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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 81 (1971)

Artikel: Die Sklereidendifferenzierung in Pyrus communis : morphologische, anatomische und histochemische Untersuchungen

Autor: Häuptli, Fritz

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-57132

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: 29.12.2025

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

Ber. Schweiz. Bot. Ges. *81*, 273–319 (1971)

Die Sklereidendifferenzierung in Pyrus communis Morphologische, anatomische und histochemische Untersuchungen

Von *Fritz Häuptli*

Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich

Manuskript eingegangen am 3. März 1971

Inhalt

1. Einleitung. – 2. Aufgabe. – 3. Geschichtliches. – 4. Das Material und seine Vorbereitung. – 5. Methoden. – 6. Ergebnisse. 6.1 Wachstum. 6.2 Steinzellen. 6.3 Tyrosin. 6.4 Stärke. 6.5 Calciumoxalat. 6.6 Lignin. 6.7 Tannin. 6.8 β-Glukosidase. 6.9 Saure Phosphatase. 6.10 Peroxydase. 6.11 Phenoloxydase. – 7. Diskussion. – 8. Zusammenfassung. – Literatur

1 Einleitung

Die eigenartige und auffallende Steinzellenbildung im Rindenparenchym der Birne ist ein eindrucksvolles Beispiel der Umdifferenzierung von Zellen. Parenchymatische Zellen mit wahrscheinlich gleichen Erbanlagen wie die Nachbarzellen entwickeln sich in den ersten Wochen der Fruchtentwicklung zu Sklereiden, das heisst zu Zellen, die sich durch die verdickten und lignifizierten Wände beträchtlich von Parenchymzellen unterscheiden.

Man stellt sich heute vor, dass Operonen, die durch Repressoren und sekundär durch Effektoren beeinflusst werden, für die unterschiedliche Entwicklung ursprünglich gleicher Zellen verantwortlich sind. Modifizierende Faktoren aktivierten oder reprimierten somit potentiell aktive oder reprimierbare Gene. Bei allen die Differenzierung betreffenden Untersuchungen müssen also einerseits diese speziellen modifizierenden Faktoren, andrerseits die Funktionen der durch sie beeinflussten Gene gefunden werden. Beides sind schwierige Unterfangen. Die Kausalität der Differenzierung ist darum noch immer ein Hauptproblem der Entwicklungsphysiologie.

2 Aufgabe

In der vorliegenden Arbeit gilt es vor allem, die Sklereidbildung mit den sie begleitenden, histochemisch nachgewiesenen chemischen Substanzen zu vergleichen und so Einblicke in das physiologische Geschehen der Differenzierung zu erhalten. Im Mittelpunkt stehen somit histochemische Untersuchungen.

Die anatomische Struktur der Birnenfrucht findet sich oft beschrieben (vgl. Esau, 1965, Kap. 3). Auch physiologische Studien während der Fruchtentwicklung sind gemacht worden (vgl. Bain, 1961; Nagel und Patterson, 1967; Nortjé und Koeppen,

1965). Histochemische Arbeiten mit diesem Objekt fehlen bis heute vollständig. Eine histochemische Untersuchung erscheint auch darum notwendig.

Grundsätzlich müssen histochemische Methoden stets sehr sorgfältig geprüft werden. Irrtümer, die sich aus der Übernahme nicht genügend gesicherter histochemischer Verfahren ergeben, sind möglich. In den Untersuchungen dieser Arbeit wäre zum Beispiel der histochemische Nachweis der Indolessigsäure sehr wünschenswert gewesen. Eine diesbezügliche Methode ist aber kürzlich widerlegt worden (Libbert und Kunert, 1966).

Die im folgenden angewandten Verfahren sind im wesentlichen erprobt. Es darf darum angenommen werden, dass dabei auftretende Schwierigkeiten bekannt sind. Zudem wird versucht, durch entsprechende Kontrollen, durch Änderungen des pH-Wertes oder des Puffers und durch verschiedene Nachweismethoden Fehlerquellen aufzuspüren.

Da die Zellwände der Steinzellen mit Lignin inkrustiert sind, wird hauptsächlich die Aktivität der Enzyme untersucht, die bei der Bildung des Lignins von Bedeutung sein können (Freudenberg et al., 1952, 1955; Siegel, 1953; Higuchi, 1957a, b).

Nach Freudenberg sind an der Synthese von Lignin in verholzendem Pflanzengewebe zwei Fermentsysteme beteiligt, nämlich β-Glukosidase und ein Redoxasengemisch. Die Glukosidase liefert nach dieser Vorstellung die Monomere. Diese «Bausteine» werden durch das Redoxasengemisch, bestehend aus Phenoldehydrogenasen und Peroxydase, in unstabile Radikale verwandelt, die dann zu Lignin polymerisieren. Allerdings muss erwähnt werden, dass das Auftreten freier Radikale von einzelnen Autoren bezweifelt wird (s. Schubert, 1965).

Das Studium der Ligninsynthese erfolgt in der Regel so, dass man lebendem Gewebe angenommene Ligninvorläufer verfüttert, wobei diese Vorläufer entweder markiert oder in hoher Konzentration verabreicht werden. Auch Versuche in vitro bringen Aufschlüsse über die Ligninbildung. Dabei werden Enzyme mit den sogenannten «Baustein»-Molekülen in Verbindung gebracht und ligninähnliche Polymere in der Folge beobachtet.

Es ist naheliegend, dass histochemische Untersuchungen nicht Aufschlüsse der gleichen Art liefern. Sie können jedoch die mit den genannten Methoden erhaltenen Ergebnisse stützen und das Differenzierungsphänomen der Sklereidbildung klären helfen, indem sie die topographischen Verhältnisse des natürlichen Gewebes berücksichtigen.

Um die histochemischen Ergebnisse anatomisch-morphologischen Gegebenheiten zuordnen zu können, müssen diese Veränderungen der Birne im Verlaufe der Entwicklung beobachtet werden. Damit bietet sich auch Gelegenheit, die Entwicklung der untersuchten Birnenvarietät mit derjenigen der Bartlett-Birne – der meistuntersuchten Sorte – zu vergleichen.

Zusammenfassend stellen sich also folgende Aufgaben:

1. Untersuchungen über die Steinzellendifferenzierung im Rindenparenchym der Birne

   In Verbindung mit 1:

2. Beobachtungen morphologisch-anatomischer Änderungen im Verlaufe der Fruchtreife
3. Physiologische Untersuchungen mit Hilfe histochemischer Methoden unter besonderer Berücksichtigung der vermutlich an der Verholzung beteiligten Enzyme

Die durch eine Virose verursachten, pathologischen Steinzellenbildungen, die zu unförmigen und nicht mehr geniessbaren Früchten führen (vgl. Sorauer, 1954; Corte, 1959), sind in diesen Untersuchungen nicht einbezogen.

3 Geschichtliches

Von der weiten Verbreitung der Sklereiden im Pflanzenreiche und von ihrer Formenmannigfaltigkeit zeugen eine grosse Zahl von Veröffentlichungen. Nicht nur in Früchten, sondern auch in Blättern, Samen, Stengeln und natürlich besonders im Gefässgewebe sind Sklereiden in Pflanzen vorhanden. Esau (1960) und Forster (1956) geben darüber zusammenfassende Darstellungen, so dass hier nur von den Birnensteinzellen berichtet werden soll.

Was ist heute über die Steinzellen in Birnen bekannt? Seit wann bilden sie ein Untersuchungsobjekt der Botanik?

«Tout le monde a pu remarquer, au milieu du tissu charnu de toutes les poires, des amas pierreux dont la structure, dit-on, rappelle celle du noyau», schrieb Cave schon 1868, und tatsächlich reicht die erste Erwähnung der Birnensklereiden in einer wissenschaftlichen Arbeit auf das Jahr 1682 zurück. Vom Römer Palladius abgesehen (bei Crist und Batjer, 1931, zitiert), der vorgeschlagen hat, die Erde um den Birnbaum durch frische Erde, frei von Kies und Steinen, zu ersetzen, falls in Birnenfrüchten viele «Steine» vorkommen, beschrieb der berühmte Engländer Grew in seiner «Anatomy of Plants» die Steinzellenbildung in der Birne und verglich sie mit jener der Nuss. Er glaubte, dass sie durch geronnene und verhärtete Säfte in freien, zufälligen Anhäufungen verursacht wurde. Macquart und Vauquelin (1791) unterwarfen die Sklereiden zum erstenmal einer physikalisch-chemischen Analyse. Noch vor ihnen vermutete man, dass die Steinzellen von der gleichen Beschaffenheit wie Nierensteine wären. Doch die beiden Forscher entdeckten, dass Sklereiden aus ligninartigem Stoff bestanden. Sie berichteten, dass die Steinzellen beim Verbrennen nach grilliertem Brot rochen, dass sie biegsam, elastisch und schwer zu pulverisieren waren.

Turpin (1838) bemerkte, dass die Zellen mit diesem ligninartigen Stoff, den er Sklerogen nannte, inkrustiert waren. Er verglich die Steinzellenbildung der Pflanzen (Birne, Quitte, Mispel, Aprikose, Pfirsich und Kokosnuss) mit der Knochenbildung im Tierreich, indem er auch dort eine Inkrustation der Zellen – allerdings nicht mit Sklerogen, sondern mit Calciumcarbonat – feststellte.

Erdmann (1866) gab in der Einleitung seiner Abhandlung einen kurzen historischen Überblick. Er hebt dabei die Erkenntnis Meyens (1837, 1841) hervor, dass die Zellmembranen der Steinzellen schichtenartig verdickt sind. Dann beschreibt er, wie er die Steinzellen vollständig vom Fruchtfleisch getrennt und anschliessend analysiert hat. Seine Untersuchungen gipfeln in einer Formel für die Steinzellensubstanz ($C_{24}H_{36}O_{16}$) und in einer Hypothese für ihre Bildung. Er will Turpins Ausdruck «Sklerogen» mit «Glycodrupose» ersetzen, ein Ausdruck, der von Hegi (1935 bzw. 1909) für die Steinzellensubstanz der Birnen übernommen wird.

Cave (1869) machte die wichtige Beobachtung, dass die Zellen, die später ihre Wände verdickten, anfänglich rascher wuchsen als normale Parenchymzellen.

Sind die im Fruchtfleisch der Birnensorten vorkommenden Steinzellhaufen die Rudimente einer bei den Vorfahren der Birne vorhanden gewesenen Steinhülle? War die Birne ursprünglich eine Steinfrucht, eine Drupa?

Potonié (1880) versuchte in phylogenetischen Betrachtungen mit Hilfe verschiedener Birnenvarietäten, die «Holzbirnen» eingeschlossen, diese naheliegende Theorie zu stützen. Allerdings konnte er, wie er ausdrücklich betonte, weder paläontologische noch geschichtliche Beweise für diese Theorie anführen, weil weder in geologischen Formationen noch bei den Pfahlbauern Birnenfruchtmaterial gefunden wurde.

In pflanzenanatomischen Werken und in Berichten über Nahrungsmitteluntersuchungen wurden die Steinzellen der Birne in der Folge erwähnt (Strasburger, 1884; Malfatti, 1896; Moeller und Griebel, 1928). Crist und Batjer (1931) versuchten die Frage zu beantworten, ob äussere Faktoren für den Steinzellengehalt in Birnen verantwortlich seien. So verglichen sie zum Beispiel Früchte in bezug auf das Sklereidvorkommen von gepfropften und ungepfropften, von jungen und alten, von kräftigen und schwächlichen Bäumen. Sie verhüllten die Früchte mit einem schwarzen Tuch, punktierten die Epidermis der Früchte, versiegelten das Kalixende, ringelten oder entlaubten die Äste. Auch wurde der Einfluss der Düngung und der künstlichen Bewässerung auf die Steinzellenbildung studiert.

Sie analysierten Früchte aus verschiedenen geographischen Gebieten, liessen Birnen bei der Lagerung ausreifen und variierten auf diese Weise das Datum des Pflückens. Alle diese äussern Beeinflussungen blieben bis auf zwei Ausnahmen ohne Wirkung auf die Steinzellenbildung: Bei punktierten und verhüllten Früchten nahm die Steinzellenzahl zu.

Von historischem Interesse ist ferner, dass Crist und Batjer ganze Querschnitte verschiedener Birnensorten mit Benzidin behandelten und so auf Peroxydase testeten. Allerdings wurde keine histologische Lokalisation des Enzyms durchgeführt. Auch Crist und Batjer gingen in ihrer umfangreichen Arbeit einleitend auf frühere Untersuchungen ein.

Crist und Batjer fanden Anhaltspunkte für eine Verminderung der Birnensklereiden während der Fruchtreife. Dies bestätigte Smith (1935) mit Untersuchungen an einer andern Birnenvarietät.

Frey-Wyssling (1942) veröffentlichte eine Studie über den Feinbau der Birnensteinzellen aufgrund polarisationsoptischer Untersuchungen. Er zeigte, dass der Anteil der isotropen Membranstoffe ungefähr dem Doppelbrechungsausfall einer Steinzelle gegenüber einer ganz aus Zellulose bestehenden, hypothetischen Steinzelle entsprach. Seine Ergebnisse verglich er mit der chemischen Analyse der Steinzellen von Nussschalen, Pflaumen- und Kirschkernen (Voss et al., 1938), welche die 3 Zellwandstoffe Zellulose, Xylan und Lignin angenähert zu je einem Drittel in der Zellmembran nachwies. «Man darf daher für die Steinzellen annehmen», folgerte er, «dass ein kohärentes Gerüst von kristallisierter Zellulose, eventuell mit in das Kettengitter aufgenommenem Xylan, vorliegt, das etwa das halbe Volumen der Zellwand einnimmt, während die grossen Maschen dieses Gerüstes von isotropem Lignin und leicht löslichem, nicht kristallisiertem Xylan sowie andern Hemizellulosen oder Pektinstoffen ausgefüllt werden.»

Sterling (1954) widerlegte in einer genauen und ausführlichen Arbeit die Publikation von Crist und Batjer, indem er die Delignifikation und Reduktion der Steinzellen in der Birne während der Fruchtreife verneinte. Es blieb die letzte grössere Untersuchung über Steinzellen der Birne. Sie brachte zahlreiche anatomische Einzelheiten der Sklereid- und Sklereidhaufenbildung.

Bain (1961) bestätigte die Untersuchungen von Sterling in bezug auf die Steinzellen. Er stellte fest, dass die Entwicklung im innern Rindenparenchym («pith») und in der «Stärkeschicht» («cortex») nach 8 Wochen abgeschlossen war und dass nur in der Subhypodermis («outer cortex») bis zur 12. Woche Neubildungen von Steinzellen vorkamen.

Sterling und Bain arbeiteten beide mit der Bartlett-Birne (= Williams Bon Chrétien). Die in der vorliegenden Untersuchung verwendete Birnenvarietät braucht wesentlich länger zur Fruchtentwicklung (26 gegenüber 20 [Sterling] bzw. 18 Wochen [Bain]). Trotz dieser Verschiedenheit erwiesen sich die gleichen Termine (8. bzw. 12. Woche nach dem Blühen) für die Steinzellenentwicklung wichtig (vgl. Kap. 6.2).

Abschliessend sei der Vollständigkeit halber noch auf folgende Publikationen hingewiesen:

Frey-Wyssling (1942) zeigte in der schon zitierten Arbeit die Unverdaulichkeit der Steinzellenpartikeln. Das Passieren des Kaninchendarms bewirkte nämlich an Steinzellen nicht die geringsten Korrosionsfiguren. Diese Tatsache wurde bedeutsam bei der industriellen Herstellung von Babynahrung aus Birnen. Van Blaricom und Brittain (1961) entwickelten darum unter Berücksichtigung eines frühern Verfahrens (Beacham, 1930) eine Methode, die eine Bestimmung des Steinzellengehaltes der Birnen und eine Entfernung dieser Steinzellen erlaubte.

Mit dem gleichen Problem beschäftigte sich zur gleichen Zeit Zalewski (1961).

4 Das Material und seine Vorbereitung

In sogenannten Winterbirnen ist die Zahl der Steinzellen sehr gross. Als Untersuchungsobjekt wird deshalb die «Dechantsbirne von Alençon» (Kessler, 1948) gewählt. Diese Birnensorte ist erst im Februar oder März essreif.

Die Früchte werden von den bodennahen Ästen eines 13 m hohen Baumes gepflückt. Der durchschnittliche Jahresertrag des 85jährigen Baumes beträgt 70–80 kg.

Ungefähr 5 mm dicke, fixierte oder unfixierte Sektoren aus den Querschnitten der Birnen werden mit einer 0,5-m Rohrzuckerlösung infiltriert und danach mit dem Gefriermikrotom oder von Hand geschnitten. Durch die Infiltration mit der Rohrzuckerlösung wird das Schneiden erleichtert. Auch werden dadurch störende Luftblasen in den Schnitten entfernt. Kontrollversuche zeigen, dass die Verwendung der Rohrzuckerlösung die Ergebnisse nicht beeinflusst.

Anschliessend werden die Schnitte nach den in den einzelnen Kapiteln beschriebenen Methoden behandelt.

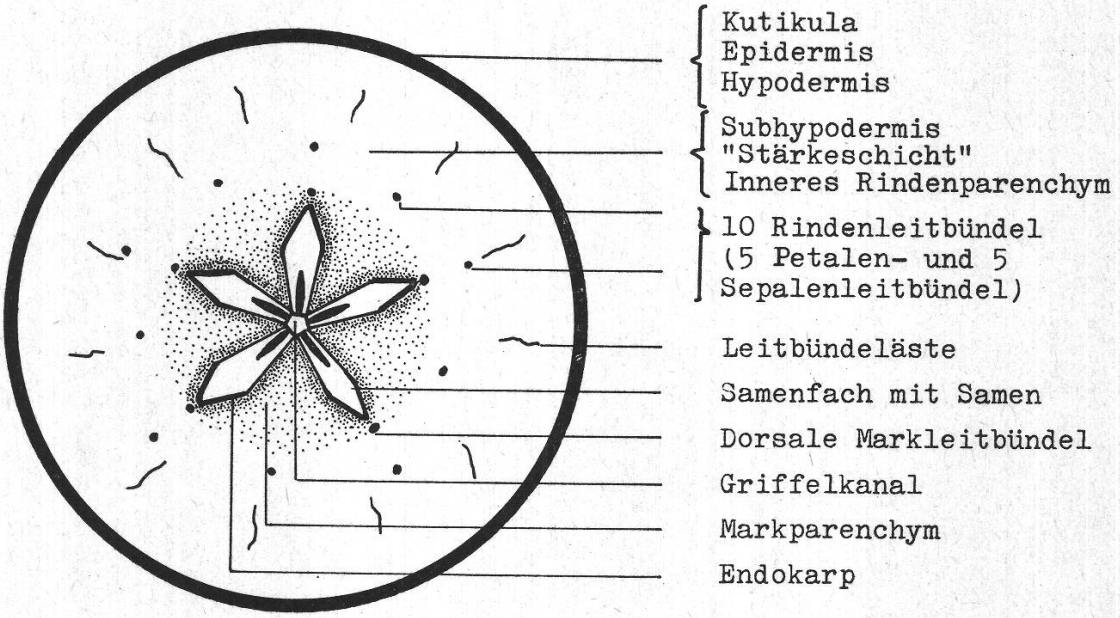


Fig. 4.1.1

Fruchtquerschnitt

5 Methoden

5.1 *Wachstum*

Periodisch werden folgende Masse der Frucht bestimmt:

a) Durchmesser der grössten Querschnittfläche (1968, 1969)
b) Längsachse (vom Stielansatz bis zum Kelch, 1969)
c) Verhältnis der Ausdehnung des Rindenparenchyms zum Radius des Markparenchyms in der grössten Querschnittfläche
d) Die Ausdehnung der einzelnen Gewebe und Gewebeteile längs des Radius der grössten Querschnittfläche
e) Fruchtvolumen, gemessen durch die Wasserverdrängung
f) Anzahl der Zellreihen längs des Radius der grössten Querschnittfläche

Anhand des grössten Fruchtdurchmessers wird im Jahre 1968 die Verteilung durch die Berechnung von Φ geprüft.

$$\Phi = \frac{\text{Anzahl der Messungen im Intervall } M \pm s}{\text{Anzahl der Messungen}}$$

(M = Mittelwert, s = Streuung)

Die Zellzahl der Frucht wird auf 2 Arten ermittelt:

a) Das Fruchtvolumen wird dividiert durch das mittlere Zellvolumen.
b) In Abständen von ungefähr 3 mm werden vom Stielansatz bis zum Kelch Querschnitte hergestellt. Auf diesen Querschnittflächen wird die Zellzahl bestimmt und unter Berücksichtigung des Zellvolumens jeweils die Anzahl der Zellen geschätzt. Die Addition dieser Werte liefert die Zellzahl der ganzen Frucht.

(Das Zellvolumen wird dem Kugelvolumen, das aus dem Zelldurchmesser errechnet wird, gleichgesetzt.)

5.2 *Steinzellen*

Es wird während der 2. bis 5. Woche nach dem Blühen versucht, die Steinzellenentwicklung zahlenmässig zu erfassen. Mit Hilfe des Mikroskopmikrometers wird auf der grössten Querschnitt-

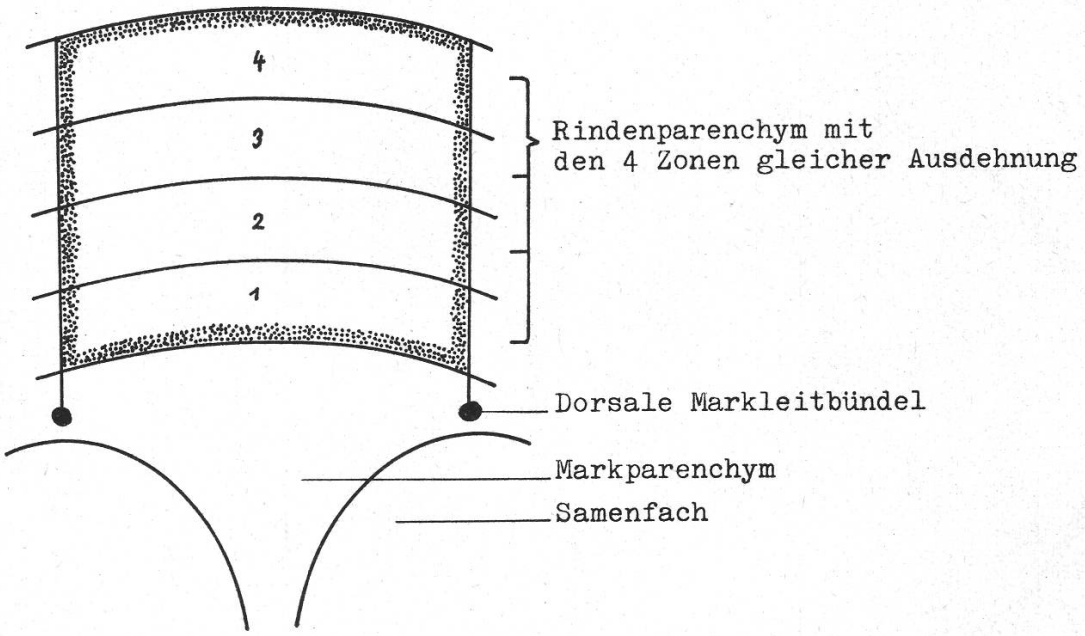


Fig. 5.2.1

Teil des Fruchtquerschnittes. Die Zonen 1 und 2 entsprechen ungefähr dem innern Rindenparenchym. Die Zone 3 kann angenähert der «Stärkeschicht» und die Zone 4 der Subhypodermis, Hypodermis, Epidermis zugeordnet werden

fläche des Rindenparenchyms eine Teilfläche (vgl. Fig. 5.2.1) in 4 gleich breite Abschnitte eingeteilt. In dieser Fläche werden stets 5 Zählungen durchgeführt. Die vertikale Ausdehnung der Haufen bleibt dabei unberücksichtigt. Insbesondere die mächtigen Haufen im innern Rindenparenchym machen nach der 5. Woche eine Zählung problematisch; sie wird deshalb später nicht mehr ausgeführt.

5.3 *Tyrosin*

Millonsche Reaktion (Baker, 1956, nach Spannhof, 1967):

Die Schnitte werden für 45 Minuten bei 60 °C im Millon-Reagenz gehalten. Danach werden sie gespült und montiert.

Millon-Reagenz:

In 100 ml einer wässrigen H_2SO_4-Lösung (10 %) werden 10 g $HgSO_4$ durch Erwärmen gelöst. Dann wird mit dest. Wasser auf 200 ml aufgefüllt und wässrige $NaNO_2$-Lösung (0,25 %) zugegeben.

Kontrolle

Das Reagenz der Kontrolle enthält keinen Nitritzusatz.

Bemerkungen

Freies Tyrosin geht in Lösung, so dass nur gebundenes nachgewiesen werden kann. Die Reaktion ist spezifisch (Spannhof, 1967).

5.4 *Stärke*

IKI-Reaktion (Johansen, 1940, nach Jensen, 1962):

Frische Schnitte werden während 10 bis 15 Minuten in der IKI-Lösung gehalten. Die Stärke färbt sich dunkelblau.

IKI-Lösung: 2 g KI werden in 100 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden 0,2 g Jod gegeben.

5.5 *Lignin*

Phlorogluzintest (Johansen, 1940, Siegel, 1953, nach Jensen, 1962):

Phlorogluzinlösung: Gesättigte wässrige Lösung von Phlorogluzin in HCl (20 %). – Lignin erscheint rot.

5.6 *Tannin*

Nitrosoreaktion (Reeve, 1951, nach Jensen, 1962):

Zu frischen Schnitten werden der Reihe nach gleiche Mengen Natriumnitratlösung (10 %), Harnstoff (20 %), Essigsäure (10 %) gegeben. Nach 3 bis 4 Minuten wird die doppelte Menge Natriumhydroxyd (2 n) zugefügt.

Zur Kontrolle wird das Natriumnitrat zuletzt beigegeben.

5.7 β-Glukosidase

Als Substrat wird Indikan gewählt (Beijerinck, 1900, nach van Fleet, 1962). Das Enzym hydrolysiert das Glukosid, und das frei werdende Indoxyl oxydiert spontan zu Indigo.

Unfixierte Schnitte werden während 3 Stunden bei 37 °C in der Inkubationslösung gehalten. Darauf werden sie gespült und montiert. Inkubationslösung: 2,5 ml wässrige Indikanlösung (2 %) +0,8 ml Phosphatpuffer (m/15), pH-Wert: 6,0. Der pH-Wert wird variiert. Hie und da wird der Puffer durch dest. Wasser ersetzt.

Kontrolle

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

5.8 *Saure Phosphatase*

5.8.1 *Allgemeines*

Saure Phosphatase ist ein Sammelbegriff für die 3 unspezifischen Phosphomonoesterasen II, III, IV. Die Phosphomonoesterase II ist in Pflanzen am verbreitetsten. Phosphatasen spalten Phosphorsäureester.

Es werden im folgenden 2 Nachweismethoden angewandt:

Metallsalzmethode: Metallionen bilden mit der frei werdenden Phosphorsäure unlösliche Salze, die sich am Ort ihrer Bildung niederschlagen. Bei saurem Milieu wird als geeignetes Metallion Blei verwendet. Das entstehende weisse Salz, $Pb_5(PO_4)_3Cl$ (Pratt, 1954, nach Deane et al., 1960), wird wegen der Kontrastwirkung sekundär in Bleisulfid umgewandelt.

Azofarbstoffmethode: Als Substrat für die Phosphatase wird ein Naphtholester gebraucht. Die enzymatische Hydrolyse setzt den Naphtholrest frei, und dieser wird mit dem «Hexazoniumsalz» gekuppelt. Dies führt zu einem unlöslichen Azofarbstoff.

5.8.2 *Fixierung*

Folgende Fixierungen werden angewandt (vgl. Deane et al., 1960):

a) Fixierung nach dem Schneiden in Kaltazeton (4 °C) für 5 Minuten
b) Fixierung vor dem Schneiden in Neutralformol (10 %) für 5 bis 7 Stunden
c) Fixierung nach dem Schneiden in Neutralformol für 10 Minuten

5.8.3 *Verfahren*

5.8.3.1 Bleisulfidverfahren (Gomori, 1952, Jensen, 1956, nach Jensen, 1962)

Frisch geschnittenes oder fixiertes Gewebe wird in der Substratlösung bei 37 °C während 3 Stunden inkubiert. Inkubationsgemisch: 0,6 g Bleinitrat in 500 ml 0,5-m Azetatpuffer (pH 4,6), 50 ml 0,1-m Natriumglycerophosphat. Vor dem Gebrauch wird mit NaOH auf den pH-Wert 5,0 eingestellt. Die Schnitte werden nach der Inkubation gründlich gespült und danach während 3 bis 5 Minuten in verdünnte Ammoniumsulfidlösung (1 %) gebracht. Schliesslich werden sie nochmals gespült und montiert.

Kontrollen

a) Fluorionen inaktivieren die Phosphatase.
b) Die Schnitte werden im Substratgemisch, das aber kein Glycerophosphat enthält, inkubiert. Die Behandlung des Gewebes bleibt im übrigen gleich wie beim Test. Durch diese Kontrolle können die freien Phosphorsäuren erfasst werden.
c) Die Schnitte werden während 5 Minuten in heisses Wasser (90 °C) gelegt. Die anschliessende Behandlung entspricht dem Testverfahren.
d) Um die Anwesenheit von Schwermetallionen zu erkennen, werden die Schnitte nur mit Ammoniumsulfid behandelt.

5.8.3.2 *Azofarbstoffmethode* (Barka, 1960, Davis et al., 1959, Lojda et al., 1964, nach Spannhof, 1967)

Die Schnitte werden bei Zimmertemperatur während 40 Minuten im Inkubationsgemisch gehalten. Inkubationsgemisch: 20 mg α-Naphthylphosphat wird zu 13 ml Phosphatpuffer (pH 6,0) gegeben, und dazu wird 1,6 ml hexazotiertes Fuchsin gefügt. Der pH-Wert wird mit NaOH (1 n) auf 6,0 bis 6,5 eingestellt. Anschliessend wird filtriert.

Hexazotiertes Fuchsin wird aus Fuchsin (4 % in HCl, 2 n) und $NaNO_2$ (4 %) hergestellt. Je 0,8 ml von beiden Lösungen werden unmittelbar vor dem Gebrauch in der Kälte gemischt. Innerhalb von 30 bis 40 Sekunden bildet sich das schwach gelbliche «Hexazoniumsalz». Nach dem Inkubieren werden die Schnitte gespült und montiert.

Kontrollen

a) Das Gewebe wird während 5 Minuten in heissem Wasser (90 °C) gehalten und anschliessend der Testbehandlung unterworfen.
b) Das Gewebe wird wie beim Testverfahren behandelt. Die Inkubationslösung enthält jedoch kein α-Naphthylphosphat.

5.9 *Oxydasen*

5.9.1 *Allgemeines*

Bei der Oxydation sich färbende, unlösliche Substrate dienen zu histochemischen Nachweisen der Oxydasen. Für die Peroxydase sind zahlreiche Verfahren entwickelt und geprüft worden (Reiss, 1967). Diese Mannigfaltigkeit der Nachweismethoden fehlt für die Phenoloxydasen.

Zytochromoxydase, Peroxydase und Phenoloxydase können die gleichen Substrate angreifen. Van der Ploeg und van Duijn (1964) haben beispielsweise zeigen können, dass Dopa (= Dihydroxyphenylalanin) und Dopaderivate rascher Melanin bilden bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxyd und von peroxydaseaktiven Proteinen. Es ist auch möglich, dass in wässrigen Phenollösungen leicht Wasserstoffperoxyd auftritt. Aus diesen Gründen wird folgende gegenseitige Abgrenzung der 3 genannten Oxydasen vorgenommen:

a) Die Schnitte, die auf Peroxydase und Phenoloxydase untersucht werden sollen, werden gelegentlich vor dem Inkubieren während 5 Minuten auf 60 °C erhitzt. Dadurch wird die Wirkung der Zytochromoxydase beseitigt.
b) Durch die Verwendung von Substraten (Benzidin, Brenzcatechin und Dopa), die in vitro durch das Zytochrom c nicht oxydiert werden (Deane et al., 1960), wird der Einfluss der Zytochromoxydase ausgeschaltet.
c) Die Phenoloxydase wird bei der Untersuchung der Peroxydase durch Präinkubation der Schnitte in Dieca (=Diäthyl-dithiocarbamat, 10^{-2}-m) vollständig gehemmt.
d) Der Dopa- und Brenzcatechinlösung wird zur Zerstörung von endogenem Wasserstoffperoxyd Katalase (1 ml Katalase [Fluka]/6,4 ml Inkubationslösung beigefügt.

Der histochemische Nachweis berücksichtigt die Tatsache nicht, dass die in dieser Arbeit untersuchten Oxydasen molekular heterogen sind. Zahlreiche Isoenzyme kommen sowohl bei der Peroxydase (Jermyn, 1952; Klapper und Hackett, 1965; Novacky und Hampton, 1968; Shannon et al., 1966; Siegel und Galston, 1967) als auch bei der Phenoloxydase (Constantinides und Bedford, 1967) vor. Dies und die Möglichkeit, dass die Peroxydase und die Phenoloxydase in einem Proteinkomplex verbunden sein könnten (Sheen und Calvert, 1969), muss bei der Auswertung der Resultate beachtet werden.

5.9.2 *Peroxydase*

Zur Hauptsache wird im folgenden Peroxydase mit der Methode von Graham et al. (1965) nachgewiesen. Um Adsorptionsartefakte zu erkennen, werden 2 weitere Methoden angewandt.

5.9.2.1 *Fixierung*

Die Gewebescheiben werden 5 Minuten in Kaltazeton (4 °C) fixiert.

5.9.2.2 *Verfahren*

Inkubationslösungen

a) 3-Amino-9-Äthylcarbazol (AAC),
(Graham et al., 1965, leicht geändert);
4 mg 3-Amino-9-Äthylcarbazol werden in 0,5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst und anschliessend mit 9,5 ml Azetatpuffer (0,05 m) von pH 5,1 gemischt.
b) Benzidin (B),
(Isaac et al., 1947, nach Jensen, 1962, leicht geändert):
10 mg Benzidin werden in 0,5 ml Alkohol abs. gelöst. Dieser Lösung werden 9,5 ml Azetatpuffer (0,05 m) von pH 5,1 zugefügt.
c) Aminlösung,
(Burstone, 1960, leicht geändert):
25 mg p-Aminodiphenylamin und 15 mg p-Aminoazobenzol werden in 1 ml Alkohol abs. gelöst und entweder mit 35 ml Wasser oder mit 25 ml Wasser und 10 ml Azetatpuffer (0,05-m) von pH 5,1 verdünnt.

Alle Lösungen werden unmittelbar vor dem Gebrauch filtriert. Danach wird zu 10 ml Inkubationslösung 1 ml Wasserstoffperoxyd (3 %) gegeben.

Kontrollen

a) Die Schnitte werden vor dem Inkubieren während 5 Minuten in heissem Wasser (90 °C) gehalten.
b) Der Inkubationslösung wird kein Wasserstoffperoxyd zugefügt.
c) 1 ml Kaliumzyanid (0,1-m) wird zu 5 ml Inkubationslösung gegeben.

5.9.3 *Phenoloxydase*

Kupferhaltige Oxydasen umfassen Phenoloxydasen (z. B.: Tyrosinase, Laccase) und die Ascorbinsäureoxydase. Letztere oxydiert keine Monohydroxy- und Polyhydroxyphenole (Rauen, 1964)

und wird mit den 2 folgenden Methoden nicht erfasst. Ascorbinsäure kann umgekehrt jedoch auch durch Polyphenoloxydase, durch Peroxydase und Laccase (Ponting und Joslin, 1948) oxydiert werden.

Neben Dopa (Bloch, 1917, nach Deane et al., 1960), dem üblichen Substrat für den Nachweis der Phenoloxydase, wird auch Brenzcatechin (Smith, 1954, nach Deane et al., 1960) verwendet. Der Einfluss der Formolfixierung wird geprüft, indem das Gewebe vor dem Schneiden während 5 Stunden in Neutralformol (10 %) fixiert wird.

Inkubationslösungen

5 ml Dopalösung (0,3 %) bzw. 5 ml Brenzcatechinlösung (0,2 %) werden mit 1,6 ml Phosphatpuffer (m/15) von pH 6,8 vermischt.

Die Inkubationsdauer beträgt in der Regel 3 Stunden, die Inkubationstemperatur 37 °C.

Lösungen mit verschiedenen pH-Werten werden neben der Standardlösung verwendet.

Die Dopalösung wird wegen der Eigenoxydation zwei- bis dreimal während der Inkubationsdauer ersetzt.

Kontrollen

a) Die Schnitte werden für 5 Minuten in Wasser von 90 °C inaktiviert.
b) Der Inkubationslösung wird 1 ml Diäthyl-dithiocarbamat (Dieca, 10^{-1}-m) als Inhibitor beigegeben.
c) Die Schnitte werden in einer Lösung ohne Substrat inkubiert.

6 Ergebnisse

6.1 *Wachstum*

Beginn des Blühens: 22. April 1968, 1. Mai 1969.

Erntedaten: 21. Oktober 1968, 28. Oktober 1969.

Wie aus der Tabelle 1.1 hervorgeht, ist die Verteilung normal.

Zellzahl der Frucht: $4 \cdot 10^7$ bis $5 \cdot 10^7$ Zellen (13. Woche nach dem Blühen).

Die Zellteilungen im Markparenchym hören schon 14 Tage nach dem Blühen, jene im Rindenparenchym zwischen der 7. und 9. Woche auf (Fig. 1.6). Die Ausdehnung der Gewebe erfolgt nachher nur noch durch das Streckungswachstum der Zellen.

Die Wachstumskurven des Volumens und des Durchmessers zeigen einen sigmoiden Verlauf (Fig. 1.1–1.3).

Der Durchmesser wächst nach der 8. Woche und nach der 16. Woche während 1 bis 3 Wochen ein wenig langsamer. Von der 21. Woche an schwanken die Durchmesserwerte des Jahres 1969 stärker als jene des Jahres 1968, weil einzelne Früchte im Jahre 1969 schon einige Wochen vor dem Erntedatum abgefallen sind und somit nicht mehr gemessen werden konnten (Fig. 1.1).

Die Längsachse der Frucht nimmt zwischen der 3. und 6. Woche am stärksten zu (Fig. 1.1).

Über die Ausdehnung der Gewebe und Gewebeteile in der Frucht geben die beiden Figuren 1.4 und 1.5 Auskunft. Auffällig ist das starke Wachstum des innern Rindenparenchyms von der 8. Woche und des Markparenchyms von der 10. Woche an. Besonders die äussern Zellen des Markparenchyms beginnen sich während der 10. Woche sehr schnell zu vergrössern. Von der 16./17. Woche an ist es die «Stärkeschicht», die sich ausserordentlich dehnt. Die nicht verholzenden Zellen der Subhypodermis werden während der Fruchtentwicklung zunehmend prosenchymatisch, was die Abnahme der Gewebeausdehnung nach der 10. Woche erklärt.

Der Griffelkanal füllt sich im letzten Drittel der Vegetationsperiode im Zentrum der Frucht mit kollenchymatischen Zellen, dem Griffelkanalgewebe.

Tabelle 1.1

Fruchtdurchmesser und Verteilung (Φ) während der Vegetationsperiode 1968 (M = Mittelwert, s = Streuung)

Alter in Wochen	Gemessene Früchte	Durchmesser M ± s in mm	Anzahl Früchte in M ± s	Φ
2	50	6,1 ± 0,7	37	0,740
3	52	8,1 ± 0,7	38	0,731
4	60	9,6 ± 0,8	43	0,717
5	61	11,5 ± 1,1	42	0,689
6	60	14,2 ± 1,2	43	0,717
7	60	16,7 ± 1,4	38	0,633
8	60	19,9 ± 1,6	39	0,650
9	62	21,8 ± 1,6	44	0,710
10	60	24,6 ± 1,8	44	0,733
11	60	27,7 ± 1,9	41	0,683
12	61	29,9 ± 2,0	40	0,656
13	60	32,2 ± 2,1	40	0,667
14	60	33,8 ± 2,2	40	0,667
15	60	36,6 ± 2,2	39	0,650
16	60	39,1 ± 2,3	40	0,667
17	60	40,5 ± 2,5	42	0,700
18	60	41,8 ± 2,8	41	0,683
19	60	44,3 ± 3,0	41	0,683
20	60	46,4 ± 3,1	39	0,650
21	60	47,9 ± 3,1	41	0,683
22	60	49,8 ± 3,2	40	0,667
23	60	51,3 ± 3,1	38	0,633
24	60	52,4 ± 3,3	43	0,717
25	60	53,1 ± 3,4	41	0,683
26	60	53,2 ± 3,0	43	0,717

Tabelle 1.2

Durchmesser, Längsachse und Volumen einzelner Früchte während der Vegetationsperiode 1969 (vgl. Fig. 1.2 und Fig. 1.3)

Alter in Wochen	Durchmesser in mm	Längsachse in mm	Volumen in cm^3
3	8,7	12,0	0,5
5	13,9	22,1	2,0
7	17,6	24,6	3,5
9	20,3	29,2	6,0
10	24,6	33,6	10,0
12	27,8	34,8	14,0
14	30,1	40,3	18,8
16	36,5	46,8	30,8
19	42,5	43,0	43,6
20	44,2	49,1	56,0
21	42,8	54,0	50,0
23	47,4	52,6	65,0
24	49,5	52,1	71,0
25	49,3	57,2	79,0
26	52,3	59,0	85,0

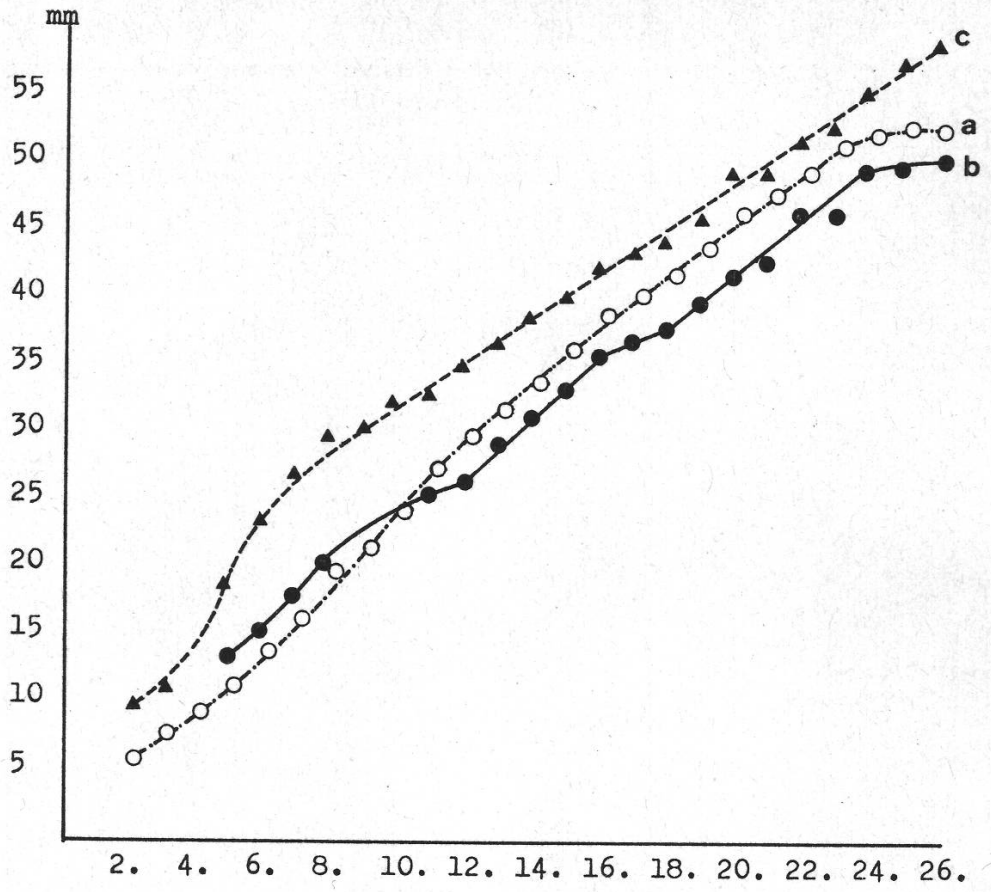


Fig. 1.1

Zunahme der Durchmesser und der Längsachsen der Früchte im Verlaufe der Entwicklung. a Durchmesser der grössten Querschnittfläche (1968; vgl. Tab. 1.1); b Durchmesser der grössten Querschnittfläche (1969); c Längsachse (1969)

6.2 *Steinzellen*

Schon 2 Wochen nach dem Beginn des Blühens kommen im innern Rindenparenchym einzelne kleinere Gruppen von Steinzellen vor. Die Wände dieser Zellen sind dicker als bei normalen Zellen. Rund 20 deutlich ausgebildete Tüpfelkanäle können pro Steinzelle gezählt werden. Im äussern Drittel des gesamten Rindenparenchyms fehlen Zellen mit verdickten Wänden noch vollständig. Die äussersten sich deutlich differenzierenden Steinzellen kommen in diesem Zeitpunkt – von aussen gezählt – in der 20. Zellreihe vor.

4 Tage später schon reicht eine Gruppe bis zur 16. Reihe. Weiter aussen werden zahlreiche, gegenüber den umgebenden Parenchymzellen vergrösserte Zellen beobachtet. Diese grossen Zellen können als zukünftige Steinzellen betrachtet werden. Es zeigt sich, dass bei Steinzellgruppen sehr oft die kleinsten Sklereiden die dicksten Wände aufweisen und dass Steinzellen mit vergleichbarer Wanddicke gleiche Grösse haben. Daraus leitet sich folgende Entstehung der Steinzellen ab, eine Entstehung, die sich auch bei spätern Beobachtungen als richtig erweisen wird:

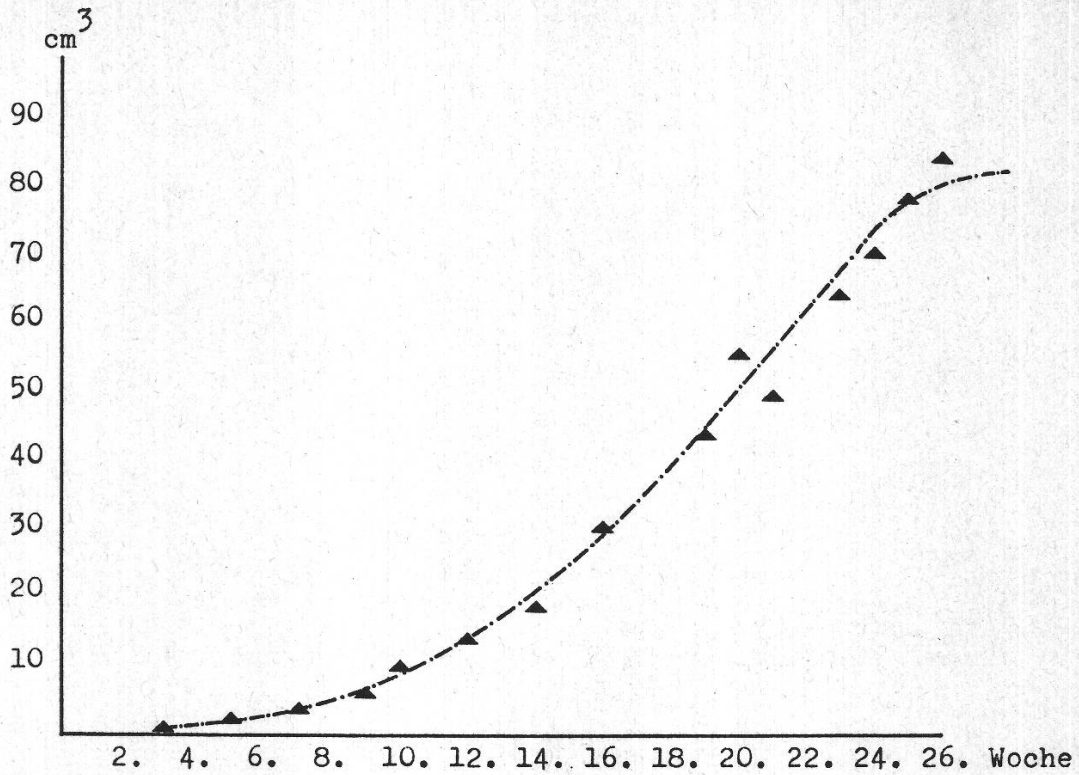


Fig. 1.2

Zunahme des Fruchtvolumens im Verlaufe der Entwicklung (vgl. Tab. 1.2)

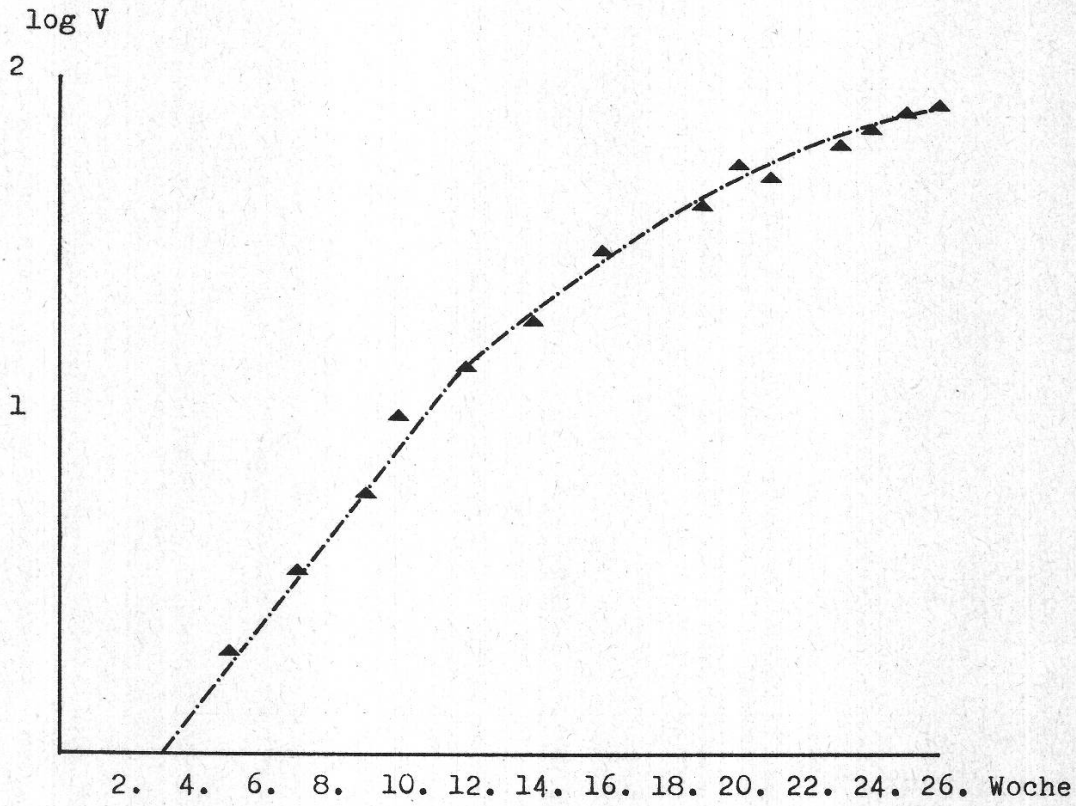


Fig. 1.3

Zunahme des Fruchtvolumens im Verlaufe der Entwicklung (logarithmische Darstellung)

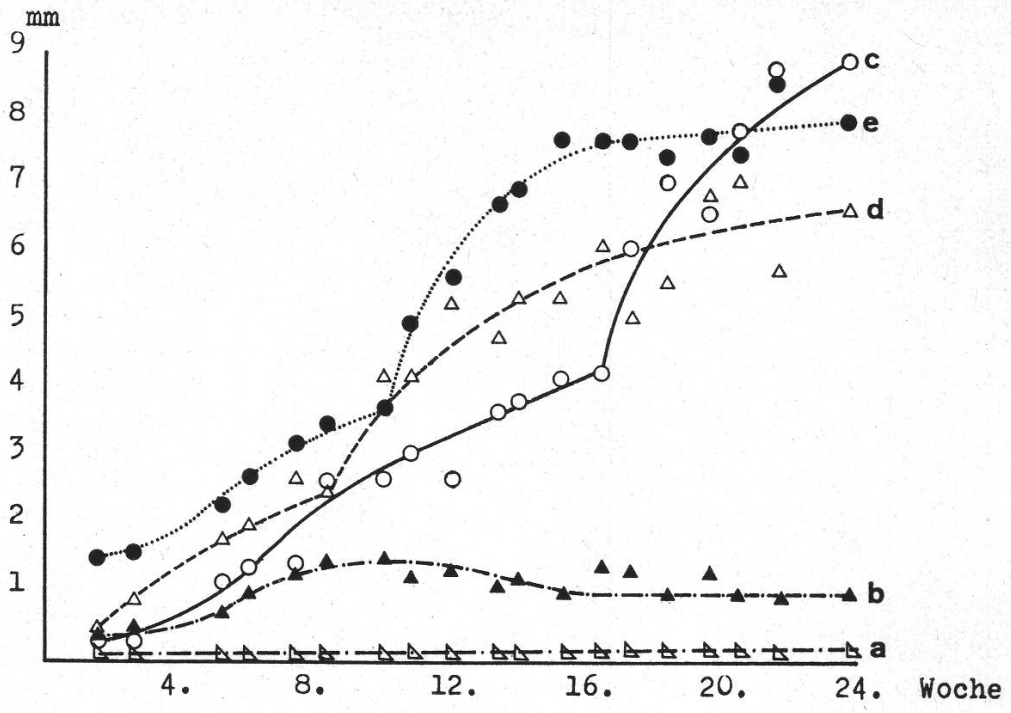


Fig. 1.4

Ausdehnung der Gewebe und der Gewebeteile der Frucht längs des Radius der grössten Querschnittfläche. a Hypodermis; b Subhypodermis; c «Stärkeschicht»; d inneres Rindenparenchym; e Markparenchym

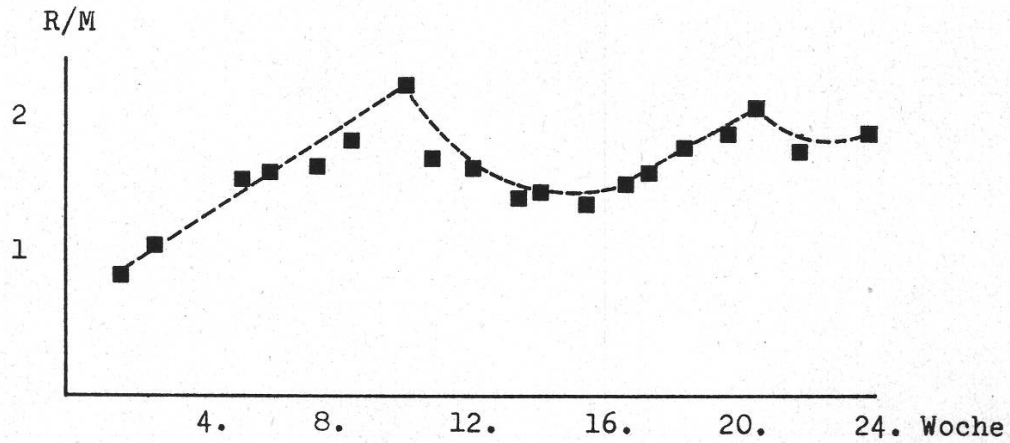


Fig. 1.5

Verhältnis der Ausdehnung des Rindenparenchyms (R) zum Radius des Markparenchyms (M) in der grössten Querschnittfläche

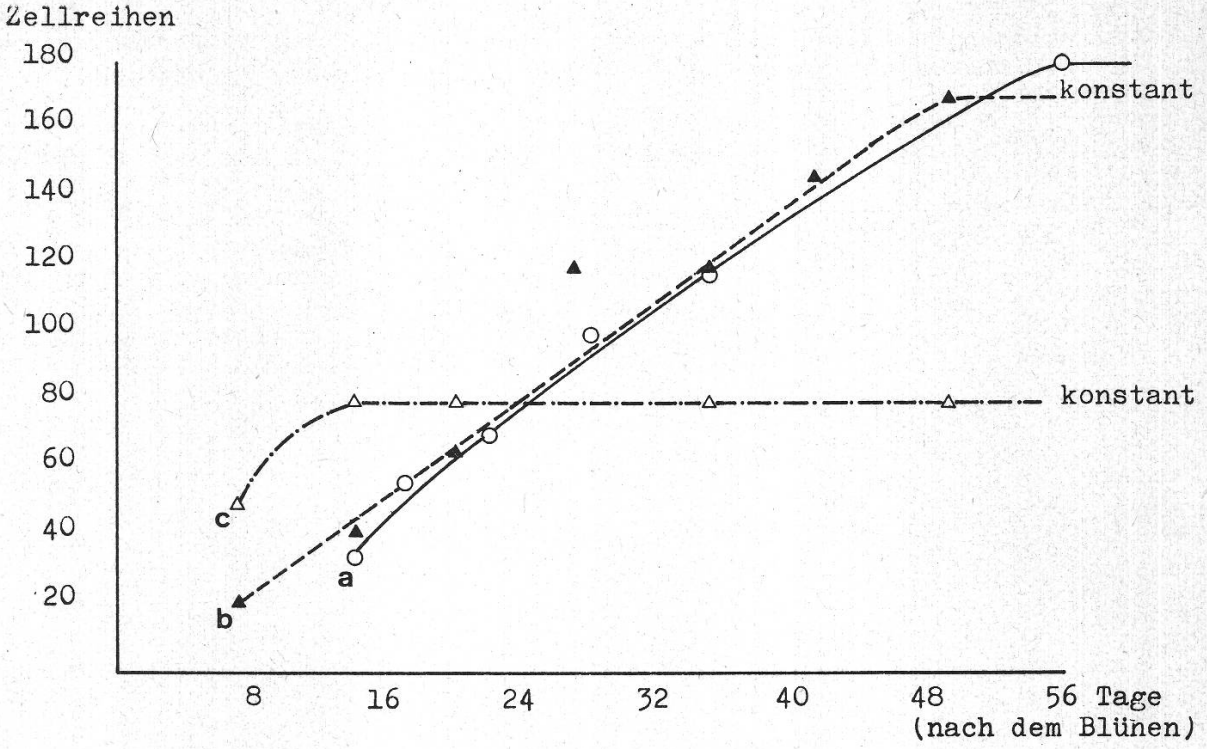


Fig. 1.6

Anzahl der Zellreihen längs des Radius der grössten Querschnittfläche. a Rindenparenchym (1968); b Rindenparenchym (1969); c Markparenchym (1969)

1. Bei Zellen, die sich später als Steinzellen differenzieren, tritt eine deutliche Vergrösserung auf.
2. Darauf hören die Zellen zu wachsen auf und verdicken anschliessend ihre Wände. Dabei fällt es, besonders in der Subhypodermis, auf, dass sich die zukünftigen Steinzellen sehr oft vor der Wandverdickung noch ein- bis zweimal teilen. Es entstehen so paarige oder kleeblattartige Stellungen der ersten Sklereiden.
3. Bei ungefähr der doppelten Zellwanddicke werden Tüpfelkanäle beobachtet, und wenig später – 3 Wochen nach dem Beginn des Blühens – reagieren die ältesten Sklereiden im innern Rindenparenchym mit Phlorogluzin (vgl. Abschnitt 6.6).
   In der 4. bis 5. Woche hat eine ganz auffällige Steinzellenproduktion auch in der Subhypodermis eingesetzt. Die Zahl der Sklereiden in der Subhypodermis wächst in dieser Zeitspanne über jene in den unmittelbar darunter liegenden Zellreihen («Stärkeschicht»).

Schreitet also die Sklereidenentwicklung von innen nach aussen sehr rasch fort, gibt es doch verschiedene genauere, erwähnenswerte Beobachtungen:

Nicht alle Gewebeteile des Rindenparenchyms sind am Ende der Fruchtentwicklung gleichmässig mit Steinzellen durchsetzt. Eine ganz auffällige Häufung erscheint beim Fruchtfall im innern Rindenparenchym und in der Subhypodermis.

Eine deutliche Verschiedenheit der Steinzellenbildung ist in den beiden Geweben festzustellen. Im innern Rindenparenchym finden sich, hauptsächlich in den ersten

Tabelle 2.1

Anzahl der Steinzellen in einem Teil des Fruchtquerschnitts (1968). Zonen 1 bis 4: Abschnitte mit der gleichen radialen Ausdehnung vom innern Rindenparenchym bis zur Epidermis

Zeit Zone	14 Tage	17 Tage	22 Tage	28 Tage	35 Tage
1	54	87 ± 10	195 ± 8	248 ± 10	349 ± 27
2	14	38 ± 9	112 ± 16	194 ± 25	327 ± 50
3	—	17 ± 6	71 ± 18	171 ± 23	197 ± 19
4	—	6 ± 3	28 ± 5	135 ± 18	223 ± 6

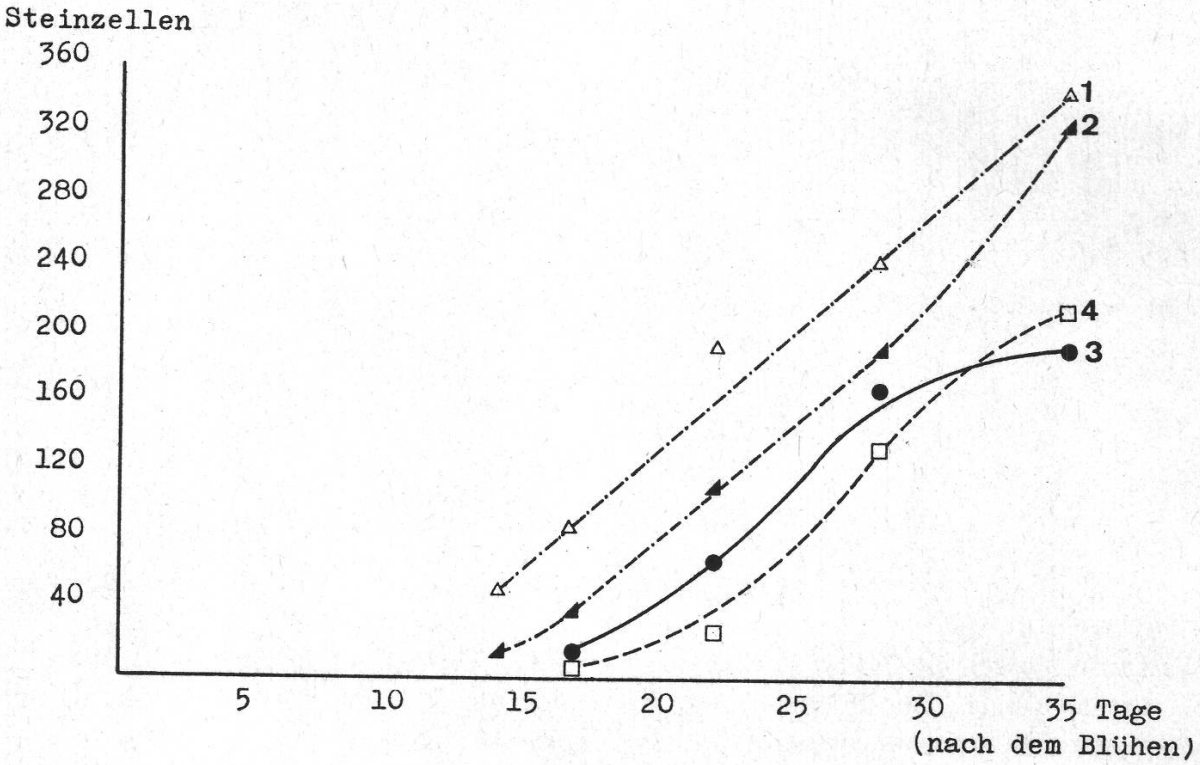


Fig. 2.1

Anzahl der Steinzellen in einem Teil des Fruchtquerschnitts (1968; vgl. Kap. «Methoden», Fig. 5.2.1) 1 Zone 1, 2 Zone 2, 3 Zone 3, 4 Zone 4

drei Wochen, viele einzelstehende Sklereiden, die ihrerseits bei den benachbarten Parenchymzellen Steinzellenbildung zu induzieren scheinen – Bünning spricht von einer «homoiogenetischen Induktion» (Bünning, 1953) –, so dass schliesslich riesige Haufen vorhanden sind. Das Wachstum dieser Haufen wird im innern Rindenparenchym zwischen der 7. und 9. Woche praktisch beendet. Wenn auch selten, so können doch bis anfangs der 6. Woche noch Differenzierungen von einzelstehenden Sklereiden (Idioblasten) beobachtet werden.

In der Subhypodermis kommen bei der reifen Birne ähnliche Sklereidhaufen vor. Zwar erscheinen dort diese Haufen, im Gegensatz zu den kugeligen Gebilden des

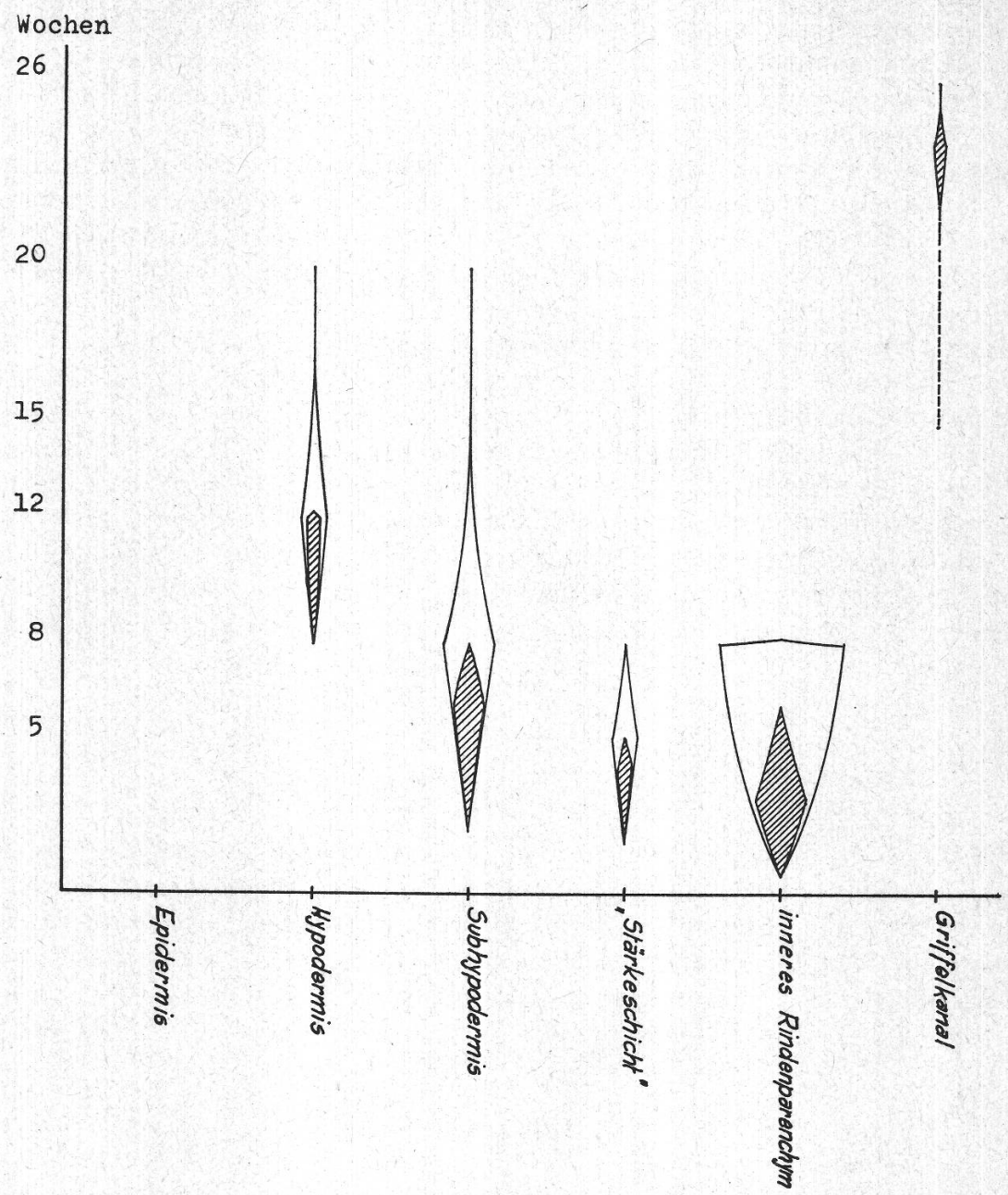


Fig. 2.2

Differenzierung und Verteilung der Steinzellen während der Entwicklung. Die horizontale Ausdehnung der grafischen Formen zeigt die relative Menge der neugebildeten Sklereiden. Schraffiert: einzelstehende Steinzellen; leer: Haufenwachstum

innern Rindenparenchyms, meist radial länger als breit. Der Grund für diese Formverschiedenheit liegt bei der verschiedenen Entstehungsweise. In der Subhypodermis bilden sich während der 4. bis 6. Woche gleichzeitig eine grosse Zahl von einzelstehenden Steinzellen, die sich über das ganze Gewebe wie zufällig verteilen. Diese Einzelzellen scheinen in den Nachbarzellen wiederum Steinzellenbildung zu induzieren, wobei die radiale Richtung bevorzugt wird. Schliesslich entstehen kleine Haufen,

die sich gegenseitig sehr bald berühren, so dass am Schluss der Entwicklung der Eindruck von kompakten Haufen entsteht. Zwischen diesen einzelnen Sklereidzapfen in der Subhypodermis finden sich dann nur eine bis zwei Reihen normaler Parenchymzellen. Während im innern Rindenparenchym bei den mächtigen und in der «Stärkeschicht» bei den kleinen, kugeligen Haufen die Steinzellenneubildungen also nach spätestens 8 bis 9 Wochen abgeschlossen sind, wachsen die Haufen in der Subhypodermis – wenn auch sehr langsam – noch bis zur 20. Woche. Einzelstehende Sklereiden differenzieren sich dagegen auch in der Subhypodermis nach der 8. Woche keine mehr.

In der Hypodermis jedoch beginnen sich Sklereiden erst von der 8. Woche an zu bilden. Die Hauptentwicklung dauert dabei bis zur 12. Woche. Bis zur 20. Woche nach dem Blühen bilden sich noch hie und da neue Steinzellen. – Auch in der Hypodermis können wiederum die 2 Bildungsarten unterschieden werden: Steinzellen, die sich anscheinend durch Induktion aus der Subhypodermis differenzieren, daneben andere, die sich vollständig autonom und spontan, völlig isoliert von andern Sklereiden, in der Hypodermis bilden. Wiederum tritt vor der Wandverdickung die charakteristische Vergrösserung der zukünftigen Steinzellen auf, die allerdings in den kollenchymatischen Hypodermiszellen nicht mehr so augenfällig ist wie im innern Rindenparenchymgewebe.

6.3 *Tyrosin* (Tafel I: Fig. 1, 2)

Sklereiden zeigen in den Wänden und oft auch im Protoplasten eine deutliche Tyrosinreaktion. Besonders die randständigen Steinzellen der Haufen unterscheiden sich von den Kontrollen. In den Parenchymzellen kann keine eindeutige Reaktion festgestellt werden. Einzig im Endokarp ist der Nachweis positiv. Während der Fruchtentwicklung werden keine Änderungen beobachtet.

6.4 *Stärke*

Die in der Hypodermis vorkommenden Chloroplasten bilden die Erklärung für die kleinen, dort vom Beginn der Fruchtentwicklung an vorhandenen Stärkekörner. Während der ersten sechs Wochen wird nur in der Hypodermis Stärke gefunden. Offensichtlich handelt es sich dabei um Assimilationsstärke. In den nächsten zwei Wochen kann auch in der Subhypodermis vereinzelt Primärstärke nachgewiesen werden.

In der 9. und 10. Woche zeigt sich eine starke Zunahme von grobkörniger Stärke, Reservestärke, im äussern Rindenparenchym. Dieser Gewebeteil, anatomisch vom innern Rindenparenchym und der Subhypodermis durch grössere Zellen unterscheidbar, ist bis 2 Wochen vor der Ernte am stärkereichsten der ganzen Frucht. Er wird darum in dieser Arbeit als «Stärkeschicht» bezeichnet. Aber nicht nur die «Stärkeschicht», sondern auch das Markparenchym, Endokarp und Subendokarp ausgenommen, enthält nun, besonders in seinem äussern Teil, Stärke. Dagegen gibt es sie im innern Rindenparenchym bis zur 15. Woche praktisch nicht. Dann aber werden auch dort zahlreiche kleine Körner beobachtet.

Das plötzliche Auftreten und das Vorkommen in Gewebeteilen, die gut mit Leitbündeln versorgt sind (im äussern Markparenchym und von den Rindenleitbündeln bis zur Subhypodermis), machen es wahrscheinlich, dass diese Reservestärke zur Hauptsache nicht von der in der Frucht gebildeten Primärstärke stammt.

In der 18. Woche bietet sich folgendes Bild: In allen Zellen, mit Ausnahme der Epidermis-, der Steinzellen, der Endokarp- und der Subendokarpzellen, findet sich Stärke.

Das Markparenchym enthält etwas mehr als das innere Rindenparenchym, aber deutlich weniger als die «Stärkeschicht».

Das im letzten Drittel der Fruchtentwicklung neugebildete Griffelkanalgewebe bleibt ohne Stärke. 5 Wochen vor der Ernte nimmt sie im Markparenchym ab. Bemerkenswerterweise häufen sich die Körner um die Leitbündel und um die Leitbündeläste, sowohl im Markparenchym als auch im Rindenparenchym. 2 Wochen vor der Ernte vermindert sie sich auch im Rindenparenchym, und eine Woche vor dem Fruchtfall weisen nur noch Zellen mit Chloroplasten (Hypodermis und ein Teil der Subhypodermis) Stärke auf.

Während der Birnenentwicklung zeigt der Stärkenachweis eine komplementäre Reaktion zum Phlorogluzintest, indem die Teile der Birnen mit viel Steinzellen (Subhypodermis, inneres Rindenparenchym) wenig oder erst spät Stärke zeigen. Auch die umgekehrte Beziehung gilt. In zeitlicher Hinsicht ergibt sich etwas Ähnliches: Reservestärke wird erst eingelagert, wenn die Steinzellenentwicklung beendet ist.

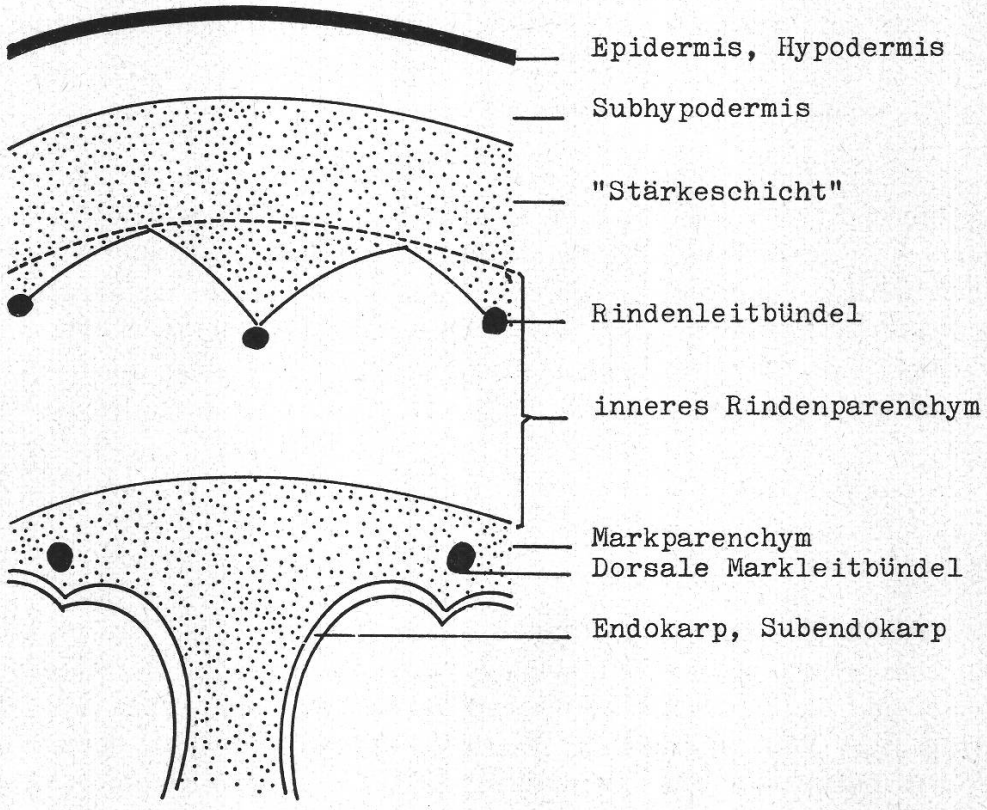


Fig. 4.1

Teil des Birnenquerschnitts (schematisch). Punktiert: Vorkommen der Stärke in der 13. Woche

6.5 *Calciumoxalat*

In der ganzen Birnenfrucht sind 2 Orte durch das Vorkommen von Calciumoxalatkristallen ausgezeichnet. Einerseits treten sehr viele Kristalle in der Subhypodermis auf, andrerseits sind sie auch im Endokarp und Subendokarp nachzuweisen. Besonders in der äussern Subhypodermis werden sie in der 5. Woche nach dem Blühen beinahe in jeder Zelle festgestellt. Im übrigen Rindenparenchym und im Markparenchym gibt es nur hie und da Kristalle. In der Subhypodermis verschwinden sie später; dagegen können sie im Endokarp und im Subendokarp länger beobachtet werden. Im ganzen aber vermindert sich die Anzahl der Kristalle während der Fruchtentwicklung.

6.6 *Lignin*

Die Zellwände der Sklereiden reagieren frühestens während der 3. Woche nach dem Blühen mit Phlorogluzin. In jenem Zeitpunkt sind die Steinzellwände drei- bis viermal dicker als normale Parenchymzellwände. Bei allen später gebildeten Sklereiden gelingt der Ligninnachweis erst nach dieser charakteristischen Verdickung der Zellwände. Auch das Xylem der Leitbündel zeigt anfänglich keine Phlorogluzinreaktion. Offensichtlich braucht eine wesentliche Lignineinlagerung in die Zellwände einige Zeit.

Das Endokarp verholzt nicht. Im ganzen Markparenchym können keine Sklereiden beobachtet werden. Nur die Scheiden der dorsalen Markleitbündel zeigen in den letzten Wochen der Fruchtentwicklung hie und da Steinzellen, und im Griffelkanalgewebe treten 14 Tage nach dem Beginn der Gewebebildung verholzende Zellen auf. Die Zellwände der Sklereiden im Griffelkanalgewebe verdicken sich wenig bis zur Fruchternte.

6.7 *Tannin*

Nur während der 4. Woche – kurz vor dem Ende der starken β-Glukosidaseaktivität – kann eine sich deutlich von der Kontrolle unterscheidende Tanninreaktion wahrgenommen werden. Dabei reagieren besonders die ventralen Markleitbündel, das Endokarp und die Hypodermis. Im letzten Drittel der Fruchtentwicklung weisen die «Stärkeschicht» und das Markparenchym wohl die Farbe einer positiven Tanninreaktion auf, unterscheiden sich jedoch von den Kontrollen in keiner Weise.

6.8 *β-Glukosidase* (Tafel III)

Allgemeines

Die kurzfristige Aktivität der β-Glukosidase in der Birnenfrucht ist auffällig. Die einzelnen Gewebe und Gewebeteile reagieren ähnlich. Schon zu Beginn der Fruchtentwicklung sind die blauen Reaktionsprodukte des Indigos in jeder Zelle zu beobachten (Fig. 1, 2). Während der 5./6. Woche – kurz vor dem Ende der Zellteilungsperiode im Rindenparenchym – vermindert sich die Enzymwirkung in der ganzen Frucht stark. Während des letzten Drittels der Fruchtentwicklung verschwindet die β-Glukosidaseaktivität völlig, und die Schnitte unterscheiden sich nicht mehr von den Kontrollen (Fig. 8).

Kutikula, Epidermis, Hypodermis

In der Epidermis und in der Hypodermis wirkt das Enzym anfänglich sehr stark. Jede Zelle reagiert (Fig. 1). Von der 5./6. Woche an verschwindet die Aktivität der β-Glukosidase. Die Reaktion in der Kutikula könnte artefiziell sein.

Subhypodermis, «Stärkeschicht», inneres Rindenparenchym

Die Subhypodermis zeigt etwas mehr Reaktionsprodukte als die beiden andern Gewebeteile. Sie reagiert auch nach der 5./6. Woche noch hie und da, während die «Stärkeschicht» und das innere Rindenparenchym dann vollständig reaktionsfrei sind. Sowohl in vergrösserten Zellen und in ältern Sklereiden als auch in normalen Parenchymzellen finden sich in den ersten vier Wochen viele Reaktionsprodukte (Fig. 3, 6, 7).

Markparenchym

Besonders zu Beginn der Fruchtentwicklung zeigt das Markparenchym in allen Zellen sehr starke Enzymaktivität, die jedoch wiederum nach der 5./6. Woche vollständig verschwindet.

Leitbündel

In den Leitbündeln, besonders in den Rindenleitbündeln und in den Leitbündelästen des Rindenparenchyms, treten die Reaktionsprodukte gehäuft auf (Fig. 4, 5). Dabei reagiert der ganze Leitbündelquerschnitt, insbesondere aber das Phloem und die Markstrahlen des Xylems. Die Umgebung der Leitbündeläste, das Kambium und das Phloem zeigen auch zwischen der 6. und der 15. Woche noch eine schwache Reaktion.

Die Abhängigkeit der Reaktion vom pH-Wert der Inkubationslösung: In einem Versuch (14. Woche) wird der pH-Wert variiert. Bei Werten über 6,4 kann kein Indigo beobachtet werden. Inkubationslösungen mit pH-Werten 5,6 und 6,0 ergeben ähnliche Reaktion.

6.9 *Saure Phosphatase* (Tafel I: Fig. 3, 4; Tafel IV)

6.9.1 *Einfluss der Vorbehandlung*

Gefrierschnitte reagieren etwas schwächer als die handgeschnittenen Frischschnitte.

6.9.2 *Einfluss der Fixierung*

Azeton: Azeton hemmt die Phosphataseaktivität empfindlich. Formol: Im allgemeinen ist die Lokalisation der Reaktionsprodukte gleich wie in unfixiertem Gewebe. Jedoch ist durch das Fixieren eine kleine Hemmung der Aktivität festzustellen. Meistens wird darum auf eine Fixierung verzichtet (vgl. Deane et al., 1960).

6.9.3 *Kontrollen*

a) Natriumfluorid: Die Konzentration, die eine Phosphataseaktivität völlig inhibiert, ändert sich im Verlaufe der Vegetationsperiode. So vermag in der 12. Woche eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-2}$-m keine völlige Hemmung zu bewirken, wogegen die gleiche Konzentration 4 Wochen später eine Enzymreaktion verunmöglicht. Die kritische Konzentration ist dann bei $4 \cdot 10^{-3}$-m.

b) Inkubation der Schnitte ohne Substrat: Es gibt keine bleisulfidähnlichen Reaktionsprodukte in den untersuchten Geweben.
c) Erhitzen der Schnitte (Tafel IV: Fig. 2, 6, 8): Die erhitzten Schnitte weisen nie eine Reaktion auf.
d) Frischschnitte im Ammoniumsulfid: Das Gewebe schwärzt sich nie.

6.9.4 *Teste*

6.9.4.1 *Bleisulfidmethode*

Auffällig ist ein deutliches Abnehmen der Phosphataseaktivität auf dem ganzen Querschnitt nach der Zellteilungsperiode. In den letzten sieben Wochen vor der Ernte ist eine weitere Verminderung der Reaktion zu beobachten. Das Bleisulfid ist granulär im Plasma und anfänglich, besonders während der 3./4. Woche in der Subhypodermis, in Zellwandnähe oder gar in der Zellwand vorhanden (Tafel IV: Fig. 3). Neu sich differenzierende Steinzellen füllen sich stets mit Bleisulfid und zeigen somit eine starke Reaktion.

Epidermis (Tafel IV: Fig. 1)

Die Epidermis erscheint in den ersten sechs Wochen schwarz. Später reagieren nicht mehr alle Zellen in gleicher Stärke. In den letzten Wochen der Fruchtentwicklung unterbleibt eine Reaktion.

Hypodermis

Nach einem Reagieren der Hypodermiszellen während der ersten zwei bis drei Wochen (Tafel IV: Fig. 1) fehlt später ein wesentlicher Sulfidniederschlag. Erst nach dem Auftreten der Steinzellen ändert sich das Bild. Neu sich differenzierende Sklereiden sind stets mit Reaktionsprodukten gefüllt (Tafel IV: Fig. 4). Es gibt jedoch auch andere Hypodermiszellen mit Reaktion. Wegen der prosenchymatischen Kollenchymzellen der Hypodermis kann nicht immer eindeutig entschieden werden, ob eine beginnende Lignifizierung vorliegt.

Steinzellen (Tafel I: Fig. 3, 4; Tafel IV: Fig. 4)

Wie schon ausgeführt, fallen neu sich differenzierende Steinzellen durch ihre grosse Phosphataseaktivität auf. In der Subhypodermis, in der «Stärkeschicht» und im innern Rindenparenchym kann dies beobachtet werden. Die zukünftigen Sklereiden sind meist gänzlich mit den schwarzen Reaktionsprodukten gefüllt. Dabei ist es bedeutungslos, ob es sich um einzelstehende Steinzellen oder um Randzellen der Sklereidhaufen handelt. Im Zeitpunkt der ersten positiven Phlorogluzinreaktion reduziert sich die Aktivität stets und verschwindet schliesslich vollends (Tafel I: Fig. 4). Der Bleisulfidtest erlaubt so rasch, neu sich differenzierende Steinzellen zu erkennen.

Subhypodermis (Tafel IV: Fig. 1, 3)

Die Subhypodermis zeichnet sich anfänglich durch die grösste Enzymaktivität im ganzen Rindenparenchym aus (Tafel IV: Fig. 1). Es sind in den ersten vier bis fünf Wochen nicht nur die Sklereiden, sondern auch die übrigen Zellen, die viel Reaktion zeigen (Tafel IV: Fig. 3). Nach der Zellteilungsperiode reagieren nur noch die randständigen Steinzellen der Haufen wesentlich.

«Stärkeschicht», inneres Rindenparenchym (Tafel IV: Fig. 1, 5)

Vor allem um die Sklereiden und um die Sklereidhaufen kommen Reaktionsprodukte vor. In der Mitte der Vegetationsperiode treten unregelmässig reagierende Zellen auf (Tafel IV: Fig. 5). Später verschwindet diese Reaktion der Parenchymzellen weitgehend. In der «Stärkeschicht» und im innern Rindenparenchym wird im letzten Drittel der Fruchtentwicklung nur noch schwache oder keine Enzymaktivität festgestellt.

Markparenchym

Zu Beginn der Fruchtentwicklung ist die Phosphataseaktivität im Markparenchym mittel bis stark. Reagiert in der 2. Woche noch der äussere Teil stärker, ist es 2 bis 3 Wochen später der innere. In der weitern Entwicklung treten unregelmässig Reaktionsprodukte auf. Schliesslich verschwinden sie mehr oder weniger. Während im Subendokarp meistens ein schwarzer Niederschlag fehlt, zeigt ihn das Endokarp über die ganze Beobachtungsperiode. Das Griffelkanalgewebe reagiert kaum. Nur einzelne Zellen sind vollständig mit Reaktionsprodukten gefüllt. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um zukünftige Sklereiden.

Leitbündel (Tafel IV: Fig. 7, 8)

Erst 14 Tage nach dem Blühen werden in den Leitbündeln Niederschläge von Bleisulfid beobachtet, wobei sie in den Leitbündeln entlang des Endokarps, dorsale Markleitbündel ausgenommen, vorerst nur vereinzelt auftreten. Später erscheinen diese Leitbündel, wie auch die Leitbündeläste im Rindenparenchym, schwarz. In den dorsalen Markleitbündeln und in den Rindenleitbündeln tritt stets eine Reaktion im Xylem, oft in der Scheide und anfänglich im Phloem, auf (Tafel IV: Fig. 7).

6.9.4.2 *Azofarbstoffmethode*

Die Methode bringt eine Bestätigung der obigen Ergebnisse. Die Lokalisation der Enzymaktivität ist jedoch schwierig, unterscheiden sich doch die Teste nur in der Intensität der Rotfärbung von den Kontrollen. Wahrscheinlich kuppeln zelleigene Phenole und Naphthole mit dem Azoniumsalz zum roten Azofarbstoff. Überdies ist im sauren Bereiche eine Kupplung erschwert, so dass die Hydrolyse des Naphthylphosphates gehemmt erscheint.

6.10 *Peroxydase*

6.10.1 *Oxydation der drei Substrate bei verschiedenen pH-Werten* (Tafel VI: Fig. 1)

Puffer: Phosphat(0,2-m)-Zitrat-Puffer (0,1-m).

Das Verhältnis der Reaktionsstärke in den einzelnen Geweben entspricht – wo nichts Besonderes vermerkt ist – dem im Kapitel 6.10.4 beschriebenen.

Die Aminreaktion ist offensichtlich gegen pH-Änderungen nicht sehr empfindlich, was bei der Verwendung der Methode zum Nachweis der Peroxydase zur Vorsicht zwingt. Erst bei pH 7 reagieren die Reaktionsprodukte mit dem Aminoazobenzol.

Das Benzidin fällt bei pH-Werten von 3–6 beinahe vollständig aus der Lösung. Auf Schnitten, die bei pH 5 inkubiert worden sind, können viele Gasblasen beobachtet werden. Dies deutet auf eine Enzymaktivität ohne Substratoxydation hin.

Tabelle 10.1.1

Oxydation der drei Substrate bei verschiedenen pH-Werten

pH	AAC	Benzidin	Aminreaktion
3	— (sehr schwache Reaktion im Phloem)	—	+
4	++ (Reaktion, besonders im Kambium und im Phloem der Leitbündel, in der Subhypodermis und im Subendokarp)	—	++(+)
5	+++	— (Reaktionsstärke mit Azetatpuffer: +++)	++
6	+ (Reaktion im Kambium, in den Leitbündeln und im Subendokarp)	—	++
7	—	+	+++ (weinrote Reaktionsprodukte, besonders in der Subhypodermis und im innern Rindenparenchym. Phloem der Leitbündel blau)

6.10.2 *Einfluss der Vorbehandlung auf die Enzymaktivität*

Tabelle 10.2.1

Einfluss der Vorbehandlung auf die Enzymaktivität

	Reaktion in handgeschnittenem Gewebe	Gefrierschnitten
Unfixiertes Gewebe	++	+(+)
In Kaltazeton fixiertes Gewebe (5 Min.)	++	+(+)

6.10.3 *Kontrollen*

1. Erhitzte Schnitte (Tafel II: Fig. 3, 5; Tafel V: Fig. 4, 6)

Die Schnitte sind ohne Reaktion. Einzig ein gelegentliches Reagieren im Phloem der Leitbündel deutet auf eine schwach wirksame Pseudoperoxydase hin. Möglicherweise hat diese Pseudoperoxydase die Reaktion bei pH 3 (Tab. 10.1.1) ebenfalls verursacht.

2. Ohne Wasserstoffperoxyd (Tafel II: Fig. 8; Tafel VI: Fig. 4)

Die Schnitte sind reaktionslos.

3. Kaliumzyanid

Kaliumzyanid hemmt die Enzymaktivität stark, jedoch nicht völlig.

6.10.4 *Test*

Die starke Enzymaktivität nimmt von der 6./7. Woche an leicht ab und vermindert sich nochmals 4 bis 5 Wochen vor der Ernte. Die Ergebnisse der drei Methoden stimmen miteinander überein. Der AAC-Test, wahrscheinlich weniger empfindlich als die zwei andern Methoden (z. B. in Hypodermis und Markparenchym), liefert die klarsten Ergebnisse, weil die roten Reaktionsprodukte gut zu lokalisieren und die Kontrollen in der Regel ohne Färbung sind. Bei der Benzidin- und besonders bei der Aminmethode färbt die Lösung das Gewebe leicht an, so dass Testreaktionen mit den Färbungen der Kontrollen sorgfältig verglichen werden müssen.

Epidermis, Hypodermis (Tafel VI: Fig. 3, 4)

Die Hypodermis erscheint dunkel (Benzidin- und Aminmethode) während der ganzen Beobachtungsperiode und weist somit viel Enzymaktivität auf. Mit der AAC-Methode können erst von der 6. Woche an Reaktionsprodukte im Plasma lokalisiert werden. Schwierigkeiten beim Eindringen der Lösung in die kollenchymatischen Hypodermiszellen oder auch unterschiedliches Reagieren von Isoenzymen (vgl. Kap. 5.9.1) mit den einzelnen Substraten können diese Beobachtungen eher erklären als Adsorptionsartefakte.

Subhypodermis (Tafel II: Fig. 7, 8; Tafel VI: Fig. 3, 4, 5, 6)

Die Wirkung der Peroxydase ist in der Subhypodermis sehr stark und übertrifft jene im Rindenparenchym. Nach der Bildung der Sklereidzapfen reagieren die Parenchymzellen zwischen den Steinzellhaufen auffällig.

Steinzellen

In neu sich differenzierenden Steinzellen lässt sich nicht mehr Reaktion nachweisen als in normalen Parenchymzellen. Dagegen erscheinen ihre Wände dunkler (Tafel II: Fig. 7, Benzidin; Tafel VI: Fig. 5, Amin). In jüngern Sklereiden, das heisst in Steinzellen mit schwach verdickten Wänden, tritt eine deutlich stärkere Reaktion in den Lumina auf (Tafel II, Fig. 6; Tafel VI: Fig. 6). Besonders die Randzellen der Sklereidhaufen zeigen dieses Bild (Tafel VI: Fig. 3). Auch eine Peroxydaseaktivität in den Sklereidwänden ist nicht auszuschliessen (Tafel II: Fig. 6; Tafel VI: Fig. 5, 6).

«Stärkeschicht», inneres Rindenparenchym (Tafel II: Fig. 1, 2, 4; Tafel V: Fig. 1, 2, 3)

Die Reaktion des innern Rindenparenchyms, die gegen das Markparenchym etwas zunimmt, ist stärker als jene der «Stärkeschicht», wo sie gegen das Ende der Vegetationsperiode beinahe ganz verschwindet. Beiden Gewebeteilen ist die starke Peroxydasewirkung in der unmittelbaren Umgebung der Steinzellhaufen gemeinsam (Tafel II: Fig. 1, 2, 3; Tafel V: Fig. 3). Nicht nur das Plasma, sondern auch die Zellwände, insbesondere im Bereiche der Mittellamellen, und die Interzellularen zeigen, vor allem während der Zellstreckungsperiode, Reaktionsprodukte (Tafel II: Fig. 4; Tafel V: Fig. 1, 2, 3). Violette (Benzidin) bzw. blaue (Amin), «gefüllte» Zellen um die Leitbündeläste in der «Stärkeschicht» fallen auf. Sie werden im Kapitel 6.11.6 nochmals erwähnt.

Leitbündel (Tafel V: Fig. 7)

Alle Leitbündel reagieren kräftig. Die Markleitbündel entlang dem Endokarp sind einheitlich rot (AAC), braun bis violett (Benzidin) oder blau (Aminlösung). In den

Rinden- und den dorsalen Markleitbündeln weisen das Phloem und die Scheide viel Reaktion auf. Das Kambium bleibt in den ersten Wochen der Fruchtentwicklung reaktionslos (Tafel V: Fig. 7). Später zeigt sich auch dort eine Enzymaktivität (Tafel V: Fig. 8). Die Reaktion im Xylem ist schwach (Tafel V: Fig. 7, 8), jene in den Leitbündelästen des Rindenparenchyms, besonders anfänglich, stark.

Markparenchym

Das Markparenchymgewebe enthält wenig rote Reaktionsprodukte (Tafel V: Fig. 5, AAC). Die Wände der Parenchymzellen sind braun bis violett (Benzidin) bzw. blau (Aminlösung). Die Reaktion nimmt gegen das Zentrum der Frucht ein wenig ab und ist vergleichbar mit jener der «Stärkeschicht». Auch hier treten «gefüllte» Zellen auf. Endokarp, Subendokarp und die Randzellen gegen den Griffelkanal reagieren stärker als die Markparenchymzellen (Tafel V: Fig. 5). Besonders in den Interzellularen des Subendokarps können Reaktionsprodukte lokalisiert werden.

Während des letzten Drittels der Fruchtentwicklung füllt sich – wie erwähnt – der Griffelkanal auch im Zentrum der Frucht mit lockerem Gewebe. In diesem Griffelkanalgewebe ist die Peroxydase sehr stark wirksam (Tafel V: Fig. 5; Tafel VI: Fig. 2).

6.11 *Phenoloxydase*

6.11.1 *Fixierung*

Die Fixierung mit Formol hemmt die Aktivität. Bei mit Azeton fixiertem Gewebe tritt gleiche Reaktion wie bei unfixiertem auf.

6.11.2 *Einfluss der Zytochromoxydase*

Wie erwartet (vgl. Kap. 5.9.1), reagieren die Schnitte ohne Zytochromoxydase bei einer halbstündigen Inkubationsdauer gleich wie nicht erhitzte. Bei einer dreistündigen Inkubation treten etwas weniger Oxydationsprodukte auf. Wahrscheinlich ist diese schwächere Reaktion eher durch etwas zerstörte Phenoloxydase als durch den Ausfall der Zytochromoxydase bewirkt.

6.11.3 *Einfluss von endogenem Wasserstoffperoxyd*

Durch Katalase, die der Dopa- und Brenzcatechinlösung beigefügt wird, ändert sich die Reaktion nicht.

6.11.4 *Kontrollen*

1. Hitze (Tafel I: Fig. 6; Tafel VI: Fig. 8; Tafel VII: Fig. 2, 6, 8; Tafel VIII: Fig. 2, 4, 8; Tafel IX: Fig. 8)

Durch Hitze inaktivierte Schnitte unterscheiden sich deutlich von jenen des Testes. Doch gibt es in der Hypodermis und im Endokarp schwache Reaktion. Auch die Steinzellen erscheinen nicht völlig reaktionsfrei. So sind die Sklereidwände grau und ihre Mittellamellen leicht dunkler (Tafel VII: Fig. 2, 6, Dopalösung), und es finden sich bräunliche Reaktionsprodukte im Lumen der Steinzellen (Brenzcatechinlösung).

Zur Erklärung dieser Tatsache bieten sich drei Möglichkeiten an:

a) Es ist denkbar, dass endogene Substrate zwischen dem Schneiden und dem Erhitzen oxydiert worden sind. Die Bräunung der nur im Wasser inkubierten Schnitte (Kontrolle 3) ist vergleichbar mit der beobachteten Reaktion.

b) Besonders bei der Dopalösung tritt eine störende Eigenoxydation auf, die Gewebeteile färbt und dadurch eine Enzymreaktion vortäuscht. So kann beispielsweise die scheinbare Kambiumreaktion der dorsalen Leitbündel durch Adsorption der oxydierten Substratlösung entstanden sein. Die Substratoxydation erscheint bei pH-Werten unter dem Neutralpunkt schwächer. Es wird darum für die Inkubationslösung der bei Deane (1960) empfohlene pH (6,8) gewählt, obwohl das Aktivitätsoptimum der Phenoloxydase etwas höher liegen mag.

c) Es könnte eine schwach wirksame Pseudophenoloxydase in der Birnenfrucht wirksam sein. Sie wäre thermostabil und oxydierte die Inkubationslösung, indem sie aus den Gewebeschnitten heraus diffundierte. Die in der Tabelle 11.4.1 dargestellten Ergebnisse belegen jedoch diese Annahme nicht. Eher scheint es, dass das Dopa mit etwas Phenoloxydase verunreinigt ist und so die Eigenoxydation der Lösung bewirkt.

2. Dieca (Tafel IX: Fig. 4)

Dieca hemmt die Phenoloxydase ganz.

3. Ohne Substrat (Tafel IX: Fig. 6)

Schnitte in Wasser zeigen eine schwache Bräunung, wobei aber Melanine (Dopalösung) nie beobachtet werden.

Tabelle 11.4.1

Oxydationsgrad der Dopalösung

Lösung	Oxydationsgrad der Dopalösung nach 3 h bei 37 °C
mit Gewebeschnitten und Dieca	—
ohne Gewebeschnitte	+
mit durch Hitze inaktivierten Gewebeschnitten	+
mit Gewebeschnitten	++

6.11.5 *Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration*

Für die folgende Versuchsserie ist ein Phosphat(0,2-m)-Zitrat(0,1-m)-Puffer verwendet worden. Die Reaktion ist schwächer als mit dem üblichen Phosphatpuffer (Tafel VI: Fig. 7). Aus der Tabelle 11.5.1 geht die Wirkung der oxydierten Dopalösung auf die Reaktionsstärke hervor.

6.11.6 *Test*

Die Unterschiede der Phenoloxydasewirkung auf die beiden dargebotenen Substrate (Dopa und Brenzcatechin) sind gering. Im Verlaufe der Fruchtreifung verändert sich die Enzymaktivität nur schwach. Immerhin scheint sie während der Zellteilungsperiode mit dem Wachstum der Sklereiden zuzunehmen (Tafel I: Fig. 5, 6, 7;

Tabelle 11.5.1

Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration

pH	Farbe der Inkubationslösung nach der Inkubation		Stärke der Reaktion	
	Brenzcatechin	Dopa	Brenzcatechin	Dopa
8,0	hellgrün	dunkel, violett	++	++++
7,8	hellgrün	violett	+++	++++
7,4	hellgrün	violett	++++	+++
7,0	hellgrün	hell, violett (heller als bei pH 7,8 und 7,4)	+++	+++
6,6	hellgrün	hell, violett	+++	+++
6,0	bräunlich	hell	+	+
5,0				
4,0	hell, bräunlich	hell, rosa	— bis +	—

Tafel IX: Fig. 1). Besonders deutlich wird dies in der Subhypodermis, wo anfänglich schwache Reaktion vorkommt. Von ungefähr der 5. Woche an – nach dem Beginn der starken Steinzellenentwicklung in der Subhypodermis – verstärkt sich dann die Aktivität. Nach Abschluss der Zellteilungsperiode wirkt die Phenoloxydase im parenchymatischen Gewebe nochmals etwas stärker.

Epidermis, Hypodermis (Tafel VII: Fig. 4, 5; Tafel VIII: Fig. 6, 7)

Die beiden äussersten Gewebe der Frucht erscheinen jeweils nach dem Inkubieren dunkel. Namentlich die Hypodermis zeigt viel Enzymaktivität. Die Reaktionsprodukte sind schwarz (Dopa) bzw. dunkelbraun (Brenzcatechin).

Subhypodermis (Tafel VII: Fig. 5)

Die Subhypodermis reagiert schwächer als die Hypodermis, jedoch deutlich stärker als das restliche Rindenparenchym. Gegen das Ende der Fruchtentwicklung treten in der Subhypodermis Chloroplasten auf. Die Enzymaktivität wird dann vergleichbar mit jener der Hypodermis.

«Stärkeschicht», inneres Rindenparenchym (Tafel VII: Fig. 7; Tafel IX: Fig. 1, 2)

Von der Steinzellenreaktion in den beiden Geweben abgesehen, können, besonders in den ersten vier Wochen, wenig Reaktionsprodukte beobachtet werden. Nach der 8. Woche kommen sie im Plasma häufiger vor. Um die Sklereidhaufen ist die Phenoloxydase während der Zellstreckungsperiode stärker wirksam als im übrigen Rindenparenchymgewebe. Eine analoge Beobachtung wird auch bei der Peroxydase gemacht (vgl. Kap. 6.10.4).

Brenzcatechin: Die Zellwände in der «Stärkeschicht» sind einheitlich olivbraun. Das Lumen zahlreicher Zellen in der Nähe der Leitbündeläste zeigt von der 10. Woche an eine homogene braune Färbung. Es scheint, dass die Reaktionsprodukte in diesen Zellen gelöst sind und das ganze Zellumen füllen. Auch im Markparenchym treten gleich reagierende Zellen auf. Bemerkenswerterweise sind mit der Millon-Reaktion (Tyrosin), in Kontrolle und Test (mit der Benzidin- und Aminreaktion [Peroxydase] im Test) ebenfalls ähnliche «gefüllte» Zellen beobachtet worden. Vielleicht stehen diese Zellen speziell im Dienste des Stofftransportes, und ihre Membranen sind per-

meabler als jene anderer Parenchymzellen. In einzelnen Zellen reagieren im Rindenparenchym am Ende der Vegetationsperiode die Zellkerne.

Dopa: Die Zellwände sind braun getönt. In den letzten Wochen der Fruchtentwicklung unterscheiden sie sich jedoch von den Kontrollen kaum mehr. Die Reaktionsprodukte finden sich im Plasma. Stärkekörner sind grau oder braun, wahrscheinlich durch die oxydierte Substratlösung angefärbt.

Leitbündel (Tafel VIII: Fig. 1; Tafel IX: Fig. 3, 5)

Die Leitbündeläste und die unmittelbar benachbarten Zellen reagieren stark. Eine Reaktion kommt über den ganzen Querschnitt der Leitbündel mit einem Maximum im Phloem und in der Scheide vor. Die Aktivität nimmt während der Zellstreckungsperiode ab.

Steinzellen (Tafel I: Fig. 5, 6, 7; Tafel VII: Fig. 1, 3, 5; Tafel IX: Fig. 1, 2)

Vergrösserte Zellen weisen keine wesentliche Reaktion auf (Tafel VII: Fig. 3; Tafel IX: Fig. 1). – Im Zeitpunkt der Lignineinlagerung zeichnen sich die Steinzellen jedoch durch eine starke Phenoloxydaseaktivität aus. Gegen das Ende der Vegetationsperiode sind die Parenchymzellen rund um die Steinzellhaufen, die zu Beginn der Zellstreckungsperiode ausgeprägt reagiert haben, nur noch schwach gelber (Brenzcatechin) als die entfernteren Parenchymzellen.

Dopa: Dunkle Sklereidwände und zahlreiche Reaktionsprodukte im Zellumen (wahrscheinlich in der Vakuole) sind zu finden (Tafel I: Fig. 5; Tafel VII: Fig. 1, 3, 5). Selbst ältere Steinzellen inmitten der Sklereidhaufen zeigen im Zellumen und in den Tüpfelkanälen Reaktionsprodukte.

Brenzcatechin: Die dunkelbraunen Reaktionsprodukte in den Steinzellen sind sehr auffällig (Tafel I: Fig. 7; Tafel IX: Fig. 2).

Markparenchym (Tafel VIII: Fig. 1, 3, 5; Tafel IX: Fig. 5, 7)

Von der 3. Woche an nimmt die Reaktion im Markparenchym zu. Die Zellen des Markparenchyms teilen sich in jenem Zeitpunkt schon nicht mehr. Die Reaktion ist vergleichbar mit derjenigen der Stärkeschicht, dagegen stärker als im innern Rindenparenchym. Auch im Markparenchym sind die Zellwände, besonders während der Zellstreckungsperiode, schwarz (Dopa) (Tafel VIII: Fig. 5) bzw. braun (Brenzcatechin) gefärbt (Tafel IX: Fig. 7). Gegen das Ende der Vegetationsperiode reagiert der Zellkern (Tafel VIII: Fig. 5). Daneben zeigt stets auch das Plasma Reaktion.

Das Endokarp erscheint mit beiden Substraten braun bis schwarz (Tafel VIII: Fig. 3; Tafel IX: Fig. 5). Die Phenoloxydase ist also sehr wirksam. Das darunterliegende Gewebe (Subendokarp) reagiert anfänglich schwach (Tafel VIII: Fig. 3). Später sind dort, wie auch in den 2 bis 3 Zellreihen gegen den Griffelkanal, die Reaktionsprodukte häufiger als in den restlichen Markparenchymzellen (Tafel IX: Fig. 5). Im Griffelkanalgewebe kann nur schwache Enzymaktivität festgestellt werden (Tafel IX: Fig. 7).

7 Diskussion

7.1 *Saure Phosphatase, Stärke*

Steinzellen, die sich neu differenzieren, zeigen unmittelbar nach der charakteristischen Zellvergrösserung, während der ersten Wandverdickung, starke Phosphatase-

aktivität. Lignin findet sich in den Wänden dieser Zellen noch nicht. – Daneben wird eine enge Beziehung zwischen der Enzymaktivität und der Zellteilungsperiode in der Entwicklung der Birne beobachtet.

Dieses Anwachsen der sauren Phosphatasewirkung in Zellen, die sich kürzlich geteilt haben, ist verschiedentlich bemerkt worden (Avers und Grimm, 1959; Fosket und Miksche, 1966; Vanden Born, 1963; Wilson, 1949).

Eine starke Phosphataseaktivität wird auch in Sklereiden der *Rauwolfia* festgestellt (Mia und Pathak, 1968).

Wie berichtet (Kap. 6.2), teilen sich Steinzellen oft vor der Wandverdickung. Ebenso wird in pflanzlichen Tumorgeweben neben einem erhöhten Auxingehalt eine vergrösserte Phosphataseaktivität gefunden (Chen und Venketeswaran, 1966; Maciewska-Potapczyk, 1960).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, insbesondere während der 3. und 4.Woche nach dem Blühen, die Reaktionsprodukte in der Nähe der Zellwand oder sogar in der Zellwand. Diese Lokalisation stimmt mit den Beobachtungen von Glick und Fisher (1946), McGregor und Street (1953) und Wilson (1949) überein. Poux (1963) betrachtet das Vorkommen des Enzyms im Bereiche des Plasmalemmas allerdings als Artefakt. Das kurzfristige Auftreten der Bleisulfidniederschläge in Zellwandnähe macht dies bei der Birne unwahrscheinlich.

Neben dieser Lokalisierung gibt es auch im Protoplasten der Parenchymzellen granuläre Reaktionsprodukte, und das Lumen der Steinzellen erscheint völlig schwarz. Die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms ist mit dem Lichtmikroskop schwierig. Avers und King (1960) und Jensen (1956) haben die saure Phosphatase in den Mitochondrien gefunden. Häufiger jedoch ist hervorgehoben worden, dass das endoplasmatische Retikulum viel saure Phosphatase zeigt (Catesson und Czaninski, 1967; Figier, 1968; Poux, 1963; Sommer und Blum, 1965). Poux (1963) stellt starke Enzymwirkung in den Vakuolen fest. Sich zu Sklereiden differenzierende Zellen im Birnenfleisch zeigen eine sehr grosse Vakuole (Sterling, 1954). Die starke Wasseraufnahme sich streckender Zellen wird bewirkt durch das Ausscheiden osmotisch wirksamer Substanzen in die Vakuole (Frey-Wyssling, 1959). Die saure Phosphatase kann eine wichtige Rolle bei der Kohlenhydrattransformation spielen (Wanner, 1952). Der Schluss liegt nun nahe, dass durch die saure Phosphatase diese osmotisch wirksamen Substanzen am Tonoplasten und im Bereiche des Plasmalemmas dephosphoryliert werden. Sie werden in der Folge in den Steinzellen und den frisch geteilten Parenchymzellen vielleicht zum Transport, aber auch – diese Möglichkeit drängt sich besonders durch die Beobachtungen der Steinzellen auf – zur Synthese von Wandsubstanzen verwendet.

Figier (1968) hat Bleisulfidniederschläge auch im Golgi-Apparat gefunden. Die etwas gewagte Vermutung, dass es sich bei den punktförmigen Reaktionsprodukten in Zellwandnähe um Ansammlungen von Golgi-Vesikeln handeln könnte, ist nicht völlig abwegig. Dies stützte die hier dargelegte Hypothese, wonach die saure Phosphatase zur Zellwandbildung nötig wäre.

Die schwache Reaktion der Hypodermis, eines Gewebes, das sich – wie die Epidermis – bis spät in die Vegetationsperiode teilt, ist damit allerdings nicht erklärt. Es besteht die Möglichkeit, dass die kollenchymatischen Hypodermiszellen ein Eindringen der Inkubationslösung mehr oder weniger verhindern.

Während der Birnenentwicklung zeigt der Stärkenachweis in zeitlicher und räumlicher Hinsicht eine komplementäre Reaktion zum Phlorogluzintest (vgl. Kap. 6.4 und Kap. 6.6). Anscheinend werden die Kohlenhydrate vorerst zur Zellwandbildung bei Sklereiden und auch bei Parenchymzellen verwendet. Erst anschliessend – nach der Zellteilungsperiode – sind sie für die Synthese von Reservestärke verfügbar.

7.2 *β-Glukosidase, Peroxydase, Phenoloxydase, Tannin, Lignin*

Lignin wird erst in die Sklereiden eingelagert, nachdem sich die Zellwände verdickt haben (vgl. Kap. 6.6). Während der Lignineinlagerung werden Peroxydase- und Phenoloxydaseaktivität beobachtet. Das Hauptwachstum der Steinzellen ist von einer β-Glukosidase in allen Fruchtzellen begleitet. All dies ist gut vereinbar mit den im Kapitel 2 skizzierten Vorstellungen der Ligninsynthese. Die 3 Enzyme kommen jedoch nicht nur in den Sklereiden, sondern auch in andern Zellen der Birnenfrucht vor. Die Ligninbildung kann somit nicht ihre einzige Aufgabe sein.

Peroxydase, aus zahlreichen Isoenzymen bestehend (vgl. Kap. 5.9.1), oxydiert das Auxin, wobei die einzelnen Isoenzyme allerdings in ihrer Wirkung verschieden sind (Macnicol und Reinert, 1963; McCune, 1961). Ray (1960) betrachtet die Indolessigsäureoxydase (IES-Oxydase) und die Peroxydase als das gleiche Enzym. Andernorts wird die Peroxydase zumindest als ein Bestandteil der IES-Oxydase angesehen (Yamazaki und Souzu, 1960; Kenten, 1955; Stutz, 1957). Sequeira und Mineo (1966) sind umgekehrt der Meinung, dass eine Komponente (oder auch mehrere) der sehr heterogenen Mischung der Pflanzenperoxydase als IES-Oxydase wirkt (oder wirken). Der histochemisch nachgewiesenen Peroxydase in der Birne kommt darum wahrscheinlich eine wichtige Aufgabe bei der Oxydation des Auxins zu. Die bedeutsame Tatsache, dass die «Stärkeschicht» und das Markparenchym, die beiden Gewebeteile der Frucht mit den grössten Zellen, sehr wenig Peroxydaseaktivität aufweisen, sei hier nochmals betont.

Zukünftige Steinzellen unterscheiden sich von den Rindenparenchymzellen nur durch ein schnelleres Wachstum. Deshalb wird angenommen, dass die Sklereidzellen anfänglich eine für das Zellwachstum günstigere Auxinproduktion aufweisen.

Seit längerer Zeit weiss man, dass die IES Peroxydase bildet (Galston und Dalberg, 1954; Galston, 1956; Jensen, 1955). In neueren Arbeiten wird dies einerseits bezweifelt (Boll, 1965; Zenk, 1966), andrerseits wiederum bestätigt (Lavee und Galston, 1968; Siegel und Galston, 1967). Es wird auch gezeigt, dass spezifische Teile des Isoenzymkomplexes durch Auxin unterdrückt werden (Ockerse et al., 1966; Galston et al., 1968). – Um die Steinzellhaufen bildet sich ein Gradient der Peroxydaseaktivität aus, der von dieser durch Auxin induzierten Enzymbildung verursacht sein könnte. Das Hormon diffundierte von den Sklereiden in die Nachbarzellen. Dieser Gradient, zusammen mit der starken Peroxydaseaktivität in den Steinzellen, bestätigt indirekt die Annahme, dass sich neu differenzierende Sklereiden durch ihre Auxinproduktion von normalen Parenchymzellen unterscheiden. Auch macht er die Möglichkeit unwahrscheinlicher, dass der grössere Gehalt an IES-Oxydase hemmenden Verbindungen eher das raschere Wachstum der Steinzellen bewirkt als der Auxinunterschied.

Peroxydase benötigt zur Oxydierung der IES (neben Mn) phenolische Co-Faktoren (vgl. Galston und Hillman, 1961; Hare, 1964). Mit Ausnahme der Ferulasäure aktivieren die Monophenole die IES-Oxydase, während Polyphenole als Inhibitoren wir-

ken (Gortner und Kent, 1958; Henderson und Nitsch, 1962; Tomaszewski und Thimann, 1966; Zenk und Müller, 1963). Werden diese möglichen Substrate der Phenoloxydase, die Phenole, in den Zellen gebildet, wo sie wirken, oder werden sie ihnen zugeführt?

Die Entwicklung eines für die IES-Oxydase inhibitorischen Systems ist mit der Chlorophyllmenge verknüpft (Pilet und Phipps, 1968). Diese Abhängigkeit mag durch ein Anwachsen des Polyphenolgehalts in den Zellen bewirkt sein. Die Polyphenole sollen hauptsächlich in assimilierenden Geweben entstehen (Delaveau und Paris, 1961; Harborne, 1964, 1967). In Äpfeln ist Phenoloxydase, ausser in der Mitochondrien-, auch in der Chloroplastenfraktion nachgewiesen worden (Harel et al., 1964, 1965). Darum ist die starke Phenoloxydasewirkung in chlorophyllhaltigem Birnengewebe, in der Hypodermis und einem Teil der Subhypodermis nicht überraschend. Sicher wirkt allerdings auch das Sauerstoffangebot auf die Phenoloxydaseaktivität regulierend. Dies wird nahegelegt durch die starke Wirkung des Enzyms im Endokarp, in der Zellreihe also, die unmittelbar an die luftgefüllten Samenfächer grenzt. Bei einzelnen Äpfeln der Sorte Boskoop sind zum Beispiel unmittelbar an der äussern Oberfläche des Kerngehäuses Sauerstoffkonzentrationen gemessen worden, die der Gleichgewichtskonzentration mit Luft entsprechen (Brändle und Wanner, 1965; Brändle, 1968). Die Wahrscheinlichkeit, dass in der Hypodermis und in Teilen der Subhypodermis phenolische IES-Oxydase-Inhibitoren gebildet werden, kann die sehr lang dauernde Neudifferenzierung von Sklereiden in diesen beiden Geweben erklären. Die Phenole in den Zellen, die – wie noch ausgeführt werden soll – zugleich Lignin-vorläufer sind, beschränkten somit die Neubildung der Steinzellen.

Grundsätzlich ist auch in den Zellen ohne Chloroplasten die selbständige Phenolsynthese nicht auszuschliessen. Meynhardt (1965) weist das Vorkommen eines aktiven Pentosephosphatzyklus in reifenden Bartlettbirnen nach. Die Erythrose aus diesem Zyklus ergäbe durch Kondensation mit einer durch Glykolyse entstandenen Triose Shikimisäure, die über Prephensäure zu aromatischen Aminosäuren und weiter zu Polyphenolen führte (Nord und Schubert, 1967). Die Ergebnisse dieser Arbeit in bezug auf die Aktivität der β-Glukosidase machen es aber wahrscheinlich, dass der Hauptteil der Phenole von Pflanzenorganen ausserhalb der Frucht stammt. Die β-Glukosidase kann phenolische Aglukone liefern (van Fleet, 1961). Glukoside würden den Zellen der Frucht zugeführt, wo sie die β-Glukosidase hydrolysierte. Die stärkere Wirkung des Enzyms um die Leitbündel und Leitbündeläste stützt diese Annahme. Ebenso deutet das während der 4. bis 5. Woche nachgewiesene Tannin auf eine durch die β-Glukosidase bewirkte Phenolhäufung in den Fruchtzellen hin. Im Verlaufe der Fruchtentwicklung oxydierten diese Phenole und fielen nach und nach als IES-Oxydase beeinflussende Verbindungen aus.

Sind die Substrate der Phenoloxydase in der Birne tatsächlich Inhibitoren der IES-Oxydase? Walker (1964) hat Chlorogensäure, Brenzcatechin, Catechin, in der genannten Reihenfolge, durch Birnenphenoloxydase am stärksten oxydiert gefunden. Kaffeesäure und Dopa haben wenig, 3,4-Dihydroxybenzoesäure und p-Kresol sehr schwach auf das Enzym reagiert. Epicatechin, Catechin und Chlorogensäure werden auch in andern Untersuchungen als Hauptsubstrate für die Birnenphenoloxydase genannt (Siegelman, 1955; Weurman und Swain, 1953).

Andrerseits werden als kräftige Inhibitoren der IES-Oxydase unter anderem Chlorogensäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure, Brenzcatechin, Eugenol und Py-

rogallol aufgeführt (Gortner und Kent, 1958; Henderson und Nitsch, 1962; Tomaszewski und Thimann, 1966; Tuli und Moyed, 1967). Sicher kommt also der Phenoloxydase neben der Peroxydase im IES-Oxydase-System eine grosse Bedeutung zu. Dass Dieca, ein Inhibitor der Phenoloxydase, die Zerstörung der IES stark hemmt (Tomaszewski und Thimann, 1966), ist ein weiteres Indiz für das Zusammenwirken der Peroxydase mit der Phenoloxydase.

Von hier aus lässt sich die Verbindung zur Ligninsynthese herstellen. Nakamura (1967) hat die Bildung von ligninartigen Polymerisationsprodukten bei der Oxydation von Coniferylalkohol – dem meistgenannten und wahrscheinlich zentralen Lignin-vorläufer – durch Peroxydase und Phenoloxydase beobachtet. Dabei hat er eine grössere Wirksamkeit der Peroxydase als der Phenoloxydase gefunden. Laccase, eine spezielle Phenoloxydase, die ebenfalls als wichtiges Enzym in der Biosynthese von Lignin betrachtet worden ist (Higuchi, 1959), hat keine ligninähnlichen Polymerisate gebildet. (Laccase scheint in Früchten, mit Ausnahme von Pfirsichen, nicht vorzukommen [Mayer und Harel, 1968].)

Eine Wechselbeziehung zwischen Auxin und Ligninbildung besteht tatsächlich. Beispielsweise beeinflusst Auxin die Xylemdifferenzierung und -regenerierung (Jacobs, 1952; Jacobs und Morrow, 1957; Wetmore, 1955). Auch die Sklereiddifferenzierung in Nadeln von *Pseudotsuga* steht wahrscheinlich unter der Kontrolle von Auxin (Al Talib et al., 1961).

Zimtsäure und ihre Derivate nehmen unter den die IES-Oxydase regulierenden Phenolen einen wichtigen Platz ein. Zimtsäurederivate (Cumarsäure, Ferulasäure und Kaffeesäure), als Co-Faktoren oder als Inhibitoren der IES-Oxydase, werden durch Meerrettichperoxydase parallel mit dem Verschwinden von IES zerstört (Engelsma, 1964). Die Synthese von Chlorogensäure verläuft von Zimtsäure über p-Cumarsäure, p-Cumaroylchinasäure oder über Kaffeesäure (Steck, 1968), wobei p-Cumarsäure bei der Umwandlung in Kaffeesäure Phenoloxydase und Ascorbinsäure benötigt (Sato, 1969).

Zimtsäurederivate sind jedoch auch im Lignin aller Pflanzen gefunden worden (Neish, 1965). p-Cumarsäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und andere Phenylpropanderivate können mit Hilfe von Kartoffelparenchym und Wasserstoffperoxyd zu ligninähnlichen Produkten aufgebaut werden (Bland und Logan, 1965). Higuchi und Brown (1963) sehen bei der Bildung von Lignin in Weizen folgenden Reaktionsablauf als gesichert an: Ferulasäure→Coniferylaldehyd→Coniferylalkohol→Lignin. Nach Taylor und Zucker (1966) kann der Cinnamoylteil der Chlorogensäure zur Lignifizierung dienen.

Aber nicht nur die Zimtsäurederivate, sondern auch andere IES-Oxydase-Inhibitoren sind als Ligninvorläufer verwendet worden. So polymerisiert zum Beispiel Eugenol (Siegel, 1953, 1955, 1957; Siegel et al., 1960) mit Wasserstoffperoxyd Lignin.

Wie in Kapitel 2 ausgeführt, werden unstabile Radikale zur Ligninbildung benötigt. Diese Radikale wirken wahrscheinlich aber auch im IES-Oxydase-System, wo ein sogenannter «freier Radikalemechanismus» vorgeschlagen ist (Fox und Purves, 1968; Fox et al., 1965; Hinman und Lang, 1965; Ray, 1960; Sacher, 1962, 1963).

Peroxydase ist in den Ribosomen, den Mikrosomen, den Mitochondrien, der Zytoplasmalösung und in der Zellwand gefunden worden (Plesnicar et al., 1967; De Jong, 1967; Matsushita et al., 1966; van Fleet, 1962). Für die Ligninsynthese ist natürlich das Vorkommen in der Zellwand von besonderem Interesse. Parenchymzellen zeigen,

besonders während der Zellstreckungsperiode, eine Wandreaktion. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit andern histochemisch gefundenen überein (De Jong, 1967; van Fleet, 1959). Peroxydaseaktivität wird auch in neu sich differenzierenden Sklereiden beobachtet. De Jong (1967) kann jedoch in lignifizierendem Gewebe keine Peroxydase nachweisen. Stark lignifizierte Zellwände verunmöglichen mit den angewandten Methoden rasch den histochemischen Enzymnachweis, so dass dieser Unterschied in verschiedenen Pflanzen verständlich ist.

7.3 *Hypothese über die Steinzellenbildung in der Birne*

Aus den vorliegenden und diskutierten Ergebnissen lässt sich folgendes Schema notieren (vgl. Fig. 7.3.1):

1. In den zukünftigen Sklereiden tritt eine von den Parenchymzellen sich unterscheidende Auxinproduktion auf, die zur Vergrösserung der Zellen und zur Peroxydasebildung führt.

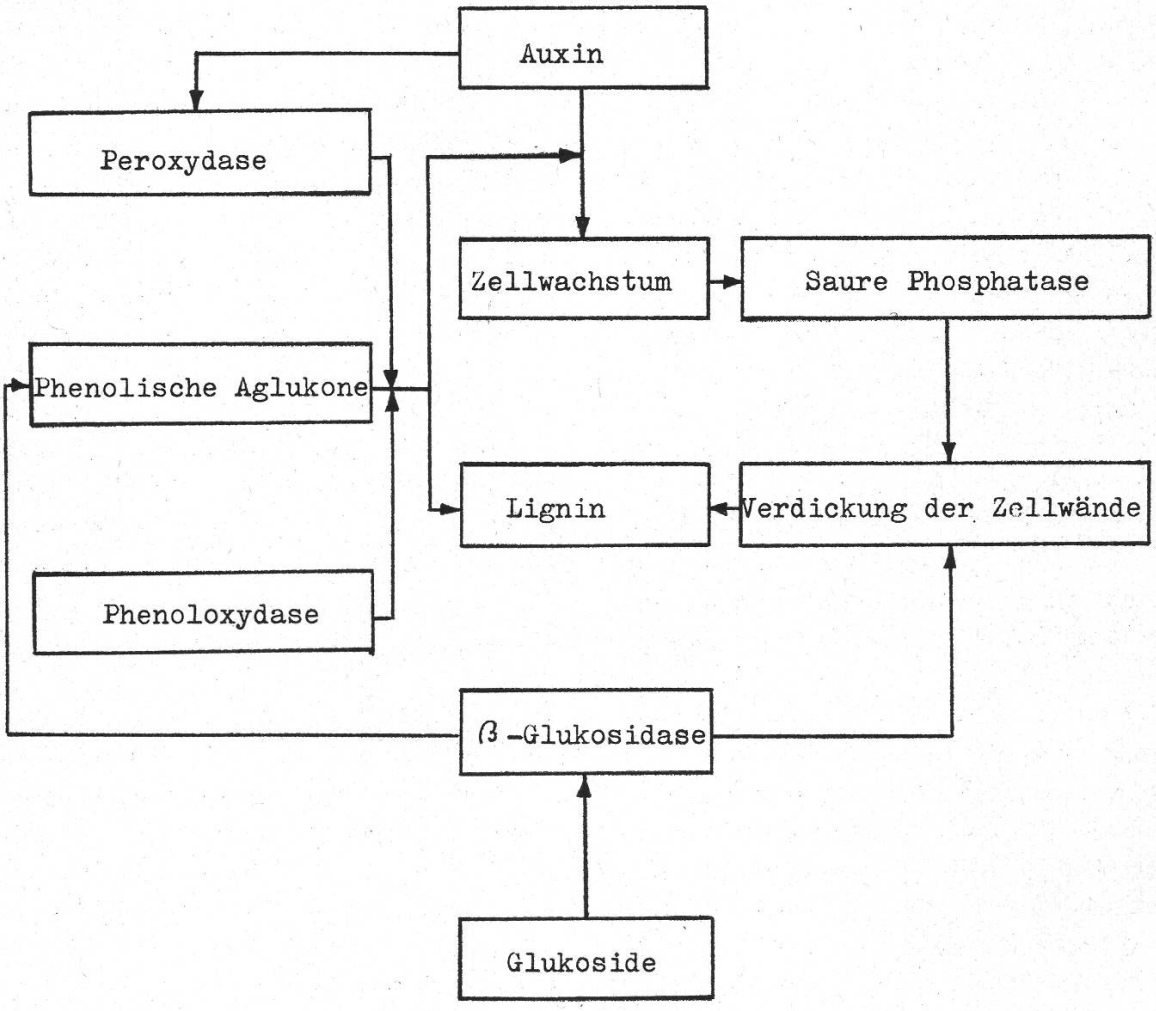


Fig. 7.3.1

Hypothese über die Steinzellenbildung in der Birne

2. Durch die Wirkung der β-Glukosidase entstehen phenolische Aglukone, die mit nicht aus Glukosiden stammenden Phenolen und mit der Peroxydase ein IES-Oxydase-System bilden.

3. Mit Hilfe der sauren Phosphatase, die nach der Zellstreckung osmotisch wirksame Substanzen mobilisiert, werden die Zellwände verdickt. Damit wird eine Matrix ausgebildet, die den zukünftigen Steinzellen erst die Lignineinlagerung gestattet (vgl. Siegel, 1962). (Den verdickten Zellwänden käme also eine besondere lignifizierende Fähigkeit zu.)

4. Die Phenole, als Teile des IES-Oxydase-Systems, werden durch die Peroxydase und die Phenoloxydase im Protoplasten oder/und in den Zellwänden oxydiert. Zum Teil polymerisieren sie anschliessend in den Sklereidwänden zu Lignin.

8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird während 2 Vegetationsperioden die Entwicklung der Birnenfrucht (Dechantsbirne von Alençon) beobachtet und vor allem die Steinzellenbildung mit histochemischen Methoden untersucht. Ferner werden die bisherigen Veröffentlichungen über die Sklereiden in Birnen zusammengestellt.

a) Die Fruchtentwicklung dauert 26 Wochen. Die Längsachse der Frucht nimmt zwischen der 3. und 6. Woche am stärksten zu. Der Durchmesser wächst nach der 8. Woche und nach der 16. Woche während 1 bis 3 Wochen ein wenig langsamer. Das innere Rindenparenchym zeigt starkes Wachstum von der 8. Woche an, das Markparenchym von der 10. Woche an und die «Stärkeschicht» von der 16./17. Woche an.

b) Die Zellteilungen im Markparenchym hören 2 Wochen nach dem Blühen, jene im Rindenparenchym zwischen der 7. und 9. Woche auf.

c) Die Zellzahl der Frucht wird auf $4 \cdot 10^7$ bis $5 \cdot 10^7$ Zellen geschätzt.

d) Sklereiden bilden sich im innern Rindenparenchym und in der «Stärkeschicht» nach der 7./8. Woche nicht mehr. In der Subhypodermis wachsen die Sklereidhaufen bis zur 20. Woche. In der Hypodermis beginnen sich Sklereiden erst von der 8. Woche an zu differenzieren.

e) Zukünftige Steinzellen wachsen rascher als normale Parenchymzellen.

f) Sklereiden zeigen in den Wänden und oft auch im Protoplasten eine Tyrosinreaktion.

g) Reservestärke wird in der Frucht nach der 7./8. Woche, besonders in der «Stärkeschicht» und im Markparenchym, beobachtet. 2 Wochen vor der Ernte weisen nur noch Zellen mit Chloroplasten Primärstärke auf.

h) 2 Orte der ganzen Birnenfrucht sind durch das Vorkommen von Calciumoxalatkristallen ausgezeichnet, die Subhypodermis und das Subendokarp. Im ganzen vermindert sich die Anzahl der Kristalle während der Fruchtentwicklung.

i) Bei Sklereidwänden gelingt der Ligninnachweis mit Phlorogluzin erst, wenn sie drei- bis viermal dicker als normale Parenchymzellwände sind.

k) In den ersten Wochen der Fruchtentwicklung tritt eine starke β-Glukosidase-Wirkung in allen Zellen auf, die zwischen der 5. und 6. Woche beträchtlich abnimmt und bis zur 15. Woche noch vereinzelt nachgewiesen werden kann.

l) Während der 4. Woche – kurz vor dem Ende der starken Glukosidaseaktivität – kann eine Tanninreaktion in den Markleitbündeln, im Endokarp und in der Hypodermis festgestellt werden.

m) Sklereiden, die sich neu differenzieren, zeigen unmittelbar nach der charakteristischen Zellvergrösserung, während der ersten Wandverdickung, stark saure Phosphataseaktivität. Daneben wird eine enge Beziehung zwischen der sauren Phosphatase und der Zellteilungsperiode in der Entwicklung der Birne beobachtet.

n) Peroxydase- und Phenoloxydaseaktivität werden während der Lignineinlagerung wahrgenommen. Um die Sklereiden sind beide Enzyme stärker wirksam als in den übrigen Parenchymzellen. In Sklereiden und in Parenchymzellen reagieren auch die Wände auf die Peroxydase- und Phenoloxydaseteste.

Aus den Ergebnissen wird folgende Hypothese über die Steinzellenbildung diskutiert:

1. In den zukünftigen Sklereiden tritt eine von den Parenchymzellen sich unterscheidende Auxinproduktion auf, die zur Vergrösserung der Zellen und zur Peroxydasebildung führt.
2. Durch die Wirkung der β-Glukosidase entstehen phenolische Aglukone, die mit nicht aus Glukosiden stammenden Phenolen und mit der Peroxydase ein IES-Oxydase-System bilden.
3. Mit Hilfe der sauren Phosphatase, die nach der Zellstreckung osmotisch wirksame Substanzen mobilisiert, werden die Zellwände verdickt. Damit wird eine Matrix ausgebildet, die den zukünftigen Steinzellen erst die Lignineinlagerung gestattet.
4. Die Phenole, als Teile des IES-Oxydase-Systems, werden durch die Peroxydase und die Phenoloxydase im Protoplasten oder/und in den Zellwänden oxydiert. Zum Teil polymerisieren sie anschliessend in den Sklereidwänden zu Lignin.

Herrn Prof. Dr. Wanner danke ich für die fesselnde Aufgabe und für sein stetes Interesse an den Ergebnissen meiner Untersuchungen. Für die Probleme meiner besondern Arbeitsweise – der Hauptteil der Arbeit entstand neben meiner beruflichen Tätigkeit – zeigte er grosses Verständnis, wofür ihm auch herzlich gedankt sei. Ein namhafter Druckkostenbeitrag der Geigy-Jubiläums-Stiftung gestattete den Druck in der vorliegenden Form. Für diese grosszügige Unterstützung sei auch hier bestens gedankt.

Literatur

Al Talib H. Khalil und G. John Torrey. 1961. Sclereid distribution in the leaves of *Pseudotsuga* under natural and experimental conditions. Amer. J. Bot. *48*, 71–79.

Alvarez M. R. und D. O. King. 1969. Peroxidase localization, activity, and isozyme patterns in the developing seedling of Vanda (Orchidaceae). Amer. J. Bot. *56*, 180–186.

Avers C. J. und R. B. Grimm. 1959. Comparative enzyme differentiation in grass roots. I. Acid phosphatase. Amer. J. Bot. *46*, 190–193.

— und E. E. King. 1960. Histochemical evidence of intracellular enzymatic heterogeneity of plant mitochondria. Amer. J. Bot. *47*, 220–225.

Bain J. M. 1961. Some morphological, anatomical and physiological changes in the pear fruit (*Pyrus communis*, var. Williams Bon Chrétien) during development and following harvest. Austr. J. Bot. *9*, 99–123.

Beacham L. M. 1930. An objective method for measuring grittiness in pears. J. Ass. Offic. Agr. Chem. *22*, 766–768.

Bland D. E. und A. F. Logan. 1965. The properties of springyl, guaiacyl and p-hydroxyphenyl artificial lignins. Biochem. J. *95*, 515–520.

Boll W. G. 1965. On the claimed adaptive nature of IAA oxidase and an effect of green light on IAA oxidase activity. Can. J. Bot. *43*, 885–892.

Brändle R. 1968. Die Verteilung der Sauerstoffkonzentration in fleischigen Speicherorganen (Äpfel, Bananen und Kartoffelknollen). Dissertation, Universität Zürich.

— und H. Wanner. 1965. Die Verteilung der Sauerstoffkonzentration in reifenden Äpfeln. Planta (Berl.) *65*, 65–72.

Bünning E. 1953. Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. 3. Aufl. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.

Burstone M. S. 1960. Histochemical demonstration of cytochrome oxidase with new amine reagents. J. Histochem. Cytochem. *8*, 63–70.

Catesson A. M. und Y. Czaninski. 1967. Mise en évidence d'une activité phosphatasique acide dans le reticulum endoplasmique des tissus conducteurs de Robinier et de Sycomore. J. Microscopie *6*, 509–514.

Cave M. C. 1869. Structure et développement du fruit. Ann. Sci. Nat. Bot. *V/10*, 123–190.

Chen P. K. und S. Venketeswaran. 1966. Acid phosphatase activity of normal and tumor tissue of tobacco grown in vitro and in vivo. Plant Physiol. *41*, 842–846.

Constantinides S. M. und C. L. Bedford. 1967. Multiple forms of phenoloxidase. J. Food Sci. *32*, 446–450.

Corte A. 1959. La presenza della pietrosità virosica delle pere in Alto Adige. Notiz. Malattie Piante *26/27 (47/48)*, 118–121.

Crist J. W. und L. P. Batjer. 1931. The stone cells of pear fruits, especially the Kieffer pear. Michigan Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. 113.

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

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.

Delaveau P. und R. Paris. 1961. Importance physiologique des composés polyphénoliques et en particulier des flavonoïdes. Bull. Soc. franç. physiol. vég. *7*, 24–33.

Engelsma G. 1964. Destruction of hydroxycinnamic acids coupled to oxidation of indolyl-3-acetic acid by peroxidase as a possible mechanism for adaptive changes of indolyl-3-acetic acid oxidase activity. Nature *202*, 88–89.

Erdmann J. 1866. Über die Concretionen in den Birnen. Ann. Chem. Pharm. *138*, 1–19.

Esau K. 1960. Anatomy of seed plants. (S. 55–62.) John Wiley & Sons, Inc., New York.

— 1965. Plant anatomy. (S. 595–602.) 2. Aufl. John Wiley & Sons, Inc., New York, London, Sydney.

Figier J. 1968. Localisation infrastructurale de la phosphomonoestérase acide dans la stipule de *Vicia faba* L. au niveau du nectaire. Planta (Berl.) *83*, 60–79.

Forster A. S. 1956. Plant idioblasts: remarkable examples of cell specialization. Protoplasma *46*, 184–193.

Fosket D. E. und J. P. Miksche. 1966. A histochemical study of the seedling shoot apical meristem of *Pinus lambertiana*. Amer. J. Bot. *53*, 694–702.

Fox L.R., W.K.Purves und H.I.Nakada. 1965. The role of horse-radish peroxidase in indole-3-acetic acid oxidation. Biochemistry *4*, 2754–2763.
— W.K.Purves. 1968. Mechanism of enhancement of IAA oxidation by 2,4-dichlorophenol. Plant Physiol. *43*, 454–456.
Freudenberg K., H.Reznik, H.Boesenberg und D.Rasenack. 1952. Das an der Verholzung beteiligte Fermentsystem. Chem. Ber. *85*, 641–652.
— H.Reznik, W.Fuchs und M.Reichert. 1955. Untersuchung über die Entstehung des Lignins und des Holzes. Naturwissenschaften *42*, 29–35.
Frey-Wyssling A. 1942. Über den Feinbau der Steinzellen. Cellulosechemie *20*, 55–61.
— 1959. Die pflanzliche Zellwand. Springer-Verlag, Berlin.
Galston A.W. und L.Y.Dalberg. 1954. The adaptive formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. Amer. J. Bot. *41*, 373–380.
— 1956. Some metabolic consequences of the administration of indoleacetic acid to plant cells. In: Wain R.L. und F.Wightman (eds.). The chemistry and mode of action of plant growth substances. (S. 219–233.) Butterworths Sci. Publications, London.
— und W.S.Hillman. 1961. The degradation of auxin. In: W.Ruhland (ed.). Handbuch der Pflanzenphysiologie *XIV*, 647–670. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
— S.Lavee und B.Z.Siegel. 1968. The induction and repression of peroxidase isozymes by 3-indoleacetic acid. In: Wightman F. und G.Setterfield (eds.). Biochemistry and physiology of plant growth substances. (S. 455–472.) Runge Press, Ottawa.
Glick D. und E.E.Fisher. 1946. Studies in histochemistry XVII. Localization of phosphatases in wheat grain and in the epicotyl and roots of the germinated grain. Arch. Biochem. *11*, 65–87.
Gortner W.A. und M.Kent. 1958. The coenzyme requirement and enzyme inhibitors of pineapple indoleacetic acid oxidase. J. Biol. Chem. *233*, 731–735.
Graham R.C., U.Lundholm und M.J.Karnovsky. 1965. Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethylcarbazole. J. Histochem. Cytochem. *13*, 150–152.
Grew N. 1682. The anatomy of plants. W.Rawlins, London.
Harborne J.B. 1964. Biochemistry of phenolic compounds. Acad. Press, New York.
— 1967. Comparative biochemistry of the flavonoids. Acad. Press, New York.
Hare R.C. 1964. Indoleacetic acid oxidase. Bot. Rev. *30*, 129–165.
Harel E., A.M.Mayer und Y.Shain. 1964. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. Physiol. Plantarum *17*, 921–930.
— A.M.Mayer und Y.Shain. 1965. Purification and multiplicity of catechol oxidase from apple chloroplasts. Phytochemistry *4*, 783–790.
Hegi G. (ed.) 1935. Illustrierte Flora von Mittel-Europa. *IV/2*, 137. C.Hanser, München.
Henderson J.H.M. und J.P.Nitsch. 1962. Effect of certain phenolic acids on the elongation of *Avena* first internodes in the presence of auxins and tryptophan. Nature *195*, 780–782.
Higuchi T. 1957a. Biochemical studies of lignin formation. I. Physiol. Plantarum *10*, 356–372.
— 1957b. Biochemical studies of lignin formation. II. Physiol. Plantarum *10*, 621–632.
— 1959. Studies on the biosynthesis of lignin. In: Proc. 4th Int. Congr. of Biochem. *II*, 161–188. Biochem. Wood. Pergamon Press, London.
— und S.A.Brown. 1963. Studies of lignin biosynthesis using isotopic carbon. XIII. The phenylpropanoid system in lignification. Can. J. Biochem. *41*, 621–628.
Hinman R.L. und J.Lang. 1965. Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. Biochemistry *4*, 144–158.
Jacobs W. 1952. The role of auxin in differentiation of xylem around a wound. Amer. J. Bot. *39*, 301–309.
— und I.Morrow. 1957. A quantitative study of xylem development in the shoot apex of *coleus*. Amer. J. Bot. *44*, 823–842.
Jensen W.A. 1955. The histochemical localization of peroxidase in roots and its induction by indoleacetic acid. Plant Physiol. *30*, 426–432.
— 1956. The cytochemical localization of acid phosphatase in root tip cells. Amer. J. Bot. *43*, 50–54.
— 1962. Botanical histochemistry. W.H.Freeman & Co., San Francisco, London.
Jermyn M. 1952. Multiple nature of the enzymes of *Aspergillus oryzae* and of horse-radish. Nature *169*, 487–489.
Kenten R.H. 1955. The oxidation of indolyl-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase systems. Biochem. J. *59*, 110–121.

Kessler H. 1948. Birnensorten der Schweiz. Verbandsdruckerei, Bern.
Klapper M.H. und D.P. Hackett. 1965. Investigations on the multiple components of commercial horse-radish peroxidase. Biochem. Biophys. Acta *96*, 272–282.
Lavee S. und A.W. Galston. 1968. Hormonal control of peroxidase activity in cultured *pelargonium* pith. Amer. J. Bot. *55*, 890–893.
Libbert E. und R. Kunert. 1966. Über einen angeblichen histochemischen Nachweis des Auxins Indol-3-Essigsäure. Flora Allg. Bot. Zeit. *156*, 573–574.
Maciejewska-Potapczyk W. 1960. Phosphorus compounds, nuclease, and phosphatase activities in healthy and tumorous stem tissues of *Datura stramonium* L. J. Exp. Bot. *31*, 98–103.
Macnicol P.K. und J. Reinert. 1963. Untersuchungen über Auxinoxydasen. II. Auftrennung und IES-Oxydase-Aktivität der multiplen Peroxydasen des etiolierten Erbsensprosses. Z. Naturforsch. *18b*, 572–579.
Macquart L.C.H. und L.N. Vauquelin. 1791. Examen des concrétions vulgairement nommées pierres qu'on rencontre dans les poires. In: La médecine éclairée par les sciences physiques, etc., par Fourcroy, tome *I*, 232–236.
Malfatti J. 1896. Beiträge zur Anatomie der Birn- und Apfelfrucht. Z. f. Nahrungsmittel-Unters., Hygiene *X*, 265–269.
Matsushita S., T. Mori und T. Hata. 1966. Enzyme activities associated with ribosomes from soybean seedlings. Plant Cell Physiol. *7*, 533–545.
Mayer A.M. und E. Harel. 1968. A laccase-like enzyme in peaches. Phytochemistry *7*, 1253–1256.
McCune D.C. 1961. Multiple peroxidases in corn. Ann. N.Y. Acad. Sci. *94*, 723–730.
McGregor S.M. und H.E. Street. 1953. The carbohydrate nutrition of tomato roots. IV. The nature and distribution of acid phosphatases. Ann. Bot. N.S. *17*, 385–394.
Meyen F.J.F. 1837. Pflanzenphysiologie. Zitiert von Erdmann.
— 1841. Pflanzenpathologie. Zitiert von Erdmann.
Meynhardt J.T., R.J. Romani und E.C. Maxie. 1965. Evidence for the occurrence of the pentose phosphate pathway in ripening Bartlett pear fruit tissue. S. Afr. J. Agr. Sci. *8*, 691–701.
Mia A.J. und S.M. Pathak. 1968. A histochemical study of the shoot apical meristem of *Rauwolfia* with reference to differentiation of sclereids. Can. J. Bot. *46*, 115–120.
Moeller J. und C. Griebel. 1928. Mikroskopie der Nahrungs- und Genussmittel aus dem Pflanzenreiche. 3. Aufl. S. 244. J.-Springer-Verlag, Berlin.
Nagel C.W. und M.E. Patterson. 1967. Pectic enzymes and development of the pear. J. Food Sci. *32*, 294–297.
Nakamura W. 1967. Studies on the biosynthesis of lignin. I. Disproof against the catalytic activity of laccase in the oxidation of coniferyl alcohol. J. Biochem. (Tokyo) *62*, 54–61.
Neish A.C. 1965. Coumarins, phenylpropanes, and lignin. In: Bonner J. und J.E. Varner (eds.). Plant Biochemistry 581–617. Acad. Press, New York.
Nord F.F. und W.J. Schubert. 1967. The biogenesis of lignins. In: Bernfeld P. (ed.). Biogenesis of natural compounds. 2. Aufl. S. 903–939. Pergamon Press, Oxford.
Nortjé B.K. und B.H. Koeppen. 1965. The flavonol glycosides in the fruit of *Pyrus communis* L. cultivar Bon Chrétien. Biochem. J. *97*, 209–213.
Novacky A. und R.E. Hampton. 1968. Peroxidase isozymes in virus-infected plants. Phytopathology *58*, 301–305.
Ockerse R., B.Z. Siegel und A.W. Galston. 1966. Hormone-induced repression of a peroxidase isozyme in plant tissue. Science *151*, 452–453.
Pilet P.E. und J. Phipps. 1968. Inhibition of auxin catabolism in relation to the chlorophyll content of the tissues. Planta (Berl.) *80*, 82–88.
Plesnicar M., W.D. Bonner und B.T. Storey. 1967. Peroxidase associated with higher plant mitochondria. Plant Physiol. *42*, 366–370.
Ponting J.D. und M.A. Joslin. 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. Arch. Biochem. *19*, 47–63.
Potonié H. 1880. Über die Bedeutung der Steinkörper im Fruchtfleische der Birnen und der Pomazeen und überhaupt. Kosmos *8*, 33–36.
Poux N. 1963. Localisation de la phosphatase acide dans les cellules méristématiques de blé (*Triticum vulgare* Vill.). J. Microscop. *2*, 485–490.
Ray P.M. 1960. The destruction of indoleacetic acid. III. Relationships between peroxidase action and indoleacetic acid oxidation. Arch. Biochem. Biophys. *87*, 19–30.
Reiss J. 1967. Prinzipien der histochemischen Lokalisation von Cytochromoxydase und Peroxydase. Mikroskopie *22*, 1–10.

Sacher J.A. 1962. An IAA oxidase-inhibitor system in bean pods. II. Kinetic studies of oxidase and natural inhibitor. Plant Physiol. *37*, 74–82.
— 1963. Effect of inhibitors on kinetics of indoleacetic acid oxidation. Amer. J. Bot. *50*, 116–122.
Sato M. 1969. The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid. Phytochemistry *8*, 353–362.
Schubert W.J. 1965. Lignin biochemistry. Acad. Press, New York.
Sequeira L. und L. Mineo. 1966. Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. Plant Physiol. *41*, 1200–1208.
Shannon L.M., E. Kay und J.Y. Lew. 1966. Peroxidase isozymes from horse-radish roots. I. Isolation and physical properties. J. Biol. Chem. *241*, 2166–2172.
Sheen S.J. und J. Calvert. 1969. Studies on polyphenol content, activities and isozymes of polyphenol oxidase and peroxidase during air-curing in three tobacco types. Plant Physiol. *44*, 199–204.
Siegel B.Z. und A.W. Galston. 1967. The isoperoxidases of *Pisum sativum*. Plant Physiol. *42*, 221–226.
Siegelman H.W. 1955. Detection and identification of polyphenol-oxidase substrates in apple and pear skin. Arch. Biochem. Biophys. *56*, 97–102.
Siegel S.M. 1953. On the biosynthesis of lignins. Physiol. Plantarum *6*, 134–139.
— 1955. The biochemistry of lignin formation. Physiol. Plantarum *8*, 20–32.
— 1957. Nonenzymic macromolecules as matrices in biological synthesis. J. Amer. Chem. Soc. *79*, 1628–1632.
— P. Frost und F. Porto. 1960. Effects of indoleacetic acid and other oxidation regulators on in vitro peroxidation and experimental conversion of eugenol to lignin. Plant Physiol. *35*, 163–167.
— 1962. The plant cell wall. Pergamon Press, London.
Smith W.W. 1935. The course of stone cell formation in pear fruits. Plant Physiol. *10*, 587–611.
Sommer J.R. und J.J. Blum. 1965. Cytochemical localization of acid phosphatases in *Euglena gracilis*. J. Cell Biol. *24*, 235–251.
Sorauer P. 1954. Handbuch der Pflanzenkrankheiten. 6. Aufl. *II/1*, 327–328. Paul-Parey-Verlag, Berlin, Hamburg.
Spannhof L. 1967. Einführung in die Praxis der Histochemie. 2. Aufl. Gustav-Fischer-Verlag, Jena.
Steck W. 1968. Metabolism of cinnamic acid in plants: Chlorogenic acid formation. Phytochemistry *7*, 1711–1717.
Sterling C. 1954. Sclereid development and the texture of Bartlett pears. Food Res. *19*, 433–443.
Strasburger E. 1884. Das botanische Practicum. 1. Aufl., S. 72. Gustav-Fischer-Verlag, Jena.
Stutz R.E. 1957. The indole-3-acetic acid oxidase of *Lupinus albus* L. Plant Physiol. *32*, 31–39.
Taylor A.O. und M. Zucker. 1966. Turnover and metabolism of chlorogenic acid in *Xanthium* leaves and potato tubers. Plant Physiol. *41*, 1350–1359.
Tomaszewski M. und K.V. Thimann. 1966. Interactions of phenolic acids, metallic ions and chelating agents on auxin-induced growth. Plant Physiol. *41*, 1443–1454.
Tuli V. und H.S. Moyed. 1967. Inhibitory oxidation products of indole-3-acetic acid: 3-hydroxymethyloxindole and 3-methyleneoxindole as plant metabolites. Plant Physiol. *42*, 425–530.
Turpin M. 1838. Mémoire sur la différence qu'offrent les tissus cellulaires de la pomme et de la poire, etc. CR Acad. Sci. Paris *6*, 711–738.
Van Blaricom L.O. und J.A. Brittain. 1961. The quantity and size distribution of stone cell particles in pear varieties. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. *78*, 59–64.
Vanden Born W.H. 1963. Histochemical studies of enzyme distribution in the shoot-tips of white spruce. Can. J. Bot. *41*, 1509–1527.
Van der Ploeg M. und P. van Duijn. 1964. The influence of peroxidases on the Dopa-system. J. Roy. Microscop. Soc. *83*, 405–414.
Van Fleet D.S. 1959. Analysis of the histochemical localization of peroxidase related to the differentiation of plant tissues. Can. J. Bot. *37*, 449–457.
— 1961. Histochemistry and function of the endodermis. Bot. Rev. *27*, 165–220.
— 1962. Histochemistry of enzymes in plant tissues. In: Graumann W. und K. Neumann (eds.). Handbuch der Histochemie *VII/2*, 1–38. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.
Voss W., R. Bauer und J. Pfirschke. 1938. Über den Aufbau von jungen hochverholzten Zellwänden. Liebigs Ann. *534*, 95–135.
Walker J.R.L. 1964. The polyphenoloxidase of pear fruit. Austr. J. Biol. Sci. *17*, 575–576.

Wanner H. 1952. Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. Planta (Berl.) *41*, 190–194.
Wetmore R.H. 1955. Differentiation of xylem in plants. Science *121*, 626–627.
Weurmann C. und T.Swain. 1953. Chlorogenic acid and the enzymic browning of apples and pears. Nature *172*, 678.
Wilson K. 1949. Histochemical localization of acid phosphatase during the development of cucurbit fruits. Amer. J. Bot. *36*, 806.
Yamazaki I. und H.Souzu. 1960. The mechanism of indoleacetic acid oxidase reaction catalyzed by turnip peroxidase. Arch. Biochem. Biophys. *86*, 294–301.
Zalewski W. 1961. Zawartosc komórek kammiennich w miazszu gruszek jako kryterium ich przydatuosci do produkcji kompotow. (Stone cells in pears as an index of pear varietal suitability for canning. English summ. in Biol. abstr. 1961. 16788.) Prace Inst. Sadown w Skiern *4*, 376–387.
Zenk M.H. und G.Müller. 1963. In vivo destruction of exogenously applied indolyl-3-acetic acid as influenced by naturally occurring phenolic acids. Nature *200*, 761–763.
— 1966. Wachstum. Fortschr. Bot. *28*, 89–97.

Fritz Häuptli,
5742 Kölliken

Legenden zu den Tafeln I-IX

Anordnung der Figuren aller Tafeln:

Figur 1	Figur 2
Figur 3	Figur 4
Figur 5	Figur 6
Figur 7	Figur 8

Tafel I

Figur 1

Tyrosinnachweis. Reaktion in den Zellwänden und im Protoplasten. 8.W., 820 ×

Figur 2

Tyrosinnachweis. Kontrolle zu Figur 1, 8.W., 820 ×

Figur 3

Saure Phosphatase (Bleisulfidmethode). Sklereiden der Subhypodermis am Rande eines Sklereidenhaufens mit starker Reaktion. Tüpfelkanäle mit Reaktionsprodukten. 3.W., 820 ×

Figur 4

Saure Phosphatase (Bleisulfidmethode). 2 Steinzellen. Die rechtsliegende ältere Steinzelle mit schwächerer Reaktion. 9.W., 820 ×

Figur 5

Phenoloxydase (Dopa). Sklereide in der «Stärkeschicht». Dunkle Sklereidwände. Reaktion im Zellumen. 3.W., 576 ×

Figur 6

Phenoloxydase (Dopa). Sklereide in der «Stärkeschicht». Kontrolle (Hitze) zu Figur 5, 3.W., 820 ×

Figur 7

Phenoloxydase (Brenzcatechin). Sklereidengruppe. 7./8.W., 330 ×

Figur 8

Phenoloxydase (Brenzcatechin). Sklereidengruppe. Kontrolle (ohne Substrat) zu Figur 7, 7./8.W., 330 ×

(W. = Wochen nach dem Blühen)

Tafel II

Figur 1

Peroxydase (AAC). 2 Sklereidenhaufen. Starke Peroxydasewirkung in der unmittelbaren Umgebung der Sklereidenhaufen. 20. W., 82 ×

Figur 2

Peroxydase (AAC). Inneres Rindenparenchym (links) mit Sklereidenhaufen. Starke Peroxydase. wirkung in der Umgebung der Steinzellhaufen. Markparenchym (rechts) mit schwacher Reaktion-Oben rechts: Markleitbündel. 17. W., 29 ×

Figur 3

Peroxydase (AAC). Von links nach rechts: Inneres Rindenparenchym mit Sklereidenhaufen. Markparenchym mit einem Leitbündel, Teil des Samenfaches (rechts unten). Kontrolle (Hitze) zu Figur 2, 17. W., 29 ×

Figur 4

Peroxydase (AAC). Inneres Rindenparenchym. Oben: Randzellen eines Sklereidenhaufens. Starke Reaktion des Plasmas und der Zellwände. 17. W., 330 ×

Figur 5

Peroxydase (AAC). Inneres Rindenparenchym mit Randzellen eines Sklereidenhaufens (links). Kontrolle (Hitze) zu Figur 4, 17. W., 330 ×

Figur 6

Peroxydase (AAC). Sklereide. Reaktion in der Wand (Mittellamelle) und im Lumen. 2./3. W., 576 ×

Figur 7

Peroxydase (Benzidin). Subhypodermis. Vergrösserte Zellen (= zukünftige Sklereiden) mit starker Reaktion in den Zellwänden. 3./4. W., 330 ×

Figur 8

Peroxydase (Benzidin). Subhypodermis mit vergrösserten Zellen (= zukünftige Sklereiden). Kontrolle (ohne Substrat) zu Figur 7. (Die Färbung der zentralen Steinzelle ist durch das Lignin bewirkt.) 5. W., 330 ×

(W. = Wochen nach dem Blühen)

Tafel III

β-Glukosidase

Figur 1

Von oben nach unten: Epidermis, Hypodermis mit starker Reaktion und Subhypodermis. 4. W., 144 ×

Figur 2

Reaktionsprodukte in den Zellen des Rindenparenchyms. 2. W., 820 ×

Figur 3

Sklereiden und Rindenparenchymzellen mit starker Reaktion. 3./4. W., 576 ×

Figur 4

Rindenleitbündel. Von links nach rechts: Xylem, Kambium, Phloem. Hauptreaktion in den Markstrahlen des Xylems und im Phloem. 2. W., 576 ×

Figur 5

Leitbündelast im Rindenparenchym mit Reaktionsprodukten. Rindenparenchymzellen in der Umgebung nur schwache oder keine Reaktion. 6. W., 144 ×

Figur 6

Steinzellen mit Reaktion. 4. W., 576 ×

Figur 7

Subhypodermis. Sklereiden und Parenchymzellen mit Reaktionsprodukten. 4. W., 144 ×

Figur 8

Subhypodermis. Sklereiden und Parenchymzellen. Kontrolle zu Figur 7, 4. W., 144 ×
(W. = Wochen nach dem Blühen)

Tafel IV

Saure Phosphatase (Bleisulfidmethode)

Figur 1

Überblick. Von links nach rechts: Markparenchym mit Samenfächern, inneres Rindenparenchym, «Stärkeschicht», Subhypodermis, Epidermis. Starke enzymatische Aktivität auf der ganzen Querschnittfläche mit einem Maximum in der Subhypodermis. Zentrum der Sklereidenhaufen hell. 5. W., 29 ×

Figur 2

Überblick. Kontrolle (Hitze) zu Figur 1, Steinzellhaufen und Leitbündel dunkler als Parenchymzellen im Rindenparenchym. Vergrösserte Zellen (= zukünftige Sklereiden) in der Subhypodermis und in der «Stärkeschicht». 5. W., 29 ×

Figur 3

Subhypodermis. Reaktion in der Nähe der Zellwände und in den Zellwänden. 3. W., 820 ×

Figur 4

Hypodermis. 2 reagierende Sklereiden. Oben: Epidermis mit Kutikula. 9./10. W., 820 ×

Figur 5

3 Steinzellhaufen im innern Rindenparenchym. Unregelmässige Reaktion in den dazwischenliegenden Parenchymzellen. 16. W., 82 ×

Figur 6

Steinzellhaufen im innern Rindenparenchym. Kontrolle (Hitze) zu Figur 5, 14. W., 82 ×

Figur 7

Rindenleitbündel. Von oben nach unten: Scheide, Phloem, Kambium, Xylem, Scheide. Starke Reaktion im Xylem, im Phloem bzw. in der Scheide. 3. W., 330 ×

Figur 8

Rindenleitbündel. Kontrolle (Hitze) zu Figur 7. Orientierung wie bei Figur 7, 3. W., 330 ×
(W. = Wochen nach dem Blühen)

Tafel V

Peroxydase (Inkubationslösung mit AAC)

Figur 1

Inneres Rindenparenchym. Reaktionsprodukte im Protoplasten. Links: Teil einer Sklereide. 11. W., 820 ×

Figur 2

«Stärkeschicht». Reaktion der Zellwände. 11. W., 820 ×

Figur 3

Inneres Rindenparenchym. Rechts: Sklereidenhaufen. Reaktion in den Wänden und in den Lumina der Parenchymzellen rings um die Sklereidenhaufen. 12. W., 330 ×

Figur 4

Inneres Rindenparenchym. Links und rechts: Teile von Sklereidenhaufen. Kontrolle (Hitze) zu Figur 3, 12. W., 330 ×

Figur 5

Rechts: Griffelkanalgewebe mit starker Reaktion. Links: Markparenchym mit schwacher Reaktion, Markleitbündel (dunkel) entlang dem Endokarp. 23. W., 82 ×

Figur 6

Kontrolle (Hitze) zu Figur 5. Unten: Griffelkanalgewebe. Oben: Markparenchym mit 3 Markleitbündeln. 23. W., 82 ×

Figur 7

Rindenleitbündel. Im Phloem (oben) starke, im Kambium keine, im Xylem (unten) schwache Reaktion. 6. W., 330 ×

Figur 8

Rindenleitbündel. Im Phloem (oben) und im Kambium starke, im Xylem (unten) schwache Reaktion. 12. W., 330 ×

(W. = Wochen nach dem Blühen)

Tafel VI

Figur 1

Peroxydase (AAC). Rindenleitbündel. Von oben nach unten: Phloem, Kambium, Xylem. Phosphat-Zitrat-Puffer. pH 6,0. Schwache Reaktion. Kambiumreaktion. 15. W., 330 ×

Figur 2

Peroxydase (Benzidin). Markparenchym (oben) mit schwacher, Griffelkanalgewebe (unten) mit starker Reaktion. 20. W., 330 ×

Figur 3

Peroxydase (Benzidin). Von links nach rechts: Epidermis, Hypodermis, Subhypodermis. Reaktion in der Hypodermis und in den Mittellamellen der Sklereiden. 9. W., 330 ×

Figur 4

Peroxydase (Benzidin). Von links nach rechts: Subhypodermis, Hypodermis, Epidermis. Unten: Teil eines Sklereidenhaufens. Kontrolle (ohne Substrat) zu Figur 3, 20. W., 330 ×

Figur 5

Peroxydase (Aminreaktion). Subhypodermis. 2 zukünftige Sklereiden (oben angeschnitten) mit starker Wandreaktion. 3./4. W., 820 ×

Figur 6

Peroxydase (Aminreaktion). Sklereidengruppe in der Subhypodermis. Zellwände grünlich. Reaktionsprodukte in den Zellumina. 3./4. W., 330 ×

Figur 7

Phenoloxydase (Dopa). Von oben nach unten: Epidermis, Hypodermis, Subhypodermis. Starke Reaktion der Hypodermis. Phosphat-Zitrat-Puffer (pH 7). 16. W., 330 ×

Figur 8

Phenoloxydase (Dopa). Von oben nach unten: Epidermis, Hypodermis, Subhypodermis. Kontrolle (Hitze) zu Figur 7, 19. W., 330 ×
(W. = Wochen nach dem Blühen)

Tafel VII

Phenoloxydase (Dopa)

Figur 1

Sklereide. Dunkle Wände und Reaktionsprodukte im Zellumen. 3./4. W., 576 ×

Figur 2

Sklereide. Kontrolle (Hitze) zu Figur 1, 3./4. W., 576 ×

Figur 3

Sklereiden (im Vergleich mit den Parenchymzellen vergrössert) in der Subhypodermis mit stärkerer Reaktion als Parenchymzellen. 4./5. W., 330 ×

Figur 4

Von links nach rechts: Hypodermis, Epidermis. Reaktion in jeder Zelle. 23. W., 576 ×

Figur 5

Von links nach rechts: Epidermis, Hypodermis, Subhypodermis mit Sklereiden. Starke Reaktion in der Epidermis und in der Hypodermis. 7. W., 330 ×

Figur 6

Von links nach rechts: Teil der Hypodermis, Subhypodermis mit Sklereiden. Kontrolle (Hitze) zu Figur 5, 3./4. W., 144 ×

Figur 7

Inneres Rindenparenchym. Reaktionsprodukte in den Zellumina. 2. W., 820 ×

Figur 8

Inneres Rindenparenchym. Kontrolle (Hitze) zu Figur 7, 2. W., 820 ×
(W. = Wochen nach dem Blühen)

Tafel VIII

Phenoloxydase

Figur 1

(Dopa.) Zentrales Markparenchym. Rechts: Teil des Samens. Links bzw. rechts: 2 Reihen Markleitbündel. 7. W., 50 ×

Figur 2

(Dopa.) Zentrales Markparenchym. Rechts: Samen (liegt dem Endokarp an). Kontrolle (Hitze) zu Figur 1, 7. W., 50 ×

Figur 3

(Dopa.) Von oben nach unten: Markparenchym, Subendokarp, Endokarp. Starke Reaktion des Endokarps und des Markparenchyms. Subendokarp mit schwacher Reaktion. 5. W., 144 ×

Figur 4

(Dopa.) Von oben nach unten: Markparenchym, Subendokarp, Endokarp. Kontrolle (Hitze) zu Figur 3, 11. W., 330 ×

Figur 5

(Dopa.) Zellen des Markparenchyms. Kernreaktion. 23. W., 330 ×

Figur 6

(Brenzcatechin.) Von links nach rechts: Subhypodermis mit Sklereiden, Hypodermis mit Substomatalraum, Epidermis mit Kutikula. Starke Reaktion in der Epidermis und in der Hypodermis. 6. W., 820 ×

Figur 7

(Brenzcatechin.) Von oben nach unten: Epidermis mit Kutikula, Hypodermis. Die Zellen der Hypodermis zeigen Enzymaktivität. 23. W., 820 ×

Figur 8

(Brenzcatechin.) Epidermis mit Kutikula (oben). Hypodermis (unten). In der Mitte der Hypodermis eine Sklereide. Kontrolle (Hitze) zu Figur 7, 12. W., 820 ×
(W. = Wochen nach dem Blühen)

Tafel IX

Phenoloxydase (Brenzcatechin)

Figur 1

3 Steinzellen bei beginnender Differenzierung ohne nennenswerte Reaktion. 2. W., 576 ×

Figur 2

Sklereide und Parenchymzellen mit Reaktion. 4./5. W., 820 ×

Figur 3

Rindenleitbündel. Von oben nach unten: Phloem, Kambium, Xylem. Reaktion über den ganzen Querschnitt. 10. W., 330 ×

Figur 4

Rindenleitbündel. Von oben nach unten: Phloem, Kambium, Xylem. Kontrolle (Dieca) zu Figur 3, 13. W., 330 ×

Figur 5

Von links nach rechts: Markparenchym. Oben: Markleitbündel. Subendokarp, Endokarp mit starker Reaktion. 9. W., 330 ×

Figur 6

Von links nach rechts: Markparenchym. Unten: Markleitbündel. Subendokarp, Endokarp, Kontrolle (ohne Substrat) zu Figur 5, 8. W., 330 ×

Figur 7

Markparenchym mit Griffelkanalgewebe (von links Mitte nach rechts oben). Starke Reaktion. 21. W., 82 ×

Figur 8

Griffelkanalgewebe (unten rechts). Markparenchym mit 2 Reihen Markleitbündeln. Kontrolle (Hitze) zu Figur 7, 21. W., 82 ×
(W. = Wochen nach dem Blühen)

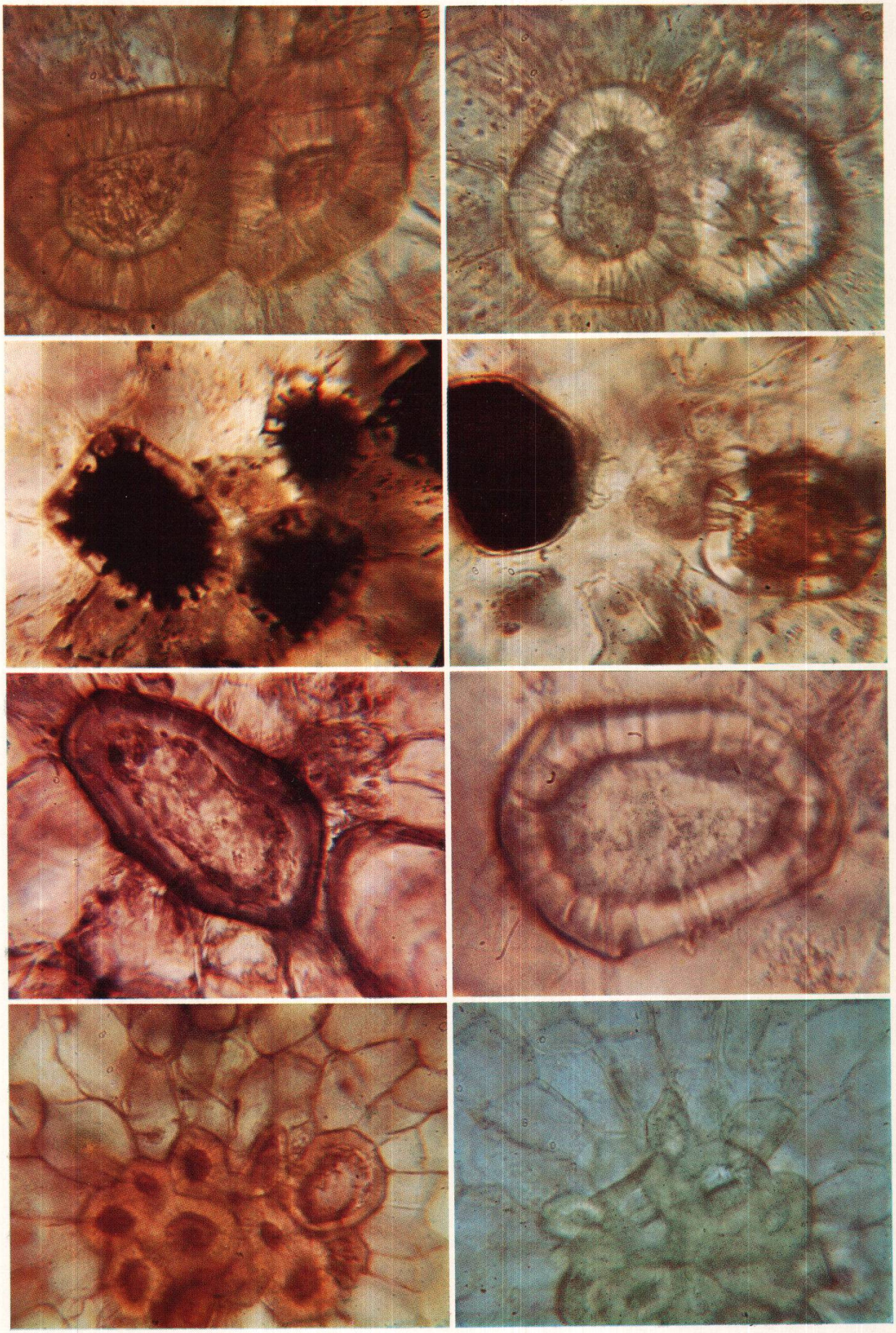
Bemerkungen zu den Tafeln:

Die in den Tafeln III bis IX wiedergegebenen Schwarzweissabbildungen sind alle farbig aufgenommen. Die Originalarbeit enthält diese Farbbilder und dazu 180 weitere Farbaufnahmen. Sie ist im Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich deponiert

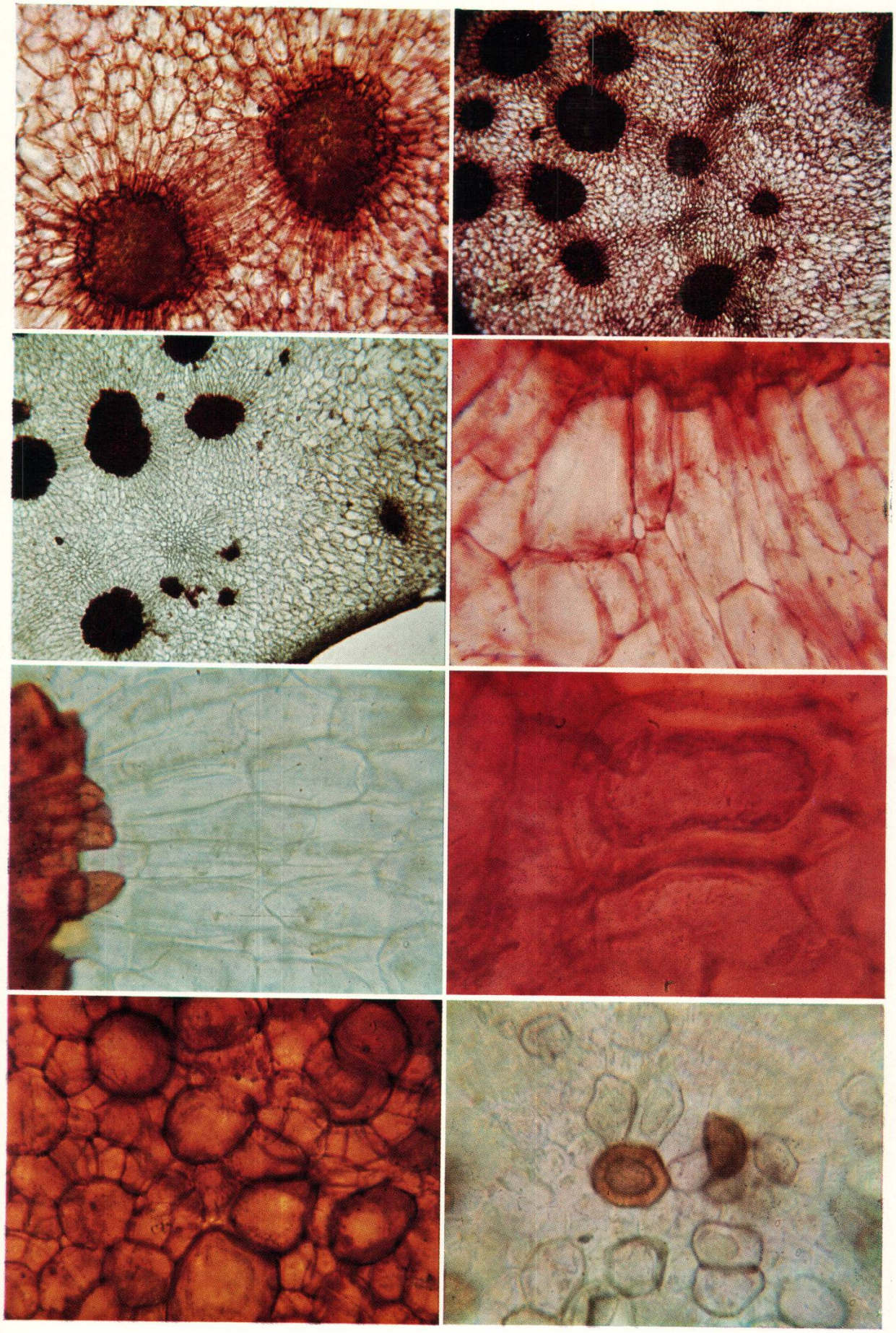
Les pressions de sélection qu'exercent sur les organismes les conditions externes ne sont en aucun cas indépendantes des performances téléonomiques caractéristiques de l'espèce. Des organismes différents vivant dans la même «niche» écologique ont avec les conditions externes (y compris les autres organismes) des interactions très différentes et spécifiques. Ce sont ces interactions spécifiques, en partie «choisies» par l'organisme lui-même, qui déterminent la nature et l'orientation de la pression de sélection qu'il subit. Disons que les «conditions initiales» de sélection que rencontre une mutation nouvelle comprennent à la fois et de façon indissoluble, le milieu extérieur et l'ensemble des structures et performances de l'appareil téléonomique.

Le comportement comme orientant les pressions de sélection, page 141, dans: JACQUES MONOD, *Le hasard et la nécessité* (Editions du Seuil, Paris, 1971).

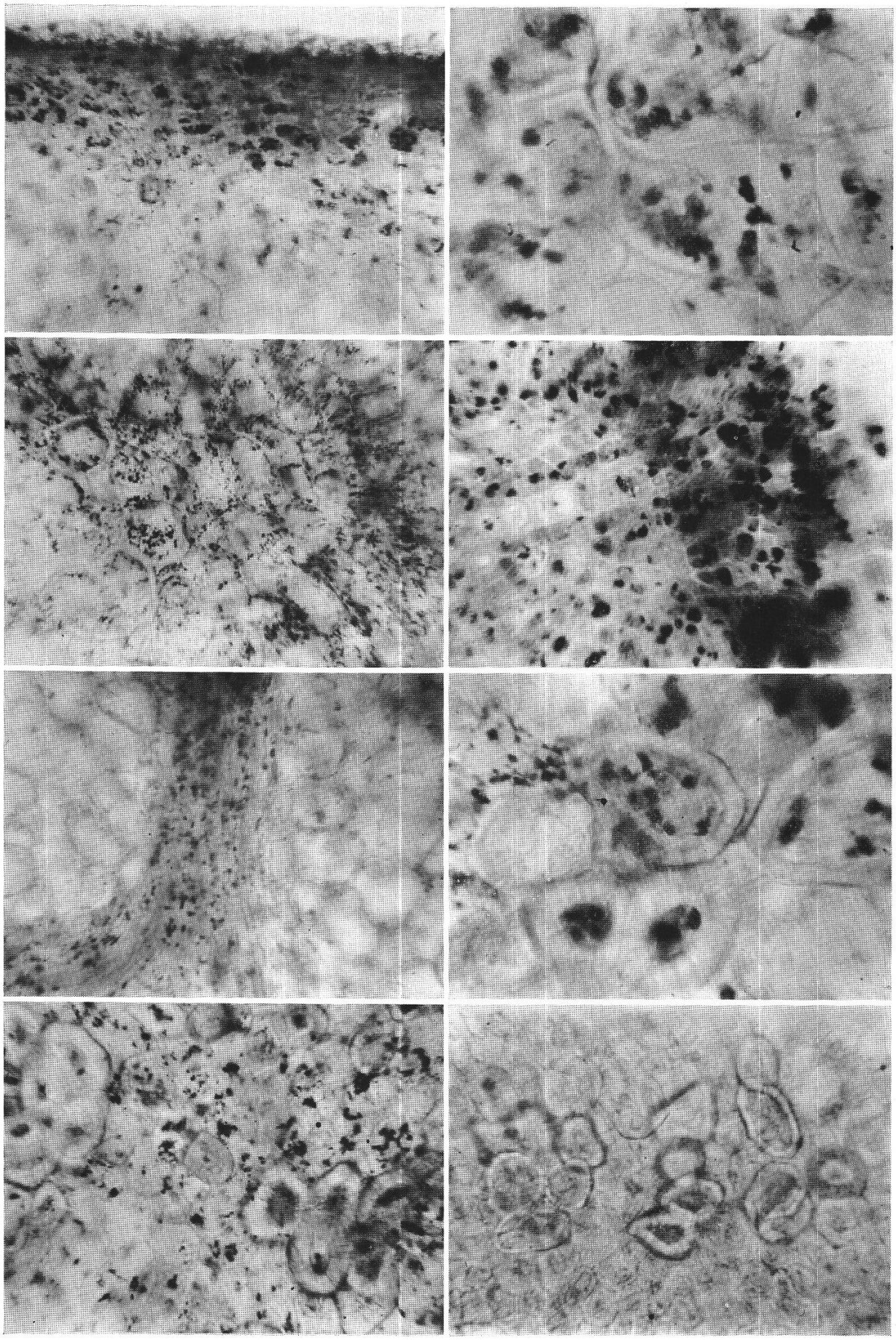
Tafel I



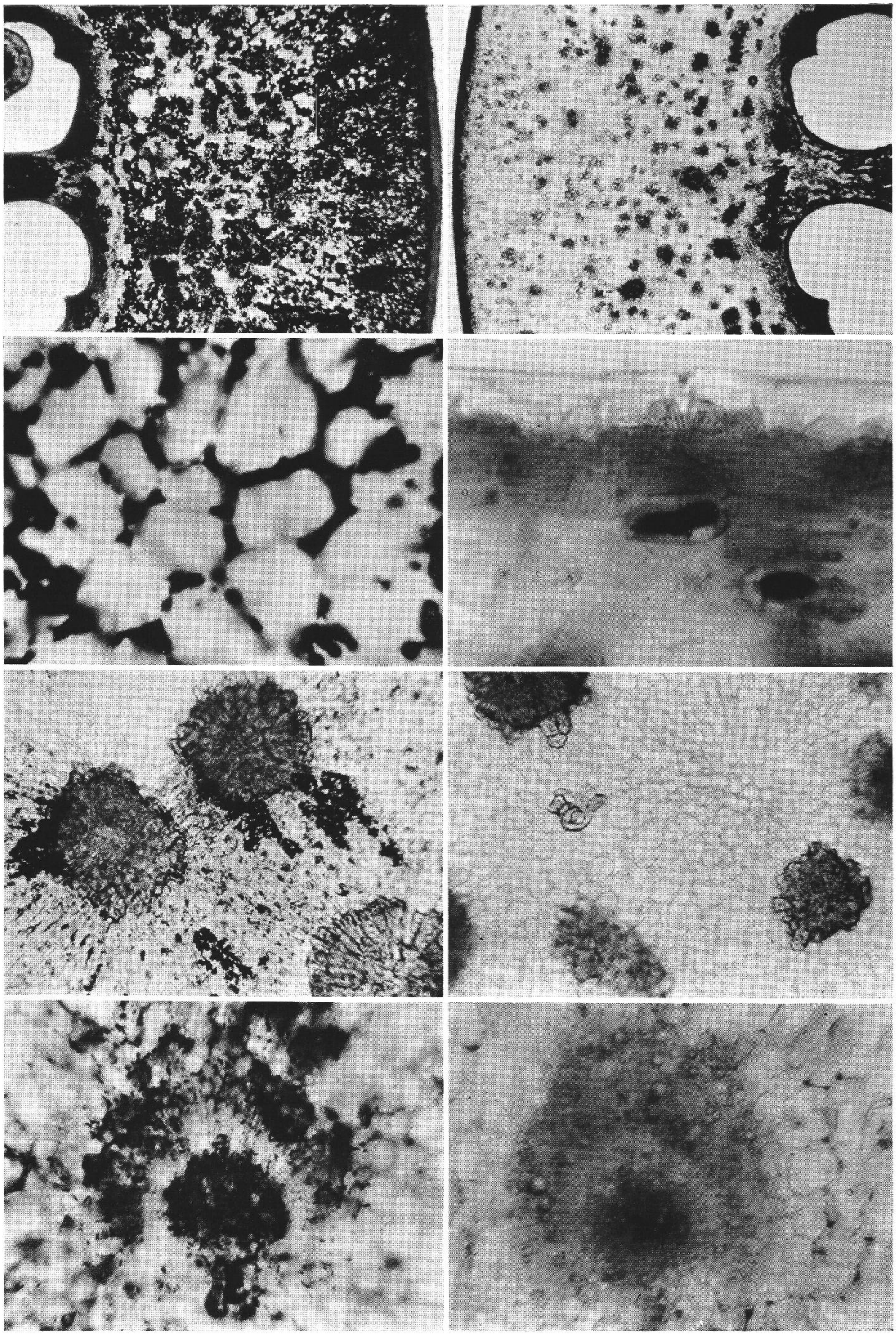
Tafel II



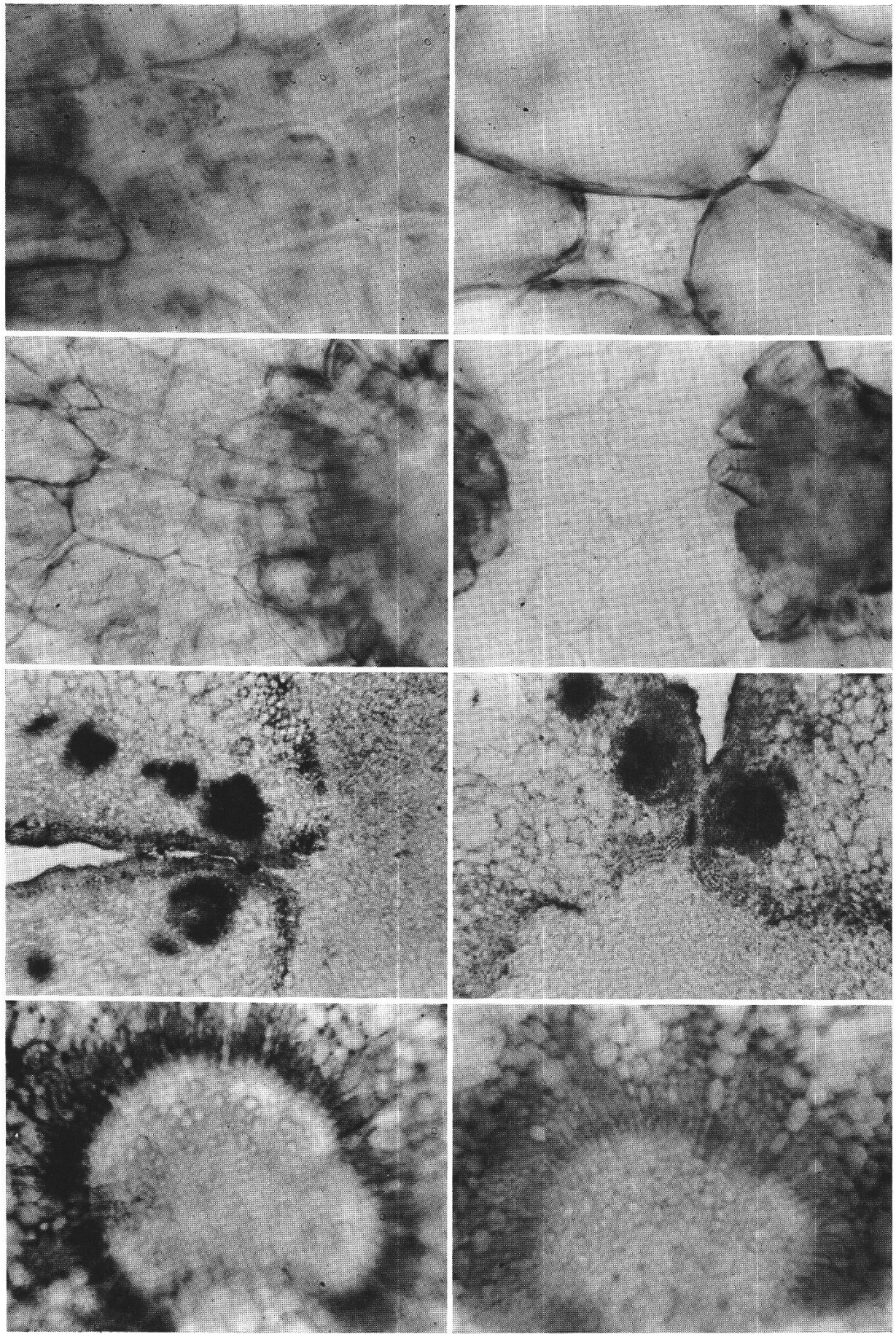
Tafel III



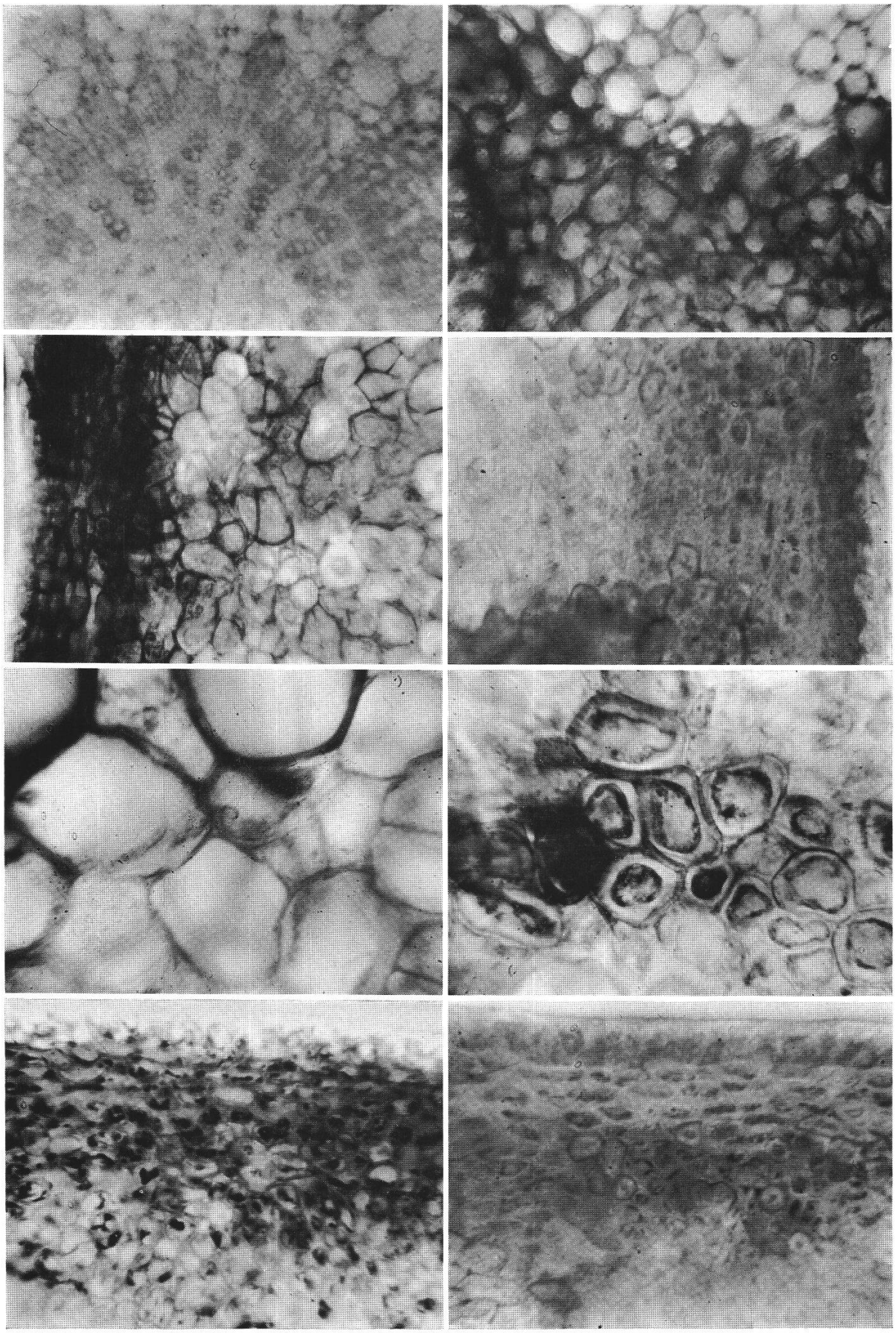
Tafel IV



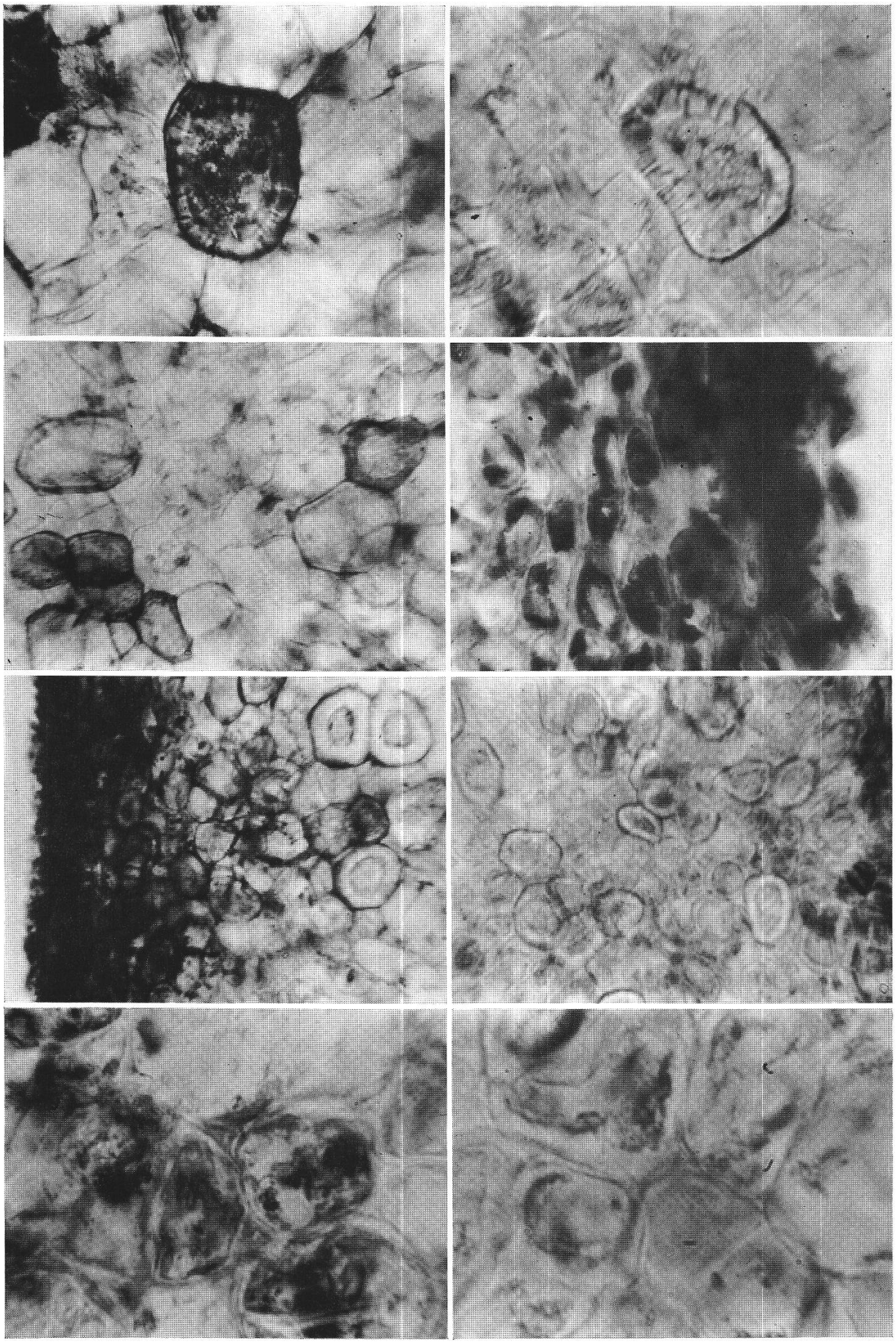
Tafel V



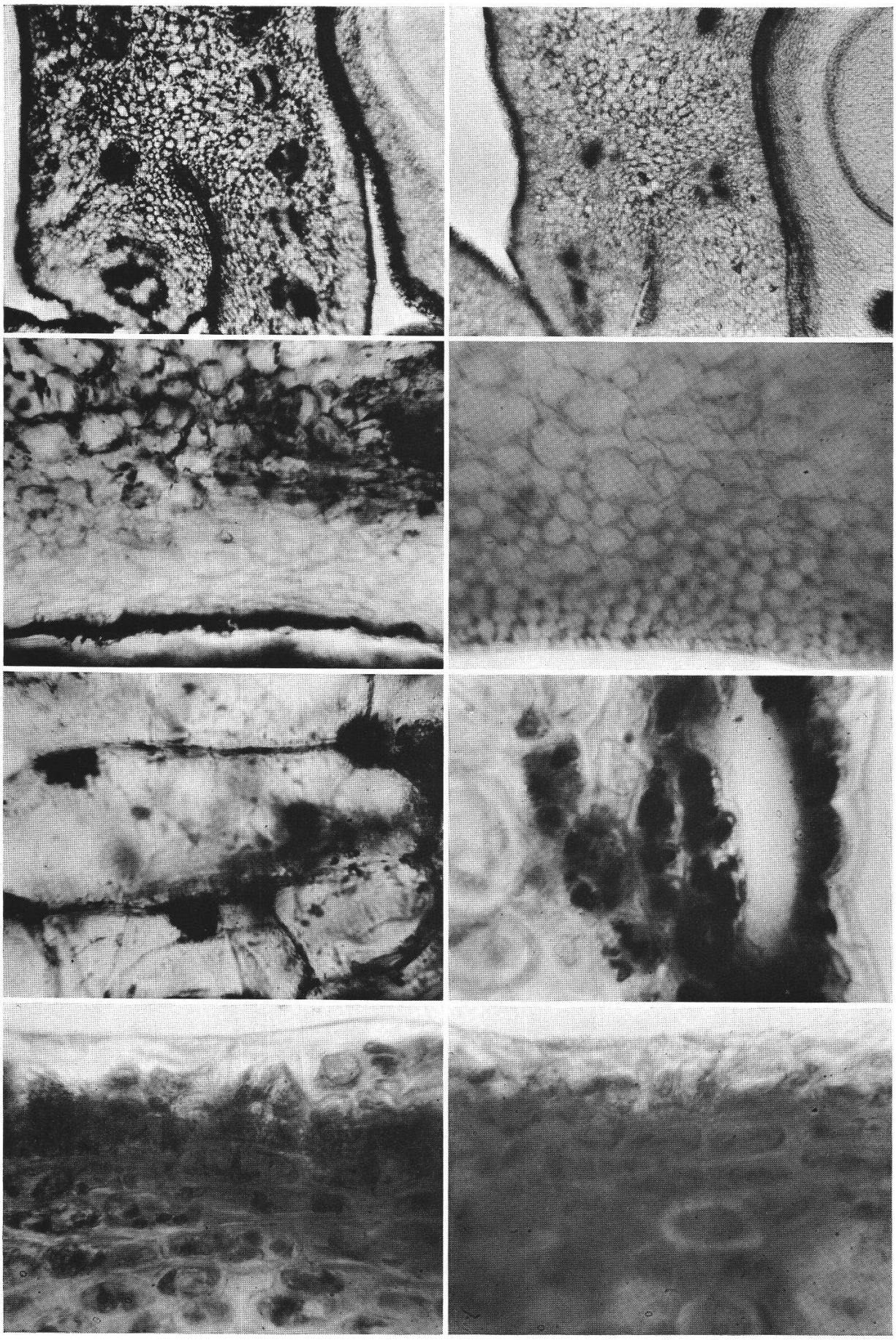
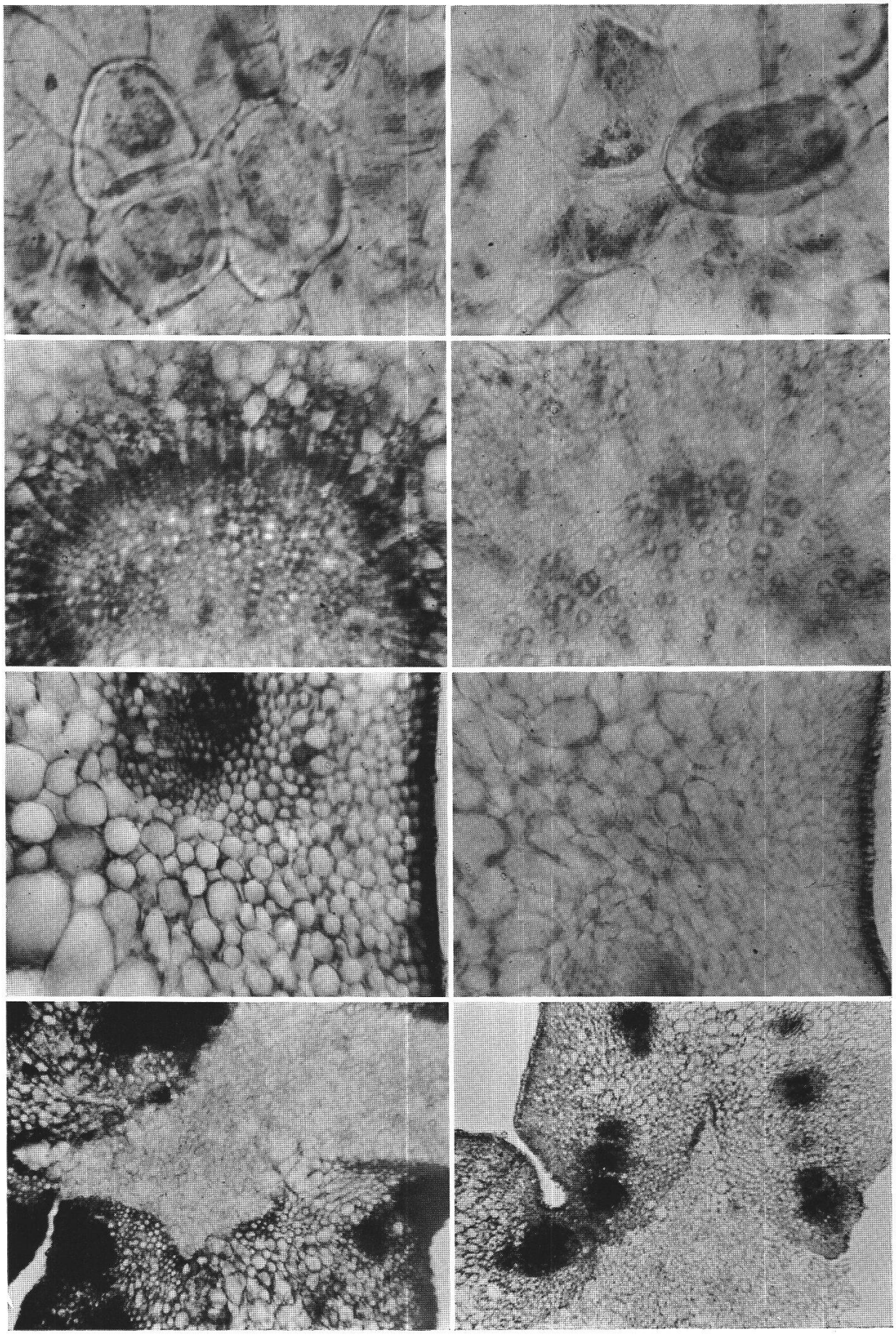
Tafel VI



Tafel VII



Tafel VIII



Tafel IX