

Über das submikroskopische Geschehen bei der Kutinisierung pflanzlicher Zellwände

Von

A. FREY-WYSSLING und K. MÜHLETHALER

Institut für Allgemeine Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

(Mit 6 Abbildungen im Text)

Die Zellwände der höheren Pflanzen, die mit Luft in Berührung kommen, werden durch einen submikroskopischen (Abb. 6) oder mikroskopischen (Abb. 3) wasserabweisenden Film abgedeckt, der als Kutikula bezeichnet wird. Dadurch entsteht eine Unstetigkeit im Dampfdruckgefälle zwischen dem wässrigen Zellinhalt und der ungesättigten Aussenluft, das bei Abwesenheit einer solchen Sperre zu einer raschen Austrocknung der Zellen führen müsste. Bei Xerophyten wird dieser Transpirationsschutz häufig durch eine zusätzliche Kutinisierung der äusseren Zellwandschichten verstärkt. Während die Kutikula aus aufgelagertem Kutin besteht (Adkruste), entstehen die Kutikularschichten durch Einlagerung von Kutin in eine bereits gebildete Zellwand (Inkruste).

Das Kutin enthält vollkommen unlösliche hochpolymere Verbindungen, die in der Regel von Wachsen begleitet sind, welche mit organischen Lösungsmitteln leicht aus der Kutikula und den Kutikularschichten entfernt werden können. Durch Verseifung wird das Kutin in Oxyfettsäuren zerlegt. Im Gegensatz zu den Bausteinen der Wachse, den Fettsäuren und Wachsalkoholen mit je einer chemisch reaktionsfähigen Gruppe, besitzen die Spaltprodukte des Kutins zwei bis mehrere aktive Stellen, nämlich je eine bis drei alkoholische OH-Gruppen und je eine bis zwei COOH-Säuregruppen. Während bei den Wachsen das Molekülwachstum durch die Veresterung eines Fettsäuremoleküls mit einem Wachsalkoholmolekül abgeschlossen ist, erfolgt bei der Kutinbildung durch die Verknüpfung der Oxyfettsäuremoleküle an mehreren Veresterungsstellen eine dreidimensionale Netzpolymerisation (vgl. 1). Das Wachstum des entstehenden Makromoleküls ist theoretisch unbeschränkt, so dass es unmöglich ist, den Polymerisationsgrad des Kutins zu messen oder auch nur zu schätzen. Eine kleine Anzahl der OH- und COOH-Gruppen der Oxyfettsäuren wird bei der Polymerisation nicht erfasst und bleibt daher frei, weshalb sich das Kutin nicht so extrem lipophil verhält wie die Wachse. Es ist schwach quellbar und gestattet so einen gewissen Wasserdurchtritt (kutikulare Transpiration); ferner zeigt es schwach saure anionische Eigenschaften (Färbbarkeit mit basischen Farbstoffen, bevorzugte Kationen-Permeabilität). Im übrigen verhält sich das Kutin chemisch sehr inert. Es widersteht oxydierenden Mazerationsmitteln und verwest im Boden im Gegensatz zu allen anderen Zellwandstoffen nicht, da es keine Mikro-

organismen gibt, die über Kutin-abbauende Fermente verfügen. Auch gelingt die Verseifung des Kutins nur mit starken heissen Alkalien, wobei meist ein unverseifbarer Rest zurückbleibt. Die Bindung der Monomeren in den Makromolekülen des Kutins erfolgt daher vermutlich nicht nur über Esterbrücken, sondern es muss bei der Polymerisation ausserdem noch ein anderer Verknüpfungsmodus auftreten. Da nach CHIBNALL und PIPER (2) ungesättigte Fettsäuren die Vorläufer der Oxyfettsäuren und auch der gesättigten Alkohole und Fettsäuren der Wachse sind, darf man solche ungesättigte Verbindungen, wie zum Beispiel Ölsäure, als die ursprünglichen Monomeren bei der Kutin-Polymerisation annehmen. Es sind dann zusätzlich zu den Esterbindungen kovalente C-C-Bindungen und Atherbrücken zwischen benachbarten Molekülen wie bei der Oxydationspolymerisation von Lacken möglich. Tatsächlich hat das frisch erstarrte Kutin hinsichtlich Glanz, Firniseigenschaften und Bildungsweise im Kontakt mit Luftsauerstoff grosse Ähnlichkeit mit dem Film eines «trocknenden» Öles; denn man kann feststellen, wie das Kutin von den sich in Entwicklung befindenden Blättern als plastische Masse ausgeschwitzt wird und dann auf der Blattoberfläche zur unlöslichen Kutikula erstarrt. Die Ausschüttung erfolgt manchmal in so auffälliger Weise, dass ZIEGENSPECK (3) von einem Ergusswachstum spricht.

Die Frage ist nun, wie dieses Prokutin durch die wachsende Zellwand, welche sich nach den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie im Kontakt mit der Plasmaoberfläche durch kontinuierliche Anlagerung submikroskopischer Wandlamellen entwickelt, nach aussen gelangt. Denn die Kutinisierung erfolgt nicht in unmittelbarer Berührung mit dem lebenden Protoplasma, sondern auf oder in den äussersten Zellwandschichten, die durch mehrere Mikron dicke Wandlagen von der Plasmaoberfläche getrennt sind. Man kann auch feststellen, dass die Kutikula und die Kutikularschichten während der Blattentfaltung trotz ihrer Trennung vom belebten Zell-Leibe in die Dicke wachsen. Da das Prokutin zweifellos ein Produkt des Zellstoffwechsels ist, muss es in irgendeiner Form nach aussen befördert werden.

LEE und PRIESTLEY (4) erklärten die Wanderung als Diffusion von Salzen der Fettsäuren, das heisst also von Seifen. Andere Histologen (5) suchten nach Kapillaren, Kanälchen oder Poren, durch welche das Prokutin ausgeschwitzt werden könnte. Es ist indessen bis heute noch nicht geglückt, im Elektronenmikroskop solche Ektodesmen in der Aussenwand der sich kutinisierenden Epidermen nachzuweisen. Dagegen ist es BOLLIGER (6) gelungen, in der Epidermisaussenwand von *Philodendron*-Blattanlagen vor der Kutinisierung submikroskopische Lipoidtröpfchen nachzuweisen.

Bei verschiedenen anderen Objekten kann dieser Befund bestätigt werden. Abb. 1-3 zeigen die Ontogenese der Kutikula des sukkulenten Blattes von *Echeveria secunda*. Das ausgewachsene Blatt (Abb. 3) weist eine fast 4μ starke Epidermisaussenwand auf, die von einer $\frac{1}{4} \mu$ dicken Kutikula bedeckt ist. Bei der gewählten Fixierung mit KMnO_4 zeigt das Kutin, offenbar zufolge der Kationenadsorption, eine starke Elektronenstreuung (schwarz), während die übrige Zellwand durchsichtig erscheint. Wie aus dem Mazerationsbild (Abb. 2) ersicht-

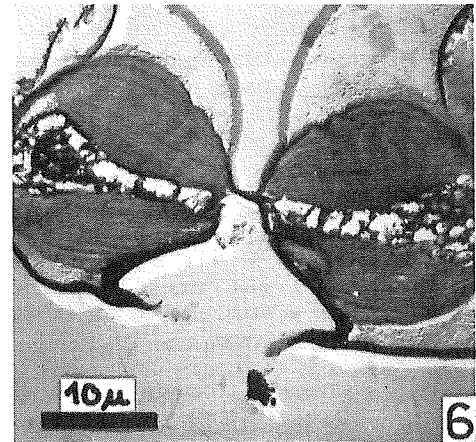
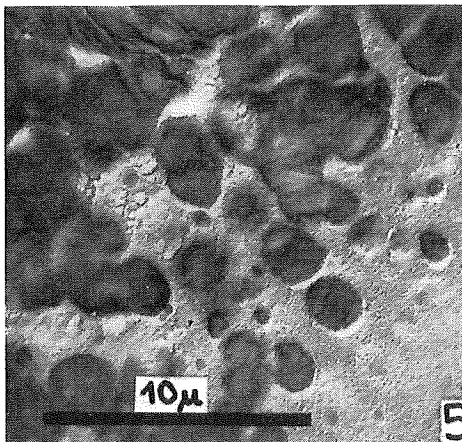
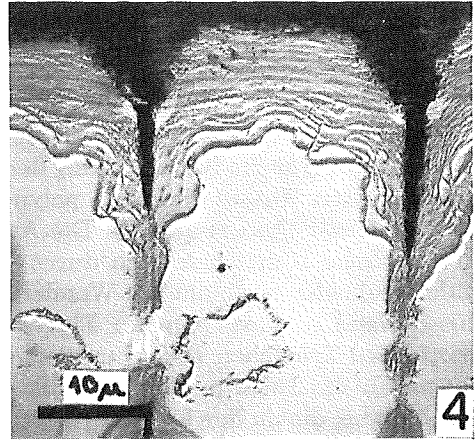
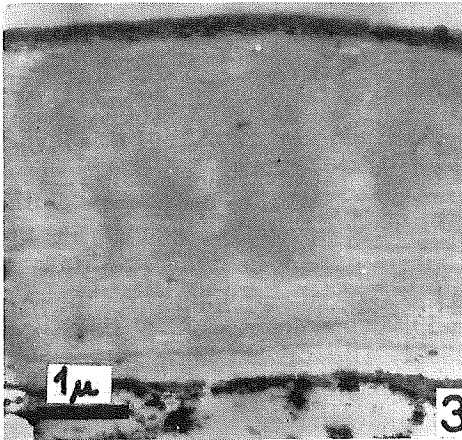
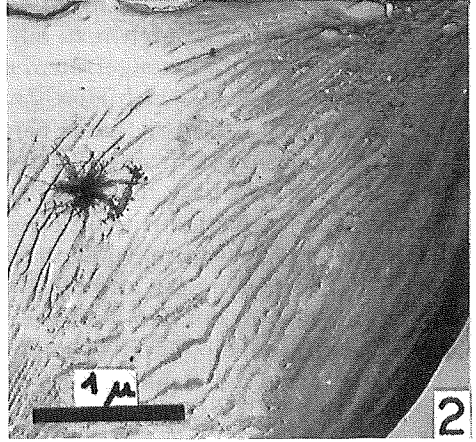
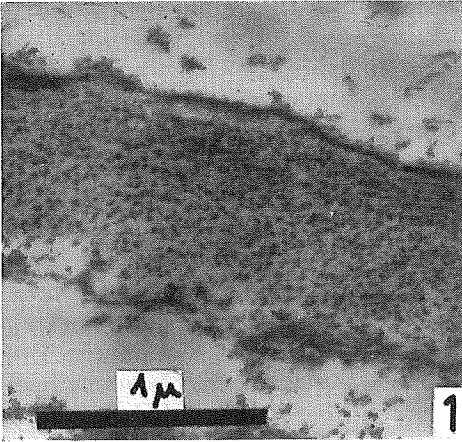
lich, besteht die Aussenwand aus zahlreichen submikroskopischen Zelluloselamellen, die in eine stark quellbare, durch die Mazeration entfernte Matrix von Pektin und Hemizellulosen eingebettet sind. In der Blattanlage, zu einer Zeit, wo die Epidermisaussenwand erst 1μ dick ist, erscheint nun die gesamte Wandung mit submikroskopischen Lipoidtröpfchen von etwa 200 \AA Durchmesser durchsetzt, die im Laufe der weiteren Entwicklung nach aussen abgeschoben werden. Die Wanderung solcher Kolloidteilchen durch die hydrophile Zellwand liegt im Bereiche der Möglichkeit, wenn sie aus polaren Molekülen mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Pol bestehen, wie dies bei den Fettsäuren der Fall ist, so dass sie Tröpfchen mit einer hydrophilen Aussenfläche bilden können. Es steht also der Anschauung nichts im Wege, dass das Prokutin als ungesättigte Fettsäuren oder als deren Seifen durch die Epidermisaussenwand nach aussen wandert. Nur diffundieren diese nicht als Einzelmoleküle, sondern in Form von Kolloidtröpfchen mit einer hydrophilen Oberfläche.

Schwieriger ist zu verstehen, wie bei der Ausbildung von Kutikularschichten, zum Beispiel in der *Clivia*-Epidermis (7), das Prokutin in den äusseren Wandpartien, der sogenannten «Kutinschicht», zurückgehalten wird, während sich die innere sogenannte Zelluloseschicht später von diesen Tröpfchen völlig befreit. Auf Abb. 4 ist ersichtlich, wie gegen Ende des Kutinisierungsprozesses nur noch der innere Rand der kutikularisierten Schicht mit Tröpfchen besetzt ist; ferner kann man sich des Eindrucks nicht erwehren, dass ein Teil des Prokutins den äusseren Schichten durch die Mittelschicht zwischen zwei benachbarten Zellen zufliesst, wodurch die bekannten Zwickelverankerungen der Kutikularschicht zwischen den Epidermiszellen zustande kommen.

Manchmal nehmen die Lipoidtropfen mikroskopische Grössen an. Dann bleiben sie im Substrat der nichtkutinisierten Zellwandschichten gefangen und können nicht mehr zu einer mikroskopisch homogenen Masse zusammenfliessen. Ein solches Bild zeigt Abb. 5, das vom inneren Rande der mächtigen Kutikular-

(Die Vergrösserung der Elektronenmikrogramme ist aus der Länge des eingezeichneten Maßstabes von 1 bzw. 10μ ersichtlich.)

- Abb. 1 Blattepidermis von *Echeveria secunda*. In Entwicklung begriffene Epidermisaussenwand mit submikroskopischen Tröpfchen aus Prokutin (Durchmesser $\sim 200 \text{ \AA}$).
- Abb. 2 Wie Abbildung 1. Epidermisaussenwand mazeriert. Kutikula 2μ dick; Wand fein lamelliert.
- Abb. 3 Wie Abbildung 1. Epidermisaussenwand ausgewachsen.
- Abb. 4 Blattepidermis von *Clivia nobilis*. Zelluloseschicht lamelliert, Kutikularschicht schwarz. An der Grenze der beiden Schichten Prokutin-Tröpfchen.
- Abb. 5 Stammepidermis von *Euphorbia echinus*. Kutinmassen im Gebiet zwischen Zellulose- und Kutikularschicht in Form mikroskopischer Tropfen (Durchmesser $\sim 2 \mu$).
- Abb. 6 Spaltöffnung von *Passiflora edulis*. Submikroskopische Kutikula der an die Atemhöhle stossenden Zellwände. Diese ist auf weite Strecken abgerissen und als Band umgekippt (Schnittdicke $0,3 \mu$).



schicht der kaktiformen *Euphorbia echinus* stammt. Hier sind die submikroskopischen Prokutin-Tröpfchen zu mikroskopischen Schollen und Tropfen von 2μ Durchmesser zusammengetreten, die ein Übergangsbereich zwischen Kutikular- und Zelluloseschicht bilden. Zweifellos entstehen die von FRITZ (3) beschriebenen Kutinzysten zwischen benachbarten Zellen auf ähnliche Weise.

Die festgestellte zentrifugale Wanderung des Prokutins erlaubt, die Morphogenese der Kutikula trotz ihrer Trennung vom lebenden Plasma durch die ansehnliche Epidermisaussenwand zu begreifen. Die Auskleidung der Atemhöhle mit einem submikroskopischen Kutinfilm (8) dürfte auf gleiche Weise zustandekommen (Abb. 6). Weniger leicht verständlich ist die Gestaltung der ausgeprägten Kutikularleisten um den Vorhof der Spaltöffnungen. Trotzdem sie angelegt werden, bevor die mächtigen, submikroskopisch lamellierten sekundären Verdickungsschichten der Schliesszellen zur Ausbildung gelangen, bleibt es rätselhaft, wie sie durch Fernwirkung so weit über den Vorhof vorgeschoben werden (Abb. 6).

Zusammenfassung

Während der Ontogenese der Blätter wird das Material für die Bildung der Kutikula und für die Kutinisierung der Kutikularschicht als halbflüssige Masse ausgeschwitzt. Dieses Prokutin polymerisiert in situ zum unlöslichen Kutin (Oxydations-Polymerisation?). Die Ausscheidung erfolgt weder durch submikroskopische Kanälchen noch durch Diffusion amikroskopischer Mikromoleküle. Vielmehr geschieht die Wanderung des Prokutins durch die Epidermisaussenwand in Form von im Elektronenmikroskop darstellbaren submikroskopischen Tröpfchen (Durchmesser $\sim 200 \text{ \AA}$). Diese Beobachtung bildet eine Stütze für die Theorie, dass das Prokutin aus ungesättigten oder Oxy-Fettsäuren bestehe, die an der Luft polymerisieren und erstarren. Der polare Charakter solcher Moleküle erlaubt ihnen, lipoide Tröpfchen mit einer hydrophilen Oberfläche zu bilden, die es diesen Kolloidteilchen ermöglicht, durch die locker gebaute wasserreiche Epidermisaussenwand zu wandern. Die Ausscheidung der Pflanzenwaxe dürfte nach dem gleichen Modus erfolgen.

Literaturverzeichnis

- (1) FREY-WYSSLING, A. (1959): Die pflanzliche Zellwand. Springer, Berlin.
- (2) CHIBNALL, A. C. and PIPER, S. H. (1934): Melting points and long crystal spacings of the higher primary alcohols and n-fatty acids. *Biochem. J.*, 28, p. 2215.
- (3) ZIEGENSPECK, H. (1928): Über das Ergusswachstum des Cutins bei Aloë-Arten. *Bot. Arch.*, 21, S. 1.
FRITZ, F. (1935): Über die Kutikula von Aloë- und Gasteria-Arten. *Jb. wiss. Bot.*, 81, S. 718.
- (4) LEE, B. and PRIESTLEY, J. H. ((1924): The plant cuticle. I. Its structure, distribution and function. *Ann. Bot. Lond.*, 38, p. 525.
PRIESTLEY, J. H. (1943): The cuticle in Angiosperms. *Bot. Rev.*, 9, p. 593.

- (5) LAMBERTZ, P. (1954): Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermisaussenwänden. *Planta*, 44, S. 147.
SCHUMACHER, W. (1957): Über Ektodesmen und Plasmodesmen. *Ber. dtsch. bot. Ges.*, 70, S. 335.
- (6) BOLLIGER, R. (1959): Entwicklung und Struktur der Epidermisaussenwand bei einigen Angiospermen. Diss. Eidg. Techn. Hochschule Zürich.
- (7) FREY, A. (1925): Die submikroskopische Struktur der Zellmembranen. *Jb. wiss. Bot.*, 65, S. 195.
- (8) HUBER, B., KINDER, E., OBERMÜLLER, E., und ZIEGENSPECK, H. (1956): Spaltöffnungs-Dünnschnitte im Elektronenmikroskop. *Protoplasma*, 46, S. 380.