©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Wirkung des Heparins auf die Pflanze

Von

Irmtraud THALER

Aus dem Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen, Universität Graz

Mit 5 Abbildungen

Eingelangt am 11. November 1964

Heparin ist im tierischen Organismus allgemein verbreitet. Es kommt im Gewebe der Leber, des Herzens, der Lunge, in den Gefäßwänden und im Darm vor, vor allem aber in den Granula der Mastzellen und der Granulocyten des Blutes.

Zum ersten Mal wurde Heparin von McLEAN 1916 aus Hundeleber isoliert. Diese gerinnungshemmende Substanz wurde von HOWELL & HOLT 1918 Heparin genannt. Eine Übersicht über die Chemie der Heparine und Heparinoide findet man bei WINTERSTEIN 1954.

Heute weiß man, daß das Heparin einzelner Tierarten verschieden ist. Die chemische Konstitution der Hauptkomponente aus Hundeleber wurde von JORPES 1935 aufgeklärt. Heparin ist danach ein Mucopolysaccharid-polyschwefelsäureester mit einem hohen Schwefelgehalt (11,5—13,5%). „Die Verbindung setzt sich aus äquivalenten Mengen D-Glukosamin-N-schwefelsäure und D-Glukoronsäure zusammen; jeder zweite Glukoronsäurerest scheint am C_2-Hydroxyl und jeder Glukosaminrest am C_4-Hydroxyl mit Schwefelsäure verestert zu sein" (KARRER 1959: 400).

Das Molekulargewicht von Heparin ist außerordentlich hoch; es beträgt nach APPEL & ZANKER 1958 12.000, KARLSON 1964 gibt 17.000 — 20.000 an. Dieses Polysaccharid besitzt die Eigenschaft, die Gerinnungszeit des Blutes zu verlängern und wird daher als antikoagulierende Substanz in der Medizin verwendet. Heparin ist leicht wasserlöslich und kann mit Protamin, Chinin und basischen Farbstoffen, wie Toluidinblau, Pyronin B, Neutralrot und Akridinorange gefällt werden. In niederen Konzentrationen wirkt Heparin nicht giftig auf die tierische Zelle. FISCHER 1936 hat festgestellt, daß bei Gewebekulturen von Herzfibroblasten und Chondrioblasten aus Hühnerembryonen die Zugabe von reinem Heparin stark wachstumshemmend wirkt. HEILBRUNN 1956 gibt an, daß der Zellteilung und Spindelbildung immer eine

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Gelation vorausgehe. Wenn man diese im kolloidchemischen Sinne der Blutgerinnung gleichsetzt, müßten alle Antikoagulantia auch antimitotisch wirken. Der Autor konnte zeigen, daß verdünnte Heparinlösungen das Gerinnen des Plasmas vor der Spindelbildung hindern können. Ob Heparin einen direkten Einfluß auf die Physiologie der pflanzlichen Zelle hat und ob es trotz seines hohen Molekulargewichtes in die Zelle einzudringen vermag, wurde meines Wissens bisher noch nicht untersucht.

Um diesem Problem etwas näher zu kommen, sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wirkt Heparin giftig auf die pflanzliche Zelle?
2. Wie verhalten sich die Zellen vitalfärberisch in Gegenwart von Heparin? Es wäre möglich, daß auch hier sich die Fluoreszenz ändert, wie es bei Anwesenheit von Huminsäure der Fall ist (MICHEL 1963).
3. Wird von Haferkeimlingen durch Guttation Heparin ausgeschieden?
4. Wie verhalten sich abgeschnittene Sprosse in verschieden starken Heparinlösungen?

Für die Untersuchungen wurde Heparin-Natrium pyrogenfrei von den Nordmarkwerken G.m.b.H. Hamburg, Werk Uetersen-Holst. verwendet. Dieses Präparat enthält 128.000 IE pro g (1 IE = 7,8 γ). Die Farbstoffe Acridinorange, Toluidinblau, Neutralrot, Rhodamin B und Erythrosin (alle von GRÜBLER) wurden jeweils in einer Konzentration von 1: 1000 angesetzt. Zur Pufferung dienten Phosphatpuffer. Die ph-Werte wurden mit einem BECKMAN-H-2 pH-Meter mit Glaselektrode eingestellt.

1. Einfluß des Heparins auf den Plasmolyseverlauf

Legt man Schnitte der unteren Epidermis von *Allium Cepa* in eine konzentrierte Heparinlösung, so zeigt sich nach etwa 4 Stunden in mehreren Zellen eine deutliche Vakuolenkontraktion, die sich in den nächsten 20 Stunden nicht ändert. In absterbenden Zellen beginnt der Kern und auch das Cytoplasma auffallend zu quellen. Bereits nach 48 Stunden ist ungefähr die Hälfte der Zellen tot. Mittels der Plasmolyseform-Methode (WEBER 1924, 1925, 1929, DERRY 1929) wurden Änderungen der Viskosität nach Einwirken von Heparin geprüft. Zwiebelepidermen wurden 7 Stunden in eine 1%ige und eine 0,5%ige Heparinlösung gelegt und anschließend mit 0,6 mol Traubenzuckerlösung plasmolysiert. Nach dieser Zeit konnte noch kein Unterschied gegenüber den Wasserkontrollen festgestellt werden. Läßt man die Schnitte 24 bis 48 Stunden in den Heparinlösungen und plasmolysiert nachher, so tritt Konkav- bzw. Krampfplasmolyse auf, die sich auch nach 6 Stunden nicht mehr ändert.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

In der Kontrolle tritt dagegen sehr bald Konvexplasmolyse auf. Nach 72 Stunden sind die Zellen durchwegs abgestorben. Die Deplasmolyse tritt nach Einwirken von Heparin schon nach zwanzig Minuten ein, in Kontrollschnitten erst nach dreißig Minuten. Daraus kann geschlossen werden, daß Heparin die Viskosität des Cytoplasmas von *Allium* erhöht.

In 0,5 und 0,3%igen Heparinlösungen stirbt nach 2 Tagen ungefähr die Hälfte der Zellen eines *Spirogyra*-Fadens. Die noch lebenden Zellen geben mit 0,6 mol Traubenzuckerlösung Konvexplasmolyse. Konkav- oder Eckenplasmolyse konnte auch bei längerem Einwirken von Heparin nicht beobachtet werden. Demnach tritt bei *Spirogyra* keine Viskositätsänderung ein. Eine 0,1%ige Heparinlösung wirkt auf *Spirogyra* nicht mehr giftig; die Algen bleiben am Leben.

Gibt man eine 0,5%ige Koffeinlösung zu den Spirogyra-Fäden, so dringt sie rasch in die Vakuole ein und gibt mit dem Gerbstoff den bekannten dichten Tröpfchenniederschlag. *Spirogyra,* die längere Zeit in einer 0,5%igen Heparinlösung lag, und anschließend mit 0,5% Koffeinlösung behandelt wurde, bildet größere Tröpfchen, die entweder zu Kugeln zusammenfließen oder Krümel bilden. Diese lösen sich im Wasser nicht mehr auf (Abb. 1). Im Fluoreszenzmikroskop leuchten die Kugeln in den lebenden Zellen hellblau. Es wäre denkbar, daß Heparin mit dem Gerbstoff und dem Koffein eine Verbindung eingeht. Nachträgliches Färben mit Toluidinblau ergibt eine rotviolette Farbe des Zellinhaltes. Die Kugeln sind ausgesprochen blau.

Das Zytoplasma von *Spirogyra* scheint durch Heparin weniger beeinflußt zu werden. Es ist bemerkenswert, daß sich in 0,5 und 0,3% Heparinlösungen, die lange Zeit im Licht stehen, Reinkulturen von *Trichonema monochloron (Heterokontae)* entwickeln.

2. Vitalfärbung in Gegenwart von Heparin

Heparin zeigt in wässriger Lösung eine hellblaue Eigenfluoreszenz. Sie nimmt mit steigender Konzentration der Lösung zunächst zu, in hoher Konzentration wird sie jedoch wieder schwächer. Wässrige Heparinlösungen flocken, mit Lösungen kathodischer Farbstoffe vermischt, innerhalb bestimmter Mengenverhältnisse der beiden Komponenten aus. Der Niederschlag löst sich in Lauge oder Heparinüberschuß, nicht aber in Wasser. Bei sehr verdünnten AO-Lösungen (10^{-5}) tritt auch bei steigendem Heparinzusatz kein Flocken mehr auf (APPEL & ZANKER 1958). Gibt man zu kathodischen Farbstofflösungen etwas Heparin, so entsteht die typische metachromatische Farbe. Eine mit bloßem Auge wahrnehmbare Farbänderung einer Farbstofflösung bezeichnet man als Metachromasie. Dabei ändern sich die Absorptionsmaxima eines Farbstoffes.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

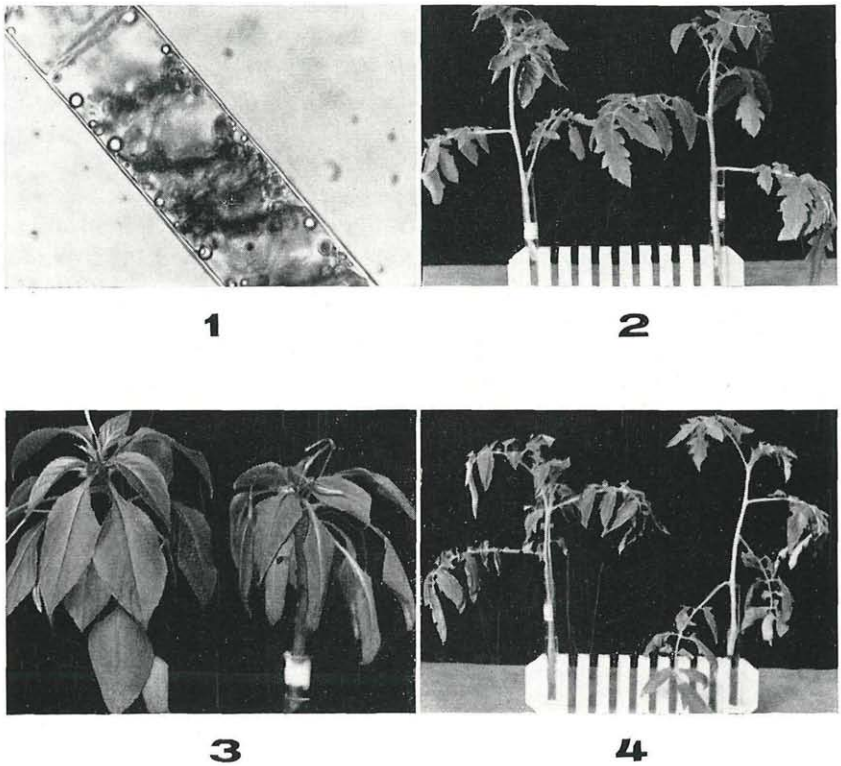

Abb. 1. Teil eines *Spirogyra*-Fadens. Tröpfchen vermutlich aus einer Verbindung von Gerbstoff, Koffein und Heparin bestehend. Vergr. 240 ×.

Abb. 2. *Solanum lycopersicum*. Links in 0,03% Heparin, rechts in H_2O.

Abb. 3. *Impatiens Holstii*. Links in H_2O, rechts in 0,007% Heparin.

Abb. 4. *Solanum lycopersicum*. Links in 0,5% Heparin, rechts in 0,5% Heparin (in dampfgesättigtem Raum).

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Nach APPEL & ZANKER 1958 werden von einem Molekül Heparin mit rund 50 SO_3H-Gruppen etwa 43 Moleküle Acridinorange elektrostatisch gebunden. Dies wird von den Autoren so gedeutet, „daß an den Stellen der Heparin-Mol., an denen die SO_3H- bzw. SO_3Na-Gruppen, also elektronegative und hydrophile Substituentengruppen sitzen, die ebenfalls hydrophilen, aber elektropositiven Farbstoffionen elektrostatisch angelagert bzw. gebunden werden. Diese Ansammlung der Farbstoffkationen an den negativen Stellen der Heparin-Mol. erfolgt solange, bis diese Stellen alle besetzt sind. Diese Vorstellung deckt sich mit den errechneten Ergebnissen, bei denen 40—50 $AO^{\oplus}$-Moll. von einer Heparin-Mol. mit rund 50 SO_3H-Gruppen beansprucht werden" (APPEL & ZANKER 1958: 133). Zusätze von NaCl heben die Metachromasie weitgehend auf.

Akridinorange und Heparin. Vorerst sollte festgestellt werden, ob das normale Fluoreszenzbild der mit Akridinorange (= AO) gefärbten Epidermiszellen der inneren Zwiebelhaut von Allium Cepa durch Zusatz von Heparin geändert wird und damit ein Eindringen des Heparins (= H) unmittelbar festgestellt werden kann. Es wurden jeweils 3 Teile einer Pufferlösung mit 3 Teilen einer 0,5%igen H-Lösung (pH 7,7) und 6 Teilen einer AO-Lösung (1: 1000) gemischt. Verwendet man AO allein, so werden 3 Teile des gewünschten Puffers genommen, 3 Teile dest. H_2O und 6 Teile einer AO-Lösung 1:1000.

Die folgende Tabelle zeigt, daß die Fluoreszenz in den reinen Farblösungen den Angaben von HÖFLER 1947 und STRUGGER 1949 a, b entspricht. Die mit AO und H behandelten Schnitte zeigen kein Schnitt-

Allium Cepa. Obere Epidermis der Zwiebelschuppe. Fluoreszenz in AO und in AO + H bei verschiedenen pH-Werten

pH	Lösung	Zellwand	Vakuole	Schnittrand
2,4	AO	rot	—	—
	AO + H	grün	—	—
4,5	AO	rot	—	—
	AO + H	grün	—	—
5	AO	rot	—	rot
	AO + H	grün	—	—
7,7	AO	grün	gelbgrün	rot
	AO + H	grün	gelbgrün, matt dunkelrot	—
9	AO	grün	kupferrot	(rot)
	AO + H	grün	laubgrün, gelblich	—
11,2	AO	grün	kupferrot	—
	AO + H	grün	laubgrün, oft leuchtend gelblich	—

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

randphänomen, während mit AO allein von pH 5 bis pH 9 das Schnittrandphänomen auftritt. Die rote Zellwandfluoreszenz im sauren Bereich bleibt aus. Die Vakuole ist meist gelbgrün, manchmal matt dunkelrot, aber niemals leuchtend kupferrot. Die Vakuolen der unteren Zwiebelepidermis zeigen eine mattgrüne Fluoreszenz.

Pyronin B und Heparin. In Lösungsgemischen von Pyronin und H leuchtet die Zellwand grüngelb, die Vakuolen fluoreszieren gelbgrün, das Schnittrandphänomen wurde nicht beobachtet. In Pyronin-Lösung allein leuchtet die Zellwand goldgelb.

Neutralrot und Heparin. Im Hellfeld zeigt die Innenepidermis fliederfarbige Vakuolen, gelbe Zellwände und kirschroten Schnittrand. Die Schnitte im Lösungsgemisch Neutralrot + H bleiben vollkommen farblos. Im UV verschwindet bei Neutralrot + H-Gemisch die schwachgrüne Fluoreszenz der Zellwand und ebenso der violettrote Schnittrand.

Rhodamin B und Heparin. In reinen Rhodamin-Lösungen fluoreszieren Plasma und Kern der oberen Epidermis gelb. Im Rodamin und H-Gemisch ist das gleiche Fluoreszenzbild zu beobachten.

Erythrosin und Heparin. In Erythrosin-Lösung sind Vakuolen mattgrün und Zellwände gelborange gefärbt. Vakuolen und Plasmafluoreszenz wechseln ab. Durch Zugabe von H wird das Färbebild nicht geändert.

Auswaschen mit Ammoniak. Mit Akridinorange gefärbte Zellen behandelt HÖFLER 1947 mit n/100 NH_3, um festzustellen, ob der Farbstoff im Zellsaft frei oder gebunden vorliegt. Ammoniak dringt leicht ein und macht den Zellsaft alkalisch. Wenn die Vakuole von freien Farbstoffionen erfüllt ist, dann werden sie zu Molekülen der Farbbase. Weil diese lipoidlöslich sind, können sie aus dem Zellsaft exosmieren. Sie werden dann im weniger alkalischen Bereich der Zellwand wieder ionisiert und werden von den negativ geladenen Zellulosemolekülen absorbiert.

Zellen, deren Vakuolen sich mit AO rot färben („leere Zellsäfte"), entfärben sich durch Ammoniakzusatz, wobei gleichzeitig eine rote Zellwandfluoreszenz auftritt.

Zellen der inneren Zwiebelepidermis, die mit AO + H-Gemisch behandelt wurden, leuchten nach Zugabe von n/100 NH_3 weiterhin in einem mattgrünen Farbton, allerdings etwas schwächer als vorher. Aus mattrotgrün fluoreszierenden Zellen verschwindet die rote Farbe vollkommen, niemals tritt — genau wie in Huminsäure-AO-Gemischen — nach Ammoniakzusatz eine Rotfärbung der Zellwände ein.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Zusammenfassung der bisherigen Versuche.

Vergleicht man die Fluorochromierungsstudien mit basischen, neutralen und sauren Farbstoffen in Anwesenheit von H mit denen, die MICHEL 1963 mit denselben Farbstoffen in Gegenwart von Huminsäure durchführte, so fällt das gleiche Ergebnis auf.

1. Bei Anwesenheit gesättigter H-Lösung in basischen Farbstofflösungen erscheinen die Schnitte im Hellfeld wie in konz. Huminsäure ungefärbt. Die Fluoreszenz ist weitgehend gehemmt.

2. Vakuolen, die durch AO rot fluoreszieren, zeigen bei H-Zusatz eine grüne bis gelbliche, manchesmal auch eine mattrote Fluoreszenz. Bei Huminsäurezusatz wird nur eine grüne bis gelbliche Fluoreszenz angegeben. Eine abgeschwächte Fluoreszenz tritt in allen untersuchten basischen Farbstoffgemischen bei Zusatz von H oder Huminsäure ein.

3. Im sauren Medium fluoreszieren Zellwände in AO + H-Gemischen sowie auch in AO + Huminsäuregemischen grün und niemals rot.

4. Die stärkere Färbung des Schnittrandes, die mit basischen Farbstoffen eintritt, unterbleibt sowohl bei H als auch bei Huminsäurezusatz.

5. Die Fluoreszenz mit Rhodamin B und Erythrosin ändert sich durch H- bzw. Huminsäurezusatz nicht.

6. Wäscht man die mit AO + H behandelten Schnitte mit NH_3 aus, so fluoreszieren die leeren Zellsäfte deutlich schwächer aber noch immer mattgrün. Sind die Zellen matt dunkelrot, so verschwindet die rote Fluoreszenz und die Vakuolen fluoreszieren mattgrün. Niemals leuchten die Zellwände rot. Zellen, die mit AO + Huminsäure behandelt wurden, fluoreszieren nach Zusatz von Ammoniak ebenfalls mattgrün.

Das Ausbleiben der Rotfluoreszenz in Gegenwart von Huminsäure erklärt MICHEL 1963: 475 dadurch, „daß keine oder zuwenig freie Farbstoffkationen zur Verfügung stehen, da sie möglicherweise an die sauren Gruppen der Huminsäure gebunden sind.“ Diese Annahme könnte auch auf H zutreffen.

3. Heparin im Guttationstropfen

Ob H von den Wurzeln aufgenommen und durch die Guttation ausgeschieden wird, sollte an *Avena*-Sämlingen beobachtet werden. Die in Wasser gequollenen Karyopsen wurden in einer 1%igen, einer 0,5%igen H-Lösung und in Wasser herangezogen. Die Kulturen wurden 4—7 Tage bei Zimmertemperatur in feuchter Kammer gehalten.

Die Keimlinge zeigten in der 1%igen Lösung nur ein schwaches Guttieren, in der 0,5%igen ein vollkommen normales. Die Guttationstropfen wurden mit einer Pipette abgenommen und gesammelt. Gibt man zu dem Exsudat der Keimlinge, die in H gezogen worden sind,

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

einen Tropfen Toluidinblau (1: 2000), so färbt es sich metachromatisch (rotviolett) und es tritt meist eine Fällung auf. Die Guttationsflüssigkeit der in Wasser gezogenen Keimlinge färbt sich mit Toluidinblau eindeutig blau.

Mit dem BECKMAN-Spektralphotometer Modell B wurden folgende Ansätze im Bereich von 350 mμ bis 650 mμ gemessen (Abb. 5).

1. Eine Toluidinblaulösung 10^{-5} (Kurve 1).
2. Doppelt verdünntes Guttationswasser mit Toluidinblau 10^{-5} (Kurve 2).

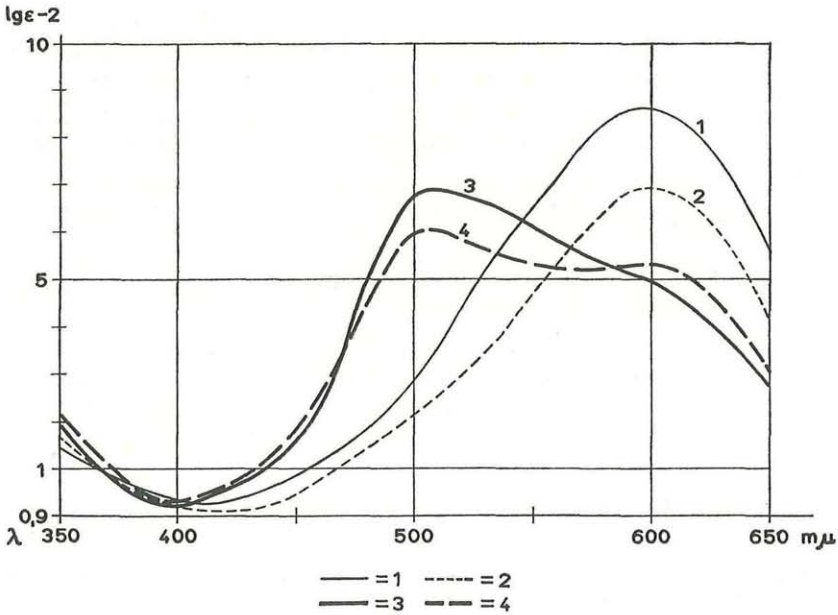

Abb. 5. Metachromasie des Toluidinblaus durch Heparin. Erklärung im Text.

3. 0,5% H-Lösung und Toluidinblau 10^{-5} (Kurve 3).
4. Doppelt verdünntes Guttationswasser der in 0,5%igem H gezogenen Keimlinge und Zusatz von Toluidinblau 10^{-5} (Kurve 4).

Kurve 1 ist durch ein Maximum bei 600 mμ charakterisiert. Dasselbe Maximum zeigt auch die Kurve 2. Zwischen 450 mμ und 500 mμ tritt aus unbekannten Gründen — vielleicht durch im Guttationswasser gelöste Stoffe — eine leichte Schulter auf. In der Kurve 3 ist der Bandenschwerpunkt von 600 mμ auf 500 mμ verschoben (metachromatischer Effekt). Statt des orthochromatischen Gipfels des Toluidinblaus findet sich eine schwache Ausbuchtung. Die 4. Kurve zeigt ebenfalls den metachromatischen Effekt, bei 600 mμ ist ein schwacher Gipfel vorhanden. JAQUES, BELL & CHO 1954 geben an, daß H noch in geringeren Mengen

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

als 0,1 mg metachromatisch wirkt. Nach eigenen Versuchen konnte ich die Metachromasie von Toluidinblau in einer Verdünnung von 3,8 γ H pro ml feststellen. Eine H-Lösung von 0,6 γ pro ml erscheint bei subjektiver Betrachtung nicht mehr metachromatisch. In der Absorptionskurve tritt in dieser Konzentration eine angedeutete Schulter auf. Die Erfaßbarkeitsgrenze für das H liegt daher bei Toluidinblau zwischen 0,6 γ und 3,8 γ pro ml, das ist also bei ungefähr weniger als 0,1 IE bis etwa 0,5 IE. Dieser Bereich deckt sich mit der von APPEL & ZANKER 1958 für H + AO festgestellten Erfaßbarkeitsgrenze von 0,2 bis 0,5 IE. Da das aus meßtechnischen Gründen $2^1/_2$ mal verdünnte Guttationswasser deutlich sichtbare Metachromasie zeigt, muß dessen H-Gehalt mindestens $3{,}8 \cdot 2.5 = 9{,}5$ γ im ml betragen. Im Guttationswasser konnte Flockung beobachtet werden, die mindestens gleich stark wie die in Lösung von $^1/_{500}$%, was einem H-Gehalt von über 20 γ entspricht. Gelegentlich beobachtete massive Flocken lassen auf zeitweise noch höheren H-Gehalt schließen.

Die H-Menge im Guttationstropfen ist erheblich geringer als in der Kulturflüssigkeit, was auf Schwierigkeiten in der H-Aufnahme hindeutet. Ob auch ein Abbau des H in der Pflanze beteiligt ist, kann derzeit nicht gesagt werden. Es scheint dies aber unwahrscheinlich, da nach JAQUES, BELL & CHO 1954 die metachromatische Aktivität des H sowohl von der Sulfatgruppe als auch vom Molekulargewicht abhängt.

Es ist bekannt, daß relativ großmolekulare, kompliziert gebaute organische Verbindungen, wie z. B. Huminsäure, von der Pflanze aufgenommen werden (PRÁT & POSPÍŠIL 1959, MICHEL 1963). Auch die Antibiotica Penicillin (Molekulargewicht 330) und Streptomycin (Molekulargewicht 581) können „trotz ihrer Organfremdheit im pflanzlichen Gewebe unverändert, als biologisch aktive Substanzen erhalten bleiben" (WINTER & WILLEKE 1951: 458). In Guttationsversuchen konnten WINTER & WILLEKE 1951 zeigen, daß Streptomycin aus wäßriger Lösung aufgenommen und ebenfalls nur in einem geringen Prozentsatz ausgeschieden wird.

Das Wurzelsystem der in H gezogenen Pflanzen ist gegenüber den Kontrollen stark gehemmt; es ist wenig verzweigt und viele der Wurzeln sind keulenartig verdickt. Die Form der Keulen erinnert an die C-Tumoren. Es ist bekannt, daß diese Gebilde sowohl durch Mitosegifte als auch durch Wuchsstoffe entstehen können (vgl. GEISSLER 1950). Die cytologische Untersuchung dieser H-Keulen ist im Gange.

4. Wie verhalten sich abgeschnittene Sprosse in Heparinlösungen?

Abgeschnittene Sprosse von *Impatiens Holstii, Solanum lycopersicum* und *Coleus hybridus* wurden in verschieden starke (1%, 0,5%, 0,3%, 0,1%ige) H-Lösungen eingestellt. Schon nach einer halben Stunde

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

beginnen sich die Blätter von *Impatiens* stark nach unten einzurollen, die von *Solanum lycopersicum* krümmen sich nach oben. Die Blätter von *Coleus* rollen sich erst nach 24-stündigem Stehen in den Lösungen nach oben ein, die Achselsprosse und die obersten Blätter bleiben unverändert. Nach 2 Tagen treten in den Interkostalfeldern helle Flecken auf. Die jungen Blätter werden an der Spitze glanzlos, verändern sich aber äußerlich nicht wesentlich. Sprosse von *Solanum lycopersicum* welken bereits in 0,01% und0,03% H, allerdings erst nach 24 Stunden, erholen sich aber nicht mehr, wenn man sie in reines Wasser zurückstellt (Abb. 2). *Impatiens*-Sprosse scheinen gegen H besonders empfindlich zu sein. Sie welken nach 48 Stunden noch in einer 0,007% Lösung (Abb. 3) und erholen sich nach 8 Tagen sogar in der H-Lösung. Nur die Blattspitzen der alten Blätter trocknen ein und sterben ab. Stellt man Tomatensprosse in einer 0,5%igen H-Lösung in dampfgesättigte Atmosphäre, so bleiben die Blätter uneingerollt; sie beginnen allerdings schon nach 30 Stunden von der Spitze und vom Blattrand her zu vergilben. Die Blattstiele senken sich nach unten (vgl. Abb. 4). Die Pflanzen scheinen besonders empfindlich zu sein und sind schon nach drei Tagen ganz vergilbt. Wasseraufnahme und Wasserabgabe sinken auf einen konstanten Wert.

Die Wirksamkeit der H-Lösung hängt sehr stark von der Temperatur ab. Ob dies nur auf die thermisch bedingte Abnahme der relativen Luftfeuchtigkeit zurückzuführen ist, müßte erst überprüft werden. Überträgt man eine bereits in H gewelkte *Impatiens*-Pflanze in 3-Oxy-5, 8, 10-Pyren-trisolfosaures Na, so steigt die Lösung in den Gefäßen auf. Es zeigt sich ein auffallender Unterschied gegenüber der Kontrolle; alle Blattnerven des im Wasser gestandenen Sprosses leuchten im UV hellgelbgrün; in den Blättern des „H-Sprosses" endet die fluoreszierende Zone ungefähr $2^1/_2$ cm von der Spitze und ungefähr 1 cm vom Blattrand entfernt.

Bekanntlich unterscheidet man ein toxigenes und ein physikalisch induziertes Welken (GÄUMANN & JAAG 1950). Bei jenem werden die Plasmagrenzschichten irreversibel geschädigt, während bei diesem das Welken hauptsächlich mechanisch bedingt ist. Die chemisch wirkenden Toxine gehören verschiedenen Stoffgruppen an und besitzen ein niederes Molekulargewicht; die Substanzen, die das physikalische Welken hervorrufen, weisen ein hohes Molekulargewicht auf.

HODGSON, RIKER & PETERSON 1945 sowie HODGSON, PETERSON & RIKER 1947, 1949, beobachteten zum ersten Mal physikalisches Welken, das durch Parasiten bedingt war. Sie isolierten aus Kulturen von *Agrobacterium tumefaciens* ein Glukosan mit einem Molekulargewicht von ungefähr 3.600. Eine 0,4%ige Lösung rief an abgeschnittenen Tomatensprossen Welken hervor. Auch mit Lösungen anderer hochmolekularer

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Substanzen konnte ein Welkeeffekt erzielt werden. Ihre Toxizität nimmt mit dem Molekulargewicht zu, das Welkebild kann verschieden sein. Inulin, Carbowachse, Polyvinylalkohole bis zum Molekulargewicht 40.000 erzeugen Symptome, die auch durch Lycomarasmin, ein Peptid, hervorgerufen werden können. Blattstiele und Sprosse bleiben turgeszent, während die Blätter geschädigt werden. Ein allgemeines Welken verursachen Xylan, Pektine und Agar. Zuerst werden die Blattstiele und Sprosse welk und erst dann die Fiederblätter. Dieses Krankheitsbild erinnert an die Welke, die durch Patulin, ein Chinon, entsteht. GÄUMANN & JAAG 1950 haben den Verlauf eines physikalisch induzierten Welkevorganges genau verfolgt. Sie verwendeten als Modellsubstanz Inulin mit einem Molekulargewicht von 5.000. Nach GÄUMANN & JAAG 1950 reagieren auf das physikalische Welken nahezu alle Pflanzen. Nur *Ricinus communis, Sparmannia africana* und *Solanum tuberosum* gaben ein zweifelhaftes Ergebnis, waren also inulin-resistent. Da H ein auffallend ähnliches Verhalten wie Inulin zeigt, überprüfte ich das Verhalten dieser drei Pflanzen in einer 0,4%igen H-Lösung. *Sparmannia africana* und *Solanum tuberosum* welken erst nach 24 Stunden. Die Blätter vertrocknen von der Blattspitze und vom Rand her. Stellt man den Kontrollsproß und den in H befindlichen ins Dunkle, vergilben nur die Blätter des Wassersprosses, die anderen vertrocknen. Von jungen *Ricinus*-Sprossen, die in 0,4%ige H-Lösung gestellt werden, wird auffallenderweise schon nach einer Stunde der obere Teil des Sprosses ganz schlaff, während die Blätter noch nicht welken. Am nächsten Tag ist der Sproß wieder turgeszent. Das Blatt ist am Rande deutlich heller gefärbt, auch in den Interkostalfeldern treten helle Flecken auf. An den Blattzähnen wird eine weiße Substanz ausgeschieden, die in Wasser gelöst, blau leuchtet und mit Toluidinblau einen Niederschlag bildet, der vermutlich auf H hinweist. Abgeschnittene Sprosse verschiedener Pflanzen (Monocotyle als auch Dicotyle) zeigten in H-Lösungen das oben beschriebene Welkebild. Die *Avena*-Keimpflanzen zeigen allerdings keine Welkeerscheinungen; vielleicht wird durch das Ausscheiden von Guttationswasser das Welken verhindert. Die Pflanzen blieben auch dann frisch, als die Guttation schon längst eingestellt war.

Gewebestreifenmethode und Randentest. Durch Toxine verkürzen sich die Gewebestreifen irreversibel in hypotonischen Lösungen, weil die Semipermeabilität der Plasmahaut gestört wird (GÄUMANN & al. 1952). Unter H-Einfluß wurden die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten von *Solanum lycopersicum* nicht gestört. In 1% und 0,5%iger Heparinlösung findet auch kaum ein Austritt von Anthozyan aus *Beta vulgaris*-Gewebe statt (vgl. Randentest GÄUMANN & al. 1952). Polysaccharide mit hohem Molekulargewicht hatten nach

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

GÄUMANN & al. 1952 keine Wirkung auf *Beta vulgaris*-Gewebe und zeigten auch keine Veränderungen der Gewebestreifen.

Demnach verhält sich H wie andere hochmolekulare Polysaccharide und stimmt in folgenden Punkten mit ihnen überein:

1. Das Wirtsspektrum ist unspezifisch.
2. Der Welkeeffekt ist irreversibel.
3. Die Wasseraufnahme und die Wasserabgabe wird gleichzeitig gedrosselt.
4. Gewebestreifenmethode und Randentest verlaufen negativ.

HODGSON, RIKER & PETERSON 1949 nehmen an, daß die äußersten Gefäße durch hochmolekulare Polysaccharide verstopft werden. Die welkeauslösende Wirkung ist auch bei H hauptsächlich mechanischer Art. Dafür spricht, daß der saure Fluoreszenzfarbstoff nicht in die äußersten Blattnerven gelangt. Trotzdem kann man sich nur der Ansicht von GÄUMANN & JAAG 1950: 242 anschließen, die nicht daran zweifeln, daß ein Verstopfungseffekt besteht, „nur glauben wir, daß er bloß einen Teil der physiologischen Vorgänge, die sich beim physikalisch induzierten Welken abspielen, erfaßt."

Gegen ein ausschließliches Verstopfen spricht die Aufnahme des H in Keimpflanzen. Es muß die Wurzelrinde und die Endodermis passieren und muß an die Gefäße abgegeben werden. Auch eine Erhöhung der Viskosität in *Allium Cepa*-Zellen und das Auftreten der Keulen bei *Avena*-Keimpflanzen spricht dagegen.

Zusammenfassung

1. Heparin wirkt in niederen Konzentrationen (unter 1%) nicht toxisch auf die pflanzliche Zelle. In 1%iger und 0.5%iger Lösung konnte nach 24 Stunden in Epidermiszellen von *Allium Cepa* eine Viskositätserhöhung festgestellt werden. *Spirogyra* zeigt in den gleichen Konzentrationen keine Änderung der Viskosität.

2. Fluorochromierungsstudien mit basischen, neutralen und sauren Farbstoffen in Gegenwart von Heparin zeigen gleiche Ergebnisse, wie sie MICHEL 1963 mit den gleichen Farbstoffen in Anwesenheit von Huminsäure erhalten hat.

3. *Avena*-Keimlinge guttieren in einer 1%igen und einer 0,5%igen Heparinlösung. Das Exsudat färbt sich mit Toluidinblau metachromatisch. Es kann daher angenommen werden, daß Heparin ausgeschieden wird. Aus spektrophotometrischen Messungen und der Flockungsintensität des Guttationswassers geht hervor, daß Heparin in erheblich geringerer Konzentration vorhanden ist als in der Kulturflüssigkeit. Dies läßt auf eine erschwerte Aufnahme schließen.

4. Die Wurzeln der Keimpflanzen sind oft keulig verdickt.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

5. Abgeschnittene Sprosse welken in Heparinlösungen und erholen sich auch in Wasser nicht mehr. Sie verhalten sich gleich wie Sprosse in Inulin (GÄUMANN & JAAG 1952) und anderen Polysacchariden (HODGSON, PETERSON & RIKER 1949).

6. Auf Grund der Fluorochromierungsstudien und der Guttationsversuche muß angenommen werden, daß das Heparin trotz des hohen Molekulargewichtes in die Zelle einzudringen vermag.

Schrifttum

APPEL W. & ZANKER V. 1958. Über die Bildung reversibler Assoziate des Acridinorange-Metachromasie — durch Heparin. — Z. Naturf. 13 b: 126—134.

DERRY B. H. E. 1929. Plasmolyseform- und Plasmolysezeit-Studien. — Protoplasma 8: 1—49.

FISCHER A. 1936. Über die Wirkung des Heparins auf das Wachstum von Gewebezellen in vitro. — Protoplasma 26: 344—350.

GÄUMANN E. & JAAG O. 1950. Über das toxigene und das physikalisch induzierte Welken. — Phytopath. Z. 16: 226—256.

— , NAEF-ROTH St., REUSSER P. & AMMAN A. 1952. Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. — Phytopath. Z. 19: 160—220.

GEISSLER G. 1950. Über die Wirkung von Mitosegiften, Wuchs- und Keimungshemmstoffen auf die Wurzelzellen von *Allium cepa*. — Naturwiss. 37: 141—142.

HEILBRUNN L. V. 1956. The Dynamics of living Protoplasm. — New York.

HODGSON R., PETERSON W. H. & RIKER A. J. 1947. The toxicity to tomato cuttings of several microbial and other polysaccharides. — Phytopath. 37: 9—10.

— — — 1949. The toxicity of polysaccharides and other large molecules to tomato cuttings. — Phytopath. 39: 47—62.

— RIKER A. J. & PETERSON W. H. 1945. Polysaccharide production by virulent and attenuated crown-gall bacteria. — J. Biol. Chem. 158: 89—100.

HÖFLER K. 1947. Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. — S. B. österr. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl. Abt. I, 156: 585—644.

HOWELL W. H. & HOLT E. 1918. Two new factors in blood coagulation — Heparin and Pro-Antithrombin. — Amer. J. Physiol. 47: 328—341.

JAQUES L. B., BELL H. J. and CHO M. H. 1954. The Physiology of Heparin. — I. Internationale Tagung über Thrombose und Embolie. Basel: 281—297.

JORPES E. 1935. The chemistry of Heparin. — Biochem. J. 29: 1817—1830.

KARLSON P. 1964. Biochemie. 4. Aufl. — Stuttgart.

KARRER P. 1959. Lehrbuch der organischen Chemie. 13. Aufl. — Stuttgart.

MCLEAN J. 1916. The thromboplastic action of cephalin. — Amer. J. Physiol. 41: 250—257.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

MICHEL E. 1963. Zur Analyse der Vitalfärbung in Gegenwart von Huminsäure (I. Vitalfluorochromierung pflanzlicher Zellen). — Protoplasma 56: 466—490.

PRÁT S. & POSPÍŠIL F. 1959. Humic acids with C^{14}. — Biol. Plant. 1: 71—80.

STRUGGER S. 1949 a. Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. — Berlin-Göttingen-Heidelberg.

— 1949 b. Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. — Hannover.

WEBER F. 1924. Plasmolyseform und Protoplasmaviskosität. — Österr. bot. Z. 73: 261—266.

— 1925. Über die Beurteilung der Plasmaviskosität nach der Plasmolyseform (Untersuchungen an *Spirogyra*). — Z. Mikrosk. 42: 146—156.

— 1929. Plasmolysezeitmethode. — Protoplasma 5: 622—624.

WINTER & WILLEKE 1951. Über die Aufnahmen von Antibioticis durch höhere Pflanzen und ihre Stabilität in natürlichen Böden. — Naturwiss. 38: 457—458.

WINTERSTEIN A. 1954. Symposium sur les macromolecules. — Centenaire de l'Institut National Genevois. 1954: 93.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1964

Band/Volume: 11_1_2

Autor(en)/Author(s): Thaler Irmtraud

Artikel/Article: Wirkung des Heparins auf die Pflanze. 108-120