

ÜBER URANINSCHWELLEN EINIGER
WASSER - ANTHOPHYTEN

V o n

APHRODITE PANAGIOTOPOULOU - KARATAGLI

I. Einleitung

HÖFLER, ZIEGLER, und LUHAN (1956) vermuten, dass die Vitalfärbung mit Na - bzw. K - Fluorescein auf eine Bindung an Eiweiss - Lipoid - Komplex zurückzuführen ist. Nach SCHARF (1956) und DRAWERT (1960) findet zwischen dem Fluorescein und den polaren Lipoiden von Lezithintyp eine festere Bindung mehr adsorptiver Natur statt. Aus Fluoreszenzmessungen in *Allium cepa* - Zellen, die mit Na - Fluorescein gefärbt worden waren, nimmt BOLHAR - NORDENKAMPF (1966) an, daß eine relativ lose Bindung an die Spräroproteine des Eiweiss - Lipoid - Komplexes besteht.

Aus den mikrospektrophotometrischen Untersuchungen von BANCHER und HÖLZL (1969) und TSEKOS (1969a) geht hervor, daß Na - Fluorescein sich als zweiwertiges Anion in der wässrigen Phase des Cytoplasmas und des Zellkernes befindet.

SCHWANTES (1965) verfolgt quantitativ mikrospektrophotometrisch die Aufnahme von K - Fluorescein und Eosin Y in die Oberepidermiszellen der Schuppenblätter von *Allium cepa* in Abhängigkeit von Zeit, Konzentration und pH - Wert. Nach SCHWANTES ist das quantitative Speichervermögen des Plasmas für die genannten anionischen Farbstoffe ähnlich der Speicherung kationischer Farbstoffe durch den Zellsaft. Daraus ergibt sich, daß der pH - Wert des lebenden Protoplasmas eine bedeutende Rolle für die Aufnahme und Speicherung von K - bzw. Na - Fluorescein spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Uraninschwellen eines Meeres und acht Süßwasser - Anthophyten bestimmt.

II. Material und Methode

Die Bestimmung der Uraninschwellen geschah wie bei DIANNELIDIS und TSEKOS (1968). Als Fluoreszenzmikroskop stand das Photomikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung der Firma C. Zeiss (Oberkochen) zur Verfügung. Als ErregungsfILTER kamen BG 38, BG 12, und BG 3 und als Okularsperrfilter das mit der Nummer 47/65 bezeichnete Filter,

zur Verwendung. Das Okularsperrfilter 47/65 ist zwischen 470 nm und 650 nm durchlässig, unterhalb von 470 nm und oberhalb von 650 nm praktisch undurchlässig.

Halophila stipulacea wurde aus dem Golf von Rodos aus einer Tiefe von 8 bis 10 m in Oktober 1968 gesammelt. Aus den Süßwasser - Anthophyten wurde *Myriophyllum spicatum* aus dem Volvi - See aus einer Tiefe von 1,5 bis 2 m in April 1969 gesammelt. Die übrigen untersuchten Arten wurden aus dem Aquarium des Botanischen Instituts genommen.

Die Untersuchung wurde in Zeit vom Oktober 1968 bis Mai 1969 durchgeführt.

III. Versuchsergebnisse und Rückschlüsse

Aus den Versuchsergebnissen (Tab. 1 und 2) und auch unter der Berücksichtigung von Angaben anderen Autoren (HÖFLER, ZIEGLER und LUHAN 1962a, b, ZIEGLER und LUHAN 1963, TSEKOS 1965, DIANNELIDIS und TSEKOS 1968) wurde die Beobachtung, daß die Uraninschwellen für die verschiedenen Pflanzengruppen verschieden sind, bestätigt. Aus den untersuchten Pflanzen besitzen die Süßwasser - Anthophyten (pH 6,0 - 7,2, Tab. 2) höhere pH - Uraninschwellen als das Meeres - Anthophyt *Halophila stipulacea* (pH 5,7 - 6,2, Tab. 1).

Tabelle 1. pH - Schwellen der Protoplasma - Fluorochromierung von *Halophila stipulacea*.

pH	Zellkategorien des Blattes *								Mittel- rippe- zellen
	Blatt- zähne	Rand- zellen	Stielzellen		Basis- zellen	Spitz- zellen	Feldzellen		
			Normales Plasma	Gequollenes Plasma			Cyto- plasm.	Zell- kern	
4,0	++	+	++	+++	++	-	-	+	-
4,5	++	+	++	+++	++	-	-	+	-
5,2	++	+	++	+++	+	-	-	+	-
5,7	+	+ -	+	+++	+ -	-	-	-	-
5,9	+	-	+ -	+++	-	-	-	-	-
6,0	+ -	-	-	+++	-	-	-	-	-
6,2	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
6,4	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
8,2	-	-	-	++	-	-	-	-	-

* Die verwendeten Ausdrücke für die verschiedenen Zellkategorien des Blattes von *Halophila stipulacea* sind von DIANNELIDIS (1951) eingeführt worden.

Unterschiede hinsichtlich der Uraninschwellenwerte wurden nicht nur zwischen den einzelnen Pflanzen, sondern sogar zwischen den verschiedenen Zellkategorien ein und derselben Pflanze beobachtet. Bei den Süßwasser - Anthophyten liegen die Uraninschwellenwerte der Epidermis - und der Außenrindenzellen niedriger in der pH - Skala als der Mark - und der Innenrindenzellen (z. B. *Hygrophila gigadea*, *Hygrophila sp.*, *Vallisneria spiralis*, Tab. 2).

Bei dem Meeres - Anthophyten *Halophila stipulacea* sind die Unterschiede der Uraninschwellenwerte der verschiedenen Zellkategorien des Blattes deutlich (Uraninschwellenwerte: Blattzähne zwischen pH 6,0 und 6,2, der Randzellen zwischen pH 5,7 und pH 5,9, der Stielzellen zwischen pH 5,9 und pH 6,0 und Basiszellen zwischen pH 5,7 und pH 5,9).

Bei allen untersuchten Pflanzen wurde ein unterschiedliches Verhalten der jungen und der ausgewachsenen Zellen dem Na - Fluorescein gegenüber festgestellt. Die jüngeren Zellen wiesen immer höher Uraninschwellen auf als die alten (*Hygrophila gigadea*: junge Zellen zwischen pH 6,7 und 6,9, alte Zellen zwischen pH 6,5 und 6,7; *Myriophyllum spicatum*: junge Zellen zwischen pH 6,7 und 6,9, alte Zellen zwischen pH 6,5 und 6,7). Das obengenannte Verhalten ist schon erwähnt (vgl. STRUGGER 1938, HONSELL 1959, HÖFLER, ZIEGLER und LUHAN 1962a, b, ZIEGLER und LUHAN 1963, TSEKOS 1965, DIANNELIDIS und TSEKOS 1968). Es wurden Unterschiede zwischen dem Cytoplasma und dem Zellkern ein und derselbe Zelle beobachtet. Wenn ein Unterschied zwischen dem Cytoplasma und dem Zellkern bestand, dann zeigte der Zellkern höhere Uraninschwellenwerte als das Cytoplasma (vgl. HÖFLER, ZIEGLER und LUHAN 1962a, b, ZIEGLER und LUHAN 1963, DIANNELIDIS und TSEKOS 1968).

Die starke Grünfluoreszenz des gequollenen Plasmas einiger Zellen (DÖRING - Phänomen) bei pH - Werten, wo die normalen lebenden Zellen keine sekundäre Grünfluoreszenz aufwiesen, muss auf die Anionen - Permeabilität des Plasmalemmas der nekrotischen Zellen beruhen (vgl. DIANNELIDIS und TSEKOS 1968).

Viele Markzellen der Süßwasser - Anthophyten befanden sich in Tonoplastenstadien. Die Tonoplasten fluoreszierten intensiv grün und sogar in pH - Werten, bei denen das Cytoplasma der normalen lebenden Zellen keine Grün - Fluoreszenz zeigten (siehe auch DIANNELIDIS und TSEKOS 1968, Abb. 6). Daraus geht hervor, daß die Anionen des Na - Fluoresceins durch die Tonoplastenmembran permeieren (vgl. HÖFLER 1952, BURIAN 1962a, b, TSEKOS 1967).

Die Zellwände der Zellen von Epidermis, Festigungsgewebe und

Tracheen zeigten Gelbfluoreszenz, deren Intensität unabhängig vom pH - Wert der verwendeten Farbstoff - Pufferlösungen war. Hier muß eine festere Bindung chemischer Natur zwischen Na - Fluorescein und bestimmten Substanzen der Zellwand vorliegen. Elektroadsorption muß ausgeschlossen werden, weil bei einer Elektroadsorption mit der Erhöhung des pH - Wertes infolge einer stärkeren Farbstoff - Dissoziation eine Zunahme der Fluoreszenz - Intensität stattfinden sollte.

Es wurde intensive Grünfluoreszenz der Assimilations - und der Reservestärkeköerner beobachtet (Reservestärkeköerner gibt es in den Markzellen des Stengels und der Wurzel der Süßwasser - Anthophyten zu sehen). Die Assimilations - Stärkeköerner leuchteten grün nur beim pH - Bereich, wo auch das Protoplasma zur Uranin - Sreicherung fähig ist (vgl. ZIEGLER 1960, DIANNELIDIS und TSEKOS 1968). Die Reservestärkeköerner fluoreszierten grün noch bei pH - Werten, bei denen das Protoplasma keine sekundäre Grünfluoreszenz zeigte (vgl. ZIEGLER 1960).

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. Th. DIANNELIDIS, danke ich für die Anregung und Unterstützung zu dieser Arbeit. Danke auch dem Herrn Dr. I. TSEKOS für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Zusammenfassung

Es wurden die pH - Schwellen der Uraninfärbbarkeit des Protoplasmas 1 Meeres - und 8 Süßwasser - Anthophyten festgestellt. Es zeigte sich folgendes:

1) Für die Süßwasser - Anthophyten lagen die Uraninschwellen zwischen pH 6,0 und pH 7,2 und für das Meeres - Anthophyt *Halophila stipulacea* zwischen pH 5,7 und pH 6,2.

2) Die Markzellen wiesen höhere Uraninschwellen auf als die übrigen Zellen. Der Zellkern wies höhere Uraninschwellenwerte auf als das Plasma.

3) Die verschiedenen Zellkategorien des *Halophila* - Blattes zeigten verschiedene Uraninschwellenwerte.

4) Die junge Zellen zeigten immer höhere Uraninschwellenwerte als die alte.

5) Gequollenes Plasma fluoreszierte intensiv grün auch bei pH - Werten, bei denen das Protoplasma der normalen, intakten Zellen keine grüne Fluoreszenz aufwies. Bei sehr hohen pH - Werten ist eine starke grüne Tonoplasten - Fluoreszenz zu erkennen.

6) Die pH - Schwellen der Assimilationstärke sind mit denen des

Plasmas identisch, während die pH - Schwellen der Reservestärke höher lagen als die des Plasmas.

Summary

The pH threshold values obtained through Na - fluoresceine stainability, were defined in eight (8) fresh - water and one (1) marine Anthophyta. The experiments resulted in the following data:

1) Fresh - water Anthophyta yielded pH threshold values of Na - fluoresceine between 6,0 and 7,2. The marine Anthophyte *Halophila stipulacea* showed a variation of pH values between 5,7 and 6,2.

2) Pith parenchyma cells of fresh - water Anthophyta showed usually higher threshold values of Na - fluoresceine than the rest of cells. Within a given cell the nucleus had always higher pH values in comparison with the cytoplasm.

3) The various categories of cells studied in *Halophila stipulacea* leaves appeared different in pH values.

4) Young cells showed always higher threshold of pH values stainability than old ones.

5) Swollen plasma was strongly green fluorescent at those pH values at which normal cells did not show any fluorescence. A few cells of fresh - water Anthophyta were at the tonoplast stage, showing a strong green fluorescence at very high pH values.

6) The pH values of Na - fluoresceine found at the assimilating starch grains are in coincidence with those of the protoplasm, whereas the corresponding values of storage starch grains appeared higher than the observed at the protoplasm.

Περίληψις

Καθωρίσθησαν τὰ ὅρια pH χρώσεως τοῦ πρωτοπλάσματος διὰ τῆς Na - φλουορεσκεΐνης ὀκτώ (8) ἀνθοφύτων γλυκέων ὑδάτων καὶ ἐνὸς (1) θαλασσίου ἀνθοφύτου. Ἐδείχθησαν τὰ ἀκόλουθα:

1) Τὰ ἀνόφυτα τῶν γλυκέων ὑδάτων ἐνεφάνιζον ὅρια pH φλουορεσκεΐνης μεταξὺ τῶν τιμῶν pH 6,0 καὶ pH 7,2. Τὸ θαλάσσιον ἀνόφυτον *Halophila* μεταξὺ τῶν τιμῶν pH 5,7 καὶ 6,2.

2) Εἰς τὰ ἀνόφυτα τῶν γλυκέων ὑδάτων τὰ κύτταρα τῆς ἐντεριώνης ἐδείκνυον πάντοτε ὑψηλότερα ὅρια pH φλουορεσκεΐνης ἐν σχέσει πρὸς τὰ λοιπὰ κύτταρα. Κατὰ κανόνα ἐντὸς ἐνὸς καὶ τοῦ αὐτοῦ κυττάρου ὁ πυρὴν ἐνεφάνιζε ὑψηλότερα ὅρια pH φλουορεσκεΐνης ἢ τὸ πλάσμα.

3) Αί διάφοροι κατηγορίαι κυττάρων τοῦ φύλλου τῆς *Halophila* ἐδείκνυον διάφορα ὄρια pH φλουορεσκεΐνης.

4) Τὰ νεαρὰ κύτταρα ἐδείκνυον πάντοτε ὄρια pH χρώσεως ὑψηλότερα τῶν ἡλικιωμένων.

5) Διογκωμένον πλάσμα ἐφθόριζεν ἔντονον πράσινον εἰς τιμὰς pH, εἰς τὰς ὁποίας τὸ πρωτόπλασμα τῶν φυσιολογικῶν κυττάρων δὲν ἐνεφάνιζεν φθορισμόν. Μερικὰ κύτταρα τῶν ἀνθοφύτων τῶν γλυκέων ὑδάτων εὐρίσκοντο εἰς στάδιον τονοπλαστῶν, οἱ ὅποιοι ἐφθόριζον ἔντονον πράσινον εἰς λίαν ὑψηλὰς τιμὰς pH.

6) Τὰ ὄρια pH φλουορεσκεΐνης τῶν ἀφομοιωτικῶν ἀμυλοκόκκων συμπίπτουν μὲ αὐτὰ τοῦ πλάσματος, ἐνῶ τῶν ἀποταμιευτικῶν ἀμυλοκόκκων κεῖνται ὑψηλότερον τῶν pH ὁρίων τοῦ πλάσματος.

Literatur

- BANCHER, E. und J. HÖLZL, 1969: Untersuchungen über die Färbemechanismen der vitalen Uraninfluorochromierung. Flora, Abt. A, Bd. 159, 451.
- BOLHAR - NORDENKAMPF, H., 1966: Zur Physiologie der Fluorescein - Speicherung in Pflanzenzellen. Protoplasma 62, 133.
- BURIAN, K., 1962a: Vitalfärbungen an Epidermiszellen von *Platanthera bifolia* mit Toluidinblau und Pyroniu. Protoplasma 55, 156.
- 1962b: Tonoplastenstudien an der Lebermoosen *Calypogeia fissa und trichomanis*. Protoplasma 55, 607.
- DIANNELIDIS, TH., 1951: Zur protoplasmatischen Anatomie des Blattes von *Halophila stipulacea*. Phytion 3, 29.
- und I. TSEKOS, 1968: cH - Schwellen der Uraninfärbbarkeit des Protoplasmas pflanzlicher Zellen. Protoplasma 66, 231.
- DÖRING, H., 1935: Versuche über die Aufnahme fluoreszierender Stoffe in lebende Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. 53, 415.
- DRAWERT, H., 1960: Fluorochromierungstudien an lebenden und toten Pflanzenzellen mit Fluorescein. Ber. dtsch. bot. Ges. 73, 115.
- HÖFLER, K., 1952: Über die Farbionenpermeabilität der Tonoplastenmembran. Ber. dtsch. bot. Ges. 65, 183.
- A. ZIEGLER und M. LUHAN 1956: Fluorochromierungsstudien mit Uranin. Protoplasma 46, 322.
- — — 1962a: cH - Schwellen der Uraninfärbbarkeit des Plasmas einiger Florideen. Protoplasma 55, 357.
- — — 1962b: Uraninschwellen des Protoplasmas der Braunalge *Stypocaulon scoparium*. Protoplasma 55, 410.
- HONSELL, E., 1959: Sull'esistenza di un gradiente citofisiologico nelle colonie di *Oscillatoria irrigua* Kütz., messo in evidenza dall'accumulo protoplasmatico *in vivo*, del fluorocromo uranina. Rendiconti dell'Accademia Nazionale dei Lincei (Classe di scienze fisiche matem. e nat.) ser. VIII, vol. XXVI, 74 - 78.
- SCHARF, J. - H., 1956: Fluoreszenz und Fluoreszenzpolarisation der Nervenfasernach Färbung mit Phenyloxyfluoronen. Versuch einer Interpretation. Mikroskopie II, 261 - 319 u. 349 - 397.
- SCHWANTES, H. O., 1965: Mikrospektralphotometrische Untersuchungen zur Farbstoffaufnahme in die lebende pflanzliche Zelle. Mikr. 20, 291.
- STRUGGER, S., 1938: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. Flora 132, 253.
- 1949: Prakticum der Zell - und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Berlin - Göttingen - Heidelberg.

- ΤΣΕΚΟΣ, Ι., 1965: Έρευνα διά φθοριζουσών χρωστικών ούσιων επί τινων θαλασσίων Ροδοφυκών. Διατριβή επί διδακτορία. Θεσσαλονίκη.
- 1967: Η συμπεριφορά τών κυττάρων τών φύλλων τοῦ *Cotyledon umbilicus* L. έναντι vital βασικών φθοριζουσών χρωστικών. 'Επιστημονική Έπετηρίς Φυσικομαθηματικής Σχολῆς. X, 107.
- 1969a: Mikrospektralphotometrische Untersuchungen der Schuppenblätter von *Allium cepa* nach Färbungen mit den Oxyfluoronen Na-Fluorescein, Eosin und Erythrosin. Flora, Abt. A, Bd. 159, 519.
- ZIEGLER, A., 1960: Plastiden und Stärke - Fluorochromierung mit Uranin. Protoplasma 52, 618.
- und M. LUHAN 1963: Über Uraninschwelleu einiger Blütenpflanzen und Tonoplastenfluorochromierung mit Uranin. Protoplasma 57, 762.