens und dem Ort der Blattfallzone; in beiden Fällen wird diese an der strukturell schwächsten Stelle angelegt. Bei den übrigen Objekten scheint kein solcher Zusammenhang zu bestehen.

3. Gemeinsam ist für alle Objekte ein Pektinabbau in den Wänden der Trennschicht kurz vor Beginn des Trennvorgangs. Dieser Abbau ist von einem Calciumschwund begleitet.

4. Die Schutzschicht verkorkt zu einem artspezifisch bestimmten Zeitpunkt.

5. Das Maximum der Aktivität von Peroxidase, Phenoloxidase und saurer Phosphatase (diese nur bei *Coleus* untersucht) liegt in der Schutzschicht. Diese wird juvenilisiert, während die Trennschicht beschleunigt altert. Alle Enzyme sind im Plasma lokalisiert; Peroxidase leckt häufig aus den Zellen hinaus und wird dann in kleinen Interzellularen und oft auch in der Mittellamelle gefunden.

6. Beim Blattfall dürfte Peroxidase eine Rolle in der Äthylenbiosynthese spielen. Äthylen würde dann via Enzyminduktion und direkte Wirkungen den Separationsprozess herbeiführen. Peroxidase ihrerseits dürfte durch Auxin induziert werden. Mögliche Rückkoppelungsmechanismen und die Wirkung weiterer Faktoren – insbesondere der Phenoloxidase als «Schalter» für peroxidasekatalysierte Reaktionen – wurden nachgewiesen und im Zusammenhang mit der Korrelation des Blattfalls diskutiert.

7. Eine direkte Rolle spielt Peroxidase in frühen Stadien des Verholzungsprozesses beim sekundären Dickenwachstum und bei der Differenzierung von Sklerenchym.

8. Von grösster Relevanz für ein wirkliches Verständnis des Blattfalls scheinen die verschiedene Reaktionskompetenz von Schutzschicht und Trennschicht sowie die mit der Seneszenz zusammenhängende Reaktionsbereitschaft in der Trennschicht zu sein.

7 Summary: Histochemical Patterns in Leaf Abscission

1. Changes in activity and distribution of peroxidase, phenoloxidase, pectic and lipid substances during leaf abscission and early scar formation have been investigated with special emphasis on peroxidase. Species of the following genera were chosen as experimental material: *Coleus*, *Coffea*, *Annona*, *Plumeria*, *Phaseolus*, *Begonia*.

2. The concept of an abscission zone consisting of a separation layer and a protective layer has been found to hold true in all objects. Differences in spatial arrangement and temporal articulation in the development of these tissues could be shown. Each layer seems to be due to its own morphogenetic stimuli.

3. Shortly before separation occurs, the separation layer impoverishes in pectin and calcium.

4. Peroxidase and phenoloxidase activity show a marked increase during the differentiation of the abscission zone. The activity is localized mainly in the protective layer. Both enzymes are found in the cytoplasm; peroxidase tends to leak out of the cells and is therefore often found in the middle lamella and in small intercellular spaces.

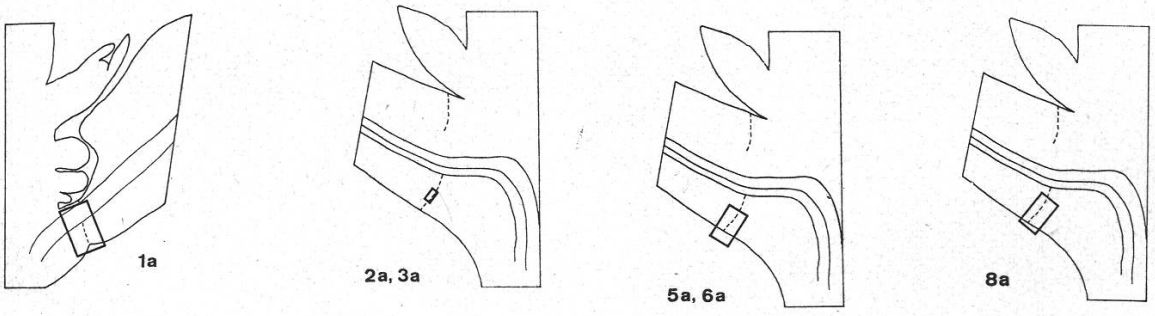
5. The possible role of peroxidase in leaf abscission has been discussed. A hypothesis of the enzyme catalyzing ethylene generation from methionine has been formulated. In a senescent organ, ethylene would promote the separation process while peroxidase itself would be induced by auxin. An important supposition is the appropriate reaction competence of the target tissue. Especially significant in this connection seems phenoloxidase which promotes, as soon as it occurs in considerable amounts, the peroxidase-mediated reactions.

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Wanner im Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich. Ich bin meinem Lehrer dankbar für die Auswahl des interessanten Themas, für seine Unterstützung und für sein kritisches Interesse.

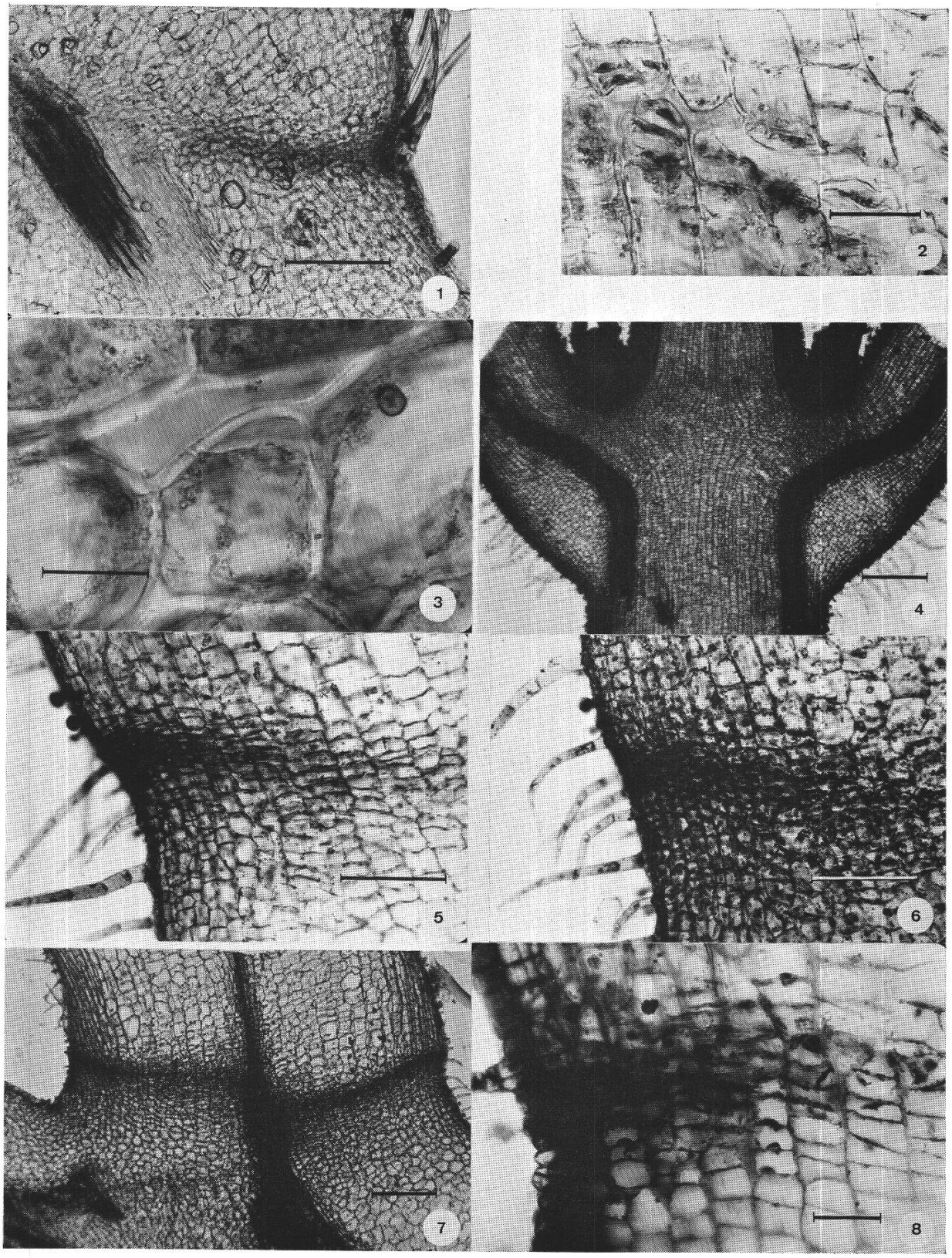
Herrn Dr. W. Egger danke ich für seinen immer gern gewährten Rat und seine Unterstützung in allen fotografischen Belangen.

Abbildungstexte

Abb. Nr.	Objekt	Reaktion	Mass-strich (μm)	Kommentar	Topographie
1	*Annona*	1,4-Phenylen-diamin/HAc	200	Vergilbtes und angedorrtes Blatt. Aldehydnachweis in Xylem, Blattfall-zone und Epidermis	Abb. 1a
2	*Coleus*	—	50	Knoten E. Interzellularenbildung 30 h nach Entfernung der Spreite	Abb. 2a/3a
3	*Coffea*	AAC	20	Knoten der 3. Vegetationsperiode. Interzellularenbildung. Peroxidase im Plasma	
4	*Coleus*	AAC	500	Knoten A, unbehandelt. Peroxidase in Meristem und Leitgewebe. Uni-forme, geringe Aktivität im Parenchym	—
5	*Coleus*	Aminreagens	200	Knoten C, unbehandelt. Peroxydase in der prospektiven Schutzschicht	Abb. 5a/6a
6	*Coleus*	Aminreagens	200	Knoten D, unbehandelt. Zunahme der Peroxidaseaktivität	
7	*Coleus*	Aminreagens	500	Knoten E, unbehandelt. Peroxidase in der prospektiven Schutzschicht	—
8	*Coleus*	Brenzkatechin	50	Knoten E, unbehandelt. Phenoloxidase in der prospektiven Schutzschicht	Abb. 8a



Tafel I



Tafel II

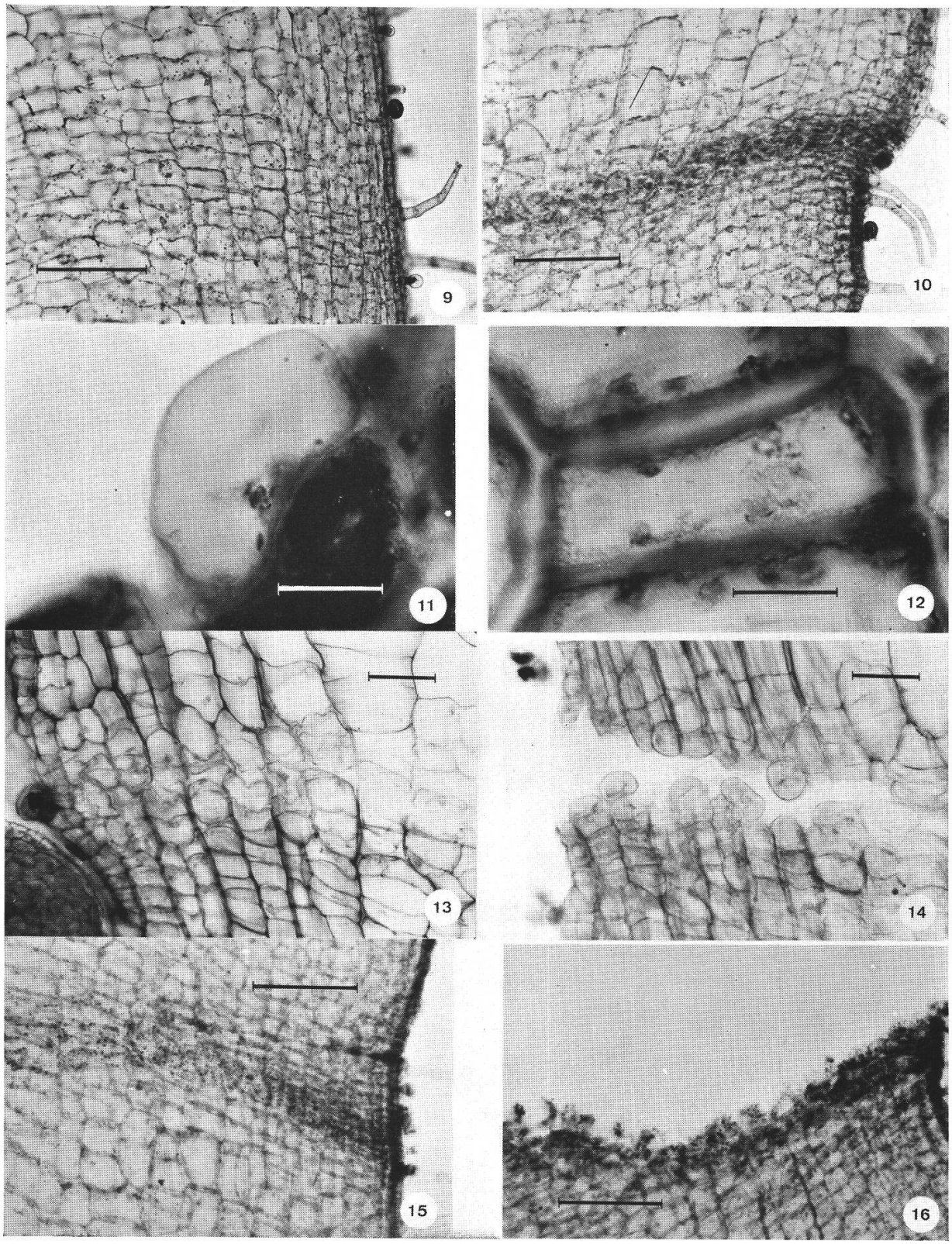
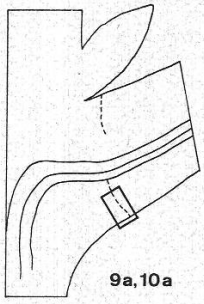
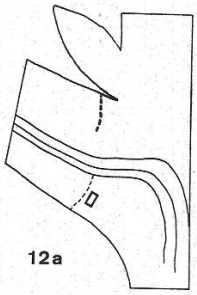
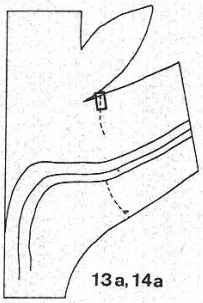


Abb. Nr.	Objekt	Reaktion	Mass-strich (μm)	Kommentar	Topographie
9	*Coleus*	Nadi	200	Knoten A, unbehandelt. Uniforme, schwache Cytochromoxidasereaktion im Plasma	Abb. 9a/10a
10	*Coleus*	Nadi	200	Knoten F, unbehandelt. Cytochrom-oxidase im Plasma der prospektiven Schutzschicht	
11	*Coleus*	Jod-Jodkali/ H_2SO_4	20	Knoten E, kurz vor Blattfall. Zell-wände ohne jegliche ad- oder inkru-stierte Lipide	Proximaler Spaltrand
12	*Coleus*	Jod-Jodkali/ H_2SO_4	20	Gleiches Präparat wie Abb. 11. Rein cellulosische, stark gequollene Wände der prospektiven Schutzschicht	Abb. 12a
13	*Coleus*	Hydroxylamin	50	Knoten E, kurz vor dem induzierten Blattfall. Pektinabbau in der Trenn-schicht	Abb.13a/14a
14	*Coleus*	Hydroxylamin	50	Knoten E, etwas späteres Stadium als Abb. 13. Die abgerundeten Zellen des Spaltrandes sind pektinfrei	
15	*Coleus*	Jod-Jodkali	200	Knoten F, unbehandelt. Stärke in der prospektiven Trennschicht	Abb. 15a
16	*Coleus*	Jod-Jodkali	200	Knoten F, unmittelbar nach erfolgtem Blattfall. Stärke in den äussersten Zellen	







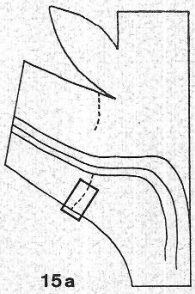
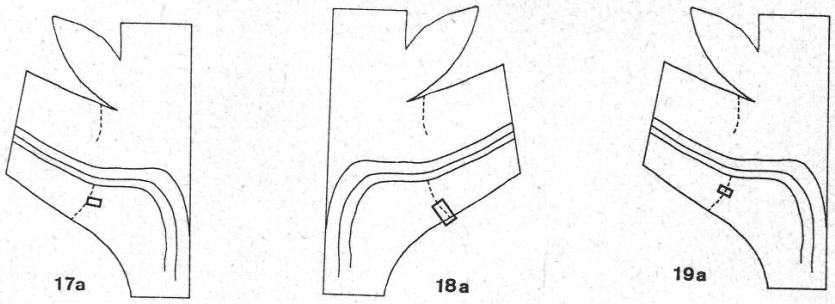
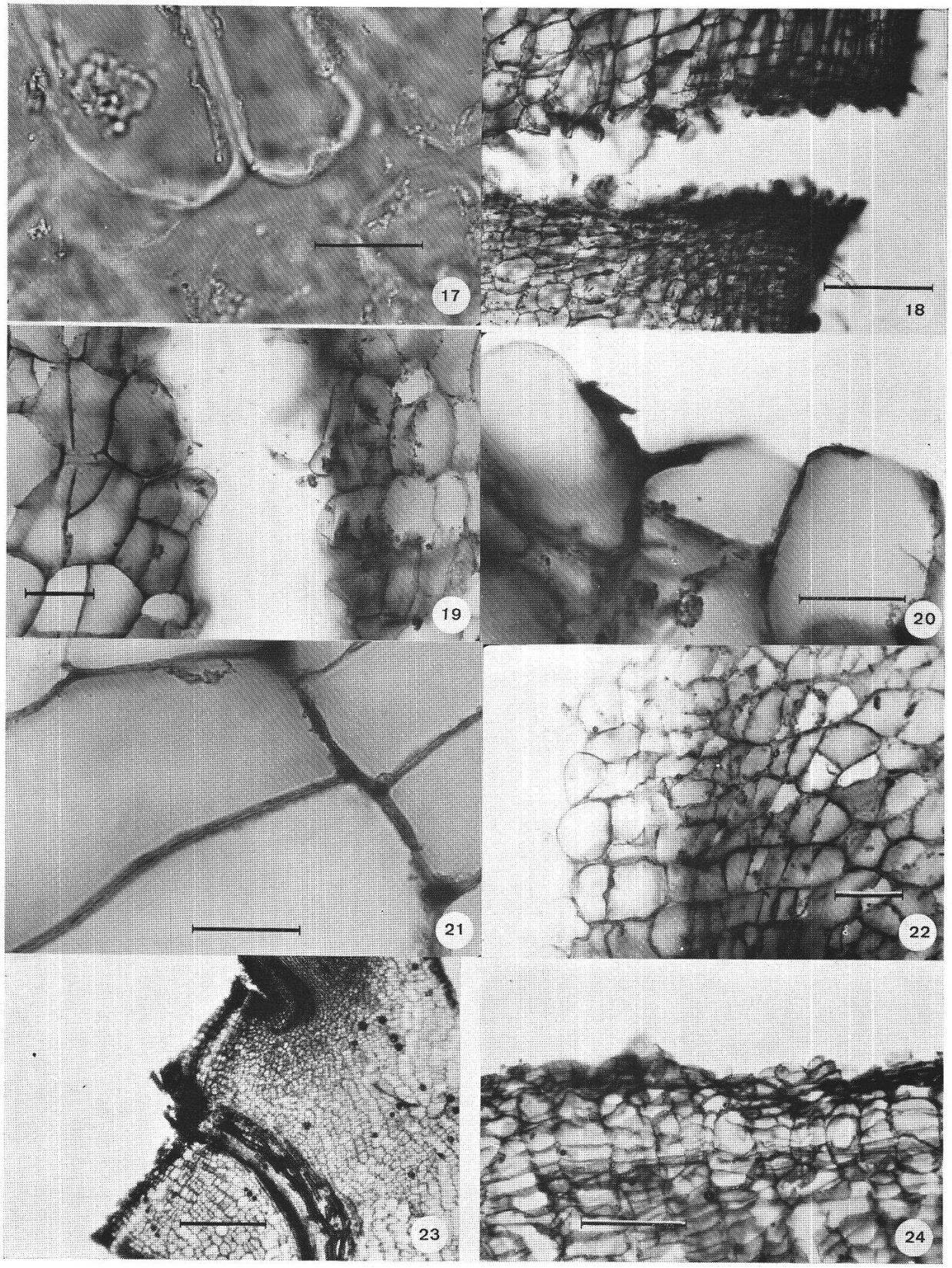


Abb. Nr.	Objekt	Reaktion	Mass-strich (μm)	Kommentar	Topographie
17	*Coleus*	Pektinase	20	Knoten F, Abrundung und Quellung der Wände. Interzellularenbildung	Abb. 17a
18	*Coleus*	Dopa	200	Knoten E, Spaltbildung vor dem induzierten Blattfall. Reaktion in der Trennschicht schwächer als in der Schutzschicht	Abb. 18a
19	*Coleus*	AAC	50	Knoten D. Starke Reaktion in den Wänden der Schutzschicht, schwächere in der Trennschicht	Abb. 19a
20	*Coleus*	AAC	20	Knoten F, kurz vor dem induzierten Blattfall. Ungewöhnlich gequollene Zellwand mit starker Peroxidase-aktivität	Proximaler Spaltrand
21	*Coleus*	AAC	20	Knoten F, kurz vor dem Blattfall. Peroxidase in Mittellamelle und Interzellularen	Distaler Spaltrand, dritte bis äusserste Zellage
22	*Coleus*	Naphthyl-1-phosphat	50	Knoten F, kurz vor dem Blattfall. Saure Phosphatase in der Schutzschicht	Proximaler Spaltrand
23	*Coleus*	Chlorzinkjod	500	Knoten E, 2 Wochen alte Narbe. Verkorkung der Schutzschicht	—
24	*Coleus*	Chlorzinkjod	200	Ausschnitt aus Abb. 23	—



Tafel III



Tafel IV

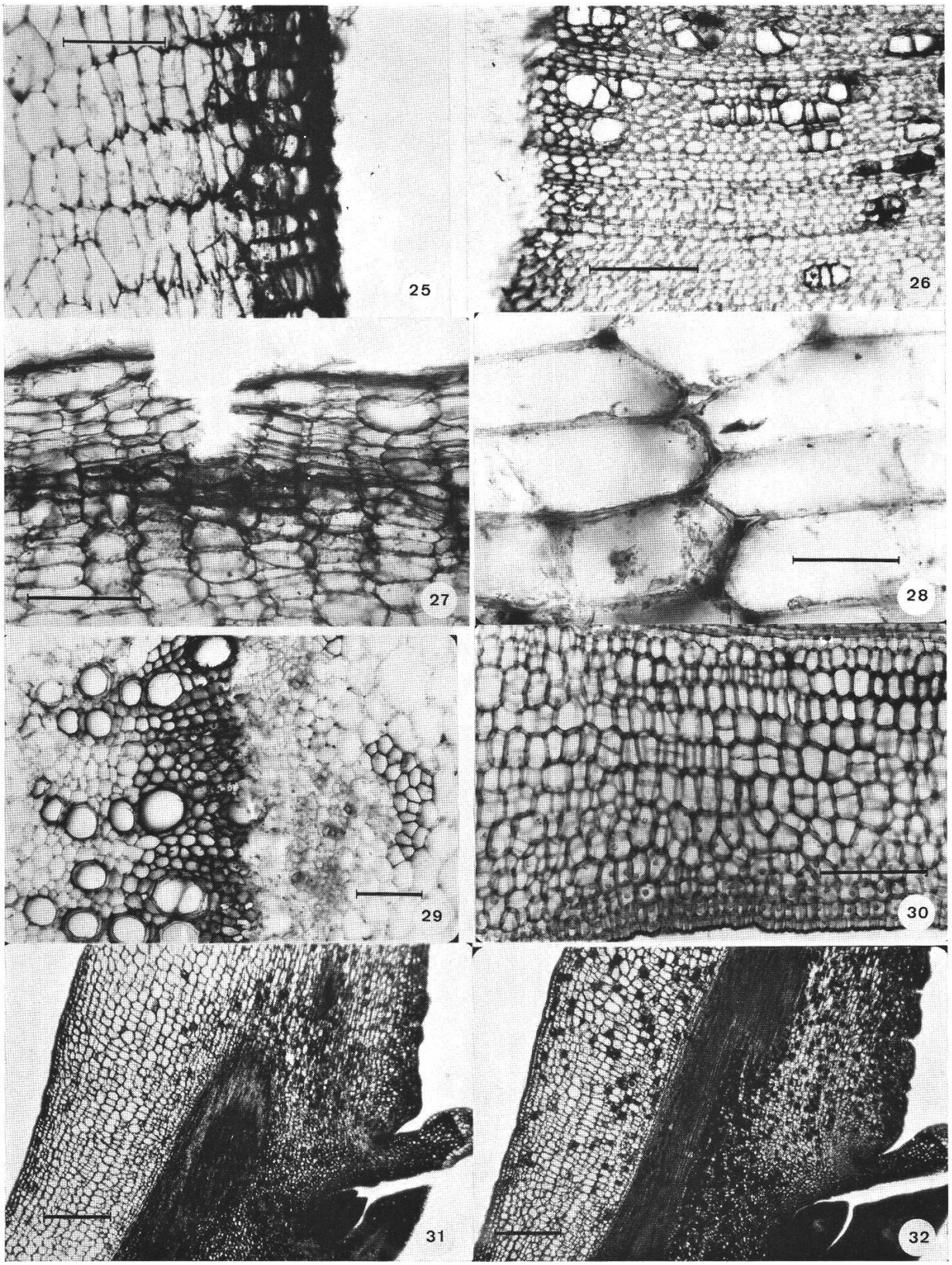
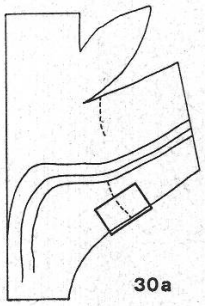
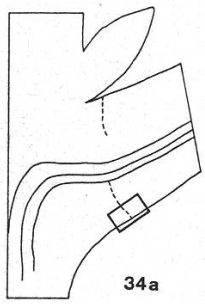


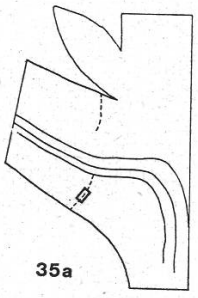
Abb. Nr.	Objekt	Reaktion	Mass-strich (μm)	Kommentar	Topographie
25	*Coleus*	AAC	200	Knoten F, 2 Wochen alte Narbe. Peroxidase in der Schutzschicht	
26	*Coleus*	AAC	200	Sekundäres Dickenwachstum mit Peroxidaseaktivität an Stellen der Ligninsynthese	Querschnitt durch den verholzten Stengel. Kambium links, blass
27	*Coleus*	AAC	200	9 Wochen alte Narbe. Bildung einer zweiten Schutzschicht mit Peroxidase-aktivität unter der ersten, jetzt gesprengten	
28	*Coleus*	AAC	50	Peroxidase in Interzellularen und Wänden der zweiten Schutzschicht	Ausschnitt aus Abb. 27
29	*Coleus*	AAC	100	Kantenleitbündel bei Beginn des sekundären Dickenwachstums. Per-oxidase an Stellen der Ligninsynthese in Xylem und Sklerenchym	Querschnitt durch den krautigen Stengel
30	*Coffea*	Hydroxylamin	200	Eben ausgewachsenes Blatt. Uniforme Pektinreaktion in der Blattfallzone	Abb. 30a
31	*Coffea*	Dopa	500	Eben ausgewachsenes Blatt. Uniforme, schwache Phenoloxidasereaktion	
32	*Coffea*	AAC	500	Blatt der zweiten Vegetationsperiode. Uniforme, schwache Peroxidaseaktivität	

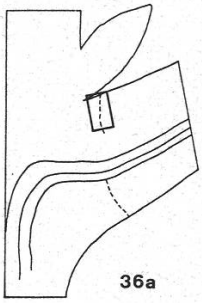


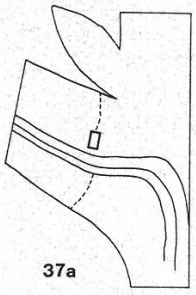
30a

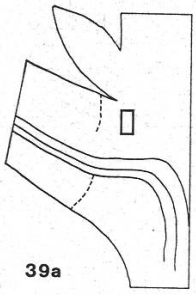
Abb. Nr.	Objekt	Reaktion	Mass-strich (μm)	Kommentar	Topographie
33	*Coffea*	AAC	500	Vergilbtes Blatt der dritten Vegetationsperiode. Kontinuierliche Rekretzunahme von Abb. 31–33. Peroxidase unverändert	—
34	*Coffea*	AAC	200	Vergilbtes und angedorrtes Blatt. Ausdünnung der Peroxidase in der Trennschicht	Abb. 34a
35	*Coffea*	AAC	20	Präparat wie Abb. 34. Schwache Peroxidaseaktivität in Tüpfeln und Plasma der Trennzone	Abb. 35a
36	*Coffea*	Hydroxylamin	200	Vergilbtes und angedorrtes Blatt. Ausdünnung an Pektinen in der Trennschicht	Abb. 36a
37	*Coffea*	Rutheniumrot	50	Vergilbtes Blatt. Beginn von Pektinabbau und Schizolyse	Abb. 37a
38	*Coffea*	Chlorzinkjod	100	Vergilbtes und angedorrtes Blatt. Fortgeschrittene Spaltbildung	—
39	*Coffea*	Hydroxylamin	50	Vergilbtes und angedorrtes Blatt. Bildung der Schutzschicht	Abb. 39a
40	*Coffea*	AAC	200	Vergilbtes und angedorrtes Blatt. Bildung des Stengelperiderms mit starker Peroxidaseaktivität in den neu eingezogenen Wänden	Abb. 40a

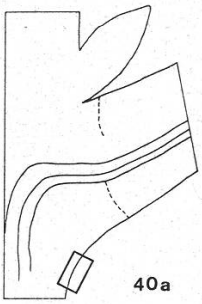

34a


35a

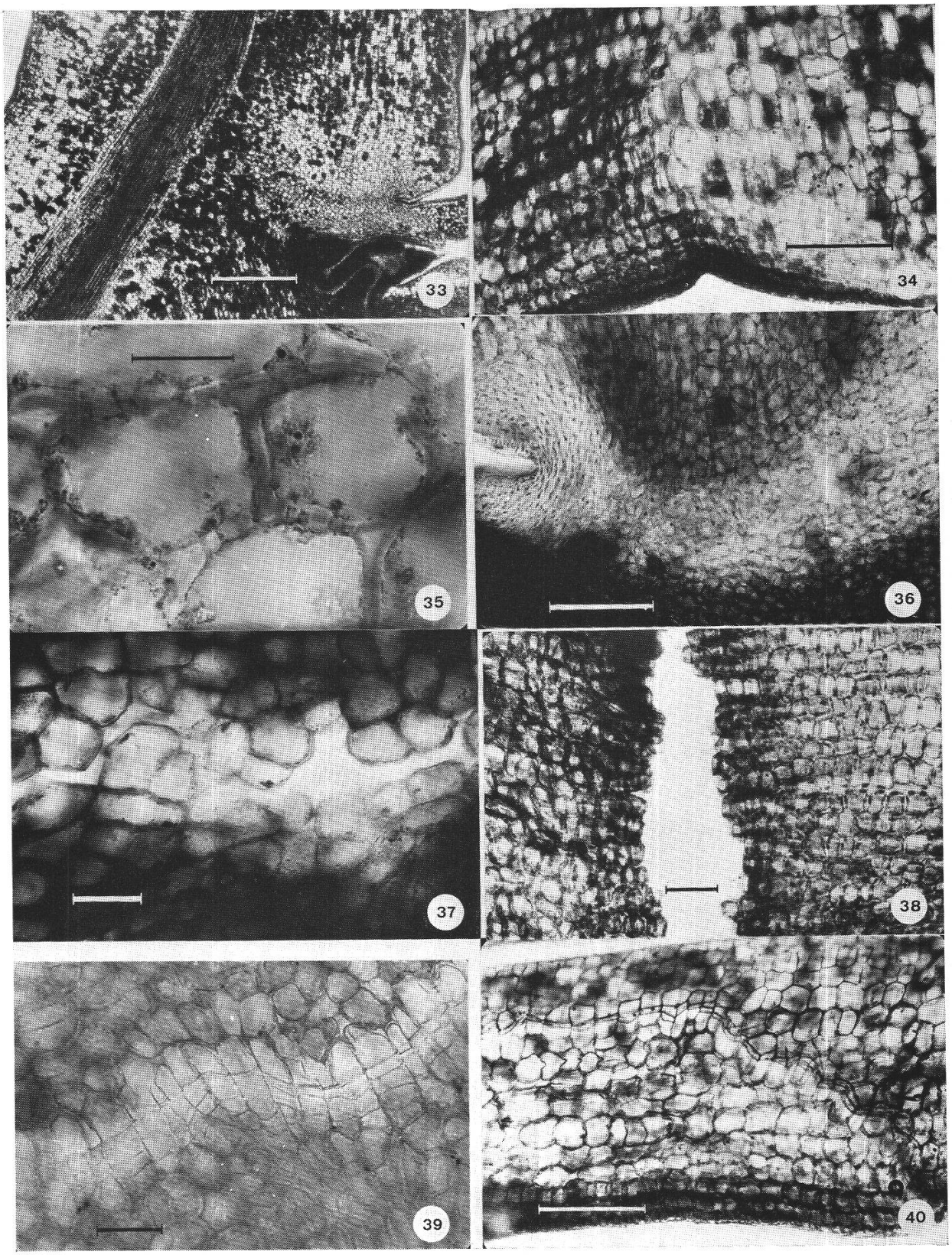

36a


37a


39a


40a

Tafel V



Tafel VI

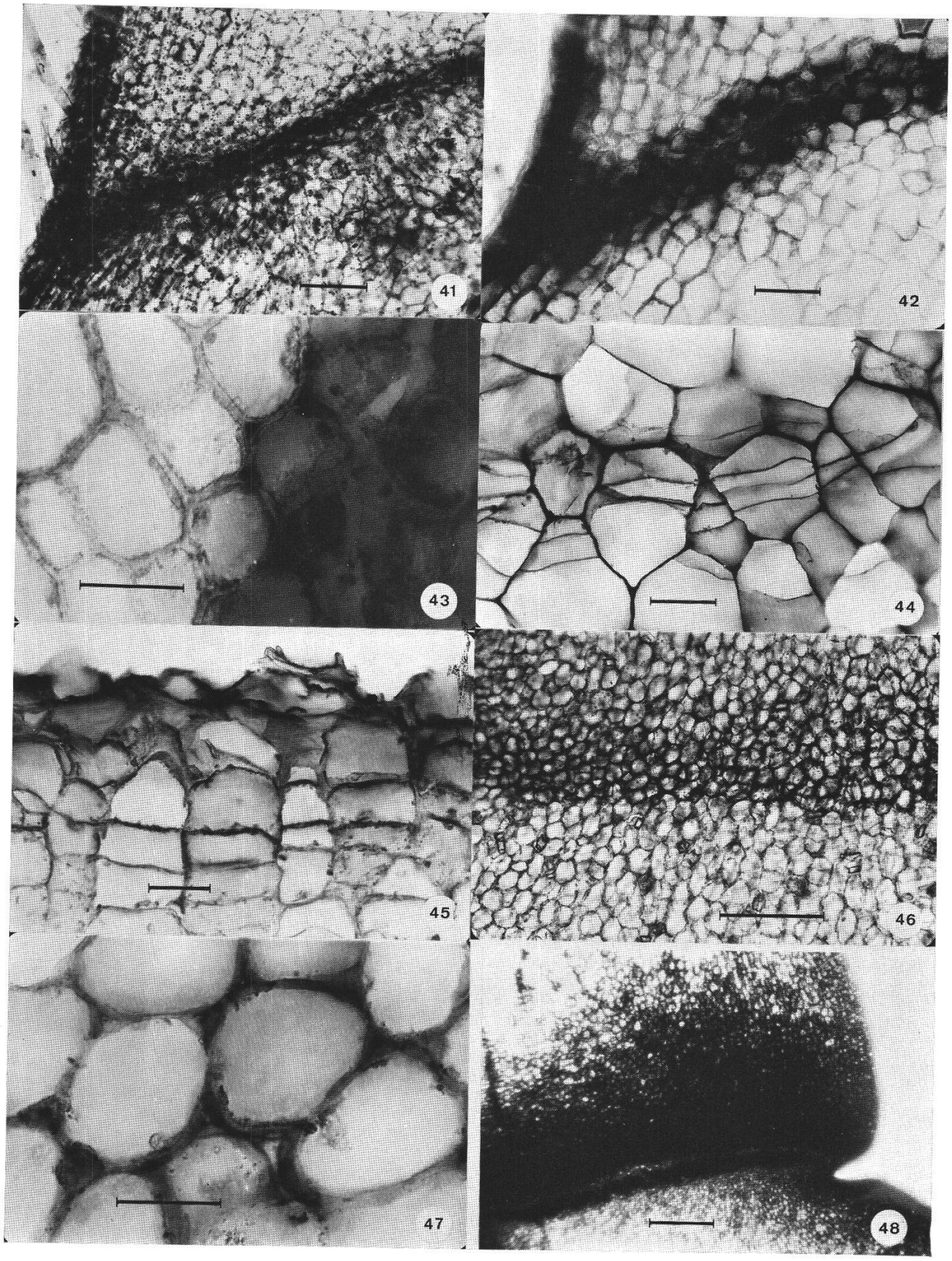
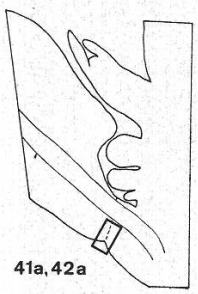
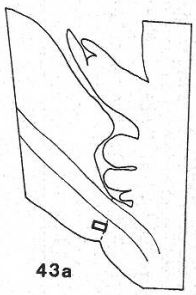
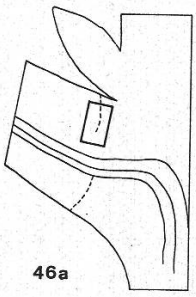
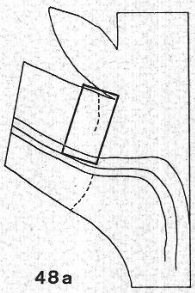


Abb. Nr.	Objekt	Reaktion	Mass-strich (μm)	Kommentar	Topographie
41	*Annona*	Dopa	100	Vergilbtes und angedorrtes Blatt. Phenoloxidaseaktivität in Epidermis und Blattfallzone	Abb. 41a/42a
42	*Annona*	AAC	50	Objekt wie Abb. 41. Peroxidaseaktivität in der Blattfallzone	
43	*Annona*	AAC	20	Objekt wie Abb. 41. Peroxidase in Interzellularen	Abb. 43a
44	*Phaseolus*	AAC	50	Bildung der Schutzschicht nach Entfernung der Spreite mit Peroxidaselokalisation in alten und neuen Wänden	—
45	*Phaseolus*	AAC	30	Frische Blattkissennarbe. Peroxidase in Schutzschicht und Trennschicht	—
46	*Plumeria*	AAC	200	Vergilbendes Blatt. Starke Peroxidaseaktivität distal der prospektiven Trennschicht	Abb. 46a
47	*Plumeria*	AAC	20	Objekt wie Abb. 46. Peroxidase in Plasma, Interzellularen und Tüpfeln	—
48	*Plumeria*	AAC	500	Vergilbtes und angedorrtes Blatt. Trennschicht hell zwischen den peroxidasereichen Zonen	Abb. 48a









8 Literatur

Abeles F.B. 1966. Auxin Stimulation of Ethylene Evolution. Plant Physiol. *41*, 585–588.

— 1967. Mechanism of Action of Abscission Accelerators. Physiol. Plantarum *20*, 442–454.

— 1968. Role of RNA and Protein Synthesis in Abscission. Plant Physiol. *43*, 1577–1586.

— 1969. Abscission: Role of Cellulase. Plant Physiol. *44*, 447–452.

— und B. Rubinstein. 1964. Regulation of Ethylene Evolution and Leaf Abscission by Auxin. Plant Physiol. *39*, 963–969.

— und R.E. Holm. 1966. Enhancement of RNA Synthesis, Protein Synthesis, and Abscission by Ethylene. Plant Physiol. *41*, 1337–1342.

Addicott F.T. 1965. Physiology of Abscission. In: Ruhland W. (Hrsg.): Handbuch der Pflanzenphysiologie, XV/2, S. 1094–1126. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Albersheim P. 1965. Biogenesis of the Cell Wall. In: Bonner J. und J.E. Varner (Hrsg.): Plant Biochemistry. S. 151–186. Academic Press, New York, London.

Arnold M. 1968. Histochemie. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Bastin M. 1966. Interpretation of the Auxin-Sparing Mechanism on the Basis of Free Radicals. Planta (Berl.) *71*, 189–194.

Belding M.E., S.J. Klebanoff und C.G. Ray. 1970. Peroxidase-Mediated Virucidal Systems. Science *167*, 195–196.

Bornman C.H. 1967. Some Ultrastructural Aspects of Abscission in *Coleus* and *Gossypium*. S. Afr. J. Sci. *63*, 325–331.

Böttger M. 1970. Die hormonale Regulation des Blattfalls bei *Coleus rehneltianus* Berger. I. Planta (Berl.) *93*, 190–204; II. Planta (Berl.) *93*, 205–213.

Brown H.S. und F.T. Addicott. 1950. The Anatomy of Experimental Leaflet Abscission in *Phaseolus vulgaris*. Amer. J. Bot. *37*, 650–656.

Bullough W.S. 1967. The Evolution of Differentiation. Academic Press, London, New York.

Burg S.P. 1968. Ethylene, Plant Senescence, and Abscission. Plant Physiol. *43*, 1503–1511.

— und E.A. Burg. 1968. Ethylene Formation in Pea Seedlings; Its Relation to the Inhibition of Bud Growth Caused by IAA. Plant Physiol. *43*, 1069–1074.

Burstone M.S. 1960. Histochemical Demonstration of Cytochrome Oxidase with New Amine Reagents. J. Histochem. Cytochem. *8*, 63–70.

Chayen J., L. Bitensky, R.G. Butcher und L.W. Poulter. 1969. A Guide to Practical Histochemistry. Oliver & Boyd, Edinburgh.

Datko A.H. und G.A. Maclachlan. 1968. IAA and the Synthesis of Glucanases and Pectic Enzymes. Plant Physiol. *43*, 735–742.

Deane H.W., R.J. Barnett und A.M. Seligman. 1960. Histochemische Methoden zum Nachweis der Enzymaktivität. In: Graumann W. und K. Neumann (Hrsg.): Handbuch der Histochemie, VII/1. G. Fischer, Stuttgart.

de Jong D.W. 1967. An Investigation of the Role of Plant Peroxidase in Cell Wall Development by the Histochemical Method. J. Histochem. Cytochem. *15*, 335–346.

de la Fuente R.K. und A.C. Leopold. 1968. Senescence Processes in Leaf Abscission. Plant Physiol. *43*, 1496–1502.

Esau K. 1965. Plant Anatomy. 2. Aufl. Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney.

Freudenberg K. und A.C. Neish. 1968. Constitution and Biosynthesis of Lignin. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Frey-Wyssling A. 1959. Die pflanzliche Zellwand. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Gahagan H.E., R.E. Holm und F.B. Abeles. 1968. Effect of Ethylene on Peroxidase Activity. Physiol. Plantarum *21*, 1270–1279.

Galston A.W., S. Lavee und B.Z. Siegel. 1968. The Induction and Repression of Peroxidase Isozymes by Indoleacetic Acid. In: Wightman F. und G. Setterfield (Hrsg.): Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. S. 455–472. Runge Press, Ottawa.

Gaur B.K. und A.C. Leopold. 1955. The Promotion of Abscission by Auxin. Plant Physiol. *30* 487–490.

Gawadi A.G. und G.S. Avery. 1950. Leaf Abscission and the So-Called Abscission Layer. Am. J. Bot. *37*, 172–180.

Glasziou K.T. 1969. Control of Enzyme Formation and Inactivation in Plants. Ann. Rev. Plant Physiol. *20*, 63–88.

Graham R.C., U. Lundholm und M. Karnowsky. 1965. Cytochemical Demonstration of Peroxidase Activity with 3-Amino-9-Ethylcarbazole. J. Histochem. Cytochem. *13*, 150–152.

Graham R.C. und M. Karnowsky. 1966. The Early Stages of Absorption of Injected Horse-Radish Peroxidase in the Proximal Tubules of Mouse Kidney. J. Histochem. Cytochem. *14*, 291–298.

Gurr E. 1965. The Rational Use of Dyes in Biology. Leonard Hill, London.

Hagemann P. 1971. Zur Darstellung des Leitbündelverlaufes im Wurzel-Stengel-Übergang von *Pisum sativum* und *Beta vulgaris*. Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zürich *116*, 155-163.

Hall W.C. und P.W. Morgan. 1964. Auxin-Ethylene Interrelationships. In: Nitsch J.P. (Hrsg.): Régulateurs naturels de la croissance végétale. S. 727–745. Editions CNRS, Paris.

Heinen W. 1963. Über den enzymatischen Cutin-Abbau. Acta Bot. Neerl. *12*, 51–57.

— und I. van den Brand. 1963. Enzymatische Aspekte zur Biosynthese des Blatt-Cutins. Z. Naturforsch. *18b*, 67–79.

Herrero F.A. und W.C. Hall. 1960. General Effects of Ethylene on Enzyme Systems in the Cotton Leaf. Physiol. Plantarum *13*, 736–750.

Horton R.F. und D.J. Osborne. 1967. Senescence, Abscission, and Cellulase Activity in *Phaseolus vulgaris*. Nature *214*, 1086–1088.

Jackson M.B. und D.J. Osborne. 1970. Ethylene, the Natural Regulator of Leaf Abscission. Nature *225*, 1019–1022.

Jacobs W.P. 1955. What Makes Leaves Fall? Sci. Amer. *193* (Nov.), 82–89.

— 1968. Hormonal Regulation of Leaf Abscission. Plant Physiol. *43*, 1480–1495.

Jensen T.E. und J.G. Valdovinos. 1967. Fine Structure of Abscission Zones. Planta (Berl.) *77*, 298–318.

Jensen W.A. 1955. Histochemical Localization of Peroxidase and its Induction by IAA. Plant Physiol. *30*, 426–432.

— 1962. Botanical Histochemistry. Freeman & Co., San Francisco, London.

Kühn A. 1965. Entwicklungsphysiologie. 2. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Lamport D.A. 1970. Cell Wall Metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. *21*, 235–270.

Lavee S. und A.W. Galston. 1968. Hormonal Control of Peroxidase Activity in Cultured *Pelargonium* Pith. Amer. J. Bot. *55*, 890–893.

Mapson L.W. 1970. Biosynthese von Äthylen und der Reifungsprozess von Früchten. Endeavour *XXIX* (Jan.), 29–33.

Martin J.T. und B.E. Juniper. 1970. The Cuticles of Plants. Edward Arnold (Publishers) Ltd., Edinburgh.

McGee-Russell S.M. 1955. A New Reagent for the Histochemical and Chemical Detection of Calcium. Nature *175*, 301–302.

Meudt W.J. 1967. Studies on the Oxidation of IAA by Peroxidase Enzymes. Ann. New York Acad. Sci. *144*, 118–128.

Morgan P.W., E. Beyer und H.W. Gausman. 1968. Ethylene Effects on Auxin Physiology. In: Wightman F. und G. Setterfield (Hrsg.): Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. S. 1255–1273. Runge Press, Ottawa.

Morré J.D. 1968. Cell Wall Dissolution and Enzyme Secretion During Leaf Abscission. Plant Physiol. *43*, 1545–1559.

Myers R.M. 1940. Effect of Growth Substances on the Absciss Layer in Leaves of *Coleus*. Bot. Gaz. *102*, 323–338.

Neish A.C. 1965. Coumarines, Phenylpropanes, and Lignin. In: Bonner J. und J.E. Varner (Hrsg.): Plant Biochemistry. S. 581–617. Academic Press, New York, London.

Nuotclà J. 1969. Histochemische Untersuchungen über Cytochromoxidase und Peroxidase in Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung von Äpfeln verschiedener Entwicklungsstufen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. *79*, 93–174.

Osborne D.J. 1958. Changes in the Distribution of Pectin Methylesterase across Leaf Abscission Zones of *Phaseolus vulgaris*. J. Exp. Bot. *9*, 446–457.

— 1968. Defoliation and Defoliants. Nature *219*, 564–567.

Pfeiffer H. 1928. Die pflanzlichen Trennungsgewebe. In: Linsbauer K. (Hrsg.): Handbuch der Pflanzenanatomie. Abt. 1, Teil 2, Bd. 5, Lief. 22. Borntraeger, Berlin.

Pratt H.K. und J.D. Goeschl. 1969. Physiological Roles of Ethylene in Plants. Ann. Rev. Plant Physiol. *20*, 541–584.

Rasmussen H.P. und M.J. Bukovac. 1969. A Histochemical Study of Abscission Layer Formation in the Bean. Amer. J. Bot. *56*, 69–76.

Ratner A., R. Goren und S.P. Monselise. 1969. Activity of Pectin Esterase and Cellulase in the Abscission Zone of *Citrus* Leaf Explants. Plant Physiol. *44*, 1717–1723.

Reeve R.M. 1949. Histological Observations on the Seed Coats of Succulent Peas. Food Res. *14*, 77–89.
Rouiller C., W.G.Forssmann und G.Siegrist. 1968. Die Elektronenmikroskopie und ihre Anwendungen. Acta clinica *8*, Geigy, Basel.
Rubinstein B. und A.C.Leopold. 1964. The Nature of Leaf Abscission. Quart. Rev. Biology *39*, 356–372.
Sampson H.C. 1918. Chemical Changes Accompanying Abscission in *Coleus blumei*. Bot. Gaz. *66*, 32–53.
Schwertner H.A. und P.W.Morgan. 1966. Role of IAA Oxidase in Abscission Control in Cotton. Plant Physiol. *41*, 1513–1519.
Scott F.M. 1950. Internal Suberization of Tissues. Bot. Gaz. *111*, 378–394.
— M.R.Schroeder und F.M.Turrell. 1948. Development, Cell Shape, Suberization of Internal Surface, and Abscission in the Leaf of the Valencia Orange, *Citrus sinensis*. Bot. Gaz. *109*, 381–411.
Scott P.C., B.D.Webster und A.C.Leopold. 1964. Formation of Tyloses During Bean Leaf Abscission. Plant Physiol. *39* (Suppl.), Abstract XLV.
— L.W.Miller und A.C.Leopold. 1967. Structural Changes During Bean Leaf Abscission. Amer. J. Bot. *54*, 730–734.
Siegel S.M. 1953. On the Biosynthesis of Lignins. Physiol. Plantarum *6*, 134–139.
Smith O.E., J.L.Lyon, F.T.Addicott und R.E.Johnson. 1968. Abscission Physiology of Abscisic Acid. In: Wightman F. und G.Setterfield (Hrsg.): Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. S. 1547–1560. Runge Press, Ottawa.
Spencer M. 1965. Fruit Ripening. In: Bonner J. und J.E.Varner (Hrsg.): Plant Biochemistry. S. 793–825. Academic Press, New York, London.
Steward F.C., R.L.Mott, H.W.Israel und P.M.Ludford. 1970. Proline in the Vesicles and Sporelings of *Valonia ventricosa* and the Concept of Cell Wall Protein. Nature *225*, 760–763.
Stösser R., H.P.Rasmussen und M.J.Bukovac. 1969. Histochemical Changes in the Developing Abscission Layer in Fruits of *Prunus cerasus* L. Planta (Berl.) *86*, 151–164.
Strasburger E. 1913. Das botanische Praktikum. 5.Aufl. G.Fischer, Jena.
Straus W. 1960. Localization of Intravenously Injected Horse-Radish Peroxidase in the Cells of the Convoluted Tubules of Rat Kidney. Exp. Cell Res. *20*, 600–607.
Thimann K.V. 1969. The Auxins. In: Wilkins M.B. (Hrsg.): The Physiology of Plant Growth and Development. S. 1–45. McGraw Hill, London.
Valdovinos J.G. und T.E.Jensen. 1968. Fine Structure of Abscission Zones. Planta (Berl.) *83*, 295–302.
van Fleet D.S. 1959. Analysis of the Histochemical Localization of Peroxidase Related to the Differentiation of Plant Tissues. Can. J. Bot. *37*, 449–458.
— 1962. Histochemistry of Enzymes in Plant Tissues. In: Graumann W. und K.Neumann (Hrsg.): Handbuch der Histochemie, VII/2. S. 1–38. G.Fischer, Stuttgart.
van Overbeek J., J.E.Loeffler und M.I.R.Mason. 1968. Mode of Action of Absisic Acid. In: Wightman F. und G.Setterfield (Hrsg.): Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. S. 1593–1607. Runge Press, Ottawa.
Varner J.E. 1965. Enzymes. In: Bonner J. und J.E.Varner (Hrsg.): Plant Biochemistry. S. 14–20. Academic Press, New York, London.
Webster B.D. 1968. Anatomical Aspects of Abscission. Plant Physiol. *43*, 1512–1544.
Yager R.E. 1960. Possible Role of Pectic Enzymes in Abscission. Plant Physiol. *35*, 157–162.
Yang S.F. 1967. Biosynthesis of Ethylene. Arch. Biochem. Biophys. *122*, 481–487.
— 1968. Biosynthesis of Ethylene. In: Wightman F. und G.Setterfield (Hrsg.): Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances. S. 1217–1228. Runge Press, Ottawa.

Peter Hagemann,
Huttenstrasse 60,
CH - 8006 Zürich