

# Zur Kenntnis der Transpiration der Schließzellen

Von

**Uta Maercker**

Aus dem Botanischen Institut der Universität Heidelberg

Mit 15 Textabbildungen

*(Eingegangen am 25. Oktober 1964)*

## A. Einleitung

Bei der üblichen Gliederung der Wasserverdunstung aus Laubblättern wird die Transpiration aus den Schließzellen selbst zu der cuticulären gerechnet, während die Verdunstung aus den Poren allein als stomatäre bezeichnet wird (Seybold 1930/31). Diese Gliederung ist für die Analyse der Transpiration unzureichend, was Seybold in den letzten Jahren ermitteln konnte<sup>1</sup>. Auf Grund physikalischer und physiologischer Überlegungen scheint ihm an Stelle der Zweigliederung eine Dreigliederung der Transpiration nötig, so daß sich diese als Summe der stomatären + cuticulären + „peristomatären“ darstellt, wobei letztere die Transpiration aus den Schließzellen und gegebenenfalls ihren Nebenzellen umfaßt. Seybold wird zu gegebener Zeit eine historische Darstellung des Problems geben, haben doch bereits mehrere Forscher vergangener Jahrzehnte der Transpiration aus den Schließzellen ihr besonderes Augenmerk geschenkt. Merkwürdigerweise sind diese Beobachtungen wenig beachtet worden, obwohl ihnen elementare Bedeutung zukommt.

Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war es, zum einen die umstrittenen Befunde von Stahl (1894), der in gewissen Fällen eine bevorzugte Transpiration aus den Schließzellen feststellte, kritisch zu überprüfen und zum anderen, eine Methode zu entwickeln, die eben diese peristomatäre Transpiration verläßlich erfassen läßt. Die Ergebnisse führten dazu, die Spaltöffnungsreaktion als Regelmechanismus zu deuten, eine Betrachtungsweise, die heute im Mittelpunkt biologischer Forschung steht (Wagner 1954, Mittelstaedt 1956, Wieser 1959, Hassenstein 1960, Steinbuch 1963).

---

<sup>1</sup> Seybold berichtete darüber in einem am 8. Juli 1961 in der Heidelberger Akademie der Wissenschaften gehaltenen Vortrag: Ergebnisse und Probleme pflanzlicher Transpirationsanalysen (Jahreshefte der Heidelberger Akademie der Wissenschaften 1961/62, 6).

## B. Experimenteller Teil

### I. Versuche nach der Methode von Stahl (1894)

Stahl (1894) ließ Thalliumsulfatlösungen durch die Blattstiele aufsaugen und wies die Thalliumionen mit Natriumchlorid als Thalliumchloridniederschlag in den Epidermiszellen nach. Die Orte mit dem meisten im Mikroskop bei Durchlicht schwarz erscheinenden Niederschlag zeigen nach Stahl die Orte stärkster Transpiration an, da das verdunstende Wasser das mitgeführte Salz liegen läßt. Stahl (1894) fand eine erheblichere Schwärzung der Schließzellen im Vergleich zu den übrigen Epidermiszellen. Bei Rudolph (1925) verliefen alle Versuche, die Verteilung der epidermalen Transpiration durch aufsteigende Lösungen verschiedener Art nachzuweisen, erfolglos. Auch Kaufmann (1927) konnte an ihren Objekten die Versuche von Stahl nicht mit demselben Ergebnis wiederholen. Seither finden sie keine Erwähnung mehr in der Literatur.

#### 1. Methode und Material

Bei Verwendung von 5%igen Lösungen von Thalliumsulfat und Natriumchlorid wurden die Versuche an folgenden Pflanzenarten aus dem Botanischen Garten, Heidelberg, unternommen: *Caltha palustris*, *Caltha radicans*, *Eranthis hiemalis*, *Vicia faba*, *Begonia spec.*, *Tropaeolum majus*, *Polygonum mühlenbergii*, *Stadice limonium*, *Menyanthes trifoliata*, *Convolvulus cneorum*, *Solanum dulcamara*, *Nymphaea daubeniana*, *Hydrocleis nymphoides*, *Aponogeton distachyum*, *Limnobium stoloniferum*, *Regnellidium diphyllum*, *Alisma plantago*, *Sagittaria sagittifolia*, *Calla aethiopica*, *Tradescantia virginiana*, *Commelina communis*, *Convallaria majalis*, *Iris pseudacorus*, *Gladiolus communis*, *Zea mays*, *Stenotaphrum secundatum*, *Phyllorhachis sagittata*, *Oplismenius variegatus*, *Acer negundo fol. var.*, *Cornus alba fol. var.*, *Veronica speciosa fol. var.*, *Acorus calamus fol. var.*, *Tradescantia fluminensis fol. var.* und *Miscanthus sinensis fol. var.*

#### 2. Versuchsergebnisse

Die ersten Versuche verliefen selbst am Objekte Stahls, *Menyanthes trifoliata*, zunächst nicht mit Stahls Ergebnis. Meist war zwar in vielen Epidermiszellen Niederschlag zu beobachten, nicht dagegen in den Schließzellen. Dies ist nicht verwunderlich nach den Versuchen von Montfort (1926), die gezeigt haben, daß Schließzellen für NaCl impermeabel sind, so daß eine Niederschlagsbildung von Thalliumchlorid hier nicht möglich ist. Blieben die Blätter nach dem Thalliumsulfatversuch mehrere Tage in NaCl-Lösungen, so konnte schließlich die Schwärzung vieler Schließzellen beobachtet werden. Aber neben stark geschwärzten Schließzellen befanden sich immer auch solche, die nicht die geringste Spur von Niederschlag zeigten. Eine Probe mit Neutralrot ergab, daß die ungeschwärzten Schließzellen noch lebten. Die Chlorionen dringen also offenbar erst nach dem Zelltod in die Schließzellen ein und können erst dann mit den Thalliumionen, die durch den Transpirationsstrom dort angehäuft wurden, reagie-

ren. Da die Schließzellen innerhalb eines Epidermisstreifens nicht gleichzeitig absterben, wird man immer Schließzellen finden, bei denen der Niederschlag noch nicht aufgetreten ist, neben solchen Schließzellen, bei denen er gerade die Zelle ganz ausfüllt. Die erste Voraussetzung bei dieser Methode zum Ergebnis *Stahls* zu gelangen, ist ein zeitlich einheitliches

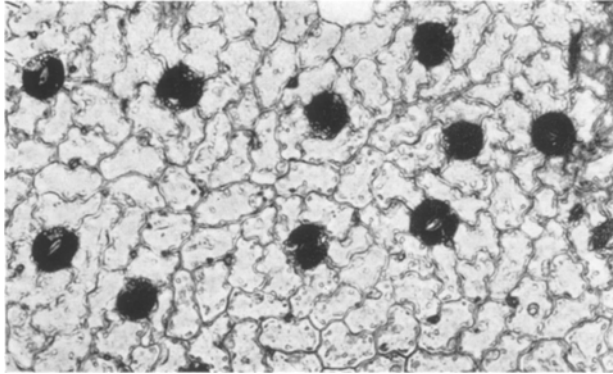


Abb. 1. *Menyanthes trifoliata*, Thalliumchlorid. 172 : 1.

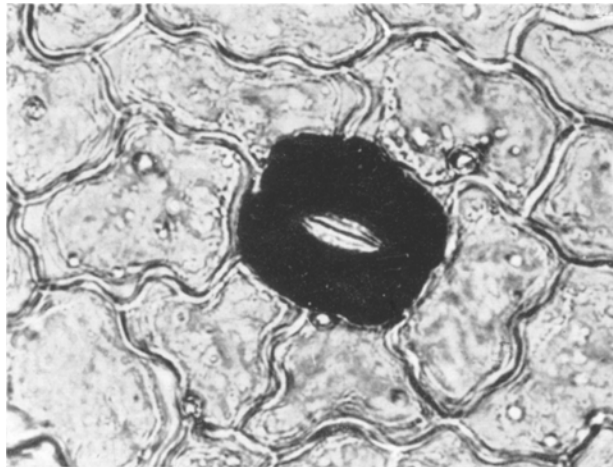


Abb. 2. *Menyanthes trifoliata*, Thalliumchlorid. 650 : 1.

Eindringen der Chlorionen in alle Zellen. Bei den folgenden Versuchen wurde die 3%ige NaCl-Lösung 1 : 1 mit Methanol versetzt. Die Folge ist ein rasches Eindringen der Chlorionen auch in die Schließzellen. In kurzer Zeit kann man beobachten, wie sich die Schließzellen mit Niederschlag ganz anfüllen, während die übrigen Epidermiszellen nur geringe Niederschlagsmengen aufweisen (Abb. 1 und 2).

Bei öfterem Wiederholen der Versuche an denselben Objekten waren die Ergebnisse sehr verschieden. Oft zeigte sich trotz Behandlung mit methanolischer NaCl-Lösung kein Niederschlag in den Schließzellen; er fand sich

vielmehr in den Zellen angehäuft, welche die Schließzellen umgeben. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten boten Versuche an panaschierten Blättern. Saugten solche Blätter bei guten Transpirationsbedingungen Thalliumsulfatlösungen auf, so färbten sich die grünen Areale bald braun, während die weißen zunächst unverändert blieben. Die grünen Gebiete panaschierter Blätter transpirieren mehr als die weißen, weil ihre Stomata weiter geöffnet sind (K ü m m l e r 1922, V e l s e n 1950, S c a r t h 1952, S c a r t h und S h a w 1951, V i r g i n 1957, K e t e l l a p p e r 1959, 1963,

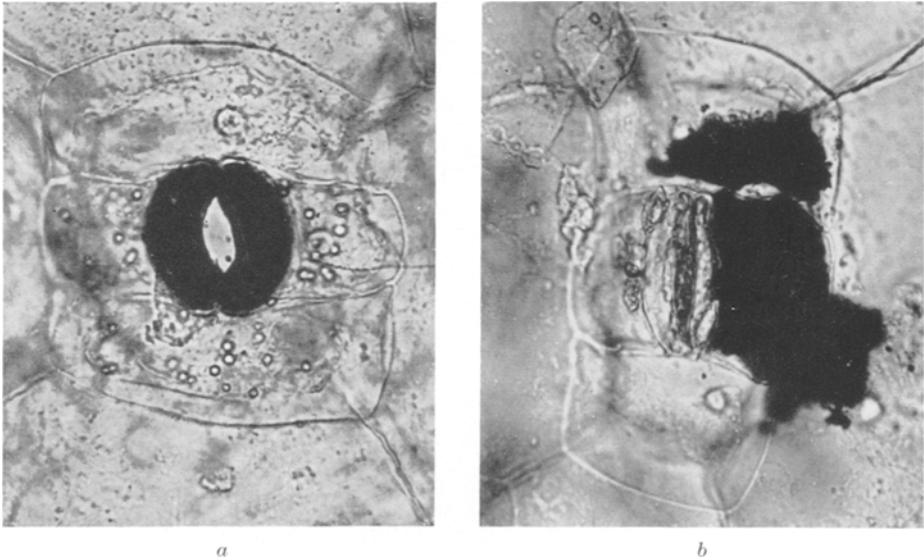


Abb. 5. *Tradescantia fluminensis*, Thalliumchlorid.  
 a. Niederschlagsbildung bei geöffneter Spalte. 700 : 1.  
 b. Niederschlagsbildung bei geschlossener Spalte. 700 : 1.

B o p p und B o c k 1961). Transpirierten die Blätter so lange, bis auch die weißen Gebiete Bräunlichfärbung zeigten, so konnte nach Behandlung der Epidermis mit methanolischer Kochsalzlösung erkannt werden, daß in den grünen Arealen die Schließzellen von Niederschlag ganz erfüllt waren, die Epidermiszellen dagegen nur wenig. In den weißen Arealen dagegen waren die Schließzellen frei von Niederschlag. Dieser trat in stärkerem Maße in den übrigen Epidermiszellen auf und war vor allem in den Nebenzellen oder an den Flanken der Schließzellen angehäuft. Die zweite Voraussetzung für eine erfolgreiche Reproduktion der Ergebnisse von S t a h l ist die maximale Öffnung der Stomata während der ganzen Versuchszeit. Die Schließzellen werden aber durch die Einwirkung bestimmter Salze zum Schließen veranlaßt (I l j i n 1922 a, M o n t f o r t 1926). Auch S t a h l (1894) beschreibt dies. Ließ er nämlich NaCl durch den Blattstiel aufsaugen, konnte er die Chlorionen mit Thalliumsulfat nicht in den Schließzellen nachweisen. In den Nebenzellen dagegen war der Thalliumchloridniederschlag gehäuft und hatte die Schließzellen ganz zusammengedrückt. Sicher hat aber auch das

Thalliumsulfat in geringerem Maße eine stomataschließende Wirkung. Vielleicht läßt sich die Tatsache, daß die Versuchsergebnisse oft nicht mit dem Befund *Stahls* übereinstimmen, damit erklären, daß die Stomata während des Versuches meist geschlossen sind. Die beste Reproduktion der Ergebnisse von *Stahl* konnte erhalten werden, wenn die Pflanzen über Nacht die Lösung aufsaugten, während sie unter einer Glasglocke in einer Wasserschale standen. In den frühen Morgenstunden wurde dann die Glasglocke entfernt und die Pflanze diffusem Tageslicht ausgesetzt. Diese

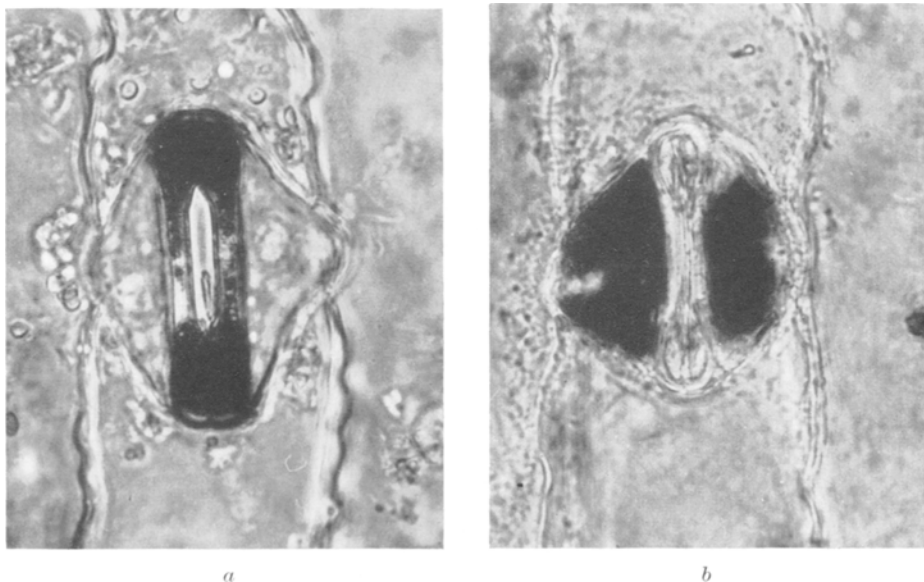


Abb. 4. *Zea mays*, Thalliumchlorid.

a. Niederschlagsbildung bei geöffneter Spalte. 774 : 1.

b. Niederschlagsbildung bei geschlossener Spalte. 774 : 1.

Methode hat den Vorteil, daß die Stomata maximal geöffnet sind, wenn die Lösung bis zur Epidermis vorgedrungen ist. Die Niederschlagsverteilung in der Epidermis hängt also vom Öffnungszustand der Spalten ab; sie ist sogar ein Kriterium für diesen. Im Dunkeln oder in trockener Luft findet man Niederschläge niemals in den Schließzellen, sondern stets in erhöhtem Maße in den Nebenzellen oder an den Flanken der Schließzellen (Abb. 3, 4, 5). In  $\text{CO}_2$ -armer Atmosphäre fand sich dagegen im Hellen wie im Dunkeln, in grünen wie in weißen Blattgebieten der Thalliumchloridniederschlag in den Schließzellen gehäuft, ein Beweis mehr dafür, daß hier die Stomata geöffnet sind, wie es Darwin (1898), Lloyd (1908), Linsbauer (1916), Scarth (1927), Scarth und Shaw (1951), Freudenberg (1941), Heath (1948, 1950, 1959) und Heath und Milthrope (1950) mit anderen Methoden festgestellt haben.

*Stahl* (1894) beobachtete mit Hilfe der Cobaltmethode schon in jüngsten Entwicklungsstadien hypostomatischer Blätter eine Förderung der

Transpiration auf der Blattunterseite. Der Befund wurde dahin interpretiert, daß die Wasserabgabe auch schon „hauptsächlich durch die allerdings noch nicht fertig ausgebildeten Spaltöffnungen vor sich geht“. Linsbauer (1916) übt an dieser Interpretation Kritik, indem er betont, daß sich die schnellere Rötung des Cobaltpapieres auch in der Weise erklären ließe, daß die Mächtigkeit der Cuticula der verschiedenen Blattseiten schon in jüngsten Entwicklungsstadien ungleich sei. Nach Aufsaugen von

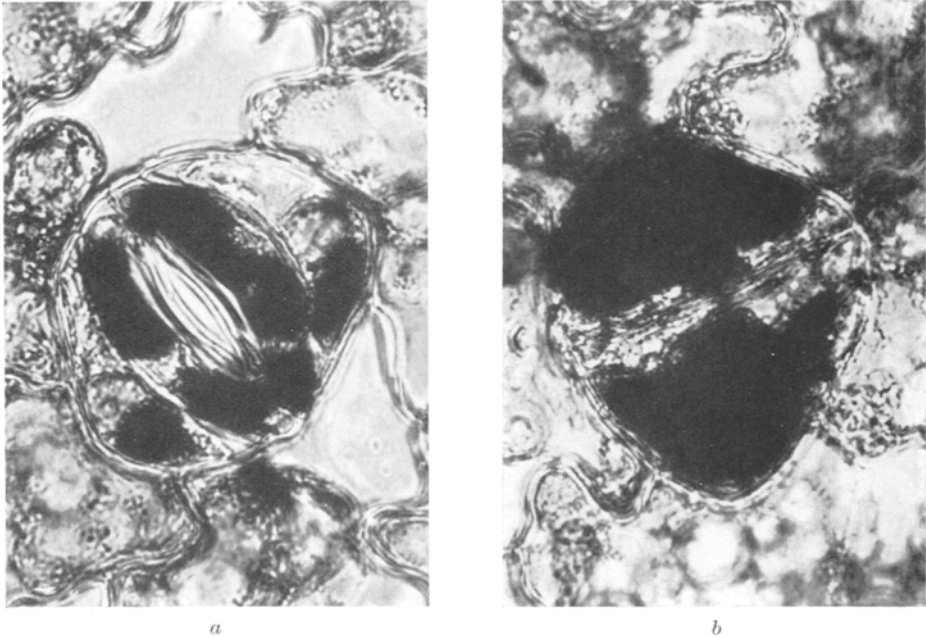


Abb. 5. *Sagittaria sagittifolia*, Thalliumchlorid.

- a. Niederschlagsbildung bei geöffneter Spalte. 774 : 1.  
 b. Niederschlagsbildung bei geschlossener Spalte. 774 : 1.

Thalliumsulfatlösung durch Keimlinge von *Vicia faba* und ganz jungen Blättchen von *Eranthis hiemalis* zeigten sich schon die jüngsten Stomatainitialen, die noch keine Zentralspalte entwickelt hatten, nach Behandlung mit methanolischer Kochsalzlösung dicht mit Niederschlag erfüllt (Abb. 6). Auch bei *Zea mays* lieferten die Schließzellen, die noch nicht die für die Gramineen typische Form angenommen hatten, die gleichen Ergebnisse. Noch ungeteilte, runde Stomatainitialen findet man bei *Zea mays* nur in den innersten zusammengerollten Blättchen von 1 bis 2 cm Länge. Saugten sie die Thalliumsulfatlösung unter Bedingungen auf, die sich bei den früheren Versuchen für die Stomataöffnung als günstig erwiesen hatten, so ließ sich nach kurzer Zeit in ihren Stomatainitialen ein Niederschlag bilden. Leider ist bei den jungen Blättchen die Epidermis nicht abziehbar, so daß die Photographien unscharf werden. Ein Vergleich mit der nebenstehenden Zeichnung läßt aber deren Übereinstimmung erkennen (Abb. 7).

## II. Mikroautoradiographischer Nachweis tritiumhaltigen Transpirationswassers

### 1. Methode und Material<sup>2</sup>

Tritiertes Wasser (THO) mit spez. Aktivitäten von 10 mc/ml bzw. 200 mc/ml wurde durch den Blattstiel aufgesaugt und gleichzeitig sein Transpirationsweg durch die einzelnen Epidermiszellen mikroautoradiographisch mit Hilfe der Stripping-Film-Technik (Gross, Bogoroch, Nadler und Leblond 1951, Fitzgerald, Simmel, Weinstein und Martin 1953, Boyd 1955, Niclas und Maurer 1955, Thaine

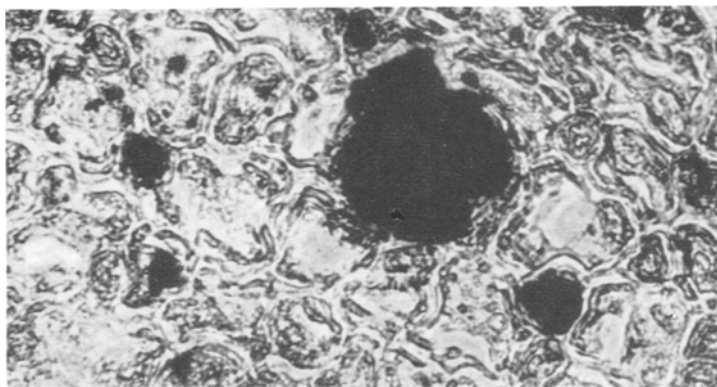


Abb. 6. *Eranthis hiemalis*, Thalliumchlorid. Eine ausdifferenzierte Spaltöffnung und mehrere Spaltöffnungsinitialen mit Niederschlag erfüllt. 425 : 1.

und Walters 1955, Habers 1958, Pelc 1958) nachgewiesen: Flottierende Stücke des Stripping-Films (Kodak Scientific Plates AR 10) von einigen cm<sup>2</sup> Fläche wurden direkt auf die Epidermen der intakten Blätter gebracht, blieben dort während der ganzen Versuchszeit und wurden anschließend in Ilford D 19 entwickelt. Applikationszeit und Expositionszeit waren also identisch. Da bei diesem Verfahren das Aufsaugen und Transpirieren von THO im Dunkeln stattfinden mußte, konnte die Öffnung der Stomata nur durch eine Verminderung des CO<sub>2</sub>-Gehaltes der Atmosphäre erreicht werden (Darwin 1898, Lloyd 1908, Linsbauer 1916, Scarth 1927, Scarth und Shaw 1951, Freudenberg 1941, Heath 1948, 1950, Heath und Milthrope 1950). Als Objekte dienten *Caltha radicans*, *Calla aethiopica*, *Tradescantia fluminensis* und *Sagittaria sagittifolia*.

Grundvoraussetzung für die Gewinnung guter Radioautogramme ist, daß sich der Stripping-Film der Epidermis dicht anlegt. Bei nur lockerem Kontakt breitet sich das Transpirationswasser zwischen Epidermis und Film aus und führt zu gleichmäßiger Schwärzung, die lediglich über den Spaltöffnungen intensiver ist; solche Schwärzungsbilder sagen naturgemäß nichts über die Verteilung der epidermalen Transpiration aus.

<sup>2</sup> Ausführliche Darstellung der Methode bei Maercker (1965) Mikroautoradiographischer Nachweis tritiumhaltigen Transpirationswassers. Naturwissenschaften 52, 15.

## 2. Versuchsergebnisse

Bei engem Kontakt zwischen Film und Epidermis während der gesamten Versuchsdauer zeigte sich oft, daß gerade über dem geöffneten Porus nur wenige Silberkörnchen zur Entwicklung gelangten, was wohl dadurch zu erklären ist, daß infolge des direkten Verschlusses des Porus durch den Film die Transpiration der Interzellularen herabgesetzt ist. Bei *Calla*

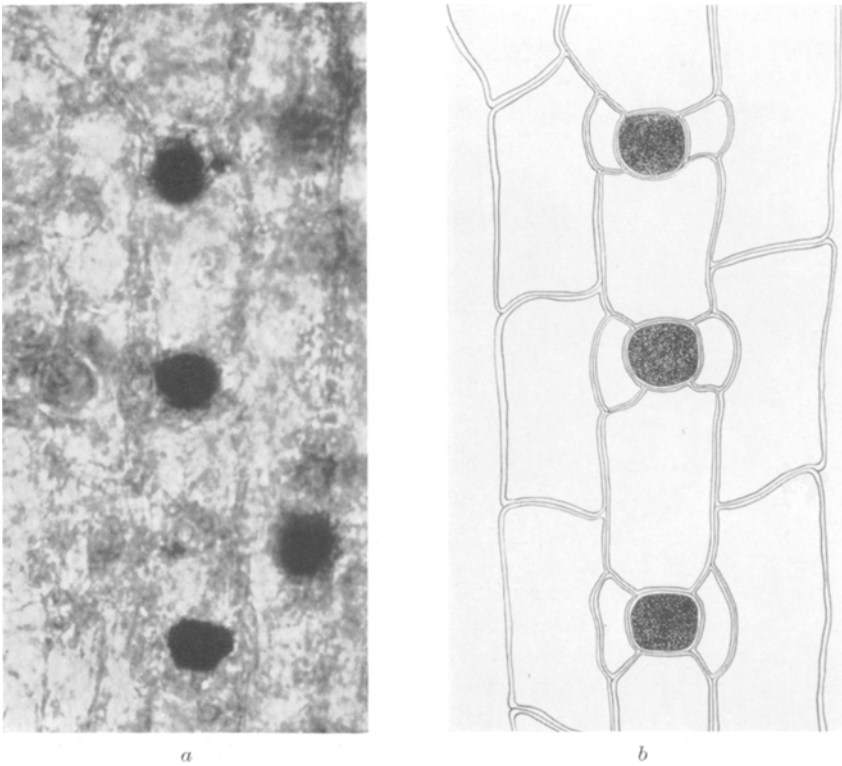


Abb. 7 a. Spaltöffnungsinitialen von *Zea mays* mit Thalliumchlorid. 450 : 1.

Abb. 7 b. Spaltöffnungsinitialen von *Zea mays* mit Thalliumchlorid. 450 : 1.

*aethiopica* war dann stets eine intensive Schwärzung über den Cuticularleisten der Stomata zu erkennen (Abb. 8). Bei *Caltha radicans* erstreckte sich die Schwärzung noch weit über die Cuticularleisten hinaus (Abb. 9). Man kann dabei nicht genau sagen, ob die Schließzellenoberfläche am Effekt beteiligt ist, oder ob sich nur das aus den Cuticularleisten austretende Wasser in der Gelatine des Films ausgebreitet hat. Bei *Tradescantia fluminensis* (Abb. 10) zeigte sich eine außerordentlich geringe cuticuläre Transpiration der Epidermiszellen bei gleichzeitiger intensiver Schwärzung über den Cuticularleisten der Stomata, die sich manchmal auch über die Schließzellenoberfläche verbreitete. An der Abb. 11, die ebenfalls an *Tradescantia fluminensis* gewonnen wurde, ist außer über den Cuticularleisten eine eindeutige Silberkornentstehung über der Schließzellenoberfläche vor allem an



deren Rückenwand zu erkennen. Bei *Sagittaria sagittifolia* konnte ein deutlicher Unterschied des Schwärzungsbildes beobachtet werden, je nachdem, ob die Spaltöffnungen während des Versuches geöffnet oder geschlossen waren. Bei geöffneten Spalten hob sich nur der Bereich über den Cuticularleisten hervor. Auch bei geschlossenen Stomata war aus der allgemeinen

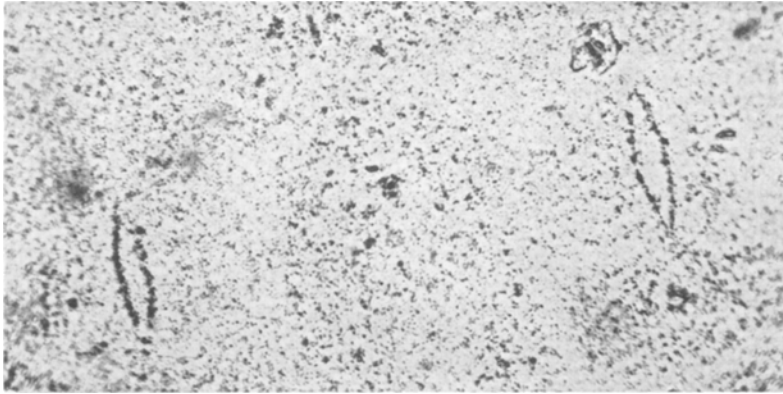


Abb. 8. *Calla aethiopica*, Tritiumautoradiogramm. 548 : 1.

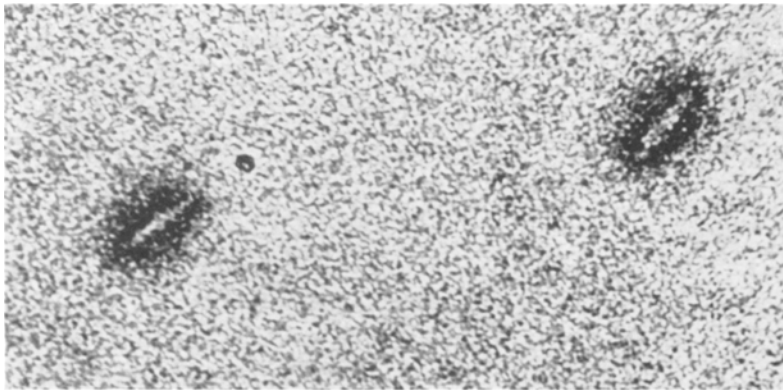


Abb. 9. *Caltha radicans*, Tritiumautoradiogramm. 548 : 1.

Schwärzung des gesamten Filmes zu schließen, die cuticuläre Epidermis-  
transpiration erheblich. Trotzdem hoben sich die Bereiche über allen Neben-  
zellen durch eine besonders hohe Silberkorndichte deutlich hervor (Abb. 12).

### III. Anhang: Nachweis von Aldehyd-Gruppen in den Cuticularleisten

Epidermispräparate von *Callisia monandrae*, *Tradescantia virginiana*,  
*Tradescantia fluminensis*, *Commelina communis*, *Calla aethiopica*, *Canna  
indica*, *Zea mays*, *Caltha palustris*, *Caltha radicans*, *Helleborus niger*,  
*Helleborus foetidus*, *Helleborus olympicus*, *Eranthis hiemalis*, *Anemone*

*pulsatilla*, *Anemone hortensis*, *Anemone montana*, *Anemone baldensis*, *Sedum spectabile*, *Vicia faba*, *Polygonum mühlenbergii*, *Limonium vulgare*, *Limonium tartaricum*, *Acanthus caroli-alexandri*, *Menyanthes trifoliata*, *Brunella vulgaris*, *Chrysanthemum maximum* wurden mit Leukothionin, das nach einer Vorschrift von F o t a k i s (1960) aus dem Thiazinfarbstoff

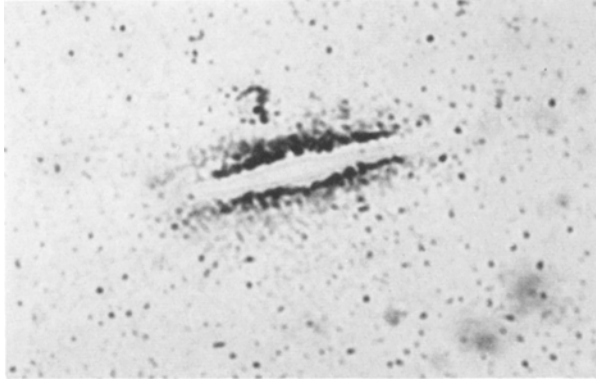


Abb. 10. *Tradescantia fluminensis*, Tritiumautoradiogramm. 774 : 1.

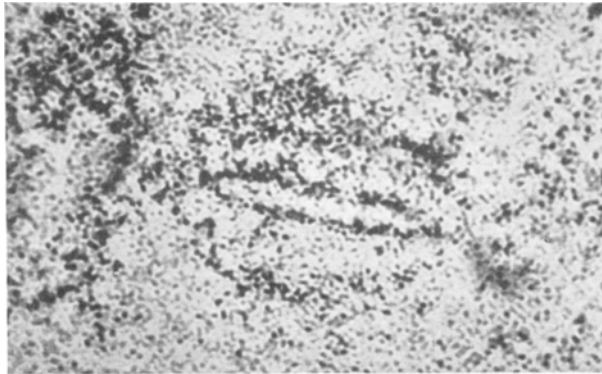


Abb. 11. *Tradescantia fluminensis*, Tritiumautoradiogramm. 774 : 1.

Thionin (Merck) durch Reduktion mit schwefliger Säure gewonnen wurde, behandelt. Nach 1 Stunde zeigte sich eine intensive Blaufärbung der Cuticularleisten der Schließzellen, die sich nicht durch Alkohol und Xylol entfernen ließ (Abb. 13). Bei Vergleichspräparaten in nicht reduziertem Thionin löste sich der violettrote Farbstoff durch Alkoholbehandlung aus allen Zellbestandteilen und es blieb keine Hellblaufärbung der Cuticularleisten zurück. Es handelt sich also um eine spezifische Thionin-SO<sub>2</sub>-Reaktion, die als spezifisch für Aldehyd-Gruppen gilt (F o t a k i s 1960). Parallel durchgeführte Versuche mit Schiff'schem Reagens (L i p p) ergaben eine entsprechende Rotfärbung der Cuticularleisten.

### C. Diskussion

Stahl (1894) interpretierte bei seinen oben erwähnten Versuchen die Anhäufung von Thalliumionen als Beweis für eine erhöhte Transpiration. Bei einer aktiven, nicht-osmotischen Wassersekretion der Schließzellen in die Nebenzellen, wie sie von Williams (1954) angenommen wird, könnte

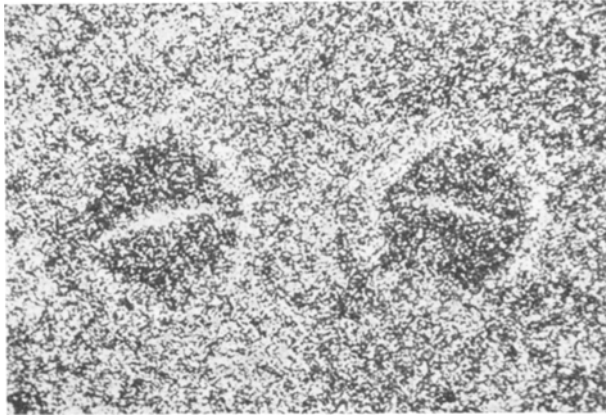


Abb. 12. *Sagittaria sagittifolia*, Tritiumautoradiogramm bei geschlossenen Spaltöffnungen. 500 : 1.

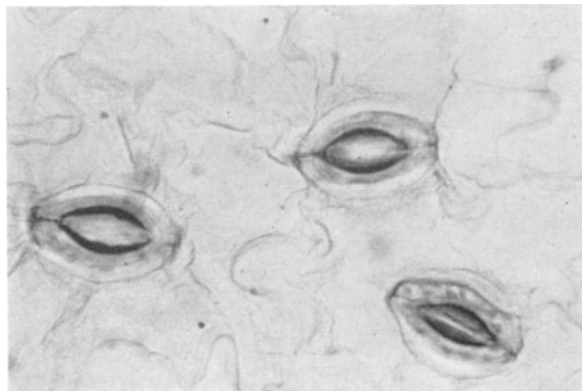


Abb. 13. *Senecio tamoides*, Thionin-SO<sub>2</sub> (Leukothionin). 500 : 1.

aber eventuell das Salz in der wasserauspressenden Zelle zurückbleiben. Bei geschlossener Spaltöffnung könnte es sein, daß der Wasserstrom nach wie vor zur Schließzelle weitergeht, diese aber jetzt für Salze so impermeabel ist, daß sich die Salzionen in den Nebenzellen anhäufen. So erklärte Montfort (1926) die Anhäufung der Chlorionen beim Aufsteigen von NaCl-Lösung bei den Versuchen von Stahl. Die Ergebnisse, die nach der Methode von Stahl erhalten werden, liefern also keinen eindeutigen Beweis für den Wasseraustritt aus den Epidermiszellen in die Atmosphäre,

Strugger (1938, 1939, 1943), Renner und Kallmeyer (1948) und Bauer (1953) hielten die Anreicherung von Berberinsulfat in den Cuticularleisten geöffneter Stomata für den Beweis einer erhöhten Transpiration an diesen Stellen. Dagegen wendete Hülsbruch (1944, 1954) ein, daß die Cuticularleisten der Schließzellen möglicherweise das Berberinsulfat auf Grund eines besonderen chemisch bedingten Speicherungsvermögens an sich ziehen. Tatsächlich ergaben Infiltrationsversuche Bauers (1953) eine bevorzugte Fluorochromierung der Cuticularleisten der Schließzellen, die also nicht durch den Transpirationsstrom, sondern allein durch chemische Eigenschaften der Cuticularleisten bedingt ist. Aus dem Ausbreitungsverlauf des Berberinsulfates kann man also nur Schlüsse ziehen über den Wasserstrom innerhalb der Epidermis, durch den das Berberinsulfat an Ort und Stelle gelangt. Dagegen sind Geschwindigkeit der Ausbreitung und Intensität der Fluoreszenz kein Maß für die peristomatäre Transpiration.

Bei der autoradiographischen Methode wird der aus den Epidermiszellen austretende Wasserdampf als solcher erfaßt, so daß Sekundärererscheinungen durch mitgeführte Substanzen ausgeschaltet werden. Bei geöffneten Spalten findet die peristomatäre Transpiration vornehmlich durch die Cuticularleisten der Schließzellen statt. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Buscalioni und Pollacci (1901), die jedoch sehr schlecht reproduzierbar sind und, da mit Äther gearbeitet wird, unter unphysiologischen Bedingungen erhalten werden.

Die Cuticularleisten der Stomata zeichnen sich durch den Besitz freier Aldehyd-Gruppen aus. Es besteht vielleicht die Möglichkeit, daß die Cuticularleisten auf Grund des bekannten relativ hohen Hydratationsvermögens der Aldehyd-Gruppe den Schließzellen das Wasser entreißen und somit zu den ausführenden Organellen der peristomatären Transpiration werden. Neben den Cuticularleisten zeichnet sich aber auch die Schließzellenoberfläche besonders entlang der Rückenwand als bevorzugter Transpirationsort aus. Auch die jungen Stomatainitialen, die noch keine Cuticularleisten besitzen, und bei geschlossenem Spaltzustand die Nebenzellen, zeigen eine gesteigerte Transpiration. Ihre Ursache kann sowohl eine erhöhte Permeabilität des Protoplasten als auch eine besondere Wegsamkeit der Zellwand für Wasser sein. Vielleicht besteht ein Zusammenhang mit dem Vorkommen von Ektodesmen, die Schumacher (1942), Lambertz (1954), Schnepf (1958), Sievers (1959) und Franke (1960, 1961) vorwiegend in den Außenwänden der Schließzellen, und zwar dort in besonderem Maße an der Rückenwand und entlang der Cuticularleisten fanden. Die autoradiographischen Verfahren Frankes (1964) sind aber nicht mit der hier entwickelten Methode zu vergleichen. Hier wird direkt der aus den Epidermiszellen austretende Wasserdampf erfaßt. Die angewendeten Versuchszeiten sind, verglichen mit den für Tritium üblichen Expositionszeiten von mehreren Wochen, wohl sicher zu kurz, als daß eventuell in die Zellsubstanz eingebautes Tritium an der Schwärzung des Stripping-Films wesentlich beteiligt sein könnte. Bei Franke (1964) dagegen handelt es sich um den Nachweis von hauptsächlich in den Schließzellen festliegenden radioaktiven Substanzen. Daß aber gerade die Schließzellen in höchstem Maße befähigt

sind, organische Substanzen einzubauen, berichten Konagami und Ono (1959) und Ketellapper (1963).

Die peristomatäre Transpiration ist für den Reaktionsmechanismus der Spaltöffnungen von entscheidender Bedeutung. Imamura (1943) hat die Stärkemenge in den Schließzellen im Vergleich zum Öffnungszustand untersucht. Die Kurve, die die Schließbewegung veranschaulicht, fällt steil ab bei allmählich zunehmender Stärkemenge. Imamura kommt daher zu dem Schluß, daß die Schließbewegungen wenigstens in der anfänglichen Phase durch einen Mechanismus geregelt werden, der mit der enzymatischen Tätigkeit nichts zu tun hat. Auch Stålfelt (1959) beschreibt, daß sich die Stomata im hydroaktiven System schon vor der Minderung des osmotischen Wertes schließen, daß also eine „nicht-osmotische Wasserabgabe“ zu einem raschen Stomataschluß führe. Die Herabsetzung des osmotischen Wertes hätte nur den Charakter eines stabilisierenden Prozesses, dessen Bedeutung darin liege, daß er einer Öffnung der Stomata vorbeuge, die nach Abklingen des Auslösungsprozesses eintreten würde. Für Stålfelt (1959) ist bei den hydroaktiven Schließbewegungen die enzymatische Herabsetzung des osmotischen Wertes, die ein weiteres Eindringen von Wasser aus den Nebenzellen in die Schließzellen verhindert, eine Folge des Wasserverlustes, nicht dessen Ursache. Das Wasserdefizit ist die Reizursache für das Enzymsystem. Auch nach Iljin (1922) wird durch den Wasserentzug eines Plasmolytikums die Stärkebildung durch Enzymbeeinflussung begünstigt. Bei den Versuchen von Strugger und Weber (1925) bewirkte  $\text{CaCl}_2$  Stomataschluß und Stärkebildung. Die Umwandlung von Zucker in Stärke zur Minderung des osmotischen Wertes in den Schließzellen kann nicht der Auslösungsprozeß für den Spaltenschluß sein ohne Abnahme der Turgeszenz der Schließzellen. Diese kann aber nur durch Wasserverlust der Schließzellen stattfinden. Die Wasserabgabe der Schließzelle ist in der Literatur über den Reaktionsmechanismus der Spaltöffnung immer wieder Gegenstand theoretischer Erörterungen. Williams (1954) sieht in der Schließbewegung eine aktive, nicht-osmotische, Energie benötigende Wasserabgabe der Schließzellen an die Nachbarzellen. Diese Theorie der Stomatärbewegung wurde von Heath (1959 a) und Ketellapper (1959) diskutiert und abgelehnt. 1959 schreibt Stålfelt: „Der eigentliche Stomataschluß besteht darin, daß die Schließzellen Wasser abgeben ... aber wie diese Wasserabgabe erfolgt, ist nicht mit Sicherheit bekannt“. Aus den von ihm gefundenen dauernden Volumenveränderungen der Schließzellen, den „Pulsationen“ (Stålfelt 1929, 1956) schließt er, daß die Schließzellen stets Wasser aus den umliegenden Epidermiszellen aufnehmen und wieder an diese abgeben. Heath und Milthrope (1950) sind der Ansicht, daß wohl die allgemeine Schließreaktion durch eine allmähliche Wasserabgabe der Schließzellen an die Epidermiszellen bewirkt werde, der rasche Stomataschluß beim Welken jedoch durch einen direkten Wasserverlust der Schließzellen an die Luft verursacht sein könne. Bei all diesen theoretischen Erörterungen über die Wasserabgabe der Schließzellen und deren Reaktionsmechanismus werden nirgends die Befunde über eine erhöhte Transpiration der Schließzellen erwähnt. Nirgends in der Literatur wird die Bedeutung

dieser gesteigerten Transpiration gerade für die Empfindlichkeit der Spaltöffnungsreaktion erörtert. Nach Leitgeb (1886), Burgenstein (1920), Wilson (1948) Heath und Russel (1954) und Hübl (1961, 1963) hängt die Spaltöffnungsbewegung von der Luftfeuchtigkeit ab, derart, daß eine niedrige relative Feuchtigkeit die Schließbewegung fördert, eine hohe relative Feuchtigkeit die Schließung hemmt. Auch nach Hygen (1951) verlaufen die Schließbewegungen bei Pflanzen von trockenen und sonnigen Standorten schneller als bei Pflanzen von feuchten und schattigen. Es wird eine direkte Wirkung der Luftfeuchtigkeit auf die Schließzellen angenommen. Eine solche kann sehr einfach erklärt werden als Beeinflussung der peristomatären Transpiration.

Betrachtet man das hydroaktive System im Sinne von Stålfelt (1926, 1929 a, 1932, 1955, 1956) als Regelkreis, so kann man die Wassersättigung des Blattes als Regelgröße bezeichnen. Die Regelaufgabe ist die Konstanthaltung dieser Größe auf einen Sollwert, d. h. den für die Lebensvorgänge in den Blattzellen optimalen Wert. Bei jeder Regelabweichung wird von den Schließzellen die kompensierende Gegenmaßnahme getroffen. Der Porus der Spaltöffnung stellt also das „Stellglied“ für die Regelung dar. Eine Regulation erfolgt stets von jenem Orte des Gesamtsystems aus, wo für eine Zustandsänderung die größte Empfindlichkeit besteht, d. h. dem *locus minoris resistentiae* (Wagner 1954). Als solches „Fühlersystem“ kann man die Schließzellen bezeichnen auf Grund ihrer Eigenschaft, stärker zu transpirieren als die übrigen Epidermiszellen. Mit dieser Eigenschaft ist die Schließzelle nicht nur besonders empfindlich gegen geringste Änderungen der Transpirationsbedingungen (wie es für eine Steuerung wichtig ist), sondern der jeweilige Istwert der Regelgröße wird als Verhältnis der Schließzellentranspiration zum Wassernachschub aus dem Mesophyll gemessen. Solange die Wasservorräte des Blattes genügen, kann der Wasserverlust der Schließzellen ausgeglichen werden. Da die Schließzelle nur über die angrenzenden Epidermiszellen mit dem Mesophyll in Verbindung steht, zeigt sie sich auch hierin als *locus minoris resistentiae*. Läßt die Wasserversorgung nach, so leiden die Schließzellen auf Grund ihrer erhöhten Transpiration sofort unter Wasserdefizit. Sie verlieren ihre Turgeszenz und schließen den Porus. Die Reaktion wird stabilisiert durch eine enzymatische Erniedrigung des osmotischen Wertes, die ein erneutes Eindringen von Wasser in die Schließzelle aus den Nebenzellen erschwert. Dann endet der Wasserstrom im Blatt mit einer erhöhten Transpiration der Nebenzellen. Es mag sein, daß es sich hierbei um eine spezifische Eigenschaft der Nebenzellen handelt, die bei gradueller Verschiedenheit zur Schließzelle die Aufrechterhaltung des Sog-Gefälles übernimmt, wodurch eine Rückwirkung gewährleistet und der Regelkreis geschlossen wird. Die peristomatäre Transpiration ist also von elementarer Bedeutung für den stomatären Regelmechanismus.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. A. Seybold, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für stete Unterstützung. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. P. Sitte für wertvolle Ratschläge.

### Zusammenfassung

1. Als „peristomatäre Transpiration“ wird die Transpiration aus den Schließzellen selbst und ihren Nebenzellen bezeichnet.

2. Mit einer von Stahl (1894) angegebenen Methode, die in Vergessenheit geraten war, wurde eine erhöhte Transpiration aus den Schließzellen bei geöffnetem Porus, aus den Nebenzellen bei geschlossenem Porus und sogar schon aus den Stomatainitialen festgestellt.

3. Da diese Methode von der Salzpermeabilität und von sekundären Salzwirkungen abhängig ist und außerdem eine aktive Wassersekretion der Schließzellen in die Nebenzellen nicht ausschließt, mußte eine Methode entwickelt werden, die den Wasseraustritt in die Atmosphäre direkt beweist. Als solche hat sich der mikroautoradiographische Nachweis tritiierten Transpirationswassers als brauchbar erwiesen.

4. Mit dieser Methode zeigte sich, daß bei geöffneten Spalten die peristomatäre Transpiration vornehmlich durch die Cuticularleisten der Schließzellen stattfindet.

5. Auch die Oberfläche der Schließzellen und bei geschlossenem Spaltenzustand die Nebenzellen zeigten eine erhöhte Transpiration.

6. In den Cuticularleisten der Schließzellen wurden Aldehyd-Gruppen mit Leukothionin nach Fotakis (1960) und mit Schiff'schem Reagens nachgewiesen.

7. Die Diskussion geht auf die Bedeutung der Ergebnisse für den Reaktionsmechanismus der Spaltöffnungen ein. Es ergab sich eine kybernetische Betrachtungsweise der Spaltöffnungsreaktion. Es wurde hervorgehoben, daß die peristomatäre Transpiration die Voraussetzung dafür ist, daß die Schließzelle zum *locus minoris resistentiae* wird und damit als „Fühlersystem“ für die Regelung dient.

### Summary

1. The transpiration out of the surface of the guard cells and their subsidiary cells is called „peristomatal transpiration“.

2. Using a method, already described by Stahl (1894) but never mentioned in the modern literature, it was demonstrated a higher transpiration of the guard cells, when stomata opened, and of the subsidiary cells, when stomata closed, and even a higher transpiration of the initials of the guard cells than of the ordinary epidermal cells.

3. Since this method depends on salt-permeability and on secondary salt-effects, and besides does not exclude an active secretion of water from the guard cells into the subsidiary cells, a method has to be found that should demonstrate the movement of the water out of the cell surface into the atmosphere directly. As such a method the microautoradiography was found useful.

4. Using this method it was demonstrated that the peristomatal transpiration takes place especially through the cuticular ledges bordering the pores, when stomata are open.

5. But also the surface of the guard cells and that of the subsidiary cells, when stomata are closed, showed the higher transpiration.

6. With leucothionine (Fotakis 1960) and Schiff's reagents the cuticular ledges bordering the stomatal pores are demonstrated to contain aldehyde groups.

7. The importance of the results for the mechanism of the stomatal movement is discussed. The stomatal reaction is regarded in the kybernetic sense. It was considered that the peristomatal transpiration is the cause for the guard cell to be the *locus minoris resistentiae* and therefore to serve as detecting element for the feedback control.

#### Literatur

- Bauer, L., 1953: Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. *Planta* 42, 367.
- Bopp, M., und G. Bock, 1961: Die Reaktion der Schließzellen bei einigen panschierten Pflanzen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 74, 125.
- Boyd, G. A., 1955: *Autoradiography in Biology and Medicine*. Acad. Press.
- Burgenstein, A., 1920: Änderung der Spaltöffnungsweite unter dem Einfluß verschiedener Bedingungen. *Verh. Zool. Bot. Ges. Wien* 70, 117.
- Buscalioni, L., e G. Pollacci, 1901: Ulteriori ricerche sull'applicazione delle pellicole di Collodio allo studio di alcuni processi fisiologici delle piante et in particular modo della Transpirazione vegetale. *Atti R. Inst. Bot. dell'universita di Pavia* 2, ser. 7, 44.
- Darwin, F., 1898: Observations on Stomata. *Philosophic. Trans. Roy. Soc. London Ser. B* 190, 31.
- Fitzgerald, P. J. M. D., E. B. A. Simmel, J. B. S. Weinstein, and C. M. A. Martin, 1953: Radioautography: Theory, Technic and Applications. *Official Journal of the International Association of medical Museums* 2, 181.
- Fotakis, N., 1960: Eine Modifikation des  $\alpha$ -Aminosäurenachweises mit Ninhydrin bzw. Alloxan. *Histochemie* 2, 43.
- Franke, W., 1960: Über die Beziehungen der Ektodesmen zur Stoffaufnahme durch Blätter. *Planta* 55, 590.
- 1961: Ectodesmata and foliar Absorption. *Amer. J. Bot.* 48, 685.
- 1964: Über die Beziehungen der Ektodesmen zur Stoffaufnahme durch Blätter. *Planta* 61, 1.
- Freudenberger, H., 1941: Die Reaktion der Schließzellen auf Kohlensäure- und Sauerstoffentzug. *Protoplasma* 35, 15.
- Gross, J., R. Bogoroch, N. J. Nadler, and C. P. Leblond, 1951: The Theory and Methods of the radioautographic Localization of Radioelements in tissues. *Amer. J. Roentgenology* 65, 420.
- Habers, E., 1958: Autoradiographie als histochemisches Untersuchungsverfahren. *Handbuch der Histochemie Band I, 1. Teil*, 400.
- Hassenstein, B., 1960: Die bisherige Rolle der Kybernetik in der biologischen Forschung. *Naturwiss. Rundschau* 13, 5.
- Heath, O. V., 1948: Control of stomatal Movement by a Reduction in the Normal Carbon Dioxide Content of the air. *Nature* 161, 179.
- 1950: Studies in Stomatal Behaviour. V. The Role of Carbon Dioxide in the Light Response of Stomata. *J. Exper. Bot.* 1, 29.
- 1959: Light and Carbon Dioxide in Stomatal Movement. In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie (W. Ruhland)*, Band XVII, 1, 415.
- 1959 a: The Water Relations of Stomatal Cells and the Mechanisms of Stomatal Movement. *Plant Physiol. F. C. Steward II*, 195.
- and F. L. Milthrope, 1950: Studies in Stomatal Behaviour. V. The Role of Carbon Dioxide in the Light Response of Stomata. *J. Exper. Bot.* 1, 227.
- and J. Russell, 1954: Studies in Stomatal Behaviour. VII. Effects of Anaerobic Conditions upon Stomatal Movement. *J. Exper. Bot.* 5, 269.



- H ü b l, E., 1961: Über das stomatäre Verhalten von *Allium ursinum*. Österr. bot. Z. 108, 379.
- 1963: Über das stomatäre Verhalten von Pflanzen verschiedener Standorte im Alpengebiet und auf Sumpfwiesen der Ebene. S. B. Österr. Akad. Wiss. math.-nat. Kl., Abt. I, Bd. 172, 1, 2, 1.
- H ü l s b r u c h, M., 1944: Fluoreszenzoptische Untersuchungen über den Wasserweg in der Wurzel. *Planta* 34, 221.
- 1954: Zum extrafaszikulären Wasserweg in der Wurzel. *Planta* 43, 566.
- H y g e n, G., 1951: Studies in Plant Transpiration I. *Physiol. Plantarum* 4, 57.
- I l j i n, W. S., 1922: Wirkung der Kationen von Salzen auf den Zerfall und die Bildung von Stärke in der Pflanze. *Biochem. Z.* 152, 494.
- 1922 a: Über den Einfluß des Welkens auf die Regulierung der Spaltöffnungen. *Jb. wiss. Bot.* 61, 670.
- I m a m u r a, S., 1943: Untersuchungen über den Mechanismus der Turgorschwankungen der Spaltöffnungsschließzellen. *Jap. J. Bot.* 12, 252.
- K a u f m a n n, K., 1927: Anatomie und Physiologie der Spaltöffnungsapparate mit verholzten Schließzellenmembranen. *Planta* 3, 27.
- K e t e l l a p p e r, H. J., 1959: The Mechanisms of Stomatal Movement. *Amer. J. Bot.* 46, 225.
- 1963: Stomatal Physiology. *Annual Review of Plant Physiol.* 14, 149.
- K o n a g a m i t s u, Y., and H. O n o, 1959: Starch formation in albino part of variegated leaves. *Sieboldia* 2, 157.
- K ü m m l e r, A., 1922: Über die Funktion der Spaltöffnungen weißbunter Blätter. *Jb. wiss. Bot.* 61, 610.
- L a m b e r t z, G., 1954: Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermisaußenwänden. *Planta* 44, 147.
- L e i t g e b, H., 1886: Beiträge zur Physiologie des Spaltöffnungsapparates. *Mitt. aus dem Bot. Institut Graz* 1, 123.
- L i n s b a u e r, K., 1916: Beiträge zur Kenntnis der Spaltöffnungsbewegungen. *Flora* 109, 100.
- L i p p, W.: Histochemische Methoden. München, Seit 1954 im Erscheinen. R. Oldenbourg, München.
- L l o y d, F. E., 1908: The Physiology of Stomata. *Carnegie Inst. Publ.* 82.
- M a e r c k e r, U., 1965: Mikroautoradiographischer Nachweis tritiumhaltigen Transpirationswassers. *Naturwissenschaften* 52, 15.
- M i t t e l s t a e d t, H., 1956: Regelungsvorgänge in der Biologie. R. Oldenbourg, München.
- M o n t f o r t, C., 1926: Physiologische und pflanzengeographische Salzwirkungen I. Einfluß ausgeglichener Salzlösungen auf Mesophyll und Schließzellen. *Jb. wiss. Bot.* 65, 502.
- N i k l a s, A., and W. M a u r e r, 1955: Autoradiographie, im Handbuch der physiologisch-chemischen Analyse (Hoppe-Seyler-Thierfelder); 10. Aufl., Bd. II, 734.
- P e l c, S. R., 1958: Autoradiography as a cytochemical method with special reference to <sup>14</sup>C and <sup>35</sup>S, in J. F. Danielli: *General cytochemical Methods*. New York. Academic Press.
- R e n n e r, O., and M. K a l l m e y e r, 1948: Luminiszenzmikroskopische Untersuchungen an Haaren und Spaltöffnungen. *Diss. Jena (1947) ref. Fiat Rev. of Germ. Sci.* 52 I., 105.
- R u d o l p h, K., 1925: Epidermis und epidermale Transpiration. *Bot. Archiv* IX, 49.
- S c a r t h, G. W., 1927: Stomatal Movement, its Regulation and Regulatory Role. *Protoplasma* II, 498.

- Scarth, G. W., 1932: Mechanism of the Action of Light and other Factors on Stomatal Movement. *Plant Physiol.* 7, 481.
- and M. Shaw, 1951: Stomatal Movement and Photosynthesis in *Pelargonium*. Effects of Light and Carbon Dioxide. *Plant Physiol.* 26, 207 and 581.
- Schnepf, E., 1958: Untersuchungen über Darstellung und Bau der Ektodesmen und ihre Beeinflussbarkeit durch stoffliche Faktoren. *Planta* 52, 644.
- Schumacher, W., 1942: Über plasmodermenartige Strukturen in Epidermisaußenwänden. *Jb. wiss. Bot.* 90, 530.
- Seybold, A., 1930/31: Die pflanzliche Transpiration II. *Ergebnisse der Biologie* 6, 559.
- 1961/62: Ergebnisse und Probleme pflanzlicher Transpirationsanalysen. *Jahreshefte der Heidelberger Akad. Wiss.* 1961/62, 6.
- Sievers, A., 1959: Untersuchungen über die Darstellbarkeit der Ektodesmen und ihre Beeinflussbarkeit durch physikalische Faktoren. *Flora* 147, 265.
- Stahl, E., 1894: Einige Versuche über Transpiration und Assimilation. *Bot. Z.* 52, 117.
- Stählfelt, M. G., 1926: Die photische Reaktion im Spaltöffnungsmechanismus. *Flora* 121, 236.
- 1929: Pulsierende Blattgewebe. *Planta* 7, 720.
- 1929 a: Die Abhängigkeit der Spaltöffnungsreaktionen von der Wasserbilanz. *Planta* 8, 287.
- 1952: Der stomatäre Regulator der pflanzlichen Transpiration. *Planta* 17, 22.
- 1955: The Stomata as a Hydrophotic Regulator of the Water Deficit of the Plant. *Physiol. Plantarum* 8, 572.
- 1956: Die Physiologie der Spaltöffnungsbewegungen. *Handbuch der Pflanzenphysiologie* (W. Ruhland) Bd. III, 351.
- 1959: Sonstige Reizreaktionen der Spaltöffnungen. *Handbuch der Pflanzenphysiologie* (W. Ruhland) Bd. XVII, 1, 468.
- Steinbuch, K., 1963: *Automat und Mensch*. Springer: Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Strugger, S., 1958: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. *Flora* 152, 255.
- 1959: Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes im Parenchym. Untersuchung an *Helxine Soleirolii*. *Biol. Zentralblatt* 59, 409.
- 1943: Der aufsteigende Saftstrom in der Pflanze. *Naturwiss.* 31, 186.
- und F. Weber, 1925: Stärkeabbau in Mesophyll- und Schließzellen. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 43, 431.
- Thaine, R., und M. C. Walters, 1955: Experiments on Application of Autoradiographic Technics to the Study of Problems in Plant Physiology. *Australian J. of the Biological Sciences* 8, 354.
- Velsen, P. J., 1950: Porometeruntersuchungen an weißbunten Blättern des *Ficus elastica* L. *Proc. Konkl. Akad. Wetensch. Amsterd.* 53, 405.
- Virgin, H. I., 1957: Stomatal Transpiration of some Variegated Plants and of chlorophyll deficient Mutants of Barley. *Physiol. Plantarum* 10, 170.
- Wagner, R., 1954: *Probleme und Beispiele biologischer Regelungen*. Georg Thieme, Stuttgart.
- Wieser, W., 1959: *Organismen, Strukturen, Maschinen*. (Fischer.)
- Williams, W. T., 1954: A New Theory of the Mechanism of Stomatal Movement. *J. exper. Bot.* 5, 345.
- Wilson, G., 1948: The Effect of some Environmental Factors on the Movement of Guard Cells. *Plant Physiol.* 23, 5.