

*Strukturelle und topochemische Untersuchungen
zu Wundreaktion und Kallusbildung
von Pappel*

(Populus tremula L. X Populus tremuloides Michx., Salicaceae)



Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. D. ECKSTEIN
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Frau Professor Dr. K. CUFAR
Tag der Disputation: 02. Juni 2006

Hamburg, den 19. Mai 2006



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Strukturelle und topochemische
Untersuchungen zu Wundreaktion und
Kallusbildung von Pappel

(*Populus tremula* L. X *Populus tremuloides* Michx., Salicaceae)

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Claus Frankenstein
aus Pinneberg

Hamburg 2006

1. Einleitung	
1.1 Wissensstand	1
1.2 Ziele der Arbeit	3
2. Untersuchungsmaterial und -methoden	
2.1 Untersuchungsmaterial	
2.1.1 PFLANZEN.....	5
2.1.2 KLIMADATEN	6
2.2 Untersuchungsmethoden	
2.2.1 VERSUCHSANLAGE 2000 UND PROBENNAHME 2001	6
2.2.2 VERSUCHSANLAGE 2002 UND PROBENNAHME 2002-2004	8
2.2.3 PRÄPARATIVE METHODEN	11
2.2.3.1 LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	12
2.2.3.2 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	13
2.2.3.3 UV-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	14
3. Ergebnisse	
3.1 Versuchsserie 2000/2001	16
3.1.1 IDENTIFIZIERUNG DES REAKTIVIERUNGSZEITPUNKTES DES VON EINER VERLETZUNG UNBEEINFLUSSTEN KAMBIUMS	16
3.1.2 MAKROSKOPISCHE UND MIKROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DER GEWEBEENTWICKLUNG AUF DER WUNDOBERFLÄCHE	21
3.2 Versuchsserie 2002-2004	29
3.2.1 IDENTIFIZIERUNG DER AN DER GEWEBEREGENERATION BETEILIG- TEN ZELLARTEN	29
3.2.1.1 BESTIMMUNG DER AN DER KALLUSBILDUNG BETEILIG- TEN GEWEBE	29
3.2.1.2 BESTIMMUNG DER AN DER KAMBIUMREGENERATION BE- TEILIGTEN ZELLARTEN	32
3.2.2 MIKROSKOPISCHE UND UV-SPEKTROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DES VON DEM WUNDKAMBIUM GEBILDETEN WUNDXYLEMS	41
3.2.2.1 STRUKTURELLE BESCHREIBUNG DES WUNDXYLMS DER VEGETATIONSPERIODEN 2002-2004	41
3.2.2.2 UV-SPEKTROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DES UNMODI- FIZIERTEN KONTROLLGEWEBES	45
3.2.2.3 UV-SPEKTROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DES WUND- XYLEMS DER VEGETATIONSPERIODEN 2002 UND 2003.....	48
3.2.2.4 UV-SPEKTROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DES WUND- XYLEMS DER VEGETATIONSPERIODE 2004	53

3.2.3 MIKROSKOPISCHE UND UV-SPEKTROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DER DURCH EINE VERLETZUNG INDUZIERTEN VERÄNDERUNGEN INNERHALB DES ZUM VERLETZUNGSZEITPUNKT DIFFERENZIERENDEN XYLEMS	55
---	----

4. Diskussion und Schlussfolgerungen

4.1 Kann durch eine Verletzung während der Vegetationsruhe Zellteilungsaktivität induziert oder zu Beginn der Vegetationsperiode eine frühere Reaktivierung der Zellteilung ausgelöst werden?	67
4.2 Welche Gewebe sind an der Regeneration eines Wundkambiums und in der Folge an der Bildung eines Überwallungswulstes beteiligt?	71
4.3 Wie unterscheidet sich das von diesem Wundkambium gebildete Gewebe feinstrukturell und lignintopochemisch von dem von einer Verletzung unbeeinflussten Gewebe?.....	75
4.4 Welchen Einfluss haben Stammverletzungen auf die zum Verletzungszeitpunkt differenzierenden Zellen des Xylems der Pappel?	79

5. Zusammenfassung

6. Gesamtverzeichnis der verwendeten Literatur

7. Verzeichnis der wissenschaftlichen Beiträge

7.1 Verzeichnis der im Rahmen der Promotion angefertigten Originalveröffentlichungen in Zeitschriften mit Review-Verfahren und Erläuterungen zu den eigenen Anteilen an den Arbeiten.....	95
7.2 Verzeichnis der im Rahmen der Promotion angefertigten Originalveröffentlichungen in Zeitschriften ohne Review-Verfahren.....	96
7.3 Posterbeiträge (mit Abstracts).....	97
7.4 Vorträge (mit Abstracts).....	99

8. Anhang 1

8.1 Klimadaten und Phänologische Entwicklung während der Versuchsserie 2000 - 2001	102
--	-----

8.2 Darstellung und Diskussion des Einflusses akzessorischer Inhaltsstoffe auf die Bestimmung der Ligninverteilung durch UV-mikrospektrophotometrische Untersuchungen.....	105
--	-----

9. Anhang 2

Originalveröffentlichungen in Zeitschriften mit Review-Verfahren.....	109
---	-----

1. Einleitung

Bäume haben im Laufe der Evolution komplexe Abwehrmechanismen entwickelt, um auf die in ihrem Lebenszyklus auf sie wirkenden Umwelteinflüsse reagieren zu können. Neben natürlichen Ursachen für mechanische Verletzungen, wie z.B. Windbruch, Blitzschlag oder Fraßschäden, haben anthropogene Schäden, wie z.B. Rucke- und Anfahrtschäden beständig an Bedeutung gewonnen. Die erstaunliche Fähigkeit der Bäume, die Schäden einer Verletzung einzuschränken und dadurch die Funktionsfähigkeit weiträumig aufrecht zu erhalten, war bereits im 18. und 19. Jahrhundert Objekt wissenschaftlichen Interesses (Du Monceau, 1764/65; Hartig, 1844; De Vries 1876). Trotz dieses frühen Interesses und zahlreicher jüngerer Arbeiten, die sich mit diesem Themenkomplex beschäftigt haben (z.B. Warren Wilson and Warren Wilson, 1961; Shigo und Marx, 1977; Shigo, 1984; Schmitt und Liese, 1992 a, b; Liese und Dujesiefken, 1996; Fink, 1999; Pearce, 2000), konnten insbesondere auf zellulärer Ebene einige grundlegende Aspekte der Wundreaktionen nicht vollständig geklärt werden.

1.1 Wissensstand

Wundreaktionen von Bäumen können nach unterschiedlichen Kriterien unterteilt werden. Eine erste Unterteilung kann in Abhängigkeit von der Verletzungstiefe und damit der betroffenen Gewebe vorgenommen werden. Eine weitere Unterteilung in passive und aktive Reaktionsmechanismen ist möglich (Schmitt und Liese, 1997; Pearce, 2000). Passiver Widerstand gegenüber der Ausbreitung von z.B. Luftembolien oder Schadorganismen ist durch die vorhandenen Holzstrukturen wie Holzstrahlen oder Zellwände bereits zum Zeitpunkt der Verwundung gegeben. Als aktiver Widerstand werden die Wundreaktionen in parenchymatischen Zellen bezeichnet, die erst durch eine Verletzung induziert werden und von physiologischen Vorgängen abhängig sind, wie z.B. das Synthetisieren akzessorischer Bestandteile, die Suberinisierung von Zellwänden und der gezielte Gefäßverschluss durch Plugs oder Thyllen sowie die Entwicklung eines Wundkallus (z.B. Schmitt und Liese, 1992 b, 1995; Dujesiefken und Liese, 1995; Schmitt und Liese, 1997; Pearce, 2000; Grünwald et al., 2002a). Durch ihre Abhängigkeit von physiologisch aktiven Zellen sind diese Mechanismen von der physiologischen Potenz und diese ihrerseits von der artspezifischen Reaktionskapazität, der Vitalität des Baumes und den jahreszeitlichen Gegebenheiten wie z.B der Temperatur abhängig (z.B. Ladefoged, 1952; Aloni, 1991, 2004; Dujesiefken et al., 1991; Schmitt und Liese, 1992 a; Schmitt et al., 2000; Dujesiefken et al., 2005). Verletzungen, die nicht über das Rindengewebe hinausgehen, rufen unspezifische Wundreaktionen der lebenden Zellen des sekundären Phloems hervor (Mullick, 1977). Neben der Einlagerung von phenolischen Inhaltsstoffen in wundnahes Gewebe ist

besonders die Bildung der „ligno-suberinierten Schicht“ für die Wundreaktionen des Phloems kennzeichnend; auf diese Schicht nach innen folgend bildet sich ein nekrophylaktisches Wundperiderm, das den Wundbereich vom intakten Gewebe abschottet und seitlich den Anschluss an das von der Verletzung unbeeinträchtigte Periderm herstellt (Zasche, 1960; Mullick, 1977; Biggs et al., 1984; Biggs, 1984, 1985, 1987; Trockenbrodt und Liese, 1991; Trockenbrodt, 1994; Oven et al., 1999, 2000).

Wunden, die so tief in das Gewebe reichen, dass sie im Kambium Wundreaktionen hervorrufen, führen häufig zur Bildung von Kallusgewebe aus überwiegend ungeordneten und großlumigen Parenchymzellen (z.B. Liese und Dujesiefken, 1989; Fink, 1999; Grünwald et al., 2002a). Hierbei können zwei Kallustypen unterschieden werden, der Seitenkallus, der sich regelhaft an den lateralen, aber bisweilen auch an horizontalen Wundrändern entwickelt (z.B. Zasche, 1960; Doley und Leyton, 1970; Neely, 1988; Götze et al., 1989; Fink, 1999), und der Flächenkallus, der sich als Sonderform bei kleinflächigen Wunden oder ausgewählten Wundbehandlungen größerer Wunden, die einen ausreichenden Schutz vor Austrocknung der freigelegten Gewebe gewährleisten, bildet (z.B. Sharples und Gunnery, 1933; Warren Wilson und Warren Wilson, 1961; Noel, 1968, 1970; Chudnoff, 1971; Wood 1980; Fischer, 1981; Warren Wilson und Grange, 1984; Novitskaja, 1998; Stobbe, 2001; Stobbe et al., 2002 a). Von den in der Praxis bekannten Wundbehandlungsmethoden, wie z.B. der Verwendung von streichbarer „künstlicher Rinde“ oder dem Einsatz von Lanolin als Trägersubstanz für Wachstumshormone wie z.B. Gibberelin oder Auxin als Wundverschlussmittel (Shear, 1936; Höstermann, 1937; Jakes und Hexnerová, 1939; McQuilkin, 1950; Doley und Leyton, 1970; Shortle und Shigo, 1978; Dujesiefken und Schmitz-Felten, 1995 a, b; Stobbe 2002 a), unterstützt vornehmlich die Abdeckung der Wundfläche größerer Stammverletzungen mit einer Folie die Bildung eines Flächenkallus (Shortle und Shigo, 1978; Zhengli und Keming, 1988; McDougall und Blanchette, 1996; Stobbe, 2001; Stobbe et al., 2002 b).

Das von einer Verletzung beeinflusste Kambium sowie das regenerierte Wundkambium bilden modifiziertes Phloem und Xylem. Dieses Wundxylem (Wundholz) enthält zunächst vermehrt Parenchymzellen, dazu weniger, unregelmäßig geformte und kürzere Gefäße und Fasern. Solche wundinduzierten anatomischen Veränderungen werden mit zunehmender Entfernung von der Wunde schwächer, bis sich die Strukturen wieder normalisiert haben (z.B. Sharon, 1973; Bauch et al., 1980; Rademacher et al., 1984; Warren Wilson und Grange, 1984; Warren Wilson und Warren Wilson, 1984; Lowerts et al., 1986; Kowol, 1987; Liese und Dujesiefken, 1996; Fink, 1999; Grünwald et al., 2002 a).

Tiefere Verletzungen, die bis an oder in das Xylem reichen, induzieren in diesen Wundreaktionen, die mit Hilfe des CODIT-Modells (**C**OMPARTMENTALIZATION **O**F **D**ECAY/**D**AMAGE **I**N **T**REES) schematisch dargestellt werden können (Shigo und Marx, 1977; Shigo, 1984; Liese und Dujesiefken, 1996). Diesem grundlegenden Modell wurden

durch vertiefende Studien zahlreiche Details wundinduzierter Reaktionsmechanismen hinzugefügt (z.B. Mulhern et al., 1979; Kowol, 1987; Liese und Dujesiefken, 1989; Schmitt und Liese, 1992 a, b, 1995, 1997; Fink, 1999; Grünwald et al., 2002 a; Dujesiefken und Liese, 2006). Grundlegender Mechanismus zur Abschottung des von einer Verletzung unbeeinflussten Gewebes gegenüber betroffenen Gewebebereichen ist die Bildung von Grenzschichten, deren Charakteristika die Synthese von phenolischen Inhaltsstoffen und der Gefäßverschluss sind (z.B. Schmitt und Liese, 1990).

Die Untersuchungen über die Reaktion von Pappeln auf mechanische Verletzungen konzentrierten sich vornehmlich auf Wundreaktionen der Rinde. Kaufert (1937) fand nach mechanischen Verletzungen meist einen Befall durch parasitäre Pilze und sah hierin den Auslöser für die Entwicklung einer furchigen, mit zahlreichen Peridermen durchsetzten Rinde, im Gegensatz zu der eigentlich glatten Rinde der untersuchten *Populus tremuloides* Michx. Die Regeneration von Rindengewebe nach dessen Entfernen mit einem Bohrer bis in die Zone des Kambiums hinein wurde an Hybridpappeln (ex *Populus deltoides*) untersucht (Soe, 1959), während Trockenbrodt und Liese (1991) die von ihnen an *Populus tremula* L.-Stämmen gesetzten Wunden auf die Rinde begrenzten und detailliert die Entstehung einer ligno-suberinierten Zone und eines neuen Periderms beschrieben. Brown und Sax (1962) untersuchten die Auswirkung von Druck auf die Regeneration von Gewebe auf Rindenzungen, die sie zuvor im nicht differenzierten Xylem vom Stamm abgelöst hatten und sie dann vor Austrocknung schützten. Einen weiteren Schwerpunkt der Untersuchungen bildete die Pathogen-Wirtsbeziehung zwischen *Populus* spp. und den Pilzen *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. (Bloomberg und Farris, 1963) und *Hypoxylon mammatum* nach Rindenverletzungen (Bucciarelli et al., 1999) sowie die Bedeutung von Insektenwunden für den Befall durch *Hypoxylon mammatum* (Anderson et al., 1979).

Dem CODIT-Modell zuzuordnende Wundreaktionen in Abhängigkeit der Gewebeeigenschaften des zum Zeitpunkt der Verletzung vorhandenen Xylems, wie z.B. der Gefäßanzahl und der Gefäßgröße, wurden bisher vornehmlich auf lichtmikroskopischer Ebene untersucht (Shigo und Marx, 1977; Eckstein et al., 1979). Dies gilt auch für die anatomischen Untersuchungen über die Wundreaktion von *Populus x euramericana* (Dode) Guinier durch Buntrock (1989). Shortle (1979) beschreibt für *Populus deltoides* Marsh. x *Populus trichocarpa* Hook. die höchste Konzentration von phenolischen Inhaltsstoffen im Grenzbereich vom verfärbten zum unverfärbten Xylem.

1.2 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit strukturellen, ultrastrukturellen und topochemischen Untersuchungen zur Wundreaktion von Pappelhybriden nach einer Stammverletzung bis an die differenzierten Zellen des Xylems. Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen richtete sich auf die parenchymatischen Zellen des Xylems und des Phloems sowie auf das Kambium. Es wurden sowohl innerhalb als auch außerhalb der Vegetationsperiode Wunden durch Freilegen des Holzkörpers gesetzt.

Die Arbeit hatte zwei wesentliche Teilziele:

1. Erweiterung der Information über die Regeneration von durch Stammverletzungen geschädigtem Gewebe bei Pappel. Vertiefend wurden die drei folgenden Fragestellungen bearbeitet:

a) Kann durch eine Verletzung während der Vegetationsruhe Zellteilungsaktivität induziert oder zu Beginn der Vegetationsperiode eine frühere Reaktivierung der Zellteilung ausgelöst werden?

b) Welche Gewebe sind an der Regeneration eines Wundkambiums und in der Folge der Bildung eines Überwallungswulstes beteiligt?

c) Wie unterscheidet sich das von diesem Wundkambium gebildete Gewebe feinstrukturell und lignin topochemisch von dem von einer Verletzung unbeeinflussten Gewebe?

2. Erweiterung der Information über den Einfluss von Stammverletzungen auf die zum Verletzungszeitpunkt differenzierenden Zellen des Xylems der Pappel.

2. Untersuchungsmaterial und -methoden

2.1.1 PFLANZEN

Die Zitterpappel, auch Aspe oder Espe genannt, gehört zur Familie der Weidengewächse (*Salicaceae*). Die Gattung *Populus* wird in zwei Sektionen unterteilt, von denen die Aspe der Sektion *Leuce* (Weißpappeln) zugeordnet wird. Diese Sektion ist nochmals in die Subsektionen *Trepidae* (Aspen) und *Albidae* (Weißpappeln) unterteilt. Als Vertreter der *Trepidae* sind *P. tremula* in Eurasien und *P. tremuloides* in Nordamerika heimisch. Sie sind raschwüchsige Lichtbaumarten mit nur geringen Ansprüchen an die Bodenqualität. Bevorzugt werden frische, mineralkräftige und tiefgründige Böden. Aspen erreichen Oberhöhen von 25-35 m und Stammdurchmesser in Brusthöhe von bis zu 1 m.

Das Holz der verschiedenen Pappelarten ist makroskopisch sowie mikroskopisch nur schwer zu unterscheiden. Ihr Splint- und Kernholz ist schmutzigweiß mit meist breiten, deutlich durch eine Spätholzzone begrenzten Jahrringen. Die Gefäße der Pappel sind zerstreut, einzeln, paarig und häufig auch in radialen Gruppen angeordnet. Zahl und Größe nehmen vom Früh- zum Spätholz allmählich ab. Die Anzahl der Gefäße schwankt zwischen 70–90 pro mm² im Querschnitt und kann bis zu 100 pro mm² erreichen. Die radialen Gefäßgruppen setzen sich meist aus 2-3, im Spätholz aus bis zu sieben Gefäßen zusammen. Ihr Durchmesser schwankt zwischen <50µm im Spätholz und 80-100µm im Frühholz. Die Gefäße zeigen einfache Durchbrechungen und bisweilen Thyllen. Das Grundgewebe setzt sich ausschließlich aus meist weitlumigen Librifasern und seltener Gefäßtracheiden zusammen. Die Fasern sind teilweise schwach radial, meist jedoch unregelmäßig angeordnet und markieren die Jahrringgrenze. Der Anteil der Fasern am gesamten Gewebe beträgt 59...68,5%. Das Parenchym der Pappeln ist spärlich apotracheal verteilt und auch als marginales, häufig unterbrochenes Band zu finden. Die Holzstrahlen sind fast ausschließlich einreihig und homogen. Ihre Höhe variiert dagegen stark von 3-5 Zellen bis zu 30 Zellen. Die Kantenzellen sind gegen die Gefäße auffällig grob getüpfelt (Food and Agricultural Organization of the United Nations, 1979).

Die für die Versuchsserien ausgewählten Pappeln befinden sich auf zwei Versuchsfeldern des Instituts für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft (BFH) im Osten von Hamburg (53°, 30' N; 10°, 12' O). Bei den Pappeln beider Versuchsserien handelt es sich um Hybride (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.). Die Bäume aus der Versuchsserie 2000 stammen aus Gewebekulturen und wurden als zweijährige Sämlinge im April 1985 ausgepflanzt. Die Pappelhybriden der Versuchsserie 2002 stammten nicht aus Gewebekulturen und waren zum Zeitpunkt der Verwundung ca. 25 Jahre alt. Weiterhin wurde eine 35 jährige

ge *Populus tremula* L. im Jahr 2003 zu ergänzenden Untersuchungen herangezogen. Dieser Baum befindet sich auf dem Gelände der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft (BFH).

2.1.2 KLIMADATEN

Während des Untersuchungszeitraumes 2000-2001 der ersten Versuchsserie wurden die Klimadaten vom 01. Dezember 2000 bis zum 27. Juni 2001 aufgezeichnet, um das Auftreten etwaiger Extrema in die Interpretation der Beobachtungen einbeziehen zu können.

Die Klimadaten wurden auf dem Gelände der BFH in Hamburg-Lohbrügge aufgezeichnet. Die Messstation befindet sich 25 m über NN und nicht weiter als 10 km von dem Versuchsstandort entfernt. Durch diese Nähe geben die Daten die standörtlichen Klimabedingungen mit ausreichender Präzision wieder. Es wurden pro Tag 120 Einzelmessungen der Niederschläge und Temperaturen auf ein Zehntel genau aufgezeichnet und zu Tagesniederschlagsmengen sowie Tagesmaximal-, Tagesminimal- und Tagesmittelwerten der Temperatur zusammengefasst (Anhang 1; S. 102-104; Tabelle 1, Diagramme 1-7).

2.2.1 VERSUCHSANLAGE 2000 UND PROBENNAHME 2001

Für die Untersuchung der Folgen einer Verletzung außerhalb der Vegetationsperiode auf Aspen, insbesondere die Überprüfung der Möglichkeit Zellteilungsaktivität außerhalb der Vegetationsperiode zu induzieren, wurden fünf Bäume mit je einer Wunde versehen.

In der Vegetationsruhe am 15. Dezember 2000 wurden 15 x 15 cm² große Stammwunden in einer Höhe von 50-150 cm durch das Entfernen der Rinde vom Stamm gesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Wunde direkter Besonnung ausgesetzt war, um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden. Zunächst wurde die Rinde mit einer Säge rund um die zu entfernende Fläche eingeschnitten und dann durch leichte Hammerschläge vom darunter liegenden Gewebe abgeschert. Es erfolgte eine sofortige Abdeckung der Wundfläche mit einer schwarzen PVC-Folie (Abb. 1). Die Folie wurde mit Metallklammern an der umgebenden Rinde straff gespannt angeheftet, um ein Austrocknen und damit eine starke Nekrose des freigelegten Gewebes zu vermeiden.

Die Trennung der Rinde vom Stamm erfolgte in unterschiedlichen Gewebeschichten, so dass es möglich wurde, die an einem Flächenkallus beteiligten Zellarten zu identifizieren. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, um eine Vergleichbarkeit mit Arbeiten zu erreichen, bei denen ähnlich vorgegangen wurde (z.B. Stobbe, 2001; Stobbe et al. 2002 b).

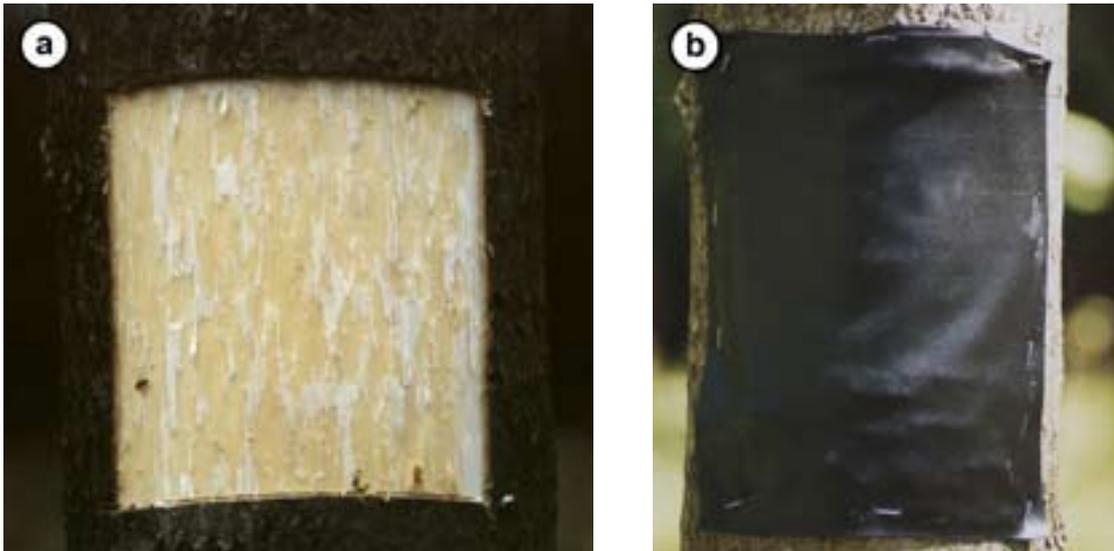


Abbildung 1: a) Pappelwunde (15 x 15 cm²); b) Wunde abgedeckt mit schwarzer Folie.

Die Entnahme des Probenmaterials für die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgte in regelmäßigen Abständen und an allen Individuen zum selben Zeitpunkt. Aus den Wunden wurden die Proben aus je zwei für den Zustand der gesamten Wundoberfläche repräsentativen Bereichen mit Hilfe eines Hammers und eines Stecheisens entnommen (Abb. 2).



Abbildung 2: a) Verletzung nach der Wundsetzung am 15.12.2000 und nach der Entnahme am 26.03.2001 (b).

Diese Proben mit einer mittleren Kantenlänge von 1,5 cm wurden anhand ihrer Färbung und Oberflächenstruktur ausgewählt. Es wurden bei jeder Probennahme von drei Bäumen je zwei Wundgewebeproben und eine Kontrolle aus einem unverletzten zusätzlichen Baum entnommen. Das Kontrollgewebe diente als Referenz für den Vergleich der von einer Verletzung beeinflussten und unbeeinflussten kambialen Zellteilungsaktivität. Im Zeitraum vom 03. April bis zum 04. Mai 2001 wurden ergänzende Entnahmen von Kontrollgewebe durchgeführt, um den Zeitpunkt zu bestimmen, an

dem das von einer Verletzung unbeeinflusste Kambium seine Zellteilungsaktivität aufnimmt (Tabelle 2). Dadurch können Veränderungen auf den Wundoberflächen den Perioden der Vegetationsruhe oder der Vegetationszeit zugeordnet werden. Neben der Untersuchung des Kambiums wurde die Entwicklung der Knospen zur Feststellung des Vegetationsbeginns visuell überprüft (Anhang 1; S.105).

Entnahmedatum	Wundgewebe/Kontrollentnahme	Kontrollentnahme (ergänzend)
15.12.2000	Wundsetzung	_____
26.01.2001	Probennahme 1	_____
26.02.2001	Probennahme 2	_____
26.03.2001	Probennahme 3	_____
03.04.2001	_____	Kontrollentnahme 1
10.04.2001	_____	Kontrollentnahme 2
20.04.2001	Probennahme 4	Kontrollentnahme 3
27.04.2001	_____	Kontrollentnahme 4
04.05.2001	_____	Kontrollentnahme 5
11.05.2001	Probennahme 5	_____
22.06.2001	Probennahme 6	_____

Tabelle 2: Daten der Probennahmen 2001

2.2.2 VERSUCHSANLAGE UND PROBENNAHME 2002-2003/2004

Für die Untersuchung der Folgen einer Verletzung innerhalb der Vegetationsperiode wurden vier Bäume mit jeweils acht Wunden versehen. Während der Vegetationszeit am 27. Mai 2002 wurden 5 x 10 cm² große Wunden spiralg um den Stamm angeordnet. Beginnend in einer Stammhöhe von ca. 30 cm waren die Entnahmestellen jeweils 15 cm vertikal voneinander entfernt, um so eine direkte Beeinflussung der Verletzungen untereinander zu vermeiden (Abb. 3a). Die Rindenfenster wurden mit einer Säge eingeschnitten, mit einem Stecheisen nachgearbeitet und dann vorsichtig durch Klopfen mit einem Hammer vom Stamm getrennt. Anschließend wurden die Wundränder mit einer Rasierklinge geglättet und sowohl das Kambium als auch das sich differenzierende Xylem von der Wundoberfläche abgeschabt, um Reaktionen auf der Wundoberfläche zu vermeiden, die Effekte auf die Entwicklung des lateralen Wundgewebes haben könnten.

Die Entnahme des Probenmaterials für die licht-, elektronenmikroskopischen und UV-spektroskopischen Untersuchungen erfolgte wöchentlich an den senkrechten Seitenrändern (Abb. 3b; Tabelle 3) an jeweils einer der acht Wunden pro Baum, um bei der geringen Größe der Wunden Artefakte durch Mehrfachentnahmen zu vermeiden. Es wurden also bei jeder Probennahme eine Wundgewebe- und eine Kontrollentnahme auf der der Wunde gegenüberliegenden Stammseite durchgeführt.

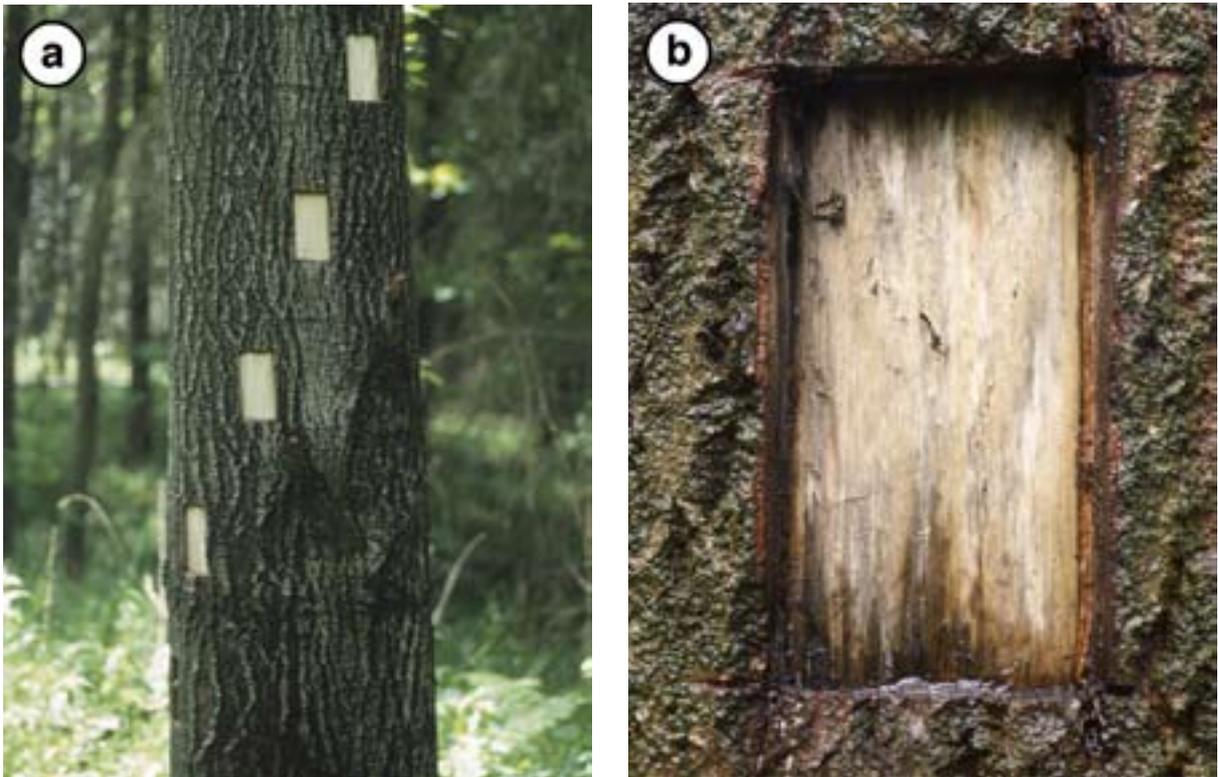


Abbildung 3: a) Spiralgummi um den Stamm angeordnete Wunden (5 x 10 cm²); b) Wunde mit sich entwickelndem seitlichen Wundgewebe.

Die mit einer Säge und einem Stecheisen aus dem seitlichen Wundgewebe und dem zum Verletzungszeitpunkt bereits vorhandenen Xylem entnommenen Proben (Abb. 4, 5) hatten eine ungefähre Größe von 5 x 3 x 1 cm³. Aus ihnen wurden anschließend die für die verschiedenen Untersuchungen verwendeten Gewebebereiche herauspräpariert.

Untersucht wurden auf struktureller Ebene das Xylem, das Wundxylem, das Kambium und das Phloem sowie das modifizierte Wundphloem. Zusätzlich wurden das Wundxylem und das Xylem, das zum Zeitpunkt der Verletzung nicht ausdifferenziert war, topochemisch untersucht (Abb. 6).



Abbildung 4: a) Zu entnehmendes Gewebe am Wundrand wurde in einem ersten Schritt von der angrenzende Rinde getrennt; b) Das eigentliche Probenmaterial wurde in einem zweiten Schritt mit Hilfe eines Stecheisens entnommen.

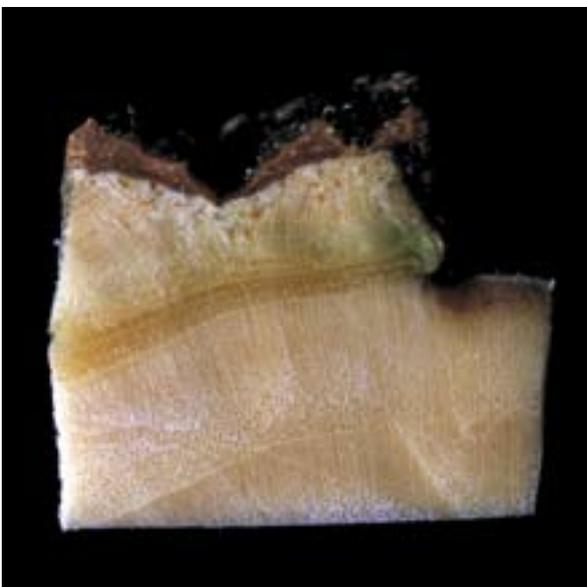


Abbildung 5: Oberfläche des seitlichen Wundgewebes, entnommen nach 5 Wochen Reaktionszeit.

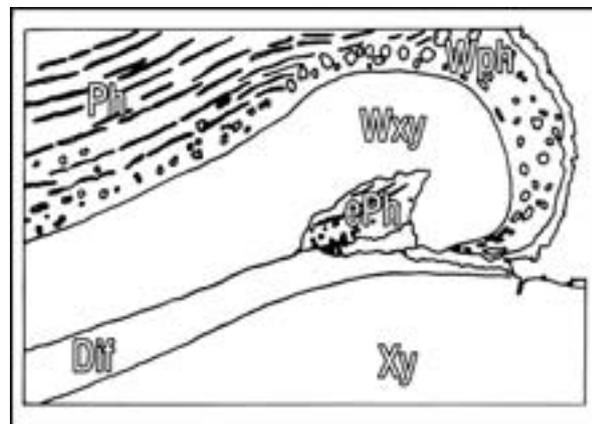


Abbildung 6: Schemazeichnung eines Wundkallus und der untersuchten Gewebezonen:

- Ph - Phloem
- Wph - modifiziertes Wundphloem
- ePh - im Wundxylem eingeschlossenes Phloem
- Wxy - Wundxylem
- Xy - Xylem
- Dif - zum Zeitpunkt der Verletzung differenzierendes Xylem

Entnahmedatum	Wundgewebe/Kontrollentnahme 2002
27.05.2002	Wundsetzung
03.06.2002	Probennahme 1
10.06.2002	Probennahme 2
17.06.2002	Probennahme 3
24.06.2002	Probennahme 4
01.07.2002	Probennahme 5
07.07.2002	Probennahme 6
22.07.2002	Probennahme 7
05.08.2002	Probennahme 8

Tabelle 3: Daten der Probennahmen 2002

Aus den am 24. Juni. und am 07. Juli 2002 bei den Kontrollentnahmen entstandenen Wunden (10 x 10 cm²) wurden für licht- und elektronenmikroskopische als auch UV-spektroskopische Untersuchungen ergänzendes Probenmaterial entnommen. Die Entnahmen erfolgten für die verschiedenen Fragestellungen am 03. April und am 10. Oktober 2003 sowie am 04. Juni 2004 aus den seitlichen Kalluswülsten.

Ergänzend wurden an einer *Populus tremula* L. am 23.06.03 vier Wunden gesetzt und diese in der oben beschriebenen Art und Weise nach 14 und 28 Tagen sowie nach 13 und 28 Wochen beprobt.

2.2.3 PRÄPARATIVE METHODEN

Für die strukturellen und topochemischen Untersuchungen zu Wundreaktionen und Kallusentwicklung von Pappel wurden lichtmikroskopische, transmissionselektronenmikroskopische und UV-spektroskopische Analysemethoden eingesetzt. Während die Lichtmikroskopie vor allem zur Aufklärung struktureller Veränderungen diene, konnten durch die Verwendung unterschiedlicher Kontrastierungsmethoden die transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen sowohl zur Darstellung ultrastruktureller Modifikationen des durch eine Verletzung beeinflussten Gewebes als auch zur Dokumentation veränderter Ligninkonzentrationen herangezogen werden. Die UV-Spektroskopie, deren Prinzip darauf basiert, dass Schnitte einer definierten Dicke sequentiell mit monochromatischem Licht in einem Wellenlängenbereich von 240-400 nm durchstrahlt und die Absorption innerhalb des Messbereiches analog mit

einem Dioden-Array-Detektor wellenlängenabhängig aufgezeichnet werden (Koch, 2003), wurde zur topochemischen Charakterisierung der Gewebe genutzt.

2.2.3.1 LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die Präparation des Probenmaterials für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Färbemethoden und Probengrößen auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt.

Die Fixierung (1 – 3 Tage) des gesamten Probenmaterials erfolgte mit gepuffertem Formol, einer wässrigen 3,7%igen Formaldehyd-, 0,64%igen di-Natriumhydrogenphosphat- und 0,4%igen Natriumdihydrogenphosphat-Lösung (Lille, 1954). Anschließend wurde ein Teil der Proben mit destilliertem Wasser gewaschen und in Polyethylenglycol 2000 (PEG 2000) eingebettet. Die Proben wurden zur Infiltration in eine 50%ige wässrige PEG-Lösung gegeben und dann in einem Wärmeschrank bei 60-70 °C für sieben Tage aufbewahrt. Während dieser Zeit verdunstete das Wasser, und die Objekte wurden mit PEG durchtränkt. Nachdem die Lösung auf ca. 1/5 des Ausgangsvolumens eingedickt war, wurden die Proben nun in spezielle Formen überführt und entsprechend der vorhergesehenen Schnittrichtung orientiert. Die Formen wurden mit flüssigem PEG aufgefüllt und dann zum Aushärten für 24 Stunden in einen Kühlschrank gegeben. Nach dem Entfernen der Formen wurden mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Fa. Reichert) oder eines Rotationsmikrotoms (Fa. Jung) 16 µm dicke Schnitte angefertigt. Vorteile dieser Methode sind die verkürzte Infiltrationszeit, die Möglichkeit, größere Proben (1 x 1 x 2 cm³) einzubetten und andere Färbungen zu verwenden als es bei einer Einbettung mit Glykolmethacrylat möglich ist. Allerdings ist zur Infiltration eine Temperatur von 60–70 °C notwendig, so dass ein Kollabieren des nicht lignifizierten Gewebes auftreten kann.

Die so angefertigten Präparate wurden für den qualitativen Nachweis von verholzten Zellwänden mit einer Safranin-Astrablau-Lösung gefärbt und auf Objektträgern positioniert (Gerlach, 1977). Safranin färbt lignifizierte Zellwände rot, während Astrablau die unlignifizierten, überwiegend aus Cellulose bestehenden Zellwände blau färbt.

Für die UV- und Lichtmikroskopie verwendete kleinere Proben (4 x 4 x 4 mm³) wurden nach der Fixierung in einer achsstufigen, aufsteigenden Propanolreihe entwässert. Nach einer 10 minütigen Präinfiltrationsstufe in einem 50%igen Propanol–Technovit 7100-Gemisch (Glykolmethacrylatmonomer + Aktivator 1; Kulzer) im Vakuum wurden sie dann zur Infiltration für zwei Wochen in reines „Technovit 7100“ überführt. Die Einbettung erfolgte in „Technovit 7100“ unter Zusatz eines Härters (Aktivator 2) in Teflonformen. Nach der Polymerisation des Technovits bei Raumtemperatur wurden mit Technovit 3040 (Kulzer) Probenträger (Histoblocks) auf den in den Teflonformen befindlichen Proben befestigt.

Die so aufbereiteten Proben wurden dann nach Entfernen der Teflonformen auf einem Rotationsmikrotom (Fa. Jung) geschnitten. Die Quer- und Radialschnitte mit einer Dicke von 6 µm wurden auf einer Wasseroberfläche gestreckt, auf einen Objektträger aufgezogen und bei ca. 55 °C auf einer Wärmebank getrocknet.

Die Schnitte wurden wie folgt gefärbt:

Eine unspezifische allgemeine Färbung der Schnitte für die Lichtmikroskopie erfolgte für zwei Stunden in einer 20%igen Giemsa-Lösung. Hierbei färben sich Zellkerne blau, nekrotisches Gewebe dunkelblau, lignifizierte Zellwände hellblau, unlignifizierte Zellwände violett und Tannine grünblau. Nach dem Waschen der Schnitte mit einer 0,05%igen Essigsäurelösung und 96%igem-100%igem Ethanol wurden diese für ca. 12 Minuten in Xylol gegeben und dann mit Eukitt als Dauerpräparate eingedeckelt.

Für die UV-Mikroskopie wurden ungefärbte Schnitte und Schnitte, die für eine Stunde in einer 0,05%igen wässrigen Toluidinblau-Lösung gefärbt wurden, verwendet (Gerlach, 1977). Lignin und Suberin zeigen eine deutliche Autofluoreszenz unter UV-Anregung. Toluidinblau unterdrückt die Autofluoreszenz des Lignins, wodurch die des Suberins deutlicher wird. Als Übersichtsfärbung für die Durchlichtmikroskopie färbt Toluidinblau verholzte und verkorkte Zellwände wie auch Zellkerne grünblau, die Cellulose unverholzter Zellwände dagegen purpurrot bis violett. Mit Hilfe so aufbereiteter Schnitte konnten orientierende Beobachtungen zur Ligninverteilung auf lichtmikroskopischer Ebene durchgeführt und gezielt Bereiche für die Elektronenmikroskopie und UV-spektroskopischen Untersuchungen ausgewählt werden.

Bei der Färbung mit einer Neutralrotlösung erscheinen die lignifizierten Zellwände unter Blauanregung (380-390 nm) grünlich, Mittellamellen gelbgrün bis gelb und die Farbe der Zellwände variiert von gelb bis orange. Die Färbung erfolgte mit einer Lösung aus 0,1g Neutralrot in 1000ml Aqua dest. (Gerlach, 1977).

Die Mikroskopie sowie die Fotografie der Schnitte erfolgte mit einem Olympus BH-2 Durchlichtmikroskop und einer Olympus OM-2S Kamera.

2.2.3.2 ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Zur Fixierung wurden die Proben mit einer Größe von 5 x 1,5-5 mm² Querschnittsfläche für bis zu drei Tage in ein Gemisch aus Paraform- und Glutaraldehyd (Karnovsky, 1965) gegeben. Anschließend wurden sie dreimal mit 0,1 molarem Cacodylatpuffer gewaschen, bevor ein Teil der Proben für 12-18 Stunden in einer wässrigen 2%igen Osmiumtetroxidlösung (OsO₄) nachfixiert bzw. vorkontrastiert wurde. Vor der Entwässerung in einer aufsteigenden Acetonreihe wurden die Proben erneut in 0,1 molarem Cacodylatpuffer gewaschen, über sechs aufsteigende Propylenoxid-Epoxidharz-Infiltrationsstufen in reines Epoxidharz überführt (Spurr, 1969) und anschließend bei 70°C in einem Wärmeschrank auspolymerisiert.

Eine zweite Probengruppe, die für eine Kontrastierung mit Kaliumpermanganat (KMnO_4) (Donaldson, 1992; Schmitt und Melcher, 2004) verwendet wurde, wurde ohne Vorkontrastierung mit Osmiumtetroxid eingebettet.

Zur genauen Festlegung der Bereiche, aus denen die Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) entnommen werden sollten, wurden für eine Vorauswahl Semidünnschnitte ($1\mu\text{m}$ dick) mit einem Ultramikrotom (ULTRACUT E; Fa. Reichert-Jung) angefertigt. Nach dem Mikrotomieren wurden die Schnitte auf Glasobjektträger überführt und bei ca. $70\text{ }^\circ\text{C}$ auf einer Wärmeplatte gestreckt und angetrocknet. Anschließend wurde eine Schnellfärbung mit einer 1%igen Borax-Toluidinblau-Lösung gemischt im Verhältnis 4:1 mit einer 1%igen Pyronin G-Lösung durchgeführt, mit nachfolgendem Waschen in Aqua bi-dist. und Ethanol. Die Querschnitte wurden skizziert und Bereiche für die TEM-Untersuchung festgelegt.

Aus den ausgewählten Bereichen wurden dann Ultradünnschnitte hergestellt. Um diese 90-100 nm dicken Schnitte faltenfrei zu halten, wurden sie in dem Auffangtrog des Diamantmessers mit einem Gemisch aus Chloroform und Xylol (1:1) gestreckt. Anschließend wurden die Schnitte auf mit Formvar befilmte oder unbefilmte Kupfernetze (Maschenweite 100, 300) aufgezogen. Schnitte der mit Osmiumtetroxidlösung (OsO_4) vorkontrastierten Proben wurden mit Bleicitrat und Uranylacetat nachkontrastiert, während die Schnitte von Proben ohne Vorkontrastierung mit Kaliumpermanganat (KMnO_4) kontrastiert wurden.

Die Proben wurden mit einem Elektronenmikroskop „CM 12 TEM“ (Fa. Philips) bei einer Beschleunigungsspannung von 60, 80 oder 100kV untersucht.

2.2.3.3 UV-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Für die UV-spektroskopischen Untersuchungen wurden Proben aus unterschiedlichen Bereichen des Wundgewebes, aus dem zum Verletzungszeitpunkt bereits vorhandenes Gewebe sowie aus Kontrollgewebe entnommen. Die Proben ($5 \times 1,5\text{-}5 \times 5\text{ mm}^3$) wurden nach der Fixierung ohne Osmiumtetroxid direkt in Spurr's Epoxidharz eingebettet (Spurr, 1969). Anschließend wurden von ausgewählten Bereichen Semidünnschnitte ($3\text{ mm} \times 1,5\text{ mm} \times 1\mu\text{m}$) mit einem Ultramikrotom (ULTRACUT E; Reichert-Jung) angefertigt. Diese Schnitte wurden dann auf Quarz-Objektträger überführt und unter zur Hilfenahme eines nicht UV-Licht absorbierenden Immersionsöles mit einem Quarz-Deckglas abgedeckt. Die Messungen erfolgten an einem Ultra-Mikro-Spektrophotometer (UMSP 80, Zeiss), ausgerüstet mit einer Flächenscanningeinrichtung und Ultrafluor-Objektiven (Vergrößerung: 32:1, 100:1).

Mit diesem Gerät können Flächenscanningaufnahmen bei einer definierten Wellenlänge (280 nm) erstellt werden. Hierbei wird eine über ihre Eckpunkte definierte Fläche mit Hilfe des Scan-Programms APAMOS (Automatic-Photometric-Analysis of Microscopic Objects by Scanning, Fa. Zeiss) bei einer Ortsauflösung von $0,25\mu\text{m}^2$ gescannt

und die detektierbaren 4096 Graustufen in 14 Grundfarben konvertiert, welche dann die gemessenen Absorptionsintensitäten repräsentieren (Koch und Kleist, 2001; Koch und Grünwald, 2004).

Punktmessungen mit einer geometrischen Auflösung von 1 μm können in einem variablen Wellenlängenbereich von 240-700 nm in 2 nm-Schritten durchgeführt werden, wobei jede Punktmessung ein Mittelwert aus automatisch 50x wiederholten Einzelmessungen ist. Diese Messungen dienen der semiquantitativen Bestimmung des Ligningehalts und der Charakterisierung der Ligninzusammensetzung in den Zellwandschichten. Bei den Untersuchungen wurde der Wellenlängenbereich auf 240-400 nm beschränkt, da das Absorptionsmaximum von Laubholzlignin bei einer Wellenlänge von 270-280 nm liegt.

3. Forschungsergebnisse

3.1 Versuchsserie 2000/2001

Zur Bestimmung der an einer Flächenkallusbildung beteiligten Gewebe bzw. Zellarten und der Zuordnung der Zellteilungsaktivität zu den Perioden der Vegetationsruhe bzw. der Vegetationsperiode wurde zunächst der Reaktivierungszeitpunkt des von den Verletzungen unbeeinflussten Kambiums bestimmt und anschließend mit der Entwicklung auf der Wundoberfläche verglichen.

3.1.1 IDENTIFIZIERUNG DES REAKTIVIERUNGSZEITPUNKTES DES VON DER VERLETZUNG UNBEEINFLUSSTEN KAMBIUMS

Im Dezember 2000 war das Ruhe-Kambium der untersuchten Pappeln durchschnittlich fünf bis acht Fusiforminitialzellen und zwei bis vier Strahlinitialzellen breit. Die dünnwandigen Fusiforminitialen, deren Radialwände stärker ausgeprägt waren als ihre Tangentialwände, erschienen radial abgeflacht und im Querschnitt quaderförmig. Die radiale Ausdehnung der Kambiuminitialen nahm ausgehend vom ausdifferenzierten Xylem der vorhergehenden Vegetationsperiode in Richtung des Phloems leicht zu. Die Zellen einiger Zellreihen innerhalb des Kambiums zeigten eine deutlich geringere tangentiale Ausdehnung, verglichen mit den übrigen Fusiforminitialen (Abb. 7).

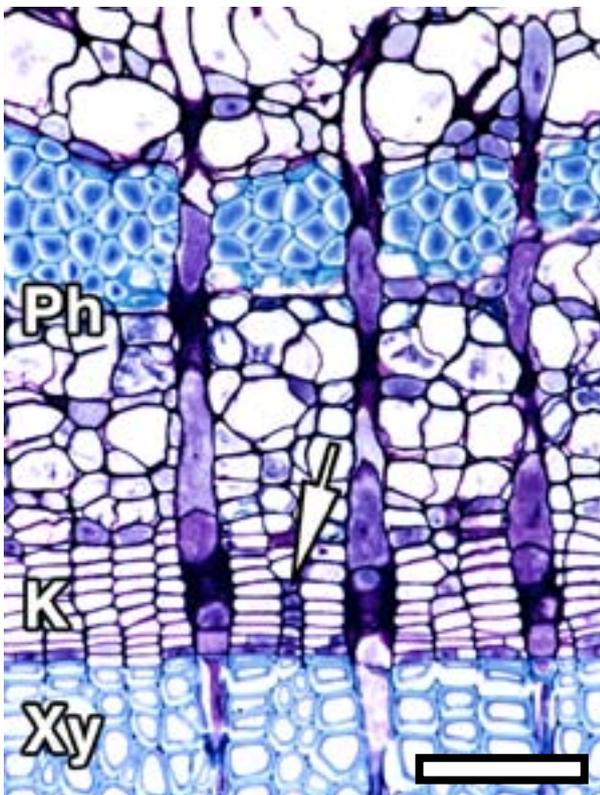


Abbildung 7: Phloem (Ph), Xylem (Xy) und Kambium (K) während der Vegetationsruhe im Dezember 2000; Kambiuminitialen mit z.T. stark reduzierter tangentialer Ausdehnung (Pfeil); Querschnitt; LM-Aufnahme, Giemsafärbung; Maßstab = 100 μ m

Das Cytoplasma aller Kambiuminitialzellen zeigte außerhalb der Vegetationsperiode eine hohe Dichte, zahlreiche Lipidtröpfchen und viele kleine Vakuolen (Abb. 8a). Die Strahlinitiale und die xylemseitigen ein bis drei parenchymatischen Zellen zeichneten sich durch Cytoplasma noch höherer Dichte bei einer reduzierten Anzahl von Vakuolen aus. In diesen Zellen erschien die Zahl der Lipidtröpfchen nochmals erhöht, auch wurden vornehmlich in ihnen Stärkekörner gefunden (Abb. 8a, b). Die überwiegende Zahl der Vakuolen der Strahlinitiale und der inneren Zellreihen zeigte elektronendichte Inhalte (Abb. 8b). Im Cytoplasma waren fast ausschließlich freie Ribosomen und kaum Polysomen vorhanden, damit überwog das glatte endoplasmatische Reticulum (ER) gegenüber dem rauen ER. Das Plasmalemma verlief während der Kambiumruhe glatt in unmittelbarer Nähe der Zellwand und zeigte weder Einstülpungen noch die Verschmelzung mit Vesikeln, die auf Exocytosevorgänge hindeuten (Abb. 8c).

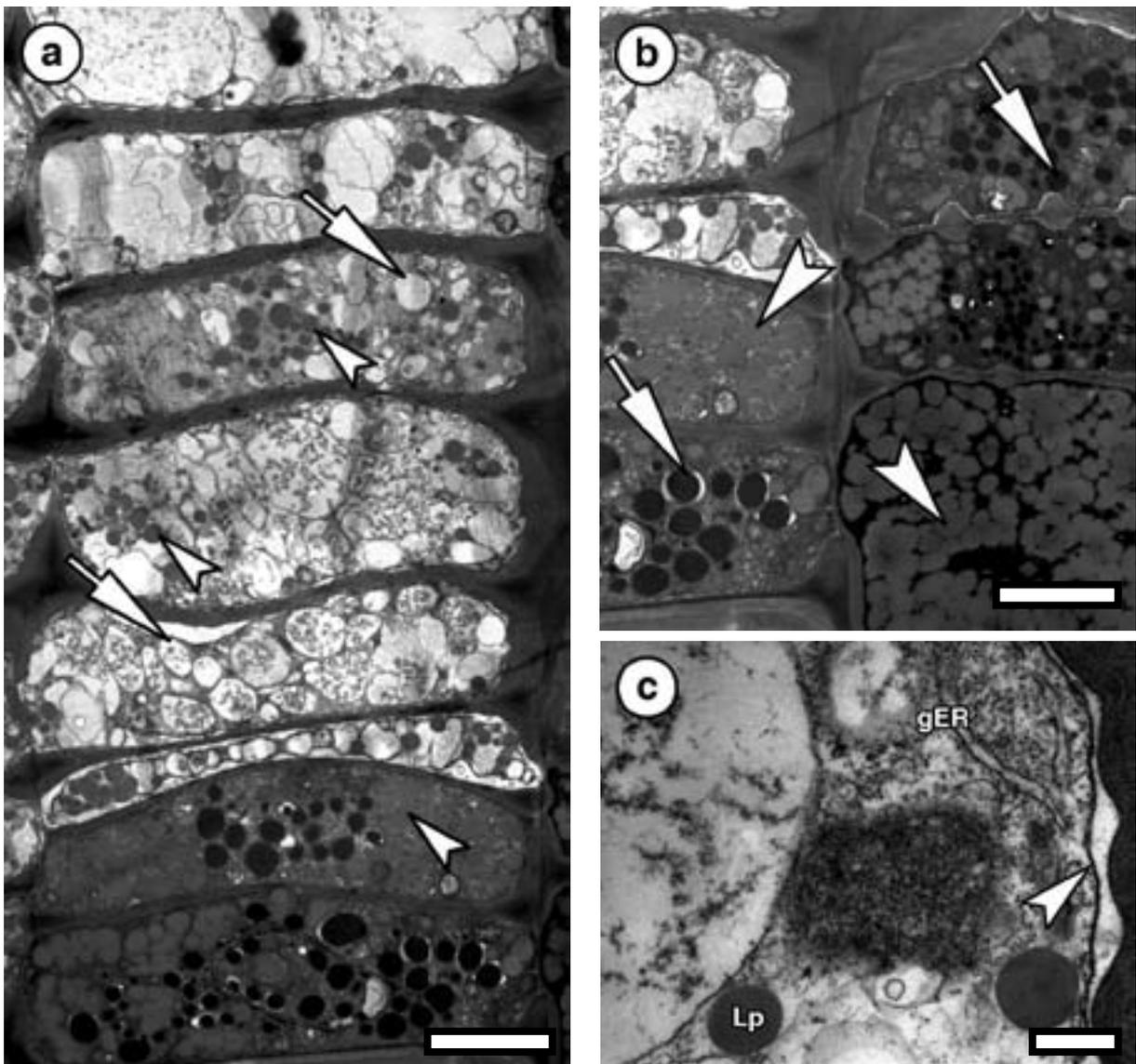


Abbildung 8a-c: Ruhe-Kambium; a) Kambiumzellen mit überwiegend kleinen Vakuolen (Pfeile), zahlreichen Lipidtröpfchen (Pfeilspitzen) und Plasma hoher Dichte; Maßstab = 2 μ m, b) Strahlinitiale und xylemseitige parenchymatische Zellen mit besonders dichtem Plasma, erhöhter Zahl Lipidtröpfchen (Pfeilspitzen) und weniger, mit elektronendichtem Material angefüllten Vakuolen (Pfeile); Maßstab = 2 μ m; c) Plasmalemma dem Zellwandverlauf folgend (Pfeilspitze), Lipidtröpfchen (Lp) und glattes ER (gER); Maßstab = 200 nm; Querschnitte; TEM-Aufnahmen, Osmiumkontrastierung

Hinsichtlich der Beurteilung der Zellaktivität auf transmissionselektronenmikroskopischer Ebene waren Plastiden und Mitochondrien nur von untergeordneter Aussagekraft, da sie strukturell keine deutlichen Unterschiede während der Vegetationsruhe gegenüber der Vegetationsperiode zeigten.

In diesem strukturellen Ruhezustand verweilte das Kambium bis in die ersten Tage des April 2001. Ab dem 10. April konnten lichtmikroskopisch erste Volumenerweiterungen einiger Kambiumzellen erkannt werden. Nachdem dies zunächst die phloemseitigen Zellen des Kambiums erkennen ließen, dehnten sich in den folgenden zehn Tagen vor allem die jungen, xylemnahen Fusiformzellen radial aus. In dieser Zone zeigten sich nun erste neu gebildete, deutlich dünnere Tangentialwände (Abb. 9). Zu diesem Zeitpunkt streckten sich die Strahlinitiale z.T. deutlich in radialer Richtung, ohne jedoch auf eine einsetzende Zellteilung hinzuweisen.

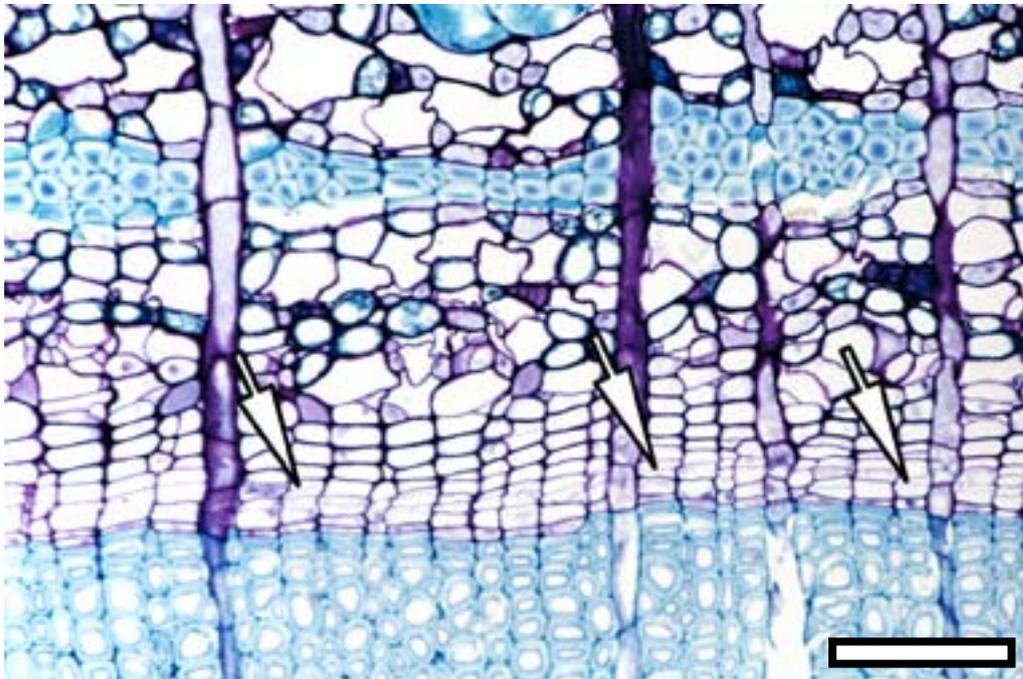


Abbildung 9: Aktives Kambium der Kontrollproben am 20. April; dünne, neu gebildete Zellwände sind in den xylemseitigen Fusiforminitialen sichtbar (Pfeile); Maßstab = 100 µm; Querschnitt; LM-Aufnahme, Giemsa-Färbung

Elektronenmikroskopisch zeigten sich am 20. April deutliche Unterschiede, lediglich die Anzahl der Lipidtröpfchen blieb unverändert. Jetzt waren die im Ruhekambium zahlreichen, mit dunklen Inhalten gefüllten Vakuolen nicht mehr vorhanden, dafür enthielten die Zellen wenige größere Vakuolen (Abb. 10a). Zudem schien das Cytoplasma eine geringere Dichte aufzuweisen. Ribosomen, angeordnet als freie Polysomen, oder membrangebundene, einzelne Ribo- und auch Polysomen, als Bestandteile des rauen ERs, waren nun häufig zu erkennen. Zahlreiche Dictyosomen zeigten viele Vesikel, die als Hinweis auf eine hohe Aktivität gedeutet werden (Abb. 10b). In diesen hoch aktiven Zellen waren im Gegensatz zu den Zellen des Ruhekambiums

keine das Lumen durchziehende Plasmastränge mehr vorhanden, und das Plasmalemma war durch einen wellenlinienförmigen Verlauf mit zahlreichen Einstülpungen gekennzeichnet. Als deutlichstes Merkmal für die vollständige Reaktivierung des Kambiums am 20. April waren aber die neu gebildeten Zellwände anzusehen (Abb. 10c).

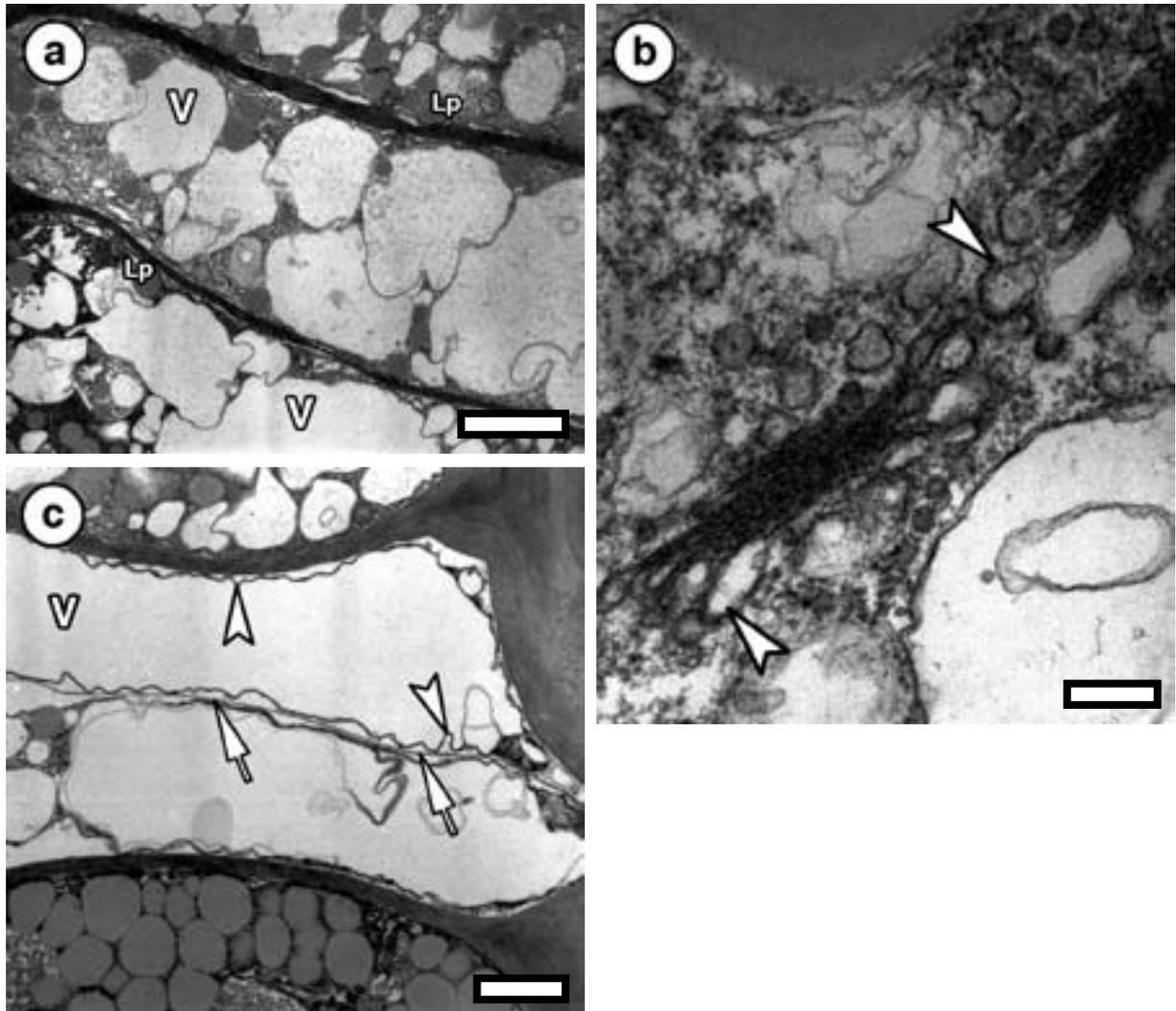


Abbildung 10a-c: Aktives Kambium der Kontrollproben am 20. April; a) kleine Vakuolen (V) fusionieren zu wenigen großen; Lipidtröpfchen (Lp); Maßstab = 2 μ m; b) aktive Dictyosomen geben Vesikel (Pfeilspitzen) an das Cytoplasma ab; Maßstab = 100 nm; c) Fusiforminitiale mit unruhig verlaufendem Plasmalemma mit zahlreichen Einstülpungen (Pfeilspitzen) und einer neu entstehenden Zellwand (Pfeile); Maßstab = 2 μ m; Querschnitte; TEM-Aufnahmen, Osmiumkontrastierung

Vier Wochen nach den ersten sichtbaren Reaktivierungsvorgängen waren alle Kambiuminitialen hochgradig zellteilungsaktiv. Während fast das gesamte Lumen von einer zentralen Vakuole ausgefüllt wurde, lag das Cytoplasma, in dem nur noch wenige Lipidtröpfchen vorhanden waren, als schmale Schicht den Zellwänden an (Abb. 11a). In den Bereichen, in denen neues Wandmaterial synthetisiert wurde, waren sowohl Plastiden und Mitochondrien als auch Dictyosomen, die Vesikel mit Wandmaterial abschürten, und vermehrt raues ER konzentriert (Abb. 11b). Ein weiteres Merkmal war das verringerte Vorkommen von Stärkekörnern in den Plastiden.

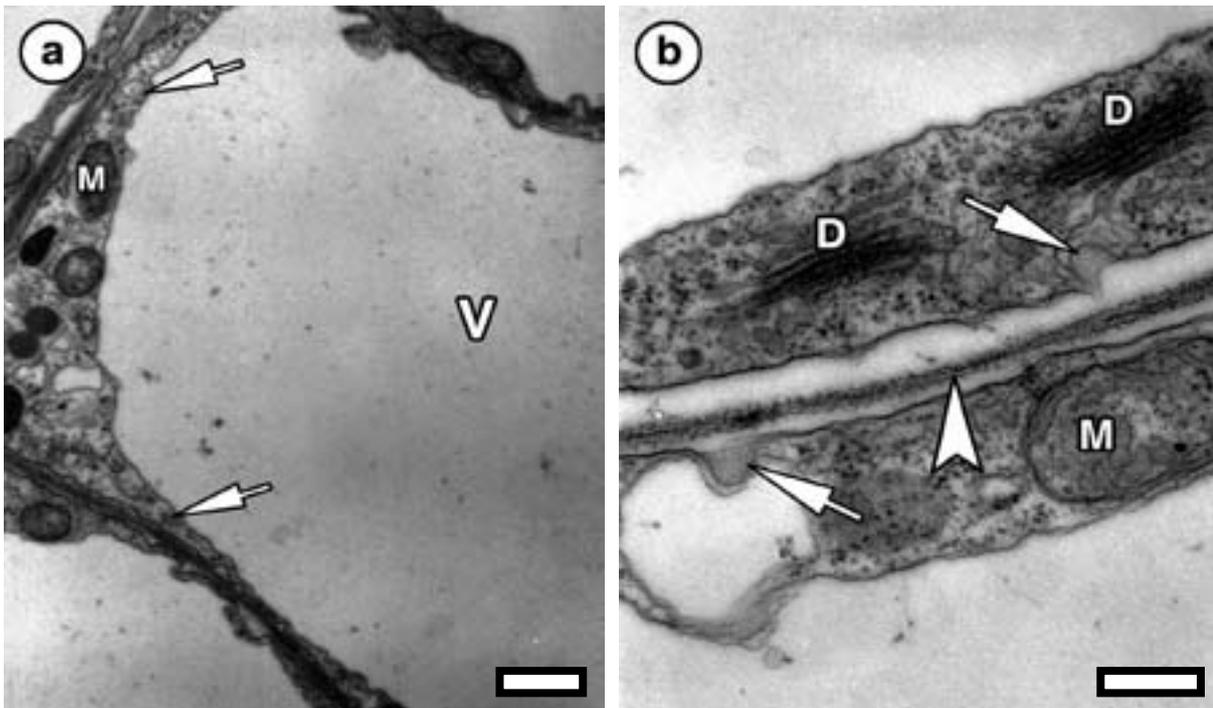


Abbildung 11a, b: Teilungsaktives Kambium im Mai; a) Kambiumzellen mit einer großen, zentralen Vakuole (V) und wandständigem Plasma (Pfeile); Mitochondrien (M); Maßstab = 900 nm; b) frühes Stadium der Zellwandbildung einer Tangentialwand (Pfeilspitze), Dictyosomen (D) und Mitochondrien (M) liegen in unmittelbarer Nähe; Vesikel fusionieren während der Exocytose mit dem Plasmalemma (Pfeile); Maßstab = 300 nm; Querschnitte; TEM-Aufnahmen, Osmiumkontrastierung

Das Kambium befand sich demnach im Zeitraum um den 10. April 2001 in einer Phase der fortgeschrittenen Reaktivierung und kann spätestens ab dem 20. April, also mit dem Auftreten erster neu gebildeter Zellwände, als aktives Kambium angesehen werden.

3.1.2 MAKROSKOPISCHE UND MIKROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DER GEWEBEENTWICKLUNG AUF DER WUNDOBERFLÄCHE

Während der Versuchsanlage konnte die Rinde nur schwer und größtenteils in Bruchstücken vom Stamm getrennt werden, wobei verschieden starke Phloemreste auf der Wundoberfläche verblieben. Diese helleren Bereiche zeigten an ihrer Oberfläche eine ungleichmäßige, eher faserige Struktur, während Zonen mit einer Trennung in tieferen Gewebeschichten des Phloems eine glatte, gelblich feuchte Oberfläche aufwiesen (Abb. 12a). Sechs Wochen nach der Wundsetzung hatten sich die Bereiche mit stärkeren Phloemresten dunkler verfärbt als die umliegenden Wundbereiche, die nun hell gelblich und trocken waren; Teile dieser abgestorbenen Gewebeschichten lösten sich von der Wundoberfläche ab (Abb. 12b). Während sich in den folgenden ca. acht Wochen die Verfärbung der Wundoberfläche intensivierte, war makroskopisch weder die Entwicklung eines Seiten- noch eines Flächenkallus zu erkennen (Abb. 12c).



Abbildung 12a-c: Wundoberflächen a) unmittelbar nach der Verletzung im Dezember 2000, mit z.T. starken Phloemresten auf der Wundoberfläche (Pfeile); b) sechs Wochen nach der Verletzung, dunkel bräunlich verfärbte Phloemreste auf einer sonst hellen Wundoberfläche; c) deutlich fortgeschrittene Verfärbungen 14 Wochen nach der Verletzung

Bis zur Probennahme 21 Wochen nach der Verletzung (11. Mai) degenerierte zusätzliches Gewebe an der Wundoberfläche und lag dieser nun fast vollflächig als gräuliche Schicht auf (Abb. 13a). Es hatte sich ein Seitenkallus entwickelt, der zunächst an den horizontalen Wundrändern stärker ausgeprägt war (Abb. 13b), in den folgenden sechs Wochen aber von dem sich an den vertikalen Wundrändern entwickelnden Wundkallus in seiner Entwicklung weit übertroffen wurde (Abb. 13c). In Teilbereichen wölbte sich die Wundoberfläche leicht vor, was auf Veränderungen unterhalb der oberen Ge-

webeschichten hindeutete. Bis zum Ende der Versuchsreihe hatte sich auf keiner der Wunden ein makroskopisch sichtbarer Flächenkallus entwickelt (Abb. 13d).

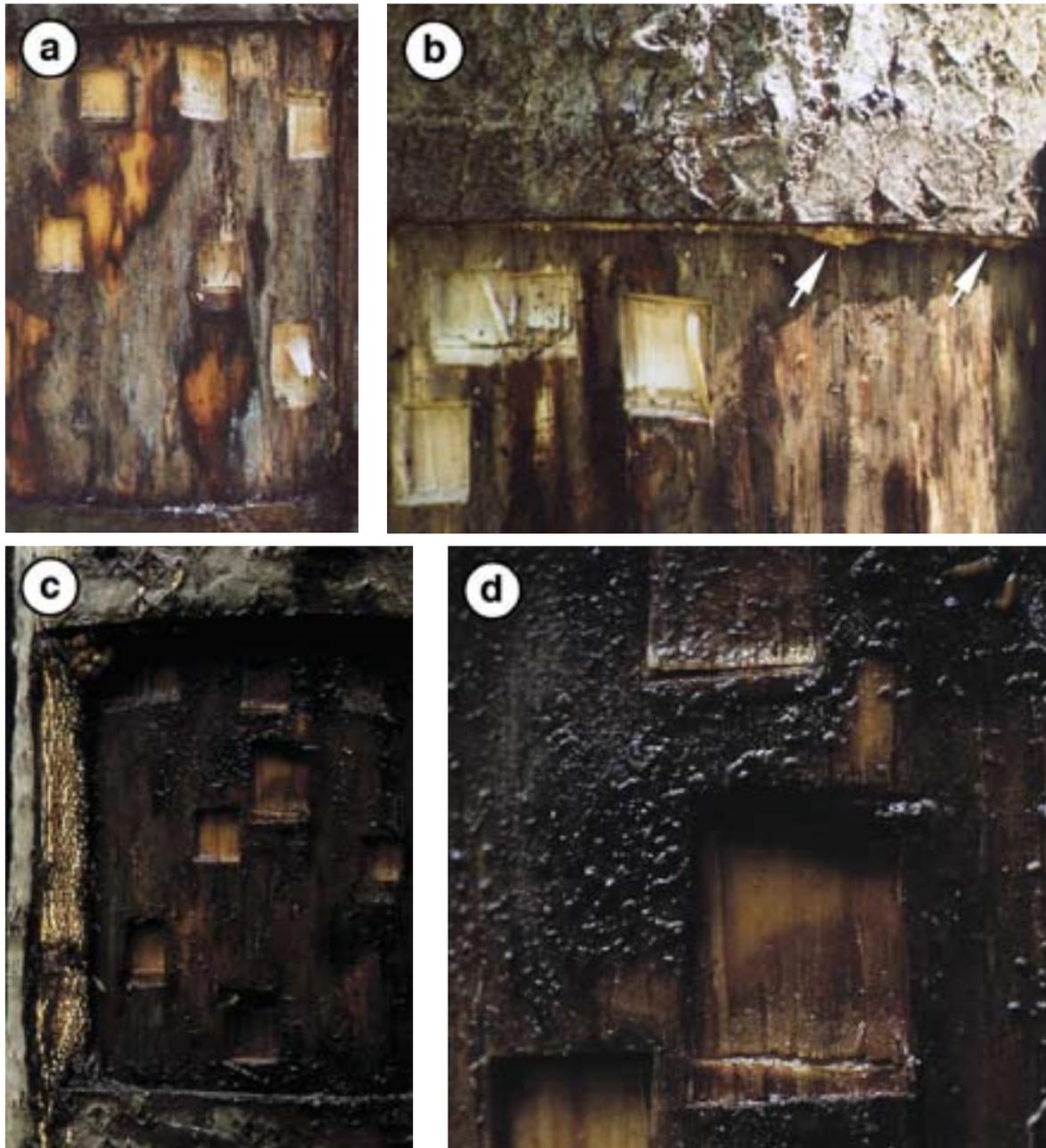


Abbildung 13a-d: Wundoberflächen: a) 21 Wochen nach der Verletzung; annähernd vollständig mit grüulichem, degeneriertem Gewebe bedeckte Wundoberfläche; b) Detailaufnahme des oberen horizontalen Wundrandes aus Abb. 13a, mit sich entwickelndem Seitenkallus (Pfeile); c) weitere sechs Wochen später hat sich ein starker Seitenkallus an den senkrechten Wundrändern gebildet; d) Detailaufnahme der Wundoberfläche aus Abb. 13c mit dem charakteristischen Fehlen eines Flächenkallus

Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, dass sich die Rinde stets innerhalb des nicht kollabierten, sekundären Phloems ablöste. Das dem Kambium am nächsten liegende Phloemfaserband bildete jeweils die am tiefsten im Gewebe liegende Trennungsgrenze, jenseits derer bei keinem der Versuchsbäume die Rinde abgetrennt wurde. Die Menge des außerhalb des Phloemfaserbandes auf der Wundoberfläche verbliebenen Gewebes variierte hingegen stark und bestätigte damit den

makroskopischen Eindruck (Abb. 14a,b). Auch zeigte sich, dass - bedingt durch mechanische Vorschädigungen bei der Wundsetzung - in Teilbereichen tieferliegende Gewebeschichten geschädigt wurden. Besonders in den Bereichen der Wunde, in denen mehr Phloemreste auf der Wundfläche verblieben, also den makroskopisch als dunkel beschriebenen Zonen, zeigte sich in den folgenden sechs Wochen eine fortschreitende Degeneration des Gewebes außerhalb des innersten Phloemfaserbandes, das offensichtlich als schützende Barriere für die xylemseitigen Zellen wirkte (Abb. 14a). Das xylemseitige Phloem und Kambium waren zu diesem Zeitpunkt noch weitgehend intakt, sofern sie nicht direkt durch das Setzen der Wunde geschädigt wurden (Abb. 14b). Ausnahme waren jedoch die Strahlzellen, die teilweise durch das Faserband hindurch bis in tieferliegende Gewebebereiche degenerierten oder mit dunklen Inhalten gefüllt waren.

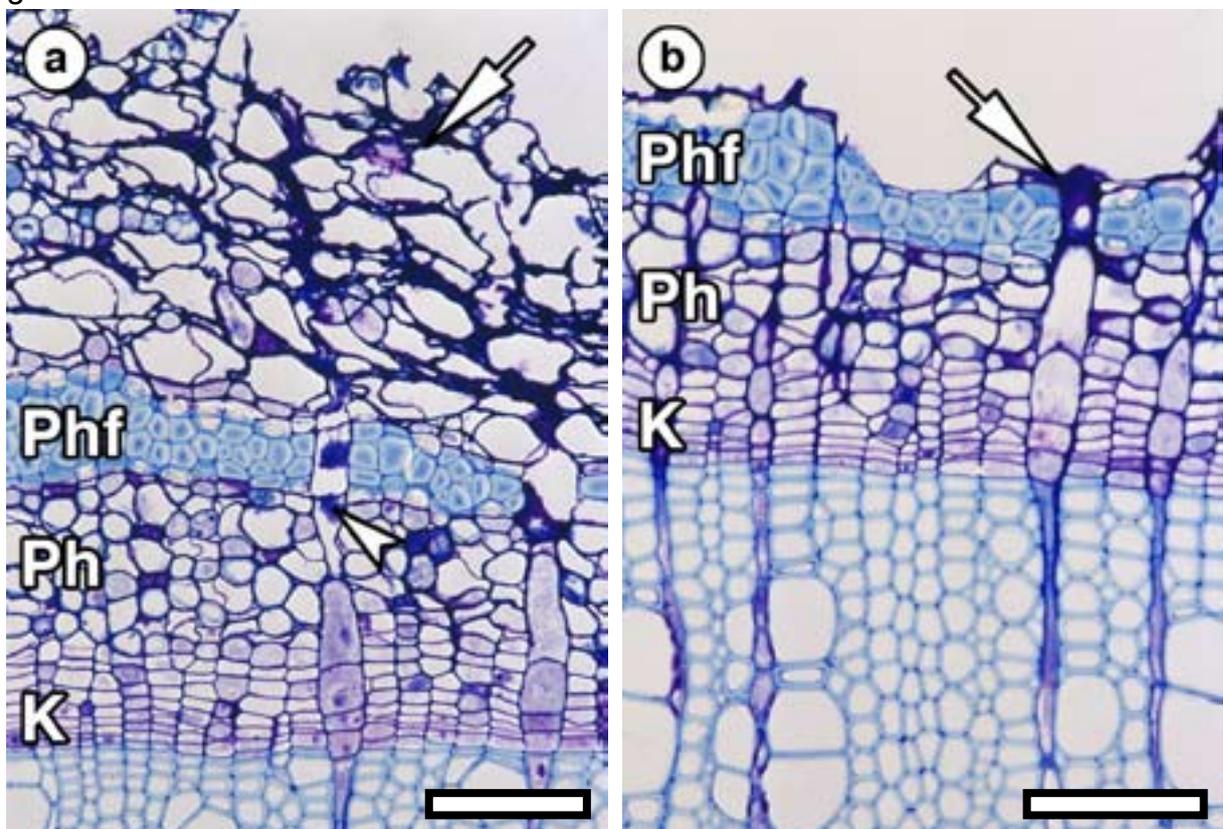


Abbildung 14a, b: Wunde mit verschieden starken Phloemresten auf der Wundoberfläche im Januar 2001; a) makroskopisch als „dunkle Zone“ bezeichneter Bereich mit starken degenerierten Phloemresten (Pfeil) außerhalb des Phloemfaserbandes (Phf); intaktes Kambium (K) und Phloem (Ph), mit Ausnahme geschädigter Strahlzellen (Pfeilspitze); Maßstab = 100 µm; b) makroskopisch als „helle Zone“ wahrgenommener Bereich; Phloemfaserband mit nur wenigen, degenerierten Phloemresten außerhalb (Pfeil) und intaktem Phloem und Kambium xylemseitig; Maßstab = 100 µm; Querschnitte; LM-Aufnahme, Giemsa-Färbung

Auf einem Großteil der Wundoberfläche war das Gewebe abgestorben, ohne eine Flächenkallusbildung einzuleiten. Während der 18 Wochen bis zur Entnahme im April war besonders in den dunkleren Bereichen das Gewebe abgestorben und soweit kollabiert, dass Zellen nicht mehr identifiziert werden konnten. In der Folge degenerierten auch die Zellen vom Phloemfaserband nach innen bis auf das Xylem der vorhergegan-

genen Vegetationsperiode (Abb. 15a). Die Strahlzellen waren besonders in Bereichen des Phloemfaserbandes oder zwischen den gehäuft auftretenden Sklereiden, aber auch bis in das Xylem hinein mit dunklen Inhalten gefüllt (Abb. 15a). Innerhalb des Phloems und angrenzend an das Faserband entwickelten einige der zuvor parenchymatischen Zellen deutlich lignifizierte Zellwände, was auf Grund ihrer Lage und des Bildungszeitraumes als Wundreaktion einzustufen ist (Abb. 15a). Bis zum Ende der Untersuchungen erfolgten in diesen Bereichen weiterhin nur degenerative Prozesse, da keine lebenden parenchymatischen Zellen für Wundreaktionen mehr vorhanden waren (Abb. 15b).

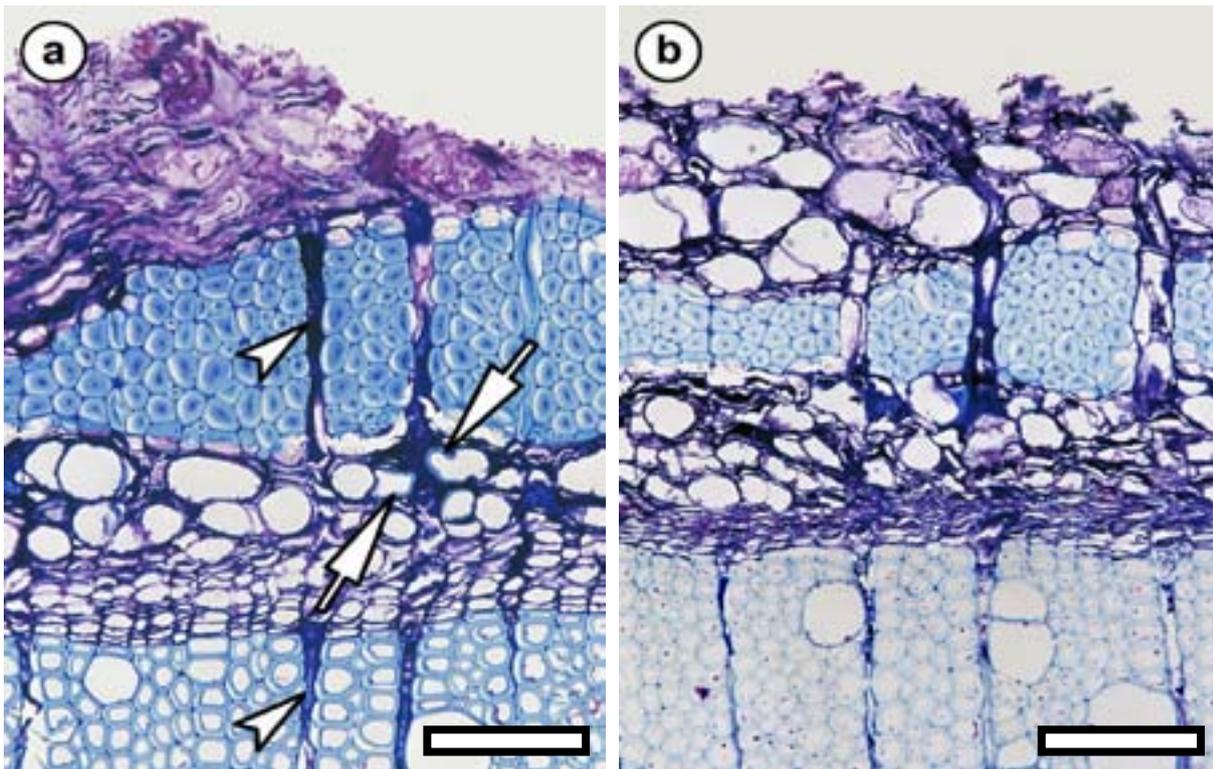


Abbildung 15a, b: Wundoberflächen mit bis auf das Xylem degeneriertem Gewebe: a) nach 18 Wochen, Holzstrahlen sind bis in das Xylem mit dunklen Inhalten angefüllt (Pfeilspitzen), wundinduzierte Lignifizierung von Zellwänden im Phloem (Pfeile); Maßstab = 100 µm; b) nach weiteren drei Wochen; fortgesetzte Degeneration und Kollabieren auch tiefer gelegener Gewebeschichten; Maßstab = 100 µm; Querschnitte; LM-Aufnahme, Giemsa-Färbung

Nur in kleinen Teilbereichen der Wundoberflächen, unabhängig von der Stärke des auf dem Xylem verbliebenen Gewebes, starben die Zellen nicht vollständig ab. Die Bildung neuen Gewebes zeigte sich jedoch am intensivsten in den Bereichen, in denen die Rinde sich am jüngsten Phloemfaserband abgelöst hatte. In diesen Zonen starben die gesamten Phloemzellen bis an das Faserband ab, während xylemseitig nur wenige Phloemzellen degenerierten und die Kambiumzellen weitestgehend intakt blieben. In einigen dieser makroskopisch hellen Wundabschnitte konnte trotz vielfacher Einlagerung dunkler Inhalte die Proliferation von parenchymatischen Zellen des sekundären Phloems bereits am 26. März, also 14 Wochen nach der Wundsetzung, beobachtet werden (Abb. 16a). Zellproliferation fand in gleicher Weise bei Kambiumzellen statt.

Abweichend von dieser frühen Wundreaktion wurde in anderen makroskopisch hellen Zonen eine Proliferation der Kambium- und parenchymatischen Phloemzellen erst weitere ca. sechs Wochen später festgestellt (Abb. 16b).

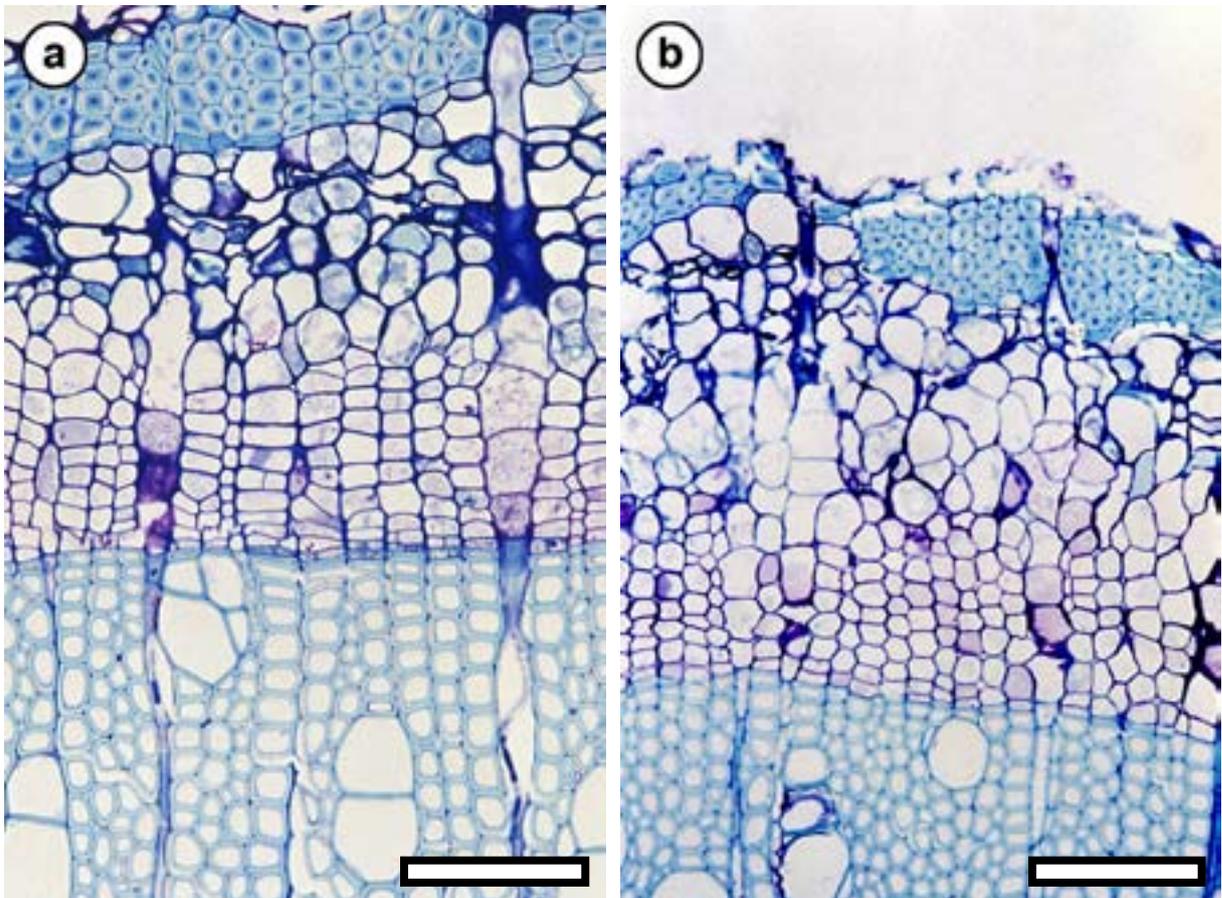


Abbildung 16a, b: Proliferation der parenchymatischen Phloem- und der Kambiumzellen; a) 14 Wochen nach der Verletzung in Bereichen mit wenig Phloemresten auf der Wundoberfläche; Maßstab = 100 μ m; b) erst im Mai einsetzende Proliferation in ähnlichen Bereichen der Wundoberfläche; Maßstab = 100 μ m; Querschnitte; LM-Aufnahme, Giemsafärbung

Nach der Zellproliferation im März entwickelten sich in den folgenden dreieinhalb Wochen auf zwei unterschiedlichen Wegen neue Gewebe. Während bei einem Entwicklungstyp (Typ 1) sich nach vorangegangener Proliferation das gesamte Zellgefüge umstrukturierte, blieben bei dem zweiten Entwicklungstyp (Typ 2) die ursprünglichen Gewebe erhalten.

Bei einer Entwicklung vom „Typ 1“ nahmen radial abgeflachte, rechteckige Fusiforminitialen und die Strahlinitialen eine rundliche bis ovale Form an (Abb. 17a). Die 4-6 Zellen starke Kambiumzone war nun von zahlreichen Interzellularen unterschiedlicher Größe durchsetzt (Abb. 17b). In Richtung des Phloemfaserbandes folgte ein Gewebe aus Parenchymzellen, welches aufgrund seiner Lage und Form aus Phloemzellen der vorangegangenen Vegetationsperiode hervorgegangen zu sein schien. Oft waren zwei bis drei dieser Zellen zu mehr oder weniger radial ausgerichteten Gruppen geordnet (Abb. 17a, c). Sowohl in diesem Gewebeabschnitt als auch in dem bis zum abschließenden Phloemfaserband folgenden Bereich aus zum Teil degenerierten Zellen waren

häufig dunkle Inhalte in den Vakuolen intakter Zellen oder als Wandauflagerungen bei degenerierten Zellen zu finden (Abb. 17d).

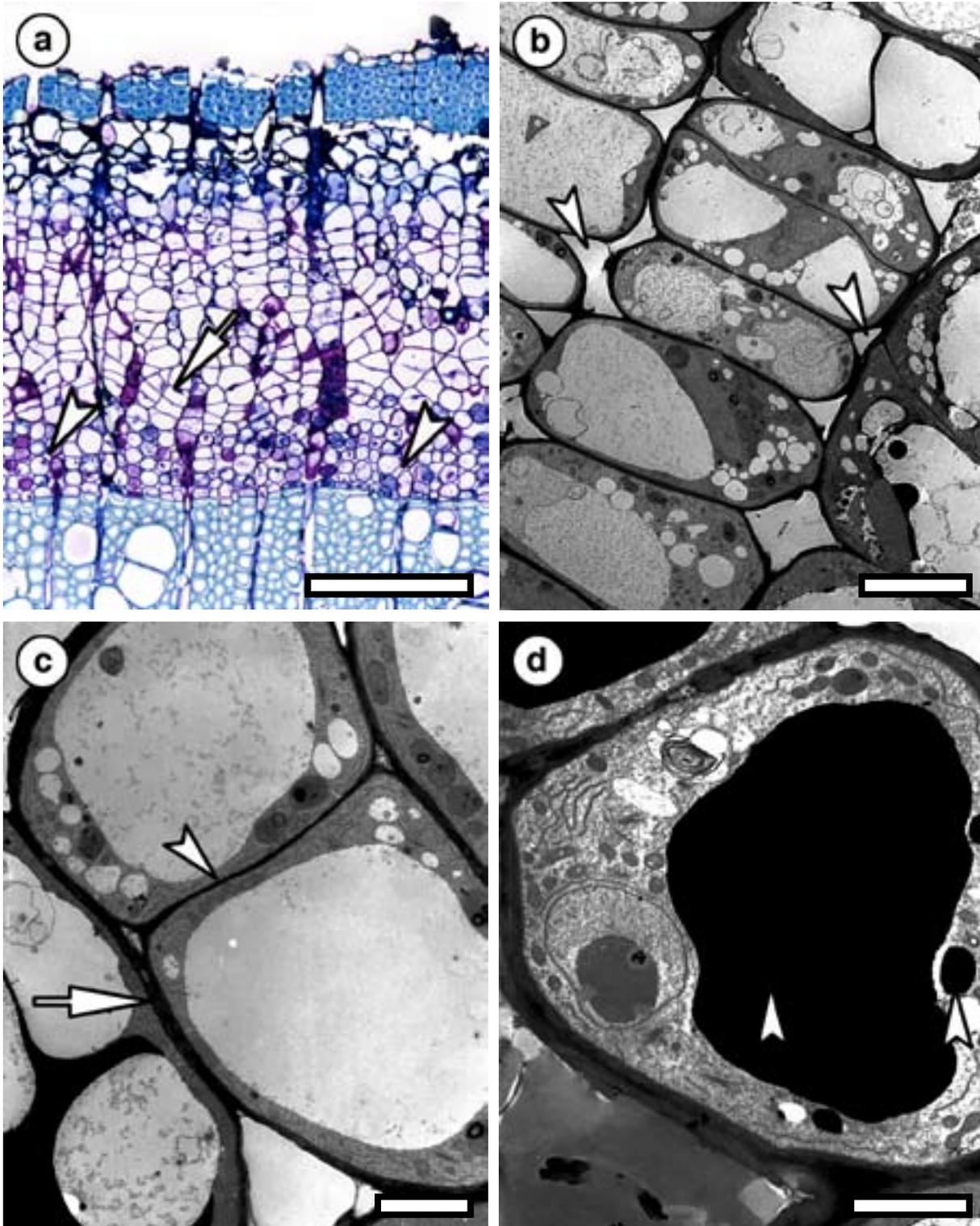


Abbildung 17a-d: Kallöses Gewebe unterhalb des Phloemfaserbandes; a) Kallusstrukturen mit zahlreichen Interzellularen (Pfeilspitzen) zwischen den rundlichen Zellen der ursprünglichen Kambiumzone und radialen Gruppen von Parenchymzellen (Pfeile); Maßstab = 200 μm ; b) Interzellularräume unterschiedlicher Größe innerhalb der ehemaligen Kambiumzone (Pfeilspitzen); Maßstab = 10 μm ; c) Gruppe aus zwei Parenchymzellen, die augenscheinlich eine gemeinsame, beide umschließende Zellwand aufweisen (Pfeil) und durch eine dünnere antikline Wand voneinander getrennt sind (Pfeilspitze); Maßstab = 4 μm ; d) lebende Parenchymzelle deren Vakuolen vollständig mit dunklen Inhalten gefüllt sind (Pfeilspitzen); Maßstab = 2 μm ; Querschnitte; LM-Aufnahmen, Giemsa-Färbung (a); TEM-Aufnahmen, Osmiumkontrastierung (b-d)

Bei einer Entwicklung vom „Typ 2“ veränderten sich die Gewebestrukturen weniger stark und es proliferierten überwiegend die parenchymatischen Zellen des Phloems. Die Kambiumzellen zeigten eine früher einsetzende Zellteilung, so dass sich bereits am 20. April eine mehrere Zellen starke Differenzierungszone gebildet hatte (Abb. 18a). Obwohl dieser Kambialbereich weniger klar strukturiert war als das von einer Verletzung unbeeinflusste Kambium, fehlten hier die für einen Kallus typischen Merkmale wie zahlreiche Interzellularen, rundliche Zellen in lockerem Zellverband und von der radialen Ausrichtung abweichende Zellteilungen (Abb. 18a, b). Die neu gebildeten Siebröhren und Phloemparenchymzellen schlossen übergangslos an die Phloemzellen des Vorjahres an. Obwohl auch in Bereichen dieses Wundreaktionstyps Strahlzellen zum Teil mit dunklen Inhalten angefüllt waren, schien der Schutz des lebenden Gewebes besonders effizient gewesen zu sein, da zwischen dem Phloemfaserband und dem Xylem kaum abgestorbene Zellen vorhanden waren.

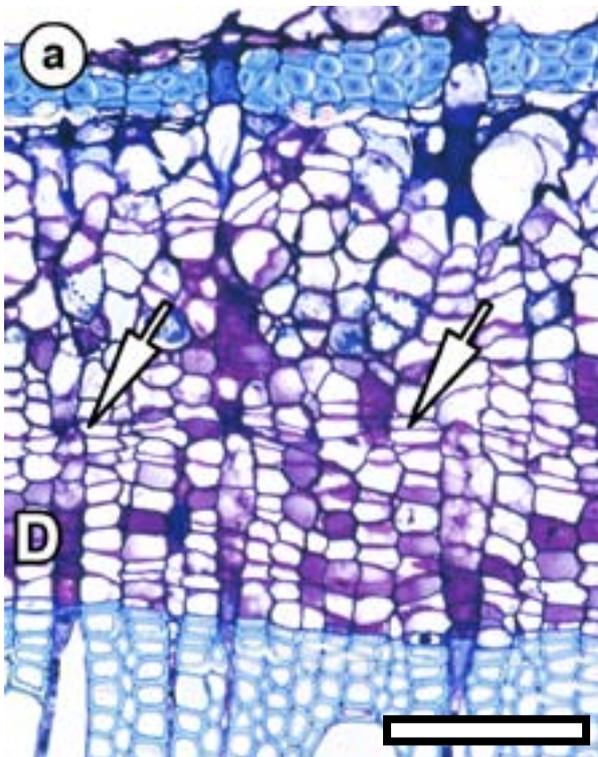
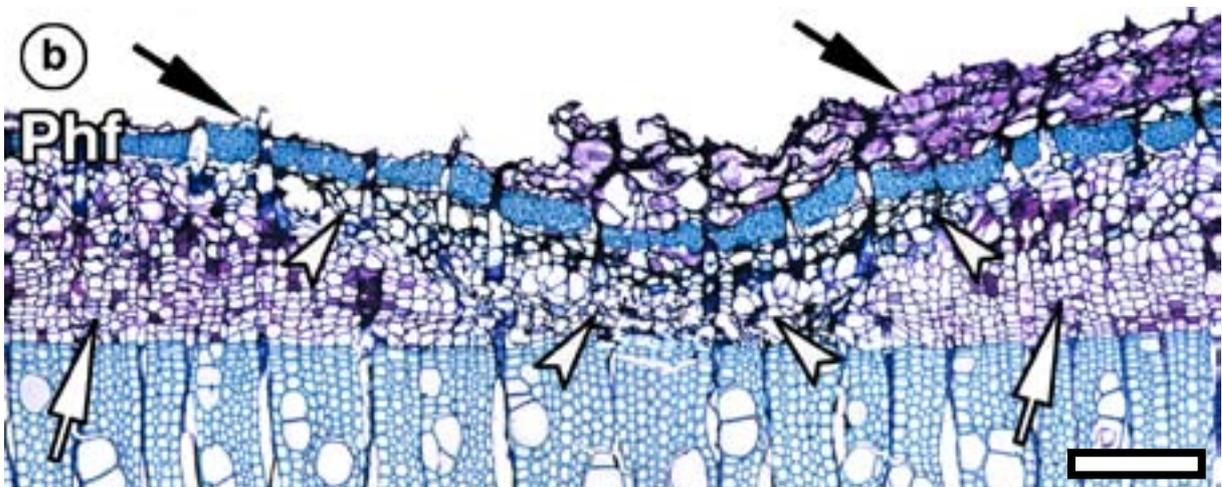


Abbildung 18a, b: Kallusgewebe an das Phloemfaserband nach innen anschließend; a) Kallusentwicklung des „Typ 2“, bei dem vornehmlich die parenchymatischen Zellen des Phloems proliferierten, mit bereits ausgeprägter Differenzierungszone (D) am 20. April und nicht umdifferenzierten Kambiuminitialen (Pfeile); Maßstab = 100 μm ; b) Wundabschnitt, in dem eine Zone aus überwiegend degenerierten Zellen und Zellen mit dunklen Inhalten (Pfeilspitzen) klar zu den lebenden Zellen benachbarter Zonen (Pfeile) abgegrenzt ist; alle drei Zonen liegen sowohl unter dicken als auch weniger dicken Resten abgestorbenen Phloems (schwarze Pfeile) außerhalb des Phloemfaserbandes; Maßstab = 200 μm ; Querschnitte; LM-Aufnahmen, Giemsa-Färbung



Die Reaktionen auf die großflächigen Verwundungen differierten innerhalb einer Wunde und zwischen den Bäumen sehr stark. Ein Kallusgewebe wurde auf der Wundfläche nur in seltenen Fällen gebildet und entwickelte sich dann nicht direkt auf der Oberfläche, sondern unterhalb einer unterschiedlich starken Schicht aus degeneriertem Gewebe (Abb. 18b). Die Reaktivierung der Zellen, sichtbar an der Proliferation, erfolgte in Teilbereichen der Wunden schon Ende März. Bis zum 20. April hat sich in der Folge entweder ein lockeres Kallusgewebe (Typ 1) oder eine mehrere Zellen breite Differenzierungszone sowohl phloem- als auch xylemseitig (Typ 2) entwickelt.

3.2 Versuchsserie 2002-2004

3.2.1 IDENTIFIZIERUNG DER AN DER GEWEBEREGENERATION BETEILIGTEN GEWEBE

Für die Bestimmung der an der Regeneration bzw. Neubildung eines Wundkambiums beteiligten Zellarten wurden zunächst die an der Kallusbildung beteiligten Gewebe identifiziert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellarten, aus denen die Wundkambiumzellen unmittelbar hervorgegangen waren. Beide Untersuchungen wurden an Probenmaterial durchgeführt, das aus den am 27. Mai 2002 gesetzten Wunden nach verschiedenen langen Wundreaktionszeiten entnommen worden war.

3.2.1.1 BESTIMMUNG DER AN DER KALLUSBILDUNG BETEILIGTEN GEWEBE

Nach dem Setzen der Wunden zeigten die Pappeln neben einer deutlichen Kambialnekrose Wundreaktionen im freigelegten Xylem. Das Kollabieren des Kambiums in Verbindung mit der Degeneration der Xylem- und Phloemzellen am Wundrand (Abb. 19a) führte dazu, dass erst einige Millimeter vom Wundrand entfernt, nämlich im Übergangsbereich zum intakten Gewebe, die Bildung von Kalluszellen eingeleitet wurde. In einigen der Wunden lösten sich in dieser Übergangszone die ursprünglichen Kambiumstrukturen auf, die Zellen dedifferenzierten sich und ein von zahlreichen Interzellularen durchsetztes lockeres Gewebe aus Parenchymzellen entstand (Abb. 19b). Ein Wundkallus in Form eines aus dünnwandigen, großlumigen Zellen aufgebauten Gewebes konnte lichtmikroskopisch bereits nach 14 Tagen der Wundreaktion nachgewiesen werden (Abb. 19c, d). Innerhalb des Phloems hatte sich parallel zum lateralen Wundrand eine in seiner Struktur dem frühen Kallusgewebe gleichende Zone entwickelt, die das degenerierende Phloem von dem unbeeinflussten Phloem trennte (Abb. 19c). Elektronenmikroskopisch zeigten sich bereits zu diesem Zeitpunkt Zellgruppen im an das unbeeinflusste Kambium grenzenden Kallus und an der dem Wundrand zugewandten Seite der kallusähnlichen Zellen im Phloem, die durch überwiegend orientierte Zellteilungen entweder parallel zur Stammoberfläche oder zur Wundfläche abgeflacht erschienen; entsprechend ihrer Feinstruktur redifferenzierten diese zu sekundären Meristemen (Abb. 20a, b). Grundsätzlich zeichnete sich der Kallus durch hoch aktive Zellen und zahlreiche Zellteilungen aus (Abb. 20c, d). Nach einer weiteren Woche der Kallusentwicklung wurde innerhalb des Kallusgewebes ein zur Wunde gerichtetes Zellwachstum lichtmikroskopisch deutlich. Lage und Struktur des Gewebes zeigten, dass neben den in einem geringeren Maße beteiligten Zellen der Xylemdifferenzierungszone und des Kambiums insbesondere Phloemparenchymzellen zur Entwicklung des Wundgewebes beitragen (Abb. 21a). In dem zunächst rein parenchymatischen Kallusgewebe der Pappeln entwickelten sich in der Folge zahlreiche Sklereidennester bzw. modifizierte Wundphloemfasern (Abb. 21b).

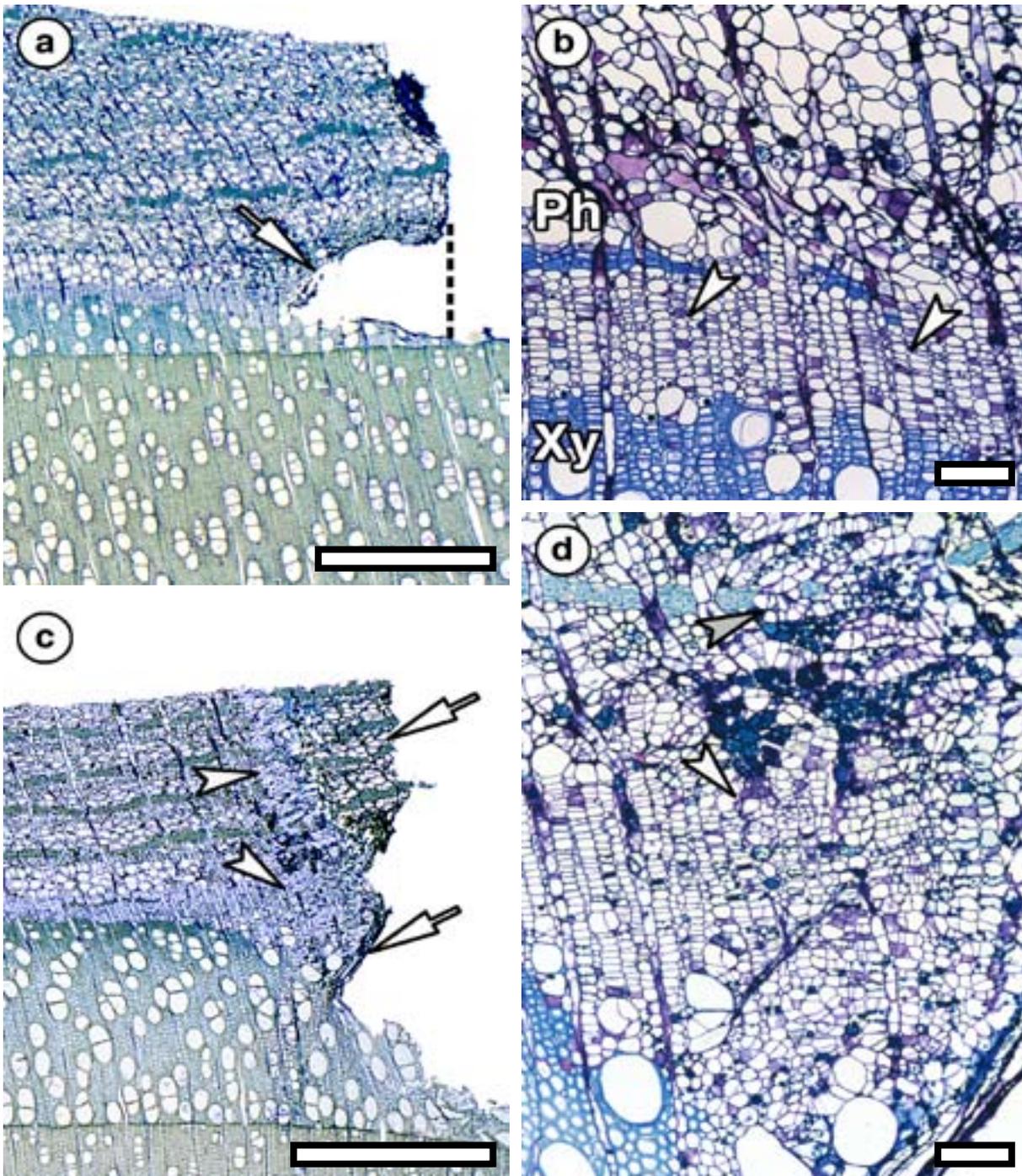


Abbildung 19a-d: Wundgewebeentwicklung am seitlichen Wundrand; 7 Tage (a, b) und 14 Tage (c, d) nach der Verletzung; a) durch das Absterben von parenchymatischen Phloem-, Xylem- und Kambiumzellen war eine neue Wundoberfläche (Pfeil) jenseits des ursprünglichen Wundrandes (Linie) entstanden; Maßstab = 1 mm; b) zwischen Xylem (Xy) und Phloem (Ph) entwickelte sich aus dem Kambium ein von zahlreichen Interzellularen durchsetztes parenchymatisches Gewebe (Pfeilspitzen); Maßstab = 100 μ m; c) an der Grenze zum intakten Gewebe der ehemaligen Differenzierungszone und des Kambiums sowie innerhalb des Phloems hat sich ein Gewebe aus dünnwandigen, großlumigen Zellen gebildet (Pfeilspitzen); innerhalb des Phloems trennt diese Zone das degenerierende vom intakten Gewebe (Pfeile); Maßstab = 1 mm; d) Detail aus c); durch ungerichtete Zellteilung entstandenes Kallusgewebe am Wundrand (Pfeilspitze) und ein das Phloemfaserband durchziehendes Band parenchymatischer Zellen (graue Pfeilspitze); Maßstab = 100 μ m; Querschnitte; LM-Aufnahmen, Giemsa-Färbung

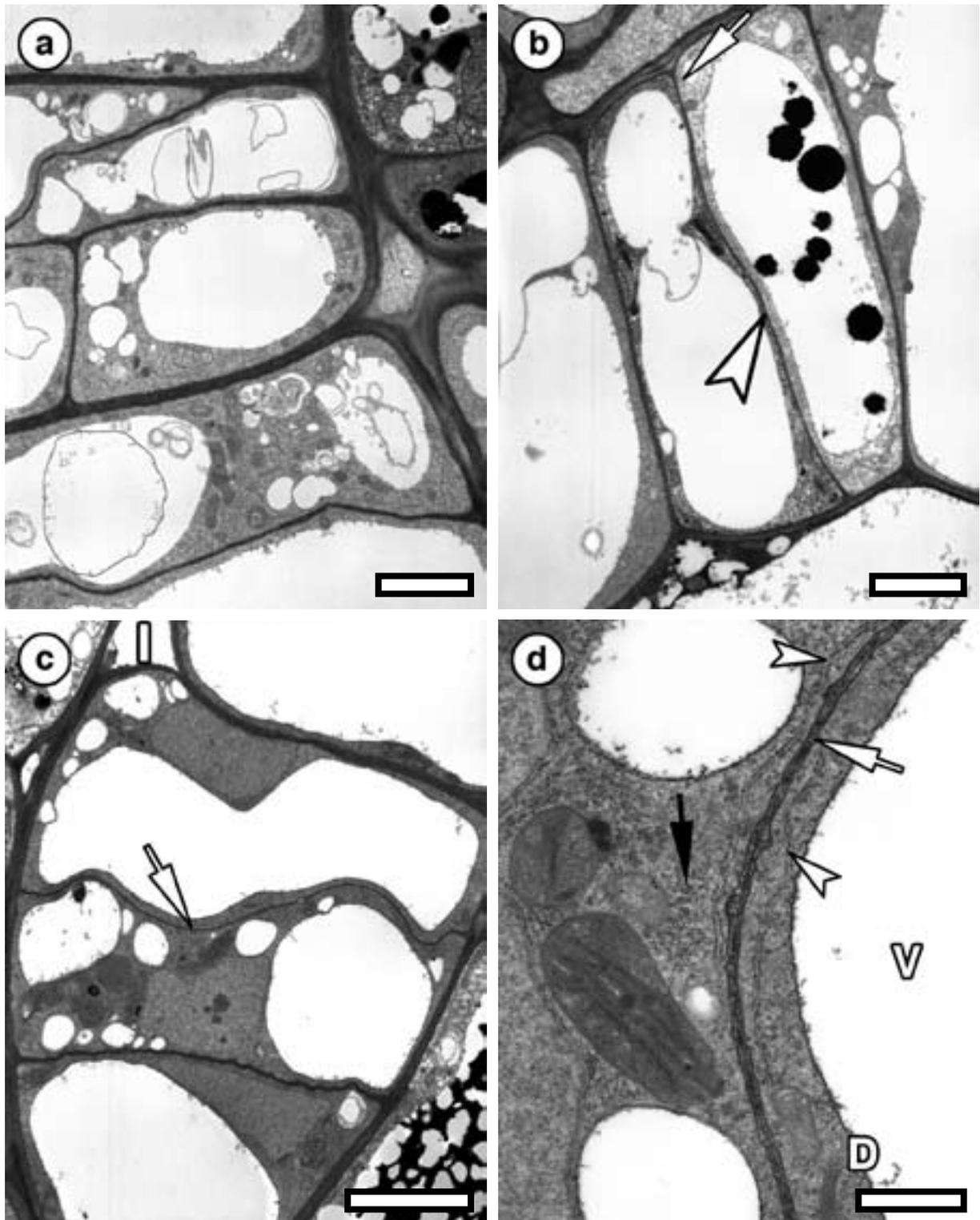


Abbildung 20a-d: Wundgewebeentwicklung am seitlichen Wundrand, 14 Tage nach der Verletzung; a) zu einem Wundkambium redifferenzierende, radial abgeflachte Kallusparenchymzellen in der Übergangszone zum unbeeinflussten Kambium; Maßstab = 4 μ m; b) zu einem neuen Meristem redifferenzierende Zellen des kallösen Parenchymbandes innerhalb des Phloems; Maßstab = 4 μ m; c) typische, hoch aktive Zellen des mit zahlreichen Interzellularen (I) durchsetzten Kallusparenchyms; junge Zellwand (Pfeil); Maßstab = 4 μ m; d) junge Zellwand im Kallus (Pfeil) und hoch aktives Cytoplasma mit zahlreichen Polysomen (schwarzer Pfeil), rauem ER (Pfeilspitzen), Dictyosomen (D); Maßstab = 800 nm; Querschnitte; TEM-Aufnahmen, Osmiumkontrastierung

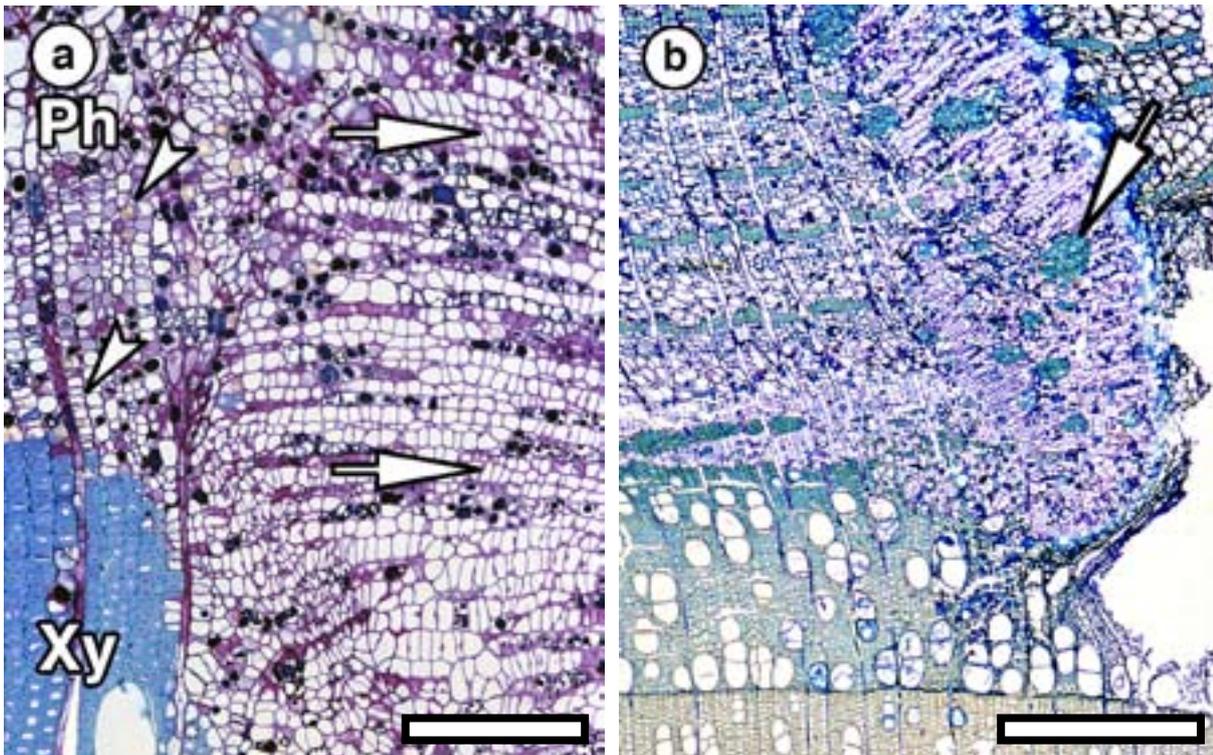


Abbildung 21a,b: Wundgewebeentwicklung am seitlichen Wundrand, 21 (a) und 28 (b) Tage nach der Verletzung; a) deutlich zur Wundoberfläche (Wunde rechts) gerichtete Zellteilung (Pfeile) der aus den parenchymatische Zellen der Xylemdifferenzierungszone (Xy), des Phloems (Ph) und des Kambiums (Pfeilspitze) hervorgegangenen Zellen; Maßstab = 100 μm ; b) Sklereidenbündel (Pfeil) innerhalb des Kallus; Maßstab = 800 μm ; Querschnitte; LM-Aufnahmen, Giemsa-Färbung

Bei einem Teil der untersuchten Verletzungen fanden vierzehn Tage nach der Verwundung in dem an das junge Kallusgewebe grenzenden Phloembereich deutliche Umdifferenzierungen statt. Diese deuteten auf eine Funktionsänderung der parenchymatischen Zellen hin. Aus ihnen entwickelten sich während der weiteren Wundreaktionszeit die beiden neuen Bildungsgewebe, das Phellogen und das Wundkambium. Bei der Entwicklung des Wundkambiums konnten zwei Strategien unterschieden werden, die nachfolgend beschrieben werden.

3.2.1.2 BESTIMMUNG DER AN DER KAMBIUMREGENERATION BETEILIGTEN ZELLARTEN

Strategie A:

Innerhalb des zum Verletzungszeitpunkt vorhandenen Phloems setzten in einer Gruppe bereits ausdifferenzierter Parenchymzellen Teilungen ein, wodurch sich ein zunächst unzusammenhängendes Band aus abgeflachten, im Querschnitt quaderförmigen Zellen entwickelte; weitere sieben Tage später konnte dieses Band schon deutlich als sekundäres Meristem angesprochen werden, da es seine Teilungsaktivität aufnahm (Abb. 22a, b). An dessen Übergangszone zum Kallusgewebe lagen teilungsaktive Zellen unmittelbar an degenerierenden, dunkle Inhalte aufweisenden Kalluszellen (Abb. 22c, d).

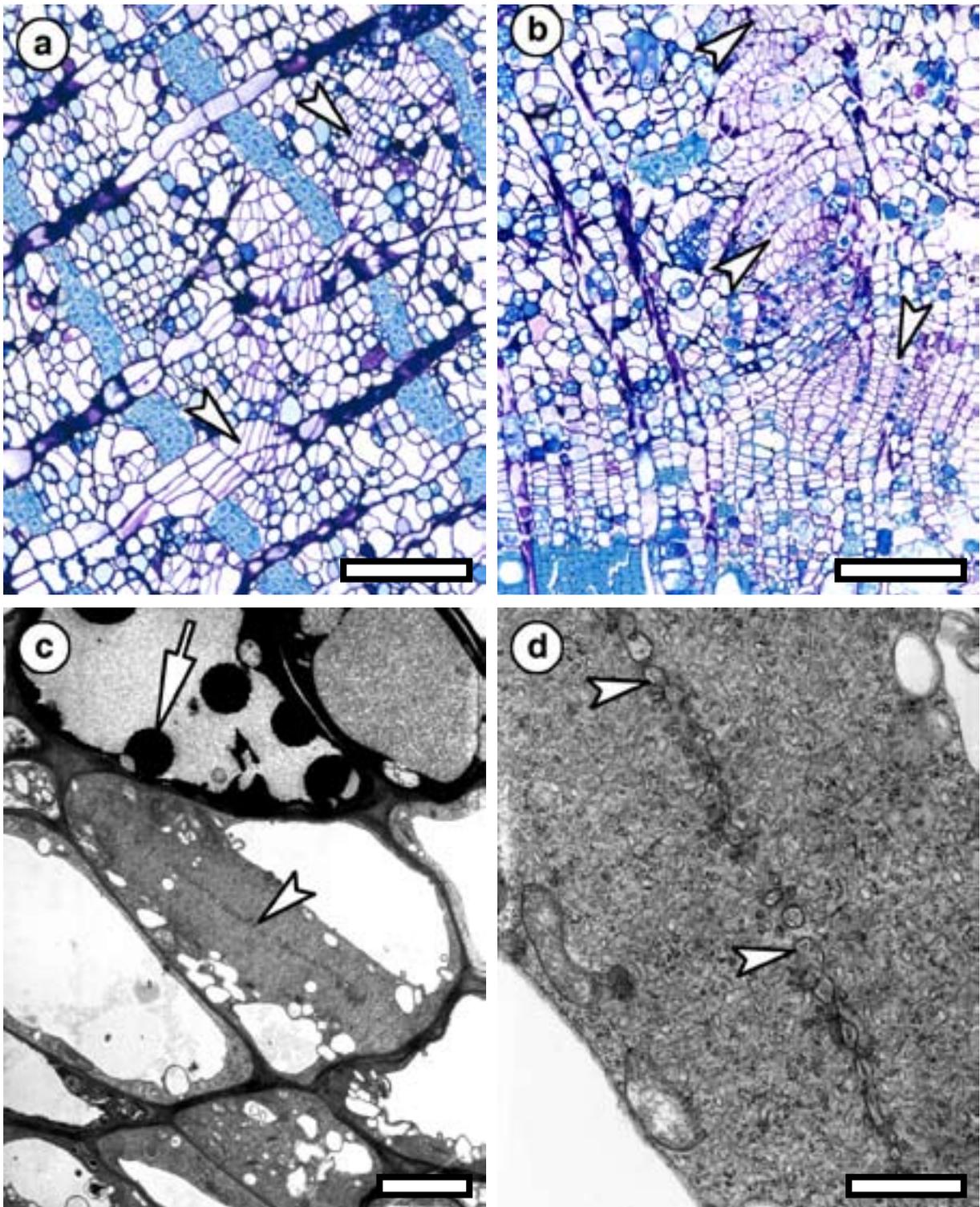


Abbildung 22 a-d: Entwicklung neuer Meristeme, drei (a) und vier (b-d) Wochen nach der Verletzung; a) innerhalb des Phloems ist ein unzusammenhängendes Band abgeflachter, quaderförmiger Zellen (Pfeilspitzen) aus umdifferenzierten Phloemzellen entstanden; Maßstab = 200 µm; b) die quaderförmigen Zellen in der Zone zwischen Kallusgewebe und sekundärem Phloem sind als sich neu entwickelndes sekundäres Meristem zu erkennen (Pfeilspitzen); Maßstab = 200 µm; c) sich neu entwickelnde Kambiumzelle mit junger Zellwand (Pfeilspitze) in unmittelbarer Nähe zu dunkle Substanzen enthaltenden Kalluszellen (Pfeil); sie liegen in der Zone zwischen Kallus, ehemaliger Xylemdifferenzierungszone und einem Kambium, dessen Zellen zu Kallusparenchymzellen umdifferenzierten; Maßstab = 4 µm; d) Detail der jungen Zellwand im Vesikelstadium (Pfeilspitzen); Maßstab = 400 nm; Querschnitte; LM-Aufnahmen (a, b), Giemsa-Färbung; TEM-Aufnahmen (c, d), Osmiumkontrastierung

Innerhalb des Parenchybandes im Phloem, in dem sich zwei Wochen nach der Verletzung die bereits beschriebenen Gruppen abgeflachter meristematischer Zellen gebildet hatten, waren diese Gruppen weitere sieben Tage später zu einem durchgehenden Band vereinigt (Abb. 23a). Auf Grund der Lage dieses Meristems, angrenzend an das phellemartige Gewebe im Phloem, und seiner Funktion, der Bildung von Zellen, die während ihrer Differenzierung lignifizieren und suberinisieren, scheint es sich um ein nekrophylaktisches Phellogen zu handeln. Dieses neue Phellogen wurde durch ein phellemartiges Gewebe aus großen, dünnwandigen Zellen von dem nach außen anschließenden, degenerierenden Gewebe getrennt. Eine solche Peridermvorstufe reichte entweder bis in das Kallusgewebe hinein oder durch dieses hindurch und schloss dann direkt an die ehemalige Differenzierungszone an. Nach acht Wochen war außen im Phloem weiterhin ein Periderm erkennbar, das den lebenden und den inzwischen degenerierten Gewebeteil des Phloems voneinander trennte und dessen Phellemzellen sich noch immer durch ihre ungewöhnlich dünnen Wände und großen Lumina auszeichneten (Abb. 23b).

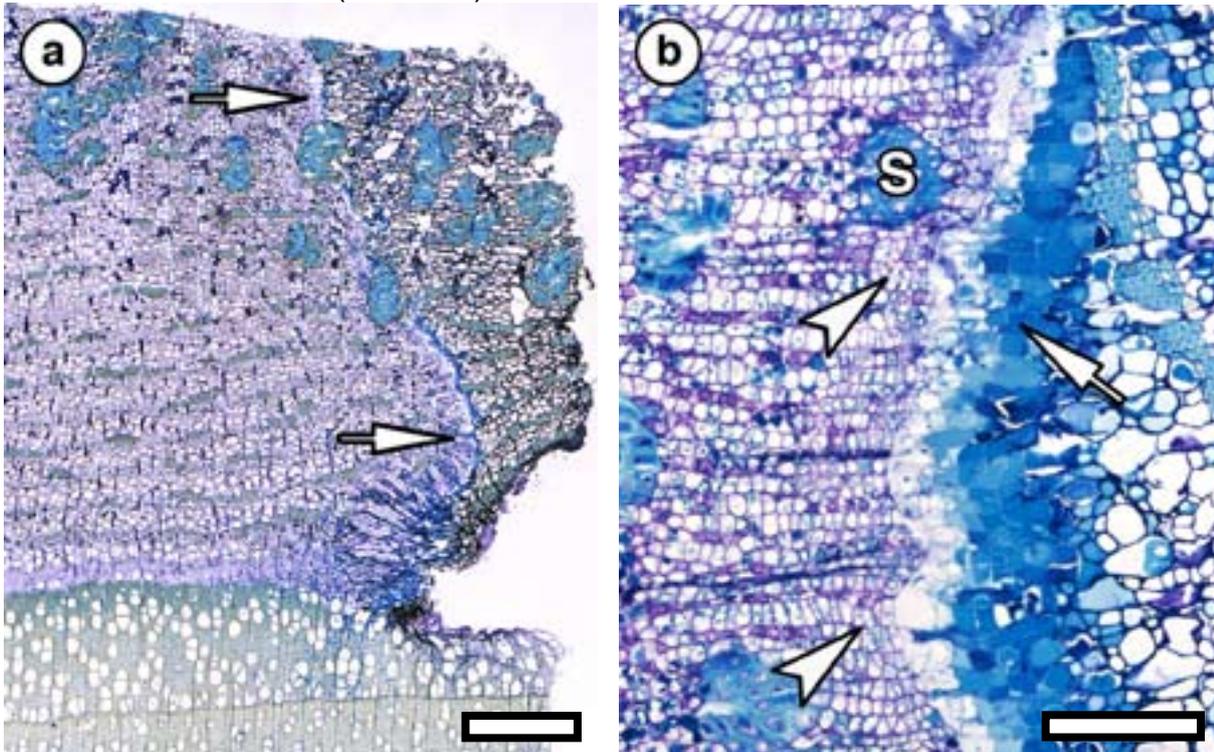


Abbildung 23a, b: Durchgehendes Phellem und Phellogen (Pfeile) innerhalb des Bandes aus Parenchymzellen im Phloem sowie im Kallus; drei Wochen nach der Verletzung; Maßstab = 800 μm ; b) neues Periderm nach acht Wochen Wundreaktion; an das Phellogen (Pfeilspitzen) angrenzendes Sklereidenbündel (S); Phellem (Pfeil) aus dünnwandigen, großlumigen Zellen z.T. mit Inhalten gefüllt; Maßstab = 200 μm ; Querschnitt; LM-Aufnahme, Giemsa-Färbung

Strategie B:

In der zweiten Gruppe von Wunden, bei denen das zum Verletzungszeitpunkt vorhandene Kambium nach der Verwundung strukturell unbeeinflusst blieb, hatte die Xylembildung in der Übergangszone zwischen modifiziertem und unmodifiziertem Gewebe bereits drei Wochen nach der Verwundung wieder eingesetzt (Abb. 24a-d).

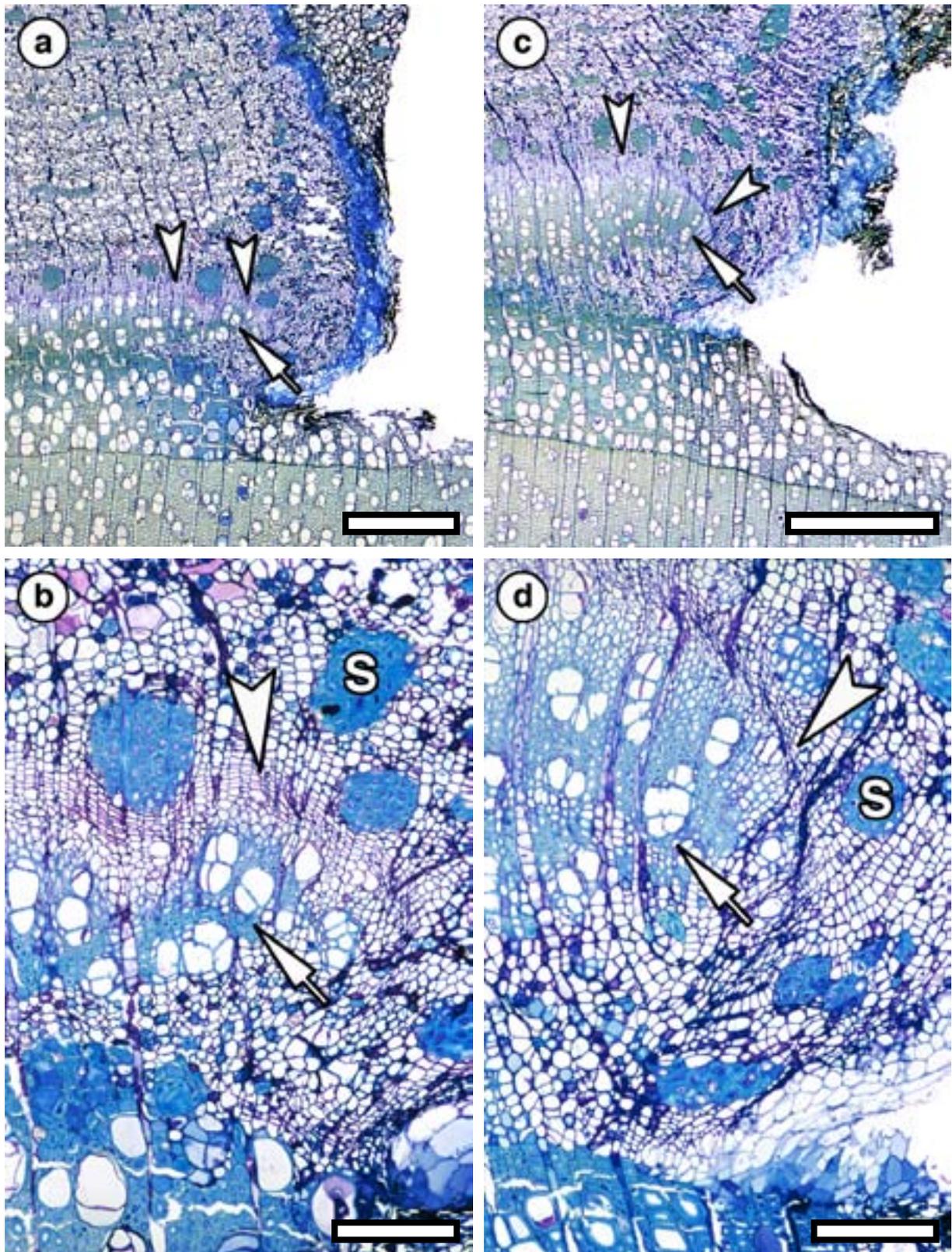
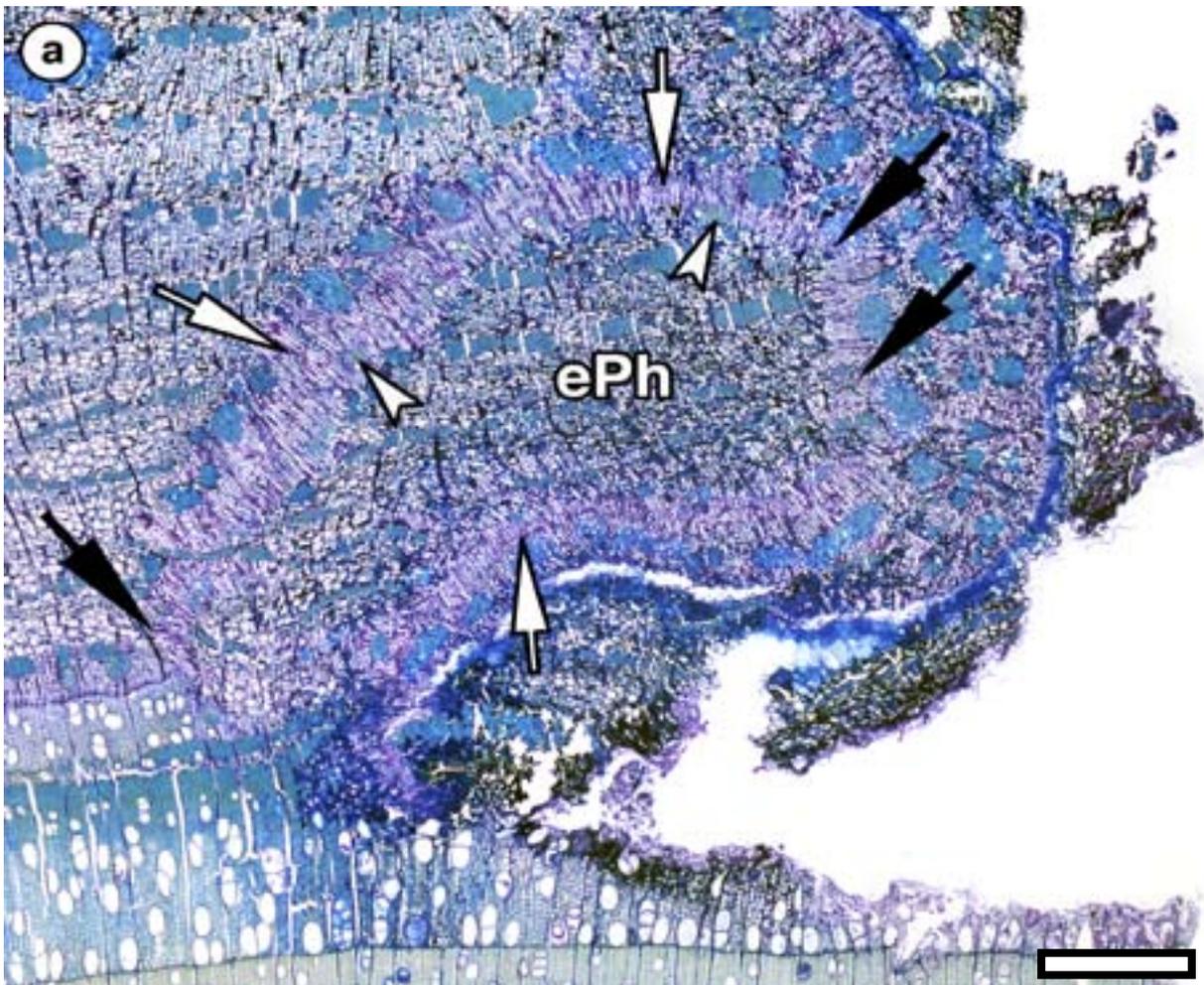


Abbildung 24a-d: Entwicklung neuer Meristeme, fünf (a, b) und zehn (c, d) Wochen nach der Verletzung; Strategie B; a) Kambiumregeneration im Kallusgewebe als tangentielle Verlängerung des intakten Kambiums (Pfeilspitzen) und Bildung neuen Xylems (Pfeil); Maßstab = 800 μ m; b) Detail aus (a); vom regenerierten Kambium (Pfeilspitze) neu gebildete Xylemfasern und Gefäße (Pfeil); Sklereiden (S); Maßstab = 200 μ m; c, d) weitere tangentielle als auch parallel zum Wundrand verlaufende Verlängerung des Kambiums mit sukzessive folgender Xylem- und Phloembildung; Maßstab = 800 μ m; d) Detail aus (c); Maßstab = 200 μ m; Querschnitt; LM-Aufnahme, Giemsa-Färbung

Nach weiteren zwei Wochen entwickelte sich in diesen Wunden das Wundkambium als eine tangentielle Verlängerung des unbeeinflussten Kambiums in das parenchymatische Kallusgewebe hinein (Abb. 24a). Dieses junge Kambium hatte bereits mit der Bildung von Phloem- und Xylemzellen begonnen (Abb. 24b). Weitere sechs Tage später hatte sich bis fast in die Spitze des Kallus hinein ein neues Wundkambium entwickelt. Parallel zur fortschreitenden Verlängerung des Kambiums folgte mit leichter zeitlicher Verzögerung die Phloem- und Xylembildung. In den Wunden, in denen sich das Wundkambium als tangentielle Verlängerung des ursprünglichen Kambiums entwickelte, verlängerte sich dieses im Untersuchungszeitraum, bis es sich parallel zur seitlichen Wundoberfläche durch annähernd den gesamten Kallus erstreckte (Abb. 24c, d). Durch kontinuierliche Abgliederung von Phloem- und Xylemzellen setzte eine langsame Überwallung der Wunde ein.

In der ersten Gruppe (Strategie A), die durch die Dedifferenzierung sekundärer Phloemzellen gekennzeichnet war, fusionierten diese meristematisierten Zellen zu einem nach fünf Wochen Wundreaktionszeit fast durchgehenden Band (Abb. 25a, b). Vereinzelt konnten zu diesem Zeitpunkt bereits erste lignifizierte Zellen nachgewiesen werden (Abb. 25a).



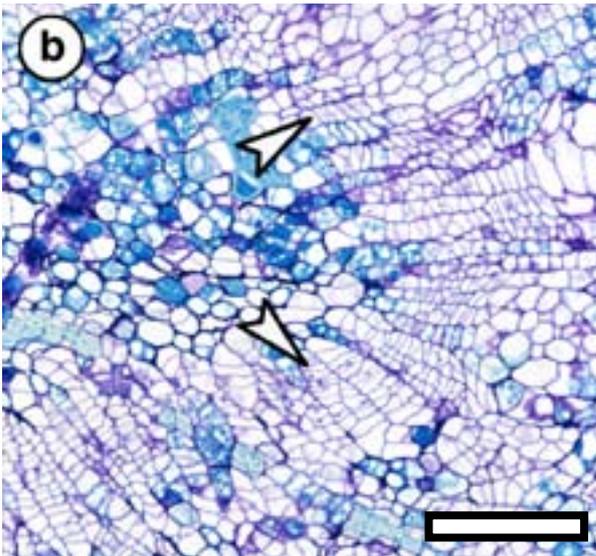


Abbildung 25a, b: Kambiumregeneration, Strategie A; fünf Wochen nach der Verletzung; a) fast durchgehendes Band teilungsaktiver Kambiumzellen (Pfeile) im Phloem, eingeschlossenes Phloem (ePh); Bereiche ohne Kambialgewebe (schwarze Pfeile); lignifizierende, junge Zellen (Pfeilspitzen); Maßstab = 800 μm ; b) Detail eines Kambiumabschnittes mit erkennbaren Kambiuminitialen (Pfeilspitzen); Maßstab = 200 μm ; Querschnitte; LM-Aufnahmen, Giemsa-Färbung

Eine Woche später hatten sich die Bänder teilungsaktiver Zellen in einem großen Teil der Proben zu einem annähernd halbkreisförmigen Kambium verbunden, das in das ursprüngliche Phloem eingebettet war und folgerichtig auch Teilbereiche des Phloems umschloss. Zu diesem Zeitpunkt hatte das sich neu entwickelnde Wundkambium überwiegend noch keinen Anschluss an das zum Verletzungszeitpunkt vorhandene Kambium (Abb. 26). Eine sichtbare Sekundärwandbildung und deren Lignifizierung hatte vor allem bei den modifizierten Phloemfasern/Sklereiden des Wundgewebes stattgefunden.

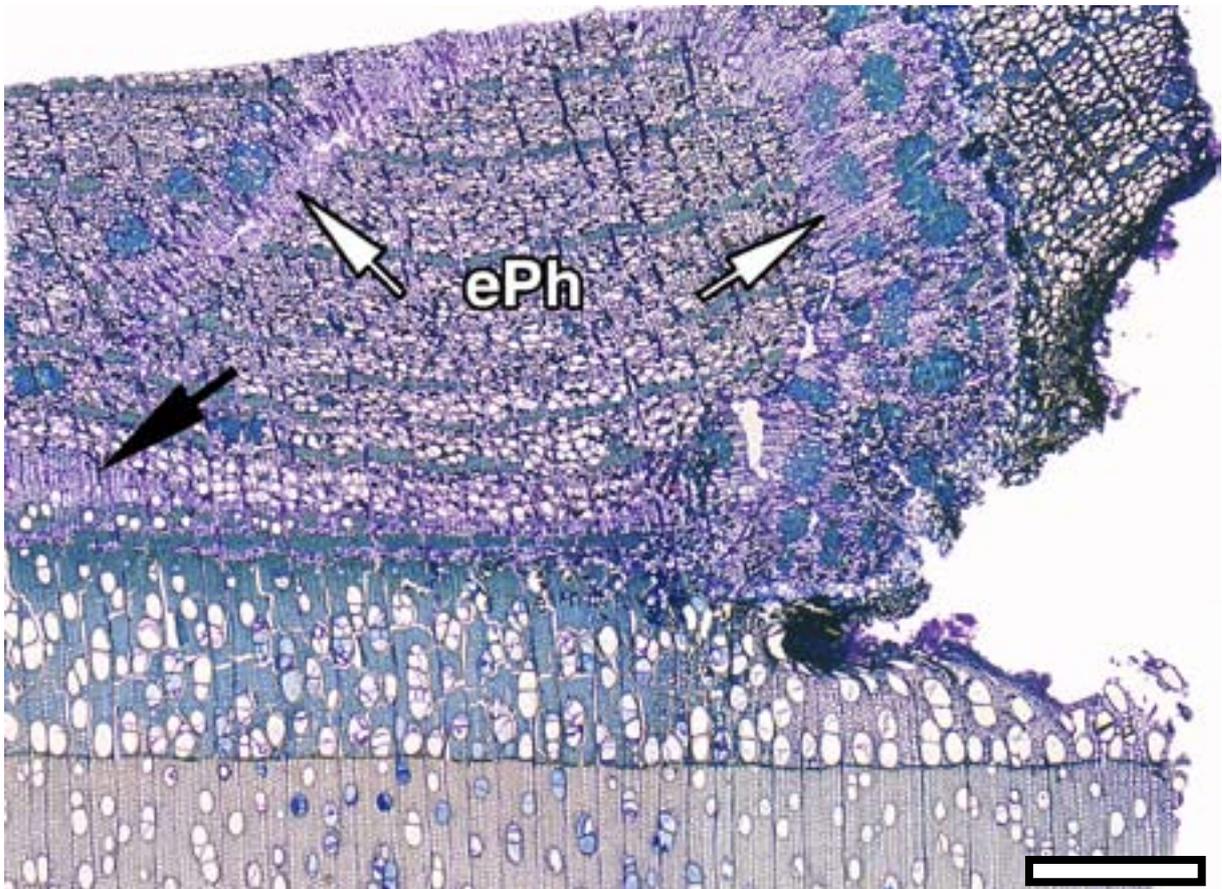


Abbildung 26: Kambiumregeneration, Strategie A; sechs Wochen nach der Verletzung; halbkreisförmiges Band aus Kambiumzellen (Pfeile) ohne Verbindung zu dem bereits zum Verletzungszeitpunkt vorhandenen Kambium (schwarzer Pfeil); eingeschlossenes Phloem (ePh); Maßstab = 800 μm ; Querschnitt; LM-Aufnahme, Giemsa-Färbung

Acht Wochen nach der Verletzung dehnte sich das Kambium zunehmend in Richtung des unbeeinflussten Kambiums aus, bis zur Anbindung an dieses in der weiter vom Wundrand entfernten Zone (Abb. 27a). Entlang des Wundrandes erstreckte sich das neu gebildete Wundkambium bis zu genau der Zone, in der die Xylembildung nach der Verletzung eingestellt wurde. Das so regenerierte Wundkambium bildete Wundxylem, das unmittelbar auf das vom Kambium eingeschlossene ursprüngliche Phloem folgte (Abb. 27b).

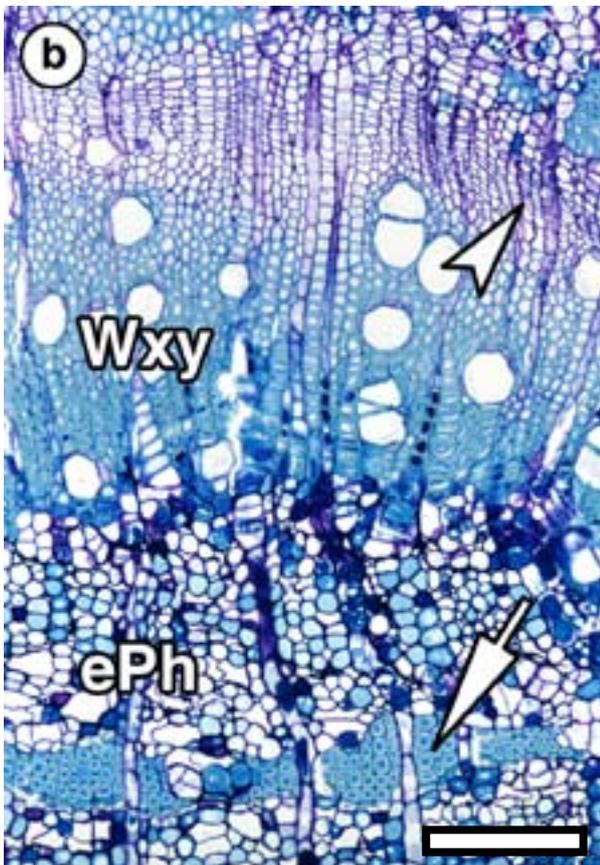
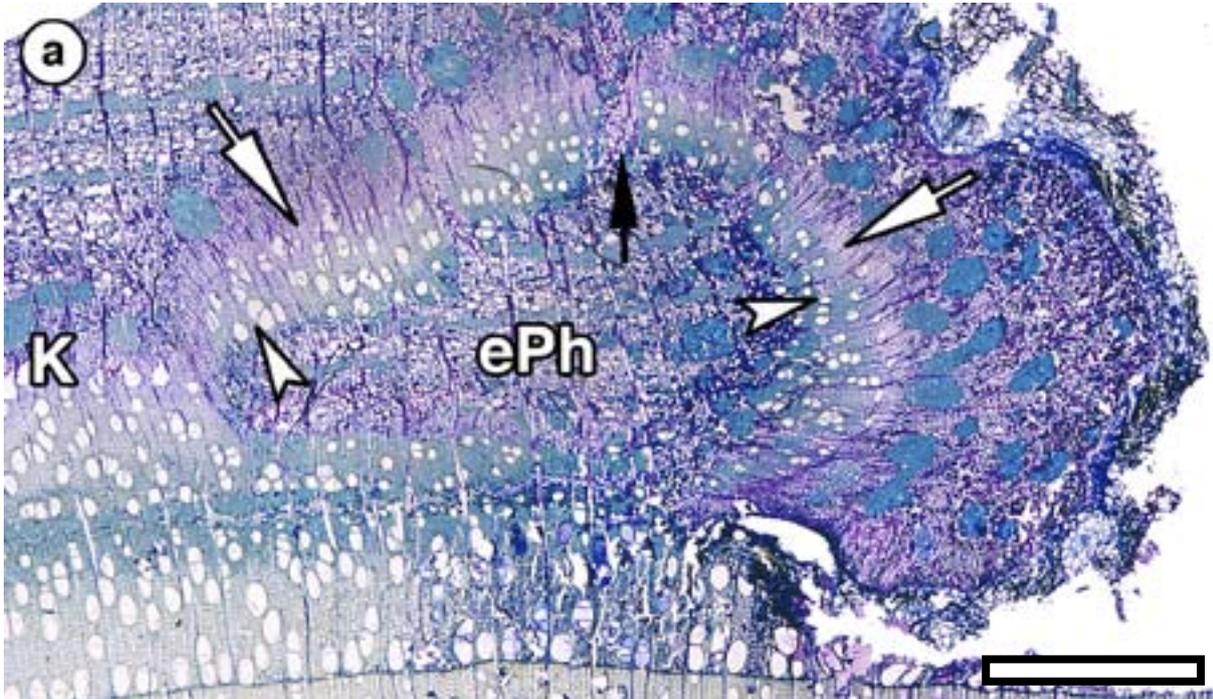


Abbildung 27a, b: Kambiumregeneration, Strategie A; acht Wochen nach der Verletzung; a) das Wundkambium (Pfeile) ist noch nicht durchgehend geschlossen (schwarze Pfeile), hat sich aber mit dem bereits zum Verletzungszeitpunkt vorhandenen Kambium (K) verbunden; Maßstab = 800 μm ; b) Detail eines Wundkambiumabschnittes, Kambiuminitialen (Pfeilspitzen), neu gebildetes Wundxylem (Wxy), eingeschlossenes Phloem (ePh), Phloemfasern (Pfeil); Maßstab = 200 μm ; Querschnitte; LM-Aufnahmen, Giemsa-Färbung

Zehn Wochen nach der Wundsetzung konnten demnach diese zwei Strategien der Kambiumregeneration deutlich daran unterschieden werden, ob zum Zeitpunkt der Verletzung vorhandenes Phloem vom neu gebildeten Wundxylem eingeschlossen wurde (Strategie A), oder nicht (Strategie B) (Abb. 28 a-d).

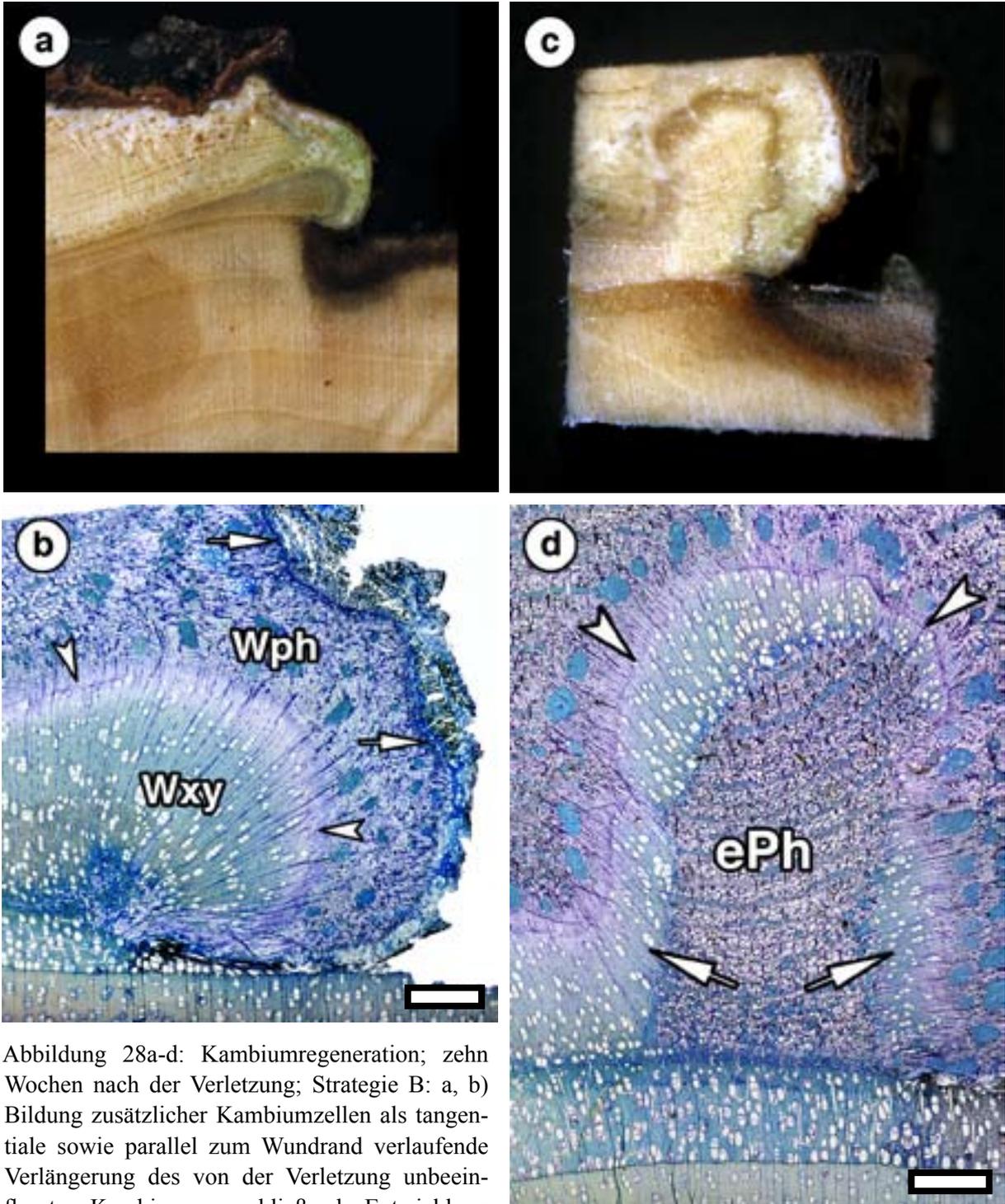


Abbildung 28a-d: Kambiumregeneration; zehn Wochen nach der Verletzung; Strategie B: a, b) Bildung zusätzlicher Kambiumzellen als tangentielle sowie parallel zum Wundrand verlaufende Verlängerung des von der Verletzung unbeeinflussten Kambiums; anschließende Entwicklung eines Kalluswulstes, bestehend aus Wundperiderm (Pfeile), Wundphloem (Wph), Wundkambium (Pfeilspitzen) und Wundxylem (Wxy); Maßstab = 800 µm; Strategie A: c, d) Wundxylementwicklung (Pfeile) durch ein das Phloem (ePh) einschließendes Wundkambium (Pfeilspitzen); Maßstab = 800 µm; makroskopische Abbildungen (a, c); Querschnitte; LM-Aufnahmen, Giemsa-Färbung

An der Regeneration des Kambiums sind den vorliegenden Beobachtungen nach zwei Zellarten beteiligt; Zellen des parenchymatischen Kallusgewebes, hervorgegangen aus undifferenzierten Xylemzellen, Kambiumzellen und Zellen des Phloems. Maßgeblich beteiligt sind dedifferenzierte und anschließend zu meristematischen Kambiumzellen redifferenzierte Zellen des sekundären Phloems.

Zusammenfassend können die beiden Strategien der Kambiumregeneration in drei (Strategie A) bzw. vier (Strategie B) Entwicklungsstufen gegliedert werden.

Strategie A, gegliedert in drei Entwicklungsstufen:

1- Entwicklung eines uniformen, parenchymatischen Gewebes am Wundrand, hervorgehend aus undifferenzierten Zellen des Xylems, Phloemzellen und Kambiumzellen; 2- Entwicklung eines Wundkambiums überwiegend innerhalb des differenzierten sekundären Phloems, das schließlich halbkreisförmig angeordnet ist und Bereiche des zum Verletzungszeitpunkt bereits vorhandenen Phloems einschließt; 3- Entwicklung von Wundxylem und -phloem durch das neue Wundkambium mit der Tendenz, einen Überwallungswulst zu bilden.

Strategie B, gegliedert in vier Entwicklungsstufen:

1- Entwicklung eines uniformen, parenchymatischen Kallusgewebes am Wundrand, hervorgehend aus undifferenzierten Zellen des Xylems, Phloemzellen und Kambiumzellen; 2- Entwicklung eines Wundkambiums innerhalb des parenchymatischen Kallusgewebes als eine tangentielle Verlängerung des von der Verletzung unbeeinflussten Kambiums; 3- Bildung strikt radial ausgerichteter Xylem- und Phloemzellen durch die neu gebildeten Wundkambiumabschnitte; 4- Verlängerung des Kambiums, das nun parallel zum senkrechten Wundrand verläuft und der abschließend folgenden Bildung von Wundphloem und -xylem.

3.2.2 MIKROSKOPISCHE UND UV-SPEKTROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DES VON DEM WUNDKAMBIUM GEBILDETEN WUNDXYLEMS

Die Modifikationen der Zellwände des durch ein regeneriertes Wundkambium gebildeten Wundxylems wurde mit Hilfe licht-, elektronenmikroskopischer und UV-spektroskopischer Methoden untersucht. Besondere Bedeutung wurde hierbei der Lignintopochemie beigemessen. Hierfür wurden Proben aus den am 24. Juni und 07. Juli 2002 bei den Kontrollentnahmen entstandenen Wunden (10 x 10 cm²) nach 37, 62 und 95 Wochen entnommen (Abb. 29).

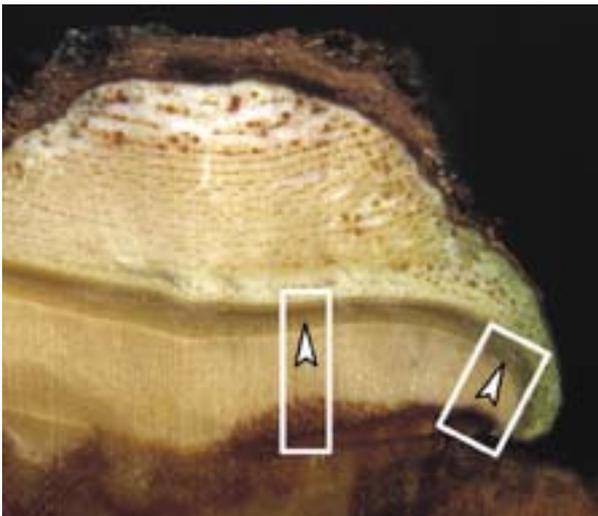


Abbildung 29: Seitlicher Kalluswulst; die Rechtecke kennzeichnen die Lage des für die TEM und UV-Spektroskopie entnommenen Xylems; die Pfeilspitzen zeigen auf Xylem, das in der zweiten Vegetationsperiode (2004) nach der Wundsetzung gebildet wurde.

3.2.2.1 STRUKTURELLE BESCHREIBUNG DES WUNDXYLMS DER VEGETATIONSPERIODEN 2002-2004

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen (Abb. 30a-e) zeigten, dass die Wundxylemzellen stark von der axialen Orientierung in einem von einer Verletzung unbeeinflussten Xylemgewebe abweichen, unabhängig davon, ob bei der Wundxylementwicklung Phloem eingeschlossen wurde oder nicht (Abb. 30b-e). Gefäße im Wundxylem zeichneten sich durch einen reduzierten Durchmesser und eine geringere Länge im Vergleich zu unmodifizierten Gefäßen aus und wiesen oft einen welligen, unregelmäßigen Verlauf verbunden mit einer deutlichen Abweichung von der normalen axialen Ausrichtung auf (Abb. 30d). Modifizierte Wundxylemfasern waren ebenfalls verkürzt und zeigten wie die Gefäße einen häufig axial welligen, ungeordneten Verlauf (Abb. 30b, d). Diese axialen Unregelmäßigkeiten waren bei einigen Gefäßen und Fasern so stark ausgeprägt, dass sie teilweise annähernd horizontal im Xylem verliefen (Abb. 30b-d). Je nach ihrer Lage im Kalluswulst verliefen sie hierbei fast senkrecht gegenüber den Holzstrahlen. Weiterhin wiesen die Wundxylemfasern im Vergleich zu unmodifizierten Fasern leicht verdickte Zellwände auf (Abb. 30e). Mit zunehmender Kallusbildung, d.h. auch mit zunehmendem zeitlichen Abstand vom Verletzungszeitpunkt, schwächten sich diese wundinduzierten Modifikationen wieder ab.

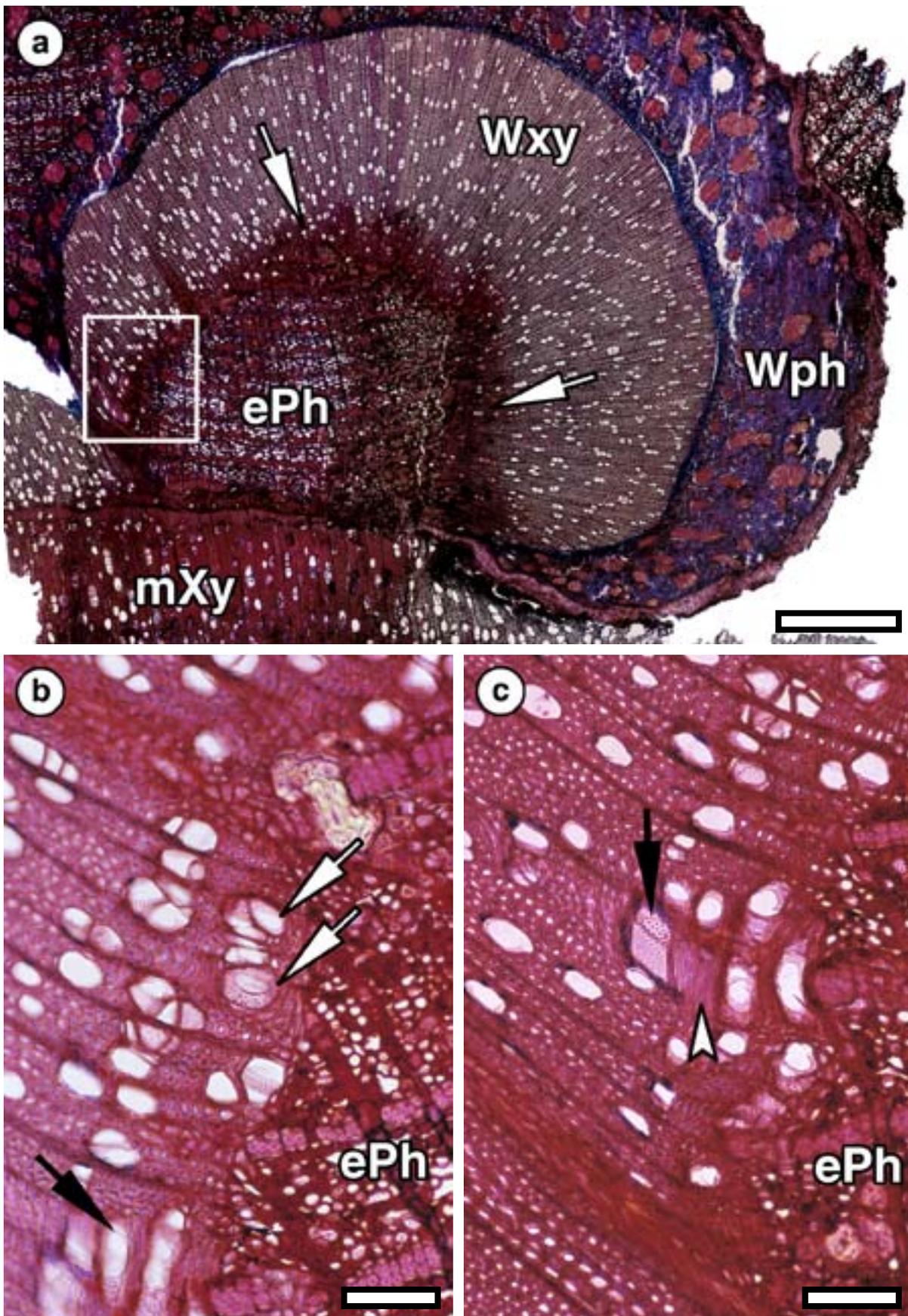
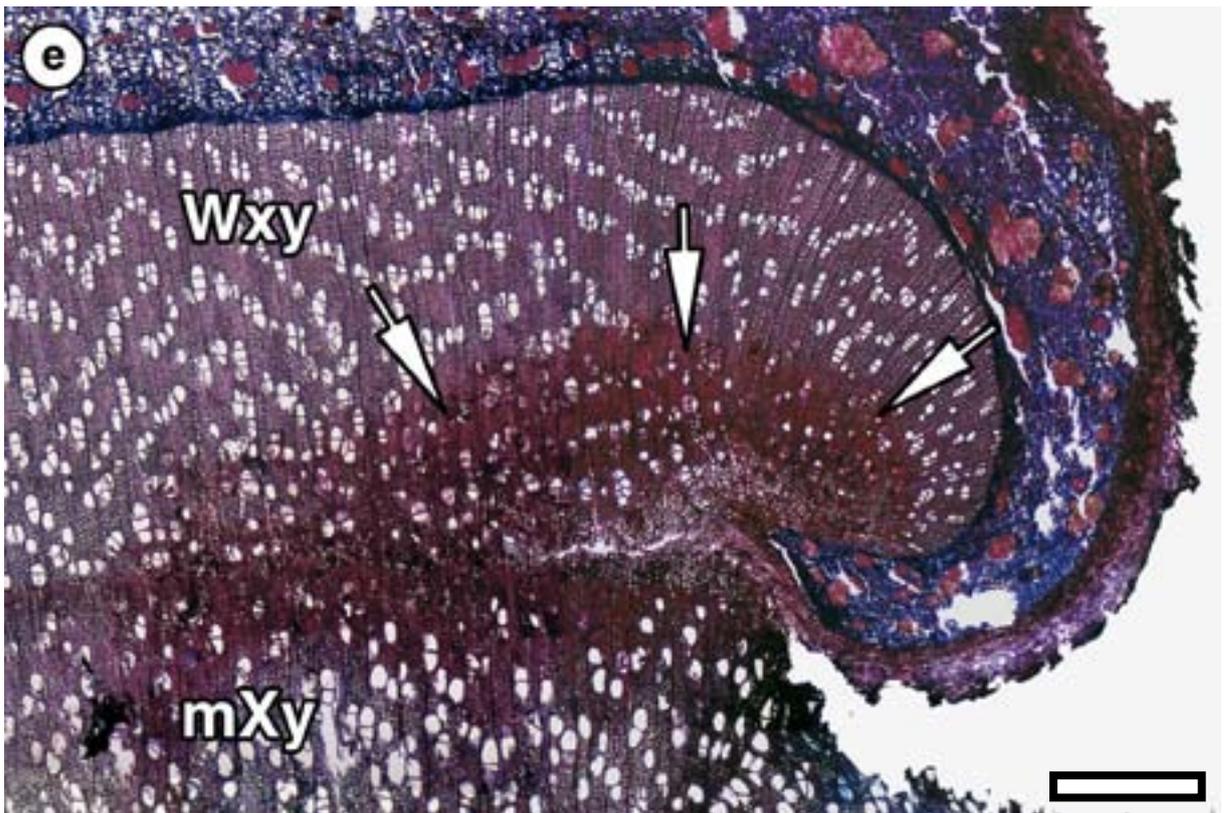
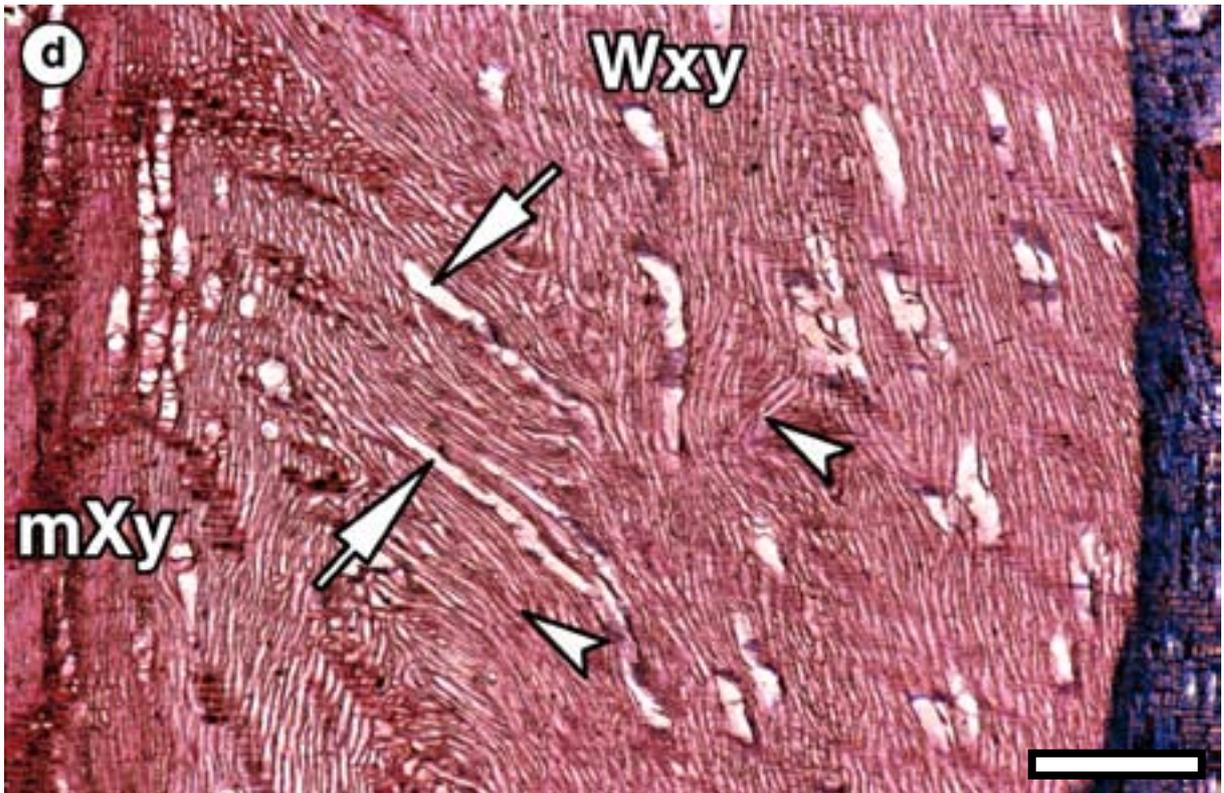


Abbildung 30a-e: Modifiziertes Wundxylem in Wunden mit eingeschlossenem Phloem, 41 Wochen nach der Verletzung (a-c) und ohne eingeschlossenes Phloem, 42 Wochen nach der Verletzung (d, e); a) seitlicher Kalluswulst mit vom Wundxylem (Wxy) eingeschlossenem Phloem (ePh) und an dieses anschließende Wundxylemfasern mit verdickter Zellwand (Pfeile); Wundphloem (Wph), modifiziertes Xylem (mXy); Bereich der Detailaufnahmen b, c (Rechteck); Maßstab = 400 μ m;



b, c) im Durchmesser reduzierte GefäÙe mit leichter radialer Abweichung von der axialen Ausrichtung (Pfeile) und annähernd horizontal verlaufende GefäÙe (schwarze Pfeile) im direkt an das eingeschlossene Phloem anschließende Wundxylem; Fasern (Pfeilspitze) mit radialer Abweichung von der Stammachse; Maßstab = 200 µm; d) modifiziertes Xylem (mXy) und Wundxylem (Wxy) mit GefäÙen (Pfeile) und Fasern (Pfeilspitzen), die eine starke axiale Abweichung aufweisen; Maßstab = 400 µm; e) deutlich erkennbare Zone von Wundxylemfasern mit verdickter Zellwand (Pfeile), angrenzend an das aus Kambiumzellen, parenchymatischen Zellen des Phloems und Zellen der Xylemdifferenzierungszone hervorgegangene Kallusparenchym; Maßstab = 400 µm; Querschnitte (a-c, e), Radialschnitt (d); LM-Aufnahmen, Safranin/Astrablau-Färbung

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben, dass die als erstes vom neuen Wundkambium gebildeten Wundxylemfasern zusätzliches Sekundärwandmaterial aufgelagert hatten (Abb. 31a, b; 32a). Nach der Bildung nur weniger zusätzlicher Zellreihen konnten jedoch keine klar erkennbaren Zellwandverstärkungen mehr festgestellt werden. Zellzwikel, die in den Jahren 2002 und 2003 nach der Verletzung gebildet wurden, bestanden aus für Pappeln ungewöhnlich elektronendichtem Material (Abb. 32b). Auch die Elektronendichte der Zellzwikel nahm wie zuvor die Sekundärwandstärke mit zunehmender Entfernung vom unmodifizierten Xylem ab. Innerhalb des im Jahr 2004 gebildeten Wundxylems schien sich sowohl die Zellwanddicke als auch die Elektronendichte der Zellzwikel den Werten unmodifizierter Xylemzellen (Abb. 31a, b) angeglichen zu haben. Ein weiteres Merkmal des Wundxylems, besonders jener Bereiche, die unmittelbar an zum Verletzungszeitpunkt vorhandenes Gewebe anschlossen, waren Strahlparenchymzellen mit starken Einlagerungen dunkel kontrastierter Inhaltsstoffe.

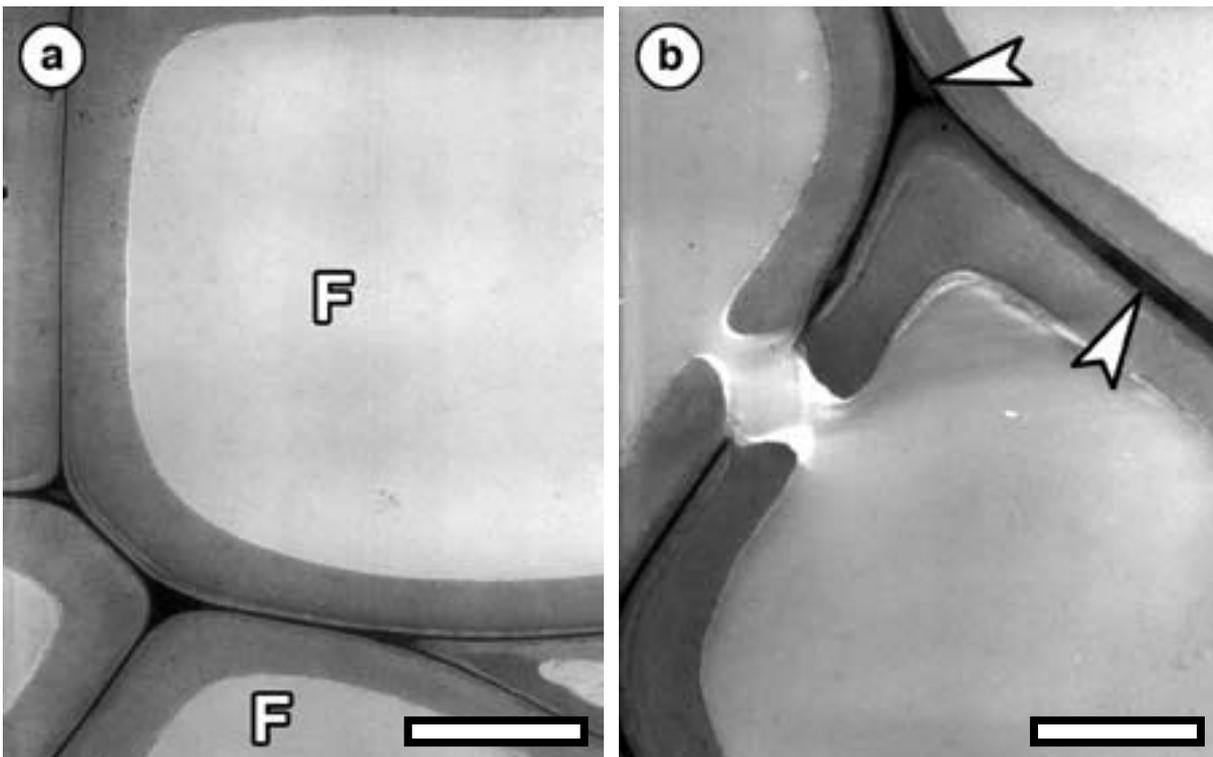


Abbildung 31a, b: Unmodifiziertes Pappelxylem; a) typische, dünnwandige Fasern (F); Maßstab = 3 μm ; b) Zellzwikel und zusammengesetzte Mittellamelle mit Bereichen weniger elektronendichten Materials (Pfeilspitzen); Maßstab = 2 μm ; Querschnitte; TEM-Aufnahmen, Kaliumpermanganatkontrastierung

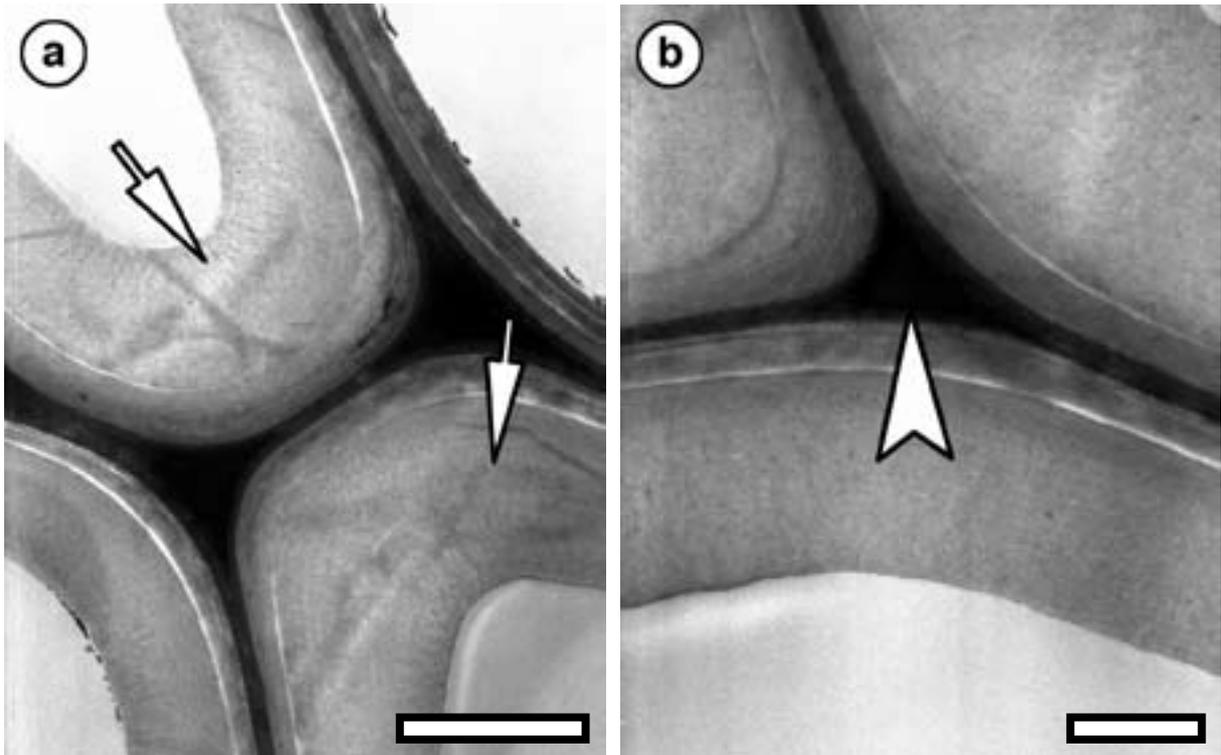


Abbildung 32a, b: Modifiziertes Wundxylem; a) Wundxylemfasern angrenzend an das zum Verletzungszeitpunkt vorhandene Xylem mit deutlichen Sekundärwandverstärkungen (Pfeil); Maßstab = 2 μm ; b) Zellwinkeln (Pfeilspitze) mit ungewöhnlich hoher Elektronendichte; Maßstab = 1 μm ; Querschnitte; TEM-Aufnahmen, Osmiumkontrastierung

3.2.2.2 UV-SPEKTROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DES UNMODIFIZIERTEN KONTROLLGEWEBES

Zur Darstellung der Ligninverteilung sowie der semiquantitativen Bestimmung der Ligninkonzentration und -zusammensetzung in unmodifiziertem Kontrollgewebe und modifiziertem Wundxylem wurden die Zellen mit UV-mikrospektrophotometrischen Methoden untersucht. Für die detaillierte Darstellung der Mikroverteilung des Lignins in den verschiedenen Zellwandschichten wurden die Gewebe zunächst mit dem „Flächen-Scanning-Verfahren“ bei einer konstanten Wellenlänge von 280 nm spektroskopiert. An den gleichen Proben wurden auch Punktmessungen mit einem Durchmesser von 1 μm bei variierender Wellenlänge von 240 bis 400 nm durchgeführt, welche eine semiquantitative Bestimmung der Ligninzusammensetzung ermöglichten.

Beim „Flächen-Scanning“ des unmodifizierten sekundären Xylems zeigten Frühholzfasern und -gefäße mit dünnen S2-Wandschichten relativ geringe und über den Querschnitt der S2 uniforme Absorptionswerte um Abs_{280} 0,09 bis Abs_{280} 0,16 (Abb. 33a-c). Die zusammengesetzte Mittellamelle, eine Zusammenfassung aus Primärwand und Mittellamelle, zeigte höhere Absorptionswerte (Abs_{280} 0,16-0,23). Die höchsten Absorptionen von Abs_{280} 0,35-0,67 konnten in einigen Zellwinkeln nahe Gefäßen gemessen werden. Im Vergleich zu den Frühholzfasern zeigten die termi-

nalen Spätholzfaseren leicht erhöhte Werte, besonders in der zusammengesetzten Mittellamelle (Abs_{280} 0,23-0,35). Die stärker ausgeprägte S2-Schicht der Spätholzfaseren ergab Absorptionwerte von Abs_{280} 0,09-0,23. In Zellwinkeln dominierten Werte von Abs_{280} 0,35-0,67 (Abb. 33d).

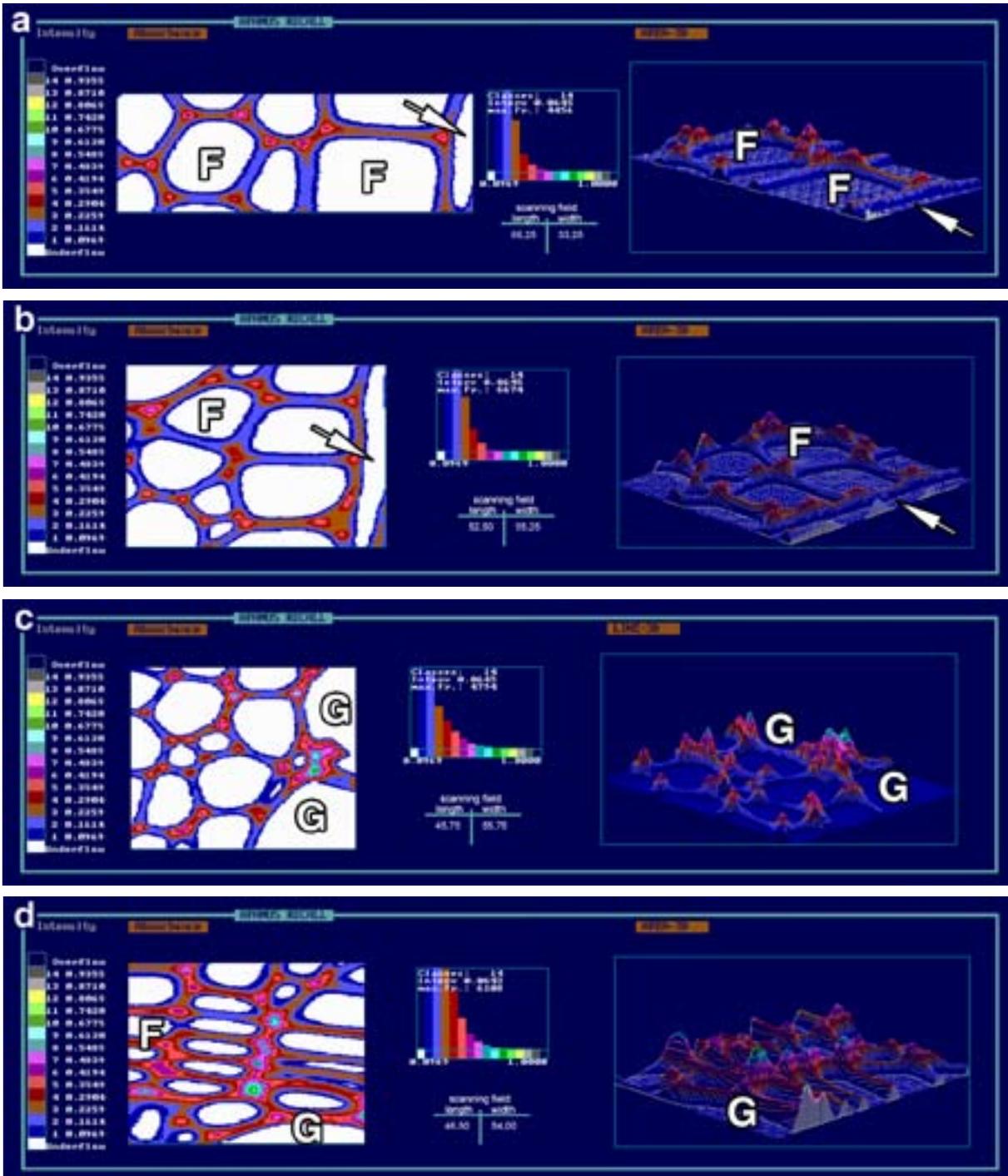


Abbildung 33a-d: UV-spektroskopische Scanningprofile von unmodifiziertem Pappelxylem; Frühholzbereich (a-c); Spätholzfaseren an der Jahrringgrenze (d); Fasern (F); Gefäße (G), Holzstrahlparenchym (Pfeile); die farbigen Pixel repräsentieren die verschieden hohen Absorptionen innerhalb der Zellwände bei einer Wellenlänge von 280 nm

Punktmessungen bei variierender Wellenlänge ergaben für die dünnen Sekundärwände der unmodifizierten Pappelfasern mittlere Absorptionsmaxima bei einer Wellenlänge von 270-272 nm und eine nur schwach ausgeprägte Absorptionsspitze (Abb. 34). Auch für die zusammengesetzte Mittellamelle lagen die Absorptionsmaxima bei einer Wellenlänge von 272 nm, jedoch bei einem erhöhten Absorptionsniveau (Abb. 34). Für Zellzwickel bestätigten die Punktmessungen das schon bei den Flächen-Scannings festgestellte hohe Absorptionsniveau bei einer Wellenlänge von 278 nm.

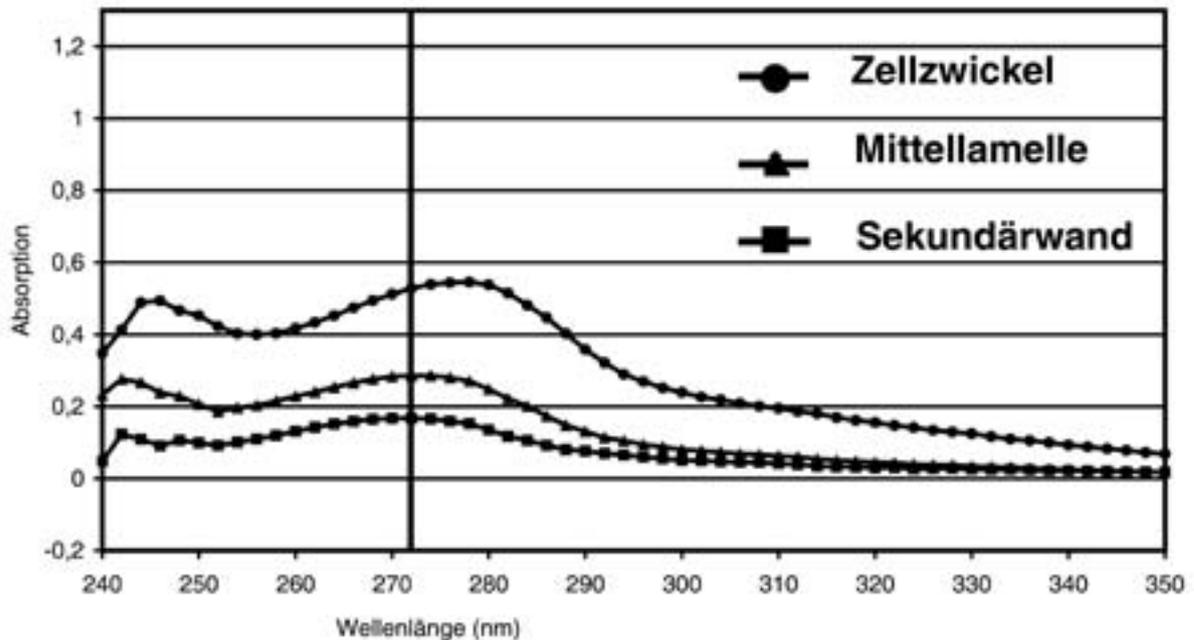


Abbildung 34: Repräsentative UV-Absorptionsspektren von unmodifizierten Xylemfasern; Absorptionsmaxima der Zellzwickel bei 278 nm, der zusammengesetzten Mittellamelle bei 272 nm und der Sekundärwand bei 270-272 nm; die senkrechte Linie markiert eine Wellenlänge von 272 nm

Neben der Charakterisierung durch die eigentlichen Spektren kann mit Hilfe des Verhältnisses der Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 280 nm und 260 nm ($A_{280} : A_{260}$) eine ergänzende Aussage über das semiquantitative Konzentrationsverhältnis von den bei Pappeln auftretenden p-Hydroxy-phenylpropan-Einheiten zu den Guaiacyl- und Syringyllignineinheiten getroffen werden (Tabelle 4). Dies ist möglich, da sich die Absorptionsspektren von Guaiacyl- und Syringyl-Ligninkomponenten stark von denen der p-Hydroxy-phenylpropan-Bestandteile unterscheiden. Während die Absorptionsmaxima von Syringyl- und Guaiacyleinheiten zwischen 270-280 nm Wellenlänge liegen, befindet sich das der p-Hydroxy-phenylpropan-Bestandteile bei 260 nm, also im Bereich des Minimums der beiden anderen Bestandteile. Eine Veränderung des Verhältnisses ($A_{280} : A_{260}$) deutet damit auf eine veränderte Ligninzusammensetzung hin.

	$A_{280} : A_{260}$		
Probe	Sekundärwand	zusammengesetzte Mittellamelle	Zellzwickel
unmodifizierte Xylemfasern	1,02	1,09	1,29

Tabelle 4: UV-Absorptionsverhältnis $A_{280} : A_{260}$ verschiedener Zellwandschichten unmodifizierter Xylemfasern

Bei den UV-mikrospektrophotometrischen Untersuchungen des vom regenerierten Wundkambium gebildeten Wundxylems wurde zunächst in unmittelbarer Nähe zu dem zum Verletzungszeitpunkt vorhandenen Xylem begonnen und dann in zunehmendem räumlichen und damit auch zeitlichen Abstand zur Verletzung fortgeführt. Es wurde zunächst das in den Vegetationsperioden 2002 bis 2003 gebildete modifizierte Xylem betrachtet und danach jenes der Vegetationsperiode 2004.

3.2.2.3 UV-SPEKTROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DES WUNDXYLEMS DER VEGETATIONSPERIODEN 2002 UND 2003

Abbildung 35 zeigt repräsentative UV-spektroskopische Scanningprofile eines Wundxylembereiches, der in der Vegetationsperiode 2002 gebildet wurde und sich nahe an zum Verletzungszeitpunkt vorhandenem Xylem befindet. Die Holzstrahlparenchymzellen innerhalb dieses Gewebes waren häufig mit kondensierten akzessorischen Bestandteilen gefüllt (Abb. 35a). Das leicht erhöhte Absorptionsmaximum der nur wenig verdickten Sekundärwand bewegte sich zwischen Abs_{280} 0,09 und Abs_{280} 0,23. Die Absorptionswerte der zusammengesetzten Mittellamelle schwankten meist zwischen Abs_{280} 0,23 und Abs_{280} 0,48, konnten aber in Gefäßnähe auch Werte von Abs_{280} 0,61 erreichen (Abb. 35b). In den Zellzwickeln lagen sie überwiegend zwischen Werten von Abs_{280} 0,42 bis 0,87, erreichten aber auch Werte oberhalb von Abs_{280} 0,93 (Abb. 35a, b). Abweichend von diesen grundlegenden Tendenzen zeigten sich zwei räumlich begrenzte Bereiche des in der Vegetationsperiode 2002 gebildeten Wundxylems. Die Fasern der Jahrringgrenze zeigten in ihrer Sekundärwand höhere Absorptionswerte (bis Abs_{280} 0,29) (Abb. 35c). In Zonen, in denen Wundxylemfasern in unmittelbarer Nähe des auch in späteren Entwicklungsstadien vorhandenen, aus dem Kallusparenchym hervorgegangenen, ungeordneten Gewebe lagen, war deren Sekundärwand häufig stärker ausgeprägt (Abb. 35d).

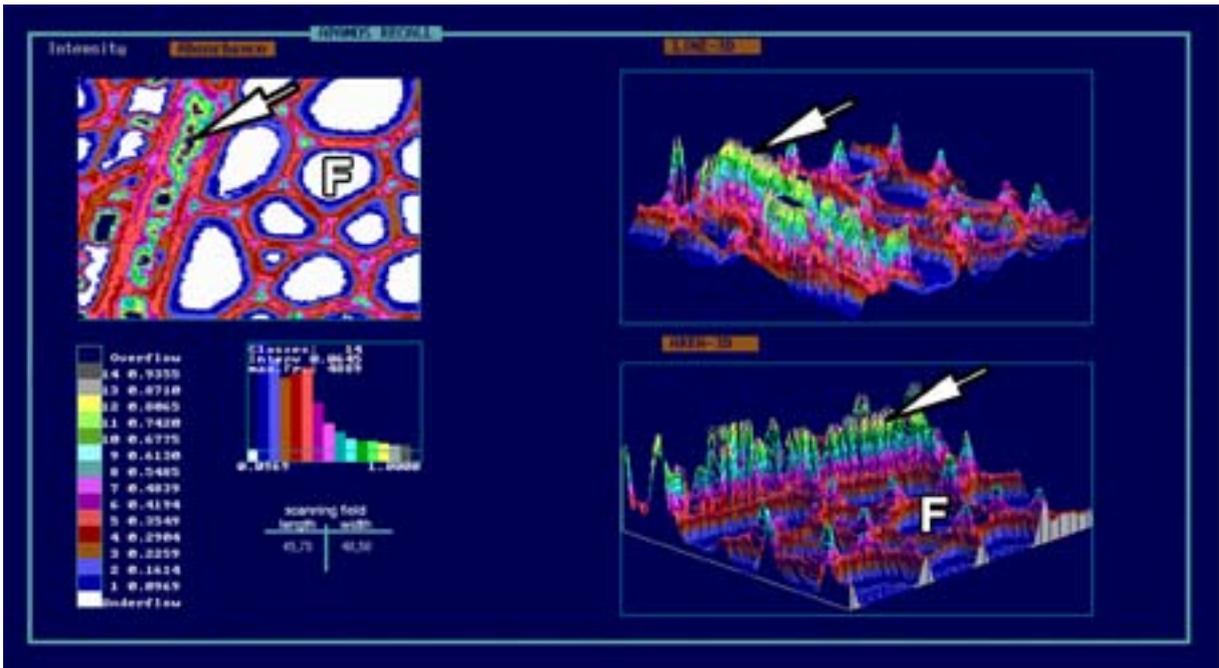


Abbildung 35a: UV-spektroskopische Scanningprofile von Wundxylem gebildet 2002; Fasern (F) mit leicht verdickten Sekundärwänden und mit Inhaltsstoffen gefülltes Holzstrahlparenchym (Pfeile)

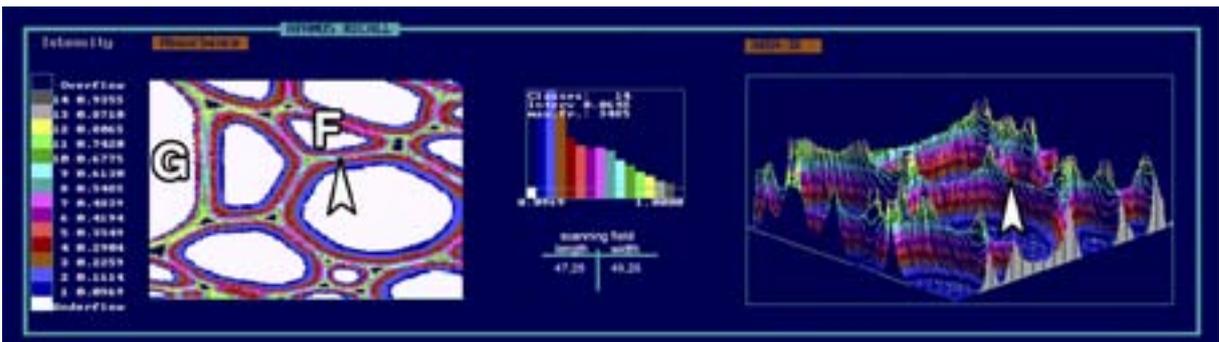


Abbildung 35b: UV-spektroskopische Scanningprofile von Wundxylem gebildet 2002; Fasern (F) in der Nähe eines Gefäßes (G) mit höheren Absorptionswerten in der Mittellamelle (Pfeilspitzen)

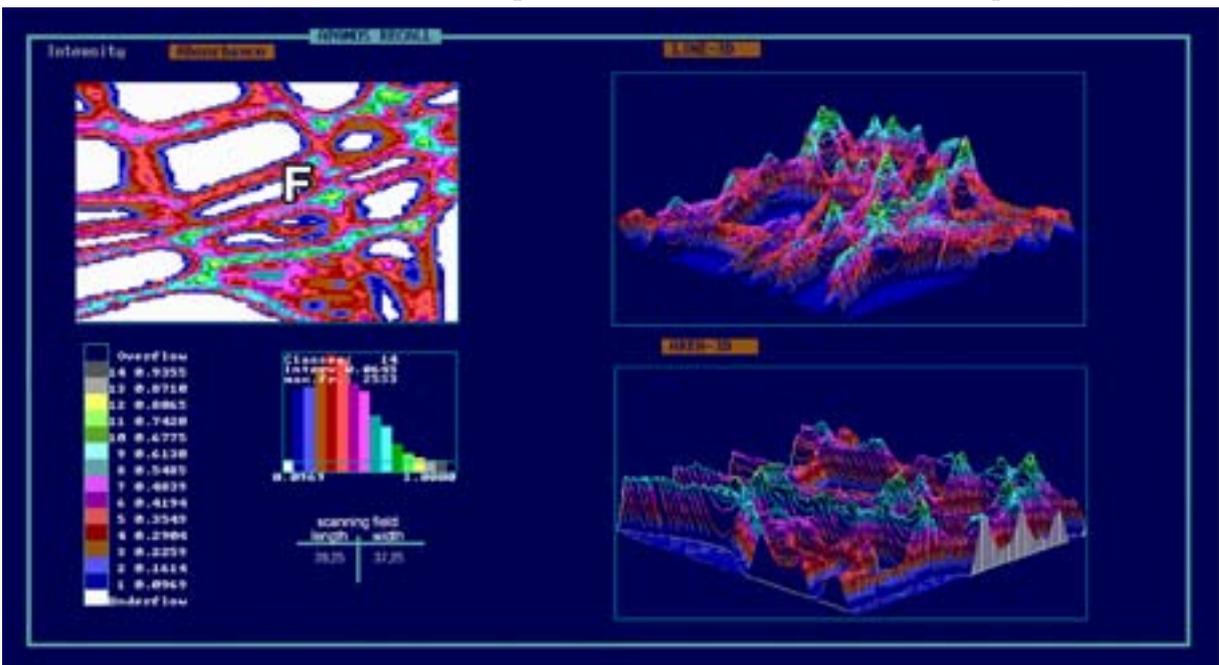


Abbildung 35c: UV-spektroskopische Scanningprofile von Wundxylem gebildet 2002; abgeflachte Fasern (F) der Jahringgrenze 2002/03 mit stark erhöhten Absorptionmaxima in der S2

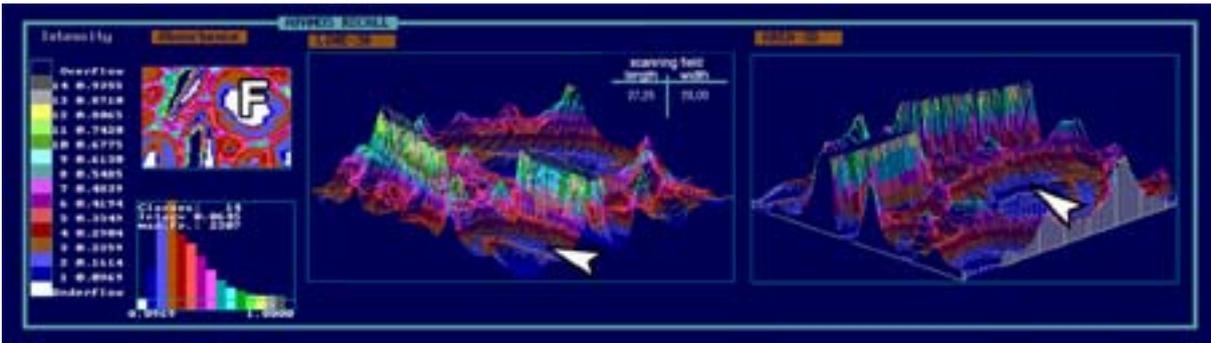


Abbildung 35d: UV-spektroskopische Scanningprofile von Wundxylem gebildet 2002; Fasern (F) mit zusätzlich verstärkten Sekundärwänden (Pfeilspitzen)

Eine Zuordnung der nach der Verletzung gebildeten Zellen zu den einzelnen Vegetationsperioden der Jahre 2002 und 2003 war in zahlreichen Wundgewebeabschnitten nicht exakt möglich, da klare Merkmale wie z.B. die kontinuierliche Abnahme der Gefäßdurchmesser fehlten. Aus diesem Grund werden die beiden Vegetationsperioden in der Folge zumeist zusammengefasst.

Die Absorptionswerte in der zusammengesetzten Mittellamelle modifizierter Fasern, die sich in späteren Stadien der Wundxylembildung (2002-2003) entwickelt hatten, zeigten weiterhin eine leichte Erhöhung (Abs_{280} 0,23 bis Abs_{280} 0,48), ebenso wie die Zellwinkel, deren Absorptionswerte von Abs_{280} 0,42 bis zu Werten von über Abs_{280} 0,93 reichten. Im Gegensatz hierzu schienen die Sekundärwanddicke sowie die Absorptionswerte in der S2 wieder vergleichbar zu denen unmodifizierter Xylemfasern (Abb. 36a). Die Fasern des Wundxylems, das kurz vor dem Ende der Vegetationsperiode 2003 gebildet wurde, zeigten Absorptionsmaxima der Sekundärwand auf z.T. immer noch leicht erhöhtem Niveau, wogegen sich die Maxima der zusammengesetzten Mittellamelle weiter auf durchschnittliche Werte zwischen Abs_{280} 0,23 bis Abs_{280} 0,35 verringerten (Abb. 36b). Die Absorptionsmaxima der Zellwinkel hatten ebenfalls eine leichte Reduzierung erfahren und lagen mit Werten um Abs_{280} 0,35 bis Abs_{280} 0,87 weiterhin oberhalb der Maxima unmodifizierter Fasern (Abb. 36c). Innerhalb der letzten in der Vegetationsperiode 2003 gebildeten Zellreihen stiegen, wie auch in von einer Verletzung unbeeinflusstem Gewebe, die UV-spektroskopisch gemessenen Absorptionswerte leicht an (Abb. 36d).

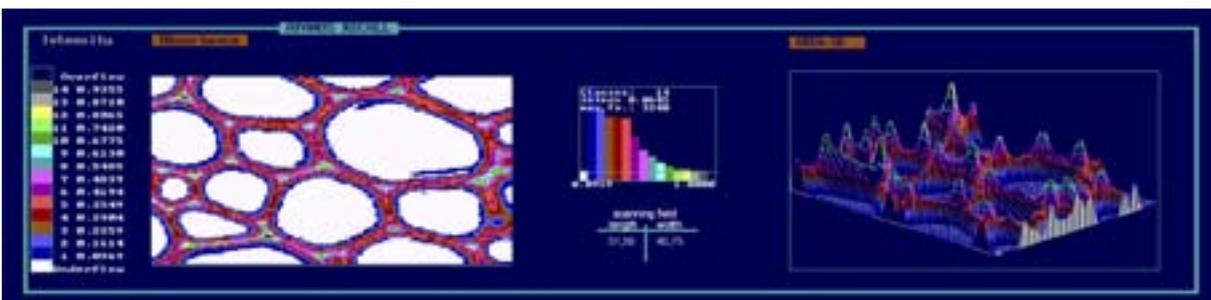


Abbildung 36a: UV-spektroskopische Scanningprofile von Wundxylem; während späterer Stadien der Wundxylembildung (2002-2003) gebildete Fasern ohne Sekundärwandverdickungen und leicht erhöhten Absorptionswerten

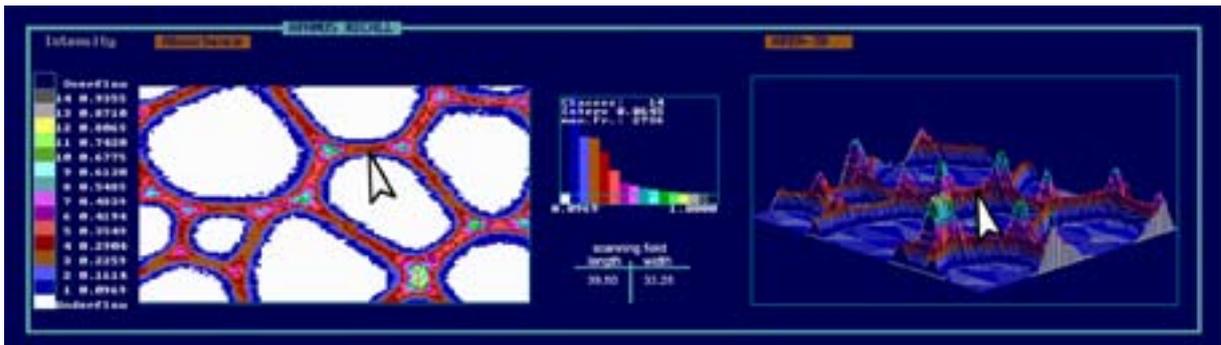


Abbildung 36b: UV-spektroskopische Scanningprofile von Wundxylem; zum Ende der ersten Vegetationsperiode des auf die Verletzung folgenden Jahres (2003) gebildet; wieder verringerte, sich den Werten des unmodifizierten Xylems nähernde Absorptionsmaxima der zusammengesetzten Mittellamelle (Pfeilspitze) von Fasern

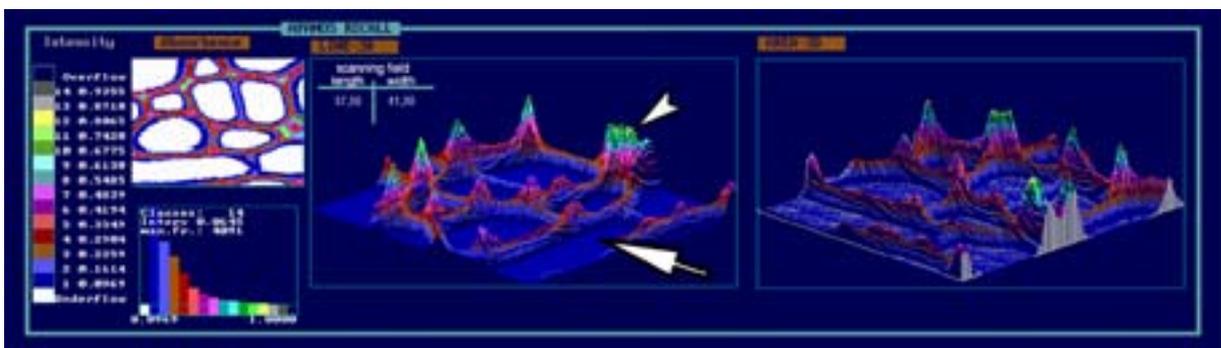


Abbildung 36c: UV-spektroskopische Scanningprofile von Wundxylem; zum Ende der ersten Vegetationsperiode des auf die Verletzung folgenden Jahres (2003) gebildet; Zellzwinkel zeigen trotz der abnehmenden Absorptionsmaxima Werte, die über denen der Kontrollen liegen (Pfeilspitzen); Holzstrahl (Pfeil)

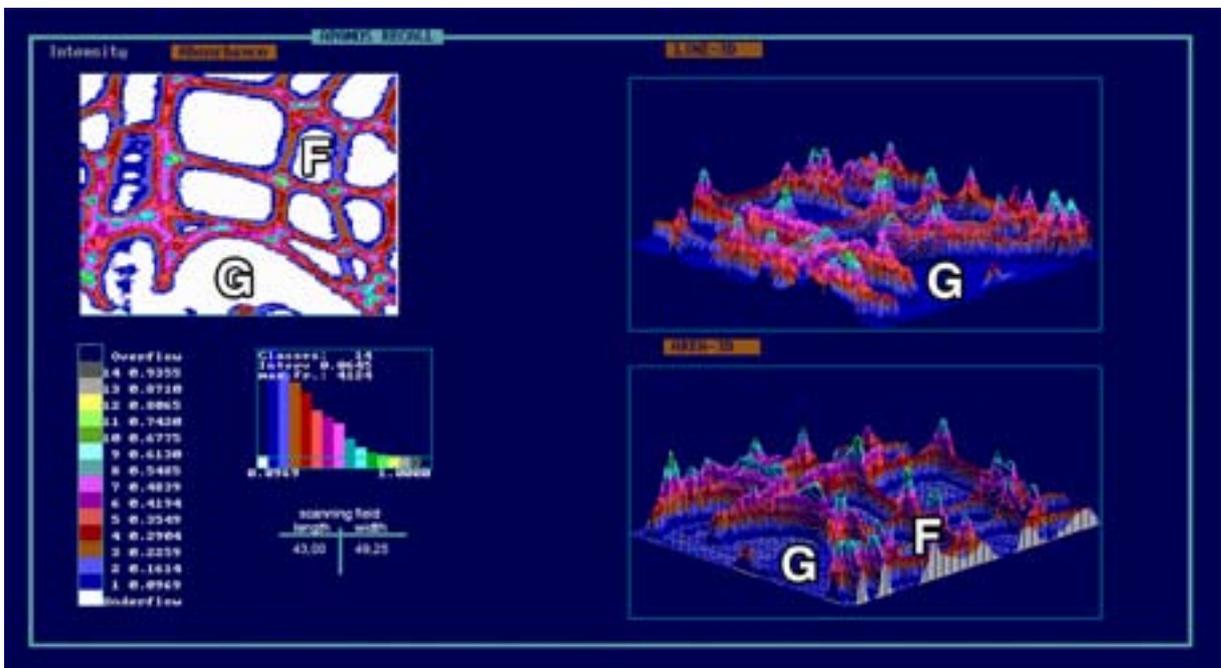


Abbildung 36d: UV-spektroskopische Scanningprofile von Wundxylem, das am Ende der ersten Vegetationsperiode des auf die Verletzung folgenden Jahres (2003) gebildet wurde; leichter Anstieg der Absorptionswerte bei Sekundärwänden und Zellzwinkel von Spätholzfasern (F); Frühholzgefäße (G) unmittelbar an der Jahrringgrenze liegend

Das bis zum Ende der Vegetationsperiode 2003 gebildete Wundxylem zeigte bei UV-spektroskopischen Punktmessungen in einem Wellenlängenbereich von 240 bis 350 nm, dass sich die Wellenlängen der Absorptionsmaxima der Sekundärwand von Kontrollwerten zwischen 270 und 272 nm auf 274 nm verschoben hatten und gleichzeitig das $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnis von 1,02 auf mittlere Werte von 1,22 anstieg (Tabelle 5; Abb. 37). Auch bei der zusammengesetzten Mittellamelle stieg dieses Verhältnis von 1,09 auf einen Wert von 1,22. Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums der Mittellamelle erhöhte sich von 272 bei Kontrollen auf 276 nm. Im Gegensatz dazu sank das $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnis der Zellzwickel von 1,29 auf 1,23, während das Absorptionsmaximum hier unverändert bei 278 nm lag (Tabelle 5; Abb. 37).

	$A_{280} : A_{260}$		
Probe	Sekundärwand	zusammengesetzte Mittellamelle	Zellzwickel
modifizierte Xylemfasern	1,22	1,22	1,23

Tabelle 5: UV-Absorptionsverhältnis $A_{280} : A_{260}$ verschiedener Zellwandschichten modifizierter Xylemfasern der Vegetationsperioden 2002 und 2003

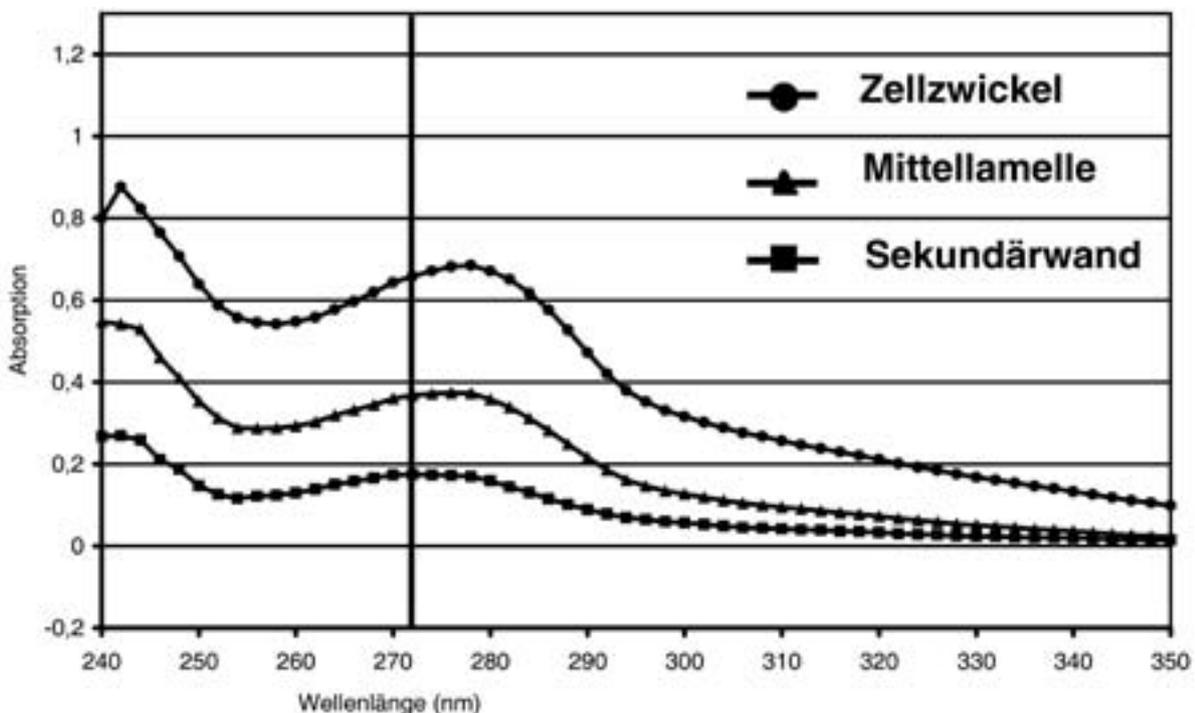


Abbildung 37: Repräsentative UV-Absorptionsspektren von modifizierten, in den Vegetationsperioden der Jahre 2002 und 2003 gebildeten Wundxylemfasern; Absorptionsmaxima der Zellzwickel bei 278 nm, der zusammengesetzten Mittellamelle bei 276 nm und der Sekundärwand bei 274 nm; die senkrechte Linie markiert eine Wellenlänge von 272 nm

3.2.2.4 UV-SPEKTROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DES WUNDXYLEMS DER VEGETATIONSPERIODE 2004

Die Sekundärwände von Wundxylemfasern, die in der Vegetationsperiode 2004, also fast 2 Jahre nach der Verletzung gebildet wurden, ergaben Absorptionsmaxima um Abs_{280} 0,09 (Abb. 38). Diese Werte lagen auf dem Niveau unbeeinflusster Fasern. Auch die Absorptionswerte der zusammengesetzten Mittellamellen mit Abs_{280} 0,16 bis Abs_{280} 0,23 und der Zellzwickel mit Abs_{280} 0,35 bis Abs_{280} 0,74 lagen nun wieder auf Kontrollniveau (Abb. 38).

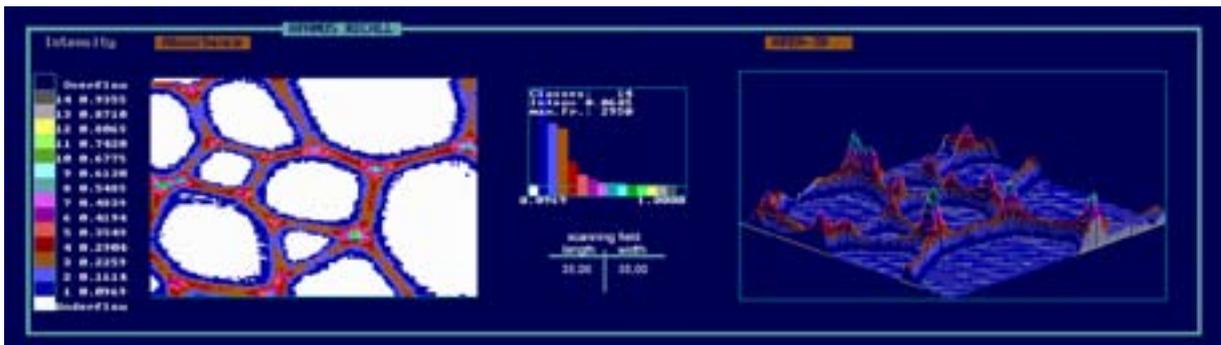


Abbildung 38: UV-spektroskopische Scanningprofile von Wundxylem, gebildet zu Beginn der zweiten Vegetationsperiode (2004) nach der Wundsetzung; Frühholzfaser mit erhöhten Absorptionswerten nur in wenigen Zellzwickel

Im Gegensatz zu den sich normalisierenden Absorptionsniveaus der Flächen-Scannings zeigten die UV-spektroskopischen Punktmessungen gegenüber den Referenzproben Verschiebungen der Absorptionsmaxima und daraus resultierend auch veränderte $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnisse (Tabelle 6; Abb. 39). So lagen die Wellenlängen der Absorptionsmaxima der Sekundärwände bei 272 nm und die der zusammengesetzten Mittellamellen erhöhten sich auf 274-276 nm. Für die S2-Schicht errechneten sich erhöhte $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnisse von 1,23 und für die zusammengesetzte Mittellamelle von 1,21 (Tabelle 6). In den Zellzwickeln sank hingegen das $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnis weiter auf 1,21 ab, und auch die Wellenlängen der Absorptionsmaxima verschoben sich zu kürzeren Längen auf etwa 276 nm.

	$A_{280} : A_{260}$		
Probe	Sekundärwand	zusammengesetzte Mittellamelle	Zellzwickel
modifizierte Xylemfasern	1,23	1,21	1,21

Tabelle 6: UV-Absorptionsverhältnis $A_{280} : A_{260}$ verschiedener Zellwandschichten bei modifizierten Xylemfasern, die in der Vegetationsperiode 2004, also etwa 2 Jahre nach der Verletzung gebildet wurden.

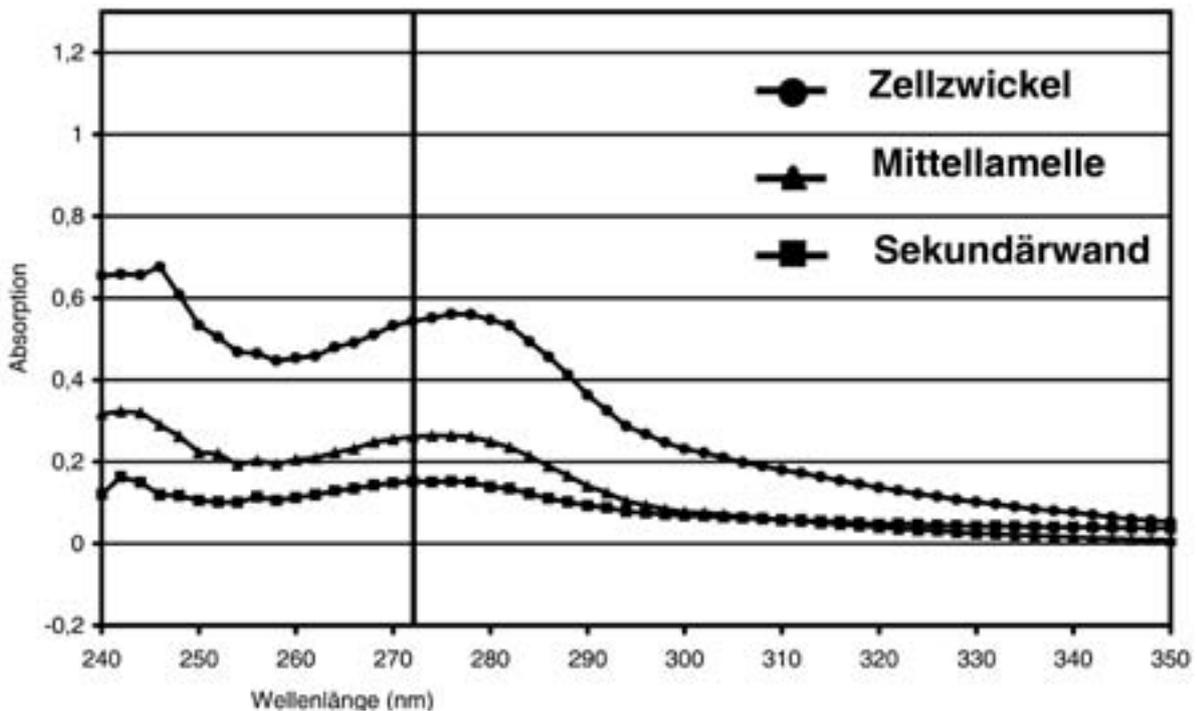


Abbildung 39: Repräsentative UV-Absorptionsspektren von modifizierten, in der Vegetationsperiode des Jahres 2004 gebildeten Wundxylemfasern mit verschobenen Absorptionsmaxima; Absorptionsmaxima der Zellzwickel bei 276 nm, der zusammengesetzten Mittellamelle bei 274-276 nm und der Sekundärwand bei 272 nm; die senkrechte Linie markiert eine Wellenlänge von 272 nm

Die mikroskopischen und UV-mikrospektrophotometrischen Untersuchungen haben gezeigt, dass sich das von einem regenerierten Wundkambium gebildete Wundxylem von dem von einer Verletzung unbeeinflussten Xylem unterscheidet. Diese Modifikationen, wie z.B. veränderte Zellartenanteile, abweichende axiale Orientierung, ungeordnete Ausrichtung der verkürzten Gefäße und Fasern sowie eine veränderte Zellwandzusammensetzung, nehmen mit zunehmendem zeitlichem wie auch räumlichem Abstand von der Verletzung ab und nähern sich wieder den Werten des Referenzmaterials.

3.2.3 MIKROSKOPISCHE UND UV-SPEKTROSKOPISCHE BESCHREIBUNG DER DURCH EINE VERLETZUNG INDUZIERTEN VERÄNDERUNGEN INNERHALB DES ZUM VERLETZUNGSZEITPUNKT DIFFERENZIERENDEN XYLEMS

Zur Bestimmung des Einflusses einer Verletzung auf das zum Verletzungszeitpunkt differenzierende Xylem dienten vier *Populus tremula* x *P. tremuloides*-Hybriden und eine *Populus tremula*. Untersucht wurden im Schwerpunkt Wunden vom 7. Juli 2002 und 23. Juni 2003 nach 2, 4, 10, 17, 62 und 95 Wochen.

Lichtmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass eine Verletzung die Entwicklung von differenzierenden Xylemzellen beeinflusst. Diese Zellen befinden sich stets in der Übergangszone zwischen dem vor dem Verletzungszeitpunkt gebildeten Xylem und nach der Verletzung angelegten Geweben (Abb. 40a-c).

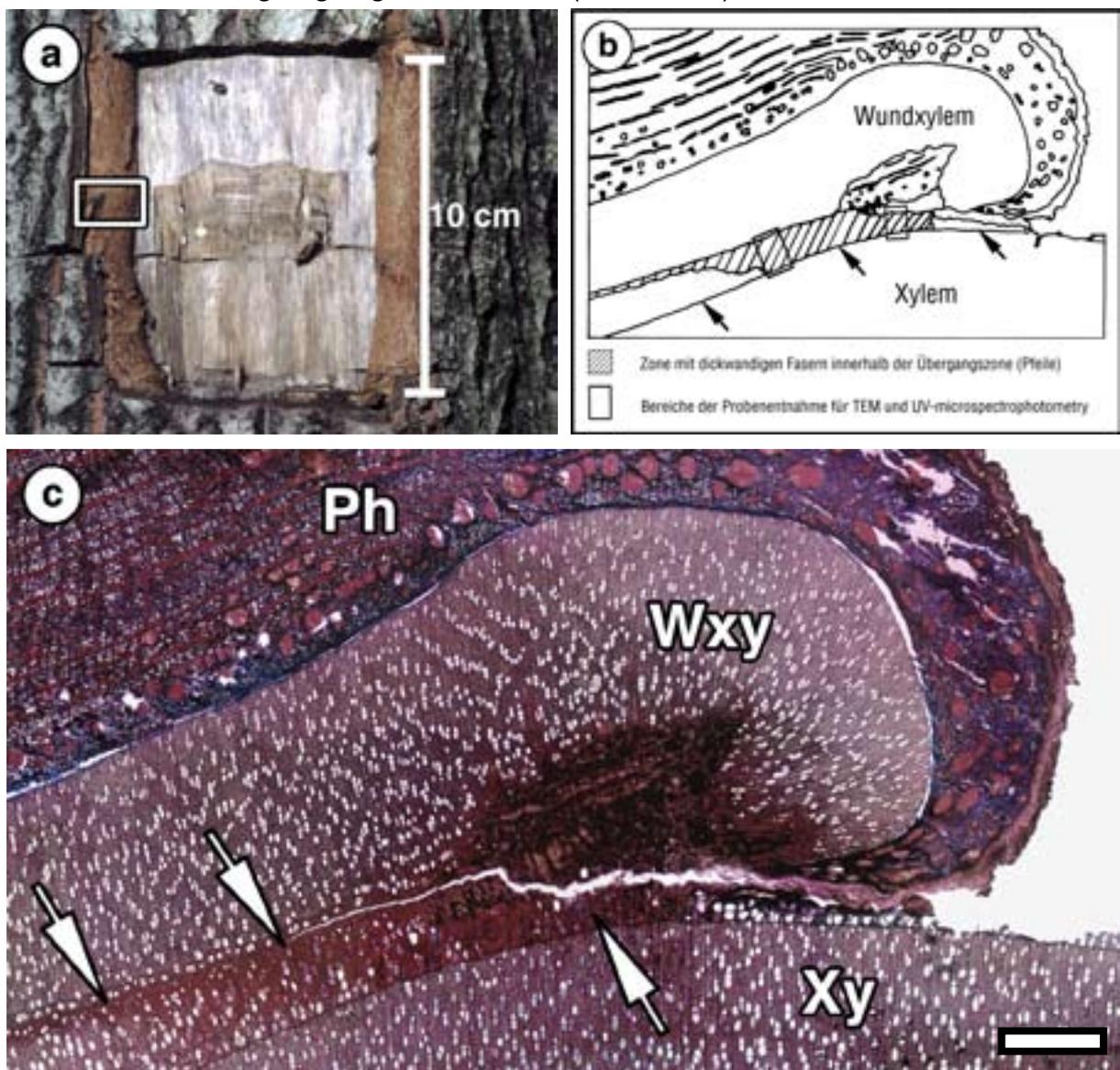


Abbildung 40a-c: Kallus mit Übergangszone zwischen vor und nach der Verletzung gebildetem Xylem; a) Entnahmebereich innerhalb des seitlichen Überwallungswulstes (Kästchen); b) Schema eines Querschnittes durch eine solche Probe mit der Zone modifizierter Fasern (Schraffur) in der Übergangszone (Pfeile); Lage der Probenbereiche für TEM und UV-Mikrospektrophotometrie (Kästchen); c) Querschnitt durch einen Kallus nach 37 Wochen Reaktionszeit, Phloem (Ph), Wundxylem (Wxy), Xylem (Xy), Zone modifizierter Fasern (Pfeile); Maßstab = 600 µm; LM-Aufnahme, Safranin/Astrablau-Färbung

In der Zone des zum Verletzungszeitpunkt differenzierenden Xylems zeigte sich als Verletzungsreaktion die Entwicklung deutlich dickwandiger Fasern, die in dieser Form in Kontrollen nicht gebildet wurden (Abb. 41a, b). Das Vorkommen septierter Fasern, teilweise mit Calciumoxalatkrystallen, war ein weiteres strukturelles Merkmal in dieser Übergangszone (Abb. 41c).

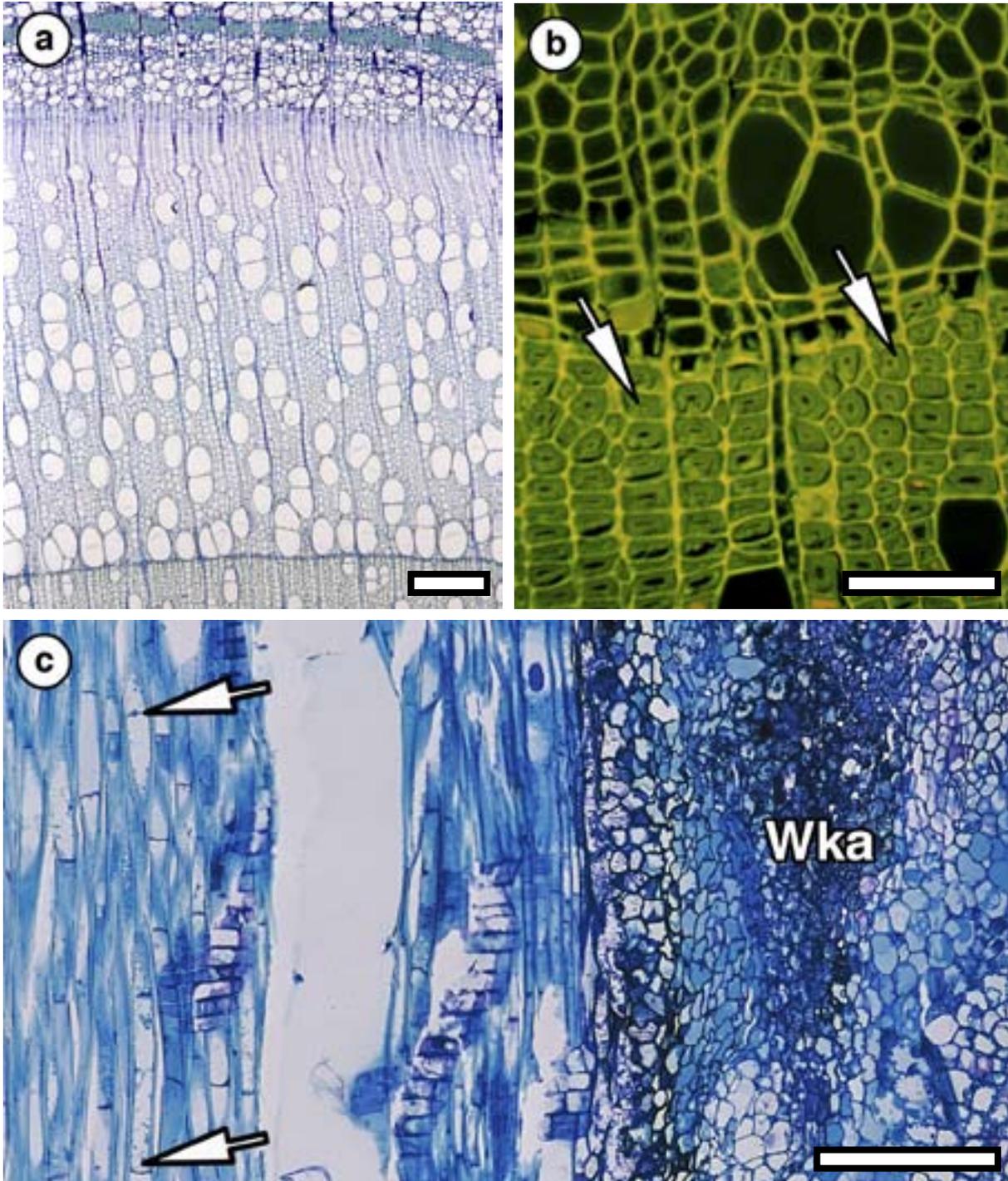


Abbildung 41a-c: LM-Aufnahmen unmodifizierter Kontrollen und modifizierten Gewebes der Übergangszone; a) unmodifiziertes Pappelxylem mit den typischen, dünnwandigen Fasern; Maßstab = 600 μ m; Querschnitt, Giemsa-Färbung; b) modifizierte Xylemfasern mit stark verdickten Zellwänden, acht Wochen nach der Verletzung (Pfeile); intensivere Fluoreszenz deutet auf einen höheren Ligningehalt hin; Maßstab = 100 μ m; Querschnitt, Neutralrotfärbung unter UV-Anregung; c) Übergangszonen-Bereich mit weniger deutlichen Wandverdickungen acht Wochen nach der Wundsetzung, septierte Fasern (Pfeile), Wundkallus (Wka); Maßstab = 200 μ m; Radialschnitt, Giemsa-Färbung

Solche Kristalle fanden sich besonders zahlreich in Axialparenchym- und Faserzellen am Rand der Übergangszone zum sich neu entwickelnden Gewebe (Abb. 42a, b).

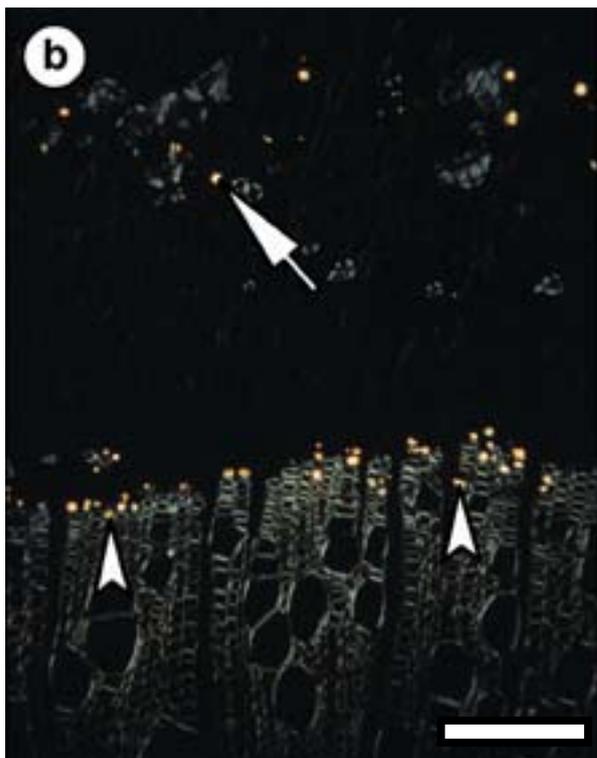
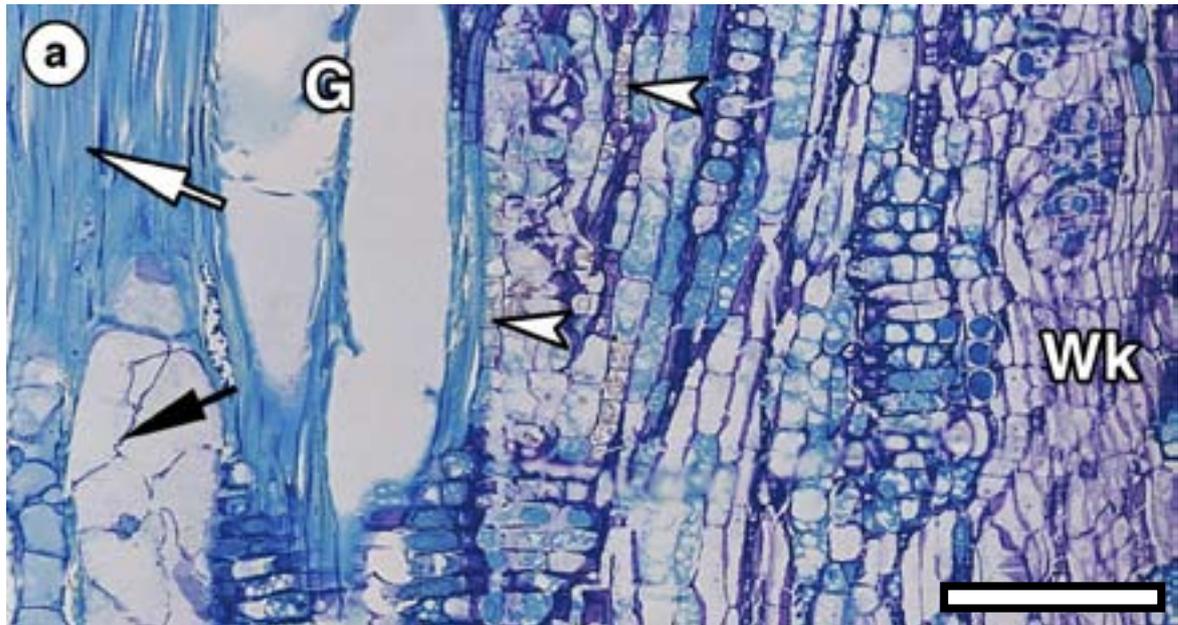
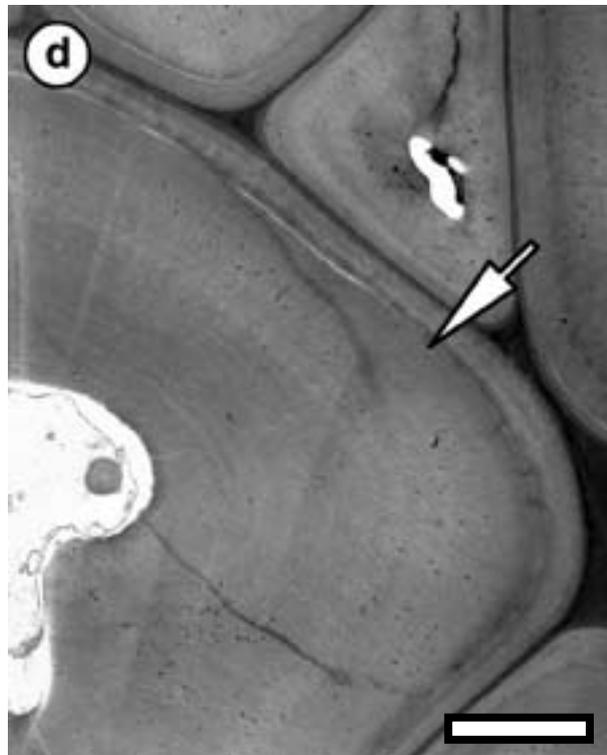
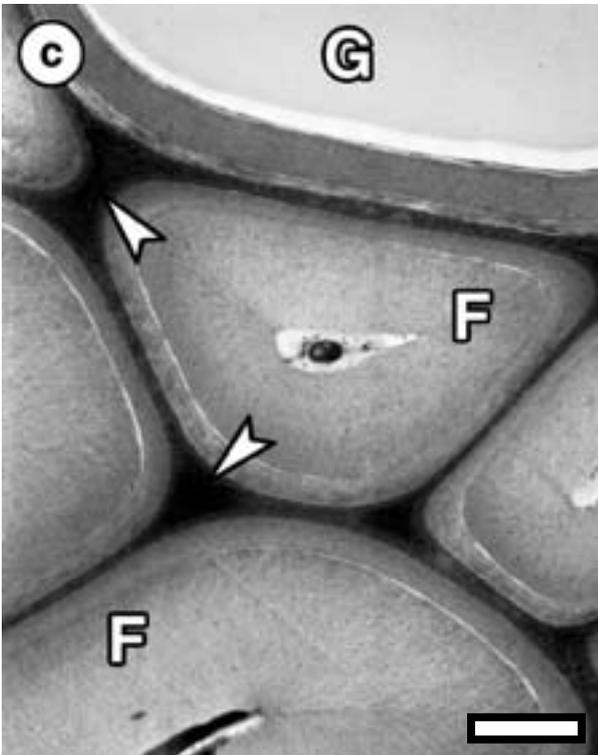
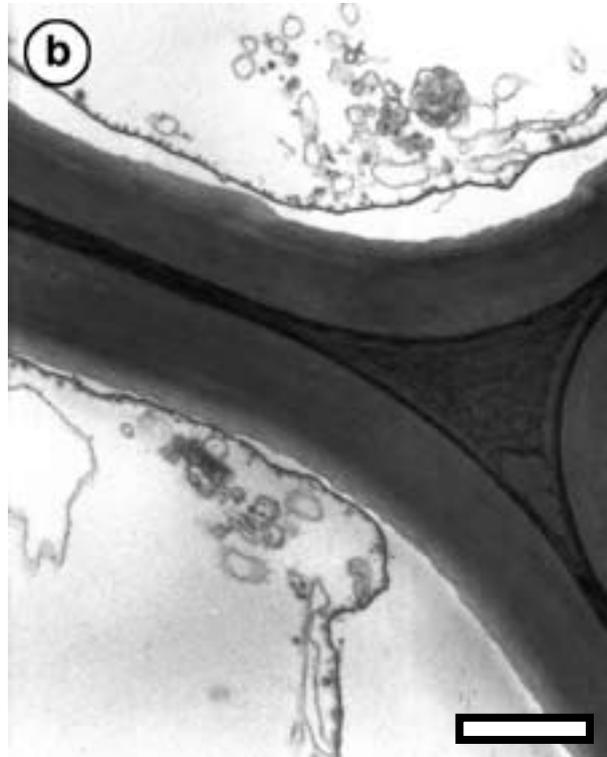
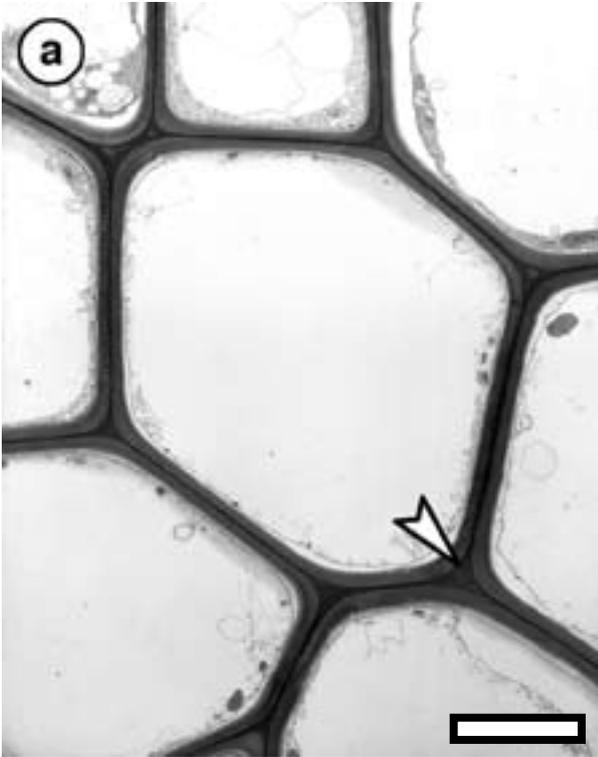


Abbildung 42a, b: Calciumoxalatkrystalle in der Übergangszone; a) Kristalle in Axialparenchymzellen (Pfeilspitzen); dickwandige Fasern der Übergangszone (weißer Pfeil) und Gefäße z.T. ohne (G) und mit Thyllen (schwarzer Pfeil), Wundkambium (Wk); Maßstab = 200 μ m; Radialschnitt, LM-Aufnahme, Giemsafärbung; b) Kristalleinlagerung (Pfeilspitzen) im Xylem der Übergangszone zum sich neu entwickelnden, noch parenchymatischen Wundgewebe; regelmäßig auftretende Kristalle im Phloem (Pfeil); Maßstab = 200 μ m; Querschnitt, LM-Aufnahme, polarisiertes Licht

Durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde deutlich, dass modifizierte Fasern der Übergangszone, im Gegensatz zu Kontrollfasern (Abb. 43a, b), zusätzliches Sekundärwandmaterial auflagerten. Diese wundinduzierte Sekundärwandverstärkung führte zu drei elektronenmikroskopisch unterscheidbaren Arten des Sekundärwandaufbaus, wogegen die Zellwikel des modifizierten Xylems gleichbleibend durch Material hoher Elektronendichte gekennzeichnet waren (Abb. 43c-h). Eine Gruppe von Xylemfasern zeigte eine verdickte S2-Schicht (Abb. 43c, d), während in einer zweiten Gruppe auf die S2 eine zusätzliche Wandschicht auf-

gelagert wurde (Abb. 43e, f). In einer dritten, kleineren Gruppe von Xylemfasern der Übergangszone bildete sich eine Sekundärwand mit einem an Sklereiden erinnernden Wandaufbau aus zahlreichen Unterschichten (Abb. 43g, h).



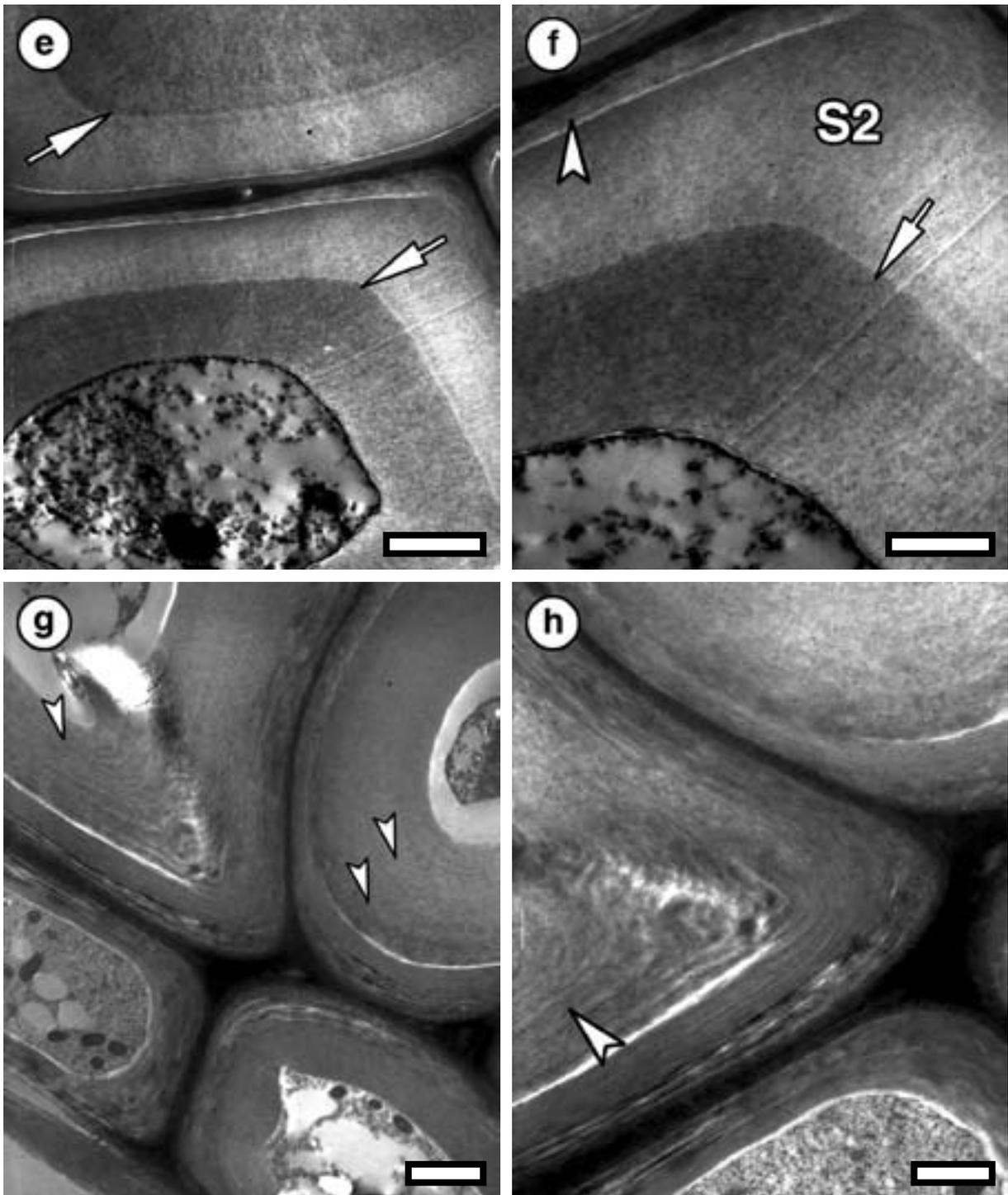


Abbildung 43a-h: TEM-Aufnahmen von Querschnitten durch unmodifiziertes Xylem (a, b) und modifiziertes Gewebe der Übergangszone (c-h); a) typische dünnwandige Xylemfasern; Zellzwickel aus fibrillärem, nur wenig elektronendichtem Material (Pfeilspitze); Maßstab = 3 μm ; b) Zellzwickel aus Abb. 43a (Pfeilspitze) mit geringer und heterogen erscheinender Elektronendichte; Maßstab = 1 μm ; Osmiumkontrastierung; c) Fasern (F) mit verdickter S2-Schicht; elektronendichte Zellzwickel (Pfeilspitzen); Gefäß (G); Maßstab = 3 μm ; Kaliumpermanganatkontrastierung; d) modifizierte Xylemfaser mit einer deutlich verdickten S2-Schicht (Pfeil); Maßstab = 3 μm ; Osmiumkontrastierung; e) Fasern mit nur einer zusätzlichen Sekundärwandschicht (Pfeile); Maßstab = 2 μm ; Kaliumpermanganatkontrastierung; f) Detail aus (e), S1 (Pfeilspitze), Sekundärwand (S2) und wundinduzierte zusätzliche Sekundärwandschicht (Pfeil); Maßstab = 1 μm ; g) Fasern mit mehreren zusätzlichen Sekundärwandlamellen (Pfeilspitzen); Maßstab = 2 μm ; Kaliumpermanganatkontrastierung; h) Detail aus (g); Maßstab = 1 μm

Für eine Darstellung der Ligninverteilung im modifizierten Xylem innerhalb der Übergangszone wurden zunächst UV-spektroskopische Scanningprofile angefertigt. Obwohl die Messungen nach unterschiedlich langen Zeiträumen der Wundreaktion durchgeführt wurden, handelte es sich stets um weitestgehend ausdifferenziertes Xylem, das sich zum Zeitpunkt der Verletzung in der Phase der Differenzierung befand. Alle dargestellten Werte werden nebeneinander gestellt und sind nicht als chronologische Abfolge zu verstehen.

Bereits vier Wochen nach der Verletzung befanden sich zahlreiche Fasern und Gefäße innerhalb der Übergangszone in verschiedenen Stadien der Sekundärwandverdickung. Die Flächen-Scannings der Zellen zeigten, dass sich die Sekundärwände aus Unterschichten zusammensetzten, deren Absorptionswerte zwischen Abs_{280} 0,09 und Abs_{280} 0,48 lagen (Abb. 44). Die niedrigsten Absorptionswerte zeigten stets die lumenseitigen Sekundärwandschichten der verdickten Faserwände. Sehr hohe Absorptionswerte wurden regelhaft in der zusammengesetzten Mittellamelle zwischen Fasern (Abs_{280} 0,55 - 0,68) sowie auch in den Zellwänden gemessen (Abs_{280} 0,81 - 0,94). Die Absorptionswerte in Gefäßwänden erschienen ebenfalls heterogen mit ungewöhnlich hohen Absorptionsmaxima von Abs_{280} 0,68 bis zu Abs_{280} 0,87 in der zusammengesetzten Mittellamelle zwischen Gefäßen und Faserzellen (Abb. 44).

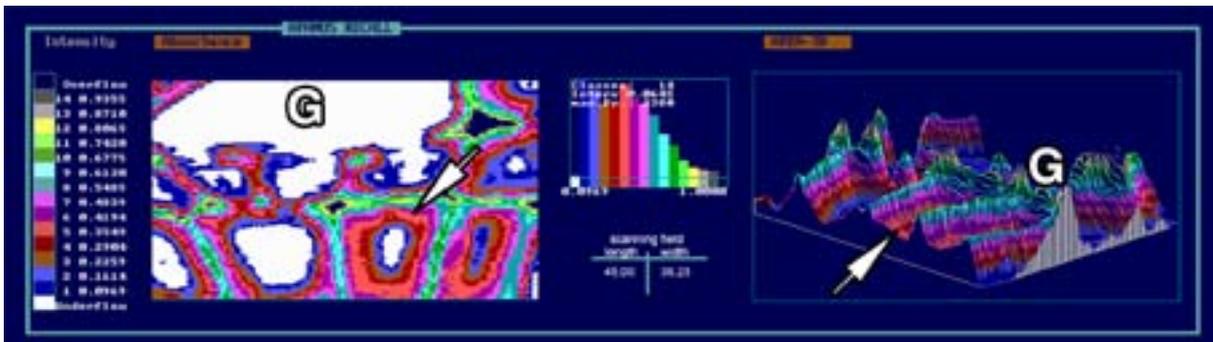


Abbildung 44: UV-spektroskopische Scanningprofile von modifiziertem Xylem der Übergangszone; Fasern mit verdickten Sekundärwänden (Pfeile) und ein kleines Gefäß (G) vier Wochen nach der Verletzung

In Abbildung 45 ist die Verteilung der Absorptionsmaxima in modifizierten Gefäßen und in Fasern mit extrem stark ausgeprägter Verdickung der Sekundärwände nach 62 Wochen Reaktionszeit dargestellt. Die Lumina der überwiegenden Zahl dieser Fasern waren durch verdickte Zellwände auf ein Minimum reduziert (Abb. 45a). In einigen dieser Fasern war das verbliebene Lumen zusätzlich mit UV-absorbierenden Einlagerungen gefüllt (Abb. 45b). Die inhomogen verteilten Absorptionswerte innerhalb der ver-

die S2 dicken variierten zwischen Abs_{280} 0,09 und Abs_{280} 0,42. Diese Variationsbreite konnte sowohl auf Gewebeebene als auch innerhalb der Sekundärwand einer einzelnen Zelle auftreten. Obwohl die zweidimensionalen Darstellungen der Verteilung der Absorptionswerte diesen heterogenen Eindruck bestätigten, zeigten die dreidimensionalen Scanning-Profile deutlich, dass auch bei diesen Zellwänden eine annähernd geordnete Konzentrationsabfolge in den Sekundärwandschichten vorlag (Abb. 45a-c). Innerhalb der zusammengesetzten Mittellamelle schwankten die Absorptionswerte von Abs_{280} 0,61 bis Abs_{280} 0,81. In den Zellwinkeln wurden Werte von Abs_{280} 0,81 bis zu Werten oberhalb von Abs_{280} 0,94 ermittelt. Die in den Gefäßwänden erhaltenen Absorptionswerte zeigten neben einer heterogenen Verteilung ungewöhnlich hohe Spitzenwerte in der zusammengesetzten Mittellamelle (Abs_{280} 0,29 - 0,62) (Abb. 45c). Für die Sekundärwände der Gefäße wurden Absorptionswerte um Abs_{280} 0,23 - 0,42 und für Zellwinkel von Abs_{280} 0,55 bis Abs_{280} 0,94 gemessen (Abb. 45c).

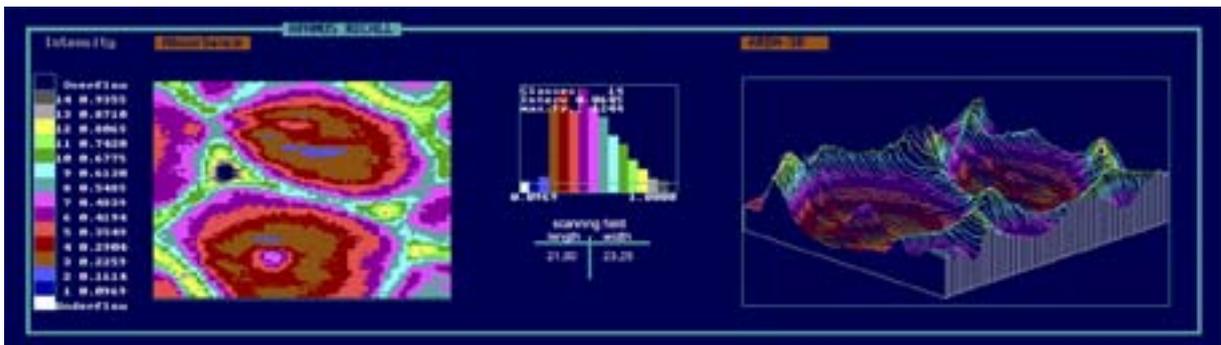


Abbildung 45a: UV-spektroskopische Scanningprofile von modifiziertem Xylem der Übergangszone; 62 Wochen nach der Verletzung; Fasern mit extrem verdickten Sekundärwänden und heterogener Ligninverteilung

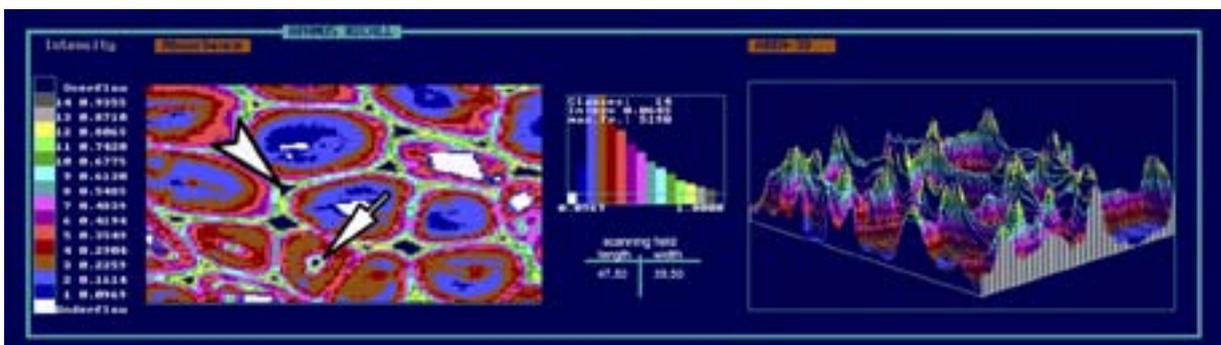


Abbildung 45b: UV-spektroskopische Scanningprofile von modifiziertem Xylem der Übergangszone; 62 Wochen nach der Verletzung; Fasern mit deutlich verdickten Sekundärwänden; einige Fasern sind mit UV-absorbierenden Inhalten gefüllt (Pfeil), Zellwinkel mit extrem hohen Absorptionswerten (Pfeilspitzen)

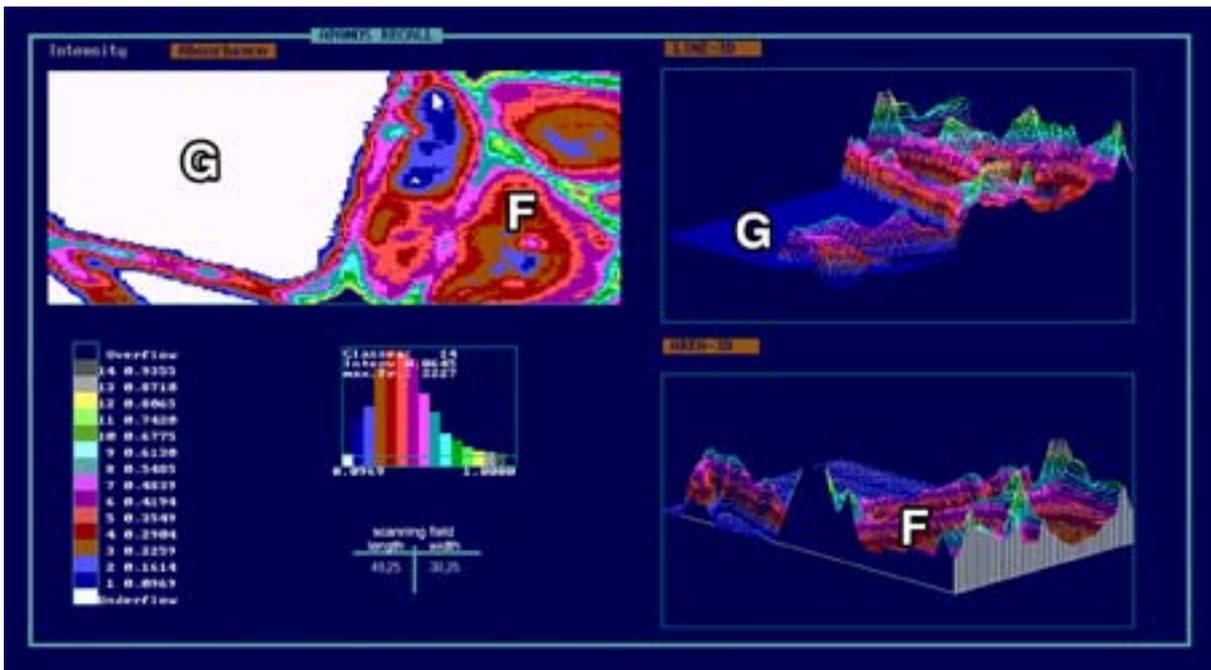


Abbildung 45c: UV-spektroskopische Scanningprofile von modifiziertem Xylem der Übergangszone; 62 Wochen nach der Wundsetzung; Gefäß (G) mit hohen Absorptionswerten in der Zellwand und Fasern (F) mit ausgeprägten Sekundärwandverdickungen

Die Verteilung der Absorptionswerte in der Übergangszone für Gefäße, Fasern und Xylemstrahlparenchymzellen nach einer fast 24 Monate dauernden Wundreaktionszeit ist in den UV-Flächen-Scannings von Abbildung 46 dargestellt. In dem hier untersuchten modifizierten Gewebe sind auch hohe Absorptionswerte in der gesamten verdickten Zellwand von Fasern und Gefäßen zu erkennen (Abb. 46a). In der Sekundärwand von Gefäßen schwankte die Absorption, wie schon nach 62 Wochen Reaktionszeit, zwischen Abs_{280} 0,23 und Abs_{280} 0,42, und in deren zusammengesetzter Mittellamelle von Abs_{280} 0,48 bis 0,68. In Zellwinkeln wurden Werte von Abs_{280} 0,55 - 0,94 aufgezeichnet (Abb. 46a). Die Flächen-Scannings dokumentieren für die verdickte Sekundärwand von Fasern heterogen verteilte Absorptionswerte von Abs_{280} 0,16 - 0,35. Innerhalb der Zellwinkel und der zusammengesetzten Mittellamellen lagen die dargestellten Werte bei Abs_{280} 0,42 - 0,94 und Abs_{280} 0,23 bis 0,55 (Abb. 46a, b). Die Xylemstrahlparenchymzellen waren häufig mit UV-absorbierenden Inhalten gefüllt, deren Absorptionswerte bis über Abs_{280} 0,94 reichten (Abb. 46c).



Abbildung 46a: UV-spektroskopische Scanningprofile von modifiziertem Xylem der Übergangszone; 24 Monate nach der Verletzung; Gefäß (G) mit erhöhten Absorptionswerten in der Zellwand und Fasern (F) mit extremen Sekundärwandverdickungen

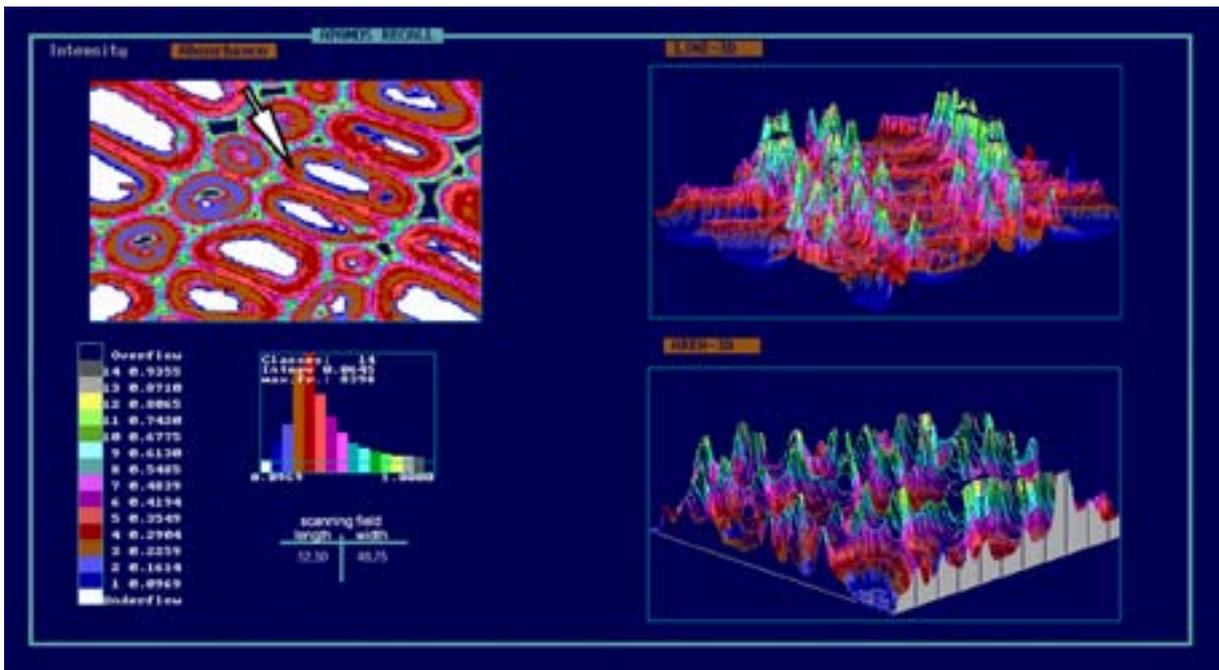


Abbildung 46b: UV-spektroskopische Scanningprofile von modifiziertem Xylem der Übergangszone; 24 Monate nach der Verletzung; dickwandige, teilweise radial abgeflachte Fasern (Pfeil) mit erhöhten Absorptionswerten

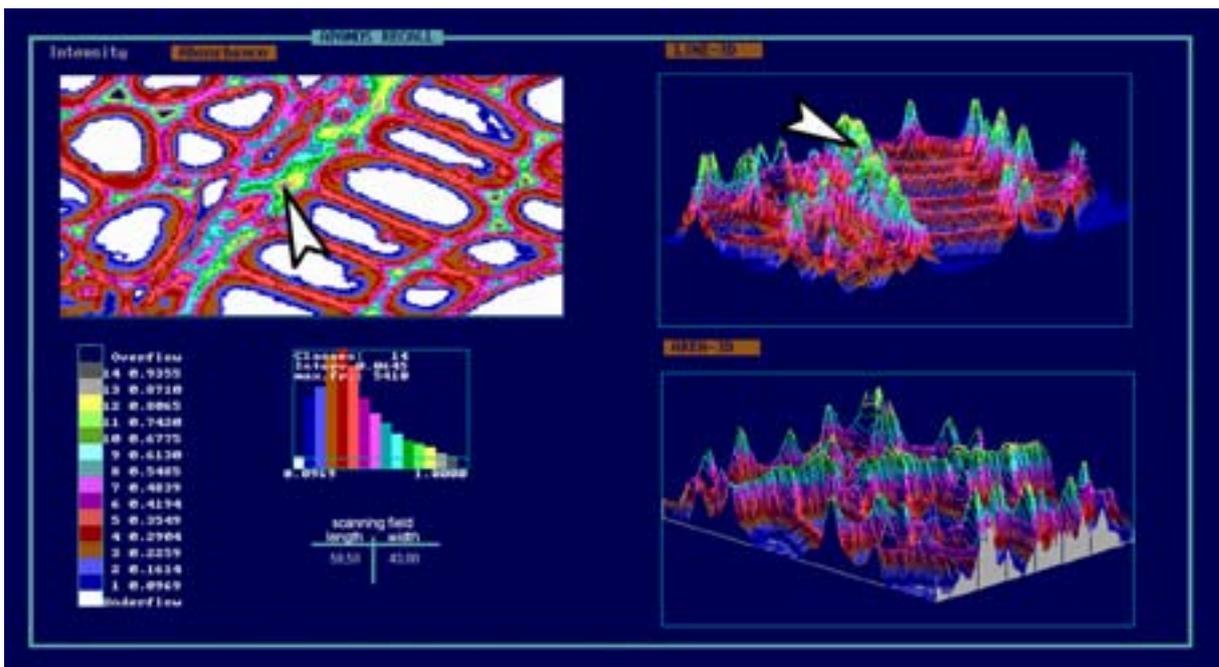


Abbildung 46c: UV-spektroskopische Scanningprofile von modifiziertem Xylem der Übergangszone; 24 Monate nach der Verletzung; Xylemstrahlparenchymzellen mit UV-absorbierenden Inhalten gefüllt (Pfeilspitzen) und Fasern mit erhöhten Absorptionswerten

Zur semiquantitativen Ligninanalyse wurde das UV-Absorptionsverhalten im Xylem der Übergangszone mit Punktmessungen in einem Wellenlängenbereich von 240 - 400 nm untersucht. Die für das Referenzmaterial gemessenen Werte sind bereits in Abschnitt 3.2.2.2 dargestellt worden. Innerhalb der deutlich verdickten Sekundärwände der modifizierten Fasern in der Übergangszone ergab sich im Vergleich zu unmodifi-

zierten Xylemfasern der Kontrollen eine regelhafte Verschiebung der Wellenlänge der Absorptionsmaxima von 270-272 nm auf 272-274 nm. Auch innerhalb der zusammengesetzten Mittellamelle verschoben sich die Spektren hin zu größeren Wellenlängen (von 272 nm zu 274-276 nm). Ausnahmen bildeten die in den Zellwicken gemessenen Absorptionsmaxima, deren Wellenlänge von überwiegend 276-280 nm sich nicht klar von den Werten des Referenzmaterials (278 nm) unterschieden (Abb. 47a-e).

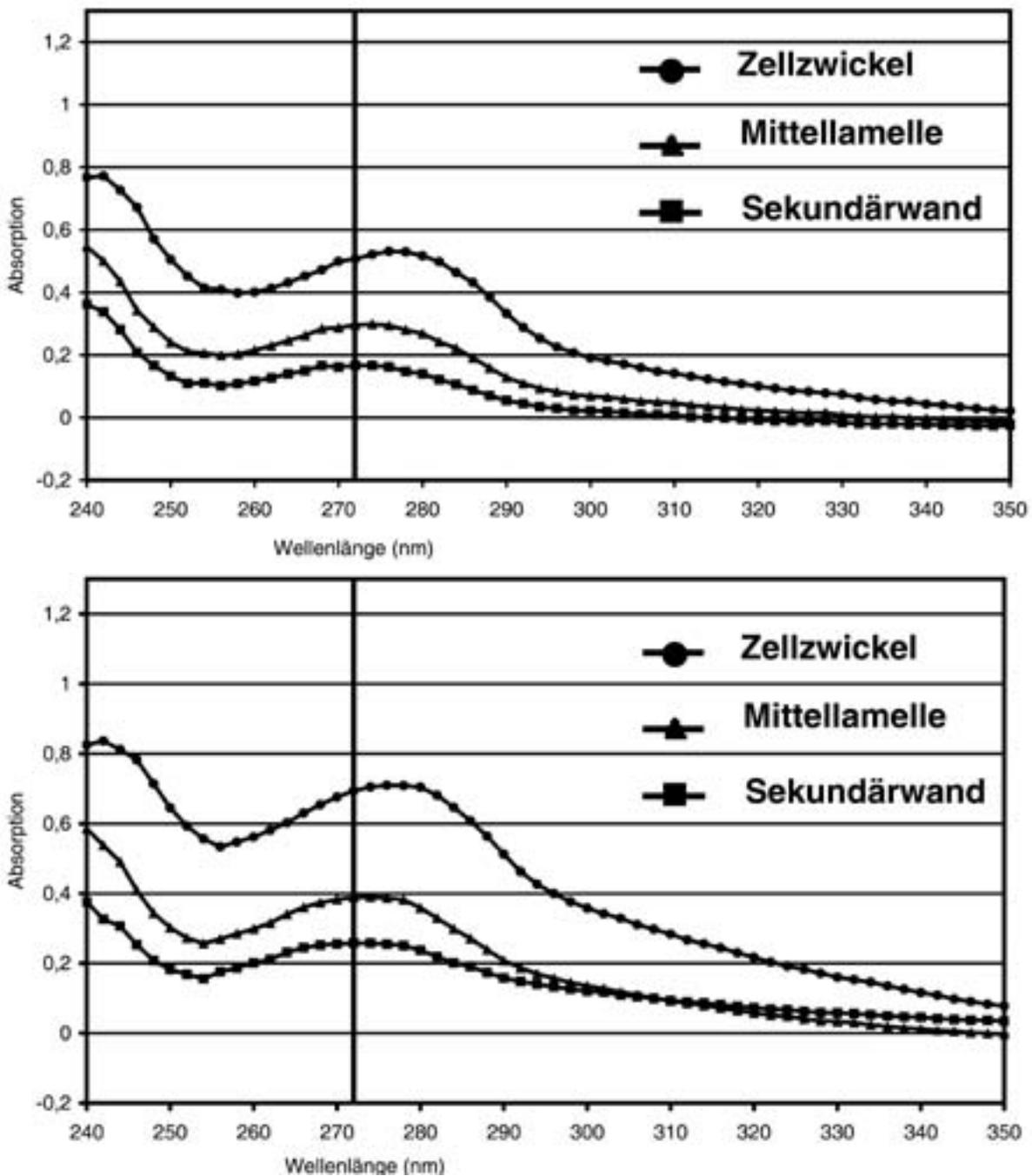
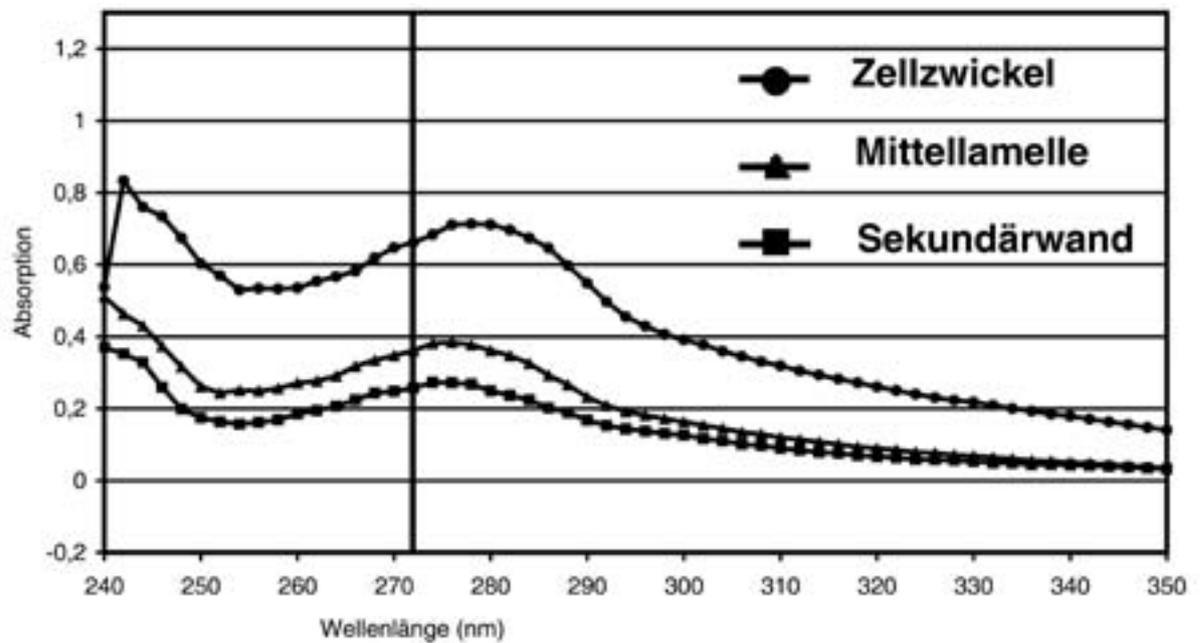
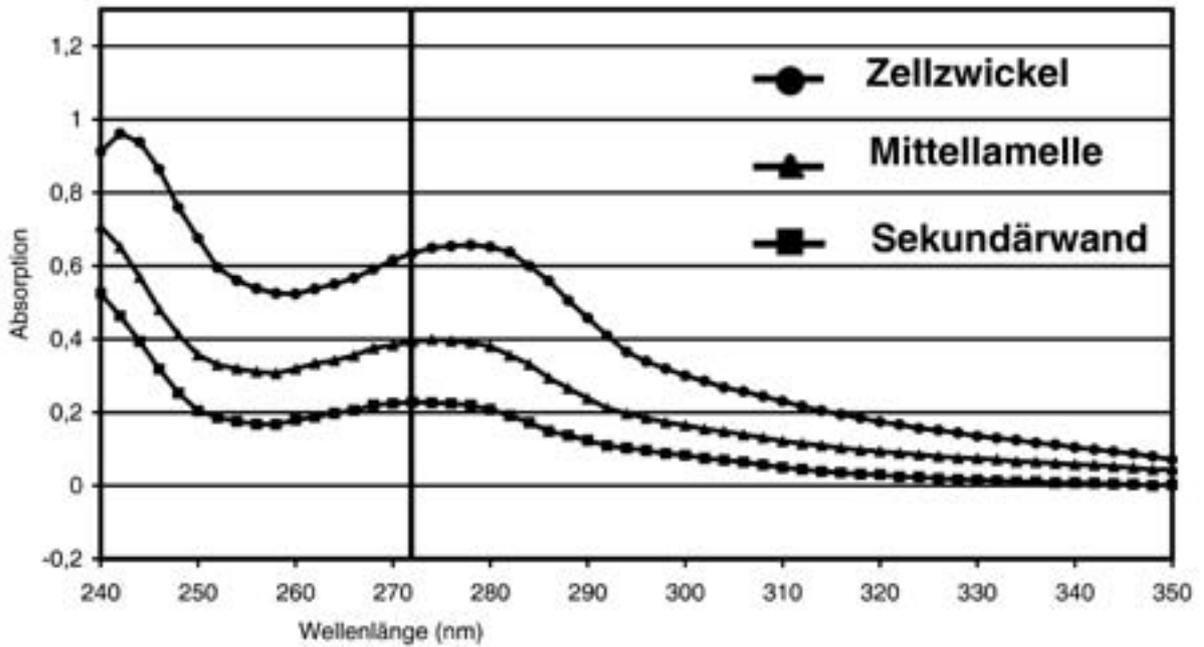
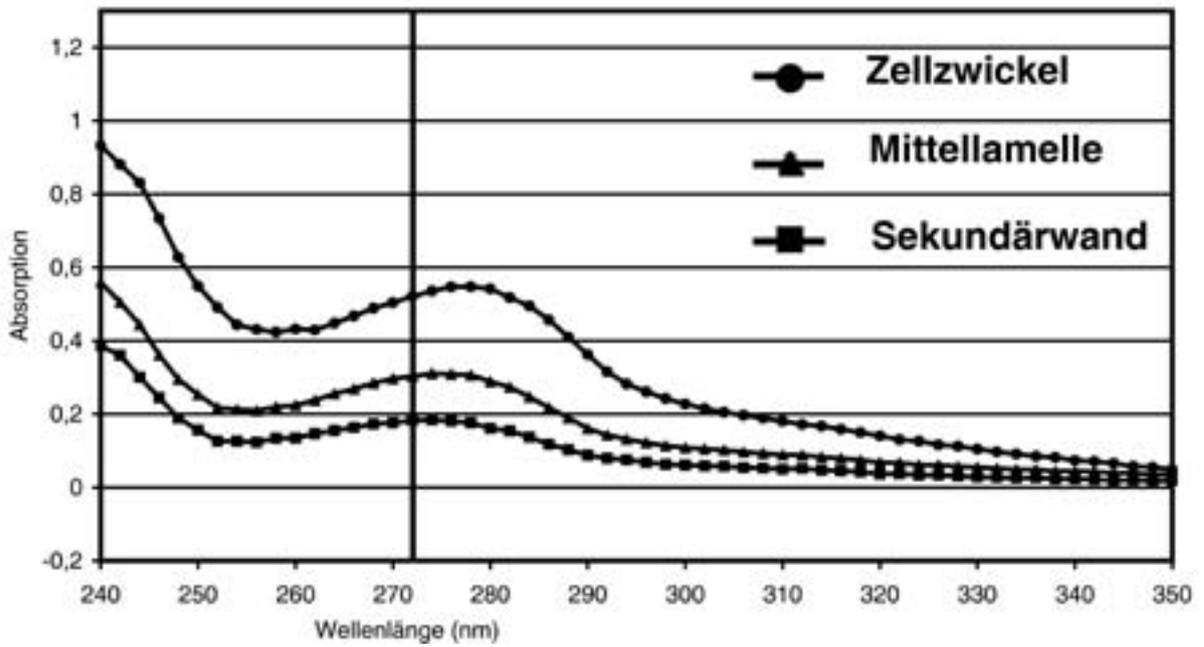


Abbildung 47a-e: Repräsentative UV-Absorptionsspektren von Xylemfasern mit verdickten Sekundärwänden nach unterschiedlich langen Perioden der Wundreaktion; (a) 2, (b) 4, (c) 17, (d) 62 und (e) 95 Wochen nach der Verletzung; die senkrechte Linie markiert eine Wellenlänge von 272 nm



Das Verhältnis der Absorptionswerte bei Wellenlängen von 280 nm und 260 nm ($A_{280} : A_{260}$ -Verhältnisse) zeigte sich im Vergleich zu den Werten unmodifizierter Fasern in allen Faserproben des modifizierten Xylems in der Übergangszone erhöht, unabhängig vom Entnahmezeitpunkt (Tabelle 7). Ausnahme bildeten nur die Zellzwickel.

Probe	$A_{280} : A_{260}$		
	Sekundärwand	zusammengesetzte Mittellamelle	Zellzwickel
modifizierte Xylemfasern 2 Wochen Wundreaktionszeit	1,20	1,25	1,29
modifizierte Xylemfasern 4 Wochen Wundreaktionszeit	1,18	1,20	1,25
modifizierte Xylemfasern 17 Wochen Wundreaktionszeit	1,20	1,29	1,26
modifizierte Xylemfasern 62 Wochen Wundreaktionszeit	1,16	1,19	1,25
modifizierte Xylemfasern 95 Wochen Wundreaktionszeit	1,34	1,33	1,33

Tabelle 7: UV-Absorptionsverhältnis $A_{280} : A_{260}$ verschiedener Zellwandschichten von Xylemfasern der Übergangszone mit verdickter Sekundärwand, entnommen nach verschiedenen langen Zeitspannen nach der Verletzung

Zusammenfassend betrachtet haben die mikroskopischen Untersuchungen gezeigt, dass Xylemfasern, die zwischen dem zum Zeitpunkt der Verletzung vorhandenen differenzierten Xylem und den nach der Verletzung gebildeten Geweben liegen, eine wundinduzierte Verdickung der Sekundärwände erfuhren. Die UV-mikrospektrophotometrischen Messungen haben zusätzlich gezeigt, dass die Absorptionswerte in der Sekundärwand, der zusammengesetzten Mittellamelle sowie in den Zellzwickeln erhöht und heterogen waren.

Die Spektren der in den Lumina der Fasern und Holzstrahlparenchymzellen gemessenen stark UV-absorbierenden Inhaltsstoffe und ihre Bedeutung für die Bestimmung der Ligninverteilung sind in Anhang 1 aufgeführt (Anhang 1; S. 105-108).

4. Diskussion und Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit strukturellen, ultrastrukturellen und topochemischen Untersuchungen zur Wundreaktion von Pappelhybriden nach einer Verletzung bis an das Xylem des Stammes. Aus der Zielsetzung der Arbeit ergeben sich vier grundlegende Fragen, die im Folgenden mit Hilfe der Untersuchungsergebnisse beantwortet und in Beziehung zu anderen Studien diskutiert werden.

- Kann durch eine Verletzung während der Vegetationsruhe Zellteilungsaktivität induziert oder zu Beginn der Vegetationsperiode eine frühere Reaktivierung der Zellteilung ausgelöst werden?
- Welche Gewebe sind an der Regeneration eines Wundkambiums und in der Folge der Bildung eines Überwallungswulstes beteiligt?
- Wie unterscheidet sich das von diesem Wundkambium gebildete Gewebe feinstrukturell und lignintopochemisch von unbeeinflusstem Gewebe?
- Welchen Einfluss haben Stammverletzungen auf die zum Verletzungszeitpunkt differenzierenden Zellen des Xylems?

4.1 Kann durch eine Verletzung während der Vegetationsruhe Zellteilungsaktivität induziert oder zu Beginn der Vegetationsperiode eine frühere Reaktivierung der Zellteilung ausgelöst werden?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Reaktionen innerhalb der von einer Verletzung beeinflussten Gewebe denen des unbeeinflussten Kambiums gegenübergestellt. Die Kambialdynamik der untersuchten Bäume diente als Indikator für das Einsetzen der Vegetationsperiode und ermöglichte dadurch die Zuordnung der Wundreaktionen zu den Phasen der Vegetationsruhe bzw. der Vegetationsperiode.

Das Einsetzen der Holzbildung im Frühjahr wird durch ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher exogener und endogener Faktoren bestimmt. Zu diesen Faktoren zählen zum Beispiel die Temperatur, Nährstoffe, Mineralien, der Wasserpotentialgradient, sowie Phytohormone, oder genauer deren Konzentrationsschwankungen sowohl in axialer als auch in radialer Richtung (z.B. Savidge, 1996, 2001; Sundberg et al., 2000). Der polaren, basipetalen Ausbreitung des Auxins von den Knospen/Blättern zu den

Wurzeln folgend, setzt bei zerstreutporigen Baumarten die Xylem- und Phloembildung entlang des sich bildenden Auxingradienten ein (Aloni, 1991, 2004; Savidge, 1996; Sundberg et al., 2000). Bei Pappel unterliegt die Kambiumreaktivierung deutlich diesem Schema. So zeigten Untersuchungen mehrfach, dass die ersten Frühholzgefäße zu einem Zeitpunkt entstehen, wenn die Blätter sich annähernd voll entwickelt haben (z.B. Larson, 1962, 1994; Fahn und Werker, 1990; Aloni, 1991; Sundberg et al., 2000; Schmitt et al., 2000). Ladefoged (1952) beobachtete dieselben Tendenzen und ermittelte für unterschiedliche Baumarten, in welchen Zeiträumen nach dem Aufbrechen der Knospen die Holzbildung im Stamm einsetzt. Auf Grund der bekannten stimulativen Wirkung der IAA (indol-3-acetic acid = Auxin) auf die Holzbildungsaktivität wurde in der vorliegenden Arbeit neben den ultrastrukturellen Untersuchungen zur Zellteilungsaktivität der Zustand der Knospen als zusätzlicher physiologischer Parameter zur Bestimmung des Reaktivierungszeitpunktes des Kambiums verwendet. Die Pappelknospen waren am 27. April deutlich erkennbar geöffnet. Der Zeitraum, in dem die Holzbildung demnach eingesetzt haben könnte, konnte jedoch nicht genauer benannt werden, da in der Literatur keine Angaben über die Zeitspanne zwischen Knospenaufbruch und Einsetzen der Holzbildung bei Pappel vorliegen. Durch die licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte, trotz der fehlenden Informationen über diesen zeitlichen Zusammenhang, der Zeitraum beginnender Reaktivierung und das Einsetzen der Zellteilung im Kambium bestimmt werden.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen des Kambiums zeigten erste, reaktivierungsbedingte Veränderungen ab dem 10. April 2001. Zu diesem Zeitpunkt konnten erste Volumenerweiterungen der Kambiumzellen festgestellt werden. Während der folgenden zehn Tage wurden weitere Veränderungen eingeleitet, die für die Reaktivierung eines Kambiums unterschiedlicher Baumarten kennzeichnend sind (z.B. Farrer und Evert, 1997a; Arend und Fromm, 2003). Ist das Ruhekambium durch zahlreiche kleine und mit dunklen Inhalten gefüllte Vakuolen gekennzeichnet, so verloren diese nun ihre Inhalte und fusionierten zu wenigen großen Vakuolen. In Übereinstimmung mit anderen Studien erscheint das Plasma weniger dicht und an die Stelle des in der Vegetationsruhe seltenen und überwiegend glatten ERs tritt nun das raue ER; auch treten vermehrt Polysomen auf (z.B. Farrer und Evert, 1997a; Arend und Fromm, 2003). Das aktive Kambium der von uns untersuchten *Populus tremula* x *P. tremuloides* zeigt, korrespondierend zu dem aktiven Kambium von *Populus trichocarpa* (Arend und Fromm, 2003), zahlreiche aktive, Vesikel produzierende Dictyosomen und ein Plasmalemma, das im Gegensatz zur Vegetationsruhe unregelmäßig verläuft und zahlreiche Einstülpungen sowie Fusionen mit Vesikeln aufweist. Die von Arend und Fromm (2003) beobachtete Reduktion der Lipidtröpfchen bestätigte sich in dieser frühen Phase der Kambiumaktivität noch nicht, konnte aber wenig später im hochaktiven Kambium belegt werden. Deutlichstes Kennzeichen für die Aktivität des Kambiums am

20. April aber waren dünne, neue Tangentialwände, die sich in der 1-3 Zellreihen vom Xylem entfernten Initialzone des Kambiums entwickelt haben.

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die Reaktivierungsphase des Kambiums strukturell um den 10. April einsetzte und bis zum 20. April dauerte. Mit Hilfe des so ermittelten Endes der Vegetationsruhe können nun die Wundreaktionen den Perioden der Vegetationsphase bzw. -ruhe zugeordnet werden.

Zahlreiche Arbeiten belegen die positive Wirkung einer sofortigen Wundabdeckung mit einer lichtundurchlässigen Folie während der Vegetationsperiode (Noel, 1968; Chudnoff, 1971; Shortle und Shigo, 1978; Zhengli und Keming, 1988; McDougall und Blanchette, 1996; Novitskaya, 1998; Stobbe et al., 2002a, b, 2003). An Alleebäumen durchgeführte Studien führten zu dem Schluss, dass die untersuchten Laubbaumarten, unabhängig vom Verletzungszeitpunkt, nach einer zeitnahen Abdeckung der Wunde mit einer Folie in der Lage sind, einen Flächenkallus zu entwickeln (Stobbe, 2001). Für Pappel zeigte sich hierbei, dass an Wunden, die am Ende der Vegetationsperiode bzw. während der Vegetationsruhe gesetzt wurden, eine deutlich stärkere Flächenkallusbildung einsetzte als bei Wunden, die zu Beginn oder in der Mitte der Vegetationsperiode entstanden (Stobbe, 2001). Die Flächenkallusbildung bei Pappeln schien demnach gut geeignet, um zu überprüfen, ob Zellteilungen in der Vegetationsruhe induziert werden können oder sich ein früheres Einsetzen der Zellteilungen zu Beginn der Vegetationsperiode erzielen lässt. Um zu verhindern, dass sich die Kambiumzellen noch in einem Stadium reduzierter Stoffwechselaktivität befinden, also noch Reaktionspotential besitzen (z.B. Farrar und Evert, 1997a, b) und noch keine vollständige physiologische Ruhe eingetreten ist, oder Zellen der Phloemdifferenzierungszone noch aktiv sind (Ladefoged, 1952), wurden die Wunden erst im Dezember gesetzt.

Der Zeitpunkt der Verletzung beeinflusst die Geweberegeneration auf unterschiedliche Art und Weise. Erfolgt sie in der Vegetationsruhe, so löst sich das Gewebe überwiegend im Phloembereich, während es sich in der Vegetationsperiode vornehmlich innerhalb des undifferenzierten Xylems ablöst (Zhengli und Keming, 1988; Stobbe, 2001). Dies hat zur Folge, dass die Zellartenzusammensetzung auf der Wundoberfläche und damit die zu einer Kallusbildung fähigen Zellarten in Abhängigkeit vom Verletzungszeitpunkt variieren. Die Gewebetrennung erfolgte bei den Pappeln überwiegend im sekundären, nicht kollabierten Phloem, so dass neben dem Kambium die parenchymatischen Zellen des Phloems für die Kallusbildung erhalten blieben.

Ein weiterer Faktor ist die Abhängigkeit aktiver Wundreaktionsmechanismen wie z.B. die Bildung von Thyllen, die Synthese akzessorischer Bestandteile und die Kallusbildung von physiologisch aktiven Zellen. Sowohl Art und Menge der verfügbaren Zellen und der in ihnen für Kompartimentierungsreaktionen gespeicherten Reservesubstanzen ist saisonalen Schwankungen unterworfen (z.B. Noel, 1970; Liese und Dujesiefken, 1989;

Schmitt und Liese, 1992a; Liese und Dujesiefken, 1996; Dujesiefken et al., 2005). Dujesiefken et al. (1991) konnten an Ahorn und Esche zeigen, dass die Intensität einer Kambialnekrose sowie die Seitenkallusbildung stark von der Verletzungszeit abhängen. Bei Verletzungen in der Vegetationsruhe starben die Kambiumzellen weiträumiger ab, und es entwickelte sich weniger Seitenkallus als bei Verletzungen zu Beginn der Vegetationsperiode. Eine Studie an *Eucalyptus* spp. führte zu dem Ergebnis, dass Perioden geringer kambialer Aktivität immer mit einer schwach ausgeprägten Kallusentwicklung zusammenfallen (Chudnoff, 1971). Untersuchungen der Flächenkallusbildung einheimischer Laubbaumarten ergaben ebenfalls einen deutlichen jahreszeitlichen Einfluss, der zwischen den Baumarten stark variierte. Während Ahorn und Pappel nach einer Verletzung in der Vegetationsruhe den stärksten Flächenkallus entwickelten, zeigten Buche und Hainbuche eine gegenläufige Tendenz (Stobbe, 2001). Die Kallusbildung, aktive Wundreaktionsmechanismen und die Zellteilungsaktivität eines von einer Verletzung unbeeinflussten Kambiums scheinen demnach gleichermaßen von jahreszeitlichen Faktoren determiniert zu werden.

Obwohl sich auf den Wundflächen der Pappeln nur in wenigen Zonen Kallusgewebe entwickelte, können zwei Reaktionsmuster unterschieden werden. Bei der einen Variante lösten sich die normalen Gewebestrukturen außerhalb des Xylems auf, d.h. alle parenchymatischen Zellen des Phloems sowie das Kambium sind von der Zellproliferation und Zellteilung betroffen (Typ 1). Bei der zweiten Variante proliferierten ausschließlich die parenchymatischen Zellen des Phloems und wenige Zellen des äußeren Kambiums; die Kambiumstrukturen selbst blieben weitestgehend erhalten, und es fehlten die für Kallusgewebe charakteristischen Merkmale, beispielsweise die Interzellularen (Typ 2). Unabhängig von diesen zwei Reaktionsmustern traten starke Unterschiede bezüglich des Zeitpunktes der ersten Reaktivierungsvorgänge auf. Während in einigen Wundbereichen eine Zellproliferation erst im Mai einsetzte, also lange nachdem das Kambium zellteilungsaktiv wurde, begann sie in anderen Gewebeabschnitten bereits im März. In Teilbereichen der Wundoberfläche proliferierten parenchymatische Zellen des sekundären Phloems und des Kambiums bereits 14 Wochen nach der Verletzung (26. März 2001). Erste Zellvergrößerungen im Kambium des Referenzgewebes setzten zeitlich verzögert ein und konnten erst 14 Tage später, also um den 10. April 2001, mikroskopisch festgestellt werden. Weitere zehn Tage später (20. April) wurden im Kambium der Kontrollen erste neue Tangentialwände als Hinweis auf einsetzende Zellteilungen sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich in den Bereichen der Kallusbildung schon ein mehrere Zellen breites Gewebe entwickelt. Bis zum Ende der Untersuchungen (22. Juni 2001) konnte weder die Entwicklung eines Phellogens noch eines Wundkambiums beobachtet werden, welche kennzeichnend für Wundreaktionen und Flächenkallusbildung während der Vegetationsperiode sind (Oven et al., 1998; Stobbe et al. 2002).

Aus den vorstehenden Ergebnissen kann geschlossen werden, dass durch eine Verletzung in der Vegetationsruhe keine unmittelbar folgende Zellteilung induziert werden konnte. Es wurden vielmehr in Teilbereichen des auf der Wundoberfläche verbliebenen Gewebes zeitlich vorverlegte Zellteilungen eingeleitet. Setzt man voraus, dass zwischen den ersten beobachteten Reaktivierungsvorgängen sowie dem Einsetzen der Zellteilungen im Kallus und im unbeeinflussten Kambium eine identische Zeitspanne liegt, hätte die Zellteilung im Kallus um den 05. April 2001 begonnen. Sie setzte demnach zu einem Zeitpunkt ein, an dem sich das unbeeinflusste Kambium physiologisch bereits in der Reaktivierungsphase befand. Die Zellteilungsaktivität auf einer Wundfläche, unabhängig davon, welches Reaktionsmuster betrachtet wird, muss als abhängig von der Zellteilungsaktivität des unbeeinflussten Kambiums und den jahreszeitlichen Bedingungen angesehen werden und bestätigt damit entsprechende Ergebnisse früherer Studien (z.B. Chudnoff, 1971; Dujesiefken et al., 1991).

4.2 Welche Gewebe sind an der Regeneration eines Wundkambiums und in der Folge der Bildung eines Überwallungswulstes beteiligt?

Bei der Identifizierung der an der Regeneration eines Wundkambiums und der anschließenden Entwicklung eines Überwallungswulstes beteiligten Gewebe bzw. Zellarten wurden zwei Entwicklungsabläufe festgestellt. Diese lassen sich morphologisch als zwei eigenständige Strategien (A, B) definieren. Beide Entwicklungsstrategien können an einem Baum in unterschiedlichen Wunden auftreten oder sogar innerhalb verschiedener Abschnitte eines einzelnen Überwallungswulstes parallel vorkommen. Bei beiden Strategien ist der erste Entwicklungsschritt, der nach der Degeneration der parenchymatischen Zellen am Wundrand einsetzt, identisch. Dabei werden großlumige, dünnwandige, parenchymatische Zellen nahe am degenerierten Wundrand gebildet, die aus intakten, parenchymatischen Zellen tieferliegender Gewebeschichten des Phloems, des Kambiums und undifferenzierten Xylems hervorgehen. Die Beobachtungen zeigten, dass diese zu Beginn unorientierten, isodiametrischen frühen Kalluszellen sich überwiegend aus dedifferenzierenden parenchymatischen Phloemzellen entwickeln. Die Zellen des Kambiums und undifferenzierte Zellen des Xylems sind nur zu einem geringeren Maße an der Kallusentwicklung beteiligt, was gleichermaßen für *Fraxinus excelsior* von Doley und Leyton (1970) beschrieben wurde. Bei Apfelbäumen entwickelte sich der Kallus nach dem Ringeln von Zweigen sogar fast ausschließlich aus Phloemzellen (Swarbrick, 1927).

Im Gegensatz dazu stellte Soe (1959) fest, dass Kallusgewebe nach dem Einschneiden von drei Jahre alten *Populus deltoides*-Stämmchen bis in das Xylem sich überwiegend aus lebenden Holzstrahlzellen entwickelte. In geringerem Maße waren hier auch

parenchymatische axiale Zellen des Phloems, des Kambiums und des Xylems beteiligt. Vergleichbare Befunde erhielten Sharples und Gunnery (1933) sowie Bucciarelli et al. (1999) an *Hibiscus rosa-sinensis*, *Hevea brasiliensis* und *Populus tremuloides*. Für *Fagus sylvatica* und *Quercus robur* wurde an Flächenwunden beobachtet, dass das sekundäre Phloem nur marginal oder gar nicht an der Entwicklung eines seitlichen Wundkallus beteiligt ist (Fink, 1999; Grünwald et al., 2002a). Noel (1970) beschreibt auch für *Trema orientalis* und *Dalbergia melanoxylon* die Entwicklung eines Seitenkallus ohne wesentliche Beteiligung von Zellen des sekundären Phloems. Noel (1968) weist in einer früheren Arbeit über die Flächenkallusbildung jedoch darauf hin, dass sich ein Kallus bei verschiedenen Arten prinzipiell aus allen undifferenzierten, zentripetalen Kambiumderivaten entwickeln könne, auch wenn bei den von ihm untersuchten Arten (*Trema orientalis* und *Julbernardia globiflora*) nur Kambiumzellen und Zellen des undifferenzierten Xylems beteiligt waren. Neben baumartspezifischen Unterschieden bezüglich der an der Seitenkallusbildung hauptsächlich beteiligten Gewebe scheint innerhalb einer Art neben zahlreichen anderen Faktoren wie z.B. dem Verwundungszeitpunkt oder dem Wasserpotential (z.B. Doley und Leyton, 1970; Dujesiefken et al., 1991; Schmitt und Liese, 1992a, Dujesiefken et al., 2005) vor allem die Art der Wunde einen starken Einfluss auf die an der Kallusbildung beteiligten Gewebe zu haben. So beschreibt auch Fink (1999) Wundreaktionen, die je nach der Art der Verletzung unterschiedliche Reaktionsmechanismen zeigen. Bei den hier untersuchten großflächigen Wunden zeigte sich einheitlich und deutlich die dominante Rolle des sekundären Phloems während der Initiationsphase der Kallusbildung.

Der zweite Entwicklungsschritt der Strategie A ist die Umdifferenzierung von Zellen des sekundären Phloems. Nach ihrer Dedifferenzierung erfolgt in einem weiteren Schritt die Redifferenzierung zu meristematischen Kambiumzellen. Dieses zunächst noch unterbrochene Band meristematischer Zellen innerhalb des Phloems entwickelt sich zu einem geschlossenen, häufig halbkreisförmigen Wundkambiumring, der konsequenterweise Bereiche des zum Zeitpunkt der Verletzung bereits ausdifferenzierten sekundären Phloems einschließt. Bei dieser Strategie A finden demnach sowohl Morphallaxis als auch Epimorphismus in einer kombinierten Form statt. Von Epimorphismus spricht man, wenn Zellen nahe der Wundoberfläche proliferieren und dedifferenzieren, um ein neues, zunächst undifferenziertes Gewebe, hier den Kallus, zu bilden. Innerhalb dieses Kallusgewebes findet dann die Redifferenzierung neuer Gewebe zur Wiederherstellung der geschädigten Bereiche statt (Warren Wilson und Warren Wilson, 1984). Es würde sich demnach innerhalb des Kallus nach der Peridermbildung ein Kambium und anschließend Wundxylem und -phloem entwickeln, was auch von Grünwald et al. (2002a) beschrieben wurde. Unter Morphallaxis versteht man die Umdifferenzierung des in Wundnähe liegenden Gewebes, mit nur engräumig

begrenzten Zellteilungen, wie z.B. bei Wundreaktionen nach einer Rindenverletzung (Warren Wilson und Warren Wilson, 1984). Bei Strategie 2 liegt insofern eine Kombination dieser beiden Entwicklungsmuster vor, als sich zwar ein Kallusgewebe bildet, und dieses auch mit fortschreitender Entwicklung von einem Periderm begrenzt wird, sich aber das neue meristematische Gewebe durch Umdifferenzierungen innerhalb des bestehenden Phloems bildet. Hierbei können sich Abschnitte des Wundkambiums im Kallus entwickeln, wobei dieser Vorgang jedoch nicht obligatorisch abläuft. Während früher Phasen der Entwicklung war es nicht möglich vorauszubestimmen, ob sich das entwickelnde meristematische Gewebe zu einem Phellogen oder einem Wundkambium differenzieren würde. Ein Grund hierfür waren die teilweise vielfältigen Verzweigungen der bandartig angeordneten Zellen innerhalb des Phloems und des Kallusgewebes. Ein weiterer ist, dass augenscheinlich zu Beginn der Remeristematisierung der Zellen die genannten Gewebe ineinander übergehen. Doley und Leyton (1970) beschrieben einen ähnlichen Vorgang für bestimmte Kallusformen, bei denen in manchen Fällen das Kambium in das von ihnen als „subsurface meristem“ bezeichnete Gewebe übergeht. Es ist ein bekanntes Phänomen, dass Zellen innerhalb des sekundären Phloems in der Lage sind, sich in meristematische Zellen umzudifferenzieren, um ein neues Phellogen und in der Folge ein neues Periderm während der Rhytidombildung zu entwickeln. Zusätzlich demonstriert die Entstehung eines nekrophylaktischen Periderms, ausgelöst durch eine Rindenverletzung, die Fähigkeit sekundärer Phloemparenchymzellen, auf wundinduzierte Reize mit der Bildung meristematischen Gewebes zu reagieren (z.B. Mullick, 1977; Biggs et al., 1984; Biggs, 1985; Trockenbrodt und Liese, 1991; Trockenbrodt, 1994; Oven et al., 1999). Das Potential für die Entwicklung eines Wundkambiums innerhalb des ausdifferenzierten sekundären Phloems könnte demnach außer bei Pappel auch bei anderen Baumarten vorhanden sein. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zellen des sekundären Phloems maßgeblich an der Bildung des parenchymatischen Kallusgewebes beteiligt sind und aus ihnen durch De- und anschließende Redifferenzierung ein neues Wundkambium direkt hervorgehen kann.

Die zweite Strategie (Strategie B) ist histologisch von Strategie A klar zu unterscheiden. Der zweite Entwicklungsschritt ist hier die Bildung von Wundkambiumzellen innerhalb des neu gebildeten parenchymatischen Gewebes. Dies erfolgt als tangentielle Verlängerung des in einigem Abstand zum Wundrand liegenden unbeeinträchtigten Kambiums. Soe (1959) berichtete für *Populus deltoides*, dass die Bildung eines neuen Wundkambiums im Kallus dort begann, wo das Kallusgewebe an das von der Verletzung unbeeinflusste Kambium grenzt. Ähnliche Befunde bei anderen Baumarten bestätigen diese Entwicklung des Wundkambiums im lateralen, parenchymatischen Kallusgewebe, ohne jedoch genauer auf die Lage der ersten Wundkambiumzellen

einzuweichen (z.B. Doley und Leyton, 1970; Noel, 1970; Fink, 1999; Grünwald et al., 2002a). Sharples und Gunnery (1933) sowie Brown und Sax (1962) beschrieben die Entwicklung eines Wundkambiums, ausgehend vom unbeeinflussten Kambium an den seitlichen Wundrändern durch den Kallus auf schmalen Wundoberflächen. Auch andere Autoren beobachteten die Bildung eines Wundkambiums im parenchymatischen Flächenkallusgewebe (Warren Wilson und Warren Wilson, 1961; Noel, 1968; Warren Wilson und Warren Wilson, 1984; Warren Wilson und Grange, 1984). Die physiologischen Mechanismen, die für die Bildung eines Kambiums verantwortlich sind, und die Faktoren, die die Lage des Kambiums innerhalb eines wundinduzierten Kallusgewebes determinieren, sind bisher jedoch nicht eingehend untersucht worden.

Während das junge Wundkambium der Pappeln (Strategie B) begann, radial orientierte Xylem- und Phloemzellen zu bilden, dehnte es sich gleichzeitig weiter tangential aus. Sharples und Gunnery (1933) haben in gleicher Weise das Einsetzen der Xylembildung vor dem Abschluss der Kambiumregeneration innerhalb des Kallus auf Wundflächen von *Hibiscus* dokumentiert. Andere Studien haben gezeigt, dass in manchen Fällen tracheale Elemente und Siebröhrenstränge sogar noch vor der Bildung von Kambiumzellen gefunden werden können und nicht alle Zellen Kambiumderivate sein müssen (Warren Wilson und Warren Wilson, 1984), was auch verschiedentlich bei den vorliegenden Untersuchungen zu beobachten war. In den meisten Fällen wird jedoch ein Einsetzen der Xylemdifferenzierung nach der Regeneration eines Kambiums beschrieben (Soe, 1959; Noel, 1970; Warren Wilson und Warren Wilson, 1984; Grünwald et al., 2002a).

Während und nach der Kambiumregeneration bei *Populus trichocarpa* entwickeln sich erste Phloemelemente augenscheinlich aus parenchymatischen Zellen des Kallus, während es sich bei den ersten vom Kambium gebildeten Zellen um Gefäße handelt (Brown und Sax, 1962). Eine genaue Herkunftsbestimmung von unmittelbar am Kambium liegenden modifizierten Phloemfasern/Sklerenchymfasern und Sklereiden ist bei den untersuchten Überwallungswülsten von Pappel in frühen Entwicklungsstadien nicht eindeutig möglich. Demnach ist auch nicht zu bestimmen, ob Xylem- oder Phloemzellen vom Wundkambium als erstes gebildet werden. Während bei Soe (1959) in ihrer Form rundlichen Sklereiden ähnelnde und vom Wundkambium gebildete modifizierte Phloemfasern beschrieben werden, wurden bei den hier untersuchten Bäumen nur in späteren Entwicklungsstadien solche Zellen gefunden.

Das Wundkambium, das mit fortschreitender Ausdehnung durch das Kallusgewebe hindurch sich zunehmend parallel zum Wundrand orientiert, bildet schließlich Wundxylem und -phloem und führt so zur Entwicklung eines Überwallungswulstes. Eine derartige kontinuierliche Verlängerung des Kambiums innerhalb eines lateralen Wundkallus zu einem Zeitpunkt, während dessen in bereits regenerierten Kambiumsegmenten mit

Verzögerung die Xylembildung einsetzte, ist bisher für die Seitenkallusbildung nicht beschrieben worden.

Es existieren verschiedene Hypothesen zur Kambiumentwicklung innerhalb eines wundassoziierten Kallus (z.B. Sharples und Gunnery, 1933; Warren Wilson und Warren Wilson, 1961, 1984). Ein großer Teil dieser Hypothesen bezieht sich jedoch auf die Kambiumregeneration innerhalb eines auf einer Wundfläche entstandenen Kallus, wie z.B. die „gradient induction hypothesis“ von Warren Wilson und Warren Wilson (1961, 1984), und sind auf die Seitenkallusbildung nicht zu übertragen. Aloni (2004) sieht nach einer Verletzung den Auslöser für die Regeneration von Gewebe um eine Wunde in einer Unterbrechung des IAA-Stroms (indole-3-acetic acid oder Auxin). Dieser könne über die Wunde umgebende Parenchym- und/oder Kambiumzellen umgeleitet werden und dort die Regeneration auslösen. Die Überprüfung, ob sich die beschriebenen Strategien (A, B) auch durch hormonelle Konzentrationsunterschiede innerhalb ihrer Gewebebereiche unterscheiden, kann einen Ansatz für zukünftige Untersuchungen bilden.

4.3 Wie unterscheidet sich das von diesem Wundkambium gebildete Gewebe feinstrukturell und lignintopochemisch von unbeeinflusstem Gewebe?

Das vom Wundkambium gebildete Wundxylem und Wundphloem unterscheidet sich bereits strukturell stark von regulärem Xylem und Phloem. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen haben gezeigt, dass bereits die Zellen des Wundkambiums axial stark verkürzt sind. Diese Beobachtung wie auch die Reduktion der Länge und Durchmesser von Fasern und Gefäßen sowie deren oft welliger, unregelmäßiger und von der axialen Orientierung abweichender Verlauf korrespondieren mit den Beobachtungen von Buntrock (1989), die anatomische Untersuchungen zur Wundreaktion an *Populus euramericana* durchführte. Derartig modifizierte Fasern befanden sich bevorzugt in der wundassoziierten Gewebzone. Die Fasern zeigten in Wundnähe zusätzlich leicht verdickte Zellwände, wie es auch für die ersten 10-15 nach einer Verletzung gebildeten Zellen von *Acer saccharum* beschrieben wurde (Sharon, 1973). Im Gegensatz hierzu weisen *Acer rubrum* und *Betula papyrifera* eine reduzierte Wandstärke der Fasern innerhalb der Barriere-Zone und im Wundxylem auf (Bauch et al. 1980). In Übereinstimmung mit früheren Studien, in denen andere Pappelarten und auch andere Baumarten wie z.B. Ahorn, Birke und Buche untersucht wurden, nahmen die strukturellen Modifikationen mit zunehmendem Abstand vom ursprünglichen Wundrand ab (Brown und Sax, 1962; Mulhern et al., 1979; Rademacher et al., 1984; Lowerts et al., 1986; Liese und Dujesiefken, 1996; Novitskaya, 1998; Fink, 1999). Die Zeitspanne bis zur Normalisierung der Strukturen des Wundxylems schwankte von mehreren

Vegetationsperioden (Mulhern et al., 1979) über ca. zwei Jahre (Rademacher et al., 1984) bis zu kürzeren Phasen innerhalb einer Vegetationsperiode (Brown und Sax, 1962). Die Strukturen des Wundxylems der untersuchten Pappeln hatten sich innerhalb zweier Vegetationsperioden nach der Verletzung zum großen Teil normalisiert. In dem Teil des Wundxylems, der in der Vegetationsperiode des Jahres der Verletzung und dem Folgejahr gebildet wurde, nahmen die Modifikationen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ab. Während Zellwandverstärkungen schon nach wenigen Zellreihen nicht mehr nachweisbar waren, nahm die Dichte der Zellwände kontinuierlich bis zum Ende der Probennahme 2004 ab.

Für die Darstellung der Ligninverteilung in unmodifizierten Zellen des Referenzgewebes und den modifizierten Zellen des Wundxylems sowie der semiquantitativen Ligninbestimmung wurden zwei Varianten der Mikrospektralphotometrie eingesetzt, welche sich bei verschiedenen Baumarten und unterschiedlichen Fragestellungen als verlässliche Methoden erwiesen haben (z.B. Bland und Hillis, 1969; Scott et al., 1969; Fergus und Goring, 1970b; Musha und Goring, 1975; Bauch et al., 1976; Fukazawa, 1992; Bucciarelli et al., 1999; Grünwald et al., 2001, 2002b, c; Koch und Kleist, 2001; Takabe, 2002; Koch et al., 2003; Koch und Grünwald, 2004, Röder et al., 2004). Für detaillierte Informationen über die Mikroverteilung des Lignins innerhalb der unterschiedlichen Zellwandschichten wurden die Zellen zunächst mit Hilfe des „Flächen-Scannings“ bei konstanter Wellenlänge und anschließend mit Hilfe von Punktmessungen bei variablen Wellenlängen analysiert.

Die Sekundärwand von Laubholzfasern setzt sich überwiegend aus Guaiacyl- und Syringyleinheiten zusammen. Hieraus resultieren ein Absorptionsminimum bei Wellenlängen zwischen 250 und 260 nm und ein Absorptionsmaximum zwischen 270 und 280 nm. Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums und die Absorptionsintensität werden durch das Syringyl-Guaiacyl-Verhältnis sowie die Kondensation der Methoxygruppen ($\text{CH}_3\text{O}- = \text{MeO}$) bestimmt. Mit einem steigendem Guaiacyl-Anteil und einer sinkenden Zahl von MeO- zu C_9 -Gruppen verschiebt sich das Absorptionsmaximum in Richtung einer Wellenlänge von 280 nm und das Absorptionsniveau steigt (z.B. Fergus und Goring, 1970a, b; Fukazawa, 1992; Koch und Kleist, 2001; Takabe, 2002). Dies führt dazu, dass eine rein qualitative Veränderung der Ligninzusammensetzung den Eindruck einer veränderten Ligninkonzentration hervorrufen kann, weil sich das Absorptionsniveau verändert hat, obwohl die Gesamtkonzentration des Lignins unverändert ist. Diese Tatsache muss bei der semiquantitativen Interpretation der Unterschiede in den Absorptionsmaxima zwischen unmodifiziertem und modifiziertem Gewebe berücksichtigt werden. Das bedeutet, dass die in den Flächen-Scannings dargestellten Absorptionsmaxima (280 nm) in Relation zu den in den Spektren ersichtlichen Veränderungen der Zusammensetzung gesetzt werden müssen.

Bei *Populus* spp. setzt sich das Lignin generell aus Syringyl- und Guaiacyleinheiten wie auch p-Hydroxy-phenylpropan-Resten zusammen, deren ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt (Musha und Goring, 1975). Sind die p-Hydroxy-phenylpropan-Reste den Guaiacyleinheiten beigeordnet, so erscheint die Spitze des Absorptionsmaximums bei 280 nm abgeflacht; sind sie mit Syringyleinheiten assoziiert, so flacht auch hier die Spitze ab oder ein klares Maximum ist nicht mehr zu erkennen, wie für *Populus deltoides* von Musha und Goring (1975) gezeigt wurde und sich auch bei den hier aufgenommenen Spektren bestätigt hat. Aus diesen Gründen können mit Hilfe des errechneten Verhältnisses der Absorptionswerte bei 280 nm und 260 nm Wellenlänge ($A_{280} : A_{260}$) zusätzliche Aussagen zur Veränderung der Ligninzusammensetzung getroffen werden.

Die in den vorliegenden Untersuchungen bei den Punktmessungen in unmodifizierten Sekundärwänden der Xylemfasern gewonnenen Spektren mit ihrem relativ geringen Absorptionsmaximum (vergl. Flächen-Scannings) bei einer Wellenlänge von 270-272 nm und einer nur schwach ausgeprägten Spitze korrespondieren mit den Untersuchungsergebnissen früherer Studien, auch wenn das ermittelte $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnis leicht über den Werten anderer Pappelarten liegt (Fergus und Goring, 1970b; Musha und Goring, 1975; Fukazawa, 1992). Die Messergebnisse deuten auf einen geringen Gesamtgehalt von überwiegend aus mit p-Hydroxy-phenylpropan-Resten assoziierten Syringyllignineinheiten hin. Der im Verhältnis zur zusammengesetzten Mittellamelle und den Zellwicken relativ geringe Ligningehalt in der S2-Schicht sowie dessen homogene Verteilung innerhalb der S2 sind in guter Übereinstimmung mit den herkömmlichen Konzepten zum Zellwandaufbau in Laubhölzern (Fergus und Goring, 1970a, b; Musha und Goring, 1975; Terashima et al., 1986a, b; 1993; Donaldson, 2001; Donaldson et al., 2001; Grünwald et al., 2002c; Koch und Kleist, 2001; Takabe, 2000, 2002). Die annähernde Übereinstimmung der Wellenlängen der Absorptionsmaxima der S2 (270-272 nm) und der zusammengesetzten Mittellamelle (272 nm) bei erhöhtem Absorptionsniveau in letzterem Zellwandbereich deuten auf einen erhöhten Ligningehalt und eine weitgehend unveränderte Ligninzusammensetzung der Mittellamelle hin. Grünwald et al. (2002c) beschrieben für Xylemfasern mit zunehmender Distanz vom Kambium Veränderungen der Ligninzusammensetzung in der zusammengesetzten Mittellamelle. Sie führen die Verschiebung des Absorptionsmaximums zum Ende der Vegetationsperiode hin zu einer kürzeren Wellenlänge von 272 nm auf einen steigenden Anteil von Syringyl- und p-Hydroxy-phenylpropan-Bestandteilen zurück. Häufiger wurde jedoch ein höherer Anteil von Guaiacylligninbestandteilen in der Mittellamelle von Laubhölzern festgestellt (e.g. Fergus und Goring, 1970b; Musha und Goring, 1975; Terashima et al., 1986a, b, 1993). Die Flächen-Scannings der Mittellamellenregionen wiesen weiterhin auf eine eher großräumig heterogene Verteilung des Lignins hin, während bei *Hevea brasiliensis* die Ligninniveaus in der Mittellamelle und den Zellwicken engräumige Konzentrationsschwankungen zeigten (Singh und Schmitt,

2000). In guter Übereinstimmung mit den meisten Lignifizierungskonzepten für Laub- und Nadelhölzer deuteten sowohl die Flächen-Scannings als auch die Punktmessungen auf die höchsten Ligninkonzentrationen und hohe Gehalte von Guaiacyleinheiten in den Zellwänden hin (z.B. Fergus und Gorin, 1970b; Terashima et al., 1986b, 1993; Fukazawa, 1992; Donaldson, 2001; Donaldson et al., 2001; Koch und Kleist, 2001; Takabe, 2002).

Wundxylemzellen zeigten im Vergleich zu Kontrollgeweben neben den strukturellen Modifikationen auch Veränderungen ihres Ligningehaltes und ihrer Ligninzusammensetzung. Im unmittelbar an das zum Verletzungszeitpunkt bereits vorhandene Gewebe angrenzenden Wundxylem zeigten sowohl die leicht verstärkten Sekundärwände und die zusammengesetzten Mittellamellen der Fasern als auch die Zellwände erhöhte Absorptionswerte. Sie deuten auf einen höheren Ligningehalt hin, wie er auch für Parenchymzellen aus der Barriere-Zone von *Acer rubrum* und *Betula papyrifera* von Bauch et al. (1980) ermittelt wurde. Eine gegensätzliche Beobachtung machten Rademacher et al. (1984) bei *Acer saccharum*. Überdurchschnittlich hohe Ligningehalte wurden in dieser Wundxylemzone in den Sekundärwänden von Gefäßen und den sie umgebenden Zellen festgestellt. Entwickelte sich am Ende der Vegetationsperiode 2002 eine erkennbare Jahrringgrenze in Form radial abgeflachter Fasern, so zeigten diese, wie auch Fasern im unmodifizierten Xylem, einen zusätzlichen Anstieg des Ligningehaltes. In zahlreichen Fällen konnten die Zuwachszonen der Vegetationsperioden 2002 und 2003 jedoch nicht klar voneinander getrennt werden, vor allem nicht in Bereichen, die im eigentlichen Überwallungswulst lagen. Auch in späteren Stadien der Wundxylementwicklung (2002-2003) deuten die in den modifizierten Fasern aufgezeichneten Absorptionswerte auf erhöhte Ligninkonzentrationen in der zusammengesetzten Mittellamelle und den Zellwänden hin. Der Ligningehalt in der Sekundärwand war in dieser Wundxylemzone bereits auf ein normales Maß reduziert und zeigte Werte wie sie für unmodifiziertes Spätholz charakteristisch sind. Im Wundxylem, das kurz vor Ende der Vegetationsperiode 2003 gebildet wurde, reduzierte sich der Ligningehalt der zusammengesetzten Mittellamelle wieder soweit, dass nun Mittellamelle und Sekundärwand Ligningehalte des unmodifizierten Xylems aufwiesen. Ausnahme waren einige Zellwände, die auch noch bis zum Ende der Vegetationsperiode 2003 erhöhte Werte aufwiesen.

Die Spektren der Sekundärwände von Fasern aus dem bis zum Ende der Vegetationsperiode 2003 gebildeten Wundxylem zeigten eine Verschiebung zu größeren Wellenlängen. Zusammen mit dem gestiegenen $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnis deutet dies auf eine Reduktion der p-Hydroxy-phenylpropan-Einheiten bei gleichzeitig verstärktem Gehalt an Guaiacyleinheiten hin. Im Gegensatz hierzu zeigten die Wände von Parenchymzellen der Barriere-Zone von *Acer saccharum* einen erhöhten Anteil

an Syringyleinheiten (Rademacher et al., 1984). Auch in der Mittellamelle der hier untersuchten Pappeln zeigte sich eine Verschiebung der Absorptionsmaxima zu größeren Wellenlängen und ein Anstieg der $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnisse und damit der selbe Effekt wie in den Sekundärwänden. Von diesen übereinstimmenden Modifikationen innerhalb der Sekundärwand und der zusammengesetzten Mittellamelle abweichend, sank in den Zellzwickeln das $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnis bei gleichbleibender Wellenlänge des Absorptionsmaximums. Dies deutet darauf hin, dass sich bei einem unveränderten Syringyl-Guaiacyl-Verhältnis die Zahl der p-Hydroxy-phenylpropan-Bestandteile erhöht hat.

Die Wundxylemfasern, die zu Beginn der Vegetationsperiode 2004 gebildet wurden, zeigten normalisierte Ligninniveaus in der Sekundärwand, der zusammengesetzten Mittellamelle und den Zellzwickeln. Die Spektren in den Sekundärwänden und Mittellamellen der Fasern deuteten hingegen weiterhin auf eine modifizierte Ligninzusammensetzung hin. Ein reduzierter Anteil an p-Hydroxy-phenylpropan-Bestandteilen und ein Anstieg der Guaiacyleinheiten im Lignin wurde, wie auch im zuvor gebildeten Wundxylem, durch gestiegene $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnisse und eine Verschiebung der Absorptionsmaxima zu im Mittel größeren Wellenlängen deutlich. In den untersuchten Zellzwickeln ergaben sich hingegen ein geringerer Einbau von Guaiacyleinheiten und ein leicht erhöhter Anteil an p-Hydroxy-phenylpropan-Bestandteilen, denn sowohl die Wellenlänge der Absorptionsmaxima als auch das $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnis waren reduziert.

Die mikroskopischen und UV-mikrospektrophotometrischen Untersuchungen von Zellen im Wundxylem haben gezeigt, dass Verletzungen sowohl strukturelle als auch topochemische Modifikationen innerhalb der Zellwände von Fasern und Gefäßen auslösen. Diese Veränderungen reduzieren sich mit zunehmendem Abstand zu dem zum Zeitpunkt der Verletzung bereits vorhandenem Gewebe. Offenbar verläuft hierbei die Wiederherstellung der topochemischen Verhältnisse der Zellwände zu normalen Werten langsamer als die Normalisierung der Strukturparameter.

Neben den häufig beschriebenen strukturellen Modifikationen des neu gebildeten Wundxylems (z.B. Shigo und Marx, 1977; Shigo, 1984; Buntrock, 1989; Liese und Dujesiefken, 1989; Fink, 1999) scheinen auch die topochemischen Modifikationen des Wundxylems ein wichtiger Aspekt zur Erhöhung der Widerstandsfähigkeit insbesondere gegen eindringende Mikroorganismen zu sein. So beschreiben andere Autoren die Lignifizierung als einen Mechanismus, der diesbezüglich in verschiedenen Pflanzensystemen vorkommt (z.B. Vance et al., 1980; Nicholson und Hammerschmidt, 1992). Ferner wird auch die wundinduzierte Lignifizierung nach Rindenverletzungen vielfach genannt (z.B. Mullick, 1977; Biggs et al., 1984; Biggs, 1985; Rittinger et al., 1987; Trockenbrodt und Liese, 1991; Trockenbrodt, 1994; Hawkins und Boudet, 1996, 2003; Bucciarelli et al., 1999).

4.4 Welchen Einfluss haben Stammverletzungen auf die zum Verletzungszeitpunkt differenzierenden Zellen des Xylems der Pappel?

Starke Gewebemodifikationen gab es nicht nur im nach einer Verletzung gebildeten Gewebe, sondern auch in zum Zeitpunkt der Verletzung bereits vorhandenem Gewebe. Licht- und Elektronenmikroskopie zeigten, dass Xylemzellen, die sich zum Verletzungszeitpunkt differenzierten, in ihrem Wandaufbau beeinflusst wurden. Diese Zellen befanden sich in einem als Übergangszone bezeichneten Bereich zwischen dem bereits zum Zeitpunkt der Verletzung ausdifferenzierten Xylem und den nach der Verletzung neu entwickelten Geweben.

In Abhängigkeit vom Grad ihrer Differenzierung zum Verletzungszeitpunkt reagierten die verschiedenen Zelltypen in unterschiedlicher Art und Weise. Innerhalb des Phloems wurde die wundinduzierte Entwicklung modifizierter Fasern und Sklereiden sowie die Lignifizierung betroffener Gewebeabschnitte regelhaft beschrieben (z.B. Soe, 1959; Brown und Sax, 1962; Mullick, 1977; Trockenbrodt und Liese, 1991; Bucciarelli et al., 1999; Fink, 1999). Die wundinduzierte Bildung eines tangentialen Bandes dickwandiger, radial abgeflachter Fasern in einer Zone zwischen dem modifizierten und dem regulären Xylem als Folge einer Stichverletzung bei Pinning-Untersuchungen wurde bereits an Buchen beobachtet (Schmitt et al., 2000). In der vorliegenden Untersuchung traten innerhalb der Übergangszone verdickte Fasern nicht nur in Form eines Bandes auf, sondern entstanden vielmehr großräumig in der ehemaligen Xylemdifferenzierungszone. Innerhalb dieses Bereiches nimmt die Anzahl der dickwandigen Fasern mit zunehmender Entfernung zum Wundrand ab, so dass sich am Wundrand selbst eine deutlich begrenzende Zone aus dickwandigen Fasern befindet. Diese liegt zwischen intakten, weiter vom Wundrand entfernten Gewebezonen und den degenerierten äußeren Zellschichten der ehemaligen Differenzierungszone. Lowerts et al. (1986) berichteten, dass die Entwicklung von Sklereiden in wundnahe Xylem von *Liriodendron tulipifera* regelhaft auftrat. Auch für einige Zellen innerhalb der Übergangszone, deren verdickte Sekundärwand einen mehrschichtigen Aufbau zeigt, muss angenommen werden, dass es sich nicht ausschließlich um Fasern, sondern auch um Sklereiden bzw. Sklerenchymfasern handelt, insbesondere dann, wenn ihre axiale Ausdehnung stark reduziert ist. Neben dickwandigen und in ihrer axialen Ausdehnung begrenzten Fasern treten häufig septierte Fasern auf, in denen verstärkt Calciumoxalatkristalle zu finden sind. Grundsätzlich schien die Bildung von Calciumoxalatkristallen, die normalerweise auf die Rinde der Pappel beschränkt ist, in Axialparenchymzellen und septierten Fasern durch die Verletzung gefördert zu werden.

Elektronenmikroskopisch konnten drei Arten der Sekundärwandverstärkung gezeigt werden. Neben Fasern, deren verdickte S2 aus einer einzigen Schicht zu bestehen schien, fanden sich auch Fasern mit einer deutlich ausgeprägten zusätzlichen

Sekundärwandschicht und andere mit einem polylamellaten Aufbau der Sekundärwand. Die Ursache für eine derart unterschiedliche Wandverstärkung konnte nicht eindeutig geklärt werden. Ein entscheidender Faktor scheint möglicherweise der Grad der Differenzierung der Zellen zum Zeitpunkt der Verletzung zu sein. Demnach könnte der Zeitpunkt des Impulses zur Wandverstärkung je nach Stadium der Sekundärwandbildung eine wichtige Rolle spielen.

Die UV-mikrospektrophotometrischen Untersuchungen von Zellen innerhalb der Übergangszone haben neben den Modifikationen auf struktureller Ebene auch ein verändertes Absorptionsverhalten der Zellwände gezeigt. Die erhaltenen Spektren und UV-spektroskopischen Scanningprofile machten deutlich, dass Verletzungen Veränderungen der Ligninzusammensetzung und -verteilung in dem zum Verletzungszeitpunkt differenzierenden Xylem induzieren können. Die Flächen-Scannings, die die Mikroverteilung des Lignins widerspiegeln, zeigten erhöhte Ligningehalte in allen Wandbereichen, wobei die Maximalwerte in Faser- und Gefäßwänden stark schwankten. Während früher Stadien der Wandverstärkung scheint der Ligningehalt innerhalb der Sekundärwand in konzentrischen Unterschichten anzusteigen, die geringsten Ligningehalte immer in lumenseitigen Wandbereichen. Diese Ligninverteilung erinnert an die der Phloemsklereiden von Laubbälzern (eigene Beobachtungen) und an den polylamellaten Wandaufbau von Bambusfasern, wie u.a. von Koch und Kleist (2001) dargestellt. In späteren Stadien erscheint die Ligninverteilung besonders in den Sekundärwänden heterogener. Dieser Eindruck, den man besonders durch die zweidimensionale Darstellung der Flächen-Scannings gewinnt, relativiert sich bei der Betrachtung der dreidimensionalen Darstellungen, aus denen ersichtlich wird, dass auch in solchen Zellwänden eine klar strukturierte, ringförmige Anordnung der einzelnen Konzentrationsstufen vorherrscht. Unmodifizierte Xylemfasern von Laubbäumen sind, im Gegensatz zu den hier untersuchten Fasern der Übergangszone, durch eine uniforme Ligninverteilung über den gesamten Querschnitt der S2-Schicht gekennzeichnet (Saka und Goring, 1988; Koch und Kleist, 2001).

Die UV-spektroskopischen Punktmessungen in den verstärkten Sekundärwänden der Fasern der Übergangszone ergaben eine Verschiebung der Absorptionsmaxima zu größeren Wellenlängen. Gleichzeitig stieg das $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnis an. Die Werte bestätigten einen reduzierten Gehalt an p-Hydroxy-phenylpropan-Bestandteilen und eine verstärkte Einbindung von Guaiacyleinheiten bei der Ligninsynthese. In der zusammengesetzten Mittellamelle wiesen die gestiegenen $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnisse und die erhöhten Wellenlängen auf die gleichen Veränderungen in der Ligninzusammensetzung hin. Korrespondierend zu den vorliegenden Beobachtungen haben frühere Studien, neben einer Verstärkung vorhandener Zellwände durch eine zusätzliche Lignifizierung und/oder Suberinisierung, eine Veränderung der

Ligninzusammensetzung belegen können (z.B. Biggs et al., 1984; Hawkins und Boudet, 1996, 2003). Biggs et al. (1984) beschrieben, dass Lignin, das nach einer Rindenverletzung von Pappel in der Wundreaktionszone gebildet wird, einen erhöhten Guaiacylanteil zu haben scheint. Hawkins und Boudet (1996, 2003) konnten während zweier Studien an *Eucalyptus gunnii* zeigen, dass durch eine mechanische Verletzung ein von ihnen als „Verteidigungs-Lignin“ (engl.: defence lignin) bezeichnetes Lignin in Wundreaktionszonen des Phloems und des Xylems synthetisiert wird. Dieses „Verteidigungs-Lignin“ unterscheidet sich von dem normalen, bei der Zelldifferenzierung synthetisierten Lignin durch einen geringeren Anteil an Syringylbestandteilen und kann damit in Übereinstimmung mit den hier für Pappel ermittelten Werten als reich an Guaiacylligninbestandteilen bezeichnet werden. Die in den Zellwänden der Übergangszonen-Fasern aufgenommenen Spektren und $A_{280} : A_{260}$ -Verhältnisse zeigten keine deutlichen Unterschiede gegenüber den Werten von Zellwänden unmodifizierter Fasern. Dies deutet darauf hin, dass sich zwar der Ligningehalt erhöht, die Ligninzusammensetzung aber annähernd unverändert bleibt. Die Zellwände, die üblicherweise vor anderen Wandabschnitten lignifizieren und damit in ihrer Differenzierung zum Zeitpunkt der Verletzung weiter fortgeschritten waren als die anderen Zellwandabschnitte, erfahren keine auf die Verletzung zurückzuführende Veränderung ihrer Ligninzusammensetzung, sondern nur einen Anstieg ihres Ligningehaltes.

Sowohl die wundinduzierte Zellwandverstärkung als auch die modifizierte Lignin-topochemie sind als die Widerstandsfähigkeit eines Baumes verbessernde Mechanismen anzusehen (z.B. Vance et al., 1980; Hawkins und Boudet, 1996, 2003). Sie ergänzen die im CODIT-Modell beschriebenen Reaktionen durch die Entwicklung einer lignifizierten Grenzschicht, hervorgegangen aus zum Verletzungszeitpunkt bereits vorhandenen, undifferenzierten Xylemzellen, und nicht vom Wundkambium neu gebildeten Zellen wie bei der klassischen Barriere-Zone (z.B. Shigo und Marx, 1977; Shigo, 1984;).

Zusammenfassend hat die Beantwortung der vorgenannten Fragestellungen zu der Wundreaktion und Kallusbildung von *Populus tremula* x *Populus tremuloides* gezeigt, dass durch eine Verletzung in der Vegetationsruhe die bestimmenden jahreszeitlichen Faktoren nicht überlagert werden und keine unmittelbar einsetzenden Zellteilungen in parenchymatischem Gewebe auf der Wundfläche induziert werden können. Durch eine Verletzung konnte jedoch eine zu Beginn der Vegetationsperiode früher eingeleitete Reaktivierung und Teilungsaktivität im Wundgewebe belegt werden. Grundsätzlich waren die untersuchten Bäume zur Bildung von Kallusgewebe auf der Wundfläche fähig, wobei neben den Kambiumzellen den parenchymatischen Phloemzellen besondere Bedeutung zukommt. Auch bei der Entwicklung des Kallusgewebes in frühen Entwicklungsstufen eines seitlichen Überwallungswulstes bestätigte sich die wichtige

Rolle des Phloems für die Geweberegeneration. Zellen des sekundären Phloems sind nicht nur maßgeblich an der Bildung des parenchymatischen Kallusgewebes beteiligt, sondern ein neues Wundkambium geht in zahlreichen Fällen direkt durch Remeristematisierung aus ihnen hervor.

Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass neben der wundinduzierten Verstärkung der Sekundärwand besonders bei Xylemfasern in einer Zone zwischen dem zum Verletzungszeitpunkt vorhandenen Xylem und den nach der Verletzung gebildeten Geweben eine Modifizierung der Ligninverteilung stattfand. Neben dieser Gewebzone zeigten auch die vom regenerierten Wundkambium gebildeten Wundxylemfasern zunächst verstärkte Sekundärwände und eine veränderte Ligninverteilung. Hier nehmen die strukturelle Modifikation sowie der erhöhte Ligningehalt mit zunehmender Entfernung vom zum Verletzungszeitpunkt vorhandenen Gewebe ab. Diese beiden Gewebe waren an ihrem Außenrand häufig nur durch eine schmale Zone aus Parenchymzellen voneinander getrennt. Es entwickelte sich demnach am lateralen Wundrand eine Grenzschicht, bestehend aus Zellen, deren Sekundärwand verdickt und deren Ligningehalt erhöht war.

5. Zusammenfassung

Bäume sind in der Lage, Schäden durch mechanische Verletzungen mit Hilfe einer Vielzahl komplexer Wundreaktionsmechanismen zu begrenzen. Es lassen sich hierbei zwei grundlegende Zielsetzungen unterscheiden. Zum einen dienen die Wundreaktionen der Begrenzung der Schädwirkungen und zum anderen der Regeneration von durch die Verletzung beeinträchtigtem Gewebe. In der vorliegenden Arbeit zu Reaktionen bei der Pappel sollte überprüft werden, ob Zellteilungsaktivität durch eine Stammverletzung in der Vegetationsruhe induziert werden kann, welche Zellen an der Regeneration von Gewebe nach einer Verletzung in der Vegetationsperiode beteiligt sind und welche Modifikationen das neu gebildete Wundxylem aufweist. Weiterhin sollte der Einfluss von Verletzungen auf die zum Verletzungszeitpunkt differenzierenden Zellen des Xylems untersucht werden.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden zwei Versuchsserien mit jeweils fünf Pappeln untersucht. Für die Zuordnung des Einsetzens der Zellteilungsaktivität nach einer Verletzung in der Vegetationsruhe zu den Perioden der Vegetationsruhe oder der Vegetationszeit wurden die Entwicklungen von Wundgewebe auf der Wundfläche licht- und elektronenmikroskopisch untersucht und dem Verlauf der Zellteilungsaktivität in unbeeinflusstem Gewebe gegenübergestellt. Die Bestimmung der an der Regeneration eines Wundkambiums beteiligten Gewebe und die Beschreibung der Modifikationen im zum Verletzungszeitpunkt differenzierenden Xylem sowie dem nach der Verletzung gebildeten Wundxylem erfolgten durch strukturelle, ultrastrukturelle und lignintopochemische Untersuchungen. Diese Versuche wurden nach einer Verletzung in der Vegetationsperiode während der Seitenkallusbildung betrachtet.

Durch eine großflächige Verletzung in der Vegetationsruhe kann in den auf der Wundfläche verbleibenden parenchymatischen Zellen des sekundären Phloems und den Kambiumzellen keine unmittelbar auf die Verletzung folgende Zellteilung induziert werden. Die Verletzung führt jedoch in Teilbereichen der Wundoberfläche zu einer vorgezogenen Reaktivierung und Teilungsaktivität der Kambium- und Kalluszellen zu Beginn der Vegetationsperiode. Die Zellteilung setzt im Wundgewebe zu einem Zeitpunkt ein, an dem sich das unbeeinflusste Kambium in der Reaktivierungsphase befindet. Diese zeitlich vorgezogene Reaktivierung kann jedoch nicht als regelhaft betrachtet werden, da in anderen Zonen der Wundoberfläche die Reaktivierung der Zellen erst nach denen des Kambiums einsetzt.

Nach den vorliegenden Befunden sind an der Regeneration des Kambiums nach einer Verletzung in der Vegetationsperiode zwei Zellarten beteiligt. Demzufolge kann sich das Kambium aus Zellen des parenchymatischen Kallusgewebes entwickeln, das

wiederum aus undifferenzierten Xylemzellen, parenchymatischen Phloemzellen, aber auch aus Kambiumzellen hervorgegangen ist. Besondere Bedeutung besitzen Zellen des sekundären Phloems dadurch, dass sich Kambiumzellen auch direkt aus zunächst dedifferenzierten und anschließend meristematisierten Phloemzellen entwickeln können. Anhand der mikroskopischen Beobachtungen lassen sich zwei Strategien der Kambiumregeneration an ihren Entwicklungsstufen unterscheiden:

Strategie A mit drei Entwicklungsstufen:

1- Entwicklung eines uniformen, parenchymatischen Kallusgewebes am Wundrand, hervorgehend aus undifferenzierten Zellen des Xylems, aus Phloemzellen und Kambiumzellen; 2- Entwicklung eines Wundkambiums überwiegend innerhalb des differenzierten sekundären Phloems, das schließlich halbkreisförmig angeordnet ist und Bereiche des zum Verletzungszeitpunkt vorhandenen Phloems einschließt; 3- Entwicklung von Wundxylem und -phloem durch das neue Wundkambium mit der Tendenz, einen Überwallungswulst zu bilden.

Strategie B mit vier Entwicklungsstufen:

1- Entwicklung eines uniformen, parenchymatischen Kallusgewebes am Wundrand, hervorgehend aus undifferenzierten Zellen des Xylems, aus Phloemzellen und Kambiumzellen; 2- Entwicklung eines Wundkambiums innerhalb des parenchymatischen Kallusgewebes als eine tangentialer Verlängerung des von der Verletzung unbeeinflussten Kambiums; 3- Bildung strikt radial ausgerichteter Xylem- und Phloemzellen durch die neu gebildeten Wundkambiumabschnitte; 4- Verlängerung des Wundkambiums, das nun parallel zum senkrechten Wundrand verläuft und abschließend Bildung von Wundphloem und -xylem.

Das Wundxylem zeigt allgemein neben strukturellen Modifikationen wie z.B. einem unregelmäßigen und von der axialen Orientierung abweichenden Verlauf der verkürzten Gefäße und Fasern auch topochemische Veränderungen in den Zellwänden. Neben einem erhöhten Ligningehalt in allen Wandbereichen zeigt die Ligninzusammensetzung in den Sekundärwänden und zusammengesetzten Mittellamellen einen erhöhten Anteil von Guaiacyllignin-Bestandteilen bei einer gleichzeitigen Reduktion der p-Hydroxy-phenylpropan-Bestandteile. Davon abweichend erhöht sich in den Zellwänden die Zahl der p-Hydroxy-phenylpropan-Bestandteile bei einem dem Kontrollgewebe gegenüber unveränderten Syringyl/Guaiacyl-Ligninverhältnis. Diese Veränderungen verringern sich mit zunehmendem Abstand vom zum Verletzungszeitpunkt vorhandenen Geweben.

Verletzungen lösen bei Pappel auch eine Verstärkung der Zellwände und eine Modifikation der Lignintopochemie in Xylemfasern aus, die sich zum Verletzungszeitpunkt in der Differenzierung befinden. Elektronenmikroskopisch können drei Arten der Sekundär-

wandverstärkung unterschieden werden. Neben einer Gruppe von Xylemfasern, die eine durchgehend verstärkte S2-Schicht zeigen, finden sich auch Fasern mit einer zusätzlich aufgelagerten Sekundärwandschicht und eine dritte, kleinere Gruppe mit einer aus zahlreichen Unterschichten aufgebauten Sekundärwand. Die Sekundärwand, die zusammengesetzte Mittellamelle und die Zellzwickel dieser Fasern sind durch erhöhte Ligningehalte und eine heterogene Ligninverteilung charakterisiert. Während in der Sekundärwand und der Mittellamelle der Anteil der Guaiacyllignin-Bestandteile bei einer gleichzeitigen Abnahme der p-Hydroxy-phenylpropan-Bestandteile ansteigt, kann im Zellzwickel keine wundinduzierte Veränderung der Ligninzusammensetzung festgestellt werden.

6. Gesamtverzeichnis der verwendeten Literatur

- ALONI R.** 1991. Wood formation in deciduous hardwood trees. In: Raghavendra AS, (ed.), *Physiology of trees*. New York, Chichester, Toronto: John Wiley and Sons, 175 – 197.
- ALONI R.** 2004. The induction of vascular tissues by auxin. In: Bisseling T, Schell J (eds.), *New developments in plant hormone research*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 471 – 492.
- ANDERSON NA, OSTRY ME, ANDERSON GW.** 1979. Insect wounds as infection sites for *Hypoxylon mammatum* on trembling aspen. *Phytopathology* 69, 476-479.
- AREND M, FROMM J.** 2003. Ultrastructural changes in cambial cell derivatives during xylem differentiation in poplar. *Plant Biology* 6, 255-264.
- BAUCH J, SEEHANN G, FITZNER H.** 1976. Microspectrophotometrical investigations on lignin of decayed wood. *Material und Organismen, Beiheft 3*, 141-152.
- BAUCH J, SHIGO AL, STARCK M.** 1980. Auswirkungen von Wunden im Xylem von Ahorn- und Birkenarten. *Holzforschung* 34, 153-160.
- BIGGS AR.** 1984. Intracellular suberin: occurrence and detection in bark. *IAWA Bulletin* 5, 243-248.
- BIGGS AR.** 1985. Suberized boundary zones and the chronology of wound response in tree bark. *Phytopathology* 75, 1191-1195.
- BIGGS AR.** 1987. Occurrence and location of suberin in wound reaction zones in xylem of 17 tree species. *Phytopathology* 77, 718-725.
- BIGGS AR, MERRILL W, DAVIS DD.** 1984. Discussion: Response of bark tissues to injury and infection. *Canadian Journal of Forest Research* 14, 351-356.
- BLAND DE, HILLIS WE.** 1969. Microspectrophotometric investigations of lignin and polyphenol distribution in wood sections. *Appita* 23, 204-210.
- BLOOMBERG WJ, FARRIS SH.** 1963. *Cytospora* canker of poplars: Bark wounding in relation to canker development. *Canadian Journal of Botany* 41, 303-310.
- BROWN CL, SAX K.** 1962. The influence of pressure on the differentiation of secondary tissues. *American Journal of Botany* 49, 683-691.
- BUCCIARELLI B, OSTRY ME, FULCHER RG, ANDERSON NA, VANCE CP.** 1999. Histochemical and microspectrophotometric analyses of early wound responses of resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammatata* (*Hypoxylon mammatum*). *Canadian Journal of Botany* 77, 548-555.
- BUNTROCK M.** 1989. Anatomische Untersuchungen über die Wundreaktion der Pappel. Diploma thesis, University of Hamburg, Germany.
- CHUDNOFF M.** 1971. The regeneration of debarked Eucalyptus. *Forest Science* 17, 300-305.
- DE VRIES H.** 1876: Über Wundholz. *Flora No. 1-9*.

- DOLEY D, LEYTON L.** 1970. Effects of growth regulating substances and water potential on the development of wound callus in *Fraxinus*. *New Phytologist* 69, 87-102.
- DONALDSON LA.** 2001. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57, 859-873.
- DONALDSON LA, HAGUE J, SNELL R.** 2001. Lignin distribution in coppice poplar, linseed and wheat straw. *Holzforschung* 55, 379-385.
- DUJESIEFKEN D, LIESE W.** 1995. Wundreaktionen bei Bäumen. In: Dujesiefken D. (ed.), *Wundbehandlung an Bäumen*. Braunschweig: Bernhard Thalacker Verlag, 23-32.
- DUJESIEFKEN D, LIESE W.** 2006. Die Wundreaktionen von Bäumen - CODIT heute. In: Dujesiefken D., Kockerbeck P. (ed.), *Jahrbuch der Baumpflege*. Braunschweig: Thalacker Medien, 21-41.
- DUJESIEFKEN D, SCHMITZ-FELTEN E.** 1995 a. Zur Geschichte der Wundbehandlung. In: Dujesiefken D. (ed.), *Wundbehandlung an Bäumen*. Braunschweig: Bernhard Thalacker Verlag, 7 – 15.
- DUJESIEFKEN D, SCHMITZ-FELTEN E.** 1995 b. Prüfung von Wundverschlussmitteln, Normen und Richtlinien. In: Dujesiefken D. (ed.), *Wundbehandlung an Bäumen*. Braunschweig: Bernhard Thalacker Verlag, 16 – 22.
- DUJESIEFKEN D, PEYLO A, LIESE W.** 1991. Einfluß der Verletzungszeit auf die Wundreaktionen verschiedener Laubbäume und der Fichte. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 110, 371-380.
- DUJESIEFKEN D, LIESE W, SHORTLE W, MINOCHA R.** 2005. Response of beech and oaks to wounds made at different times of the year. *European Journal of Forest Research* 124, 113-117.
- Du MONCEAU D.** 1764/65. Von der Zergliederung der Pflanzen und der Einrichtung ihres Wachsens In: *Naturgeschichte der Bäume* 276.
- ECKSTEIN D, LIESE W, SHIGO AL.** 1979. Relationship of wood structure to compartmentalization of discoloured wood in hybrid poplar. *Canadian Journal of Forest Research* 9, 205-210.
- FAHN A, WERKER E.** 1990. Seasonal cambial activity. In: Iqbal M, (ed), *The vascular cambium*. Taunton Somerset, England: Research Studies Press, 139 – 158.
- FARRAR JJ, EVERT RF.** 1997 a. Seasonal changes in the ultrastructure of the vascular cambium of *Robinia pseudoacacia* L. *Trees* 11, 191 - 202.
- FARRAR JJ, EVERT RF.** 1997 b. Ultrastructure of cell division in the fusiform cells of the vascular cambium in *Robinia pseudoacacia* L. *Trees* 11, 203-215.
- FERGUS BJ, GORING DAI.** 1970 a. The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. *Holzforschung* 24, 113-117.
- FERGUS BJ, GORING DAI.** 1970 b. The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy. *Holzforschung* 24, 118-124.
- FINK S.** 1999. *Pathological and regenerative plant anatomy*. Berlin, Stuttgart: Gebrüder Borntraeger.

- FISCHER JB.** 1981. Wound healing by exposed secondary xylem in *Adansonia* (*Bombacaceae*). *IAWA Bulletin* 2, 193-199.
- FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.** 1979. *Poplars and willows in wood production and land use*. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- FUKAZAWA K.** 1992. Ultraviolet microscopy. In: Lin SY, Dence CW, (eds.), *Methods in lignin chemistry*. Berlin: Springer Verlag, 110-121.
- GERLACH D.** 1977. *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- GÖTZE H, SCHULTZE-DEWITZ G, WENK M.** 1989. Abnorme Holzstrukturen, Teil II: Stocküberwallung an Nadelholz. *Drevársky Výskum* 121, 33-48.
- GRÜNWARD C, STOBBE H, SCHMITT U.** 2002 a. Entwicklungsstufen der seitlichen Wundüberwallung von Laubgehölzen. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 121, 50-58.
- GRÜNWARD C, RUEL K, SCHMITT U.** 2002 b. Differentiation of xylem cells in rolC transgenic aspen trees – a study of secondary cell wall development. *Annals of Forest Science* 59, 679-685.
- GRÜNWARD C, RUEL K, JOSELAU JP, FLADUNG M.** 2001. Morphology, wood structure and cell wall composition of rolC transgenic and non-transformed aspen trees. *Trees* 15, 503-517.
- GRÜNWARD C, RUEL K, KIM YS, SCHMITT U.** 2002 c. On the cytochemistry of cell wall formation in poplar trees. *Plant Biology* 4, 13-21.
- HARTIG T.** 1844. Über gelungene Versuche der Reproduktion neuer Holz- und Rindenschichten aus dem Holzkörper der Bäume. *Verhandl. Verein Bef. Gartenbau Kgl. Preuss. Staaten* 17, 42-43.
- HAWKINS S, BOUDET A.** 1996. Wound-induced lignin and suberin deposition in a woody angiosperm (*Eucalyptus gunnii* Hook.): histochemistry of early changes in young plants. *Protoplasma* 191, 96-104.
- HAWKINS S, BOUDET A.** 2003. "Defence lignin" and hydroxycinnamyl alcohol dehydrogenase activities in wounded *Eucalyptus gunnii*. *Forest Pathology* 33, 91-104.
- HÖSTERMANN G.** 1937. Zur Heilung von Baumwunden. *Gartenschönheit*, 23-24.
- IMAGAWA H, FUKUZAWA K.** 1978. Influence of wood extractives on UV-microscopy for lignin determination. *Mokuzai Gakkaishi* 24, 583-586.
- JAKES E, HEXNEROVA H.** 1939. Über den Einfluss der Wuchsstoffe auf Wundgewebekbildung bei Obstbäumen. *Gartenbauwissenschaft* 13, 83-93.
- KAUFERT F.** 1937. Factors influencing the formation of periderm in aspen. *American Journal of Botany* 24, 24-30.
- KARNOVSKY MJ.** 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27, 137-138.

- KOCH G.** 2003. Biologische und chemische Untersuchungen über Inhaltsstoffe im Holzgewebe von Buche (*Fagus sylvatica* L.) und Kirschbaum (*Prunus serotina* Borkh.) und deren Bedeutung für Holzverfärbungen. Forschungsbericht, Universität Hamburg.
- KOCH G, KLEIST G.** 2001. Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. *Holzforschung* 55, 563-567.
- KOCH G, GRÜN WALD C.** 2004. Application of UV microspectrophotometry for topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. In: Schmitt U, Ander P, Barnett JR, Emons AMC, Jeronimidis G, Saranpää P, Tschegg S, (eds.), *Wood fibre cell walls: Methods to study their formation, structure and properties*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Science, 119-130.
- KOCH G, PULS J, BAUCH J.** 2003. Topochemical characterisation of phenolic extractives in discoloured beechwoog (*Fagus sylvatica* L.). *Holzforschung* 57, 339-345.
- KOCH G, RICHTER HG, SCHMITT U.** 2006. Topochemical investigation on phenolic deposits in vessels of afzelia (*Afzelia* spp.) and merbau (*Intsia* spp.) heartwoods and their influence on wood utilisation. *Holzforschung*, im Druck.
- KOWOL T.** 1987. Untersuchungen über Astungsmethoden an Stadtbäumen. Diploma Thesis, University of Hamburg, Germany.
- LADEFOGED K.** 1952. The periodicity of wood formation. *Danske Biologiske Skrifter* 7, 1 - 98.
- LARSON PR.** 1962. Auxin gradients and the regulation of cambial activity. In: Kozlowski TT, (ed.), *Tree growth*. New York: The Ronald Press Company, 97 - 117.
- LARSON PR.** 1994. *The vascular cambium: Development and structure*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer Verlag.
- LIESE W, DUJESIEFKEN D.** 1989. Wundreaktionen bei Bäumen. Tagungsbericht, 2. *Symposium, Ausgewählte Probleme der Gehölzphysiologie – Gehölze, Mikroorganismen und Umwelt*. Tharandt, 13.- 16. Juni, 75-80.
- LIESE W, DUJESIEFKEN D.** 1996. Wound reactions of trees. In: Raychaudhuri SP, Maramorosch K, (eds.), *Forest trees and palms: Diseases and control*. Oxford, New Delhi, Calcutta: IBH publishing, 21-35.
- LILLE RD.** 1954. *Histopathologic technique and practical histochemistry*. 2nd edn. New York: McGraw-Hill.
- LOWERTS G, WHEELER EA, KELLISON RC.** 1986. Characteristics of wound-associated wood of Yellow-Poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). *Wood and Fiber Science* 18, 537-552.
- MCDUGALL DN, BLANCHETTE RA.** 1996. Polyethylene plastic wrap for tree wounds: a promotor of wound closure on fresh wounds. *Journal of Arboriculture* 22, 205-210.
- MCQUILKIN WE.** 1950. Effects of some growth regulators and dressings on the healing of tree wounds. *Journal of Forestry* 48, 423-428.

- MELCHER E, JÜNGEL P, MÖLLENDORF B, SCHMITT U.** 2003. Identification of a hydroxy substituted calamenene-a sesquiterpene associated with wound reactions in non-infected xylem of *Tilia* spp. *Phytochemistry* 62, 707-713.
- MULHERN W, SHORTLE W, SHIGO AL.** 1979. Barrier zones in red maple: an optical and scanning microscope examination. *Forest Science* 25, 311-316.
- MULLICK DB.** 1977. The non-specific nature of defence in bark and wood during wounding, insect and pathogen attack. *Recent Advances in Phytochemistry* 11, 395-441.
- MUSHA Y, GORING DAI.** 1975. Distribution of syringyl and guaiacyl moieties in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. *Wood Science and Technology* 9, 45-58.
- NEELY D.** 1988. Wound closure rates on trees. *Journal of Arboriculture* 14, 250-254.
- NICHOLSON RL, HAMMERSCHMIDT R.** 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30, 369-389.
- NOEL ARA.** 1968. Callus formation and differentiation at an exposed cambial surface. *Annals of Botany* 3, 347-359.
- NOEL ARA.** 1970. The girdled tree. *Annals of Botany* 32, 162-195.
- NOVITSKAYA LL.** 1998. Regeneration of bark and formation of abnormal birch wood. *Trees* 13, 74-79.
- OVEN P, SCHMITT U, STOBBE H.** 2000. Wundreaktionen im Splintholz der Gemeinen Kiefer (*Pinus sylvestris* L.). In: Dujesiefken D., Kockerbeck P. (ed.), *Jahrbuch der Baumpflege*. Braunschweig: Thalacker Medien, 208-211.
- OVEN P, TORELLI N, SHORTLE WC, ZUPANCIC M.** 1999. The formation of a ligno-suberized layer and necrophylactic periderm in beech bark (*Fagus sylvatica* L.). *Flora* 194, 137-144.
- PEARCE RB.** 2000. Decay development and its restriction in trees. *Journal of Arboriculture* 26, 1-11.
- RADEMACHER P, BAUCH J, SHIGO AL.** 1984. Characteristics of xylem formed after wounding in *Acer*, *Betula* and *Fagus*. *IAWA Journal* 5, 141-151.
- RITTINGER PA, BIGGS AR, PEIRSON DR.** 1986. Histochemistry of lignin and suberin in boundary layers formed after wounding in various plant species and organs. *Canadian Journal of Botany* 65, 1886-1892.
- RÖDER T, KOCH G, SIXTA H.** 2004. Application of confocal Raman spectroscopy for the topochemical distribution of lignin and cellulose in plant cell walls of beech wood (*Fagus sylvatica* L.) compared to UV microspectrophotometry. *Holzforschung* 58, 480-482.
- SAKA S, GORING DAI.** 1988. Localization of lignins in wood cell walls. In: Higuchi T, (ed.) *Biosynthesis and Biodegradation of wood components*. New York: Academic Press, 51-62.
- SAVIDGE RA.** 1996. Xylogenesis, genetic and environmental regulation (review). *IAWA Journal* 17, 269 – 310.

- SAVIDGE RA.** 2001. Intrinsic regulation of cambial growth. *Journal of Plant Growth Regulation* 20, 52-77.
- SCHMITT U, LIESE W.** 1990. Wound reaction of the parenchyma in *Betula*. *IAWA Journal* 11, 413-420.
- SCHMITT U, LIESE W.** 1992 a. Seasonal influences on early wound reactions in *Betula* and *Tilia*. *Wood Science and Technology* 26, 405-412.
- SCHMITT U, LIESE W.** 1992 b. Response of xylem parenchyma by suberization in some hardwoods after mechanical injury. *Trees* 8, 23-30.
- SCHMITT U, LIESE W.** 1995. Wundreaktionen im Xylem einiger Laubbäume. *Drevársky Výskum* 4, 1-10.
- SCHMITT U, LIESE W.** 1997. Zellreaktionen im Splintholz von Laubbäumen nach Verletzung. In: Dujesiefken D., Kockerbeck P. (ed.), *Jahrbuch der Baumpflege*. Braunschweig: Thalacker Medien, 219-222.
- SCHMITT U, MELCHER E.** 2004. Section staining with potassium permanganate for transmission electron microscopy: a useful tool for lignin localisation. In: Schmitt U, Ander P, Barnett JR, Emons AMC, Jeronimidis G, Saranpää P, Tschegg S, (eds.), *Wood fibre cell walls: Methods to study their formation, structure and properties*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Science, 105-118.
- SCHMITT U, MÖLLER R, ECKSTEIN D.** 2000. Seasonal wood formation dynamics of Beech (*Fagus sylvatica* L.) and Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) as determined by the "Pinning" technique. *Journal of Applied Botany* 74, 10-16.
- SCOTT JAN, PROCTER AR, FERGUS BJ, GORING DAI.** 1969. The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood. Description and validity of the technique. *Wood Science and Technology* 3, 73-92.
- SHARON EM.** 1973. Some histological features of *Acer saccharum* wood formed after wounding. *Canadian Journal of Forest Research* 3, 83-89.
- SHARPLES A, GUNNERY H.** 1933. Callus formation in *Hibiscus rosa-sinensis* L. and *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. *Annals of Botany* 47, 827-839.
- SHEAR GM.** 1936. Lanolin as a wound dressing for trees. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 34, 286-288.
- SHIGO AL.** 1984. Compartmentalization: A conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annual Review of Phytopathology* 22, 189-214.
- SHIGO AL.** 1985. Kompartimentierung als Abwehrreaktion bei Bäumen. *Spektrum der Wissenschaft* 7, 86-94.
- SHIGO AL, MARX HG.** 1977. Compartmentalization of decay in trees. USDA Forest Service, *Agriculture Information Bulletin* 405.
- SHORTLE WC.** 1979. Compartmentalization of decay in red maple and hybrid poplar trees. *Phytopathology* 69, 410-413.

- SHORTLE WC, SHIGO AL.** 1978. Effect of plastic wrap on wound closure and internal compartmentalization of discolored and decayed wood in red maple. *Plant Disease Report* 62, 999-1002.
- SINGH AP, SCHMITT U.** 2000. High variability in the distribution of lignin in the middle lamella of Rubber-wood (*Hevea brasiliensis*) cells. In: Kim YS, (ed.) *New horizons in wood anatomy*. Kwangju: Chonnam Nat'l University Press, 203-207.
- SOE K.** 1959. Anatomical studies of bark regeneration following scoring. *Journal of the Arnold Arboretum* 40, 260-267.
- SPURR AR.** 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research* 26, 31-43.
- STOBBE H.** 2001. Entwicklung und Feinstruktur von Flächenkallus- Gewebe und seine Bedeutung für die Behandlung von Anfahrschäden an Alleebäumen. PhD. Thesis, University of Hamburg, Germany.
- STOBBE H, DUJESIEFKEN D, ECKSTEIN D, SCHMITT U.** 2002 a. Wound reactions of broad-leaved trees after stem wound treatment with wound dressings and plastic wrap. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 54, 312-317.
- STOBBE H, SCHMITT U, ECKSTEIN D, DUJESIEFKEN D.** 2002 b. Developmental stages and fine structure of surface callus formed after debarking of living lime trees (*Tilia* spp.). *Annals of Botany* 89, 773-782.
- STOBBE H, DUJESIEFKEN D, SCHMITT U, ECKSTEIN D.** 2003. Wundbehandlung von frischen Anfahrschäden. *Stadt und Grün* 5, 39-43.
- SUNDBERG B, UGGLA C, TUOMINEN H.** 2000. Cambial growth and auxin gradients. In: Savidge RA, Barnett JR, Napier R, (eds.), *Cell and molecular biology of wood formation*. Oxford: BIOS Scientific Publications, 169-188.
- SWARBRICK T.** 1927. The healing of wounds in woody stems II. Contributions to the physiological anatomy of ringed apple shoots. *Journal of Pomology & Horticultural Science* 6, 29-46.
- TAKABE K.** 2000. Formation and ultrastructure of lignified plant cell walls. In: Kim Ys (ed.), *New horizons in wood anatomy*. Kwangju: Chonnam Nat'l University Press, 169-180.
- TAKABE K.** 2002. Cell walls of woody plants: Autoradiography and ultraviolet microscopy. In: Chaffey N, (ed.), *Wood formation in trees*. London: Taylor & Francis, 159-177.
- TERASHIMA N, FUKUSHIMA K, TAKABE K.** 1986 b. Heterogeneity in formation of lignin. VIII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in *Magnolia kobus* DC. *Holzforschung* 40, 101-105.
- TERASHIMA N, FUKUSHIMA K, TAKABE K.** 1993. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J, (eds.), *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison: ASA-CSSA-SSSA, WI, 247-270.
- TERASHIMA N, FUKUSHIMA K, TSUCHIYA S, TAKABE K.** 1986 a. Heterogeneity in formation of lignin. VII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in poplar. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 6, 495-504.

- TROCKENBRODT M.** 1994. Light and electron microscopic investigations on wound reactions in the bark of *Salix caprea* L. and *Tilia tomentosa* Moench. *Flora* 189, 131-140.
- TROCKENBRODT M, LIESE W.** 1991. Untersuchungen zur Wundreaktion in der Rinde von *Populus tremula* L. und *Platanus xacerifolia* (Ait.) Willd. *Angewandte Botanik* 65, 279-287.
- VANCE CP, KIRK TK, SHERWOOD RT.** 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 18, 259-288.
- WARREN WILSON J, WARREN WILSON PM.** 1961. The position of regenerating cambia, a new hypothesis. *New Phytologist* 60, 63-73.
- WARREN WILSON J, WARREN WILSON PM.** 1984. Control of tissue patterns in normal development and in regeneration. In: Barloss PW, Carr DJ, (eds.), *Positional controls in plant development*. Cambridge: Cambridge University Press, 225-280.
- WARREN WILSON J, GRANGE RI.** 1984. Regeneration of tissue in wounded stems: A quantitative study. *Annals of Botany* 53, 515-525.
- WOOD H.** 1980. An investigation of callus growth on the wounds of hardwood trees. *Arboricultural Journal* 4, 79-88.
- ZASCHE H.** 1960. Untersuchungen über den Wundverschluss von Längswunden bei *Corylus coluna*. *Zeitschrift für Botanik* 48, 304-239.
- ZHENGLI L, KEMING C.** 1988. Differentiation of secondary xylem after girdling. *IAWA Journal* 9, 375-383.

7. Verzeichnis der wissenschaftlichen Beiträge

7.1 Verzeichnis der im Rahmen der Promotion angefertigten Originalveröffentlichungen in Zeitschriften mit Review-Verfahren und Erläuterungen zu den eigenen Anteilen an den Arbeiten

-Frankenstein C, Schmitt U, Waitkus C, Eckstein D. 2005. Wound callus formation - a microscopic study on poplar (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.). **Journal of Applied Botany and Food Quality** 79, 44-51.

Konzipierung der Arbeit, Literaturrecherche, Versuchsdurchführung, Datenaufnahme und -auswertung sowie publikationsfähige Darstellung. Die Co-Autoren haben sich mit Diskussionsbeiträgen oder der Unterstützung der fotografischen Arbeit beteiligt.

-Frankenstein C, Eckstein D, Schmitt U. 2005. The onset of cambium activity - A matter of agreement? **Dendrochronologia** 23, 57-62.

Beteiligung an der Konzipierung der Arbeit, vollständige Versuchsdurchführung, Datenaufnahme und -auswertung sowie Beteiligung an der publikationsfähigen Darstellung.

-Frankenstein C, Schmitt U, Koch G. 2006. Topochemical Studies on modified lignin distribution in the xylem of Poplar (*Populus* spp.) after wounding. **Annals of Botany** 97, 195-204.

Konzipierung der Arbeit, Literaturrecherche, Versuchsdurchführung, Datenaufnahme und -auswertung sowie publikationsfähige Darstellung. Diskussion der Ergebnisse mit Beteiligung der Co-Autoren.

-Schmitt U, Singh A, **Frankenstein C**, Möller R. 2006. Cell wall modifications in woody stems induced by mechanical stress. **New Zealand Journal of Forestry**, angenommen zur Veröffentlichung im Januar 2006

Beteiligung an der Konzipierung der Veröffentlichung, Versuchsdurchführung und Datenauswertung (wundinduzierte Modifikationen). Beteiligung an der Diskussion der Ergebnisse und der publikationsfähigen Darstellung.

-Frankenstein C, Schmitt U. 2006. Microscopic studies on modified wall structure and lignin topochemistry in xylem fibres of poplar after wounding. **Maderas: Ciencia y Tecnologia** 8, eingereicht.

Konzipierung der Arbeit, Literaturrecherche, Versuchsdurchführung, Datenaufnahme und -auswertung. Elektronenmikroskopische Untersuchungen, Diskussion der Ergebnisse und publikationsfähige Darstellung mit Unterstützung des Co-Autors.

- **Frankenstein C**, Schmitt U. 2006. Wound effects in the xylem of poplar: a UV-microspectrophotometric study. **Holzforschung**, eingereicht.

Konzipierung der Arbeit, Literaturrecherche, Versuchsdurchführung, Datenaufnahme und -auswertung sowie publikationsfähige Darstellung. Elektronenmikroskopische Untersuchungen, Diskussion der Ergebnisse Darstellung mit Unterstützung des Co-Autors.

7.2 Verzeichnis der im Rahmen der Promotion angefertigten Originalveröffentlichungen in Zeitschriften ohne Review-Verfahren

Frankenstein C, Grünwald C, Stobbe H, Schmitt U. 2003. Anatomische Untersuchungen zur Entstehung des Überwallungswulstes bei Pappel. **Jahrbuch der Baumpflege**, 248-254. Sowie: Zur Entstehung des Überwallungswulstes bei Pappel. **AFZ-Der Wald** 10, 519-521.

7.3 Posterbeiträge (mit Abstracts)

Frankenstein C, Grünwald C, Stobbe H, Schmitt U. 2003. Anatomische Untersuchungen zur Entstehung des Überwallungswulstes bei Pappel. Augsburger Baumpflegetage. Augsburg.

Anatomische Untersuchungen zur Entstehung des Überwallungswulstes bei Pappel

Dipl.-Holzw. C. Frankenstein*, Dr. C. Grünwald*, Dr. H. Stobbe** und
Dr. U. Schmitt*

Zusammenfassung

Die mechanische Verletzung eines Baumes bis in den Holzkörper hinein löst eine Überwallung der Wundfläche von den Seiten her aus. In der vorliegenden Studie wird die Entstehung eines Überwallungswulstes bei Pappel (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.) lichtmikroskopisch beschrieben. Nahe am Wundrand zeigten sich etwa zwei Wochen nach einer Verletzung im Übergangsbereich zwischen Xylem und Phloem zahlreiche isodiametrische Zellen, die vorwiegend durch ungerichtete Teilungen parenchymatischer Zellen des direkt am Wundrand gelegenen Phloems entstanden. In geringerem Umfang wurde dieses Kallusgewebe durch Teilung kambialer Zellen und Zellen der Differenzierungszone des Xylems gebildet. Gleichzeitig waren im kallusnahen Phloem orientierte Zellteilungen zu beobachten, aus denen abgeflachte Zellen hervorgingen. Allmählich bildeten diese Zellen ein durchgehendes Band. Drei Wochen nach der Verletzung hatte sich ein deutlicher Wundkallus gebildet, aus dem in weiteren drei Wochen ein Überwallungswulst entwickelte, der in Wundholz, Wundkambium, Wundphloem und Wundperiderm strukturiert ist. Den vorliegenden Befunden zufolge entwickelt sich bei Pappel der Überwallungswulst vorwiegend durch Reaktionen im Phloemparenchym, Zellen des Kambiums und der Differenzierungszone des Xylems sind in geringerem Umfang beteiligt.

*Ordinariat für Holzbiologie der Universität Hamburg und Institut für Holzbiologie und Holzschutz der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Leuschnerstr. 91, D-21031 Hamburg

**Institut für Baumpflege, Brookkehre 60, D-21029 Hamburg

Frankenstein C*, Koch G, Schmitt U. 2003. On the modification of woody tissue in poplar after wounding. In: **Proc. COST Action E20 Workshop „Building a cell wall“**. Hrsg.: COST Action E20 und Metla, Helsinki, Finland, 56.

P15

On the regeneration of woody tissue in poplar after wounding

C. Frankenstein, C. Grünwald and U. Schmitt

University of Hamburg and Federal Research Centre for Forestry and Forest Products
Leuschnerstr. 91, D-21031 Hamburg

Mechanical wounding of trees into the xylem induces the formation of callus tissue along the wound edges. The present study deals with stem wounds set in poplar trees during the vegetation period. Light and electron microscopy revealed that young callus tissue develops by cell divisions in the phloem parenchyma, in the differentiation zone of xylem and phloem as well as in the cambium. With increasing duration of wound response, i.e., within two to six weeks, a wound cambium is regenerating preferably by re-differentiation of phloem parenchyma cells. Later on wound xylem and phloem is laid down. Wall structures of cells in the callus tissue are characterised.

7.4 Vorträge (mit Abstracts)

Frankenstein C, Schmitt U. 2004. Wound callus formation in poplar (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.) a microscopic study. IAWA/IAWS International Symposium on Wood Science. Montpellier, Frankreich.

C. FRANKENSTEIN¹, U. SCHMITT², ¹University of Hamburg and ²Federal Research Centre for Forestry and Forest Products, Leuschnerstr. 91, 21031 Hamburg, Germany. - **Wound callus formation in poplar (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.) a microscopic study. -**

Callus formation after mechanical wounding of poplar trees was examined by light and transmission electron microscopy. Wounds of 5 x 10 cm² were set at the end of May with weekly or fortnightly sampling at the lateral wound edges. Maximum response period was ten weeks. The experiments were carried out in 2002 with four trees, each of them with eight wounds. Microscopy revealed two strategies until a typical lateral wound callus, which is subdivided into xylem, cambium and phloem, has developed.

The first strategy is characterized by the following four steps: i- formation of a uniform parenchymatic tissue at the wound edge by division of cambium as well as undifferentiated xylem and phloem; ii- formation of a wound cambium within this parenchymatic zone as a tangential continuation of undisturbed cambium further apart from the wound; iii- deposition of strictly radially oriented xylem and phloem cells by the new cambium; iiiii- formation of additional cambial cells along the lateral side of the wound, which then forms tissue continuously covering the wound.

The second strategy can be subdivided into three developmental steps only: i-formation of parenchymatic cells at the wound edge; ii- formation of a wound cambium preferably within the differentiated phloem tissue, semicircular in outline and including parts of differentiated phloem; iii- beginning formation of xylem and phloem cells by the wound cambium with preferred deposition of cells towards the wound surface.

Both strategies may occur at the same tree or even at different portions of one wound.

Schmitt U, **Frankenstein C**, Koch G. 2005. Microscopic studies on modified wall structure and lignin topochemistry in xylem fibres of poplar after wounding. Plenary Meeting of the International Academy of Wood Science (IAWS). Concepción, Chile.

**Microscopic studies on modified wall structure and lignin topochemistry in xylem fibres
of poplar after wounding**

Claus Frankenstein, Uwe Schmitt

Federal Research Centre for Forestry and Forest Products/Institute for Wood Biology and
Wood Protection, Leuschnerstrasse 91, D-21031 Hamburg/Germany

1 Abstract

Fine structural details on the influence of wounding in differentiating xylem tissue are still scarce. The present study provides information on cell wall modifications with special emphasis on the lignin distribution in xylem fibres of poplar differentiating at the time of wounding. Samples were collected from wounded *Populus spp.* trees after response periods of up to twenty-three months and processed for microscopic analyses. General studies on the wall structure of wound-adjacent xylem fibres were carried out with light and transmission electron microscopy, whereas lignin distribution patterns of these cells were examined by UV-microspectrophotometry.

Xylem fibres close to the wound and within a transition zone between differentiated xylem laid down prior to and tissue laid down after wounding developed a distinctively thicker secondary wall. These modified fibre walls regularly showed an in the mean slightly higher lignin content and additionally an inhomogeneous lignin distribution in the middle lamella and the secondary wall.

As revealed for poplar, wounding induces a modified wall structure and lignin topochemistry in xylem fibres differentiating at the time of wounding. It is assumed that this wound response is part of the compartmentalization and therefore contributes to an increased resistance.

Schmitt U, Frankenstein C. 2005. Modification of secondary cell wall layers in woody tissue. 1st Joint New Zealand - German Symposium on Plant Cell Walls. Roturoa, New Zealand.

Modification of secondary cell wall layers in woody tissue

Uwe Schmitt and Claus Frankenstein

**Federal Research Centre for Forestry and Forest Products
University of Hamburg
Leuschnerstr. 91
D-21031 Hamburg
Germany**

Secondary cell walls are the most important wall portions in woody cells and mainly responsible for the determination of wood properties. In both softwoods and hardwoods cell walls are subdivided into middle lamella, primary wall and secondary wall. The secondary wall itself with a few exceptions consists of three layers, which are termed S1, S2, and S3. The S2 layer in tracheids and fibres represents the thickest wall portion and therefore its fine structure, including distribution of its chemical constituents, was subject of numerous investigations. In hardwood vessels the S2 layer is reduced in thickness, but nevertheless responsible for some important properties, especially resistance against fungal attack. Light and electron microscopy as well as UV-microspectrophotometry revealed secondary wall details such as microfibril orientation and lignin distribution. However, endogenous and exogenous influences may cause modifications of the secondary wall. The most prominent and well known modifications are compression wood and tension wood cells as well as unusually thin walls due to various influences. In addition, there are some other less known modifications which are described in the following. One type of modifications naturally occurs in vessel walls of hardwoods. In addition to a generally higher lignin content than in fibres, secondary walls of vessels may show a distinct incrustation with accessory compounds as observed e.g. for Sapelli (*Entandrophragma cylindricum*) with relatively high durability. Incrustations were not found in less durable samples of the same species. This implies that those incrustations of the inner secondary wall are obviously related with an increased durability. Another type of secondary wall modifications is regularly observed in wound-associated xylem tissue of hardwoods after mechanical wounding, i.e. the deposition of an additional inner wall lining as well as an incrustation of the inner secondary wall. It was proven that sesquiterpenes are a main constituent of both the lining and the incrustation. A second additional wall structure frequently occurring in wound-associated hardwood tissue is a suberin-like layer. Third, within a narrow zone close to the wound surface, fibre walls often appear extremely thickened and more lignified. All these structural details initiated by wounding are part of the compartmentalization process after wounding. These selected examples of secondary wall modifications confirm that there is a wide range of wall modifications in woody tissue as the result of activities of the protoplast of differentiating or differentiated, but still living xylem cells.

8. Anhang 1

8.1 Klimadaten und phänologische Entwicklung während der Versuchsserie 2000-2001

Mittelwerte der Tagestemperatur °C							
Tage	Dezember	Januar	Februar	März	April	Mai	Juni
1	8,4	0,8	0,6	0,2	12,3	13,8	13,7
2	9,9	3,4	-3,6	0,2	14,1	13,0	11,4
3	8,6	4,7	-7,4	-0,9	11,3	17,6	9,7
4	5,7	3,2	-4,7	-0,3	10,3	12,0	10,5
5	7,7	5,6	1,0	0,8	8,0	9,4	13,7
6	7,1	5,8	7,8	0,4	8,9	10,3	15,2
7	8,4	5,3	8,6	1,9	9,2	10,3	14,1
8	8,9	4,6	9,9	7,2	7,4	13,0	12,2
9	8,2	4,9	2,8	9,6	8,0	15,2	11,3
10	7,8	2,8	0,9	9,6	9,1	17,2	10,6
11	10,0	-0,3	0,0	10,8	7,2	15,7	11,0
12	12,0	-1,5	9,4	9,3	3,8	16,4	12,0
13	11,0	-3,2	5,7	5,2	2,3	17,6	12,6
14	7,3	-1,1	4,0	4,5	2,5	19,2	14,4
15	5,5	-2,5	1,2	5,7	3,3	16,0	16,0
16	3,6	-3,4	1,0	5,1	5,7	14,2	16,7
17	3,7	-3,9	3,3	3,0	5,3	13,3	15,6
18	2,1	-3,6	5,3	1,0	3,7	11,0	15,7
19	0,1	-1,9	4,7	0,8	3,4	11,0	13,8
20	0,5	-1,5	4,9	-1,6	4,3	11,2	15,0
21	-2,6	-0,3	5,6	-0,8	6,5	12,8	16,1
22	-4,3	-0,3	3,2	-0,2	5,9	13,5	13,1
23	-5,6	2,6	-1,6	0,7	7,0	15,1	15,5
24	-1,7	6,6	-4,2	1,4	9,8	16,1	14,6
25	-1,2	4,1	0,2	1,4	11,0	14,4	14,8
26	-3,0	4,0	0,4	1,8	9,6	16,2	18,6
27	-1,1	2,0	0,2	0,4	9,0	16,1	21,6
28	0,5	2,0	0,8	1,4	8,5	15,3	
29	0,5	2,3		5,2	11,6	16,0	
30	0,1	2,0		7,6	15,4	14,7	
31	0,9	1,5		8,9		13,6	

Tabelle 1: Mittelwerte der Tagestemperatur, Dezember 2000 - Juni 2001

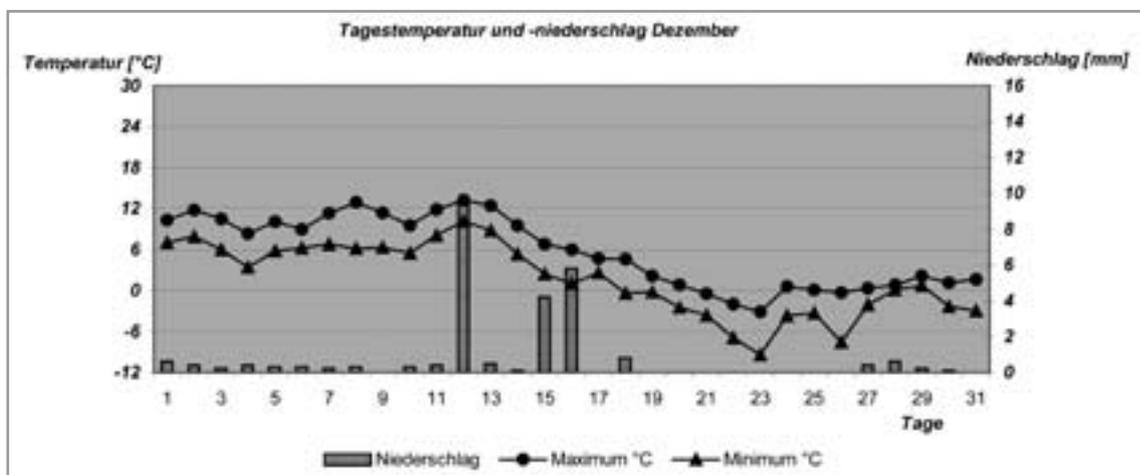


Diagramm 1: Minima und Maxima der Tagestemperatur und Tagesniederschlagsmenge im Dezember.

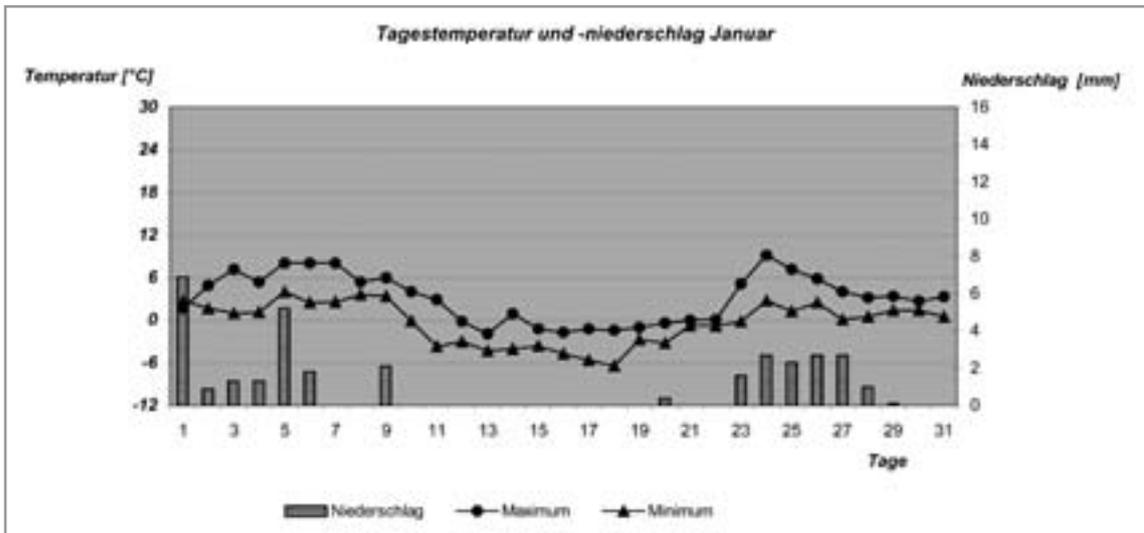


Diagramm 2: Minima und Maxima der Tagestemperatur und Tagesniederschlagsmenge im Januar.

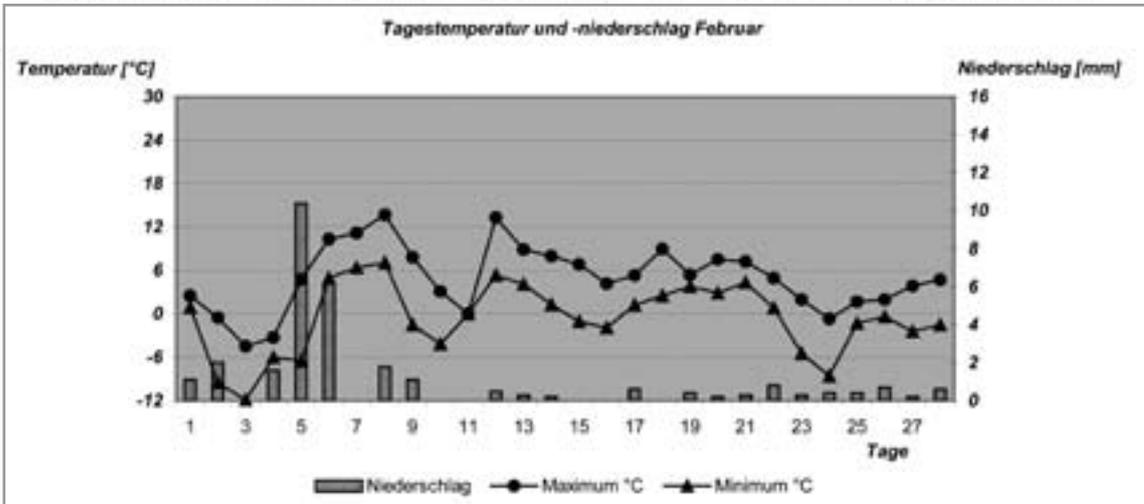


Diagramm 3: Minima und Maxima der Tagestemperatur und Tagesniederschlagsmenge im Februar.

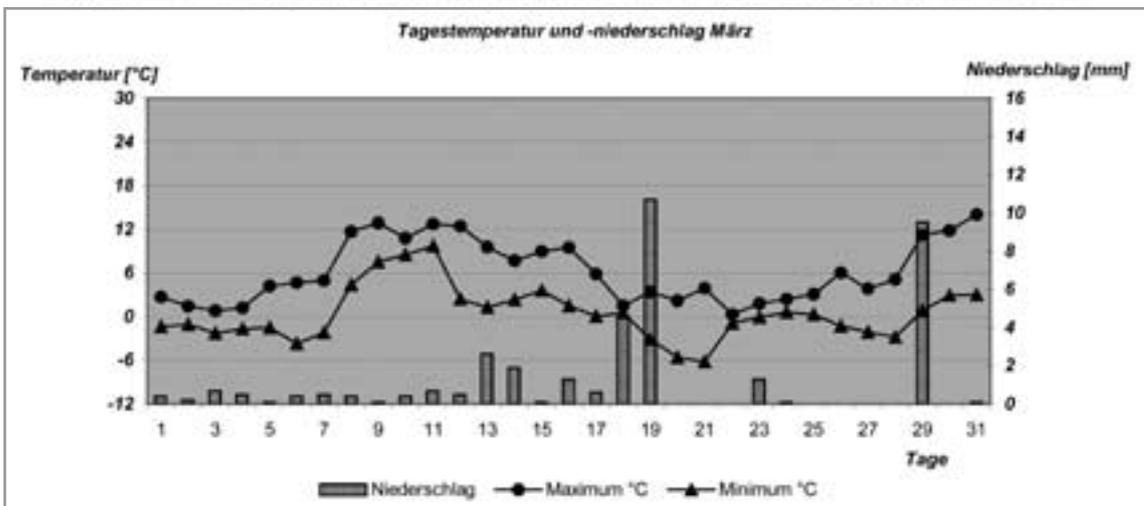


Diagramm 4: Minima und Maxima der Tagestemperatur und Tagesniederschlagsmenge im März.

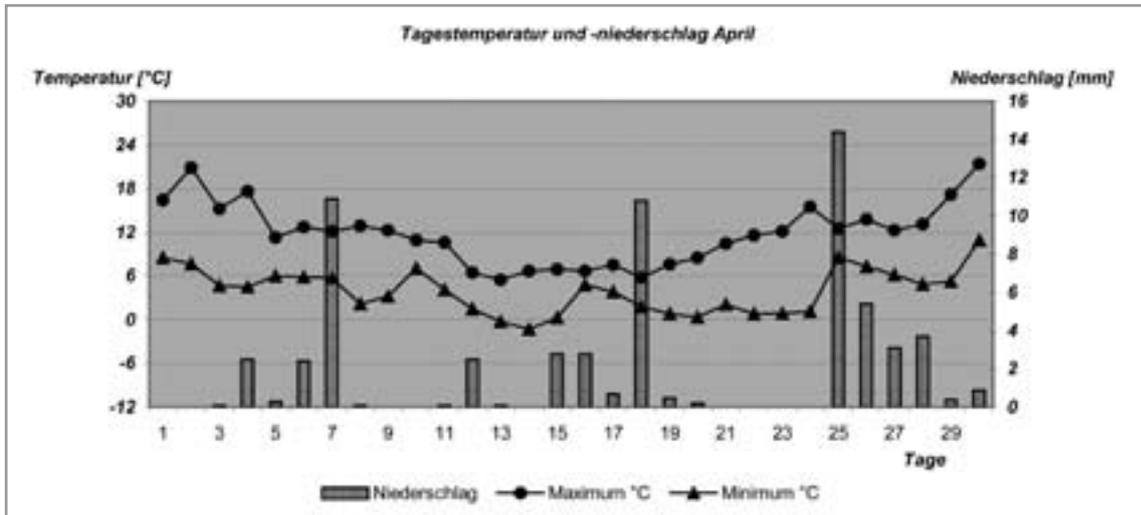


Diagramm 5: Minima und Maxima der Tagestemperatur und Tagesniederschlagsmenge im April.

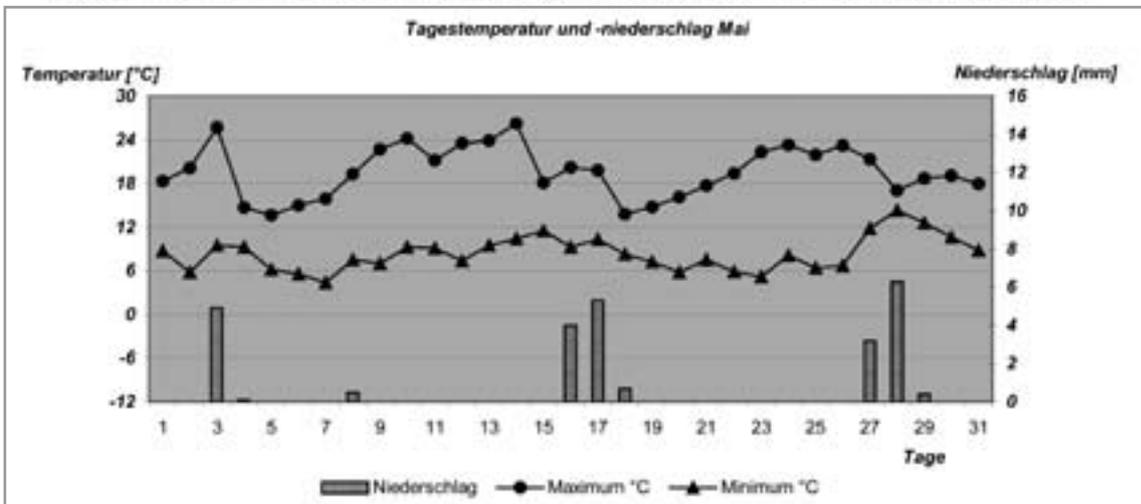


Diagramm 6: Minima und Maxima der Tagestemperatur und Tagesniederschlagsmenge im Mai.

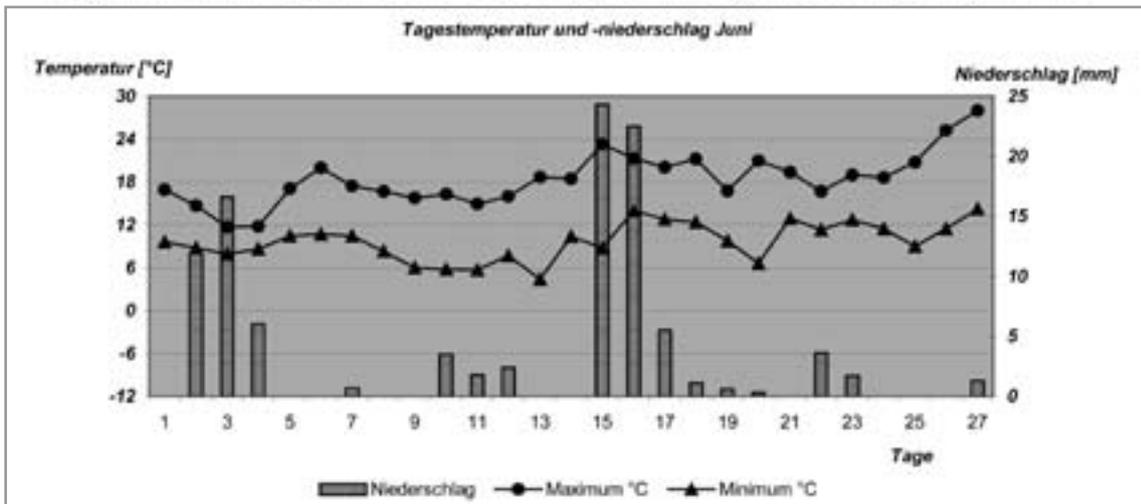


Diagramm 7: Minima und Maxima der Tagestemperatur und Tagesniederschlagsmenge im Juni.

Die Knospen der untersuchten Pappeln befanden sich am 10. April 2001 augenscheinlich noch im Zustand der Ruhe, da ihre Knospenschuppen weder angeschwollen, noch gelockert erschienen. Erst 17 Tage später öffneten sich die Knospenschuppen erkennbar, wobei die Entwicklung der Knospen im gesamten Kronenbereich ähnlich weit fortgeschritten war.

8.2 Darstellung und Diskussion des Einflusses akzessorischer Inhaltsstoffe auf die Bestimmung der Ligninverteilung durch UV-mikrospektrophotometrische Untersuchungen

Die Synthese akzessorischer Inhaltsstoffe als eine verletzungsbedingte physiologische Abwehrreaktion gehört zu den aktiven Wundreaktionen und wird regelhaft bei zahlreichen Baumarten wie z.B. Ahorn, Buche, Birke und Linde beobachtet (z.B. Sharon, 1973; Bauch et al., 1980; Shigo, 1985; Nicholson und Hammerschmidt, 1992; Schmitt und Liese, 1995; Dujesiefken und Liese, 1995; Schmitt und Liese, 1997; Fink, 1999; Pearce, 2000; Melcher et al., 2003). Eine Beeinflussung der mikrospektrophotometrischen Untersuchungen zur semiquantitativen Bestimmung des Ligningehaltes und der Ligninzusammensetzung durch die im modifizierten Gewebe vorhandenen Inhaltsstoffe kann aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden:

- Die Eignung der UV-mikrospektrophotometrischen Methoden -Punktmessungen bei variabler Wellenlänge in Kombination mit Flächen-Scannings bei einer konstanten Wellenlänge (280 nm)- zur topochemischen Untersuchung von Lignin und akzessorischen Inhaltsstoffen sowie der Unterscheidung dieser beiden Gruppen wurde bereits in zahlreichen früheren Studien belegt (z.B. Koch und Kleist, 2001; Koch, 2003; Koch et al., 2003; Koch und Grünwald, 2004; Koch et al., im Druck). Koch (2003) zeigte, dass durch einen Vergleich der Spektren der in den Lumina und in der Zellwand vorhandenen, hoch kondensierten Inhalte bei Kirschbaum Lignin und Inhaltsstoffe deutlich voneinander unterschieden werden können.

Es war weiterhin durch ergänzende Untersuchungen möglich, aromatischen Verbindungen mit einem flavonoiden Grundgerüst und phenolischen Verbindungen charakteristische Spektren zuzuordnen.

- Bei den vorliegenden Untersuchungen fanden sich Inhaltsstoffe überwiegend in Holzstrahl- und Axialparenchymzellen sowie in Zellen des Kallusgewebes (Abb. 1). Weniger häufig konnten Inhaltsstoffe in Fasern mit wundinduzierten Wandverdickungen lokalisiert werden, deren Ligningehalt und -zusammensetzung vorrangig betrachtet wurde.

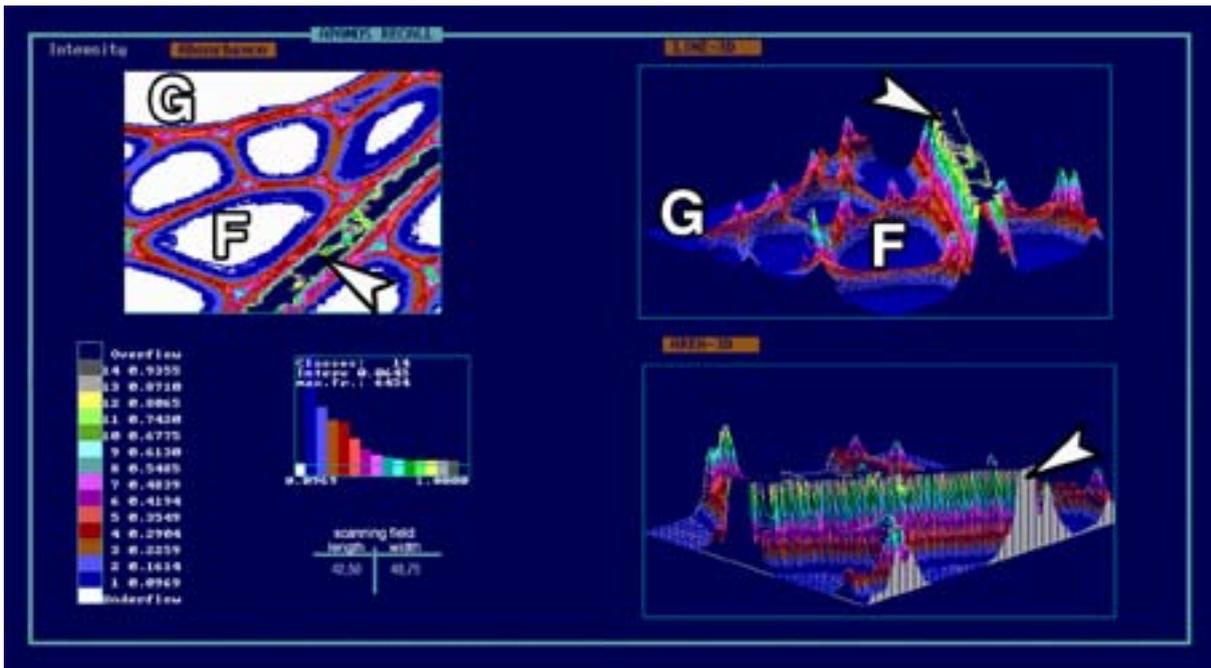


Abbildung 1: UV-spektroskopische Scanningprofile von modifiziertem Wundxylem ; Parenchymzellen eines Holzstrahles gefüllt mit UV-absorbierenden Inhalten (Pfeilspitze); Fasern (F) und Gefäß (G) ohne Inhalte

- Die UV-Spektren der im Wundxylem und dem modifizierten Xylem der Übergangszone detektierten Inhaltsstoffe wurden durch Absorptionsmaxima in einem Wellenlängenbereich von 282 bis 294 nm mit Schwerpunkt zwischen 284 und 286 nm, charakterisiert (Abb. 2).

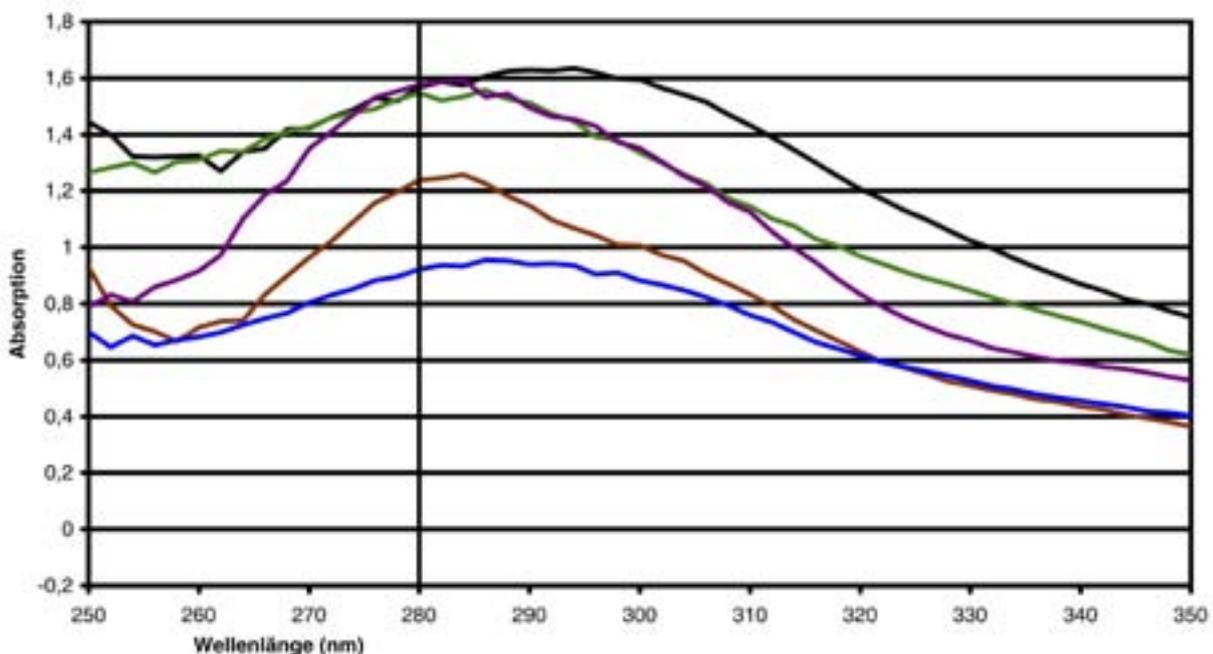


Abbildung 2: Repräsentative UV-Absorptionsspektren von akzessorischen Inhaltsstoffen in Holzstahl- und in Xylemfaserzellen, die die typische bathochrome Verschiebung (Rotverschiebung) zu größeren Wellenlängen und hohe Absorptionsmaxima zeigen; Absorptionsmaxima: blau (286 nm, 0,96), braun (284 nm, 1,26), grün (286 nm, 1,56), lila (284 nm, 1,59), schwarz (294 nm, 1,64)

Dies bedeutet, dass die Spektren eine bathochrome Verschiebung gegenüber den Ligninspektren mit Absorptionsmaxima zwischen 270 und 280 nm erfahren haben. Der Absorptionsbereich der akzessorischen Inhaltsstoffe war also zu größeren Wellenlängen verschoben (Rotverschiebung). Korrespondierend mit Beobachtungen von Koch (2003) an *Fagus sylvatica* lag das Absorptionsniveau der Inhaltsstoffe mit Werten von mindestens Abs_{280} 0,68 bis weit über Abs_{280} 1,0 (Abb. 1, 2) deutlich über dem Absorptionsniveau der untersuchten Sekundärwände des modifizierten Xylems (Abs_{280} 0,09-0,48) und nahm im Vergleich zu Ligninspektren langsamer ab. Die Absorptionsmaxima der Zellwikel erreichten Werte, die in den unteren Bereich der Inhaltsstoffe hineinreichten, während in der zusammengesetzten Mittellamelle nur in seltenen Fällen die niedrigsten bei den Inhaltsstoffen gemessenen Absorptionswerte festgestellt wurden (Abb. 1, 2). Eine Inkorporation von Inhaltsstoffen in die Zellwände hätte demnach anhand eines veränderten Verlaufs der Spektren erkannt werden können. Da eine solche Beeinflussung nicht festgestellt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die hochmolekularen Inhaltsstoffe nur als Adkrustierungen in den untersuchten Zellen vorlagen. Hierfür spricht weiterhin, dass *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx. nicht der Gruppe der obligatorischen Farbkernholz bildenden Baumarten zugeordnet wird, sondern nur fakultativ einen Farbkern entwickelt. UV-mikrospektrophotometrische Untersuchungen an Buche als ebenso fakultativem Farbkernbildner haben gezeigt, dass hier bei der Farbkernbildung hochmolekulare, aromatische Verbindungen entstehen, die überwiegend in Lumina von Parenchymzellen vorkommen (Koch 2003, Koch et al. 2003). Durch die hochauflösende Darstellung der Scanning-Profile konnten Koch et al. (2003) bestätigen, dass die aromatischen Inhaltsstoffe im rotkernigen Buchenholz (fast) ausschließlich im Axial- und Holzstrahlparenchym, d.h. an ihren Synthesorten deponiert waren. Die Zellwände der Fasern und Gefäße wurden nicht mit den hochmolekularen Inhaltsstoffen imprägniert, da bei der Nekrobiose des parenchymatischen Gewebes bereits hochmolekulare phenolische Verbindungen entstanden waren, die nicht mobilisiert werden konnten (Koch et al. 2003). Da die fakultative Farbkernbildung durch exogene Faktoren wie z.B. Kronenverletzungen, Astabbrüche oder Kernrisse beim Rotkern der Buche induziert wird, und es sich somit überwiegend um eine physiologische Reaktion auf Verletzungen handelt, scheint ein solcher Depositionsvorgang auch auf die Wundreaktionen von Pappel übertragbar zu sein, was durch die beschriebenen Beobachtungen bestätigt wird.

- Ein Einfluss durch Extraktstoffe bei der Bestimmung des Ligningehaltes mit Hilfe der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde von Imagawa und Fukazawa (1978) untersucht. Sie kamen zu dem Schluss, dass Schnitte, die keiner Extraktion mit n-Hexan, einer Alkohol-Benzen-Mischung oder aber einem Aceton-Wasser-Gemisch unterzogen wurden, bis zu 1,3-1,6 mal höhere Absorptionswerte

erreichten. Aufgrund der durchgeführten Dehydrierung des Probenmaterials in dieser Studie mit Hilfe einer aufsteigenden Acetonreihe kann die von Imagawa und Fukazawa (1978) bei *Larix leptolepis* festgestellte Erhöhung der Messwerte durch den Einfluss der phenolischen Inhaltsstoffe auch methodisch ausgeschlossen werden.

9. Anhang 2

Originalveröffentlichungen in Zeitschriften mit Review-Verfahren



SHORT ARTICLE

The onset of cambium activity – A matter of agreement?

Claus Frankenstein^a, Dieter Eckstein^{a,*}, Uwe Schmitt^b

^aDepartment of Wood Science, Division Wood Biology, University of Hamburg, Leuschnerstr. 91, D-21031 Hamburg, Germany

^bInstitute for Wood Biology and Wood Protection, Federal Research Centre for Forestry and Forest Products, Hamburg, D-21031 Hamburg, Germany

Received 21 November 2004; accepted 8 July 2005

Abstract

The diffuse-porous maple and the ring-porous ash showed first cambium cell divisions after bud break contemporaneously in the second half of April. However, in the ash, a few cells scattered throughout the dormant cambium zone had already distinctly enlarged by the end of March. Later on these cells developed further into earlywood vessels prior to the onset of cell divisions. The question about which criteria can be used as an indication of cambium reactivation will be discussed.

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Cambium reactivation; Tree-ring research; Cell differentiation; Deciduous tree species; Light and electron microscopy

Introduction

For dendroclimatological studies it is good to know more about the onset and the duration of cambium activity of the study trees in order to better understand and biologically verify the statistically obtained climate-growth relationships (Fritts, 1976). The duration of the cambium activity is just the time during which a “window” in the tree is open to receive and “archive” environmental signals directly. During the rest of the year, environmental influences can only indirectly act on stem growth.

The cambium forms a continuous meristematic tissue around the entire tree and extends via the procambium up to the apical meristems in the tips of the twigs and roots. The nature of the cambium has been known only since around 1850 (Schweingruber, 1988). The cambium initials are axially elongated cells of notable length so that the daughter cells and their derivatives are also quite long just

after their formation. Because of that, the derivate cells do not need to grow much in length but their walls can lignify as soon as the final shape and diameter is achieved, and these new cells can take on their predestined final function for the tree (Catesson, 1990).

Nevertheless, criteria for determining cambial reactivation in spring are not yet generally accepted. Earlier, the ease with which the bark can be peeled from the stem was used to identify the onset of cambial activity. Later, phenological events such as bud swelling were taken as an externally visible mark for the beginning wood formation, taking into account a variable time span between bud swelling and cambium reactivation. According to the literature (Larson, 1994), in diffuse-porous trees the first vessels are formed when the leaves are fully developed, whereas in ring-porous trees the first vessels are formed 2–6 weeks prior to bud break.

The present study is aimed at contributing details on structural modifications in the cambial zone prior to cell division, and to suggest a suitable criterion for the onset of cambium activity, both in deciduous diffuse- and ring-porous trees.

*Corresponding author. Tel.: +49 40 73962 404;

fax: +49 40 2891 2835.

E-mail address: d.eckstein@holz.uni-hamburg.de (D. Eckstein).

Materials and methods

Plant material and sample collection

Three trees respectively of *Acer platanoides* L. and *Fraxinus excelsior* L. were used. All trees were approximately 15 years old and grew 4 m a.s.l. in the south of Hamburg, Germany. The sampling for light and electron microscopy took place in winter on December 15, 2000, and then during spring in weekly intervals from March 26 to May 4, 2001.

Light microscopy

One set of in total 8 specimens of $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ containing phloem, cambium and xylem was dissected from each tree at a stem height of 50–150 cm, immediately fixed in a phosphate-buffered solution of 37% formaldehyde, dehydrated in propanol and embedded in glycol methacrylate (Technovit 7100). A rotary microtome was used to produce 8- μm -thick transverse sections which were stained with a standard Giemsa solution for 2 h and mounted on glass slides with Euparal.

Transmission electron microscopy (TEM)

Another set of in total 8 specimens of $1 \times 1 \times 4 \text{ mm}^3$ containing phloem, cambium and xylem was dissected from the same trees, fixed for 1 day in a mixture of 5% glutaraldehyde and 8% paraformaldehyde, washed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3), dehydrated through a graded series of acetone, and embedded in Spurr's (1969) epoxy resin. Ultrathin transverse sections were prepared and stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Philips CM12 TEM at an accelerating voltage of 80 kV.

Results

Maple

During the dormant season, the cambial zone of maple comprised 6–9 rows of radially flattened rectangular cells with only a small variation in size (Fig. 1a). Electron microscopy revealed distinctly thinner tangential than radial cell walls. The cytoplasm was very dense with numerous lipid droplets, starch-containing plastids and small vacuoles filled with thready material (Fig. 1b). It also contained smooth endoplasmic reticulum (sER), numerous free ribosomes, only few tubules of rough ER and few polysomes. The plasmalemma was smooth in outline, without undulations, and closely appressed to the cell wall (Fig. 1c).

By April 20, a small radial swelling was observed in all cells of the cambial zone prior to or simultaneously with the onset of cell divisions. However, there was no difference in cell size relative to their position in the cambial zone. In particular, cells adjacent to the prior latewood were not yet enlarged but nearly as flat as in the dormant cambium.

By the beginning of May, dividing cells with several newly formed thin, tangentially oriented walls indicated the active cambium (Fig. 1d). The dividing cells contained numerous small vacuoles, whereas in non-dividing cells one large central vacuole was present (Fig. 1e). The plasmalemma was now irregular in outline with many undulations. Some cells close to the previously formed latewood showed advanced stages of secondary wall formation (Fig. 1f).

Ash

During the dormant season, the cambium of ash comprised 9–11 rows of radially flattened cells but showing a distinct variation in shape and size; most of them were small and rectangular, others large and nearly oval. Some cells adjacent to such oval cells appeared radially compressed. Two to three cell rows of extremely flattened cells occurred in the middle of the cambium, about 3–5 cell rows distant from the prior latewood (Fig. 2a). Electron microscopy revealed numerous small vacuoles in the cambial cells neighbouring the prior latewood. With increasing distance from the xylem, vacuoles increased in size and decreased in frequency. The cytoplasm was very dense with conspicuously few lipid droplets and starch-containing plastids (Fig. 2b). It contained a sER, short tubules of rough ER, free ribosomes and numerous mitochondria. The plasmalemma was appressed to the cell wall and smooth in outline (Fig. 2c).

A distinct enlargement of a few cambium derivatives, probably vessel elements, was observed around March 26. At that time, the cells located in the middle of the cambium did not show any changes in shape when compared with the radially flattened cells of the dormant cambium observed in December (Fig. 3a). However, first ultrastructural changes were observed in these cells. Small vacuoles had fused into larger ones, and the cytoplasm generally appeared less dense than that of the dormant cambial initials (Fig. 3b). The presence of a few secretory vesicles indicated dictyosome activity. The plasmalemma was not as smooth in outline as in the dormant cambium (Fig. 3c). With the onset of cell division in the flattened inner cells of the cambium around April 20, some large earlywood vessels had already formed (Fig. 3d). By May 11, the walls of the vessels and of the surrounding paratracheal parenchyma started to lignify, and the

number of fusiform initials had multiplied 3–4 times compared to the dormant cambium.

Discussion

A clear difference between diffuse-porous and ring-porous hardwood trees, regarding the onset of cambium activity in spring, was pointed out by Priestley and Scott

(1936) as early as 1936. They claimed that the reactivation of the cambium in diffuse-porous species is a slow process proceeding gradually from the top of a tree downward to its base, whereas in ring-porous species it starts almost simultaneously throughout the entire tree. Meanwhile, it is known that cambial activity depends on a complex of interactions between intrinsic and extrinsic factors such as phytohormones, DNA binding proteins, monolignols, nutrients, minerals,

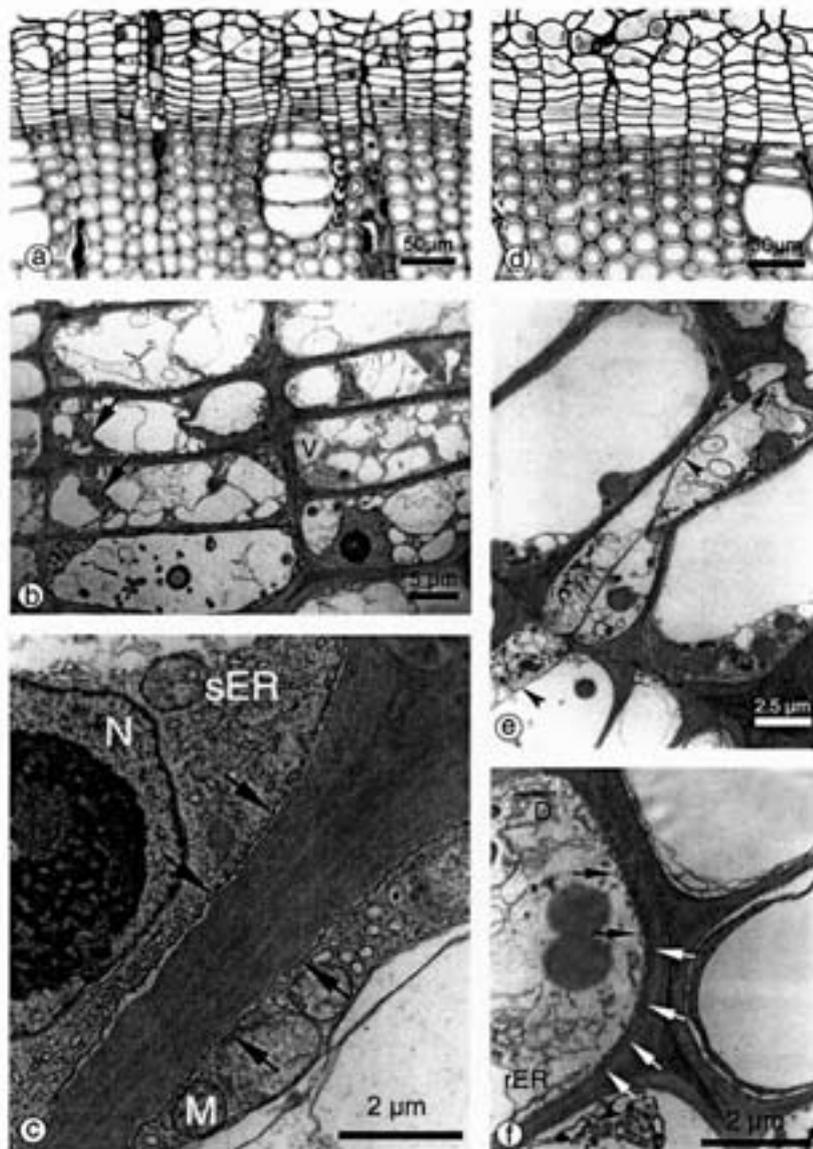


Fig. 1. Maple, dormant (a–c) and active cambium (d–f). (a) dormant cambium with 6–9 rows of cells; (b) cytoplasm with lipid droplets (arrows) and vacuoles (v); (c) smooth plasmalemma (arrows), M = mitochondrion, N = nucleus, sER = smooth endoplasmic reticulum; (d) active cambium with newly formed cell walls; (e) newly formed cell walls (arrowheads); (f) new cell wall layers (white arrows), plasmalemma with ondulations (black arrows), D = dictyosome, rER = rough endoplasmic reticulum. (a,d) light micrographs, transverse sections; (b, c, e, f) electron micrographs, transverse sections.

pressure, temperature and water potential gradients (e.g., Savidge, 1996). The first earlywood vessels in diffuse-porous trees are formed when the leaves are nearly fully developed (e.g., Lodewick, 1928; Wareing, 1958; Larson, 1962; Savidge and Wareing, 1981; Fahn and Werker, 1990; Aloni, 1991; Sundberg et al., 2000; Schmitt et al., 2000), whereas in ring-porous trees the first earlywood vessels are formed 2–6 weeks prior to bud break (Atkinson and Denne, 1988; Suzuki et al., 1996). Ladefoged (1952) found the same tendency for maple and ash in Denmark where the climatic conditions are similar to our site. These repeatedly made observations could indeed be confirmed by the present

study, but it has to be questioned whether the appearance of vessels is a suitable feature to determine the onset of cambial reactivation in deciduous trees.

In this study, both diffuse- and ring-porous trees showed first cell divisions at the same time around April 20. One week later, the buds of ash started to break, and the maple leaves were nearly fully developed. However, while in the diffuse-porous maple no obvious changes in the cambial zone had taken place before bud break (around April 10), the ring-porous ash revealed a distinctive enlargement of cells as well as ultrastructural changes of the plasmalemma and organelles already about 3–4 weeks prior to the first cell divisions and to

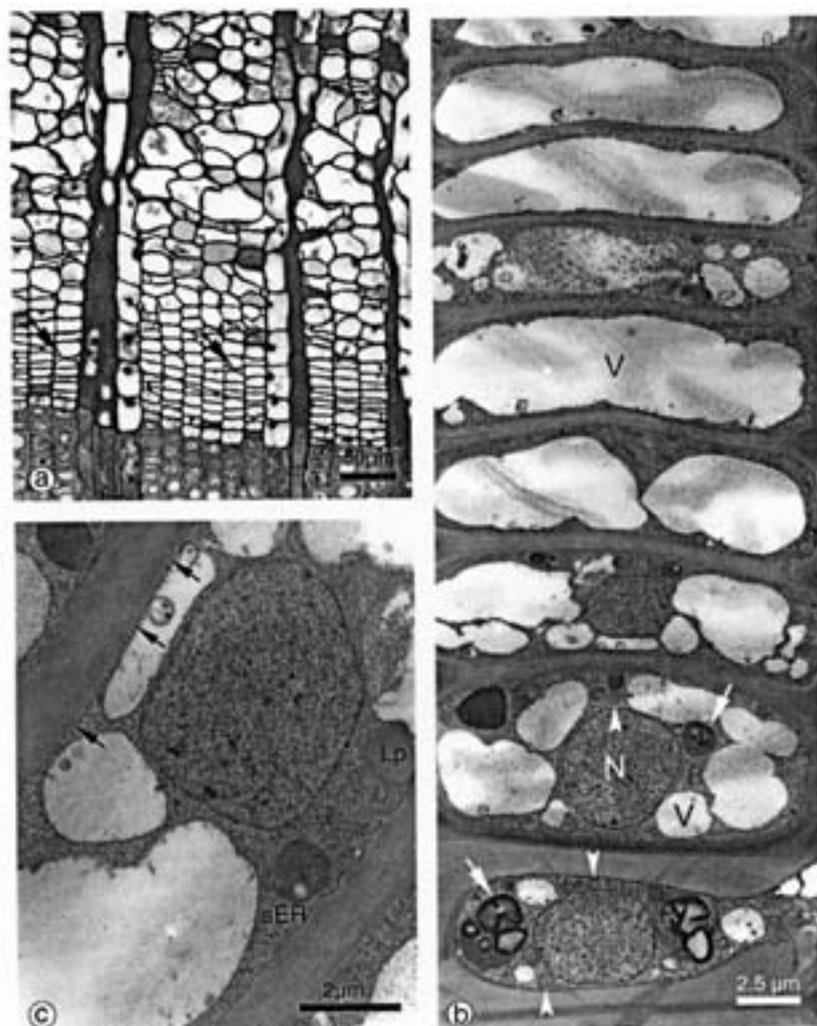


Fig. 2. Ash, dormant cambium (a–c). (a) dormant cambium with 9–11 rows of cells and radially flattened fusiform cells (arrows); (b) cytoplasm with starch containing plastids (arrows), mitochondria (arrowheads) and vacuoles (v); N = nucleus; (c) smooth plasmalemma (arrows), Lp = lipid droplets, sER = smooth endoplasmic reticulum; a light micrograph, transverse section; (b,c) electron micrographs, transverse sections.

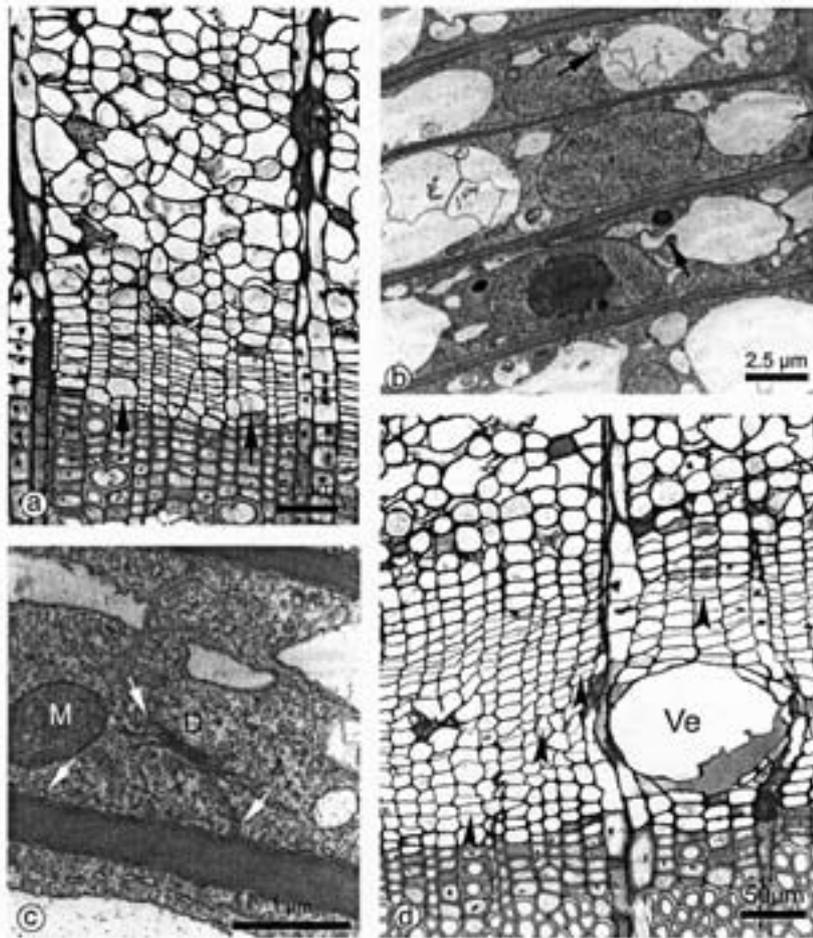


Fig. 3. Ash, cambium in transition (a–c), active cambium (d). (a) cambium in transition with enlarging cells (arrows); (b) small vacuoles fuse to larger ones (arrows); (c) secretory vesicles (arrows) indicating dictyosome (D) activity; (d) active cambium with newly formed cell walls (arrowheads) and developing early wood vessel element (Ve). (a, d) light micrographs, transverse sections; (b, c) electron micrographs, transverse sections.

bud break, respectively. A few days later, earlywood vessels were present, still prior to the beginning of cell division. These cells, differentiating into earlywood vessels, were not formed recently but overwintered as cambial derivatives as already postulated by e.g. Zasada and Zahner (1969), Imagawa and Ishida (1972), Doley and Leyton (1986), Matovic (1980) and Barnett (1992). The vessel elements resting over winter in an undifferentiated state must have been formed under a certain quantity of auxin at the end of the previous vegetation period. Auxin or auxin precursors have been found in the cambial region of ring-porous trees during winter dormancy (Savidge and Wareing, 1981; Wignall and Browning, 1988), and also in developing earlywood vessels of ring-porous trees prior to bud break (Digby and Wareing, 1966). However, it is still uncertain

whether these cells are able to develop without a new supply of auxin. Hence, it is postulated that endogenous auxin may either accumulate in the dormant cambium as a result of polar transport, or may be provided by a *de novo* synthesis in buds or cambial tissues during dormancy (Sundberg et al., 2000 and references cited therein). In view of the fact that auxin is present, the environmental conditions, particularly temperature and day length, are likely to regulate the continuation of differentiation of predisposed vessel elements in spring. If the statement that wood formation in ring-porous species starts simultaneously along the entire trunk is deduced from the development of earlywood vessels, it has to be checked by electron microscopy whether the onset of cell divisions in the cambium behaves the same way or diversely as in diffuse-porous trees.

Conclusion

For both ring- and diffuse-porous species, the most appropriate criterion of reference determining cambium reactivation should be the first observation of cell divisions as suggested by Farrar and Evert (1997). Therefore, in ring-porous species as ash, the first ultrastructural changes described and the distinct enlargement of a few cambium cells prior to the beginning of cell division, should not be considered as a criterion for cambium reactivation. In this study with maple and ash, cell divisions occurred at the same time towards the end of April leading to a contemporaneous cambium activation for both species.

Acknowledgements

We are grateful to Christina Waitkus for supporting the photographic work.

References

- Aloni R. Wood formation in deciduous hardwood trees. In: Raghavendra AS, editor. *Physiology of trees*. New York, Chichester, Toronto: Wiley; 1991. p. 175–97.
- Atkinson CJ, Denne MP. Reactivation of vessel production in ash (*Fraxinus excelsior*) trees. *Annals of Botany* 1988;61: 679–88.
- Barnett JR. Reactivation of the cambium in *Aesculus hippocastanum* L.: a transmission electron microscope study. *Annals of Botany* 1992;70:169–77.
- Catesson AM. Cambial cytology and biochemistry. In: Iqbal M, editor. *The vascular cambium*, Taunton Somerset, England: Research Studies Press; 1990. p. 63–112.
- Digby J, Wareing PF. The relationship between hormone levels in the plant and seasonal aspects of cambium activity. *Annals of Botany* 1966;30:607–22.
- Doley D, Leyton L. Effects on growth regulating substances and water potential on the development of secondary xylem in *Fraxinus*. *New Phytologist* 1986;67:579–94.
- Fahn A, Werker E. Seasonal cambial activity. In: Iqbal M, editor. *The vascular cambium*, Taunton Somerset, England: Research Studies Press; 1990. p. 139–58.
- Farrar JJ, Evert RF. Seasonal changes in the ultrastructure of the vascular cambium of *Robinia pseudoacacia*. *Trees* 1997; 11:191–202.
- Fritts HC. *Tree rings and climate*. London, New York: Academic Press; 1976. 567 pp.
- Imagawa H, Ishida S. Occurrence of the overwintering cells in cambial zone in several ring-porous trees. Hokkaido University, Research Bulletin of the College Experiment Forests 29, Study on the wood formation in trees, Report III, 1972, p. 207–221.
- Ladefoged K. The periodicity of wood formation. *Danske Biologiske Skrifter* 1952;7:1–98.
- Larson PR. Auxin gradients and the regulation of cambial activity. In: Kozlowski TT, editor. *Tree growth*. New York: The Ronald Press Company; 1962. p. 97–117.
- Larson PR. *The vascular cambium: development and structure*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Springer Verlag; 1994. 725 pp.
- Lodewick JE. Seasonal activity of the cambium in some northeastern trees. *Bulletin of the New York State College of Forestry at Syracuse University, Technical Publication* 23, 1928. p. 1–52.
- Matovic A. Cambium activity and xylem differentiation in *Fraxinus angustifolia* Vahl. ssp. *pannonica* Soo. et Simon. *Drevarsky Vyskum* 1980;25:25–46.
- Priestley JH, Scott LF. A note upon summer wood production in the tree. *Proceedings of the Leeds Philosophical Society* 1936;3:235–48.
- Savidge RA. Xylogenesis, genetic and environmental regulation. *IAWA Journal* 1996;17:269–310 [review].
- Savidge RA, Wareing PF. Plant growth regulators and the differentiation of vascular elements. In: Barnett JR, editor. *Xylem cell development*. Turnbridge Wells/UK: Castle House Pub.; 1981. p. 192–235.
- Schmitt U, Möller R, Eckstein D. Seasonal wood formation dynamics of beech (*Fagus sylvatica* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) as determined by the "pinning" technique. *Journal of Applied Botany* 2000;74:10–6.
- Schweingruber FH. *Tree rings. Basics and applications of dendrochronology*. Dordrecht, Boston, Lancaster, Tokyo: D Reidel Pub.; 1988. 276 pp.
- Spurr AR. A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research* 1969;26: 31–43.
- Sundberg B, Uggla C, Tuominen H. Cambial growth and auxin gradients. In: Savidge RA, Barnett JR, Napier R, editors. *Cell and molecular biology of wood formation*. Oxford: BIOS Scientific Pub.; 2000. p. 169–88.
- Suzuki M, Yoda K, Suzuki H. Phenological comparison on the onset of vessel formation between ring-porous and diffuse-porous deciduous trees in a Japanese temperate forest. *IAWA Journal* 1996;17:431–44.
- Wareing PF. The physiology of cambial activity. *Journal of the Institute of Wood Science* 1958;1:34–42.
- Wignall TA, Browning G. Epicormic bud development in *Quercus robur* L. Studies of endogenous IAA, ABA, IAA polar transport and water potential in cambium tissues and effects of exogenous hormones on bud outgrowth from stem explants. *Journal of Experimental Botany* 1988;39: 1667–78.
- Zasada JC, Zahner R. Vessel element development in the earlywood of red oak (*Quercus rubra*). *Canadian Journal of Botany* 1969;47:1965–71.

¹University of Hamburg, Department of Wood Science, Division Wood Biology

²Federal Research Centre for Forestry and Forest Products, Institute for Wood Biology and Wood Protection, Hamburg

Wound callus formation – a microscopic study on poplar (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.)

Claus Frankenstein¹, Uwe Schmitt², Christina Waitkus², Dieter Eckstein¹

(Received January 17, 2005)

Summary

Poplar trees were mechanically wounded and the subsequently built parenchymatic callus tissue and wound cambium as well as the developing lateral wound callus were investigated by light microscopy. Two strategies of callus formation were observed. One of them is characterized by four steps: i- formation of a parenchymatic tissue at the wound edge; ii- formation of a cambium within the parenchymatic zone as a tangential extension of the undisturbed vascular cambium; iii- release of radially oriented xylem and phloem cells; iiiii- formation of cambial cells with greater parallel orientation to the wound edge. The other strategy can be subdivided into three steps: i-formation of parenchymatic cells at the wound edge; ii- establishment of a wound cambium preferably within the differentiated phloem tissue; iii- formation of wound xylem and phloem cells, with the tendency to cover the wound laterally. Both strategies may occur within the same tree or even at different portions of one and the same wound.

Introduction

Trees respond to mechanical injury both anatomically and biochemically. Depending on the extent and date of wounding, the reactions can either be restricted closely around the wound or can affect larger portions of the surrounding tissue. They show a large variety and have been subject of numerous investigations on macroscopic and microscopic levels (e.g. BUNTROCK, 1989; LIESE and DUESIEFKEN, 1996; PEARCE, 2000; SCHMITT and LIESE, 1990, 1992a, 1992b; SHIGO, 1984).

Wound reactions restricted to the bark start with the production of phenolic substances close to the wound and the formation of a ligno-suberized layer around the wound to protect the unaffected tissues against pathogen attack and water loss. Subsequently, a necrophylactic periderm develops (BIGGS et al., 1984; BIGGS, 1985; MULLICK, 1977; OVEN et al., 1999; TROCKENBRODT and LIESE, 1991; TROCKENBRODT, 1994). Wounds up into the cambial region often lead to the formation of callus tissue at the edges (PINK, 1999; GRÜNWARD et al., 2002; LIESE and DUESIEFKEN, 1989). Wounds extending into the xylem lead to a sequence of reactions, which are often described by the CODIT-model (Compartmentalization Of Decay/Damage In Trees) (BAUCH et al., 1980; LIESE and DUESIEFKEN, 1996; SHIGO, 1977, 1984). The macro- and microscopically most prominent mechanism involved in compartmentalization, as mainly revealed for hardwoods, is the formation of a so called boundary layer or reaction zone mostly characterized by the synthesis of phenolic compounds and vessel occlusions (e.g. PEARCE, 2000; SCHMITT and LIESE, 1990). Wounding during the period of wood formation by partially removing the bark may lead to the formation of surface callus tissue (DOLEY and LEYTON, 1970; JAKES and HEXNEROVA, 1939; MCDUGALL, BLANCHETTE, 1996; MCQUILKIN, 1950; NOEL, 1968; NOVITSKAYA, 1998; SHARPLES and GUNNERY, 1933; SHORTLE and SHIGO, 1978; STOBBE et al., 2002; WARRIN WILSON and WARREN WILSON, 1984). For poplar, some

research was conducted on wound reactions in the bark focusing on the formation of the ligno-suberized zone and the formation of a new periderm as well as a new bark (KAUFERT, 1937; SOE, 1959; TROCKENBRODT and LIESE, 1991). Additionally, the influence of pressure on tissue differentiation on longitudinal bark strips, separated from the bole during early spring and held under different humid conditions, was subject of a detailed study (BROWN and SAX, 1962). The present paper describes on a light microscopic level the regeneration pattern along the lateral edges of stem wounds extending into the xylem. Particular emphasis is given to the role of the bark tissue entering in callus formation and the regeneration of the vascular cambium.

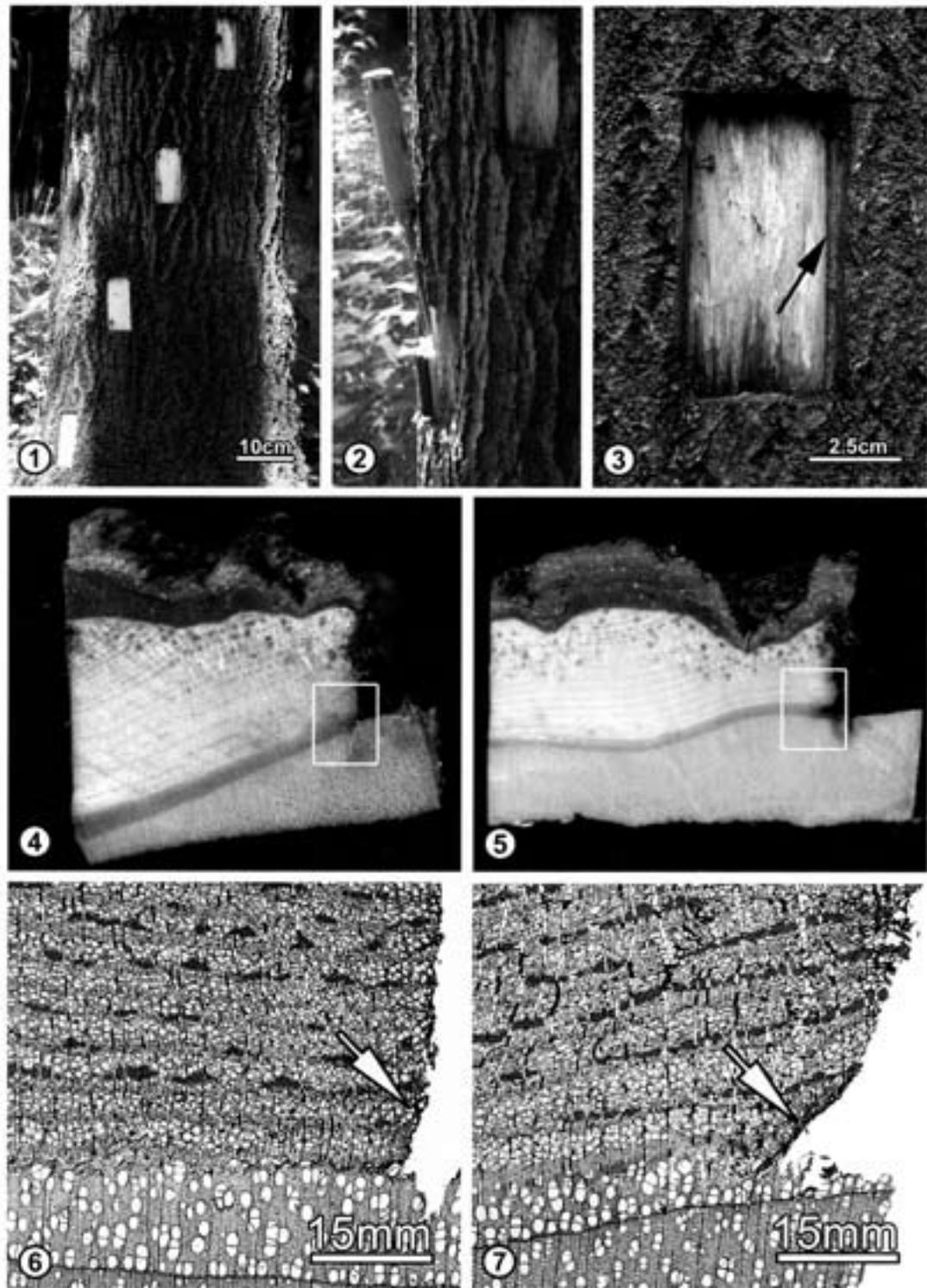
Material and methods

Investigations were carried out using four 25-year old poplar trees (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.) of a plantation in the northeast of Hamburg. Eight wounds were set helically around each stem on 27 May 2002. 32 rectangles of bark of 5 x 10 cm² were removed from the trunks using a saw; the wounds were separated 15 cm vertically (Fig. 1, Tab. 1). The edges of the debarked areas were smoothed and the wound surfaces scraped with a razor blade to remove remnants of the cambium and the differentiating xylem. This procedure was carried out to avoid reactions on the wound surface, which might affect tissue portions on the wound edges.

For light microscopy, samples of 5 x 3 x 1 cm³ were collected from the lateral wound edge after 7, 14, 21, 28, 35, 42, 56, and 70 days of response. Spot checks were additionally taken at the end of the vegetation period 2003. The wound tissue was removed with a chisel and a razor blade (Fig. 2, 3, Tab. 1). The samples were cut into smaller cubes of 4 x 4 x 4 mm³, fixed for at least 24h in a phosphate-buffered solution of 37% formaldehyde, dehydrated in propanol and embedded in glycol methacrylate (Technovit 7100). 6µm thin transversal sections were cut with a rotary microtome, stained for 1.5h with a standard Giemsa solution and mounted on glass slides using Euparal.

Results

Seven days after wounding, a brownish discolouration in parts of the xylem next to the wound edge became macroscopically visible (Fig. 4, 5, Tab. 1). Light microscopy revealed that phloem parenchyma, undifferentiated xylem and especially cambium cells at the wound edges collapsed and degenerated. In some wounds, proliferations of a few undifferentiated cells occurred in the former cambial zone adjacent to the necrotic tissue (Fig. 4, 5, Tab. 1). Fourteen days after wounding, large isodiametric cells with thin, unoriented new walls were present in the transition zone from xylem to phloem close to the wound edge. These cells mostly dedifferentiated from phloem parenchyma cells, whereas cambial cells and



Tab. 1: (1-3) *Populus*, experimental design; (4 - 7) 7 days after wounding; transverse sections through lateral wound edges; 1) size and arrangement of stem wounds; 2) sampling of callus tissue with a chisel; 3) callus formation at the edge (arrow) 70 days after wounding; 4, 5) degeneration of cells at the wound surface and wound-associated discoloration in the xylem (frames); 6, 7) light micrographs: degeneration of phloem, cambium and xylem cells at the wound surface (arrows); 6 detail of Fig. 4 (frame), 7 detail of Fig. 5 (frame).

undifferentiated cells of the xylem differentiation zone were hardly involved. At the same time, phloem cells adjacent to this tissue along the wound edge showed dedifferentiation indicating a functional change. Repeated oriented divisions led to the formation of an initial discontinuous band of radially flattened cells.

21 days after wounding, a distinct wound callus became microscopically visible (Fig. 1, Tab. 2). The former unoriented parenchymatic callus tissue now showed oriented cell divisions towards the wound surface (Fig. 2, Tab. 2). In most wounds, the above described band of radially flattened cells in the vicinity of the degenerated outermost tissue developed a phellogen, separated from the degenerated outer tissue by a phellem-like zone consisting of large but thin-walled cells. Such a band extended into or crossed the callus tissue up to the former xylem differentiating zone. Within the phloem, present at the time of wounding, differentiated parenchyma cells started to divide leading to radial and tangential groups of flattened cells. In wounds with a nearly unaffected cambium, wood formation was restarted at the transition between the zone with wound-associated modifications and the unaffected tissue.

Within the next 14 days, these wounds showed a regeneration of the cambium as a tangential extension of the undisturbed cambium across the parenchymatous zone. This new vascular cambium was already starting with the production of xylem and phloem cells. In a second group of wounds, showing cell divisions of dedifferentiated phloem cells, these cells fused to a nearly continuous band.

42 days after wounding, the tangential regeneration of the cambium almost reached the callus tip. With progressing elongation it gradually started to form xylem and phloem. The new modified wound xylem, consisting of less and smaller vessels, predominantly showed a radial orientation (Fig. 3, Tab. 2). In the second group of wounds, the bands of dividing cells within the differentiated phloem fused to a wound cambium, which appeared semicircular in outline by including parts of the preexisting phloem. At this stage, the wound cambium did not contact the vascular cambium present before wounding. The formation and lignification of secondary cell walls in the wound tissue started in modified phloem fibres (Fig. 1, Tab. 3).

56 days after wounding, the wound cambium extended inward thus achieving a connection with the structurally unaffected cambium further apart from the wound edge. Along the wound edge, the wound cambium extended exactly to the zone, where wood formation had stopped after setting the wound. This new wound cambium started to develop wound xylem directly adjacent to the preexisting phloem. Dark phenolic deposits were present in numerous phloem parenchyma cells of this area (Fig. 2, Tab. 3). In wounds without included phloem but with a tangential extension of the cambium, additional cambium cells were formed parallel to the lateral wound edge. This cambium subsequently formed phloem and xylem cells starting to continuously cover the wound.

70 days after wounding, two strategies of cambium regeneration and callus formation could be clearly differentiated: accordingly, included preexisting secondary phloem was either present (Fig. 2, 4, Tab. 4) or not (Fig. 1, 3, Tab. 4).

In summary of the microscopic observations, the two strategies can be described as follows:

One strategy is subdivided into four developmental steps:

i- formation of a uniform parenchymatous tissue at the wound edge by division of undifferentiated xylem, phloem as well as cambial cells; ii- formation of a wound cambium within the parenchymatous zone, as an exclusively tangential elongation of the undisturbed cambium further apart from the wound edge; iii- release of strictly radial oriented xylem and phloem cells; iiiv- formation of cambial cells with an increasingly parallel orientation to the perpendicular wound edge, finally leading to the lateral covering of the wound.

The other strategy can be subdivided into three developmental steps:

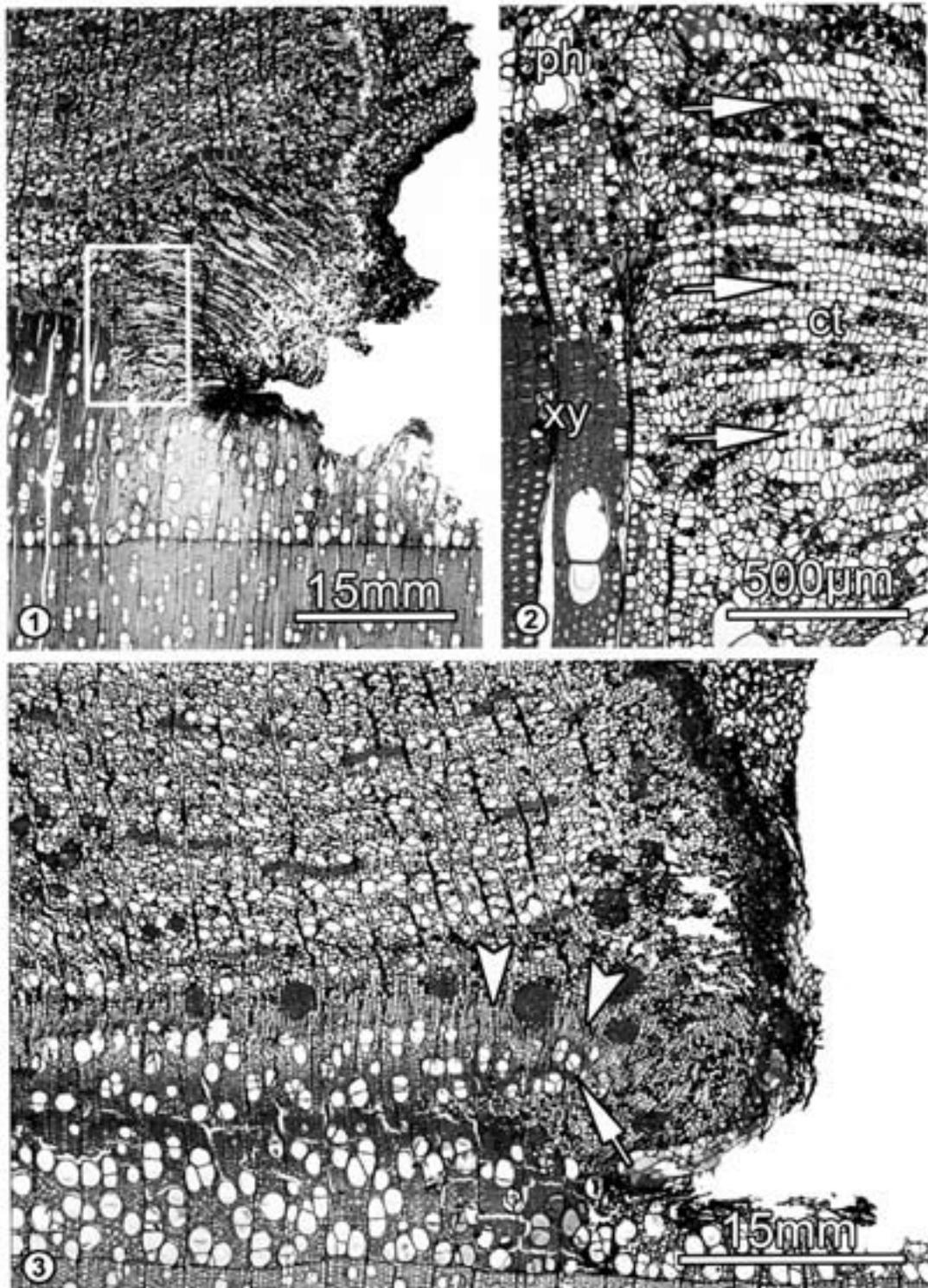
i- formation of parenchymatous cells at the wound edge by division of undifferentiated xylem, phloem as well as cambial cells; ii- formation of a wound cambium preferably within the differentiated phloem tissue, finally semicircular in outline and including parts of the differentiated phloem; iii- beginning formation of wound xylem and phloem cells by the cambium, already with the tendency to cover the wound laterally.

Discussion

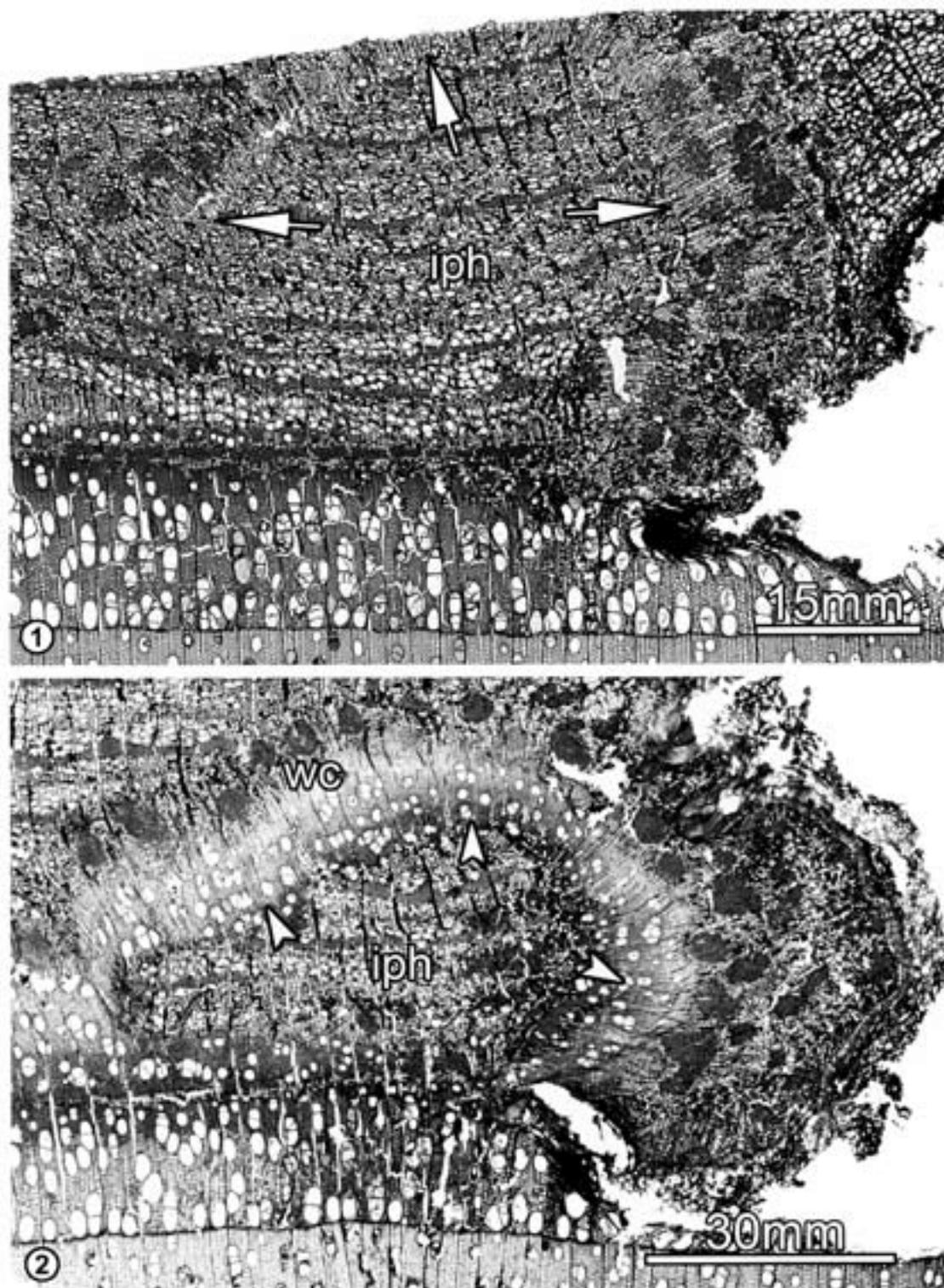
The present study on callus formation in poplar revealed different ways of vascular cambium regeneration and subsequent callus development. In principle, two strategies were defined by several morphologically characteristic developmental steps. Both strategies may occur within the same tree or even at different portions of one and the same wound.

The first step towards a wound callus, viz. the formation of large, thin-walled parenchymatous cells along the wound edge, originating from undifferentiated xylem cells, vascular cambium and parenchymatous phloem cells, is common to both strategies. The un-oriented, isodiametric callus cells mainly derive from parenchymatous phloem cells after dedifferentiation. Undifferentiated xylem and cambium cells are not contributing to that extension, as similarly observed in *Fraxinus excelsior* L. stems (DOLEY and LEYTON, 1970). SWARBRICK (1927) also showed that callus in girdled apple trees almost entirely originate from the phloem. However, other observations (BUCCIARELLI et al., 1999; SHARPLES and GUNNERY, 1933) led to the assumption that xylem elements, namely the vascular rays as well as cambial cells are mainly responsible for callus formation. In other tree species like *Fagus sylvatica* L. and *Quercus robur* L., the secondary phloem does not play a role in the development of a lateral wound callus (PINK, 1999; GRÜNWARD et al., 2002; NOEL, 1968, 1970). Such a contradiction may depend either on species-specific reactions or the mode and time of wounding. Especially the mode of wounding seems to have a strong selective effect on the tissue mainly contributing to callus formation. According to SOE (1959), the callus tissue in *Populus deltoides*, scored by cutting with a knife through the bark and often into the underlying xylem, originates mainly from cells of the vascular rays. The present study on poplar with large-scale wounds revealed a dominant role of the secondary phloem in the initiation of callus tissue.

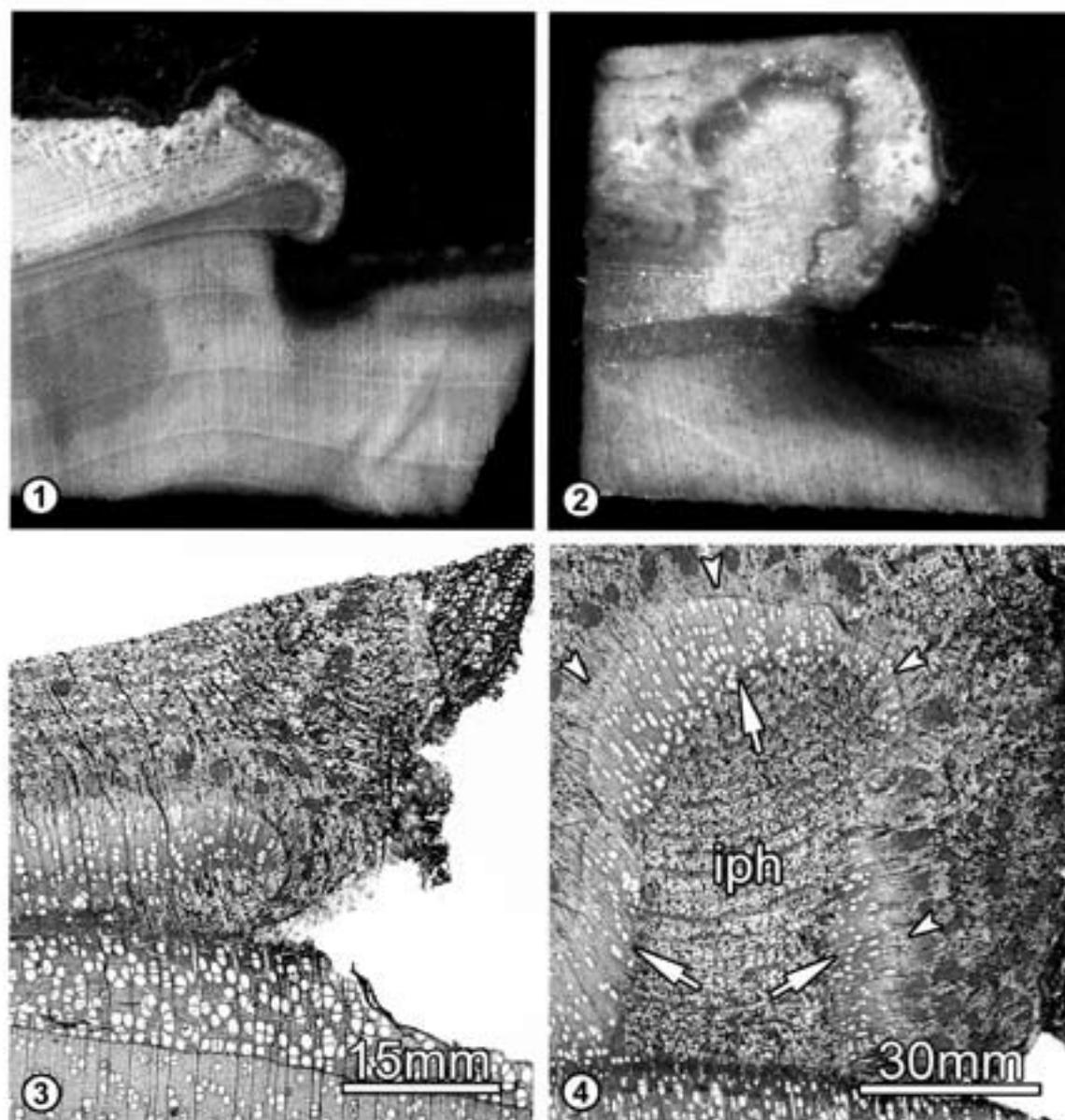
The second step of strategy one, i.e. the formation of a wound cambium within the parenchymatous zone as a tangential extension of the undisturbed cambium further apart, corresponds with previous observations. SOE (1959) reported the formation of a new cambial zone in *Populus deltoides* scores in regions where the callus tissue lies close to the undisturbed cambium. Other studies described the formation of a wound cambium inside the lateral parenchymatous callus tissue (DOLEY and LEYTON, 1970; PINK, 1999; GRÜNWARD et al., 2002; NOEL, 1970; SHARPLES and GUNNERY, 1933). It was also found on a debarked surface that the vascular cambium regenerates within the callus tissue (BROWN and SAX, 1962; NOEL, 1968; STORBE et al., 2002; WARREN WILSON and WARREN WILSON, 1961, 1984; WARREN WILSON, 1984; ZHENGLI and KEMING, 1988). The physiological mechanism responsible for the formation of a cambium and the factors determining the site of cambium regeneration within a wound-induced callus are still rarely understood. While the young wound cambium of poplar, following strategy one, started to release strictly radially oriented xylem and phloem cells, the cambium continuously extends through the formation of meristematic cells. This cambium, with an increasingly parallel orientation to the wound edge, finally leads to the lateral covering of the wound through phloem and xylem formation. It is mentioned that in some cases tracheary



Tab. 2: *Populus*, transverse sections through lateral wound edges, light micrographs; 21 days after wounding: 1) formation of a parenchymatous callus tissue; 2) detail of Fig. 1 showing callus tissue (ct) with oriented cell formation (arrows), originating from phloem (ph), cambium and undifferentiated xylem cells, differentiated xylem (xy); 42 days after wounding: 3) cambium regeneration within the callus tissue as a tangential continuation of the undisturbed cambium (arrowheads) and deposition of new xylem cells (arrow).



Tab. 3: Populus, transverse sections through lateral wound edges, light micrographs; 42 days after wounding: 1) formation of a wound cambium within the differentiated phloem tissue and semicircular in outline (arrows), included phloem (iph); 56 days after wounding: 2) formation of wound xylem (arrowheads) and wound phloem cells by the wound cambium (wc), included phloem (iph).



Tab. 4: *Populus*, 70 days after wounding; strategy one: 1, 3) formation of additional cambium cells as a tangential elongation of the unaffected cambium and along the lateral side of the wound with subsequent formation of xylem and phloem cells continuously covering the wound; strategy two: 2, 4) formation of xylem (arrows) and phloem cells through the newly formed cambium (arrowheads) around a portion of included phloem (iph) also continuously covering the wound; transversal sections, macroscopic view (1, 2), light micrographs (3, 4).

elements and sieve tube strands appear before any cambium has formed and that not all differentiated cells derive from the cambium (WARREN WILSON and WARREN WILSON, 1984), as variously observed in this study. A continuing extension of the cambium within a lateral callus with simultaneous xylem formation by previously formed wound cambium segments has not been reported yet. SHARPLES and GUNNERY (1933) found that in a callus on an exposed wood surface of *Hibiscus* the earliest formed cambium had begun to function normally before the cambial cylinder was completely closed. In most cases it is reported that xylem differentiation starts after a vascular

cambium has formed (e.g. GRÜNWARD et al., 2002; NOEL, 1970; SOE, 1959; WARREN WILSON and WARREN WILSON, 1984).

The second strategy is characterized by the formation of a wound cambium through dedifferentiation of mature secondary phloem cells followed by redifferentiation into a cambial tissue. Its semicircular outline consequently included parts of the differentiated phloem. No such observations were found in the literature.

It is a well-known phenomenon that cells in the secondary phloem are able to differentiate into meristematic cells to form a new periderm during rhytidom formation. Additionally, the formation of a necro-

phylactic periderm due to wounding demonstrates the capability of differentiation of secondary phloem parenchyma cells into a meristematic tissue (e.g. BIGGS et al., 1984; BIGGS, 1985; MULLICK, 1977; OVEN et al., 1999; TROCKENBRODT and LIESE, 1991; TROCKENBRODT, 1994).

During early developmental stages, it was impossible to exactly predict whether a phellogen or a vascular cambium would develop at the sites of redifferentiation. There are several hypotheses referring to what induces and what determines the site of cambium formation within a wound-associated callus (e.g. ALONI, 2004; DOLEY and LEYTON, 1970; SHARPLES and GUNNERY, 1933; WARREN WILSON and WARREN WILSON, 1961). Future studies should focus on the relationships between structural details as observed in the present work and mechanisms described in these hypotheses such as the involvement of hormones (ALONI, 2004), including the "gradient induction hypothesis" of WARREN WILSON and WARREN WILSON (1961), and other hypotheses based on histological observations, such as the "free surface" hypothesis (BERTRAND, 1884; VÖCHTING, 1892) and the "cambial ring" hypothesis (JANSIE, 1921; SNOW, 1942).

In conclusion, the present study revealed two strategies of wound cambium development in poplar. Both strategies, which are mainly defined by the position of the wound cambium at early developmental stages, aim at the formation of a wound callus starting to cover the wound. The factors guiding these processes on the cell and the tissue level have yet to be determined.

Acknowledgements

With financial support of the "Deutsche Forschungsgemeinschaft/DFG" (GR 1788/2-1). The experimental trees were kindly provided by the Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding of the Federal Research Centre for Forestry and Forest Products.

References

- ALONI, R., 2004: The induction of vascular tissues by auxin. In: Bisseling, T., Schell, J. (eds.), *New developments in plant hormone research*, 471-492. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- BAUCH, J., SHIGO, A.L., STARCK, M., 1980: Auswirkungen von Wunden im Xylem von Ahorn- und Birkenarten. *Holzforsch.* 34, 153-160.
- BERTRAND, C.E., 1884: *Loi des surfaces libres*. C.R. Acad. Sci. Paris 98, 48-51.
- BIGGS, A.R., MERRELL, W., DAVIS, D.D., 1984: Discussion: Response of bark tissues to injury and infection. *Can. J. For. Res.* 14, 351-356.
- BIGGS, A.R., 1985: Suberized boundary zones and the chronology of wound response in tree bark. *Phytopathology* 75, 1191-1195.
- BROWN, C.L., SAX, K., 1962: The influence of pressure on the differentiation of secondary tissues. *Am. J. Bot.* 49, 683-691.
- BUCCIARELLI, B., OSTRY, M.E., FULCHER, R.G., ANDERSON, N.A., VANCE, C.P., 1999: Histochemical and microspectrophotometric analyses of early wound responses of resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (= *Hypoxylon mammatum*). *Can. J. Bot.* 77, 548-555.
- BUNTROCK, M., 1989: Anatomische Untersuchungen über die Wundreaktion der Pappel. Diploma Thesis, University of Hamburg, Germany.
- DOLEY, D., LEYTON, L., 1970: Effects of growth regulating substances and water potential on the development of wound callus in *Fraxinus*. *New Phytol.* 69, 87-102.
- FINK, S., 1999: *Pathological and regenerative plant anatomy*. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- GRÜNWALD, C., STORBE, H., SCHMITT, U., 2002: Entwicklungsstufen der seitlichen Wundüberwallung von Laubgehölzen. *Forstwiss. Centralbl.* 121, 50-58.
- JAKES, E., HEJNEROVA, H., 1939: Über den Einfluss der Wachstoffs auf Wundgewebebildung bei Obstbäumen. *Gartenbauwiss.* 13, 83-93.
- JANSIE, J.M., 1921: La polarité des cellules cambiales. *Ann. Jard. Bot. Buitenz.* 31, 167-180.
- KAUFERT, F., 1937: Factors influencing the formation of periderm in aspen. *Am. J. Bot.* 24, 24-30.
- LIESE, W., DUESIEFKEN, D., 1989: Wundreaktionen bei Bäumen. Tagungsbericht, 2. Symposium, Angewählte Probleme der Gehölzphysiologie - Gehölze, Mikroorganismen und Umwelt, Tharandt, 13.-16. Juni, 75-80.
- LIESE, W., DUESIEFKEN, D., 1996: Wound reactions of trees. In: Raychaudhuri, S.P., Maramorosch, K. (eds.), *Forest trees and palms: Diseases and control*, 21-35. IBH publishing, Oxford, New Delhi, Calcutta.
- MCDONOGALL, D.N., BLANCHETTE, R.A., 1996: Polyethylene plastic wrap for tree wounds: a promoter of wound closure on fresh wounds. *J. Arboricult.* 22, 205-210.
- MCQUILKIN, W.E., 1950: Effects of some growth regulators and dressings on the healing of tree wounds. *J. Forestry* 48, 423-428.
- MULLICK, D.B., 1977: The non-specific nature of defence in bark and wood during wounding, insect and pathogen attack. *Recent Adv. Phytochem.* 11, 395-441.
- NOEL, A.R.A., 1968: Callus formation and differentiation at an exposed cambial surface. *Ann. Bot.* 3, 347-359.
- NOEL, A.R.A., 1970: The girdled tree. *Ann. Bot.* 32, 162-195.
- NOVITSKAYA, L.L., 1998: Regeneration of bark and formation of abnormal birch wood. *Trees* 13, 74-79.
- OVEN, P., TORELLI, N., SHORTELE, W.C., ZUPANCIC, M., 1999: The formation of a ligno-suberized layer and necrophylactic periderm in beech bark (*Fagus sylvatica* L.). *Flora* 194, 137-144.
- PEARCE, R.B., 2000: Decay development and its restriction in trees. *J. Arboricult.* 26, 1-11.
- SCHMITT, U., LIESE, W., 1990: Wound reaction of the parenchyma in *Betula*. *IAWA Bulletin n.s.* 11, 413-420.
- SCHMITT, U., LIESE, W., 1992a: Seasonal influences on early wound reactions in *Betula* and *Tilia*. *Wood Sci. Technol.* 26, 405-412.
- SCHMITT, U., LIESE, W., 1992b: Response of xylem parenchyma by suberization in some hardwoods after mechanical injury. *Trees* 8, 23-30.
- SHARPLES, A., GUNNERY, H., 1933: Callus formation in *Hibiscus rosa-sinensis* L. and *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. *Ann. Bot.* 47, 827-839.
- SHIGO, A.L., 1984: Compartmentalization: A conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Ann. Rev. Phytopath.* 22, 189-214.
- SHIGO, A.L., MARX, H.G., 1977: Compartmentalization of decay in trees. *USDA Forest Serv. Agric. Inform. Bull.* 405.
- SHORTELE, W.C., SHIGO, A.L., 1978: Effect of plastic wrap on wound closure and internal compartmentalization of discolored and decayed wood in red maple. *Plant Dis. Rep.* 62, 999-1002.
- SNOW, R., 1942: On the causes of regeneration after longitudinal splits. *New Phytol.* 41, 101-107.
- SOR, K., 1959: Anatomical studies of bark regeneration following scoring. *J. Arnold Arboretum* 40, 260-267.
- STORBE, H., SCHMITT, U., ECKSTEIN, D., DUESIEFKEN, D., 2002: Developmental stages and fine structure of surface callus formed after debarking of living lime trees (*Tilia* spp.). *Ann. Bot.* 89, 773-782.
- SWARRICK, T., 1927: The healing of wounds in woody stems II. Contributions to the physiological anatomy of ringed apple shoots. *J. Pomol. & Hort. Sci.* 6, 29-46.
- TROCKENBRODT, M., 1994: Light and electron microscopic investigations on wound reactions in the bark of *Salix caprea* L. and *Tilia tomentosa* Moench. *Flora* 189, 131-140.
- TROCKENBRODT, M., LIESE, W., 1991: Untersuchungen zur Wundreaktion in der Rinde von *Populus tremula* L. und *Platanus xacerifolia* (Ait.) Willd.. *Angew. Botanik* 65, 279-287.
- VÖCHTING, H., 1892: Über Transplantation am Pflanzenkörper. H. Laupp'sche Buchhandlung, Tübingen.
- WARREN WILSON, J., WARREN WILSON, P.M., 1961: The position of re-

- generating cambia, a new hypothesis. *New Phytol.* 60, 63-73.
- WARREN WILSON, J., WARREN WILSON, P.M., 1984: Control of tissue patterns in normal development and in regeneration. In: Barloss, P.W., Carr, D.J. (eds.), *Positional controls in plant development*, 225-280. Cambridge University Press, Cambridge.
- WARREN WILSON, J., 1984: Regeneration of tissue in wounded stems: A quantitative study. *Ann. Bot.* 53, 515-525.
- ZHONGLI, L., KEMMO, C., 1988: Differentiation of secondary xylem after girdling. *IAWA Bulletin n.s.* 9, 375-383.
- Addresses of authors:
^{1,2} University of Hamburg, Department of Wood Science, Division Wood Biology, and Federal Research Centre for Forestry and Forest Products, Institute for Wood Biology and Wood Protection, Leuschnerstrasse 91, D-21031 Hamburg

Topochemical Studies on Modified Lignin Distribution in the Xylem of Poplar (*Populus* spp.) after Wounding

C. FRANKENSTEIN^{1,*}, U. SCHMITT² and G. KOCH²

¹University of Hamburg, Department of Wood Science, Division Wood Biology and ²Federal Research Centre for Forestry and Forest Products, Institute for Wood Biology and Wood Protection, Leuschnerstrasse 91, 21031 Hamburg, Germany

Received: 29 July 2005 Returned for revision: 6 October 2005 Accepted: 27 October 2005 Published electronically: 14 December 2005

• **Background and Aims** Information on the influence of wounding on lignin synthesis and distribution in differentiating xylem tissue is still scarce. The present paper provides information on cell modifications with regard to wall ultrastructure and lignin distribution on cellular and subcellular levels in poplar after wounding.

• **Methods** Xylem of *Populus* spp. close to a wound was collected and processed for light microscopy, transmission electron microscopy and cellular UV microspectrophotometry. Cell wall modification with respect to lignin distribution was examined at different stages of wound tissue development. Scanning UV microspectrophotometry and point measurements were used to determine the lignin distribution.

• **Key Results** Xylem fibres within a transition zone between differentiated xylem laid down prior to wounding and the tissues formed after wounding developed distinctively thickened secondary cell walls. Those modified walls and cell corners showed, on average, a higher lignin content and an inhomogeneous lignin distribution within the individual wall layers.

• **Conclusions** The work presented shows that wounding of the xylem may induce a modified wall architecture and lignin distribution in tissues differentiating at the time of wounding. An increasing lignin content and distinctively thickened walls can contribute to improved resistance as part of the compartmentalization process.

Key words: Wound reaction, fibre cell wall, UV microspectrophotometry, lignin distribution, *Populus* spp.

INTRODUCTION

In trees, wounding induces specific reactions which have been the subject of numerous investigations at macroscopic and microscopic levels (e.g. Sharon, 1973; Mullick, 1977; Shortle, 1979; Shigo, 1984; Schmitt and Liese, 1990, 1992a, b; Liese and Dujesiefken, 1996; Pearce, 2000). Depending on the depth of wounding, the reactions can be restricted to the bark or they can also extend to the cambium and xylem. The wound reactions can either occur close to the wound or affect larger portions of tissue adjacent to the wound. This response depends on the extent of wounding, the season and tree vitality (Schmitt and Liese, 1992a). Lesions affecting the cambial region often lead to the formation of a wound callus and subsequently modified xylem and phloem (e.g. Liese and Dujesiefken, 1989; Fink, 1999; Grünwald *et al.*, 2002). Within the xylem a combination of different reactions taking place compartmentalizes the inflicted area (Sharon, 1973; Shigo and Marx, 1977; Bauch *et al.*, 1980; Rademacher *et al.*, 1984; Shigo, 1984; Lowerts *et al.*, 1986; Liese and Dujesiefken, 1996). The macro- and microscopically most prominent mechanism involved in compartmentalization is the formation of a so called boundary layer. This layer is mainly characterized by the synthesis of phenolic compounds in parenchyma cells with their ensuing extrusion into neighbouring cells and vessel occlusions (e.g. Schmitt and Liese, 1990; Pearce, 2000).

Research on wound reactions in poplar has been mostly carried out by conventional light microscopy (e.g. Buntrock, 1989). Earlier studies mainly focused on wound reactions of the bark, such as the formation of the ligno-suberized zone, of new periderms, and new bark (Kaufert, 1937; Soe, 1959; Trockenbrodt and Liese, 1991). The influence of pressure on tissue differentiation on longitudinal bark strips, separated from the bole, has been examined in detail (Brown and Sax, 1962). Bucciarelli *et al.* (1999) compared, over a 96-h period, the wound responses of the bark of resistant and susceptible *Populus tremuloides* genotypes, inoculated with *Entoleuca mammata*, using histochemical and microspectrophotometric analyses.

The objective of the present study was to provide detailed information on the modification of xylem elements within a transition zone between differentiated xylem laid down prior to wounding and the tissues laid down after wounding. The xylem elements in this transition zone often develop distinct wall thickenings. A particular emphasis is given to the lignin distribution on a cellular and subcellular level. For this purpose, the unaffected xylem and modified xylem were investigated by transmission electron microscopy (TEM) and cellular UV microspectrophotometry.

MATERIALS AND METHODS

Investigations were carried out with four 25-year-old *Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* Michx. trees and one 35-year-old *Populus tremula* L. tree, growing in the east of Hamburg. Rectangular wounds of 10 × 10 cm²

* For correspondence. E-mail c.frankenstein@holz.uni-hamburg.de

were set on 7 Jul. 2002 and 23 Jun. 2003 by removing the bark from the stems using a saw and a chisel. The edges of the debarked areas were smoothed and the wound surfaces scraped with a razor blade to remove remnants of the cambium and the differentiating xylem. The trees were wounded at stem heights between 50 and 100 cm and the wounds were facing different directions.

For all microscopic work, samples were collected from the lateral wound edge 2, 4, 10, 17, 62 and 95 weeks after wounding. Callus tissue and the adjacent modified xylem were removed with chisel and razor blades. Unaffected xylem of the same poplar trees served as reference material.

Light microscopy

For light microscopy, samples were cut into $10 \times 10 \times 8$ mm³ pieces, fixed for 3 d in 4% buffered formol (Lillie, 1954) washed in distilled water, and embedded in polyethylene-glycol. Transverse sections, 10 μ m thick, were cut with a sliding microtome, stained with a standard safranin/astra blue solution and mounted onto glass slides.

Transmission electron microscopy

For TEM, the samples from the same wounds as used for light microscopy were cut to a final size of $3 \times 3 \times 8$ mm³ (Fig. 1), fixed for 1 d in a buffered mixture of glutaraldehyde and paraformaldehyde according to Karnovsky (1965), partly postfixed with a 1% osmium tetroxide solution, washed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3), serially dehydrated in a graded series of acetone and embedded in Spurr's epoxy resin (Spurr, 1969).

Ultra-thin (80–100 nm) transverse sections were cut with diamond knives, placed on copper grids and either double-stained with uranyl acetate and lead citrate or with potassium permanganate. The samples were examined with a Philips CM 12 TEM at an accelerating voltage of 60 or 80 kV.

UV microspectrophotometry

Samples for UV microspectrophotometry were prepared in the same way as for TEM. Semi-thin (1- μ m) transverse sections were cut on an ultramicrotome using a diamond knife. The semi-thin sections were transferred to quartz slides, immersed in a drop of non-UV absorbing glycerine and covered with a quartz cover slip. For the microscopic investigations the ultrafluor objectives 32:1 and 100:1 were used.

Scanning UV microspectrophotometry was carried out using a ZEISS UMSP 80 microspectrophotometer equipped with an Osram high-pressure xenon lamp, an ultrafluor quartz condenser and a scanning stage enabling the determination of image profiles at a constant wavelength of 280 nm using the scan program APAMOS (Automatic-Photometric-Analysis of Microscopic Objects by Scanning, Zeiss). This wavelength represents the typical absorbance maximum of lignified cell walls. The scan program digitizes rectangular tissue portions with a local geometrical resolution of $0.25 \mu\text{m}^2$ and a photometrical resolution of 4096 grey scale levels, converted into 14 basic colours representing the measured absorbance intensities (Koch and Kleist, 2001).

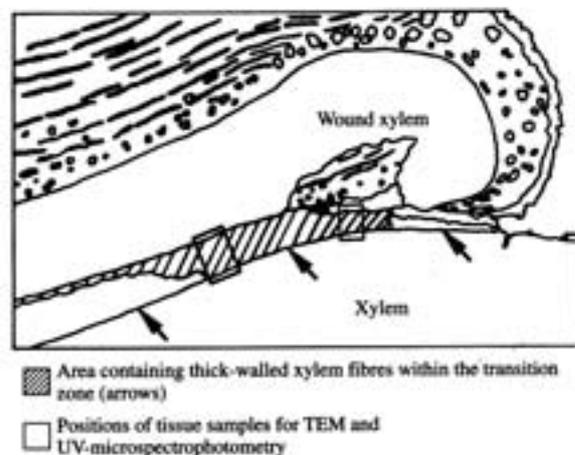


FIG. 1. Diagram of a transverse section through a lateral wound callus showing the area containing thick-walled xylem fibers (hatching) within the transition zone (arrows) and the position of tissue sampling for TEM and UV microspectrophotometry.

The specimens were also analysed by UV microspectrophotometry point measurements with a spot size of $1 \mu\text{m}^2$. UV-spectra were taken at wavelengths from 240 to 400 nm in 2-nm steps using the program LAMWIN (Zeiss) (Takabe, 2002). These point measurements, which were used for a semi-quantitative determination of lignin content, were automatically repeated 50 times at each spot for individual wall layers: (a) compound middle lamella, (b) S2 layers of the secondary wall and (c) cell corners.

RESULTS

Light microscopy revealed that wounding induced the formation of xylem cells with modified characteristics in the transition zone between the xylem laid down prior to wounding and the tissues laid down after wounding (Figs 1 and 2). Within this zone the xylem cells were still differentiating at the time of wounding. The formation of distinctively thick-walled fibres was the most prominent structural pattern within this zone. Electron microscopy showed that these fibres deposited additional secondary wall (S2) material leading to extremely thick walls compared with regular xylem cells (Figs 3–5). This wound-induced reaction resulted in three modes of wall-thickening. One group of xylem fibres showed the presence of a supplementary S2 layer (Fig. 3); the second group of fibres developed a continuously thickened secondary cell wall (Fig. 4) and in the third, smaller group, fibre walls developed a sclereid-like sublayering (Fig. 5). Cell corners within the transition zone predominantly consisted of material with a high electron density, which is unusual for poplar (Fig. 4).

To determine the lignin distribution within different wall layers of unmodified and modified tissues, these were first analysed by scanning UV microspectrophotometry at a constant wavelength (λ) of 280 nm. Figures 6 and 7 show representative two- and three-dimensional (2D and 3D, respectively) UV image profiles of unaffected mature secondary poplar xylem. Figure 6 shows the



FIG. 2. Transverse section (light microscopy) through a wound callus and the modified xylem that is located within a transition zone between xylem laid down prior to and after wounding containing fibres with wound-induced wall thickenings (arrows). Scale bar = 10 mm.

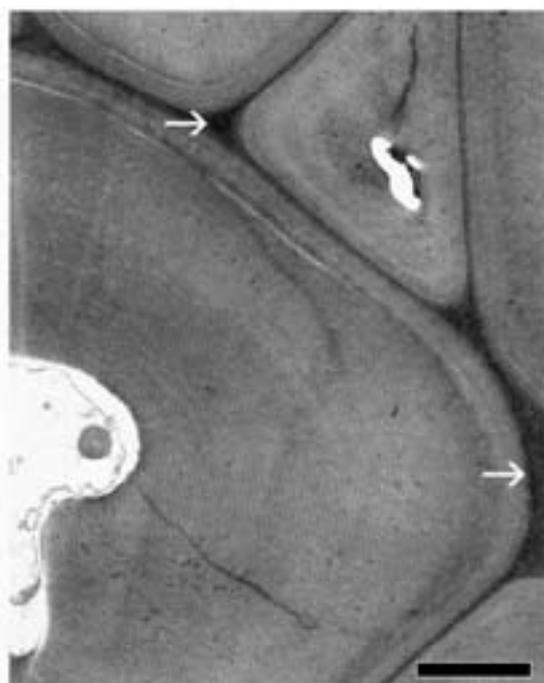


FIG. 4. Transverse section (TEM) through modified xylem of the transition zone. Fibres with continuous secondary cell wall thickenings (without lamellation); cell corners contain material with extremely high electron density (arrow). Scale bar = 2.5 μ m. Duration of wound response 4 weeks.

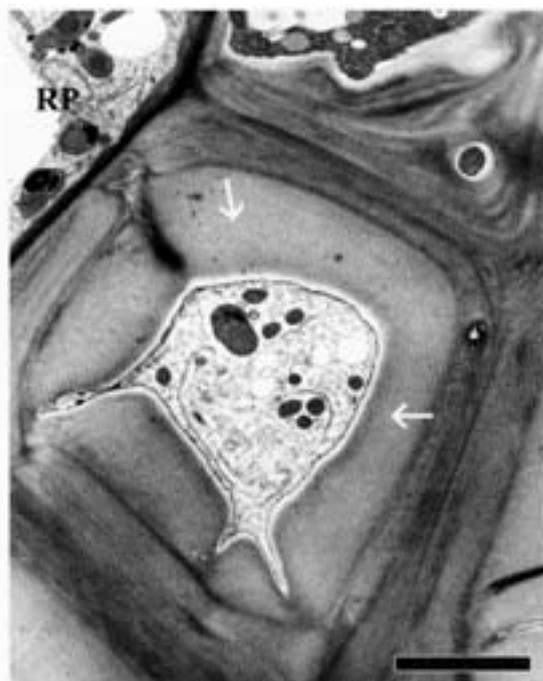


FIG. 3. Transverse section (TEM) through a modified xylem fibre with very thick, lamellate secondary wall (arrows), ray parenchyma cell (RP). Scale bar = 5 μ m. Duration of wound response 10 weeks.

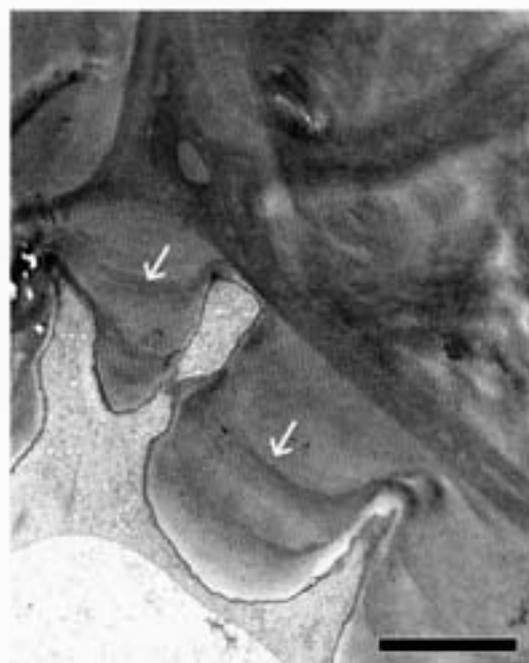


FIG. 5. Transverse section (TEM) through wound-induced fibres with a distinct polylamellate structure of the secondary wall (arrows). Scale bar = 2.5 μ m. Duration of wound response 4 weeks.

TABLE 1. Ultraviolet absorbance ratio $A_{280}:A_{260}$ of different cell wall layers

Sample	$A_{280}:A_{260}$		
	S2 layer	Compound middle lamella	Cell corner region
Unaffected fibres	1.02	1.09	1.29
Affected fibres after 2 weeks of wound response	1.20	1.25	1.29
Affected fibres after 4 weeks of wound response	1.18	1.20	1.25
Affected fibres after 17 weeks of wound response	1.20	1.29	1.26
Affected fibres after 62 weeks of wound response	1.16	1.19	1.25
Affected fibres after 95 weeks of wound response	1.34	1.33	1.33

distribution pattern of lignin in earlywood fibres and vessel elements characterized by thin S2 wall layers of relatively low uniform absorbance values (Abs_{280nm} 0.09–0.16) and increasing values in the compound middle lamella regions (Abs_{280nm} 0.16–0.23). The highest absorbencies of Abs_{280nm} 0.35–0.67 were found in some cell corners of vessel elements. Terminal latewood fibres (Fig. 7) showed slightly higher absorbance values especially in the compound middle lamella (Abs_{280nm} 0.23–0.35), as compared with earlywood. The broader S2 layer revealed absorbance values of Abs_{280nm} 0.09–0.23, the cell corners of Abs_{280nm} 0.35–0.67.

The influence of lesions on the lignin distribution within walls of modified xylem cells of the transition zone is presented in Figs 8–11. As early as 4 weeks after wounding, many fibres and vessel elements displayed different stages of secondary wall thickening (Fig. 8). The secondary wall of the scanned modified fibres showed microscopically invisible concentric sublayers with increasing absorbance values from Abs_{280nm} 0.09 to 0.48. The lowest values always occurred in the wall regions adjacent to lumen. High absorbance values were commonly recorded in the compound middle lamella (Abs_{280nm} 0.55–0.68) between fibres and also in the cell corners (Abs_{280nm} 0.81–0.94). The absorbance values of vessel walls also indicated a heterogeneous lignin distribution with unusually high values of Abs_{280nm} 0.67 up to 0.87 in the compound middle lamella between vessels and neighbouring fibres (Fig. 8).

Figure 8 displays the lignin distribution in modified fibres with extremely thickened secondary walls close to a wound surface after 62 weeks of response. The lumina in most of these fibres were extremely reduced by the thickened wall and in some cases the remaining lumina were filled with strongly UV-absorbing deposits (Fig. 9). The inhomogeneously distributed absorbance values within the thickened S2 varied between Abs_{280nm} 0.09 and increased maxima of Abs_{280nm} 0.42, both within the S2 of an individual fibre and between fibres. Compound middle lamella absorbance values ranged from Abs_{280nm} 0.61 to 0.81 and in cell corners from Abs_{280nm} 0.81 up to Abs_{280nm} over 0.94.

Figures 10 and 11 show the lignin distribution patterns for vessel elements, fibres and ray parenchyma cells within the

transition zone after nearly 2 years of wound response. The image profiles display distinctly high absorbance values across the entire thickened walls of fibres and vessels (Fig. 10). The S2 layer of vessels showed absorbance values between Abs_{280nm} 0.23 and Abs_{280nm} 0.42. For compound middle lamella regions UV absorbance ranged from Abs_{280nm} 0.48 to 0.68 and for the cell corners from Abs_{280nm} 0.55 to 0.94. The absorbance values of the S2 in fibre walls varied between Abs_{280nm} 0.16 and Abs_{280nm} 0.35. The distribution of the values was inhomogeneous. The absorbance values for the compound middle lamella and the cell corners were Abs_{280nm} 0.23–0.55 and Abs_{280nm} 0.42–0.94, respectively (Figs 10 and 11).

To characterize the UV-absorbance behaviour of previously scanned tissue portions, point measurements with a spot size of 1 μ m and a wavelength between 240 and 400 nm were carried out. In Fig. 12, representative UV absorbance spectra of unaffected and modified fibre wall layers are shown. Those point measurements of wall layers from unaffected early- and latewood fibres were characterized by mean absorption maxima at a wavelength of 270/272 nm for the S2 and the compound middle lamella, and of 278 nm for the cell corners (Fig. 12A). In distinctively thickened secondary wall regions of modified fibres, absorption maxima at wavelengths between 272 and 274 nm were regularly detected. The spectra taken in middle lamella regions of modified fibres also shifted towards higher wavelengths of 274–276 nm when compared with unaffected fibres. The absorbance maxima of cell corner regions of transition zone fibres with wavelengths of 276–280 nm were not notably different from cell corners of fibres from the unaffected references (Fig. 12B–F).

The ratio of UV absorbance at 280 nm to that at 260 nm ($A_{280}:A_{260}$) for the S2 layer, compound middle lamella and cell corner areas of the modified tissue and the reference material are listed in Table 1. This ratio combined with the characteristic wavelength of the lignin absorption maxima (Fig. 12) can be used as an indicator for the proportion of the different lignin moieties and *p*-hydroxy benzoic acid residues associated with them.

The spectra of the detected accessory phenolic extractives in fibres and ray parenchyma cells had much higher absorbance values (Abs_{280nm} 1.38) than cell wall lignins. Furthermore, their absorbance maxima displayed a bathochromic shift to a wavelength of 284–286 nm and a slower decrease of the absorbance, when compared with lignin.

The ratios ($A_{280}:A_{260}$) of S2 and compound middle lamella regions from transition zone fibres with thickened walls were higher when compared with unmodified fibre walls. For cell corner regions of affected tissue portions no such trend for the ratio ($A_{280}:A_{260}$) could be obtained, because the values were slightly higher and also lower as in the references.

In summary, the microscopic analyses showed that xylem fibres close to a wound and within a transition zone between differentiated xylem laid down prior to and tissue laid down after wounding developed a distinctively thicker secondary wall. These modified fibre walls regularly showed a higher lignin content and an inhomogeneous lignin distribution in the middle lamella and the secondary wall.

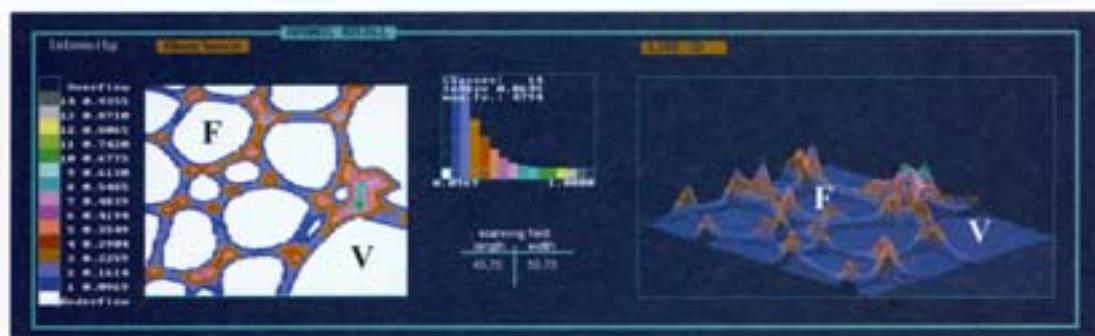


FIG. 6. UV micrograph and a 3D UV microscopic scanning profile of unaffected xylem tissue. The coloured pixels represent different UV-absorbance values within the cell wall layers of vessel elements (V) and fibres (F) at 280 nm wavelength.

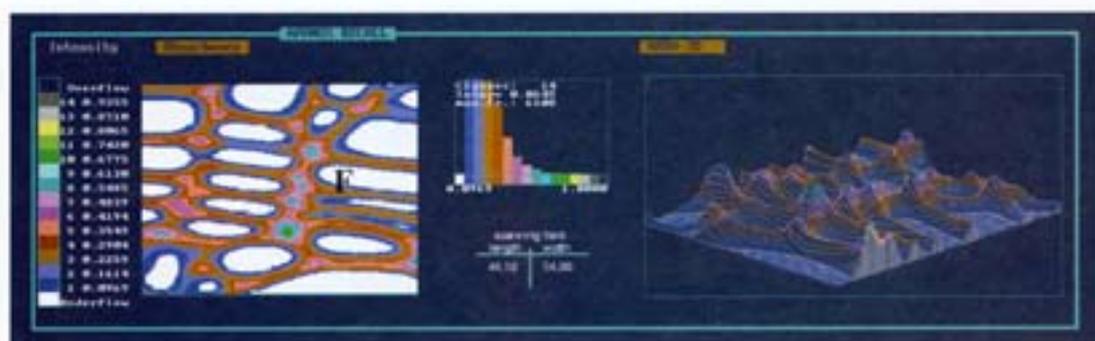


FIG. 7. UV micrograph and a 3D image profile of unaffected latewood fibres (F) at the annual ring border.

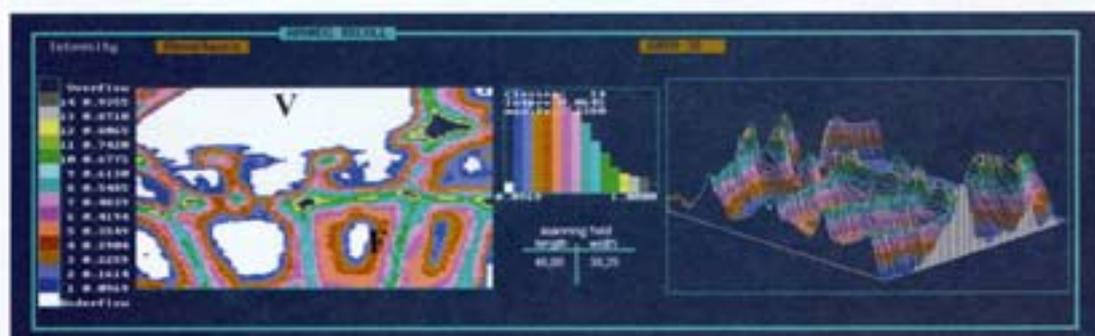


FIG. 8. UV micrograph and a 3D image profile of a small vessel element (V) and fibres (F) in the transition zone 4 weeks after wounding.

DISCUSSION

Microscopy

Light and electron microscopy showed that cells that were differentiating at the time of wounding were affected in the deposition of wall material. These cells were localized in a transition zone consisting of differentiating xylem cells at the time of wounding. Depending on their stage of differentiation at the time of wounding the different cell types respond in a distinctive manner. Within phloem tissue the wound-induced formation of modified fibres

and sclereids as well as the lignification of inflicted areas is commonly reported (e.g. Soe, 1959; Brown and Sax, 1962; Mullick, 1977; Trockenbrodt and Liese, 1991; Bucciarelli *et al.*, 1999; Fink, 1999). The formation of a tangential band of thick-walled, flattened xylem fibres within a zone between the modified and regular xylem after wounding through 'pinning', was observed in beech wood by Schmitt *et al.* (2000). A distinctive feature of wound-associated wood of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) is the presence of sclereids (Lowerts *et al.*, 1986). It is assumed for poplar that besides modified

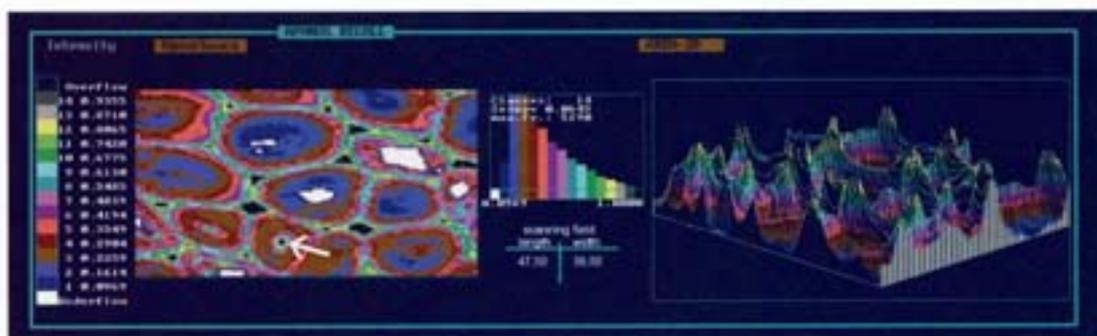


FIG. 9. UV micrograph and a 3D image profile of fibres showing strongly developed secondary wall thickenings within a band of fibres close to the former wound surface, 62 weeks after wounding. Some fiber lumina are filled with phenolic compounds (arrow).

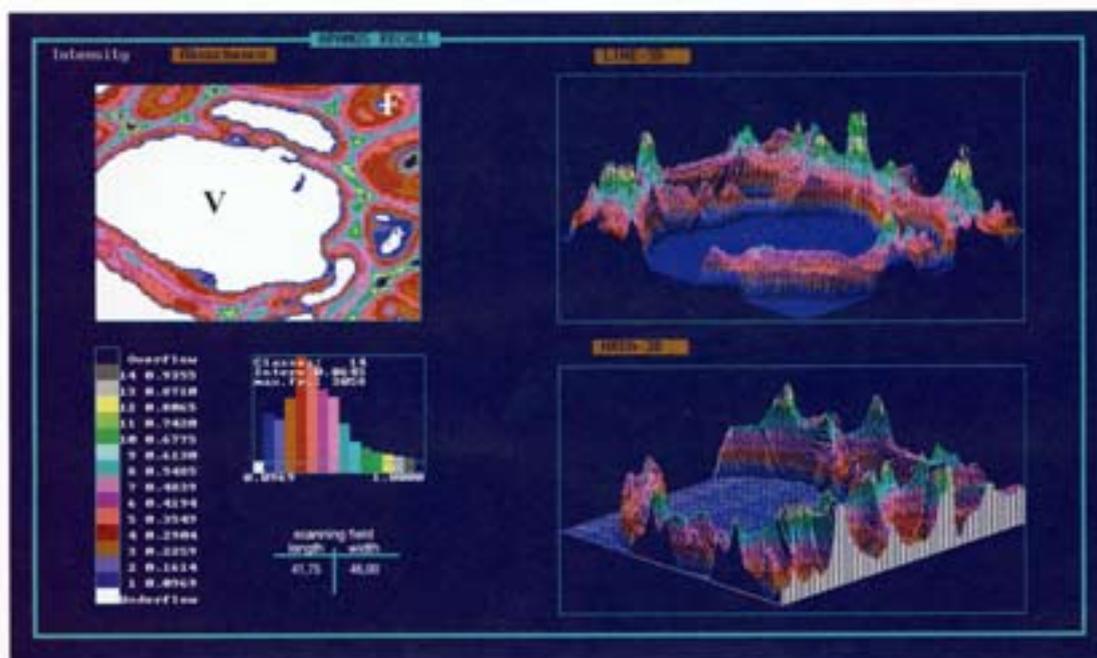


Fig. 10. UV micrograph and a 3D image profile of fibres (F) and vessel elements (V), close to the wound surface, 95 weeks after wounding.

fibres with a lamellar S2 some cells with a less axial extension and a sublayering within the S2 are sclereids. These structural alterations within the existing tissue, as observed in poplar and also in beech and yellow poplar xylem (Lowerts *et al.*, 1986; Schmitt *et al.*, 1999), supplement in some cases the well-known compartmentalization processes in these species (e.g. Shigo and Marx, 1977; Shortle, 1979; Shigo, 1984; Buntrock, 1989; Liese and Dujesiefken, 1996).

Topochemical characterization

UV microspectrophotometry has proven to be a reliable technique to study lignin distribution and its semiquantitative determination under various conditions and in different tree species (e.g. Bland and Hillis, 1969; Scott *et al.*, 1969; Fergus and Goring, 1970a, b; Musha and Goring, 1975;

Bauch *et al.*, 1976; Fukazawa, 1992; Okuyama *et al.*, 1998; Bucciarelli *et al.*, 1999; Grünwald *et al.*, 2001, 2002a, b; Koch and Kleist, 2001; Takabe, 2002; Koch and Grünwald, 2004). The following discussion is based on the observed UV absorbance behaviour of tissues in response to wounding.

Both guaiacyl and syringyl model compounds show a minimum absorbance at wavelengths from 250 to 260 nm and a maximum from 270 to 280 nm which is characteristic for hardwood lignin. This is in contrast to a strong maximum absorbance of *p*-hydroxy benzoic acid residues at 260 nm. With an increasing guaiacyl lignin content, the absorbance maximum shifts closer to 280 nm (Fergus and Goring, 1970a, b; Musha and Goring, 1975; Terashima *et al.*, 1986b; Fukazawa, 1992; Koch and Kleist, 2001; Takabe, 2002).

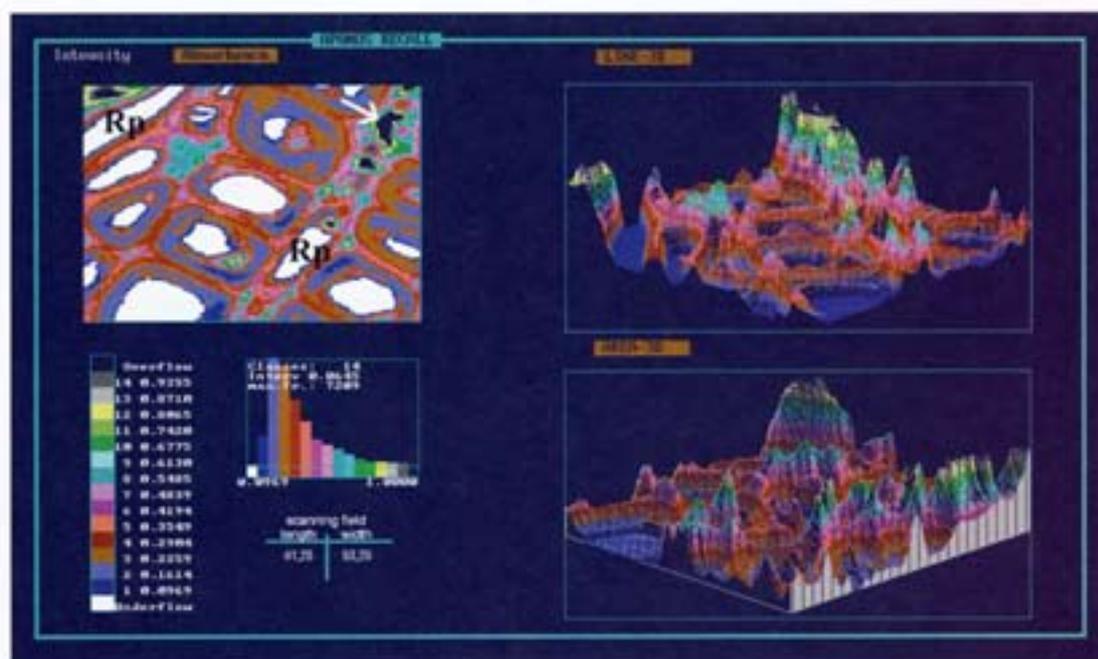


Fig. 11. UV micrograph and a 3D image profile of radially flattened fibers with secondary wall thickenings and ray parenchyma cells (Rp), some of them filled with phenolic compounds (arrow), 95 weeks after wounding.

The spectra obtained in the present study for thin S2 layers in unaffected fibres of poplar with a relative low absorbance maximum at 270–272 nm and a less distinct peak correspond to spectra obtained in earlier studies (Fergus and Goring, 1970a, b; Musha and Goring, 1975; Fukazawa, 1992), although the ratio $A_{280}:A_{260}$ is slightly higher than detected in other poplar species. Thus, the measurements indicate a low content of predominant syringyl-type lignin associated with *p*-hydroxy benzoic acid residues. The relatively low lignin content in the S2 layer, as compared with compound middle lamella and cell corner regions, as well as the uniform distribution within this layer, are in good agreement with general concepts for cell wall compositions of hardwoods (e.g. Fergus and Goring, 1970a, b; Musha and Goring, 1975; Terashima *et al.*, 1986a, b, 1993; Donaldson, 2001; Donaldson *et al.*, 2001; Koch and Kleist, 2001; Grünwald *et al.*, 2002a; Takabe, 2002). The peak absorbance at 272 nm in fibre secondary walls and the only slightly higher absorbance of the compound middle lamella indicate increased lignin content with a nearly unmodified lignin composition. Grünwald *et al.* (2002a) reported alterations in the lignin composition in middle lamella regions of xylem fibres with increasing distance from the cambium, as indicated by a shift of the peak absorbance towards 272 nm at the end of cell differentiation due to an increasing amount of syringyl and *p*-hydroxyphenyl subunits. More frequently, however, a higher relative abundance of guaiacyl lignin moieties in hardwood middle lamellae has been reported (e.g. Fergus and Goring, 1970b; Musha and Goring, 1975; Terashima, 1986a, b, 1993). The present scannings of middle lamella regions

showed a more speckled heterogeneous lignin distribution, whereas in *Hevea brasiliensis* the intercorner and cell corner middle lamella showed a mostly mottled lignin distribution, as observed by Singh and Schmitt (2000). The spectra obtained for cell corner regions showed the highest lignin concentrations of predominantly guaiacyl lignin, which is in good agreement with general lignification concepts for soft- and hardwoods (e.g. Fergus and Goring, 1970b; Terashima *et al.*, 1986b, 1993; Fukazawa, 1992; Donaldson, 2001; Donaldson *et al.*, 2001).

The spectra obtained from cells located in the transition zone showed that wounding may induce modification in lignin composition and distribution. These alterations were mainly restricted to secondary wall and compound middle lamella regions, whereas cell corner lignin remained nearly unaffected. Within thickened secondary walls the average peak absorbance shifted slightly towards higher wavelength and the ratio $A_{280}:A_{260}$ simultaneously increased, verifying a higher amount of guaiacyl moieties and a reduced amount of associated *p*-hydroxy benzoic acid residues. The same effect was evidenced by UV spectra from middle lamella regions. More detailed information on the microdistribution of lignin was provided by UV scannings which also displayed elevated lignin content with highly variable maximum values in fibre and vessel walls. It was found that at an early stage of wound response the lignin content increases in concentric sublayers within the S2-layer. It is more likely that this distribution resembles phloem sclereids in hardwoods (authors' observations) as well as in bamboo fibres as shown by Koch and Kleist (2001). Normal hardwood fibres have a uniform lignin

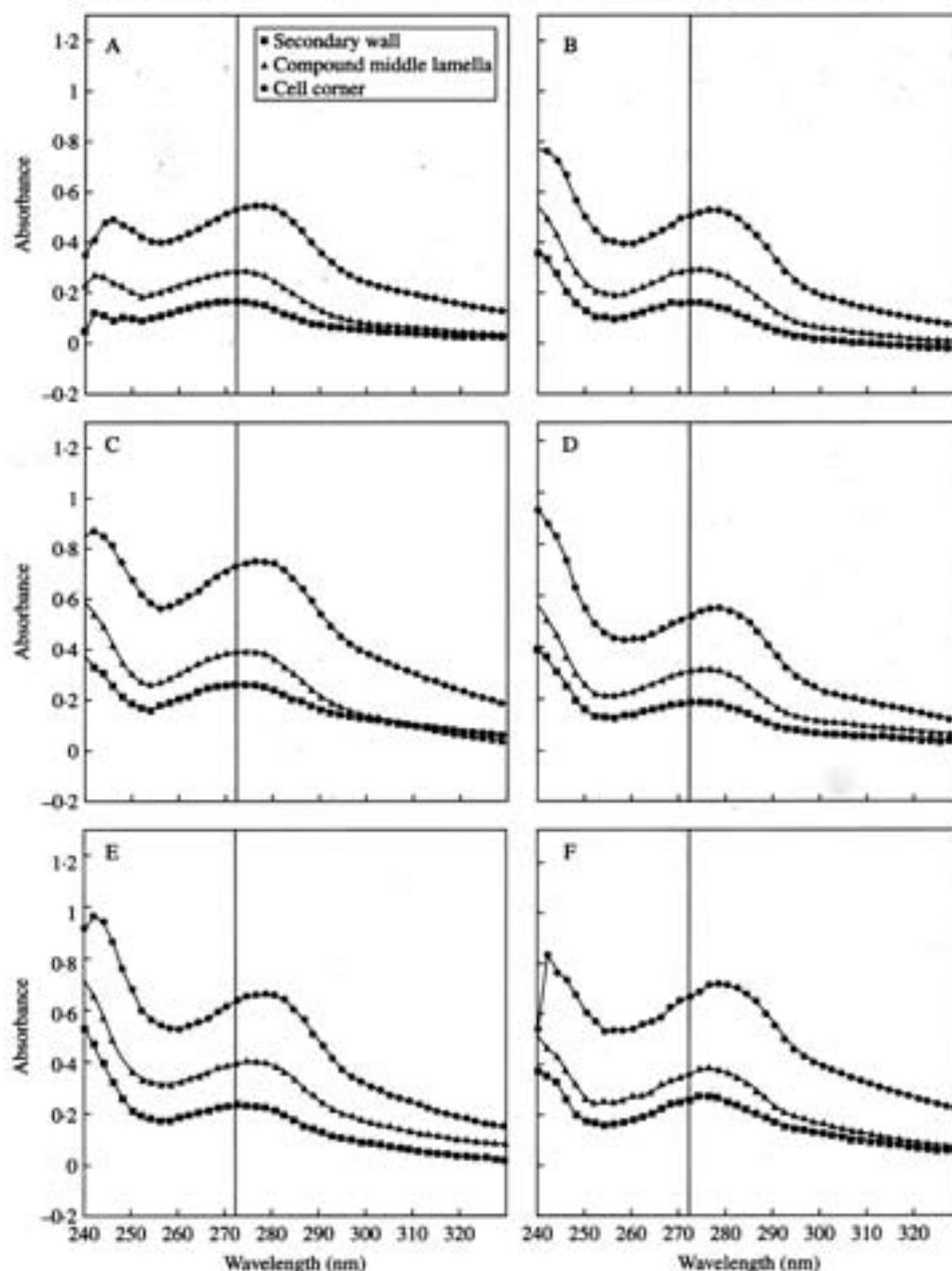


FIG. 12. Representative UV absorbance spectra of fibre cell wall layers of unaffected controls (A) and after different periods of wound response (B–F): (B) 2, (C) 4, (D) 17, (E) 62 and (F) 95 weeks after wounding. Vertical line indicates the 272 nm wavelength.

distribution across the entire S2 layer (Saka and Goring, 1988; Koch and Kleist, 2001). During later stages of wound response the lignin distribution within the secondary wall appeared more inhomogeneous. The lignin content in compound middle lamella and cell corner regions, however, was also significantly higher in late stages of wound response.

As mentioned before, the syringyl : guaiacyl ratio and the condensation of methoxy groups determines the position of

the absorbance maximum and also the absorbance intensity. With decreasing MeO/C₉ values, the peak position shifts towards higher wavelength and the intensity of absorbance increases, whereas the overall lignin concentration may still be constant (Musha and Goring, 1975). This phenomenon therefore restricts semiquantitative interpretations of maxima differences between inflicted and unaffected cells.

From these results obtained for poplar, it can be stated that wounding induces an increased wall thickness and a modified lignin topochemistry in xylem fibres differentiating at the time of wounding. It is assumed that this wound response is part of the compartmentalization and adds a further mechanism contributing to an increased resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. Dr D. Eckstein and Dr A. Singh for critically reviewing the manuscript and C. Waitkus for helping with the photographic work. The work was partly funded by the 'Deutsche Forschungsgemeinschaft/DFG' (GR 1788/2-1).

LITERATURE CITED

- Bauch J, Seehann G, Fitzner H. 1976. Microspectrophotometric investigations on lignin of decayed wood. *Material und Organismen, Beiheft* 3: 141-152.
- Bauch J, Shigo AL, Starek M. 1980. Wound effects in the xylem of acer and betula species. *Holzforschung* 34: 153-160.
- Bland DE, Hillis WE. 1969. Microspectrophotometric investigations of lignin and polyphenol distribution in wood sections. *Appita* 23: 204-210.
- Brown CL, Sax K. 1962. The influence of pressure on the differentiation of secondary tissues. *American Journal of Botany* 49: 683-691.
- Bucciarelli B, Ostry ME, Fulcher RG, Anderson NA, Vance CP. 1999. Histochemical and microspectrophotometric analyses of early wound responses of resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (= *Hypoxylon mammatum*). *Canadian Journal of Botany* 77: 548-555.
- Buntrock M. 1989. Anatomische Untersuchungen über die Wundreaktion der Pappel. Diploma Thesis, University of Hamburg, Germany.
- Donaldson LA. 2001. Lignification and lignin topochemistry—an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57: 859-873.
- Donaldson LA, Hague J, Snell R. 2001. Lignin distribution in coppice poplar, linseed and wheat straw. *Holzforschung* 55: 379-385.
- Fergus BJ, Goring DAL. 1970a. The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. *Holzforschung* 24: 113-117.
- Fergus BJ, Goring DAL. 1970b. The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy. *Holzforschung* 24: 118-124.
- Fink S. 1999. *Pathological and regenerative plant anatomy*. Berlin/Stuttgart: Gebrüder Borntraeger.
- Fukazawa K. 1992. Ultraviolet microscopy. In: Lin SY, Dence CW, eds. *Methods in lignin chemistry*. Berlin: Springer Verlag, 110-121.
- Grünwald C, Ruel K, Joselau JP, Fladung M. 2001. Morphology, wood structure and cell wall composition of rolC transgenic and non-transformed aspen trees. *Trees* 15: 503-517.
- Grünwald C, Stobbe H, Schmitt U. 2002. Entwicklungsstufen der seitlichen Wundüberwallung von Laubgehölzen. *Forstwissenschaftliches Zentralblatt* 121: 50-58.
- Grünwald C, Ruel K, Kim YS, Schmitt U. 2002a. On the cytochemistry of cell wall formation in poplar trees. *Plant Biology* 4: 13-21.
- Grünwald C, Ruel K, Schmitt U. 2002b. Differentiation of xylem cells in rolC transgenic aspen trees—a study of secondary cell wall development. *Annals of Forest Science* 59: 679-685.
- Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.
- Kaufert F. 1937. Factors influencing the formation of periderm in Aspen. *American Journal of Botany* 24: 24-30.
- Koch G, Kleist G. 2001. Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. *Holzforschung* 55: 563-567.
- Koch G, Grünwald C. 2004. Application of UV microspectrophotometry for topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. In: Schmitt U, Ander P, Barnett JR, Emons AMC, Jeronimidis G, Saranpää P, et al., eds. *Wood fibre cell walls: methods to study their formation, structure and properties*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Science, 119-130.
- Liese W, Dujesiefken D. 1989. Wundreaktionen bei Bäumen. Tharandt: Tagungsbericht, 2. Symposium, Ausgewählte Probleme der Gehölzphysiologie—Gebölze, Mikroorganismen und Umwelt, 75-80.
- Liese W, Dujesiefken D. 1996. Wound reactions of trees. In: Raychaudhuri SP, Maramorosch K, eds. *Forest trees and palms: diseases and control*. Oxford/New Delhi/Calcutta: IBH Publishing, 21-35.
- Lille RD. 1954. *Histopathologic technique and practical histochemistry*. 2nd edn. New York: McGraw-Hill.
- Lowerts G, Wheeler EA, Kellison RC. 1986. Characteristics of wound-associated wood of Yellow-Poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). *Wood and Fiber Science* 18: 537-552.
- Mullick DB. 1977. The non-specific nature of defence in bark and wood during wounding, insect and pathogen attack. *Recent Advances in Phytochemistry* 11: 395-441.
- Musha Y, Goring DAL. 1975. Distribution of syringyl and guaiacyl moieties in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. *Wood Science and Technology* 9: 45-58.
- Okuyama T, Takeda H, Yamamoto H, Yoshida M. 1998. Relation between growth stress and lignin concentration in the cell wall: ultraviolet microscopic spectral analysis. *Journal of Wood Science* 44: 83-89.
- Pearce RB. 2000. Decay development and its restriction in trees. *Journal of Arboriculture* 26: 1-11.
- Rademacher P, Bauch J, Shigo AL. 1984. Characteristics of xylem formed after wounding in *Acer*, *Betula* and *Fagus*. *IAWA Bulletin* 5: 141-151.
- Saka S, Goring DAL. 1988. Localization of lignins in wood cell walls. In: Higuchi T, ed. *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. New York, NY: Academic Press, 51-62.
- Schmitt U, Liese W. 1990. Wound reaction of the parenchyma in *Betula*. *IAWA Bulletin* 11: 413-420.
- Schmitt U, Liese W. 1992a. Seasonal influences on early wound reactions in *Betula* and *Tilia*. *Wood Science and Technology* 26: 405-412.
- Schmitt U, Liese W. 1992b. Response of xylem parenchyma by suberization in some hardwoods after mechanical injury. *Trees* 8: 23-30.
- Schmitt U, Müller R, Eckstein D. 2000. Seasonal wood formation dynamics of Beech (*Fagus sylvatica* L.) and Black Locust (*Robinia pseudacacia* L.) as determined by the 'Pinning' technique. *Journal of Applied Botany* 74: 10-16.
- Scott JAN, Procter AR, Fergus BJ, Goring DAL. 1969. The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood: description and validity of the technique. *Wood Science and Technology* 3: 73-92.
- Sharon EM. 1973. Some histological features of *Acer saccharum* wood formed after wounding. *Canadian Journal of Forest Research* 3: 83-89.
- Shigo AL. 1984. Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annual Review of Phytopathology* 22: 189-214.
- Shigo AL, Marx HG. 1977. Compartmentalization of decay in trees. *USDA Forest Service and Agriculture Information Bulletin* 405: 1-73.
- Shortle WC. 1979. Compartmentalization of decay in red maple and hybrid poplar trees. *Phytopathology* 69: 410-413.
- Singh AP, Schmitt U. 2000. High variability in the distribution of lignin in the middle lamella of Rubber-wood (*Hevea brasiliensis*) cells. In: Kim YS, ed. *New horizons in wood anatomy*. Kwangju: Chonnam Nat'l University Press, 203-207.
- Soe K. 1959. Anatomical studies of bark regeneration following scoring. *Journal of the Arnold Arboretum* 40: 260-267.
- Spurr AR. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research* 26: 31-43.
- Takabe K. 2002. Cell walls of woody plants: autoradiography and ultraviolet microscopy. In: Chaffey N, ed. *Wood formation in trees*. London: Taylor & Francis, 159-177.
- Terashima N, Fukushima K, Takabe K. 1986a. Heterogeneity in formation of lignin. VIII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in *Magnolia kobus* DC. *Holzforschung* 40: 101-105.

- Terashima N, Fukushima K, Tsuchiya S, Takabe K. 1986b. Heterogeneity in formation of lignin. VII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in poplar. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 6: 495-504.
- Terashima N, Fukushima K, Takabe K. 1993. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: Jung HG, Buxton DR, Hatfield RD, Ralph J, eds. *Forage cell wall structure and digestibility*. Madison, WI: ASA-CSSA-SSSA, 247-270.
- Trockenbrodt M, Ljese W. 1991. Untersuchungen zur Wundreaktion in der Rinde von *Populus tremula* L. und *Platanus acerifolia* (Ait.) Willd. *Angewandte Botanik* 65: 279-287.

Cell wall modifications in woody stems induced by mechanical stress¹

Uwe Schmitt^a, Adya Singh^b, Claus Frankenstein^a, Ralf Möller^c

^aFederal Research Centre for Forestry and Forest Products, Hamburg, Germany

^bEnsis, Scion, Rotorua, New Zealand

^cScion, Rotorua, New Zealand

Corresponding author:

Uwe Schmitt

Federal Research Centre for Forestry and Forest Products

Institute for Wood Biology and Wood Protection

Leuschnerstr. 91

D-21031 Hamburg

GERMANY

E-mail: u.schmitt@holz.uni-hamburg.de

New Zealand Journal of Forestry, angenommen zur Veröffentlichung im Januar 2006

¹Paper presented at the 1st New Zealand – German Symposium on Plant Cell Walls held in Rotorua from 22-24 June 2005

Abstract

Two examples of modified wall architecture in woody cells are given in the present paper. First, in poplar trees wounding caused wall thickenings of xylem fibres differentiating at the time of wounding. These fibres close to a wound also displayed slightly higher lignin content and an inhomogeneous lignin distribution as revealed by UV-microspectrophotometry. Additionally, the lignin in the middle lamella and the S2 layer of modified fibres contained more guaiacyl units than fibres of normal wood. These wound response mechanisms are assumed to contribute to an increased resistance. Second, in a pine seedling displaying stem bending, extensive compression wood formation was observed. Autofluorescence confirmed the distinctly higher lignin content in the compression wood tracheids as compared with normal tracheids. Immunolabelling of galactan for the first time clearly demonstrated that the bulk of galactan is localized in the outer S2 wall regions.

Introduction

The lateral meristem cambium or also cambium derivatives in early developmental stages respond to various stresses by producing secondary xylem tissues with altered characteristics, which are directed to enhancing the capability of plants to withstand the effect of stressful conditions. Cell wall modification by way of increased thickness or compositional changes is a common mechanism operating in plants to respond to wounding, mechanical and physical stresses. The present paper deals with two examples of cell wall modifications that can occur when the cambium or the cambium-adjacent differentiating xylem is stressed by mechanical injury or bending of stem.

Responses of xylem tissue to mechanical injuries have been variously described on the macroscopic as well as on the microscopic level (e.g. Shigo 1984, Schmitt 1990, Schmitt and Liese 1992, 1993, Liese and Dujesiefken 1996, Pearce 2000). The most prominent responses as revealed for angiosperm trees wounded during the season were reactions of parenchyma cells, such as synthesis of phenolic compounds with subsequent secretion into neighbouring fibres and vessels, tyloses formation, and suberization. There is also evidence that xylem cells differentiating at the time of wounding and without secondary wall layers, were capable of redifferentiation into parenchymatic tissue with frequently dividing cells thus contributing to the formation of a callus (Frankenstein et al. 2005). However, little is known about those differentiating xylem cells which already started with deposition of secondary wall material. The present paper is focused on modifications of the secondary wall layer in these cells with special emphasis on the lignin topochemistry.

Compression wood is a type of reaction wood that is produced in gymnosperms in response to factors that force stems or branches to bend or lean. The compression wood produced varies in its severity depending apparently on the magnitude of the stresses imposed. The characteristic features, which are typical of severe compression wood, such as rounding of tracheids, presence of intercellular spaces, thicker cell walls, greater lignification of the outer region of the S₂ layer, reduced lignification of middle lamella, absence of a S₃ layer and the presence of helical cavities in the S₂ layer, have been well characterised (Timell 1986). The anatomy of mild compression wood cells, which develop features that are intermediate between severe compression wood and normal wood, has also been characterised in detail (Donaldson et al. 1999; Singh and Donaldson 1999; Donaldson et al. 2003; Singh et al. 2003).

Higher lignin content and the presence of (1-4)- β -D-galactan in cell walls are generally regarded to be the two most characteristic compositional features of all grades of compression wood (Timell 1986). Most of the galactan is removed during delignification, and it appears that lignin and galactan may be chemically linked (Mukoyoshi et al. 1981). In the present paper we used the anti-(1-4)- β -D-galactan monoclonal antibody LM5 (Jones et al. 1997) as a marker for identifying mild and severe compression wood cells, and to examine the pattern of galactan distribution in compression wood cell walls.

Both selected phenomena are examples of an enormous variety of stress reactions in woody tissue, but represent characteristic modifications of the chemical composition mainly in the secondary wall layers.

Material and Methods

Plant material

To study cell wall modification due to wounding, rectangular wounds of 10 x 10 cm² were set on 07 July 2002 and 23 June 2003 by removing the bark from stems of four mature poplar trees (*Populus* sp.) using a saw and a chisel. Samples were collected 2, 4, 8, 10, 17, 62 and 95 weeks after wounding from the lateral edges of wounds. The wound tissue, the adjacent modified xylem and the unaffected xylem were removed with a chisel and razor blades. For galactan localisation, approximately one-year-old *Pinus radiata* D. Don seedlings were collected in the Whakarewarewa Forest, Rotorua, New Zealand. A seedling with a stem diameter of 5 mm that showed extensive compression wood was selected.

Light- and electron microscopy

For conventional light-microscopy, poplar samples (10 x 10 x 8 mm³) were fixed for three days in a phosphate-buffered solution of 3.7% formaldehyde, dehydrated in a graded series of propanol and embedded in glycol methacrylate (Technovit 7100). Transverse sections were cut at a thickness of 6 µm with a rotary microtome, and stained for 1.5 h with a standard Giemsa solution. Radiata pine samples were prepared as described above, except that they were dehydrated in a graded series of ethanol. Transverse sections were cut at a thickness of 10 µm and stained as described above.

For TEM, the poplar samples from the same series were reduced to a final size of 3 x 3 x 8 mm³, fixed for one day in a mixture of 5% glutaraldehyde and 8% paraformaldehyde, washed in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3), dehydrated in a graded series of acetone and embedded in Spurr's epoxy resin (Spurr, 1969). Ultra-thin (80-100 nm) transverse sections were either double-stained with uranyl acetate and lead citrate, or with potassium permanganate, according to Donaldson (1992). The samples were examined with a Philips CM 12 TEM at an accelerating voltage of 60 or 80 kV.

UV-microspectrophotometry

For UV-microspectrophotometry, the poplar samples were processed as described for TEM. One µm semi-thin transverse sections were mounted onto quartz slides, immersed in a drop of non-UV absorbing glycerol and covered with a quartz cover slip. An ultrafluar objective 32:1 and a 100:1 objective were used. Scanning UV-microspectrophotometry was carried out using a ZEISS UMSP 80 microspectrophotometer equipped with an Osram high-pressure xenon lamp, an ultrafluar quartz condenser and a scanning stage, enabling the determination of image profiles at a constant wavelength of 280 nm using the scan programme APAMOS (Automatic-Photometric-Analysis of Microscopic Objects by Scanning, Zeiss). This wavelength represents the typical absorbance maximum of lignified cell walls. The scan programme digitises rectangular tissue portions with a local geometrical resolution of 0.25 µm² and a photometrical resolution of 4096 grey scale levels, converted into 14 basic colours representing the measured absorbance intensities (Koch and Kleist, 2001). Additionally, specimens were analysed by point measurements with a spot size of 1 µm². The spectra were taken at wavelengths ranging from 240 to 400 nm in 2 nm steps using the programme LAMWIN (Zeiss). These point measurements for a semiquantitative determination of the lignin content were automatically repeated 50 times at each spot for individual wall layers, ie., compound middle lamella, the S2 layer of the secondary wall and cell corners.

Immuno-labelling and confocal microscopy

Radiata pine sections were prepared as described above and fixed onto microscope slides. The sections were blocked with 50 mM PBS containing 3% nonfat milk (pH 7.4) for 1 h at 24°C. A 50 µl droplet of anti-(1-4)- β -galactan monoclonal antibody LM5 (Jones et al. 1997) in blocking buffer (diluted 1:10) was then placed onto the sections. The sections were incubated for 18 h at 4°C, washed with the blocking buffer and then incubated for 2 h at 24°C with the fluorescent secondary antibody Alexa Fluor[®]660 (Invitrogen New Zealand Ltd., Auckland), diluted 1:500 in the blocking buffer. Sections were washed with water, dried, mounted in immersion oil and viewed on a confocal laser scanning microscope (Leica TCS NT). Control sections were prepared with the primary antibody omitted. For immuno-fluorescence, samples were illuminated with an excitation wavelength of 647 nm. The emission passing through a long-pass filter (LP 665) was recorded. Lignin autofluorescence was imaged from the same areas of the sections. An excitation wavelength of 488 nm was used and the emission passing through a long-pass filter (LP 515) was recorded. Stacks of 10 confocal optical sections were taken for both, immuno-fluorescence and lignin autofluorescence and projections compiled for imaging. The immuno-fluorescence images were digitally coloured red.

Results and Discussion

Wound response

Light- and transmission electron microscopic investigations of poplar xylem revealed wound-induced cell wall modifications within xylem cells differentiating at the time of wounding. This modified xylem zone became obvious between xylem laid down prior to wounding and tissue laid down after wounding (Fig. 1) and was characterized by fibres with unusually thick walls (Fig. 2). Electron microscopy showed that, compared with unaffected xylem cells, these fibres deposited additional secondary wall material leading to extremely thick walls (Fig. 3, 4). Cell corner regions within the modified xylem predominantly consisted of material with high electron density (Fig. 4). Schmitt et al. (2000) observed the formation of a tangential band of thick-walled fibres between modified and regular xylem after insertion of a pin into beech xylem. Probably, these modified fibres also developed in the zone of undifferentiated xylem.

To semiquantitatively determine the lignin distribution and composition within individual wall layers, the poplar tissues were examined by scanning UV-microspectrophotometry at a constant wavelength of 280 nm (Fig. 5 - 8). In addition, point measurements were made with a spot size of 1 µm and a wavelength range of 240 to 400 nm (Fig. 9, 10). Both methods have been proven to be reliable techniques with a high spatial resolution

(e.g. Bland and Hillis, 1969; Scott et al., 1969; Fergus and Goring, 1970 a, b; Musha and Goring, 1975; Bauch et al., 1976; Bucciarelli et al., 1999; Fukazawa, 1992; Okuyama et al., 1998; Grünwald et al., 2001, 2002 a, b; Koch and Kleist, 2001; Takabe, 2002; Koch and Grünwald, 2004).

Figure 5 shows the distribution pattern of lignin in unaffected xylem fibres and vessel elements in an earlywood region. The fibres were characterised by thin S2 wall layers with low and uniform absorbance values of around Abs_{280nm} 0.09, and increasing absorbance values in compound middle lamella regions (Abs_{280nm} 0.16 to Abs_{280nm} 0.23). Latewood fibres in unaffected xylem showed slightly higher absorbance values in their wider S2 and in cell corners, particularly in the compound middle lamella regions (Abs_{280nm} 0.23 to Abs_{280nm} 0.35) (Fig. 9). The highest absorbencies of Abs_{280nm} 0.35 to Abs_{280nm} 0.67 were found in some cell corners between latewood vessel elements and adjacent fibres. Regarding the lignin type, representative point measurements (Fig. 9) resulted in mean absorbance maxima at wavelengths 270/272 nm for the S2, indicating a low content of predominantly syringyl-type lignin. Cell corner regions showed the highest lignin concentrations at a wavelength of 278 nm therefore mainly composed of guaiacyl-type lignin, which corresponds well with earlier studies (Fergus and Goring, 1970 a, b; Musha and Goring, 1975; Fukazawa, 1992). Point measurements of middle lamella regions displayed only a slightly higher maximum absorbance at 270/272 nm compared to the maximum absorbance of the S2. The middle lamella regions and the S2 therefore had the same lignin composition. A higher relative abundance of guaiacyl lignin moieties has been reported variously (e.g. Fergus and Goring, 1970 b; Musha and Goring, 1975; Terashima, 1986 a, b, 1993). Our results for secondary wall- and cell corner regions of unaffected poplar xylem were in good agreement with the cell wall composition typical for many hardwoods (e.g. Fergus and Goring, 1970 a, b; Musha and Goring, 1975; Terashima et al., 1986 a, b, 1993; Donaldson, 2001; Donaldson et al., 2001; Grünwald et al., 2002 a; Koch and Kleist, 2001; Takabe, 2002).

The influence of wounding on the lignin distribution in walls of modified xylem cells is shown in Figures 6 - 8. Already after a short wound response period, the secondary walls of many UV-scanned modified fibres showed several concentric sub-layers with absorbance values varying between Abs_{280nm} 0.09 and Abs_{280nm} 0.48, the lowest lignin content being always in the layers adjacent to lumen (Fig. 6). In comparison, unmodified hardwood fibres were characterised by a uniform lignin content across the entire secondary wall layer (e.g., Saka and Goring, 1988; Koch and Kleist, 2001). As compared with unaffected references, higher absorbance values were regularly recorded in the compound middle lamella between fibres (Abs_{280nm} 0.55 Abs_{280nm} 0.68) and in the cell corners (Abs_{280nm} 0.81 up to over Abs_{280nm} 0.94) (Fig. 6). After prolonged wound response (62 up to 95 weeks), thick-walled fibres often showed increased absorbance

values and an inhomogeneous lignin distribution. Within the thickened secondary wall, absorbance values varied between Abs_{280nm} 0.09 and Abs_{280nm} 0.42 (Fig. 7). Absorbance values for the compound middle lamella ranged from Abs_{280nm} 0.23 to Abs_{280nm} 0.81 and in cell corner regions from Abs_{280nm} 0.42 up to Abs_{280nm} over 0.94. The secondary wall of vessels showed absorbance values between Abs_{280nm} 0.23 and Abs_{280nm} 0.42. The UV-absorbance in compound middle lamella regions ranged from Abs_{280nm} 0.48 to Abs_{280nm} 0.68 and from Abs_{280nm} 0.55 to Abs_{280nm} 0.94 for the cell corners (Figs. 7, 8). The lumina of many ray parenchyma cells were filled with accessory phenolic deposits (Fig. 7). These deposits were also observed in the lumina of numerous fibres, especially in tissues close to the wound surface (Fig. 8). As compared to lignin, the spectra of these accessory phenolic deposits in fibres and ray parenchyma cells generally had higher absorbance values (up to Abs_{280nm} 1,38), and their absorbance maxima displayed a bathochromic² shift to a wavelength of 284 nm to 286 nm and a slower decrease of the absorbance with increasing wavelength. Therefore, an influence of the condensed accessory phenolic deposits on the UV-measurements is likely to be negligible.

The spectra recorded from modified fibres indicated that wounding induced an alteration in lignin composition, being mainly restricted to secondary wall and compound middle lamella regions, whilst cell corner lignin mostly remained unchanged. Within thickened secondary walls, the maximum absorbance shifted slightly towards higher wavelengths (272 – 274). The same effect became evident for middle lamella regions (274 – 276), indicating an increase in the amount of guaiacyl moieties (Fig. 10). The UV-scannings and UV-spectra of all thickened wall layers showed a distinctively higher average lignin content with highly variable maximum values.

Mechanical stress response

The choice of a *Pinus radiata* (radiata pine) seedling displaying stem bending proved valuable in our study for examining the pattern of distribution of galactan within compression wood cell walls by immunolabelling. There was abundance of compression wood in the stem, and it was possible to compare normal and compression wood within the same year of growth (Fig. 11). In Figure 12-A large areas of normal and compression wood are compared for lignin concentration of cell walls at a low magnification based on lignin autofluorescence of their cell walls. The brightness intensity reflects the concentration of lignin, with greater brightness indicating higher lignin concentration in cell walls. Greater brightness was associated with the region of secondary xylem containing compression wood cells; in contrast the region containing normal wood cells displayed a much reduced brightness. Confirmation of this feature was obtained by observations made at higher magnifications, which also revealed other cellular features characteristic of compression wood, such as the presence of rounded tracheids

²Shift of a spectral band to lower frequencies (higher wavelengths), it is also referred to as a red shift

and intercellular spaces. As shown in Figure 12-B, the pattern of immuno-localization of galactan closely corresponds to the pattern of autofluorescence in the secondary xylem, with compression wood region being brightly fluorescent for galactan. The cell walls in the normal wood region showed only a slight fluorescence. Interestingly, a narrow band of strongly fluorescing xylem for galactan (Fig. 12 A, B) showed only marginally greater autofluorescence relative to the normal xylem present on either side of this band. As for other xylem tissues, rays which showed strong autofluorescence in localised places lacked fluorescence for galactan, and autofluorescing resin canal epithelial cells also lacked fluorescence for galactan. Presence of phenolic extractives in ray parenchyma cells and in resin canal epithelial cells were likely contributors to observed autofluorescence of these tissues. Control sections did not label with the secondary antibody (data not shown).

The patterns of cell wall autofluorescence and galactan immunofluorescence are more clearly resolved in the images shown in Figures 13-A and 13-B, which were produced from the same section. The region of the cell wall in the compression wood zone (Fig. 13-A) which showed strong autofluorescence, forming a continuous band along the compound middle lamella corresponded to an outer region of the S_2 layer (S_{2L}) where lignin concentration is greatest, as determined by UV microscopy (Yumoto et al. 1983). This region of the S_2 layer showed strong fluorescence from immuno-labelled galactan (Fig. 13-B), the brightness intensity being greatest in cell corner regions where lignin also occurred in highest concentrations in a range of compression wood (Donaldson et al. 1999; Singh and Donaldson 1999; Yumoto et al. 1983). The compound middle lamella regions in compression wood were not labelled with the anti-galactan antibody. The secondary xylem region which is weakly autofluorescent and showed cellular morphology characteristic of normal secondary xylem lacked any fluorescence for galactan. Autofluorescing ray parenchyma cells lacked any fluorescence for galactan in both normal and compression wood regions. Ray parenchyma in the sapwood of radiata pine is not lignified, which suggests that the observed autofluorescence of these cells is due to other factors, such as the presence of phenolic extractives.

The formation of secondary wall in the compression wood, as in the normal wood, is a highly coordinated process, involving many gene products and metabolic processes. A recent statistical analysis of expressed sequence tags (ESTs) from secondary xylem forming zones of *Pinus taeda* (loblolly pine) has provided evidence that certain genes are specific to compression wood development (Pavy et al. 2005). However, with functions known only for a tiny fraction of all the genes that may be involved in wood formation our knowledge of the regulation of cell wall formation in compression wood is still rudimentary. Rather specific localization of galactan in the outer S_2 cell wall region, which becomes most highly lignified, suggests that galactan plays an important role

for the cell wall architecture of the highly specialised cell walls of compression wood tracheids.

Conclusions

It can be concluded that walls of xylem cells in angiosperm and gymnosperm trees may deviate from the regular architecture due to responses to various stress factors. For example, in poplar wounding induced an increased wall thickness and a modified lignin topochemistry, mainly restricted to secondary wall and compound middle lamella regions of xylem fibres differentiating at the time of wounding. These wound responses are assumed to contribute to an increased resistance. In pine seedlings displaying stem bending, galactan was largely present in the compression wood, being concentrated in the region of the S₂ layer, which is most highly lignified. Although it has been speculated earlier that galactan in compression wood may largely be associated with the S₁ and outer S₂ regions of the secondary wall, the present work is the first to demonstrate using immunolabelling technique that the bulk of galactan is associated with the outer layers of the secondary wall.

Figures

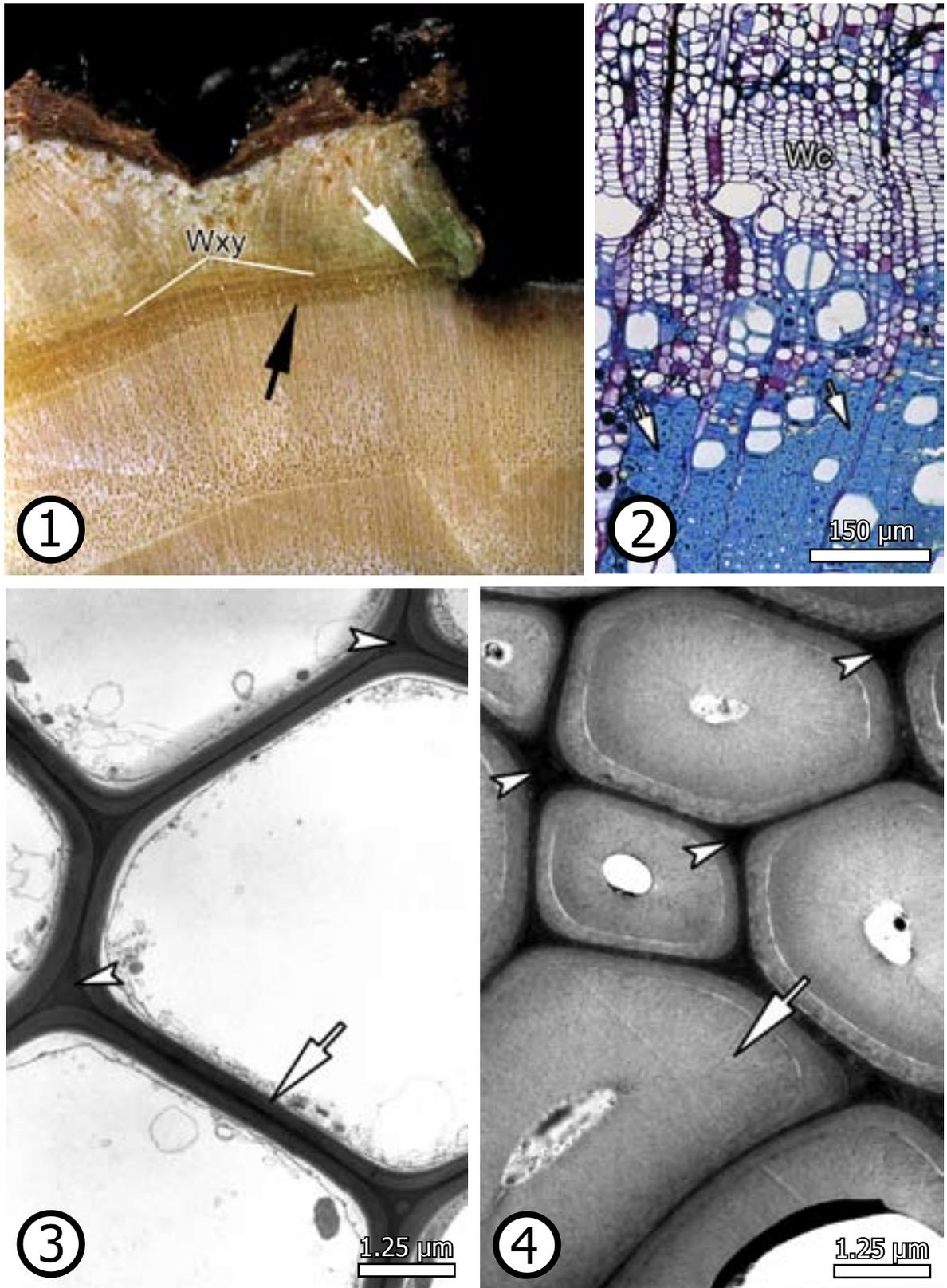


FIG. 1 Callus formation at the lateral wound edges; black arrow indicates the position of the transition zone, white arrow indicates the position of the cambium at the time of wounding, wound xylem (Wxy) formed after wounding.

FIG. 2 Transverse section through the modified transition zone between xylem laid down prior to and after wounding containing fibres with wound-induced wall thickenings (arrows), wound cambium (Wc); light micrograph, Giemsa staining.

FIG. 3 Transverse section through unmodified poplar xylem; typical thin-walled fibres (arrow), with less electron dense material in cell corners (arrowheads); TEM, uranyl acetate and lead citrate staining.

FIG. 4 Transverse section through modified xylem of the transition zone; fibres with distinct secondary cell wall thickenings (arrow); cell corners contain material with extremely high electron density (arrowheads); TEM, potassium permanganate staining.

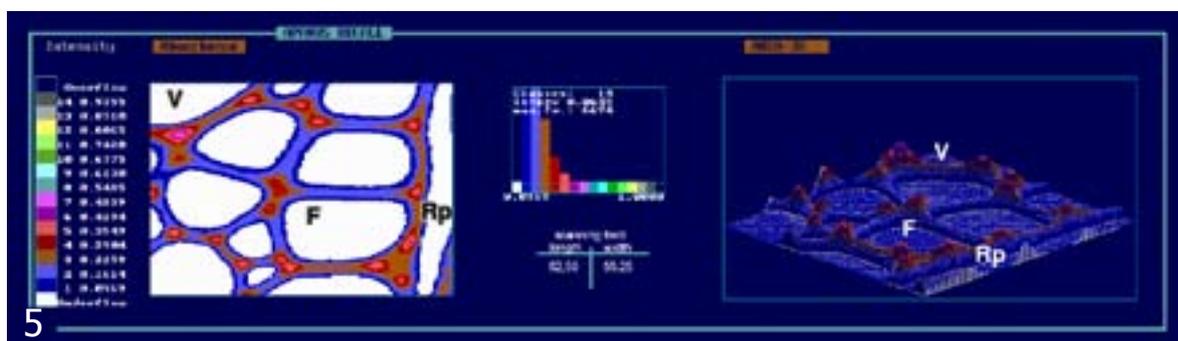


FIG. 5 UV-micrograph and 3D UV-microscopic scanning profile of unaffected xylem. The coloured pixels represent different UV-absorbance values within the fibre wall layers at 280 nm wavelength; vessel (V), fibre (F), ray parenchyma (Rp).



FIG. 6 UV-micrograph and 3D image profile of a fibre showing extreme secondary wall thickenings and increased lignin contents.

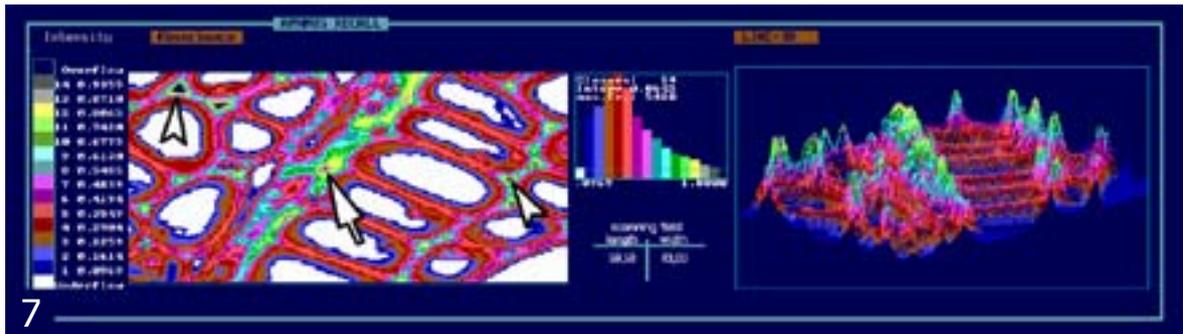


FIG. 7 UV-micrograph and 3D image profile of modified xylem; fibres showing wall thickenings; ray parenchyma cells are filled with accessory phenolic compounds (arrows) and extremely high lignin concentrations in cell corner regions (arrowheads).

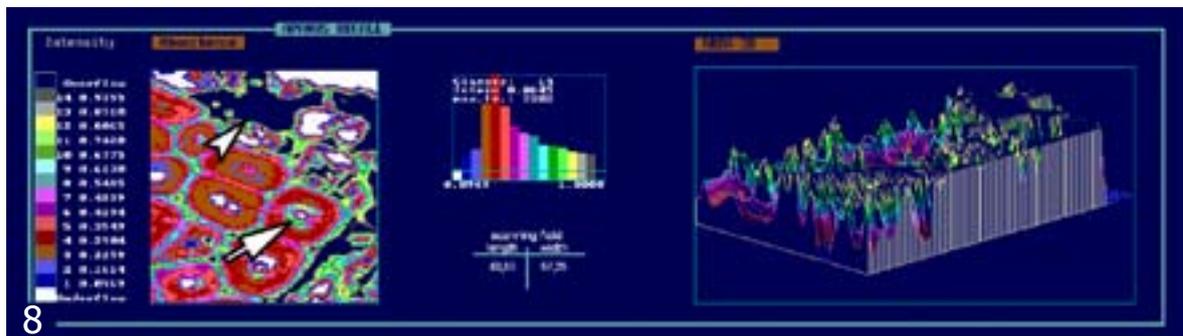


FIG. 8 UV-micrograph and 3D image profile of a modified xylem directly adjacent to the degenerated tissue on the wound surface (arrowhead); some thick-walled fibres are filled with accessory phenolic compounds (arrows).

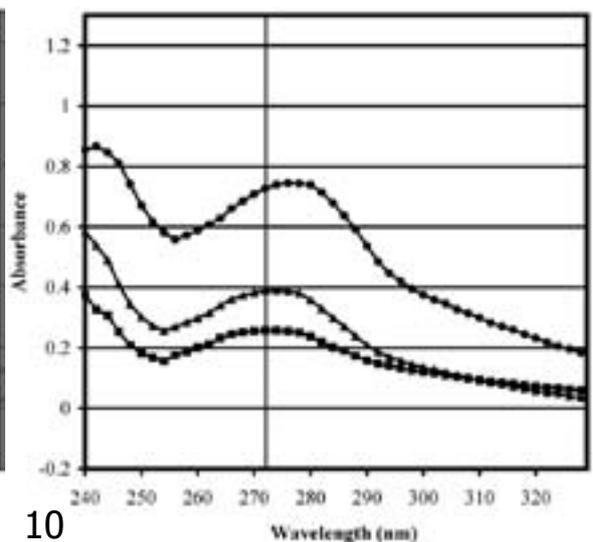
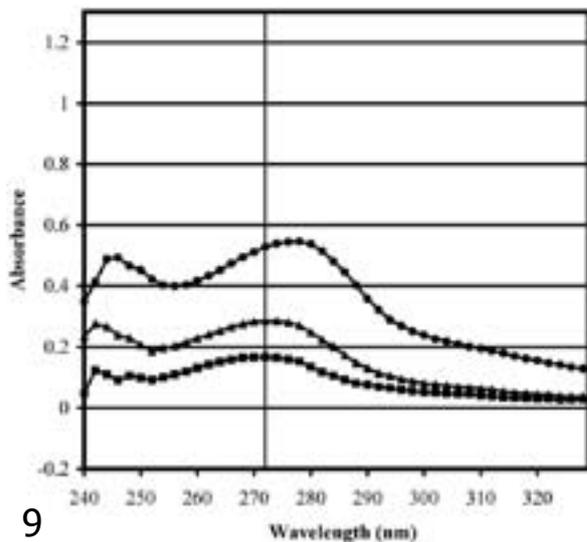


FIG. 9, 10 Representative UV absorbance spectra of fibre wall layers of controls (9) and of fibres within the transition zone (10): S2-layer (-■-), compound middle lamella (-▲-), cell corner region (-●-); vertical line indicates a wavelength of 272 nm.

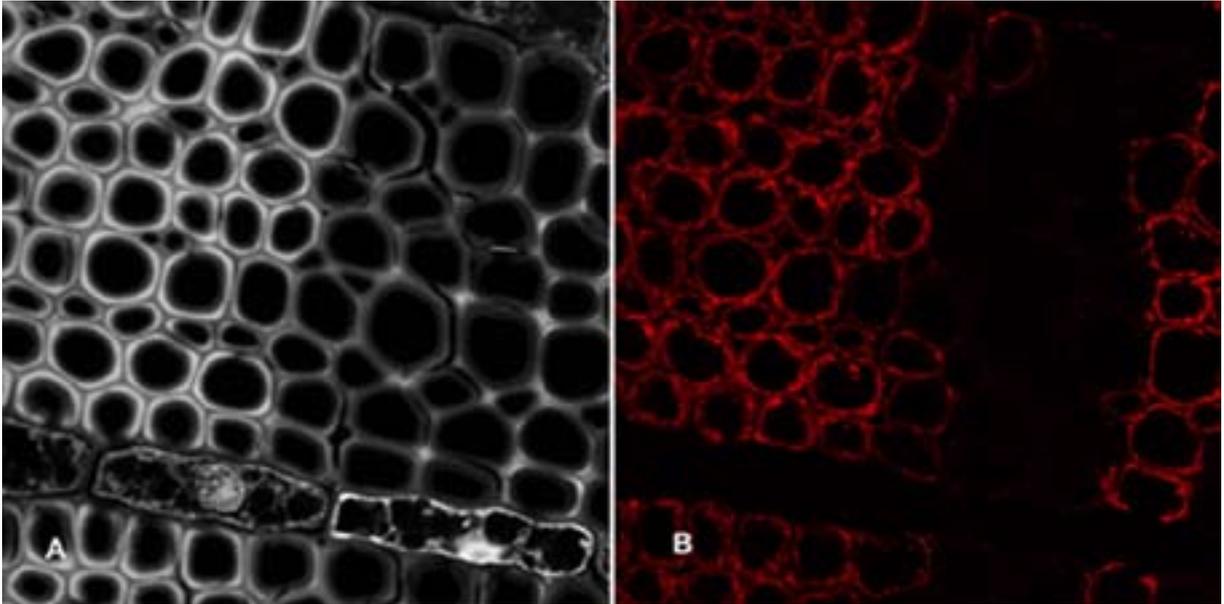


Fig. 11 Transverse section through a stem of a one-year-old *P. radiata* seedling giving an overview of the variability of wood structure caused by mechanical stresses. Bar = 0.5 mm.

Fig. 12 Confocal micrographs of a transverse stem section of a one-year-old *P. radiata* seedling. A Lignin autofluorescence. B Immunofluorescent localisation of the LM5 epitope. LM5 labelled the cell walls of compression wood cells.

Fig. 13 Confocal micrographs of a selected area from the same section as shown in Fig. 12. A Lignin autofluorescence. B Immunofluorescent localisation of the LM5 epitope. Normal wood cells are not labelled. Compression wood cells are most intensely labelled in the outer S2 cell wall region. The compound middle lamella is not labelled.

References

- Bauch, J.; Seehann, G.; Fitzner, H. 1976. Microspectrophotometrical investigations on lignin of decayed wood. *Material und Organismen, Beiheft 3*: 141-152.
- Bland, D.E.; Hillis, W.E. 1969. Microspectrophotometric investigations of lignin and polyphenol distribution in wood sections. *Appita 23*: 204-210.
- Bucciarelli, B.; Ostry, M.E.; Fulcher, R.G.; Anderson, N.A.; Vance, C.P. 1999. Histochemical and microspectrophotometric analyses of early wound responses of resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (*Hypoxylon mammatum*). *Canadian Journal of Botany 77*: 548-555.
- Donaldson, L.A. 1992. Lignin distribution during late wood formation in *Pinus radiata* D. Don. *IAWA Journal 13*: 381 – 387.
- Donaldson, L.A.; Singh, A.P.; Yoshinga, A.; Takabe, K. 1999. Lignin distribution in mild compression wood of *Pinus radiata*. *Canadian Journal of Botany 77*: 41-50.
- Donaldson, L.A. 2001. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry 57*: 859-873.
- Donaldson, L.A.; Hague, J.; Snell, R. 2001. Lignin distribution in coppice poplar, linseed and wheat straw. *Holzforschung 55*: 379-385.
- Donaldson, L.A.; Grace, J.C.; Downes, G. 2003. Within tree variation in anatomical properties of compression wood in radiata pine. *IAWA J. 25*: 253-271.
- Fergus, B.J.; Goring, D.A.I. 1970 a. The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. *Holzforschung 24*: 113-117.
- Fergus, B.J.; Goring, D.A.I. 1970 b. The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy. *Holzforschung 24*: 118-124.
- Fukazawa, K. 1992. Ultraviolet microscopy. In: Lin, S.Y.; Dence C.W., eds. *Methods in lignin chemistry*. Springer Verlag, Berlin: 110-121.
- Frankenstein, C.; Schmitt, U.; Waitkus, W.; Eckstein, D. 2005. Wound callus formation – a microscopic study on poplar (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.). *Journal of Applied Botany and Food Quality 79*: 44 – 51.
- Grünwald, C.; Ruel, K.; Joselau, J.P.; Fladung, M. 2001. Morphology, wood structure and cell wall composition of rolC transgenic and non-transformed aspen trees. *Trees 15*: 503-517.
- Grünwald, C.; Ruel, K.; Kim, Y.S.; Schmitt, U. 2002 a. On the cytochemistry of cell wall formation in poplar trees. *Plant Biology 4*: 13-21.
- Grünwald, C.; Ruel, K.; Schmitt, U. 2002 b. Differentiation of xylem cells in rolC transgenic aspen trees – a study of secondary cell wall development. *Annals of Forest Science 59*: 679-685.
- Jones, L.; Seymour, G. B.; Knox, J. P. (1997) Localization of pectic galactan in tomato

cell walls using a monoclonal antibody specific to (1-4)- β -D-galactan. *Plant Physiology* 113: 1405-1412.

Koch, G.; Kleist, G. 2001. Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. *Holzforschung* 55: 563-567.

Koch, G.; Grünwald, C. 2004. Application of UV microspectrophotometry for topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. In: Schmitt, U.; Ander, P.; Barnett, J.R.; Emons, A.M.C.; Jeronimidis, G.; Saranpää, P.; Tschegg, S., eds. *Wood fibre cell walls: Methods to study their formation, structure and properties*. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala: 119-130.

Liese, W.; Dujesiefken, D. 1996. Wound reactions of trees. In: Raychaudhuri, S.P.; Maramorosch, K., eds. *Forest trees and palms: Diseases and control*. IBH publishing, Oxford, New Delhi, Calcutta: 21-35.

Mukoyoshi, S.I., Azuma, J.I., Koshijima, T. 1981. Lignin-carbohydrate complexes from compression wood of *Pinus densiflora* Sieb et Zucc. *Holzforschung* 35: 233-240.

Musha, Y.; Goring, D.A.I. 1975. Distribution of syringyl and guaiacyl moieties in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. *Wood Science and Technology* 9: 45-58.

Okuyama, T.; Takeda, H.; Yamamoto, H.; Yoshida, M. 1998. Relation between growth stress and lignin concentration in the cell wall: ultraviolet microscopic spectral analysis. *Journal of Wood Science* 44: 83-89.

Pavy, N.; Laroche, J.; Bousquet, J.; MacKay, J. 2005. Large-scale statistical analysis of secondary xylem ESTs in pine. *Plant Molecular Biology* 57: 203-224.

Pearce, R.B. 2000. Decay development and its restriction in trees. *Journal of Arboriculture* 26: 1-11.

Saka, S.; Goring, D.A.I. 1988. Localization of lignins in wood cell walls. In: Higuchi, T., ed. *Biosynthesis and Biodegradation of wood components*. Academic Press, New York: 51-62.

Schmitt, U.; Liese, W. 1990. Wound reaction of the parenchyma in *Betula*. *IAWA Bulletin* 11: 413-420.

Schmitt, U.; Liese, W. 1992. Seasonal influences on early wound reactions in *Betula* and *Tilia*. *Wood Science and Technology* 26: 405-412.

Schmitt, U.; Liese, W. 1993. Response of xylem parenchyma by suberization in some hardwoods after mechanical injury. *Trees* 8: 23-30.

Schmitt, U.; Möller, R.; Eckstein, D. 2000. Seasonal wood formation dynamics of Beech (*Fagus sylvatica* L.) and Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) as determined by the "Pinning" technique. *Journal of Applied Botany* 74: 10-16.

Scott, J.A.N.; Procter, A.R.; Fergus, B.J.; Goring, D.A.I. 1969. The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood. Description and validity of the technique. *Wood Science and Technology* 3: 73-92.

Sharon, E.M. 1973. Some histological features of *Acer saccharum* wood formed after wounding. *Canadian Journal of Forest Research* 3: 83-89.

Shigo, A.L. 1984. Compartmentalization: A conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annual Review of Phytopathology* 22: 189-214.

Singh, A.P.; Donaldson, L.A. 1999. Ultrastructure of tracheid cell walls in radiata pine (*Pinus radiata*) mild compression wood. *Canadian Journal of Botany* 77: 32-40.

Singh, A.P.; Kim, Y.S.; Park, B.D.; Chung, G.C.; Wong, A.H.H. 2003. Presence of a distinct S3 layer in mild compression wood tracheids of *Pinus radiata*. *Holzforschung* 57: 243-247.

Spurr, A.R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research* 26: 31-43.

Takabe, K. 2002. Cell walls of woody plants: Autoradiography and ultraviolet microscopy. In: Chaffey, N., ed. *Wood formation in trees*. Taylor & Francis, London: 159-177.

Terashima, N.; Fukushima, K.; Takabe, K. 1986 a. Heterogeneity in formation of lignin. VIII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in *Magnolia kobus* DC. *Holzforschung* 40: 101-105.

Terashima, N.; Fukushima, K.; Tsuchiya, S.; Takabe, K. 1986 b. Heterogeneity in formation of lignin. VII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in poplar. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 6: 495-504.

Terashima, N.; Fukushima, K.; Takabe, K. 1993. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: Jung, H.G.; Buxton, D.R.; Hatfield, R.D.; Ralph, J., eds. *Forage cell wall structure and digestibility*. ASA-CSSA-SSSA, WI, Madison: 247-270.

Timell, T.E. 1986. *Compression wood in gymnosperms*. Volume 1. Springer Verlag Berlin.

Trockenbrodt, M.; Liese, W. 1991. Untersuchungen zur Wundreaktion in der Rinde von *Populus tremula* L. und *Platanus x acerifolia* (Ait.) Willd. *Angewandte Botanik* 65: 279-287.

Yumoto, M.; Ishida, S.; Fukuzawa, K. 1983. Studies on the formation and structure of compression wood cells induced by artificial inclination in young trees of *Picea glauca*. IV. Gradation of the severity of compression wood tracheids. *Research Bulletin of the College of Experimental Forests of Hokkaido University* 40(2): 409-454.

(Footnotes)

¹ Paper presented at the 1st New Zealand – German Symposium on Plant Cell Walls held in Rotorua from 22-24 June 2005

² Shift of a spectral band to lower frequencies (higher wavelengths), it is also referred to as a red shift

Microscopic studies on modified wall structure and lignin topochemistry in xylem fibres of poplar after wounding

Claus Frankenstein, Uwe Schmitt

Federal Research Centre for Forestry and Forest Products/Institute for Wood Biology and Wood Protection, Leuschnerstrasse 91, D-21031 Hamburg/Germany

Maderas: Ciencia y Tecnologia 8, eingereicht

1 Abstract

Information about fine structure following wounding in differentiating xylem tissue is still scarce. This study provides information on cell wall modifications with special emphasis on lignin distribution in xylem fibres of poplar differentiating at the time of wounding. Samples were collected from wounded *Populus* spp. trees after response periods of up to twenty-three months and processed for microscopic analyses. General studies on the wall structure of wound-adjacent xylem fibres were carried out with light and transmission electron microscopy, whereas lignin distribution patterns of these cells were examined by UV-microspectrophotometry.

Xylem fibres close to the wound and within a transition zone between differentiated xylem laid down prior to and tissue laid down after wounding developed a distinctively thicker secondary wall than normal fibres. These modified walls also showed a slightly higher lignin content, than normal and a heterogeneous lignin distribution in the middle lamella and the secondary wall.

Wounding in poplar induces a modified wall structure and lignin topochemistry in xylem fibres differentiating at the time of wounding. It is assumed that this wound response is part of the compartmentalization process and therefore contributes to an increased resistance.

Keywords: Wound reaction, poplar, *Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx., fibre cell wall, lignin distribution, UV-microspectrophotometry

2 Introduction

Hardwood lignin is a complex 3-dimensional co-polymer consisting mainly of guaiacyl and syringyl units. As a major cell wall component of xylem elements, lignin distribution, content and composition have a significant influence on technical wood properties as well as on decay resistance. It is therefore of interest to know how external stress factors such as like wounding influence cell wall ultra structure and lignification.

The defence mechanisms induced by different types of injury can be subdivided into active and passive mechanisms. These highly variable reactions have been subject of numerous investigations at macroscopic and microscopic levels (e.g. Sharon, 1973; Mullick, 1977; Shortle, 1979; Shigo, 1984; Schmitt and Liese, 1990, 1992, 1993; Liese and Dujesiefken, 1996; Pearce, 2000). Tree vitality, seasonal influences and the extent of wounding are factors which determine whether reactions are restricted to areas close to the wound or whether larger areas of the surrounding tissue are affected. Wounds affecting the cambial region often lead to the formation of callus tissue and subsequently, modified xylem and phloem (e.g. Liese and Dujesiefken, 1989; Fink, 1999; Grünwald et al., 2002). Within the xylem different reaction patterns lead to compartmentalization of the wounded area (Sharon, 1973; Shigo and Marx, 1977; Bauch et al., 1980; Rademacher et al., 1984; Shigo 1984; Lowerts et al., 1986; Liese and Dujesiefken, 1996). The formation of a so, called boundary layer which is mainly characterized by the synthesis of phenolic compounds in parenchyma cells with subsequent extrusion into neighbouring cells, i. e. fibres and vessels, as well as the formation of tyloses are the most prominent compartmentalization mechanisms in hardwoods at the microscopic level (e.g. Schmitt and Liese, 1990; Pearce, 2000). Earlier studies on wound reactions in poplar mainly focused on reactions of the bark, such as the formation of the ligno-suberized zone, new periderms and the influence of pressure on tissue differentiation (Kaufert, 1937; Soe, 1959; Brown and Sax, 1962; Trockenbrodt and Liese, 1991; Bucciarelli et al., 1999). The formation of a wound-callus and the wound induced alterations within the xylem of poplar have already been described at the light microscopic level (e.g. Buntrock, 1989; Frankenstein et al., 2005).

The following contribution is focused on the modification of xylem elements within a transition zone between differentiated xylem laid down prior to wounding and tissue laid down after wounding. Special emphasis is given to modifications of the cell wall ultrastructure and the lignin distribution, using light- and transmission electron microscopy as well as cellular UV-microspectrophotometry.

3 Material and Methods

Rectangular wounds of 10 cm x 10 cm were made on 07 July 2002 and 23 June 2003 by removing the bark from stems of four mature poplar trees (*Populus* spp.) using a saw and a chisel. Samples were collected from the lateral wound edge after 2, 4, 8, 10, 17, 62 and 95 weeks of wound response (Fig. 1). The wound tissue, the adjacent modified xylem and unaffected xylem were removed with a chisel and razor blades.

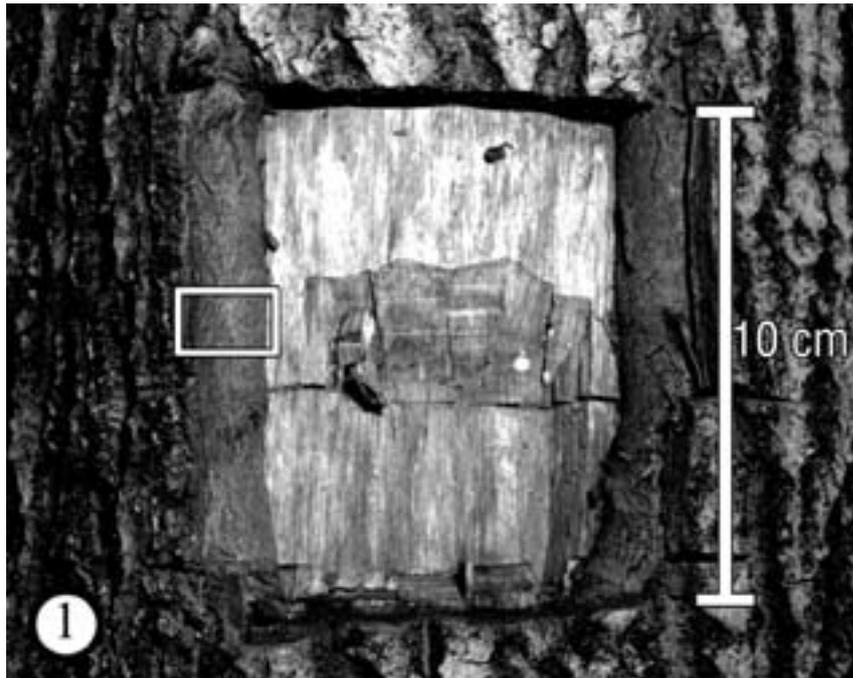


Figure 1 Callus formation at the lateral wound edges 95 weeks after wounding; the rectangle indicates the position of tissue sampling for microscopy and UV-microspectrophotometry (□).

Microscopy

For conventional light-microscopy, samples ($10 \times 10 \times 8 \text{ mm}^3$) were either fixed for three days in a phosphate-buffered solution of 37% formaldehyde, washed in distilled water, and embedded in polyethylene-glycol (PEG) or the fixed samples were dehydrated in a graded series of propanol and embedded in glycol methacrylate (Technovit 7100). $6 \mu\text{m}$ thick transverse sections were cut with a rotary microtome and stained for 1.5h with a standard Giemsa or a neutral red solution. Transverse sections $10 \mu\text{m}$ thick were cut from the PEG embedded material with a sliding microtome and stained with a standard safranin/astra blue solution. Sections stained with neutral red were examined at wavelengths between 380 – 490 nm.

For TEM, samples from the same series were reduced to a final size of $3 \times 3 \times 8 \text{ mm}^3$, fixed for one day in a mixture of 5% glutaraldehyde and 8% paraformaldehyde, then partly postfixed with a 1% Osmium tetroxide solution, washed in 0.1 M cacodylate

buffer (pH 7.3), dehydrated in a graded series of acetone and embedded in Spurr's epoxy resin (Spurr, 1969).

Ultra-thin (80-100 nm) transverse sections were either double-stained with uranyl acetate and lead citrate or with potassium permanganate according to Donaldson (1992). The samples were examined with a Philips CM 12 TEM at an accelerating voltage of 60 or 80 kV.

UV-microspectrophotometry

For UV-microspectrophotometry, the samples were processed as described for TEM. 1 μm transverse sections were prepared, mounted onto quartz slides, immersed in a drop of non-UV absorbing glycerine and covered with a quartz cover slip. Ultrafluar objectives lenses were used to observe the samples.

Scanning UV-microspectrophotometry was carried out using a ZEISS UMSP 80 microspectrophotometer equipped with an Osram high-pressure xenon lamp, an ultrafluar quartz condenser and a scanning stage enabling the determination of image profiles at a constant wavelength of 280 nm using the scan programme APAMOS (Automatic-Photometric-Analysis of Microscopic Objects by Scanning, Zeiss). This wavelength represents the typical absorbance maximum of lignified cell walls. The scan programme digitises rectangular tissue portions with a local geometrical resolution of 0.25 μm^2 and a photometrical resolution of 4096 grey scale levels, converted into 14 basic colours representing the measured absorbance intensities (Koch and Kleist, 2001).

Specimens were additionally analysed by point measurements with a spot size of 1 μm^2 . The spectra were taken at wavelengths from 240 to 400 nm in 2 nm steps using the programme LAMWIN (Zeiss). These point measurements for a semi quantitative determination of the lignin content were automatically repeated 50 times at each spot for individual wall layers, i. e., compound middle lamella (cml), S2 layers of the secondary wall (S2) and cell corners (cc).

4 Results & Discussion

Microscopy

Light microscopy revealed that wounding induced the formation of modified xylem along a transition zone between xylem laid down prior to wounding and tissue laid down after wounding (Fig. 2). The number of fibres showing cell wall alterations decreased with increasing distance from the wound edge. Within this zone which was identified as xylem differentiating at the time of wounding, the formation of unusually thick-walled fibres was the most prominent structural feature (Figs. 3, 4). Septated fibres were regularly found in the transition zone (Fig. 5). Neighbouring cells of similar shape and

therefore probably also septated fibres were in some cases filled with calcium-oxalate crystals. Corresponding to our observations, the formation of a tangential band of thick-walled, flattened fibres between newly formed and regular xylem induced by insertion of a pin, was reported for beech wood (Schmitt et al.,2000). Lowerts et al. (1986) reported the formation of sclereids within wound-associated xylem of *Liriodendron tulipifera* L. as a regular feature. Electron microscopy showed that the affected poplar fibres, in contrast to unaffected fibres (Figs. 6, 7), deposited additional secondary wall (S2) material leading to different patterns of wall thickenings with cell corners predominantly consisting of heavily-stained material (Figs. 8-11). One group of xylem fibres developed an additional secondary wall layer, whereas a second group of fibres showed a continuously thickened S2 wall layer (Figs. 8, 9). In a third, smaller group, fibre walls developed a sclereid-like sublayering (Fig. 10). It seems that the stage of differentiation at the time of wounding had the strongest influence on the response of the different cell types. These structural alterations in the transition zone of poplar probably contribute to an increased resistance.

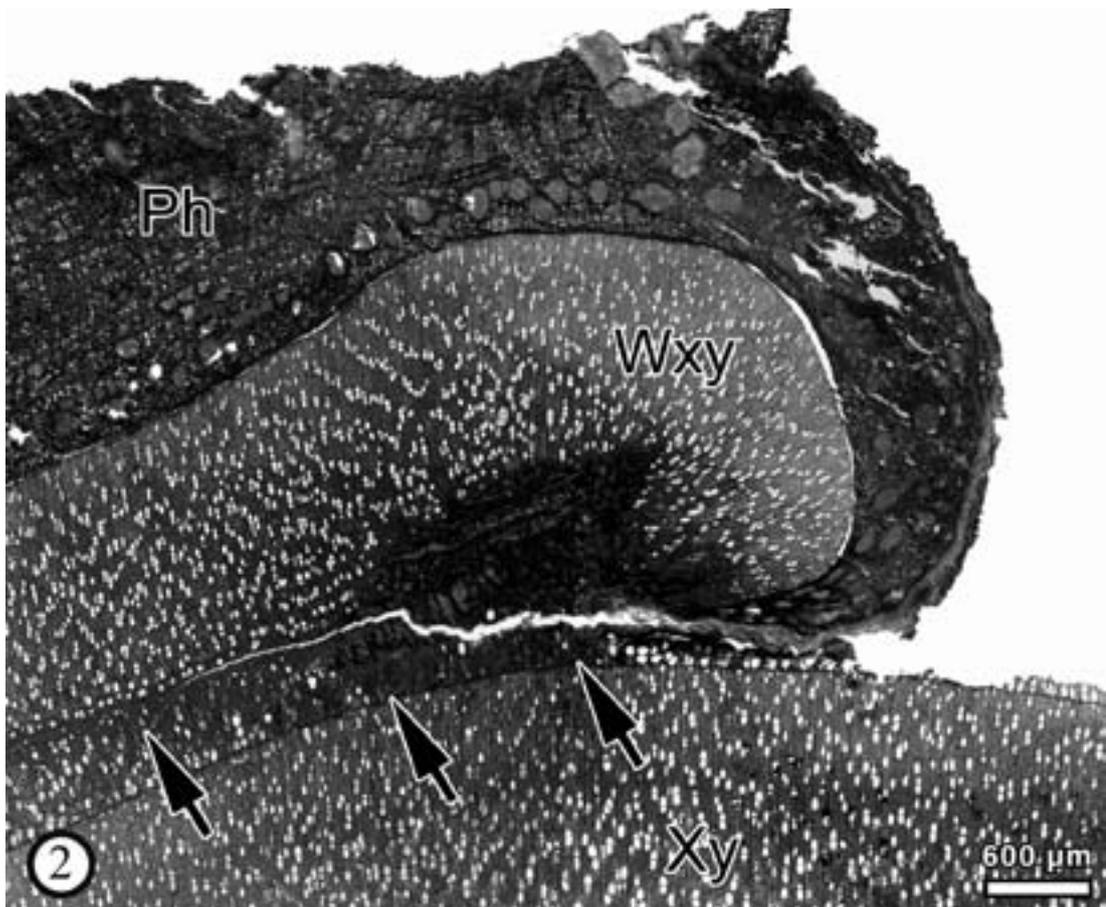
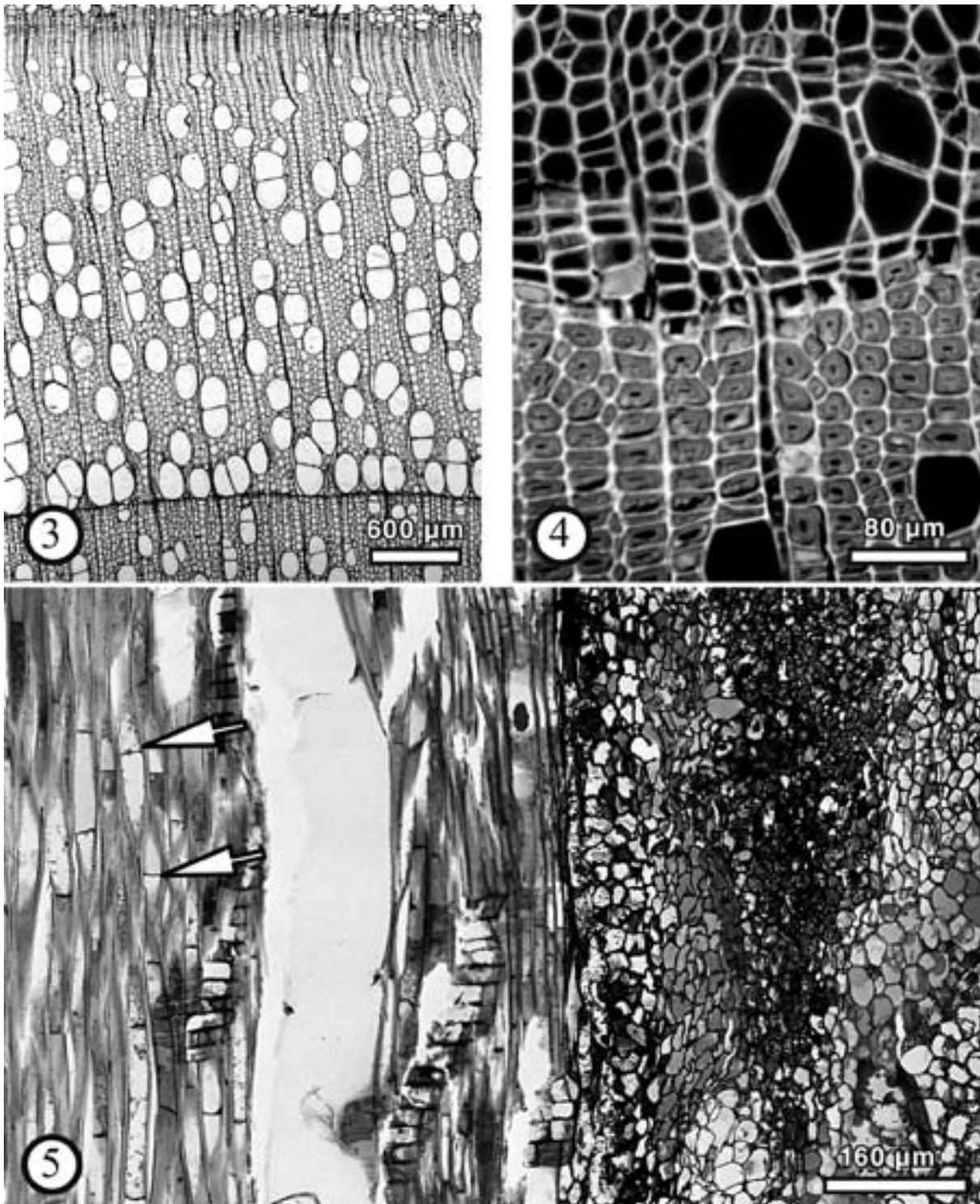
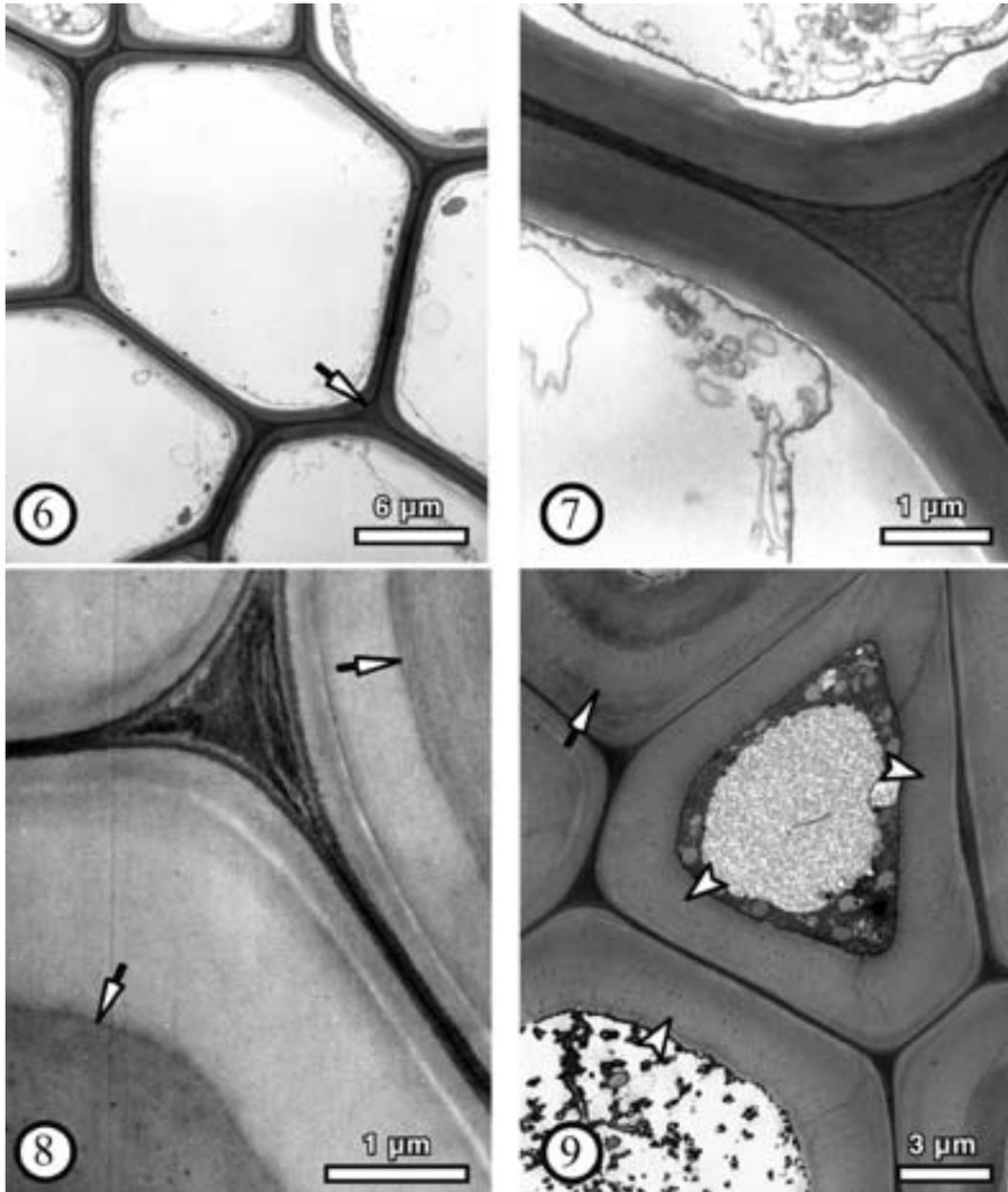


Figure 2 Transverse section through a wound callus and the modified transition zone between xylem laid down prior to and after wounding containing fibres with wound-induced wall thickenings (arrows), xylem (Xy), wound xylem (Wxy), phloem (Ph); light micrograph, safranin/astra blue staining.



Figures 3-5 Light micrographs of unaffected and affected poplar tissues: 3) Transverse section through unaffected reference material of poplar showing thin-walled fibres; light micrograph, Giemsa staining; 4) Transverse section through modified xylem fibres with very thick secondary walls 8 weeks after wounding; the brighter areas indicating a higher lignin content; light micrograph, UV excitation after neutral red staining; 5) Radial section through a transition zone area with less distinct wall thickenings 8 weeks after wounding; septate fibres (arrows) are developed; light micrograph, Giemsa staining.



Figures 6-9 TEM micrographs of transverse sections through unmodified (6, 7) and modified (8, 9) poplar xylem: 6) typical thin-walled fibres, cell corners contain less electron dense material (arrow) when compared to wound-affected fibres; uranyl acetate and lead citrate staining; 7) cell corner of Fig. 6 (indicated there by an arrow) with a relatively low lignin content and a mottled lignin distribution; uranyl acetate and lead citrate staining; 8) modified xylem fibres with thick walls, containing only one additional secondary wall lamella (arrows), 10 weeks after wounding; potassium permanganate staining; 9) modified fibres of the transition zone with continuous secondary cell wall thickenings (without lamellation; arrowheads); fibre with more than one additional S2 lamella (arrow); cell corners contain heavily-stained material; duration of wound response four weeks; potassium permanganate staining.

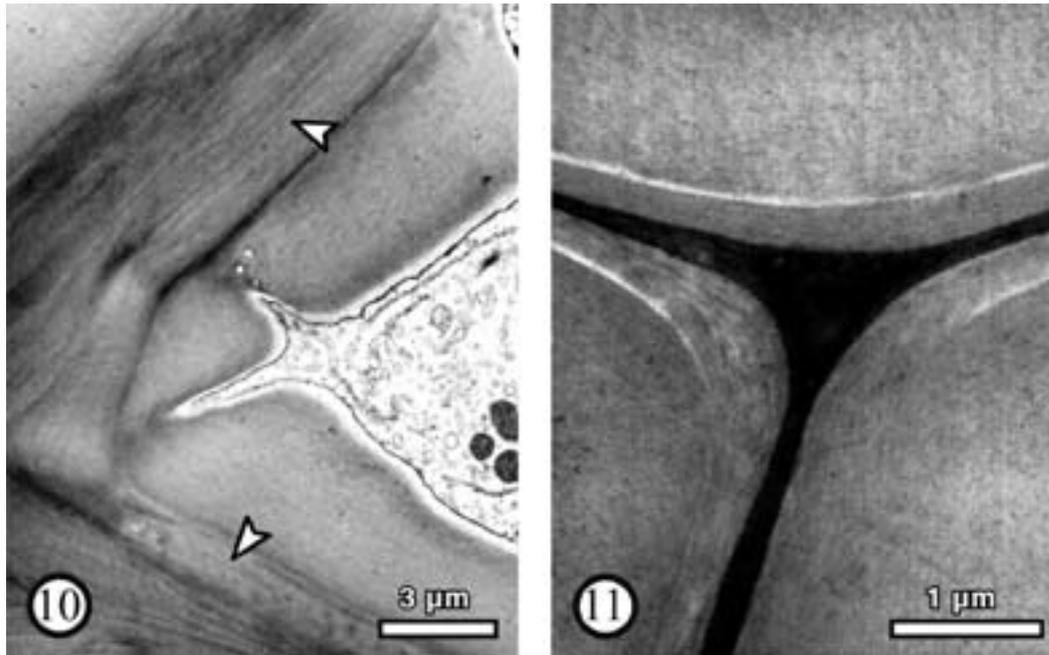


Figure 10, 11 TEM micrographs of transverse sections through modified xylem fibres: 10) wound-induced fibre with polylamellate secondary wall structure (arrowheads); duration of wound response 10 weeks; uranyl acetate and lead citrate staining; 11) cell corner of modified xylem fibres containing material with extremely high electron density; 10 weeks after wounding; potassium permanganate staining.

UV microspectrophotometry

UV microspectrophotometry has variously been proven as a reliable technique for the visualisation of lignin distribution and for its semiquantitative determination (e.g. Bland and Hillis, 1969; Scott et al., 1969; Fergus and Goring, 1970 a, b; Musha and Goring, 1975; Bauch et al., 1976; Bucciarelli et al., 1999; Fukazawa, 1992; Okuyama et al., 1998; Grünwald et al., 2001, 2002 a, b; Koch and Kleist, 2001; Takabe, 2002; Koch and Grünwald, 2004). For detailed information on the microdistribution of lignin within different wall layers, the tissues were first analysed by scanning UV-microspectrophotometry at a constant wavelength of 280 nm (Figs. 12-15).

The image profiles of unaffected fibres are characterised by thin S2 wall layers with relatively low and uniform absorbance values (Abs_{280nm} 0.09 to Abs_{280nm} 0.16). Higher absorbencies were recorded in the compound middle lamella (Abs_{280nm} 0.16 to Abs_{280nm} 0.23) and in cell corners (Abs_{280nm} 0.23 to Abs_{280nm} 0.35) (Fig. 12). In terminal latewood fibres, the absorbance values increased slightly with maxima up to Abs_{280nm} 0.23 in the broader S2-layer, Abs_{280nm} 0.35 in the compound middle lamella and maxima of Abs_{280nm} 0.67 in cell corner regions. The uniform absorbance level within the S2-layer corresponds with earlier findings, describing a homogeneous lignin distribution across of the entire S2-layer (Saka and Goring, 1988; Koch and Kleist, 2001).

In Figures 13-15, the lignin distribution in walls of modified xylem cells within the transition zone is displayed. The secondary wall of the scanned modified fibres was much thicker in later stages of wound response (Figs. 13, 15). In some cases, the narrow remaining lumen was filled with accessory phenolic compounds (Fig. 13). The inhomogeneous and increased absorbance values within the thickened S2 layer of fibres varied between Abs_{280nm} 0.09 and Abs_{280nm} 0.42 (Figs. 13-15). Even though the two-dimensional images confirm this heterogeneity, the three-dimensional image profiles clearly display an almost concentric sub-layering, the lowest values always occurring in lumen-adjacent wall regions (Figs. 13-15). The absorbance values of the compound middle lamella ranged from Abs_{280nm} 0.55 to Abs_{280nm} 0.81 and in cell corners from Abs_{280nm} 0.81 up to Abs_{280nm} over 0.94 (Figs. 13-15). The absorbance values of vessel walls also indicated a heterogeneous lignin distribution with unusual high values especially in the compound middle lamella (Abs_{280nm} 0.29 to Abs_{280nm} 0.62) (Fig. 14). The S2-layer of vessels showed absorbance maxima of Abs_{280nm} 0.42 and for the cell corners values from Abs_{280nm} 0.55 to Abs_{280nm} 0.94 were detected (Fig. 14). While Singh and Schmitt (2000) documented a mostly mottled lignin distribution in intercorner and cell, corner middle, lamella regions in *Hevea brasiliensis*, our study revealed a more dispersed lignin distribution.

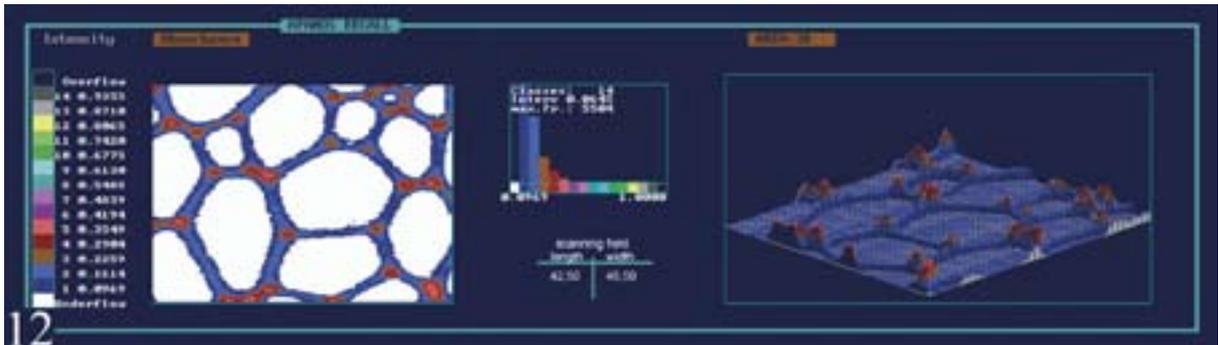


Figure 12 UV micrograph and 3D UV-microscopic scanning profile of unaffected xylem. The coloured pixels represent different UV-absorbance values within the fibre wall layers at 280 nm wavelength.

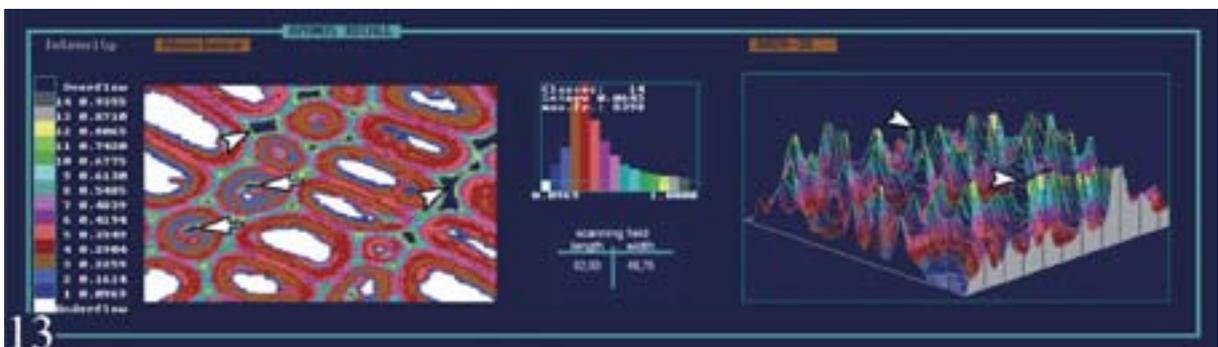


Figure 13 UV micrograph and 3D image profile of modified xylem with radially flattened fibres showing distinct wall thickenings; some fibres are filled with accessory phenolic compounds (arrows) and extremely high lignin concentrations in cell corner regions (arrowheads); 95 weeks after wounding.

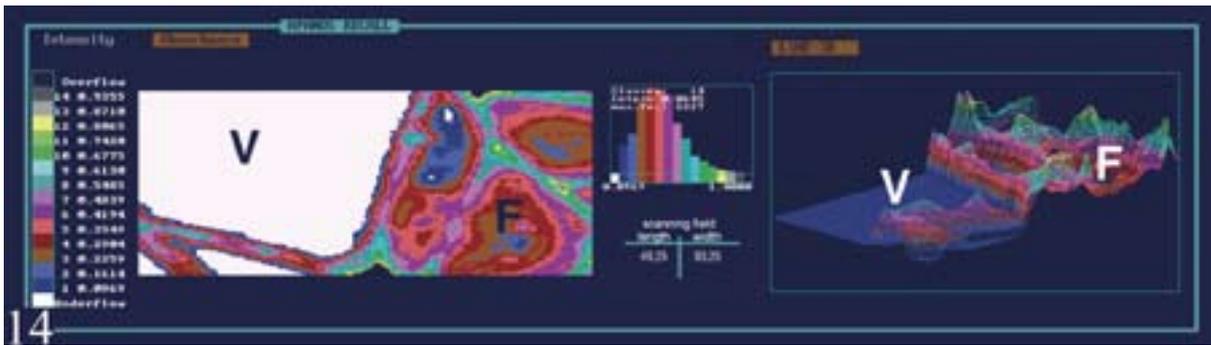


Figure 14 UV micrograph and 3D image profile of a vessel element (V) and adjacent fibres (F) within the transition zone 62 weeks after wounding. Fibres showing strong secondary wall thickenings; vessel walls displaying high lignin concentration.

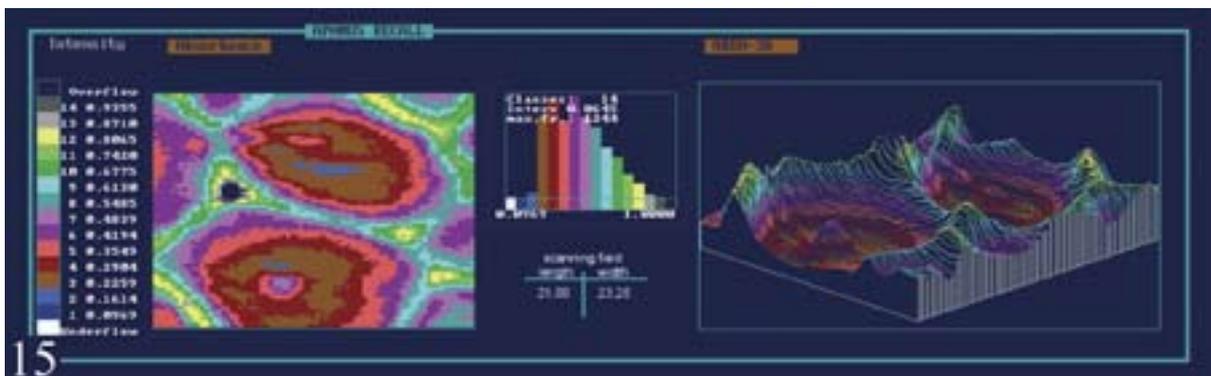


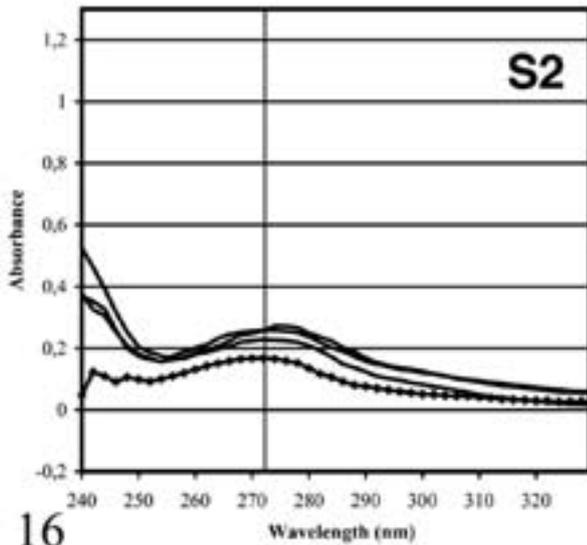
Figure 15 UV micrograph and 3D image profile of fibres showing extreme secondary wall thickenings; 62 weeks after wounding.

In hardwood fibres, the secondary wall is mainly composed of guaiacyl- and syringyl compounds resulting in a minimum absorbance at wavelengths from 250 to 260 nm and a maximum varying between 270-280 nm. The syringyl/guaiacyl ratio and the condensation of methoxyl groups determines the position of the absorbance maximum and also the absorbance intensity. With a higher guaiacyl lignin content and decreasing MeO/C9 groups, the absorbance maximum shifts closer to 280 nm and the absorbance intensity increases (Fergus and Goring, 1970 a, b; Terashima et al., 1986 a, b; Fukazawa, 1992; Koch and Kleist, 2001; Takabe, 2002). In addition to syringyl and guaiacyl moieties, the xylem of *Populus* spp. contains p-hydroxy benzoic acid residues with a maximum absorbance at 260 nm wavelength (Musha and Goring, 1975). The semiquantitative interpretations of differences in the absorbance maxima between wounded and unaffected cells are therefore restricted and have to be related to the lignin composition as represented through the varying wavelengths of the maxima and in addition the ratio of the UV absorbance at 280 nm to that at 260 nm (A_{280}/A_{260}). If p-hydroxy benzoic acid residues are associated with guaiacyl residues, the peak at 280 nm should flatten and if they are associated with syringyl residues the peak may shift to a lower wavelength or even disappear, as shown for eastern cottonwood (Musha and Goring, 1975).

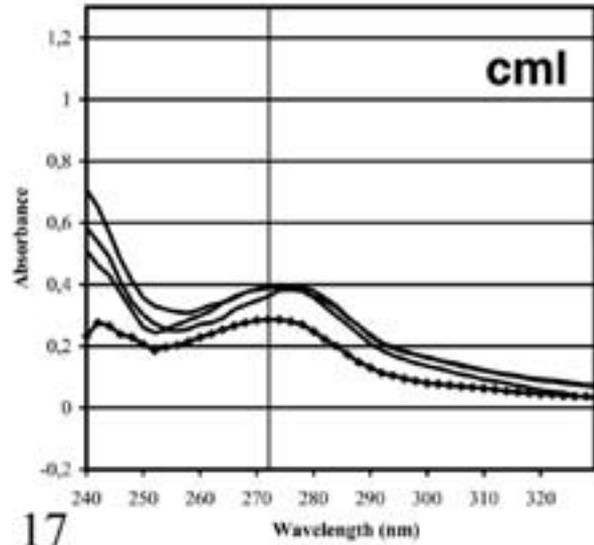
An influence of the detected condensed accessory phenolic extractives in fibres and ray parenchyma cells can be neglected. They showed much higher absorbance values (Abs_{280nm} 1,38) when compared to lignin and their absorbance maxima displayed a bathochromic shift to a wavelength of 284 nm to 286 nm and a slower decrease of the absorbance when compared to lignin.

The UV-absorbance behaviour of previously scanned tissue areas were characterized by point measurements with a spot size of $1\mu m$ and a wavelength between 240 to 400 nm. In Figures 16-18, representative spectra of unaffected and modified fibre wall layers are shown. The spectra obtained for S2-layers of unaffected early- and latewood fibres displayed a less distinct relatively low peak absorbance at 270 to 272 nm (Fig. 16), corresponding with earlier studies (Fergus and Goring, 1970 a, b; Musha and Goring, 1975; Fukazawa, 1992). Even though the A_{280}/A_{260} ratio (1.02) was slightly higher than revealed for other poplar species (Musha and Goring, 1975), it indicates a low content of predominantly syringyl-type lignin associated with p-hydroxy benzoic acid residues. The peak absorbance at 278 nm measured in cell corner regions and a ratio of 1.29 verifier the highest lignin concentration of mainly guaiacyl lignin within the unaffected xylem (Fig. 18). Our measurement within the S2 and cell corner regions are in good agreement with general lignification concepts (e.g. Fergus and Goring, 1970 a, b; Musha and Goring, 1975; Terashima et al., 1986 a, b, 1993; Donaldson, 2001; Donaldson et al., 2001; Grünwald et al., 2002 a; Koch and Kleist, 2001; Takabe, 2002). The spectra taken in middle lamella regions (Fig. 17) with an almost unchanged peak absorbance at 272 nm and the slightly higher A_{280}/A_{260} ratio (1.09) indicates only a faintly enhanced lignin content and a nearly identical lignin composition when compared with the S2. A shift of the peak absorbance in middle lamella regions of poplar towards 272 nm at the end of cell differentiation, due to an increased incorporation of syringyl residues, was shown by Grünwald et al. (2002 a). However, a higher relative abundance of guaiacyl lignin moieties in hardwood middle lamellae has been frequently was regularly described (e.g. Fergus and Goring, 1970 b; Musha and Goring, 1975; Terashima, 1986 a, b, 1993).

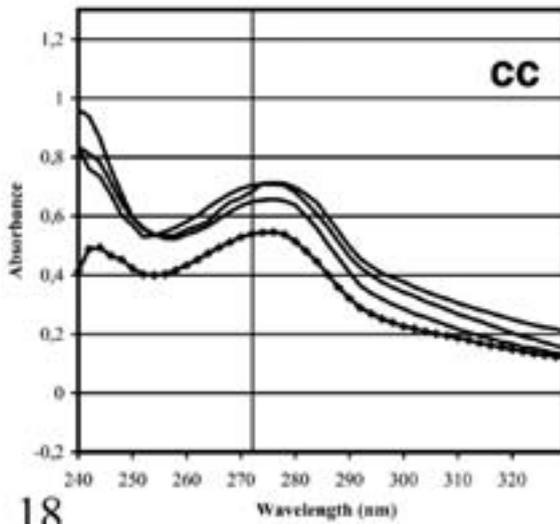
Within the distinctively thickened secondary wall of transition zone fibres, the absorbance maxima varied between 272 and 274 nm (Fig. 16). Simultaneously, the A_{280}/A_{260} ratio increased up to mean values of 1.22, verifying a reduced amount of associated p-hydroxy benzoic acid subunits and a distinct incorporation mostly of guaiacyl moieties. The mean A_{280}/A_{260} ratio in middle lamella regions of modified fibres increased (A_{280}/A_{260} 1.25) and the peak absorbance shifted towards higher wavelengths (274 to 276 nm) (Fig. 17) reflecting the same effect as already described for the S2. The spectra taken in cell corner regions displayed absorbance maxima between wavelengths of 276 to 280 nm (Fig. 18), and the A_{280}/A_{260} ratio (1.28) was not significantly different from cell corners of fibres from unaffected fibre walls. These measurements point to a higher amount of lignin, whereas its composition remains almost the same.



16



17



18

Figures 16-18 Representative UV absorbance spectra of fibre wall layers of controls (-■-) and after different periods of wound response. Vertical line indicates a wavelength of 272 nm.

It can be concluded that wounding induces a distinctive wall thickening in xylem fibres differentiating at the time of wounding and a modified lignin topochemistry, mainly restricted to secondary wall and compound middle lamella regions. This wound response adds a further mechanism to the well known compartmentalization processes and contributes to an increased resistance.

5 Acknowledgements

We thank Ms. T. Potsch and Ms. C. Waitkus for supporting the work. The work was partly funded by the "Deutsche Forschungsgemeinschaft/DFG" (GR 1788/2-1).

6 References

- Bauch, J.; Seehann, G.; Fitzner, H. 1976. Microspectrophotometrical investigations on lignin of decayed wood. *Material und Organismen, Beiheft 3*: 141-152.
- Bauch, J.; Shigo, A.L.; Starck, M. 1980. Wound effects in the xylem of acer and betula species. *Holzforschung* 34: 153-160.
- Bland, D.E.; Hillis, W.E. 1969. Microspectrophotometric investigations of lignin and polyphenol distribution in wood sections. *Appita* 23: 204-210.
- Brown, C.L.; Sax, K. 1962. The influence of pressure on the differentiation of secondary tissues. *American Journal of Botany* 49: 683-691.
- Bucciarelli, B.; Ostry, M.E.; Fulcher, R.G.; Anderson, N.A.; Vance, C.P. 1999. Histochemical and microspectrophotometric analyses of early wound responses of resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (*Hypoxylon mammatum*). *Canadian Journal of Botany* 77: 548-555.
- Buntrock, M. 1989. Anatomische Untersuchungen über die Wundreaktion der Pappel. Diploma Thesis, University of Hamburg, Germany.
- Donaldson, L.A. 1992. Lignin distribution during late wood formation in *Pinus radiata* D. Don. *IAWA Journal* 13: 381 – 387.
- Donaldson, L.A. 2001. Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57: 859-873.
- Donaldson, L.A.; Hague, J.; Snell, R. 2001. Lignin distribution in coppice poplar, linseed and wheat straw. *Holzforschung* 55: 379-385.
- Fergus, B.J.; Goring, D.A.I. 1970 a. The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. *Holzforschung* 24: 113-117.
- Fergus, B.J.; Goring, D.A.I. 1970 b. The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy. *Holzforschung* 24: 118-124.
- Fink, S. 1999. Pathological and regenerative plant anatomy. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- Frankenstein, C.; Schmitt, U.; Waitkus, W.; Eckstein, D. 2005. Wound callus formation – a microscopic study on poplar (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 79: 44 – 51.
- Fukazawa, K. 1992. Ultraviolet microscopy. In: Lin, S.Y.; Dence C.W., eds. *Methods in lignin chemistry*. Springer Verlag, Berlin: 110-121.
- Grünwald, C.; Ruel, K.; Joselau, J.P.; Fladung, M. 2001. Morphology, wood structure and cell wall composition of rolC transgenic and non-transformed aspen trees. *Trees* 15: 503-517.

- Grünwald, C.; Stobbe, H.; Schmitt, U. 2002. Entwicklungsstufen der seitlichen Wundüberwallung von Laubgehölzen. *Forstwissenschaftliches Zentralblatt* 121: 50-58.
- Grünwald, C.; Ruel, K.; Kim, Y.S.; Schmitt, U. 2002 a. On the cytochemistry of cell wall formation in poplar trees. *Plant Biology* 4: 13-21.
- Grünwald, C.; Ruel, K.; Schmitt, U. 2002 b. Differentiation of xylem cells in rolC transgenic aspen trees – a study of secondary cell wall development. *Annals of Forest Science* 59: 679-685.
- Kaufert, F. 1937. Factors influencing the formation of periderm in Aspen. *American Journal of Botany* 24: 24-30.
- Koch, G.; Kleist, G. 2001. Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. *Holzforschung* 55: 563-567.
- Koch, G.; Grünwald, C. 2004. Application of UV microspectrophotometry for topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. In: Schmitt, U.; Ander, P.; Barnett, J.R.; Emons, A.M.C.; Jeronimidis, G.; Saranpää, P.; Tschegg, S., eds. *Wood fibre cell walls: Methods to study their formation, structure and properties*. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala: 119-130.
- Liese, W.; Dujesiefken, D. 1989. Wundreaktionen bei Bäumen. *Tharandt: Tagungsbericht, 2. Symposium, Ausgewählte Probleme der Gehölzphysiologie – Gehölze, Mikroorganismen und Umwelt*: 75-80.
- Liese, W.; Dujesiefken, D. 1996. Wound reactions of trees. In: Raychaudhuri, S.P.; Maramorosch, K., eds. *Forest trees and palms: Diseases and control*. IBH publishing, Oxford, New Delhi, Calcutta: 21-35.
- Lowerts, G.; Wheeler, E.A.; Kellison, R.C. 1986. Characteristics of wound-associated wood of Yellow-Poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). *Wood and Fiber Science* 18: 537-552.
- Mullick, D.B. 1977. The non-specific nature of defence in bark and wood during wounding, insect and pathogen attack. *Recent Advances in Phytochemistry* 11: 395-441.
- Musha, Y.; Goring, D.A.I. 1975. Distribution of syringyl and guaiacyl moieties in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. *Wood Science and Technology* 9: 45-58.
- Okuyama, T.; Takeda, H.; Yamamoto, H.; Yoshida, M. 1998. Relation between growth stress and lignin concentration in the cell wall: ultraviolet microscopic spectral analysis. *Journal of Wood Science* 44: 83-89.
- Pearce, R.B. 2000. Decay development and its restriction in trees. *Journal of Arboriculture* 26: 1-11.
- Rademacher, P.; Bauch, J.; Shigo, A.L. 1984. Characteristics of xylem formed after wounding in *Acer*, *Betula* and *Fagus*. *IAWA Bulletin* 5: 141-151.

- Saka, S.; Goring, D.A.I. 1988. Localization of lignins in wood cell walls. In: Higuchi, T., ed. *Biosynthesis and Biodegradation of wood components*. Academic Press, New York: 51-62.
- Schmitt, U.; Liese, W. 1990. Wound reaction of the parenchyma in *Betula*. *IAWA Bulletin* 11: 413-420.
- Schmitt, U.; Liese, W. 1992. Seasonal influences on early wound reactions in *Betula* and *Tilia*. *Wood Science and Technology* 26: 405-412.
- Schmitt, U.; Liese, W. 1993. Response of xylem parenchyma by suberization in some hardwoods after mechanical injury. *Trees* 8: 23-30.
- Schmitt, U.; Möller, R.; Eckstein, D. 2000. Seasonal wood formation dynamics of Beech (*Fagus sylvatica* L.) and Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) as determined by the "Pinning" technique. *Journal of Applied Botany* 74: 10-16.
- Scott, J.A.N.; Procter, A.R.; Fergus, B.J.; Goring, D.A.I. 1969. The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood. Description and validity of the technique. *Wood Science and Technology* 3: 73-92.
- Sharon, E.M. 1973. Some histological features of *Acer saccharum* wood formed after wounding. *Canadian Journal of Forest Research* 3: 83-89.
- Shigo, A.L. 1984. Compartmentalization: A conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annual Review of Phytopathology* 22: 189-214.
- Shigo, A.L.; Marx, H.G. 1977. Compartmentalization of decay in trees. *USDA/ Forest Service and Agriculture Information Bulletin* 405: 1-73.
- Shortle, W.C. 1979. Compartmentalization of decay in red maple and hybrid poplar trees. *Phytopathology* 69: 410-413.
- Singh, A.P.; Schmitt, U. 2000. High variability in the distribution of lignin in the middle lamella of Rubber-wood (*Hevea brasiliensis*) cells. In: Kim, Y.S., ed. *New horizons in wood anatomy*. Chonnam Nat'l University Press, Kwangju: 203-207.
- Soe, K. 1959. Anatomical studies of bark regeneration following scoring. *Journal of the Arnold Arboretum* 40: 260-267.
- Spurr, A.R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research* 26: 31-43.
- Takabe, K. 2002. Cell walls of woody plants: Autoradiography and ultraviolet microscopy. In: Chaffey, N., ed. *Wood formation in trees*. Taylor & Francis, London: 159-177.
- Terashima, N.; Fukushima, K.; Takabe, K. 1986 a. Heterogeneity in formation of lignin. VIII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in *Magnolia kobus* DC. *Holzforschung* 40: 101-105.
- Terashima, N.; Fukushima, K.; Tsuchiya, S.; Takabe, K. 1986 b. Heterogeneity in formation of lignin. VII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in poplar. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 6: 495-504.

Terashima, N.; Fukushima, K.; Takabe, K. 1993. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: Jung, H.G.; Buxton, D.R.; Hatfield, R.D.; Ralph, J., eds. Forage cell wall structure and digestibility. ASA-CSSA-SSSA, WI, Madison: 247-270.

Trockenbrodt, M.; Liese, W. 1991. Untersuchungen zur Wundreaktion in der Rinde von *Populus tremula* L. und *Platanus x acerifolia* (Ait.) Willd.. *Angewandte Botanik* 65: 279-287.

***Wound effects in the xylem of poplar: a UV-
microspectrophotometric study***

Claus Frankenstein, Uwe Schmitt*

Federal Research Centre for Forestry and Forest Products/Institute for Wood Biology
and Wood Protection, Leuschnerstrasse 91, D-21031 Hamburg/Germany

Dedicated to Prof. Dr. Josef Bauch on the occasion of his 70th birthday.

Running title: wound effects in the xylem of poplar

Holzforschung, eingereicht

Abstract

The present study provides information on cell wall modifications in vessels and fibres of wound wood of *Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx formed after mechanical wounding. Special emphasis was given on the lignin distribution. Wound xylem within lateral wound calli was collected after response periods of up to twenty-three months. General observations about the different stages of wound-xylem development were carried out with light and transmission electron microscopy. Scanning- and point measurements with UV-microspectrophotometry were used to determine the lignin distribution. For vessels and fibres deviations from their usual axial orientation were observed as well as dimensional changes. Vessels within the wound xylem were smaller in diameter and shorter in length, xylem fibres were shorter and developed thicker walls, especially in tissue portions adjacent to the wound. Cell walls and cell corner regions of these fibres showed on average a higher lignin content and a modified lignin composition. These wall modifications within the wound xylem are believed to enhance disease resistance. With increasing distance from the wound edge, the modifications are decreasing and finally disappear.

Keywords: lignin distribution; poplar; *Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.; UV-microspectrophotometry; wound callus; wound xylem

Introduction

Hybrid aspen and other poplar species are of major commercial importance, especially with regard to plywood and pulp production, and have become model tree species for molecular, physiological and ecological research (Brinkmann, 2002; Sundberg et al., 2000; Arend and Fromm, 2004; Déjardin et al., 2004; Junghans et al., 2004). Among other tree species, also poplar was used to obtain information on the mechanisms involved in wound responses of tissue present at the time of wounding; in general, those wound reactions are subdivided into active and passive mechanisms as revealed by numerous macroscopic and microscopic investigations (e.g. Sharon, 1973; Mullick, 1977; Shortle, 1979; Shigo, 1984; Schmitt and Liese, 1993; Liese and Dujesiefken, 1996; Pearce, 2000). Within differentiated xylem, active reaction patterns are aiming at the compartmentalization along wound edges, whilst the formation of callus tissue and subsequently formed new modified xylem and phloem becomes induced (e.g. Sharon, 1973; Shigo, 1984; Bauch et al., 1980; Rademacher, 1984; Lowerts et al., 1986; Liese and Dujesiefken, 1996; Fink, 1999; Grünwald et al., 2002, Frankenstein et al., 2005).

In poplar, investigations on wound reactions were mainly focused on the bark, such as the formation of the ligno-suberized zone, new periderms and the influence of pressure on tissue differentiation (Kaufert, 1937; Soe, 1959; Brown and Sax, 1962; Trockenbrodt and Liese, 1991). Another emphasis has been on the investigation of host/pathogen interactions after bark wounding (Bloomberg and Farris, 1963; Bucciarelli et al., 1999) and insect wounds as infection sites (Anderson et al., 1979). Shortle (1979) found for *Populus deltoides* x *trichocarpa* that the concentration of soluble dry matter and phenols was greater in the marginal zones between discoloured wood and sapwood. The formation of a wound callus and the wound-

induced alterations within the xylem of poplar have been described on a light microscopic level only (Shigo et al., 1977; Eckstein et al., 1979; Buntrock, 1989; Frankenstein et al., 2005). However, less attention was paid on cellular aspects during the formation of callus tissue and during the subsequent formation of modified xylem.

Therefore the objective of the present study was to provide detailed information on the wound-associated modification of newly formed xylem elements at the edge of wounds with special regard to the lignin distribution. By means of transmission electron microscopy and cellular UV-microspectrophotometry, modified xylem cells were compared with cells of unaffected xylem portions.

Material and Methods

Rectangular wounds of 10 x 10 cm² were set on 07 July 2002 by removing the bark from stems of four mature poplar trees (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.) using a saw and a chisel.

Samples were collected from the lateral wound edge after 10, 37, 62 and 95 weeks of wound response (Fig. 1 a). The wound tissue and the adjacent modified xylem were removed with a chisel and razor blades. Within the wound callus samples taken after 62 and 95 weeks of wound response, two wound xylem areas were selected and divided into samples either containing xylem formed until the end of the following vegetation period (2003) and xylem formed afterwards (Fig. 1 b).

Microscopy

For light microscopy, samples were cut into 10 x 10 x 8 mm³ pieces, fixed for three days in a phosphate-buffered solution of 3.7% formaldehyde, washed in distilled

water, and embedded in polyethylene-glycol (PEG 2000). Transverse sections of 10 µm thickness were cut with a sliding microtome, stained with a standard safranine/astra blue solution and mounted onto glass slides.

For transmission electron microscopy, the samples were reduced to a final size of 3 x 3 x 8 mm³, fixed for one day in a mixture of 5% glutaraldehyde and 8% paraformaldehyde, then partly postfixed with a 1% osmium tetroxide solution, washed in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3), dehydrated in a graded series of acetone and embedded in Spurr's epoxy resin (Spurr, 1969).

Ultrathin (80-100 nm) transverse sections were either double-stained with uranyl acetate and lead citrate or with potassium permanganate according to Donaldson (1992). The samples were examined with a Philips CM 12 TEM at an accelerating voltage of 60 or 80 kV.

UV-microspectrophotometry

For UV-microspectrophotometry, the samples were processed as described for TEM. 1µm semithin transverse sections were prepared with a diamond knife, mounted onto quartz slides, immersed in a drop of non-UV absorbing glycerine and covered with a quartz cover slip.

Scanning UV-microspectrophotometry was carried out using a ZEISS UMSP 80 microspectrophotometer equipped with an Osram high-pressure xenon lamp, an ultrafluar quartz condenser and a scanning stage enabling the determination of image profiles at a constant wavelength of 280 nm using the scan programme APAMOS (Automatic-Photometric-Analysis of Microscopic Objects by Scanning, Zeiss). This wavelength represents the typical absorbance maximum of lignified cell walls. The scan programme digitises rectangular tissue portions with a local

geometrical resolution of $0.25 \times 0.25 \mu\text{m}^2$ and a photometrical resolution of 4096 grey scale levels, converted into 14 basic colours representing the measured absorbance intensities (Koch and Kleist, 2001).

Specimens were additionally analysed by point measurements with a spot size of $1 \mu\text{m}^2$. The spectra were taken at wavelengths from 240 to 400 nm in 2 nm steps using the programme LAMWIN (Zeiss). These point measurements for a semi-quantitative determination of the lignin content were automatically repeated 50 times at each spot for individual wall layers.

Results & Discussion

Light microscopy of xylem formed after wounding revealed that axial cells were disoriented (Fig. 2). Vessels were smaller in diameter and shorter in length than those of unaffected xylem and often had a wavy and irregular orientation. Modified fibres within the wound xylem were shorter and occurred preferably in portions adjacent to the wound. They also had slightly thicker walls when compared to unaffected fibres, which corresponds to observations by Sharon (1973) for wood of *Acer saccharum*. In contrast, Bauch et al. (1980) described a reduced wall thickness of fibres within the barrier zone and the wound xylem of *Acer rubrum* and *Betula papyrifera*. In wound xylem of poplar, fibres additionally showed the same strong deviation from the axial orientation like vessels (Fig. 2). With increasing distance from the wound edge, these structural alterations were less pronounced. The observations made for *Populus tremula x tremuloides* correspond with earlier studies on other poplar species (Buntrock, 1989) and other tree species, such as maple, birch and beech (e.g. Brown and Sax, 1962; Mulhern et al., 1979; Rademacher, 1984; Lowerts et al., 1986; Liese and Dujesiefken, 1996; Novitskaya, 1998; Fink, 1999). Electron

microscopy showed that, in contrast to unaffected fibres present at the time of wounding, the first wound xylem fibres (Fig. 3, 4) deposited additional secondary wall material. A few cell rows distant to these cells, no significant wall thickening could be detected any more. Cell corners within the xylem laid down after wounding within the years 2002 and 2003, predominantly consisted of material with a for poplar unusually high electron density (Figs. 3, 4). The electron density again decreased with increasing distance from the tissue present at the time of wounding. Within the xylem laid down in 2004, the electron density of cell walls appeared normalised. Besides vessels and fibres, ray parenchyma cells within the wound xylem were often filled with dark contents.

To visualise the lignin distribution in modified cells and for a semi-quantitative lignin determination, these cells were analysed by UV-microspectrophotometry, which has variously been proven as a reliable technique (e.g. Scott et al., 1969; Fergus and Goring, 1970 a, b; Musha and Goring, 1975; Bucciarelli et al., 1999; Fukazawa, 1992; Grünwald et al., 2001, 2002 a, b; Koch and Kleist, 2001; Takabe, 2002; Koch and Grünwald, 2004). For detailed information on the microdistribution of lignin within different wall layers, the tissues were first analysed by scanning UV-microspectrophotometry at a constant wavelength of 280 nm and additionally by point measurements with a spot size of 1µm at wavelengths between 240 to 400 nm (Figs. 5-12).

The secondary wall of hardwood fibres is mainly composed of guaiacyl- and syringyl compounds resulting in a minimum absorbance at wavelengths from 250 to 260 nm and a maximum varying between 270 and 280 nm. The position of the absorbance maximum and also the absorbance intensity is determined by the syringyl/guaiacyl ratio and the condensation of methoxyl groups. With a higher guaiacyl lignin content

and decreasing number of MeO/C₉ groups, the absorbance maximum shifts closer to 280 nm and the absorbance intensity increases (Fergus and Goring, 1970 a, b; Terashima et al., 1986; Fukazawa, 1992; Koch and Kleist, 2001; Takabe, 2002). An altered lignin composition may imply an increased lignin content, while the overall lignin concentration remains unchanged. Therefore, semi-quantitative interpretations of differences in the absorbance maxima between affected and unaffected cells are restricted.

The lignin in walls of the xylem of *Populus* spp. generally consists of syringyl and guaiacyl moieties as well as p-hydroxy benzoic acid residues with a maximum absorbance at 260 nm wavelength (Musha and Goring, 1975). If p-hydroxy benzoic acid residues are associated with guaiacyl residues, the peak at 280 nm should flatten and if they are associated with syringyl residues, the peak may shift to a lower wavelength or even disappear as shown for eastern cottonwood (*Populus deltoides*) (Musha and Goring, 1975). Therefore, the ratio between the UV absorbance at 280 nm and 260 nm (A_{280}/A_{260}) gives additional information on the lignin composition.

Figure 5 shows a representative two- and three-dimensional UV image profile of unaffected, mature secondary poplar xylem. Unaffected fibres are characterised by thin S2 wall layers with relatively low and uniform absorbance values around Abs_{280nm} 0.09 up to Abs_{280nm} 0.23 in terminal latewood fibres. Higher absorbencies were recorded in the compound middle lamella of early- and latewood fibres (Abs_{280nm} 0.16 to Abs_{280nm} 0.35) and in cell corners (Abs_{280nm} 0.23 to Abs_{280nm} 0.67). The uniform absorbance level within a single S2-layer corresponds with earlier studies describing a homogeneous lignin distribution across the whole S2-layer (Saka and Goring, 1988; Koch and Kleist, 2001). The spectra obtained for thin S2-layers in unaffected fibres of poplar (Fig. 6) with an absorbance maximum at 270 to 272 nm and a less

distinct peak are also in good agreement with earlier observations (Fergus and Goring, 1970 a, b; Musha and Goring, 1975; Fukazawa, 1992) (Fig. 6). Although the A_{280}/A_{260} ratio (1.02) was slightly higher than for other poplar species (Musha and Goring, 1975), the S2 was characterized by a low content of predominant syringyl-type lignin associated with p-hydroxy benzoic acid residues. Cell corner regions showed the highest lignin concentrations of primarily guaiacyl lignin, verified by the peak absorbance at 278 nm and a A_{280}/A_{260} ratio of 1.29 (Fig. 6). Our results for secondary wall- and cell corner regions of unaffected poplar xylem are in accordance with general cell wall composition concepts of various hardwoods (e.g. Ferguson and Goring, 1970 a, b; Musha and Goring, 1975; Terashima et al., 1986, 1993; Donaldson, 2001; Donaldson et al., 2001; Grünwald et al., 2002 a; Koch and Kleist, 2001; Takabe, 2002). Point measurements of middle lamella regions showed a higher absorbance maximum (Fig. 6), i. e., a higher lignin content, at the same wavelength as the S2, and an only faintly higher A_{280}/A_{260} ratio (1.09) indicating a nearly identical lignin composition. Grünwald et al. (2002 a) reported a shift of the peak absorbance in middle lamella regions of poplar towards 272 nm at the end of cell differentiation, due to an increased incorporation of syringyl and p-hydroxyphenyl subunits. However, more often a higher relative abundance of guaiacyl lignin moieties in hardwood middle lamellae was reported (e.g. Fergus and Goring, 1970 b; Musha and Goring, 1975; Terashima et al., 1986, 1993).

Figures 7-9 display the lignin distribution in cell walls of the wound xylem formed in 2002 and 2003, starting with a representative two- and three-dimensional UV image profile of tissue adjacent to the xylem already present at the time of wounding (Fig. 7). Ray parenchyma cells within these wound tissue areas were often entirely filled with condensed accessory phenolic extractives. An influence of these substances on the semi-quantitative lignin determination can be neglected because

of the following reason. Due to their higher absorbance values (Abs_{280nm} 1.38) and their absorbance maxima, which display a bathochromic shift towards a wavelength of 284 nm to 286 nm and in addition a much slower decrease of the absorbance when compared to lignin. The faintly increased absorbance values within the slightly thickened secondary wall of fibres varied between Abs_{280nm} 0.09 and Abs_{280nm} 0.26. The absorbance values of the compound middle lamella ranged from Abs_{280nm} 0.23 to Abs_{280nm} 0.48 and in cell corners from Abs_{280nm} 0.42 to Abs_{280nm} 0.87, sometimes exceeding Abs_{280nm} 0.93 (Figs. 7). Higher lignin contents in tissues formed immediately after wounding were also reported for parenchyma cells of *Acer rubrum* L. and *Betula papyrifera* Marsh (Bauch et al., 1980). A contrasting observation was made by Rademacher et al. (1984), who described a lower lignin content and an increase in syringyl units in the walls of parenchyma cells of the barrier zone of *Acer saccharum*.

The absorbance values of modified fibres formed in later stages of wound xylem development (2002-2003) still indicated increased lignin contents in the compound middle lamellae (Abs_{280nm} 0.23 to Abs_{280nm} 0.48) and in cell corner regions (Abs_{280nm} 0.42 to over Abs_{280nm} 0.93), even though the secondary wall thickness and lignin content (Abs_{280nm} 0.09 to Abs_{280nm} 0.23) appeared normal (Fig. 8). Within the wound xylem laid down close to the end of the vegetation period in 2003, the absorbance values of the secondary wall remained unchanged, whereas the lignin content in compound middle lamella regions was reduced ranging between Abs_{280nm} 0.23 and Abs_{280nm} 0.35 (Fig. 9). The absorbance values of cell corner regions were still higher, varying between Abs_{280nm} 0.35 to Abs_{280nm} 0.87.

Within the wound xylem formed till the end of the vegetation period 2003, the mean absorbance maxima of secondary walls shifted towards 274 nm (Fig. 10). Simultaneously, the A_{280}/A_{260} ratio increased up to mean values of 1.22 indicating a

reduced amount of associated p-hydroxy benzoic acid subunits and a distinct incorporation of additional guaiacyl moieties. The mean A_{280}/A_{260} ratio in middle lamella regions of fibres in this tissue portion increased (A_{280}/A_{260} 1.22) and the peak absorbance shifted towards a higher wavelength of 276 nm reflecting the same effect as described for the S2. In contrast to the above described measurements, the mean A_{280}/A_{260} ratio in cell corner regions decreased (A_{280}/A_{260} 1.23), while the absorbance maximum (278 nm), i.e. the syringyl/guaiacyl ratio, remained unchanged indicating a reduced amount of associated p-hydroxy benzoic acid subunits (Fig. 10).

Figures 11 and 12 show a representative two- and three-dimensional UV image profiles and spectra of wound xylem cells formed in 2004, 24 months after wounding. The lignin contents within the secondary wall (around Abs_{280nm} 0.09), compound middle lamella- (Abs_{280nm} 0.16 to Abs_{280nm} 0.23) and cell corner regions (Abs_{280nm} 0.35 to Abs_{280nm} 0.74) have nearly normalised (Fig. 11). However, the lignin composition was still modified when compared to unaffected cells. Like in the wound xylem formed prior to 2004, the A_{280}/A_{260} ratios in the S2-layer (1.23) and compound middle lamella regions (1.21) indicated a reduced amount of associated p-hydroxy benzoic acid subunits. An increased incorporation of guaiacyl moieties within these cell wall compartments was visualised by the shift of the mean absorbance maxima towards higher wavelengths (S2, 272 nm; cml, 274-276 nm) (Fig. 12). Within cell corner regions, the A_{280}/A_{260} ratio (1.21) and the wavelength of the peak absorbance (276 nm) decreased revealing a lower content of guaiacyl lignin and a higher amount of p-hydroxy benzoic acid subunits (Fig. 12).

In conclusion, the microscopic and UV microspectrophotometric observations of cells located in the wound xylem showed that wounding induces modification of the cell assembly as well as the lignin topochemistry of fibre and vessel walls. With

increasing distance from the tissues present at the time of wounding both structural and topochemical modifications decrease continuously until disappearance. It can also be concluded that wound-induced modifications of the lignin topochemistry as well as the structural alterations within the wound xylem are mechanisms of an increased disease resistance as similarly suggested by Vance et al. (1980) for various plant systems.

References

- Anderson, N.A., Ostry, M.E., Anderson, G.W. (1979) Insect wounds as infection sites for *Hypoxylon mammatum* on trembling aspen. *Phytopathology* 69: 476-479.
- Arend, M., Fromm, J. (2004) Ultrastructural changes in cambial cell derivatives during xylem differentiation in poplar. *Plant Biology* 6: 255-264.
- Bauch, J., Shigo, A.L., Starck, M. (1980) Wound effects in the xylem of acer and betula species. *Holzforschung* 34: 153-160.
- Bloomberg, W.J., Farris, S.H. (1963) *Cytospora* canker of poplars: Bark wounding in relation to canker development. *Canadian Journal of Botany* 41: 303-310.
- Brown, C.L., Sax, K. (1962) The influence of pressure on the differentiation of secondary tissues. *American Journal of Botany* 49: 683-691.
- Brinkmann, K. (2002) Einfluß sich ändernder Umweltbedingungen auf Struktur- und Abwehrkomponenten in Buche und Pappel. PhD thesis, Georg-August-Universität, Göttingen, Germany.
- Bucciarelli, B., Ostry, M.E., Fulcher, R.G., Anderson, N.A., Vance, C.P. (1999) Histochemical and microspectrophotometric analyses of early wound responses of resistant and susceptible *Populus tremuloides* inoculated with *Entoleuca mammata* (\equiv *Hypoxylon mammatum*). *Canadian Journal of Botany* 77: 548-555.

- Buntrock, M. (1989) Anatomische Untersuchungen über die Wundreaktion der Pappel. Diploma thesis, University of Hamburg, Germany.
- Déjardin, A., Leplé, J.C., Descauses, M.C., Costa, G., Pilate, G. (2004) Expressed sequence tags from poplar wood tissues – a comparative analysis from multiple libraries. *Plant Biology* 6: 55-64.
- Donaldson, L.A. (2001) Lignification and lignin topochemistry - an ultrastructural view. *Phytochemistry* 57: 859-873.
- Donaldson, L.A., Hague, J., Snell, R. (2001) Lignin distribution in coppice poplar, linseed and wheat straw. *Holzforschung* 55: 379-385.
- Fergus, B.J., Goring, D.A.I. (1970 a) The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. *Holzforschung* 24: 113-117.
- Fergus, B.J., Goring D.A.I. (1970 b) The distribution of lignin in birch wood as determined by ultraviolet microscopy. *Holzforschung* 24: 118-124.
- Eckstein, D., Liese, W., Shigo, A.L. (1979) Relationship of wood structure to compartmentalization of discoloured wood in hybrid poplar. *Canadian Journal of Forest Research* 9: 205-210.
- Fink, S. Pathological and regenerative plant anatomy. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, 1999.
- Frankenstein, C., Schmitt, U., Waitkus, W., Eckstein, D. (2005) Wound callus formation – a microscopic study on poplar (*Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx.). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 79: 44–51.
- Fukazawa, K. (1992) Ultraviolet microscopy. In: *Methods in lignin chemistry*. Eds. Lin, S.Y., Dence, C.W. Springer Verlag, Berlin. pp. 110-121.
- Grünwald, C., Ruel, K., Joselau, J.P., Fladung, M. (2001) Morphology, wood structure and cell wall composition of rolC transgenic and non-transformed aspen trees. *Trees* 15: 503-517.

- Grünwald, C., Stobbe, H., Schmitt, U. (2002) Entwicklungsstufen der seitlichen Wundüberwallung von Laubgehölzen. *Forstwissenschaftliches Zentralblatt* 121: 50-58.
- Grünwald, C., Ruel, K., Kim, Y.S., Schmitt, U. (2002 a) On the cytochemistry of cell wall formation in poplar trees. *Plant Biology* 4: 13-21.
- Grünwald, C., Ruel, K., Schmitt, U. (2002 b) Differentiation of xylem cells in rolC transgenic aspen trees – a study of secondary cell wall development. *Annals of Forest Science* 59: 679-685.
- Junghans, U., Langenfeld-Heyser, R., Polle, A., Teichmann, T. (2004) Effect of auxin transport inhibitors and ethylene on the wood anatomy of poplar. *Plant Biology* 6: 22-29.
- Kaufert, F. (1937) Factors influencing the formation of periderm in Aspen. *American Journal of Botany* 24: 24-30.
- Koch, G., Kleist, G. (2001) Application of scanning UV microspectrophotometry to localise lignins and phenolic extractives in plant cell walls. *Holzforschung* 55: 563-567.
- Koch, G., Grünwald, C. (2004) Application of UV microspectrophotometry for topochemical detection of lignin and phenolic extractives in wood fibre cell walls. In: *Wood fibre cell walls: Methods to study their formation, structure and properties*. Eds. Schmitt, U., Ander, P., Barnett, J.R., Emons, A.M.C., Jeronimidis, G., Saranpää, P., Tschegg, S. Swedish University of Agricultural Science, Uppsala. pp. 119-130.
- Liese, W., Dujesiefken, D. (1996) Wound reactions of trees. In: *Forest trees and palms: Diseases and control*. Eds. Raychaudhuri, S.P., Maramorosch, K. IBH publishing, Oxford, New Delhi, Calcutta. pp. 21-35.

- Lowerts, G., Wheeler, E.A., Kellison, R.C. (1986) Characteristics of wound-associated wood of Yellow-Poplar (*Liriodendron tulipifera* L.). *Wood and Fiber Science* 18: 537-552.
- Mulhern, W., Shortle, W., Shigo, A.L. (1979) Barrier zones in red maple: an optical and scanning microscope examination. *Forest Science* 25: 311-316.
- Mullick, D.B. (1977) The non-specific nature of defence in bark and wood during wounding, insect and pathogen attack. *Recent Advances in Phytochemistry* 11: 395-441.
- Musha, Y., Goring, D.A.I. (1975) Distribution of syringyl and guaiacyl moieties in hardwoods as indicated by ultraviolet microscopy. *Wood Science and Technology* 9: 45-58.
- Novitskaya, L.L. (1998) Regeneration of bark and formation of abnormal birch wood. *Trees* 13: 74-79.
- Pearce, R.B. (2000) Decay development and its restriction in trees. *Journal of Arboriculture* 26: 1-11.
- Rademacher, P., Bauch, J., Shigo, A.L. (1984) Characteristics of xylem formed after wounding in *Acer*, *Betula* and *Fagus*. *IAWA Bulletin* 5: 141-151.
- Saka, S., Goring, D.A.I. (1988) Localization of lignins in wood cell walls. In: *Biosynthesis and Biodegradation of wood components*. Ed. Higuchi T, Academic Press, New York. pp 51-62.
- Scott, J.A.N., Procter, A.R., Fergus, B.J., Goring, D.A.I. (1969) The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood. Description and validity of the technique. *Wood Science and Technology* 3: 73-92.
- Schmitt, U., Liese, W. (1993) Response of xylem parenchyma by suberization in some hardwoods after mechanical injury. *Trees* 8: 23-30.

- Sharon, E.M. (1973) Some histological features of *Acer saccharum* wood formed after wounding. *Canadian Journal of Forest Research* 3: 83-89.
- Shigo, A.L. (1984) Compartmentalization: A conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annual Review of Phytopathology* 22: 189-214.
- Shigo, A.L., Marx, H.G. (1977) Compartmentalization of decay in trees. *USDA/Forest Service and Agriculture Information Bulletin* 405: 1-73.
- Shortle, W.C. (1979) Compartmentalization of decay in red maple and hybrid poplar trees. *Phytopathology* 69: 410-413.
- Soe, K. (1959) Anatomical studies of bark regeneration following scoring. *Journal of the Arnold Arboretum* 40: 260-267.
- Spurr, A.R. (1969) A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Research* 26: 31-43.
- Sundberg B., Uggla C., Tuominen H. (2000) Cambial growth and auxin gradients. In: *Cell and molecular biology of wood formation*. Eds. Savidge R.A., Barnett J.R., Napier R., BIOS Scientific Publications, Oxford. pp. 169-188.
- Takabe, K. (2002) Cell walls of woody plants: Autoradiography and ultraviolet microscopy. In: *Wood formation in trees*. Ed. Chaffey, N., Taylor & Francis, London. pp. 159-177.
- Terashima, N., Fukushima, K., Tsuchiya, S., Takabe, K. (1986) Heterogeneity in formation of lignin. VII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin in poplar. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 6: 495-504.
- Terashima, N., Fukushima, K., Takabe, K. (1993) Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: *Forage cell wall structure and digestibility*. Eds. Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. ASA-CSSA-SSSA, WI, Madison. pp. 247-270.

Trockenbrodt, M., Liese, W. (1991) Untersuchungen zur Wundreaktion in der Rinde von *Populus tremula* L. und *Platanus x acerifolia* (Ait.) Willd. *Angewandte Botanik* 65: 279-287.

Vance, C.P., Kirk, T.K., Sherwood, R.T. (1980) Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Reviews of Phytopathology* 18: 259-288.

Figures

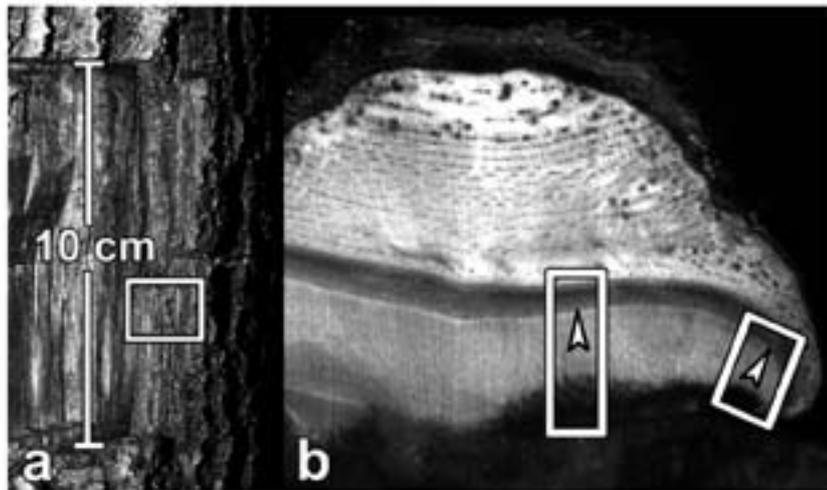


Figure 1 Callus formation along the lateral wound edges 24 months after wounding: (a) the rectangle indicates the position of tissue sampling at the wound edges (□); (b) characters indicate the positions of sampled xylem within the wound callus for microscopy and UV-microspectrophotometry, wound xylem (□), arrowheads are pointing at xylem formed during the second vegetation period after wounding (2004).

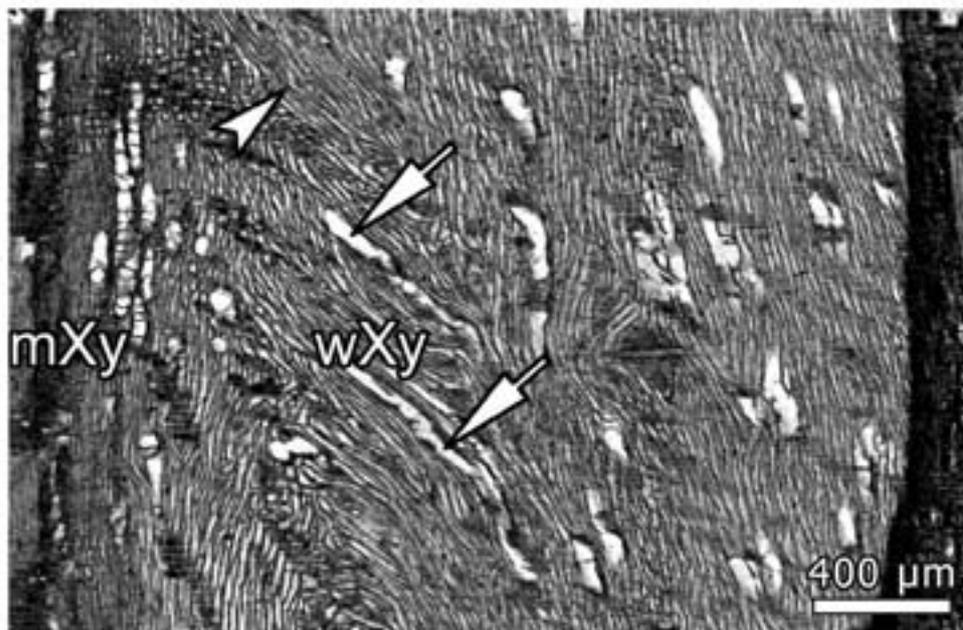


Figure 2 Transverse section through wound xylem (wXy) and modified xylem differentiating at the time of wounding (mXy); wound xylem fibres (arrowhead) and vessels (arrows) show a strong deviation from the axial orientation; light micrograph, safranin/astra blue staining.



Figure 3 Transverse section through unmodified poplar xylem; typical thin-walled fibres with cell corners containing less electron dense material (arrowhead) when compared to wound-affected fibres; TEM, potassium permanganate staining.

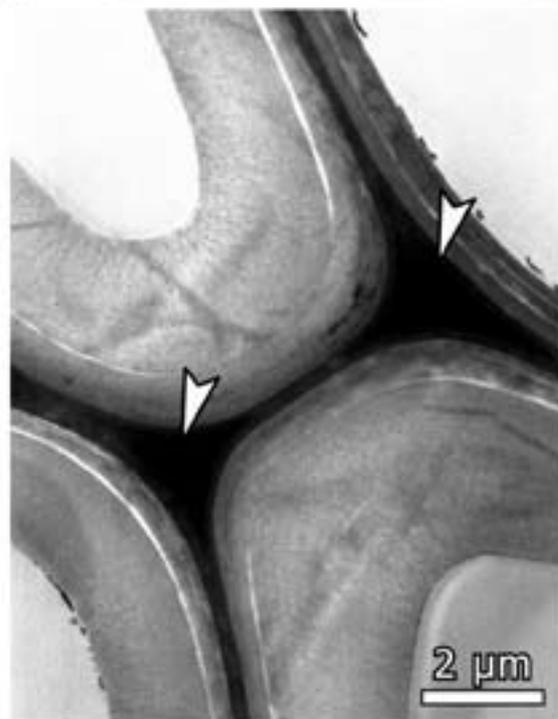


Figure 4 Transverse section through modified xylem adjacent to the xylem present at the time of wounding: fibres with secondary wall thickenings and cell corners containing material with extremely high electron density (arrowheads); TEM, potassium permanganate staining.



Figure 5 UV micrograph and 3D UV-microscopic scanning profile of unaffected xylem. The grey scale pixels represent different UV-absorbance values within the fibre wall layers at 280 nm wavelength; fibres (F), ray parenchyma (Rp).

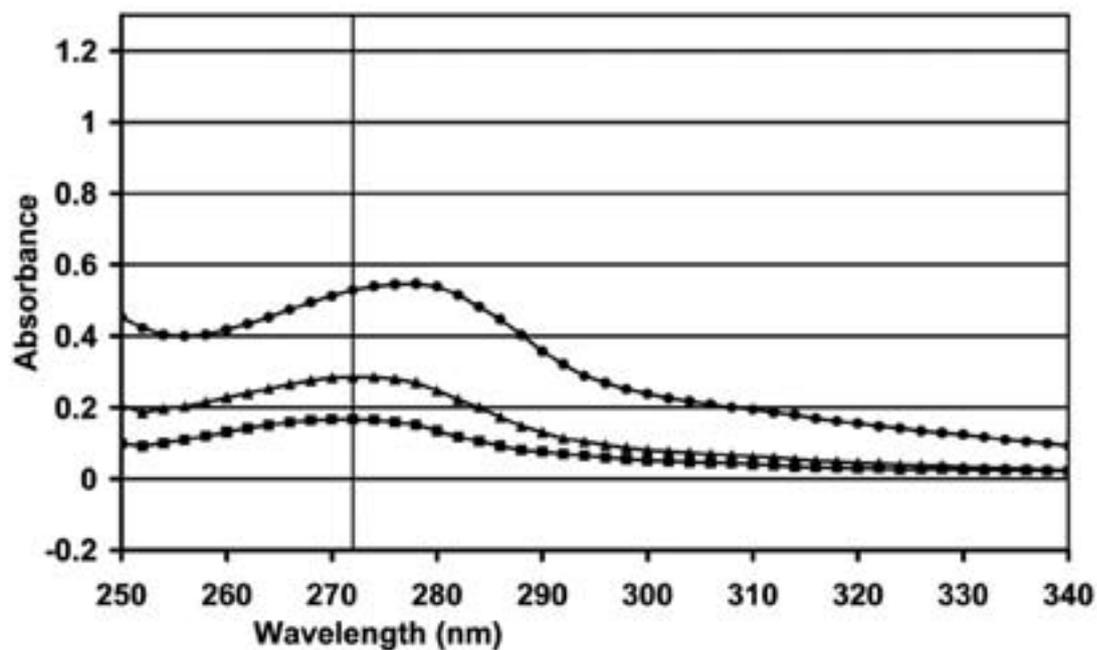


Figure 6 Representative UV absorbance spectra of unaffected fibres (secondary wall -■-, compound middle lamella -▲-, cell corner -●-); absorbance maxima at 270-272 -■-, 272 -▲-, 278 -●-.

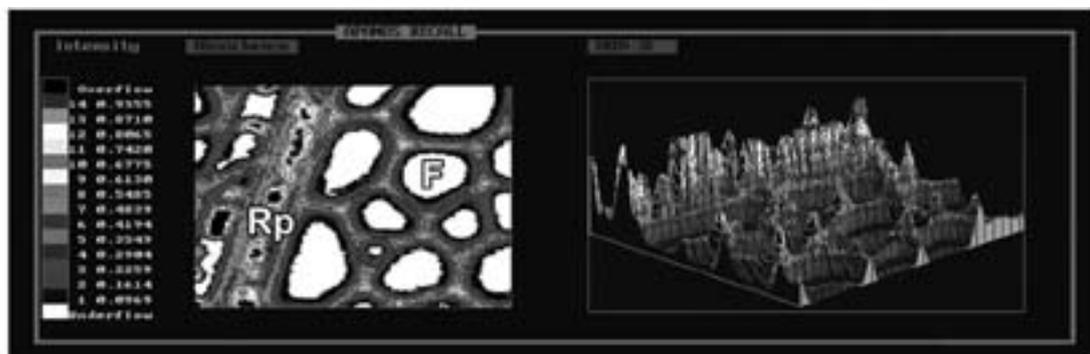


Figure 7 UV micrograph and 3D image profile of wound xylem fibres (F) and ray parenchyma cells (Rp) filled with phenolic compounds; wound xylem laid down within the same vegetation period of wound setting (2002), adjacent to the xylem present at the time of wounding.

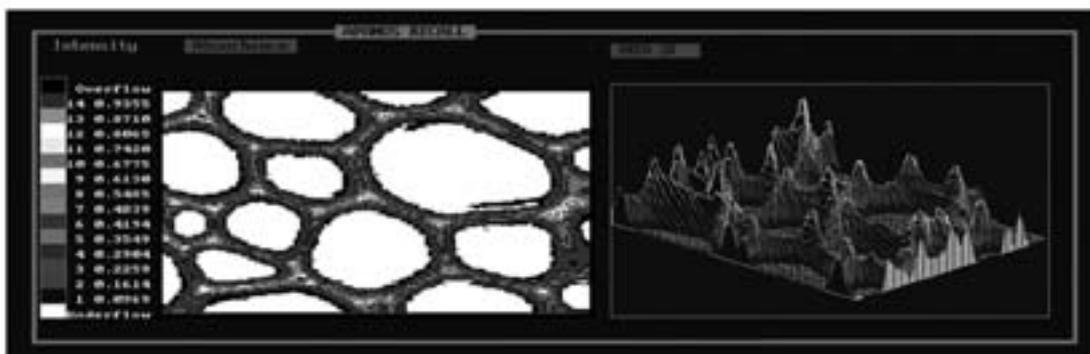


Figure 8 UV micrograph and 3D image profile of wound xylem: fibres laid down during later stages of wound xylem development (2002-2003) without wall thickenings and less increased lignin contents.

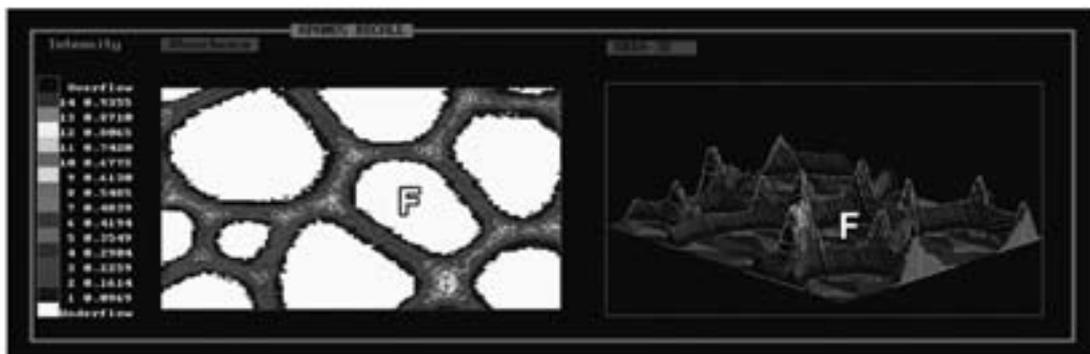


Figure 9 UV micrograph and 3D image profile of wound xylem fibres (F) formed at the end of the first vegetation period after wounding (2003).

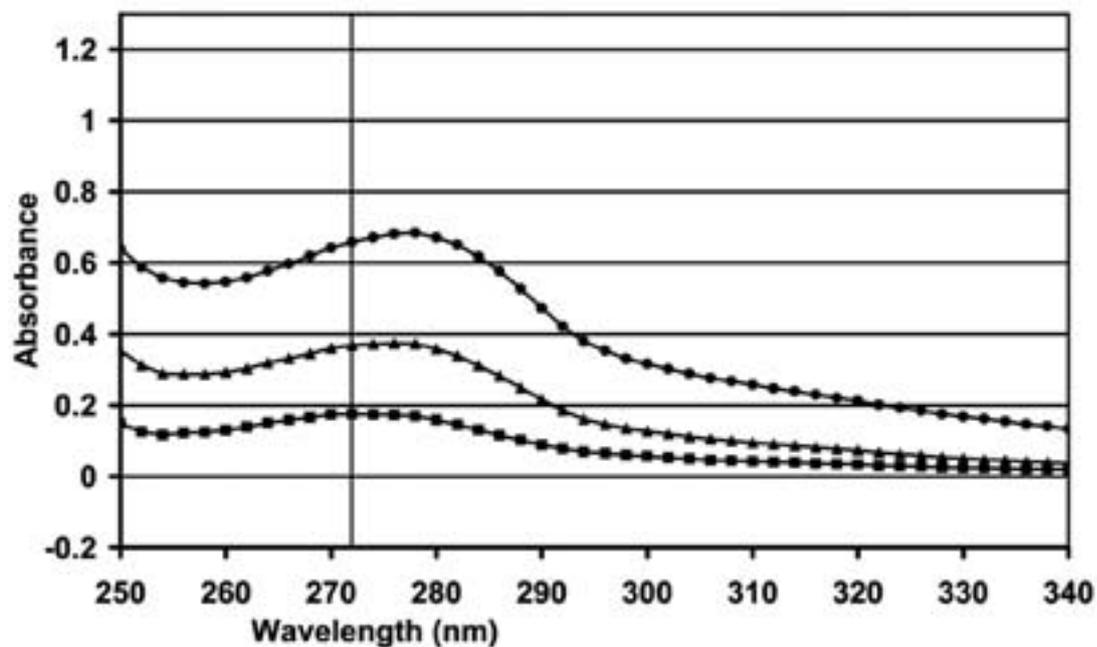


Figure 10 Representative UV absorbance spectra of cell wall layers (secondary wall -■-, compound middle lamella -▲-, cell corner -●-), of wound xylem fibres formed until the end of the vegetation period of the year after of wounding (2003). Absorbance maxima shifted towards higher values, 274 -■-, 276 -▲-, 278 -●-.

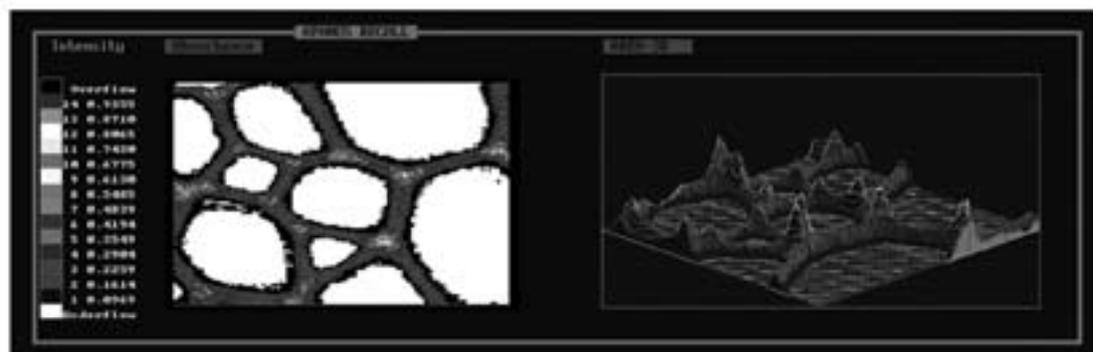


Figure 11 UV micrograph and 3D image profile of wound xylem fibres formed during the second vegetation period after wound setting (2004) showing a nearly normal lignin content in secondary wall- and compound middle lamella regions.

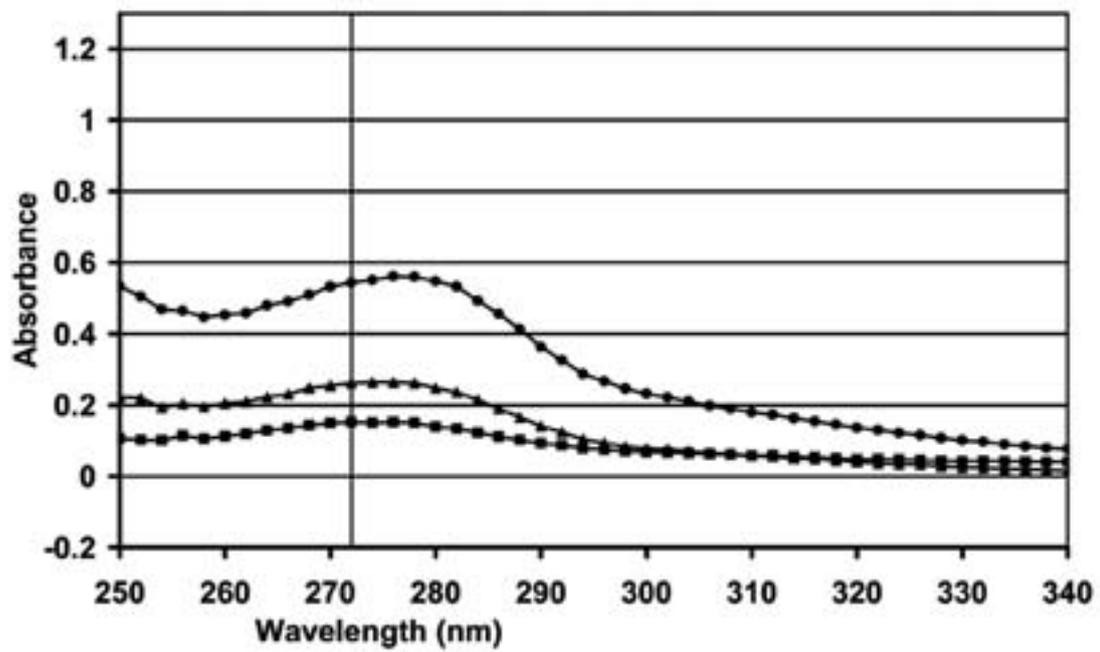


Figure 12 Representative UV absorbance spectra of cell wall layers (secondary wall -■-, compound middle lamella -▲-, cell corner -●-) of wound xylem fibres formed in the second vegetation period after wounding (2004). Absorbance maxima at wavelength of 272 -■-, 274-276 -▲-, 276 -●-.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Claus Frankenstein
Geburtsdatum: 02. August 1969
Geburtsort: Pinneberg
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

- 1989 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife; Johannes Brahms Gymnasium, Pinneberg

Zivildienst:

1989 - 1991 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Pinneberg

Ausbildung:

1992 - 1994 Ausbildung zum Tischler in Rellingen

Studium:

1995 - 2001 Studium der Holzwirtschaft an der Universität Hamburg
Abschluß: Diplom Holzwirt

Berufliche Tätigkeit:

2002 - 2005 wissenschaftlicher Angestellter der Universität Hamburg,
Ordinariat für Holzbiologie

2005 – 2006 wissenschaftlicher Angestellter der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Außerdem erkläre ich, dass ich mich weder an einer anderen Universität um eine Promotion beworben, noch die Dissertation an einer anderen Universität eingereicht habe.

Hamburg, Februar 2006

Claus Frankenstein

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Zentrum Holzwirtschaft der Universität Hamburg, in Verbindung mit dem Institut für Holzbiologie und Holzschutz der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft (BFH), Hamburg. Sie wurde zum Teil aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Technologietransfers der Universität Hamburg finanziert.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern, die mich während meiner Arbeit auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Eckstein
Katrin Griebeling
Dr. Claudia Grünwald
Dr. Gerald Koch
Tanja Potsch
Dr. Uwe Schmitt
Christina Waitkus

