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

Phyton (Austria)	Vol. 17	Fasc. 3—4	221—232	18. 8. 1976

Mikrospektralphotometrische Untersuchungen zum Mechanismus der Speicherung des kationischen Farbstoffs Malachitgrün durch die lebende Pflanzenzelle

Von

Ioannes Tsekos [1])

Aus dem Botanischen Institut der Universität Thessaloniki, Griechenland

Mit 6 Abbildungen

Eingegangen am 23. September 1975

Zusammenfassung

Aus Elektrophorese-Untersuchungen geht hervor, daß Malachitgrün ein rein kationischer Farbstoff ist, was mit der Konstitution des Farbstoffs übereinstimmt.

Rutin bedingt eine negative Metachromasie.

Plasma und Zellkern der Oberepidermis der Zwiebelschalen von *Allium cepa* zeigen nach Vitalfärbung mit Malachitgrün übereinstimmend ein ausgeprägtes Maximum bei ~626—630 nm sowie zwei breite Absorptionsbanden bei ~425 nm und ~315 nm. Die mit Malachitgrün vital gefärbten „vollen" Zellsäfte der Unterepidermis zeigen ein Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei ~633 nm.

Aus der Lage der Absorptionsmaxima und dem Verlauf der Absorptionskurven kann geschlossen werden, daß die Färbung des lebenden Plasmas und Zellkernes auf einer Anreicherung der Farbstoffteilchen in einem lipidartigen Milieu beruht. Die Speicherung in „vollen" Zellsäften beruht auf einer Komplexbildung zwischen Farbstoffteilchen und zelleigenen Flavonolen.

Summary

Microspectrophotometric Investigations on the Accumulation Mechanism of the Cationic Dyė Malachite Green by Living Plant Cells.

Electrophoretic investigations show that malachite green is a purely cationic dye, which is in absolute concurrence with the constitution of the dye.

[1]) Prof. Dr. I. Tsekos, Botanisches Institut der Universität Thessaloniki, Griechenland.

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

Rutin causes negative metachromasy.

After vital staining with malachite green both the plasma and the nucleus of cells from the upper epidermis of scale leaves of *Allium cepa* show a marked absorption maximum at ~626—630 nm as well as two wide absorption bands with maxima at ~425 nm and ~315 nm. After vital staining with malachite green the „full" cell saps of cells from the lower epidermis show absorption spectra with maximum at ~633 nm.

The position of the absorption maxima and the course of the absorption curves lead to the conclusion, that the staining of the living plasma and nucleus is due to an accumulation of dye particles in a lipid-like Milieu. The accumulation of "full" cell saps is due to a complex formation between dye particles and flavonoles genuine to the cell.

Einleitung

In ihren ausgedehnten Untersuchungen haben einerseits GUILLIERMOND und GAUTHERET (1940/46) und andererseits DRAWERT (1940) Malachitgrün als brauchbar für eine vitale Plasma- und Kernfärbung gefunden (vgl. auch ALBACH 1927, BECKER 1935, KINZEL & IMB 1961, TSEKOS 1970a). DRAWERT (1940) untersuchte die Verteilung des Farbstoffs in Abhängigkeit vom pH-Wert der wässerigen Farblösungen einerseits *in vivo* auf Plasma und Zellsaft der *Allium*-Zelle und andererseits *in vitro* zwischen organischen Lösungsmitteln und einer wässerigen Phase. Die Oberepidermen der Zwiebelschalen von *Allium cepa* speichern Malachitgrün ausschließlich im Plasma und Zellkern, die Unterepidermen dagegen vorwiegend in der Vakuole. Da Malachitgrün nicht die Zellwand färbt, ist es für mikrospektralphotometrische Messungen an den einzelnen Zellbestandteilen sehr brauchbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch vergleichende spektralphotometrische Untersuchungen an Farbstoff-Lösungen und an gefärbten lebenden Zellen den Bindungsmechanismus von Malachitgrün in den einzelnen Zellbestandteilen zu klären.

Methodik

Als Versuchsobjekte dienten die Ober- und Unterepidermen von *Allium cepa*. Die Zellen wurden mit Malachitgrün der Firma Merck in Leitungswasser in einer Konzentration 1/10.000 bzw. 1/100.000 5—6 Min. angefärbt. Die Absorptionsspektren lebender Zellen sind in Leitungswasser mit dem UMSP I (C. Zeiss, Oberkochen) aufgenommen worden. Die Vitalität der Zellen wurde durch Beobachtung der Plasmaströmung während der Messungen kontrolliert.

Die Absorption des Malachitgrüns in den verschiedenen Lösungsmitteln und deren Beeinflussung durch Rutinzusatz wurde mit dem Spektralphotometer PMQ II (C. Zeiss) gemessen. Näheres über die Methodik siehe TSEKOS (1969a, b, 1970a, b, c, 1972, 1973).

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

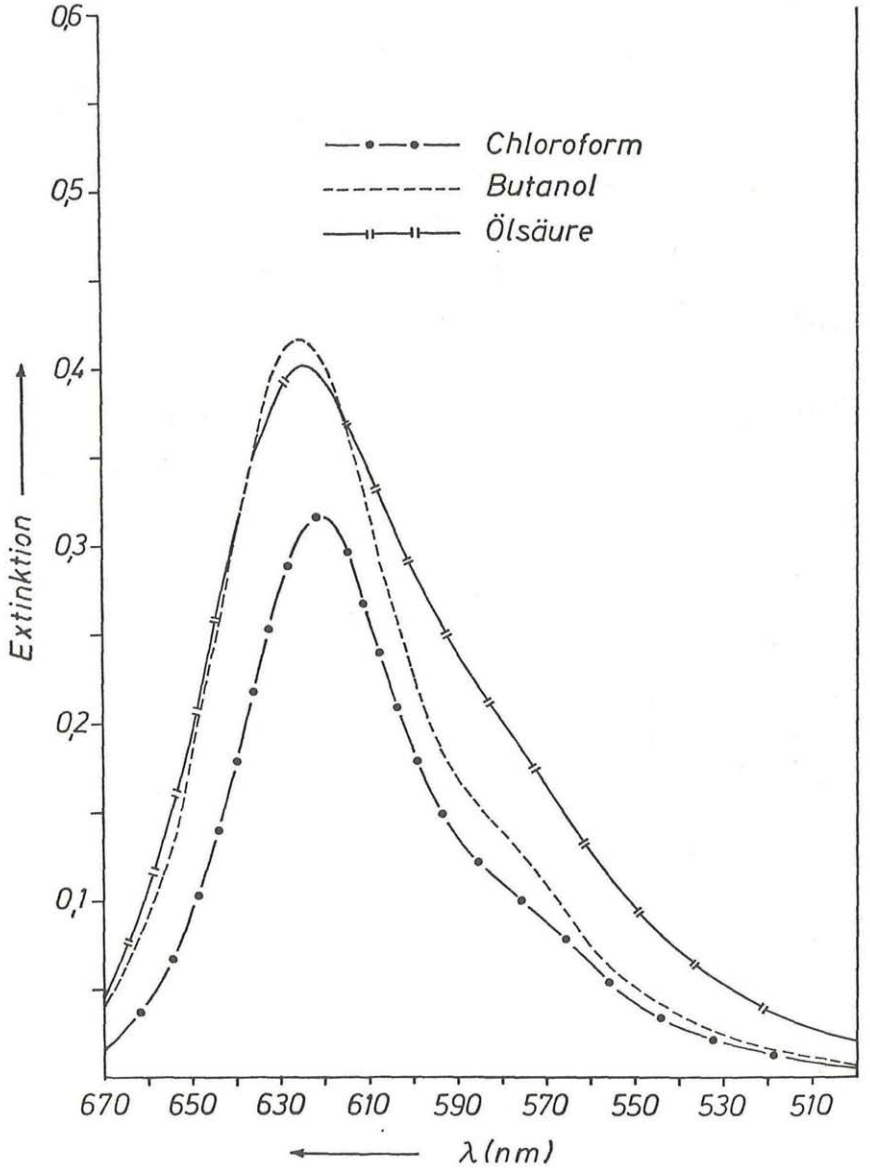

Abb. 1. Absorptionskurven von Malachitgrün in verschiedenen Solventien. Die Lösungen wurden durch Ausschütteln des Farbstoffs aus 1/200.000 wässeriger Phase mit pH ~7,0 gewonnen

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

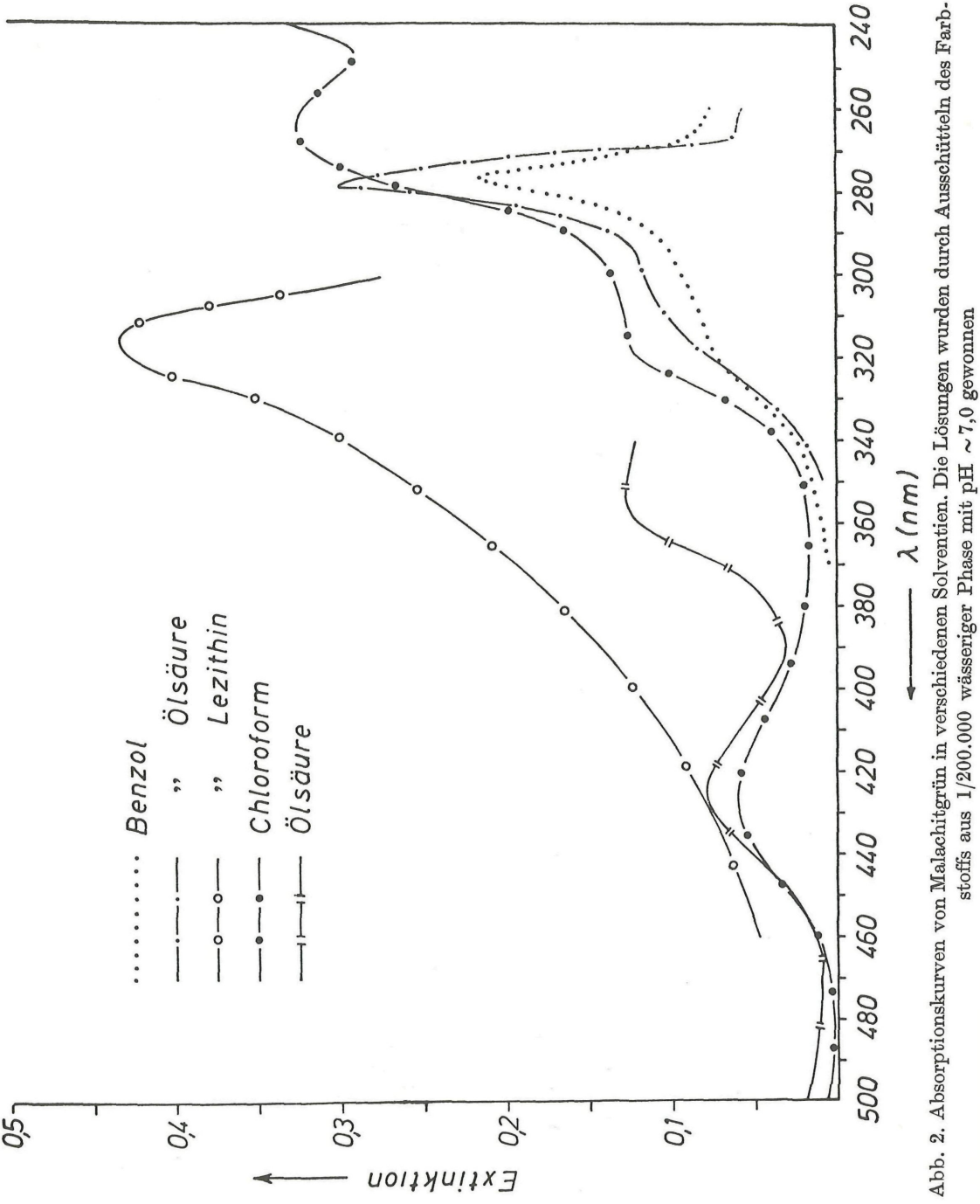

Abb. 2. Absorptionskurven von Malachitgrün in verschiedenen Solventien. Die Lösungen wurden durch Ausschütteln des Farbstoffs aus 1/200.000 wässeriger Phase mit pH ~7,0 gewonnen

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

Resultate

I. Eigenschaften des Farbstoffs

a) Reinheitsgrad

Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung auf Kieselgel G-Schichten mit Butanol-Äthanol-Wasser (90+10+10) als Fließmittel tritt neben der blaugrünen Hauptkomponente noch eine blaugrüne Fahne auf.

b) Verhalten im Elektrophoreseversuch

Übereinstimmend mit der Konstitution des Malachitgrüns (HARMS 1965, DRAWERT 1968, S. 47) erweist er sich im Elektrophoreseversuch als rein kationischer Farbstoff (Tab. 1). Das amphotere Verhalten von Malachitgrün (INGRAHAM & VISSCHER 1935, DRAWERT 1940, 1968 und die dort angegebene Literatur) soll mit DRAWERT (1968) auf Beimengungen in den handelsüblichen Präparaten zurückgeführt werden.

c) Absorptionsspektren

In den organischen Lösungsmitteln gelöst zeigt Malachitgrün folgende Absorptionsmaxima (Abb. 1 und 2): 276 nm in Benzol, 621 nm und 263 nm in Chloroform, 625 nm in Butanol und Ölsäure, 315 nm in Benzol+Lezithin und 278 nm in Benzol+Ölsäure. Aus den Abb. 1 und 2 geht hervor, daß die Natur des Lösungsmittels regelmäßig einen gewissen Einfluß nicht nur auf die Lage der Absorptionsbanden ausübt, sondern auch auf die Beschaffenheit des Absorptionsspektrums.

Tabelle 1

Papierelektrophorese von Malachitgrün

pH	cm in Richtung Kathode
1,9	4,5
3,9	2,0
5,7	1,9
6,8	1,4
8,5	1,2
10,5	1,0

Für Rückschlüsse auf die Zustandsform des Malachitgrüns in der lebenden Zelle aus Absorptionsspektren ist noch der Einfluß anderer Stoffe auf das Absorptionsspektrum des Malachitgrüns *in vitro* von Interesse (vgl. auch TSEKOS & KARATAGLIS 1975). Da bei der Speicherung kationischer Farbstoffe im Zellsaft Flavonole eine Rolle spielen, wurde auch der Einfluß

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

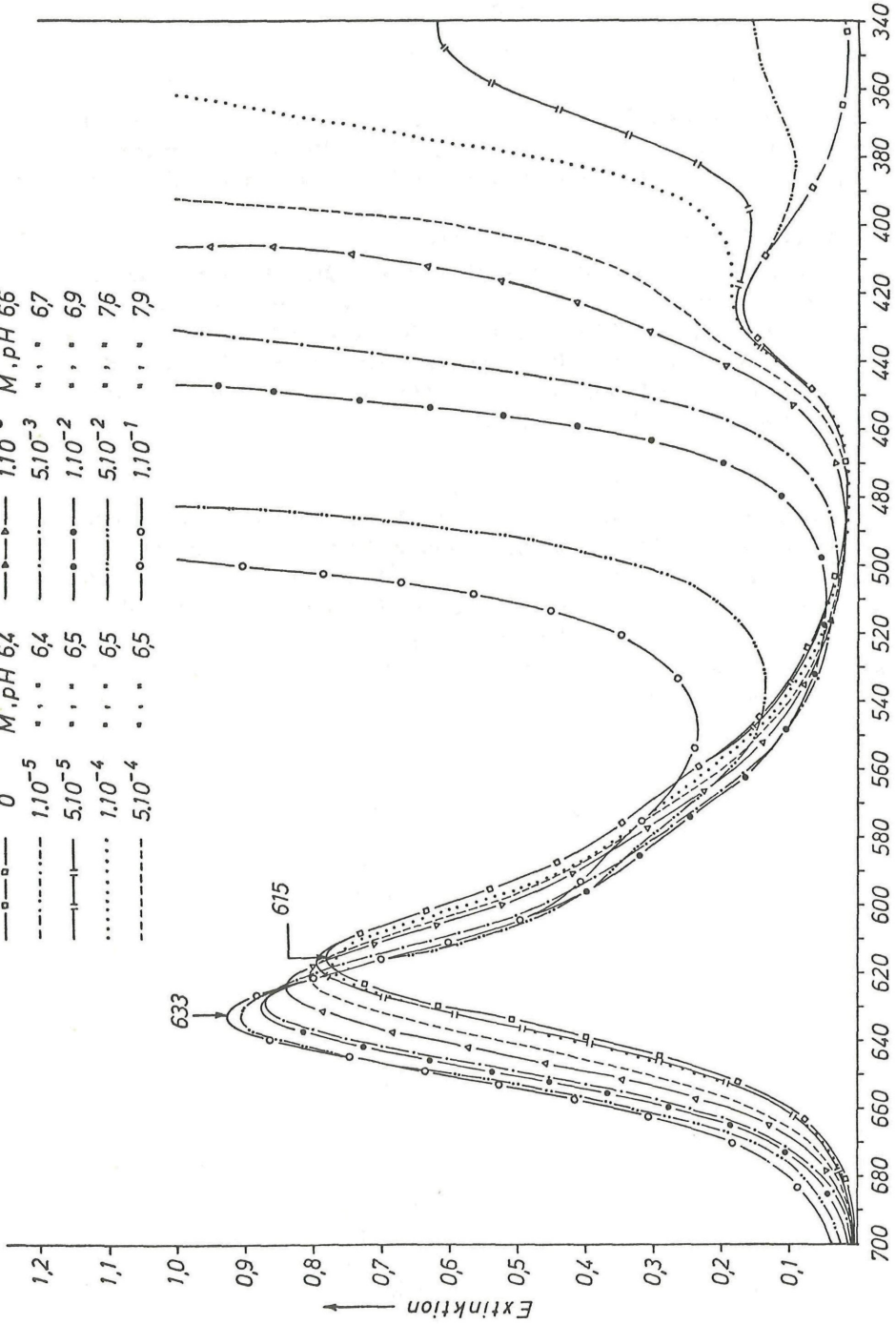

Abb. 3. Absorptionskurven von 1/200.000 Malachitgrün in Rutinlösungen verschiedener Konzentration

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

von Rutin (Na-Salz des Rutin-Schwefelsäure-Esters, Merck) untersucht. Das Absorptionsmaximum einer 1/200.000 Malachitgrün-Lösung in Phosphatpuffer (2/375 Mol/l KH_2PO_4+1/750 Mol/l Na_2HPO_4) wird durch Rutin kontinuierlich mit steigender Konzentration von 615 nm (Maximum der monomeren Farbkationen, M-Bande) bis zu einer Wellenlänge von 633 nm verschoben (Abb. 3; negative Metachromasie, Verbindungsbande V-Bande; Kinzel 1959, Bock 1964, Tsekos 1969b, 1970a, b, c, 1972, 1973, Stadelmann & Kinzel 1972 und die dort angegebene Literatur, Tsekos & Karataglis 1975).

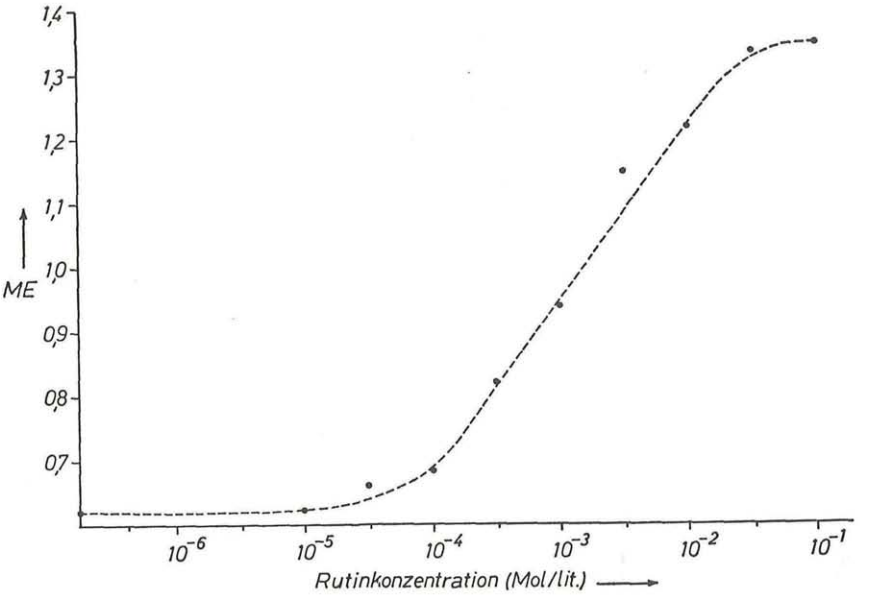

Abb. 4. Die Metachromasiegrade von 1/200.000 Malachitgrün in verschiedenen konzentrierten Rutinlösungen

Rutin bedingt nach den Messungen eine negative Metachromasie. Berechnet man nach Wiame (1947) aus den Extinktionswerten bei 633 nm und 615 nm die Metachromasiegrade $ME^- = E_{633}/E_{615}$, so ergibt sich ab 10^{-5} Mol/l Rutin mit zunehmender Konzentration ein Anstieg des Metachromasiegrades (Abb. 4). Die Metachromasie nähert sich, wie zu erwarten ist, einen Endwert.

II. Absorptionsspektren der vitalgefärbten Zelle

Sowohl Plasma als auch Zellkern der Oberepidermiszellen der Schuppenblätter von *Allium cepa* zeigen nach einer Vitalfärbung mit Malachitgrün übereinstimmend ein ausgeprägtes Maximum bei ~626—630 nm sowie zwei breite Absorptionsbanden mit Maxima bei ~ 425 nm und ~315 nm. Die

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

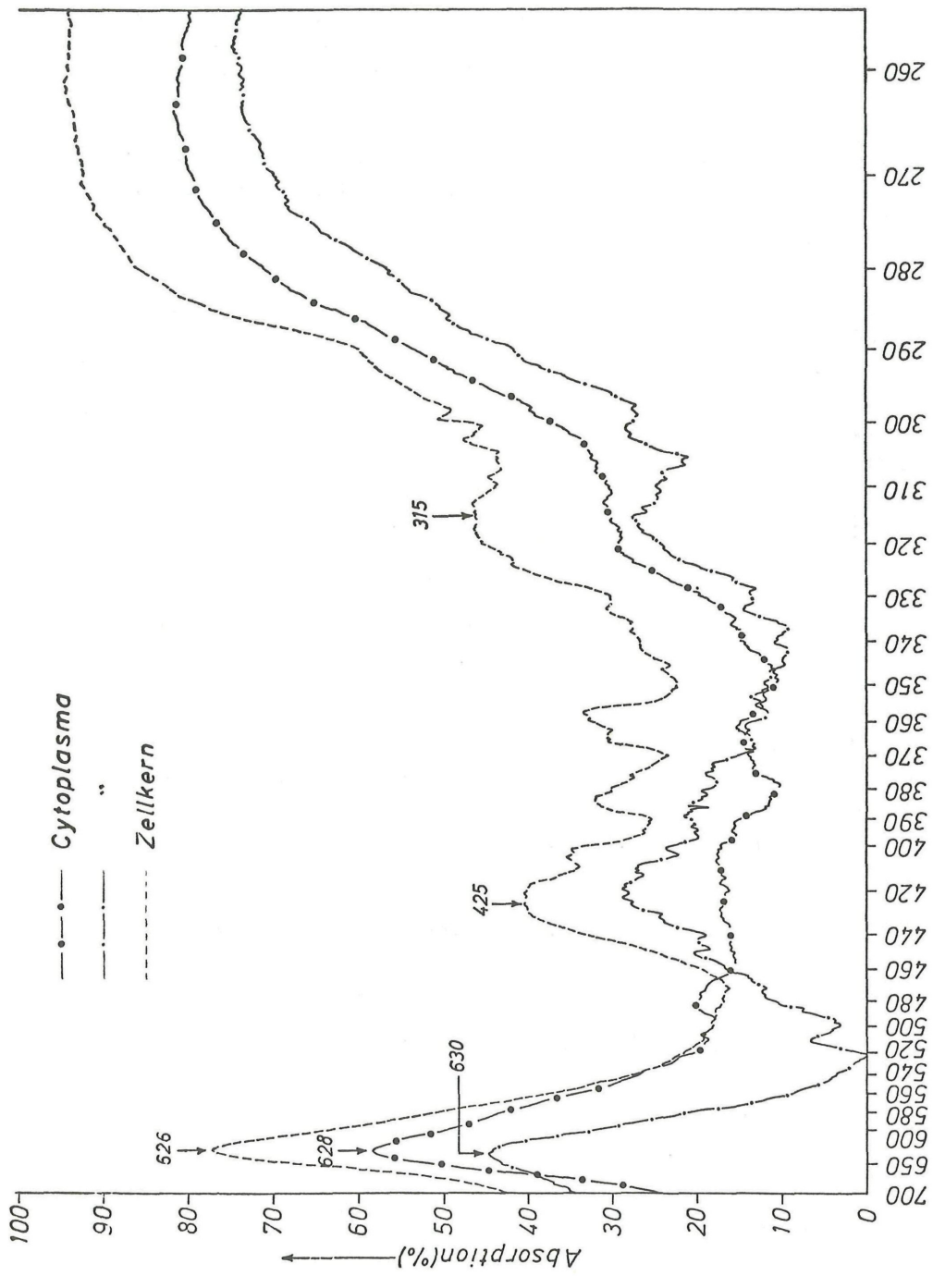

Abb. 5. Absorptionskurven von Cytoplasma und Zellkern der oberen Epidermiszellen der Zwiebelschalen von *Allium cepa*-Schuppenblättern mit „leerem" Zellsaft nach einer Vitalfärbung mit Malachitgrün

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

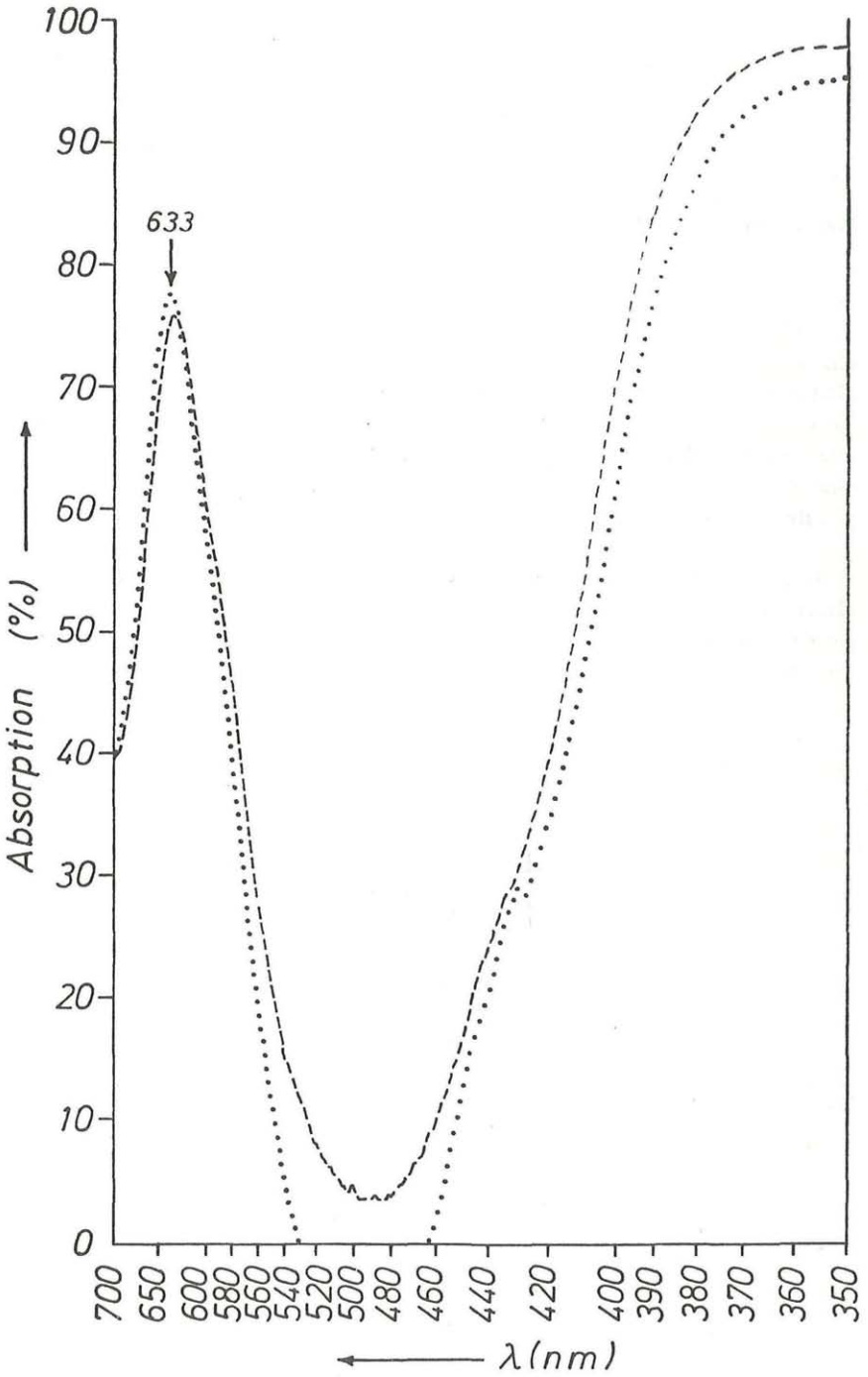

Abb. 6. Absorptionskurven des „vollen" Zellsaftes in den Unterepidermiszellen der Zwiebelschalen von *Allium cepa* nach einer Vitalfärbung mit Malachitgrün

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

Kurven in Abb. 5 lassen im UV die starke Absorption von Eiweiß, RNS und DNS erkennen.

Der mit Malachitgrün gefärbte „volle" Zellsaft (Drawert 1968 und die dort angegebene Literatur, Tsekos & Karataglis 1975) der Unterepidermiszellen der Zwiebelschalen von *Allium cepa* weist ein Absorptionsmaximum bei ~633 nm auf (Abb. 6).

III. Diskussion

Plasma und Zellkern zeigen nach einer Vitalfärbung mit Malachitgrün ein ausgeprägtes Maximum bei ~626—630 nm. Nach der Lage dieses Maximums und nach dem Verhalten des Malachitgrüns in wässerigen Lösungen verschiedener Konzentration (siehe Michaelis und Granick 1945, Lillie 1969 und die dort angegebene Literatur) ist sehr wahrscheinlich eine Anreicherung der Farbstoffteilchen in der wässerigen Phase des Protoplasmas auszuschließen.

Vergleicht man die Absorptionskurven des vital gefärbten Plasmas und Zellkerns (Abb. 5) mit den *in vitro* gewonnenen (Abb. 1, 2 und 3, siehe auch Michaelis & Granick, Lillie 1969 und die dort angegebene Literatur), so zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit den Farblösungen, die durch Ausschütteln des Farbstoffs mit Butanol, Ölsäure und Benzol+Lezithin (1%) aus einer wässerigen Lösung mit pH ~7,0 erhalten worden sind.

Es ist deshalb anzunehmen, daß es sich bei der vitalen Protoplasmafärbung mit Malachitgrün um eine Anreicherung der Farbstoffteilchen in einem lipidartigen Milieu des lebenden Plasmas handelt (vgl. auch Drawert 1940, 1948, 1956, 1968, Scharf 1956, Hölzl & Bancher 1967, Tsekos 1969a, b, 1970a, b, 1972, 1973, Tsekos & Kristen 1969, Kristen & Tsekos 1971, Stadelmann & Kinzel 1972, Tsekos & Karataglis 1975).

Durch Zusatz von Rutin wird das Absorptionsmaximum der monomeren Farbkationen (Abb. 3) zur langwelligen Seite des Spektrums hin verschoben. Dabei kann es sich nur um eine Komplexbildung zwischen Malachitgrün und Rutin handeln.

Aus dem Vergleich der Abb. 3 mit Abb. 6 geht hervor, daß die Zellsaftfärbung auf einer Komplexbildung zwischen Farbkationen und zelleigenen Flavonolen (Herrmann 1958, Bancher & Hölzl 1960, Tsekos 1969b, 1970a, b, c, 1972, 1973, Tsekos & Karataglis 1975) beruht.

Herrn A. Soumpos danke ich für die Umzeichnung der Abbildungen.

Schrifttum

Albach W. 1927. Über vitale Kern- und Protoplasmafärbung pflanzlicher Zellen. — Z. wiss. Mikrosk. 44: 333—334.

Bancher E. & Hölzl J. 1960. Die Umwandlung leerer in volle Zellsäfte bei *Allium cepa* in Beziehung zur Flavonolbildung (Spektrophotometrische und mikrospektrographische Messungen). — Flora 149: 396—425.

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

Becker W. A. 1935. Experimentelle Untersuchungen über die Vitalfärbung sich teilender Zellen. 2. Mitt.: Zytoplasmafärbung mit Azofarbstoffen, vitale Mehrfärbungen. — Cytologia 6: 337—353.

Bock U. 1964. Untersuchungen zum Mechanismus der Vakuolenfärbung pflanzlicher Zellen mit basischen Farbstoffen. — Flora 154: 99—135.

Drawert H. 1940. Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. — Flora 134: 159—214.

— 1948. Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. V. Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. — Z. Naturforsch. 3b: 111—120.

— 1956. Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung. — In W. Ruhland, Handb. Pflanzenphysiol. 2: 252—289.

— 1968. Vitalfärbung und Vitalfluorochromierung pflanzlicher Zellen und Gewebe. — Protoplasmatologia II/D/3. Wien—New York.

Guilliermond A. & Gautheret R. 1940/46. Recherches sur la coloration vitale des cellules végétales. Libr. gén. de l'Enseignement, Paris (außerdem in Rev. gén. bot. 52 (1940) und 53 (1946)).

Harms H. 1965. Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie. Kamp-Lintfort.

Herrmann K. 1958. Über die Flavonole und Phenole der Zwiebel (*Allium cepa*). Arch. Pharm. 291: 238—247.

Hölzl J. & Bancher E. 1967. Zur Physikochemie der vitalen Kern- und Plasmafluorochromierung von *Allium cepa*-Epidermen. — Protoplasma 64: 157—184.

Ingraham R. C. & Visscher M. B. 1935. Studies on the elimination of dyes in the gastric and pancreatic secretions and inferences therefore concerning the mechanisms of secretion of acid and base. — J. gen. Physiol. 18: 695—716.

Kinzel H. 1959. Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe. — Protoplasma 50: 1—50.

— und Imb R. 1961. Über Vitalfärbung stark saurer Zellsäfte und eine Methode zur pH-Bestimmung *in vivo*. — Protoplasma 53: 422—437.

Kristen U. & Tsekos I. 1971. Versuch einer Feinstrukturanalyse der durch Chrysoidin verursachten Plasmaentmischungen in Oberepidermiszellen der Zwiebelschalen von *Allium cepa*. — Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP) 162: 111—118.

Lillie R. D. 1969. H. J. Conn's biological stains. — Baltimore.

Michaelis L. & Granick S. 1945. Metachromasy of basic dyestuffs. — J. amer. chem. Soc. 67: 1212—1219.

Scharf J.-H. 1956. Fluoreszenz und Fluoreszenzpolarisation der Nervenfaser nach Färbung mit Phenyloxyfluoronen. Versuch einer Interpretation. I. Teil. II. Teil. — Mikroskopie 11: 261—319, 349—397.

Stadelmann E. J. & Kinzel H. 1972. Vital staining of plant cells. — In D. M. Prescott: Methods in cell physiology, vol. V, p. 325—372. New York—London.

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

TSEKOS I. 1969a. Mikrospektralphotometrische Untersuchungen an den Oberepidermen der Schuppenblätter von *Allium cepa* nach Färbungen mit den Oxyfluoronen Na-Fluorescein, Eosin und Erythrosin. — Flora, Abt. A, 159: 519—535.

— 1969b. Mikrospektralphotometrische Untersuchungen zum Speichermechanismus des amphoteren Oxazinfarbstoffs Prune pure durch die lebende pflanzliche Zelle. — Protoplasma 67: 249—267.

— 1970a. Mikrospektralphotometrische Untersuchungen zum Speichermechanismus einiger kationischer und anionischer Farbstoffe durch die lebende pflanzliche Zelle. — Habilitationsschrift (griech.), Thessaloniki.

— 1970b. Mikrospektralphotometrische Untersuchungen an lebenden Zellen der Schuppenblattoberepidermen von *Allium cepa* nach Acridinorange-Färbung. — Mikroskopie 26: 30—40.

— 1970c. Mikrospektralphotometrische Untersuchungen an lebenden Zellen der Schuppenblattoberepidermen von *Allium cepa* nach Toluidinblau O- und Nilblauchlorid-Färbung. — Protoplasma 71: 173—190.

— Mikrospektralphotometrische Untersuchungen an lebenden Zellen der Schuppenblattepidermen von *Allium cepa* nach Färbung mit den Triphenylmethanfarbstoffen Methyl-, Gentiana- und Kristallviolett. — Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP) 163: 344—362.

— Mikrospektralphotometrische Untersuchungen zum Speichermechanismus der kationischen Farbstoffe Viktoriablau B und 4R durch die lebende und tote Pflanzenzelle. — Histochemie 36: 201—217.

— & KARATAGLIS S. 1975. Mikrospektralphotometrische Untersuchungen zum Mechanismus der Speicherung der Xanthenfarbstoffe Rhodamin B, 6GO und 3GO durch die lebende Pflanzenzelle. — Mikroskopie 31: 155—173.

— & KRISTEN U. 1969. Mikrospektralphotometrische Untersuchungen zum Speichermechanismus des kationischen Farbstoffes Chrysoidin durch die lebende und tote Pflanzenzelle. — Ber. dtsch. bot. Ges. 82: 577—588.

WIAME J. M. 1947. The metachromatic reaction of hexametaphosphate. — J. amer. chem. Soc. 69: 3146—3147.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1976

Band/Volume: 17_3_4

Autor(en)/Author(s): Tsekos Ioannes

Artikel/Article: Mikrospektrometrische Untersuchungen zum Mechanismus der Speicherung des kationischen Farbstoffs Malachitgrün durch die lebende Pflanzenzelle. 221-232