

Chemische Untersuchungen an Wundgewebe bei der Eibe (*Taxus baccata* L.)

Von

LADISLAV KUČERA

Institut für Mikrotechnologische Holzforschung der ETH Zürich

Einleitung

In einer früheren Arbeit (L. KUČERA 1971) wurden Beschädigungen an Eibe (*Taxus baccata* L.) durch Spechte (Picidae) beschrieben mit dem Ziel, das makroskopische Schadenbild und die anatomischen Veränderungen im Xylem und Phloem zu erfassen. Die durchgeführten mikroskopischen und mikrochemischen Untersuchungen haben qualitative Veränderungen in der Beschaffenheit der Zellwände und des Zellinhaltes des Wundgewebes gegenüber dem normalen Holz gezeigt. In der vorliegenden Arbeit wird das Mass dieser Veränderungen quantitativ untersucht. Die Zellinhaltsstoffe werden in mit Benzol-Äthanol beziehungsweise mit heissem Wasser extrahierbare unterteilt. Der polysaccharidische Anteil der Zellwände wird durch Hydrolyse quantitativ bestimmt und das Hydrolysat papierchromatographisch auf die Monosaccharid-Zusammensetzung untersucht. Schliesslich wird der kristalline Aufbau der Zellwand röntgenometrisch untersucht.

Material und Methoden

Als Untersuchungsmaterial wurden Scheiben aus der schon früher beschriebenen (L. KUČERA 1971) spechtgeringelten Eibe (*Taxus baccata* L.) verwendet. Versuchsanordnung: Probe 1: Splintholz, Probe 2: normales Holz (Muster mit natürlichem Anteil von Kern- und Splintholz), Probe 3: Kernholz, Probe 4: Wundgewebe. Die Holzstücke für die Proben 1–3 wurden ausgesägt, gemahlen und gesiebt; diese Proben waren frei von Verletzungen. Das Material für Probe 4 wurde mittels eines Skalpellens unter einer Stereolupe aus den Holzstückchen ausgeschnitten und anschliessend gesiebt. Die Mengen der analysierten Proben wurden auf je 1 g beschränkt (Isolierungsschwierigkeiten bei Probe 4).

Für die Trockensubstanzbestimmungen wurden in einem Vorversuch zwei Methoden verglichen:

1. Die gewöhnliche (Trockenschrank).
2. Im HF-Feld. Bei dieser Methode wurde ein Hochfrequenzgenerator Philips Typ SFG 150/21 mit einer Präzisionswaage zusammengebaut und so gleichzeitig Austrocknung und Gewichtsbestimmung ermöglicht (Abb. 1). Eine ähnliche Anlage beschreibt J. VODOZ (1956, 1957).

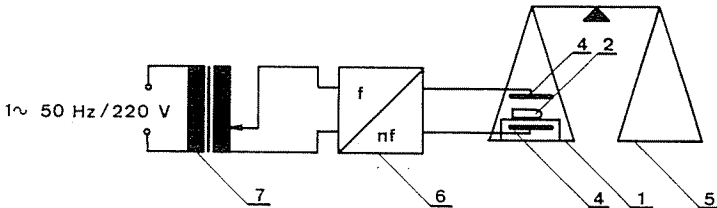


Abb. 1. Schema der Anlage für Trockensubstanzbestimmungen im hochfrequenten Wechselfeld.

- | | |
|---------------------|------------------|
| 1 = Plexiglasbrücke | 2 = Soxhlethülse |
| 3 = Transformator | 4 = Elektroden |
| 5 = Waage | 6 = HF-Generator |

Die zweite Methode hat sich als genauer erwiesen und wurde daher für sämtliche Gewichtsbestimmungen verwendet. Durch die Anordnung der HF-Anlage entstanden im Innenraum der Waage elektrostatische Felder, die die Messungen beeinflussten. Die Grösse des Fehlers war abhängig von der verwendeten Spannung. Der zweite Faktor, der die Grösse des Fehlers beeinflusste, war die senkrechte Position der Waagschale. Diese ist gegeben durch das Gewicht der Probe abzüglich volle Gramme (zum Beispiel gleiche Korrektion für 20,1040 und 25,1040 g). Das Gewicht der Probe abzüglich volle Gramme wird als Aktivgewicht bezeichnet und ist die unabhängige Variable für die Korrektion. Das Ausmass dieser Abweichung wurde in einem Vorversuch für beide verwendeten Transformatorenspannungen 120 V und 150 V festgestellt. Aufgrund des Vorversuches wurden Korrektionskurven aufgestellt und die Ergebnisse des Hauptversuches entsprechend korrigiert (Abb. 2). Die Genauigkeit dieser Methode beträgt $\pm 0,5$ mg.

Durch die Benzol-Äthanolextraktion wurden aus den Proben Wachse, Fette, Harze, Öle sowie evtl. andere Bestandteile herausgelöst; bei der Heisswasserextraktion waren es die Tannine, Gummi, Zucker, Farbstoffe und Stärken (L. E. WISE 1944). Beide Extraktionen wurden nach ASTM-Standards 1968 ausgeführt. Die Hydrolyse des extrahierten Holzmehls wurde wie bei M. A. JERMYN (1955) beschrieben ausgeführt. Für das Neutralisieren und Reinigen des Hydrolysats wurden die Angaben von B. W. SIMSON und T. E. TIMELL (1967) befolgt. Das neutrale Hydrolysat wurde in einem Rotationsverdampfer auf 10 ml eingengt und im Kühlschrank aufbewahrt. Für die qualitative Bestimmung der im Hydrolysat vorhandenen Monosaccharide wurde absteigende Papierchromatographie angewendet. Die fünf in den Hydrolysaten enthaltenen Monosaccharide D-Galactose, D-Glucose, D-Mannose, L-Arabinose und D-Xylose wurden mit 1% igen Standardlösungen der entsprechenden Monosaccharide verifiziert. Für die quantitative Bestimmung der Monosaccharid-Mengen im Hydrolysat wurde die Methode ansteigender Probe- und abnehmender Standardmengen

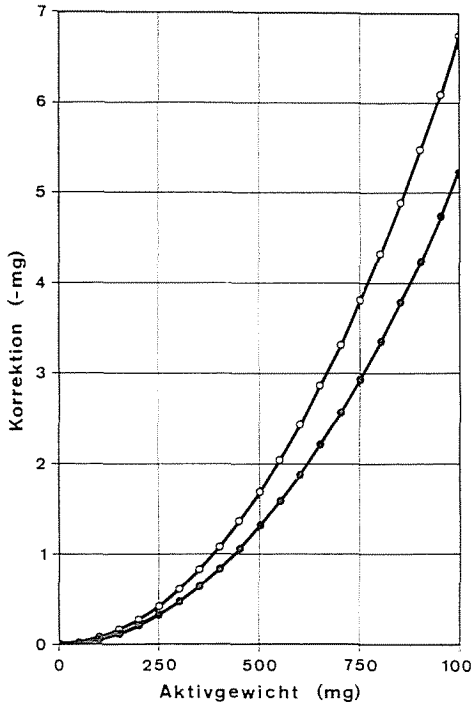


Abb. 2. Korrektionskurven für die HF-Trocknung bei Transformatorspannung 120 V (●—●) und 150 V (○—○).

verwendet (I. M. HAIŠ und K. MACEK 1958). Die Zusammensetzung der Standardlösung findet man bei B. W. SIMSON und T. E. TIMELL (1967). Als Laufmittel wurde ein Gemisch Äthylacetat, Pyridin, Wasser 8:2:1 (V/V) verwendet. Die Laufzeit betrug 28–52 Stunden. Als Nachweismittel wurde p-Anisidin-Hydrochloridlösung nach J. B. PRIDHAM (1956) im Tauchverfahren verwendet. Die luftgetrockneten Chromatogramme wurden im Trockenschrank bei 105°C während 7 Minuten entwickelt.

Für die röntgenometrische Untersuchung des kristallinen Aufbaus des Wundgewebes wurden 35 μm dicke Tangentialschnitte vorbereitet. Als Vergleichsobjekt dienten Tangentialschnitte aus gesundem Holz. Die Röntgenaufnahmen wurden mittels einer GUINIER-Kamera DE WOLFF II aufgenommen. Die Expositionszeit betrug mit Rücksicht auf die Schnittdicke 8 und 16 Stunden (E. CORRENS, W. WERGIN und CH. RUSCHER 1956 arbeiteten mit 0,5 mm dicken Schnitten).

Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Extraktionen und der Hydrolysen sind in Abb. 3 dargestellt und in Tab. 1 zusammengefasst. Vom Splintholz über das Kernholz zum Wund-

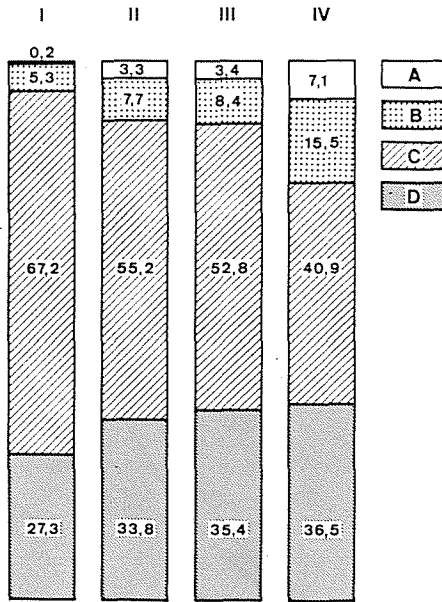


Abb. 3. Ausbeute bei Extraktionen und Hydrolyse des normalen Holzes und Wundgewebes bei Eibe (*Taxus baccata* L.).

- I = Splintholz
- II = normales Holz
- III = Kernholz
- IV = Wundgewebe
- A = Benzol-Äthanol-extrahierbare Stoffe
- B = Heisswasserextrahierbare Stoffe
- C = Anteil der Polysaccharide an der Zellwand
- D = unlöslicher Rest (Lignin u.a.)

gewebe kann eine deutliche Zunahme des prozentualen Anteils von Extraktstoffen und des unhydrolysierbaren Anteils (Lignin u.a.), dagegen eine Abnahme des polysaccharidischen Anteils der Zellwand festgestellt werden.

Ähnliche Werte wie bei der Probe 2 (normales Holz) fand für das Holz von *Pseudotsuga douglasie* A. J. BAILEY (1936b: Alkohol-Benzol-extrahierbare Stoffe 7,20%, heisswasserextrahierbare Stoffe 7,80%, Ligningehalt 33,76%).

Die alterungsbedingte Abnahme der Ligninbildung stellte PH. R. LARSON (1966) bei *Pinus resinosa* fest. Jedoch beschränkt sich diese Angabe auf die «juvenile» Periode des Baumwachstums (15–20 Jahre). Auch W. A. CÔTÉ Jr., A. C. DAY, B. W. SIMSON und T. E. TIMELL (1966) stellten bei der Lärche (*Larix laricina*) einen höheren Ligningehalt im Kernholz gegenüber dem Splintholz fest. Eine Erklärung für den höheren Ligningehalt des Kernholzes liegt in der Tatsache, dass die Markstrahlparenchymzellen erst an der Splint/Kernholzgrenze lignifiziert werden, wie das in Untersuchungen von J. J. BALATINECZ und R. V. KENNEDY (1967) bei mehreren Nadelhölzern und von R. K. BAMBER und G. W. DAVIES (1969) bei *Pinus radiata* im UV-Licht gezeigt wurde. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bestätigen diese Feststellungen: Das Kernholz (Probe 3) enthielt mehr Lignin als das Splintholz (Probe 1).

Tabelle 1. Ausbeute bei Extraktionen und Hydrolyse des normalen Holzes und Wundgewebes bei der Eibe (*Taxus baccata* L.)

Nr. Fraktion		Gewicht (g)	Anteil (%) an	
			Ausgangs- material	extrakt- freiem Holz
1. Splintholz				
1	Benzol-Äthanol-extrahierbare Stoffe	0,0022	0,22	—
2	Heisswasserextrahierbare Stoffe	0,0525	5,34	—
3	Anteil der Polysaccharide an der Zellwand	0,6609	67,18	71,13
4	Unlöslicher Rest (Lignin u.a.)	0,2682	27,26	28,87
	Ausgangsmaterial	0,9838	100,00	100,00
2. Normales Holz				
1	Benzol-Äthanol-extrahierbare Stoffe	0,0333	3,36	—
2	Heisswasserextrahierbare Stoffe	0,0763	7,71	—
3	Anteile der Polysaccharide an der Zellwand	0,5458	55,14	62,01
4	Unlöslicher Rest (Lignin u.a.)	0,3344	33,79	37,99
	Ausgangsmaterial	0,9898	100,00	100,00
3. Kernholz				
1	Benzol-Äthanol-extrahierbare Stoffe	0,0341	3,40	—
2	Heisswasserextrahierbare Stoffe	0,0843	8,40	—
3	Anteil der Polysaccharide an der Zellwand	0,5298	52,77	59,83
4	Unlöslicher Rest (Lignin u.a.)	0,3557	35,43	40,17
	Ausgangsmaterial	1,0039	100,00	100,00
4. Wundgewebe				
1	Benzol-Äthanol-extrahierbare Stoffe	0,0664	7,08	—
2	Heisswasserextrahierbare Stoffe	0,1452	15,49	—
3	Anteil der Polysaccharide an der Zellwand	0,3838	40,93	52,87
4	Unlöslicher Rest (Lignin u.a.)	0,3422	36,50	47,13
	Ausgangsmaterial	0,9376	100,00	100,00

Das Wundgewebe wurde ausschliesslich aus der Splintholzzone gewonnen. Die chemische Zusammensetzung unterschied sich jedoch wesentlich vom benachbarten Splintholz. Das Wundgewebe weist einen noch höheren Extraktstoffgehalt auf als das Kernholz. An Hand histochemischer Reaktionen konnte in einer früheren Arbeit (L. KUČERA 1971) zudem die Vermutung aufgestellt werden, dass es sich bei den Zellinhaltsstoffen des Kallusgewebes um eigentliche Kernstoffe handelt.

Diese beiden Feststellungen sind für das Verständnis der Splint/Kernholz-Umwandlung in doppelter Hinsicht bedeutungsvoll:

Das Wunderistem ist offenbar in der Lage, Gewebe aufzubauen, die zu analogen zytologischen und biochemischen Veränderungen befähigt sind wie normales Splintholz in der Übergangszone zum Kernholz. Daraus geht hervor, dass die Vorgänge, die zur Umwandlung vom Splint- zum Kernholz führen, nicht örtlich an die Splint/Kernholzgrenze gebunden sind, was für die Erforschung dieser Phänomene neue, wesentliche Aspekte bringt.

Der Anteil von Polysacchariden war hingegen kleiner als bei andern Proben. Der Ligningehalt des Wundgewebes unterschied sich nur wenig von jenem des Kern-

holzes, dafür aber bedeutend vom Ligningehalt des Splintholzes. Um diese Unterschiede abzuklären, muss man sich bewusst sein, dass das Wundgewebe überwiegend aus Parenchymzellen besteht. Schon W. M. HARLOW und L. E. WISE (1928) stellten bei zwei Laubholzarten (*Quercus alba* und *Casuarina inophloia*), A. J. BAILEY (1936a) bei *Pseudotsuga taxifolia* und H. HARADA und A. B. WARDROP (1960) bei *Cryptomeria japonica* fest, dass der Ligningehalt von Markstrahlzellen bedeutend grösser ist als im Holz. Diese Feststellung trifft aufgrund der vorliegenden Ergebnisse auf ein weiteres Gewebe, den Kallus, zu. Andererseits konnte im Wundgewebe und im besonderen im Kallus ein wesentlich niedrigerer Anteil an Polysacchariden in den Zellwänden festgestellt werden. Dieses Ergebnis wurde schon durch die früheren histochemischen und polarisationsoptischen Untersuchungen an Schnitten aus dem Wundgewebe angedeutet (L. KUČERA 1971). Die stufenweise vor sich gehende Veränderung der Zellformen von den isodiametrischen Parenchymzellen zu den langgestreckten Tracheiden wird von einer ebenfalls stufenweisen Zunahme des polysaccharidischen Anteils der Zellwände begleitet, was vermuten lässt, dass zwischen der Form (und Funktion) der Zellen einerseits sowie dem polysaccharidischen Anteil der Zellwand eine Korrelation besteht.

Unsere Ergebnisse stimmen mit den Resultaten der chemischen Analyse der «Buchenflecken» von C. JACQUIOT (1961, 1962) überein. Das anatomische Bild der Buchenflecken ähnelt jenem des hier beschriebenen Wundgewebes, das heisst es handelt sich vornehmlich um eine Kallusbildung, bestehend aus grossen parenchymatischen Zellen. Dieser Autor stellte u. a. eine Erhöhung in der Grösse von 400% des Benzol-Äthanol-Extraktes, eine Erhöhung von 15% des Ligningehaltes und eine Erhöhung von 100% des Aschenanteils fest.

Die papierchromatographische Untersuchung hat das Vorhandensein von fünf bestimmten Monosacchariden im Hydrolysat von gesundem Holz und von Wundgewebe bestätigt (D-Galactose, D-Glucose, D-Mannose, L-Arabinose, D-Xylose). Mit Hilfe der verwendeten Methode konnten keine deutlichen Unterschiede in der quantitativen Monosaccharid-Zusammensetzung der Hydrolysate nachgewiesen werden.

Die Röntgenbeugungsaufnahmen mit einer GUINIER-Kamera zeigten für einen netzebenen Abstand von 2,58 Å eine schwache diffuse Interferenz bei den Schnitten aus gesundem Holz. Bei den Wundgewebeschnitten fiel diese Interferenz aus. Diese Feststellung weist auf einen Unterschied im Aufbau der Zellwand des Wundgewebes gegenüber dem normalen Xylem hin.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wundgewebe einer Eibe (*Taxus baccata* L.), beschädigt durch Spechte (Picidae), chemisch und röntgenometrisch untersucht und mit Proben aus Kern- und Splintholz verglichen. Die chemische Analyse der relativen Zusammensetzung zeigte vom Splintholz über das Kernholz zum Wundgewebe eine deutliche Zunahme des Anteils an Extraktstoffen und unlöslichem Rest (Lignin u. a.), dagegen eine Abnahme des Anteils an Polysacchariden der Zellwand. Die papierchromatographische Untersuchung hat das Vorhandensein von fünf bestimmten

Monosacchariden im Hydrolysat, aber keine wesentlichen Unterschied in deren quantitativen Zusammensetzung erwiesen. Schliesslich deutet die röntgenometrische Untersuchung auf einen Unterschied im Aufbau der Zellwand des Wundgewebes gegenüber dem normalen Xylem hin. Die oben dargestellten Untersuchungen und die früher erwähnten Resultate (L. KUČERA 1971) über Beobachtungen von Wundgewebebildung lassen folgende Schlüsse zu: Es besteht eine innere Korrelation zwischen Zellform (und -funktion) und dem polysaccharidischen Anteil der Zellwand. Die Umwandlung vom Splint in Kernholz ist örtlich nicht von vornherein an die Splint/Kernholzgrenze gebunden, sondern sie kann sich unter bestimmten Voraussetzungen (Wundgewebebildung) in der Nekrobiose des Wundgewebes schon dicht hinter dem Kambium einstellen.

Summary

In the present study wound-tissue of a yew-tree (*Taxus baccata* L.) attacked by woodpeckers (Picidae) was investigated by chemical methods and by means of X-rays and compared with sapwood and heartwood specimens. The chemical analysis of the relative structure clearly showed an increase of extract essences and insoluble rest (lignin and others) from sapwood over heartwood to wound-tissue but on the other hand a decrease of polysaccharids of the cell wall. Paperchromatographic experiments proved the occurrence of five determined monosaccharids in the hydrolysate, but no essential differences in their quantitative composition. Analyses with X-rays point to a difference in the structure of the cell wall in wound-tissue compared with normal xylem. The above examinations as well as earlier results (L. KUČERA 1971) of investigations on wound-tissue lead to the following conclusions: An inner correlation exists between cell form (and function) and polysaccharid fractions of the cell wall. The transformation of sapwood to heartwood is locally not confined to the sapwood/heartwood zone but can, under certain conditions (formation of wound-tissue) in the necrobiosis of the wound-tissue take place immediately behind the cambium.

Literatur

- ASTM (1968): Standards, Part 16, p. 401–411, Philadelphia.
- BAILEY, A. J. (1936b): The Micro-Determination of Lignin. *Mikrochemie* 19, 98–107.
- (1936a): Lignin in Douglas Fir. Composition of the Middle Lamella. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edit.* 8, 52–55.
- BALATINECZ, J. J. and KENNEDY, R. V. (1967): Maturation of Ray Parenchyma Cells in Pine. *Forest Products Journal* 17, 57–64.
- BAMBER, R. K. and DAVIES, G. W. (1969): Lignification of Ray Parenchyma Cell Walls in the Wood of *Pinus radiata* D. DON. *Holzforschung* 23, 83–84.
- CORRENS, E., WERGIN, W. und RUSCHER, CH. (1956): Über eine Asymmetrie im Röntgendiagramm verschiedener Holzproben. *Faserforschung und Textiltechnik* 7, 569–570.
- CÔTÉ, W. A. Jr., DAY, A. C., SIMSON, B. W. and TIMELL, T. E. (1966): Studies on Larch Arabinogalactan. I. The Distribution of Arabinogalactan in Larch Wood. *Holzforschung* 20, 178–192.

- HAIŠ, J. M. und MACEK, K. (1958): Handbuch der Papierchromatographie. VEB Gustav-Fischer-Verlag, Jena, p. 262–310.
- HARADA, H. and WARDROP, A. B. (1960): Cell Wall Structure of Ray Parenchyma Cells of a Softwood (*Cryptomeria japonica*). Jour. Jap. Wood Res. Soc. 6, 34–41.
- HARLOW, W. M. and WISE, L. E. (1928): The Chemistry of Wood. I. Analysis of Wood Rays in Two Hardwoods. Industrial and Engineering Chemistry 20, 720–722.
- JACQUIOT, C. (1961): Note préliminaire sur une maladie du bois de hêtre dans l'est de la France. Revue Forestière Française 3, 167–170.
- (1962): Recherches sur la «maladie des T» du hêtre. 87^e Congrès des Sociétés Svantes, p. 895–899.
- JERMYN, M. A. (1955): Cellulose and Hemicelluloses. V. Hydrolysis of Fractions in: PAECH, K. und TRACEY, M. V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, p. 205–206.
- KUČERA, L. (1971): Wundgewebe in der Eibe (*Taxus baccata* L.). Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich, 166, 445–470.
- LARSON, PH. R. (1966): Changes in Chemical Composition of Wood Cell Walls Associated with Age in *Pinus resinosa*. Forest Products Journal 16, 37–45.
- PRIDHAM, J. B. (1956): Determination of Sugars on Paper Chromatograms with p-Anisidine Hydrochloride. Analytical Chemistry 28, 1967–1968.
- SIMSON, B. W. and TIMELL, T. E. (1967): A Method for Determination of the Carbohydrate Composition of Microgram Quantities of Plant Tissues. TAPPI 50, 473–477.
- VODOZ, J. (1956): Eine neue Versuchsanlage zur Prüfung des Verhaltens der verschiedenen Holzarten bei der Hochfrequenz-Holztrocknung. Holz als Roh- und Werkstoff 14, 407–409.
- (1957): Das Verhalten des Holzes während der Trocknung im hochfrequenten Wechselfeld. Holz als Roh- und Werkstoff 15, 327–340.
- WISE, L. E. (1944): Wood Chemistry. Reinhold Publ. Corp. New York, p. 553–650.