

# WEITERE BEITRÄGE ZUR PROTOPLASMATISCHEN ANATOMIE DES HELODEA-BLATTES

VON TILDE MEINDL

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Graz)

Mit 6 Textfiguren

Eingegangen am 13. März 1934

## I. Einleitung

Moder (1932) hat gezeigt, daß das im Sinne der klassischen Anatomie einfach und gleichförmig gebaute Blatt von *Helodea canadensis* vom Standpunkte der protoplasmatischen Anatomie aus betrachtet bisher unerkannt gebliebene regionale Unterschiede aufweist. Es bestehen protoplasmatische Differenzen zwischen der Ober- und Unterseite sowie zwischen verschiedenen Teilen der Oberseite des Blattes, vor allem der „Mittelrippe“, dem „Blattfeld“ und dem „Blattrand“.

Die protoplasmatische Charakterisierung der verschiedenen Zonen des *Helodea*-Blattes ist durch die Untersuchung von Moder noch keineswegs als beendet zu betrachten. Es stellen vielmehr diese Studien nur einen Anfang dar; auf der durch Moder geschaffenen Basis muß daher weiter gebaut werden, damit ein vertiefter Einblick in das Wesen der protoplasmatischen Unterschiede der Blattzonen und so des protoplasmatischen Bauplanes des ganzen *Helodea*-Blattes gewonnen werden kann.

Die vorliegende Arbeit, zu der ich die Anregung Herrn Professor Dr. Friedl Weber verdanke, knüpft direkt an die Untersuchung von Moder an. Die Aufgabe war, weiteres Material zur protoplasmatischen Anatomie des Blattes von *Helodea canadensis* zu erbringen; gleichzeitig ergaben sich Beiträge zur allgemeinen Physiologie der Pflanzenzelle.

## II. Kaliumpermanganat-Wirkung

### 1. Plasmolyse-Permeabilität nach Kaliumpermanganat-Vorbehandlung

Child (1928) hat an tierischen Objekten regionale Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Kaliumpermanganat festgestellt. Es war nahelegend, zu prüfen, ob auch an Pflanzenorganen solche Resistenzunterschiede bestehen. Diese Frage wurde an *Helodea*-Blättern geprüft. Erwachsene Blätter wurden in frisch bereitete  $\frac{1}{10}$  %  $\text{KMnO}_4$ -Lösungen eingelegt. Es ist bekannt, daß der Beginn von Veränderungen an lebenden Protoplasten sich häufig zunächst morphologisch gar nicht bemerkbar macht, sich aber doch schon durch künstliche Eingriffe wie Plasmolyse aufzeigen läßt (Weber 1925).

Es wurde daher geprüft, ob sich nach kurzer Vorbehandlung mit der genannten Kaliumpermanganatlösung in einem Zeitpunkt, in dem noch keinerlei Schädigung sichtbar war, durch Plasmolyse eine Veränderung etwa schon nach-

weisen läßt. Die Plasmolyse wurde mit 1,5 mol KCl-Lösung vorgenommen. Die nicht vorbehandelten Kontrollblätter zeigten normale Plasmolyse mit rasch konvex werdenden Plasmolyseformen. Nach einer Vorbehandlung mit  $\frac{1}{10}$  % Kaliumpermanganatlösung in der Dauer von nur einer Minute kam es im Plasmolytikum in den Zellen des Blattfeldes zu keiner normalen Plasmolyse, sondern zur Ausbildung eines Tonoplastenstadiums (Vakuolenplasmolyse) und zu rascher Desorganisation des Mesoplasmas und der Chloroplasten. Die kontrahierte Vakuole (der Tonoplast) hielt sich noch einige Minuten oder auch länger unverändert. Die Zellen des Blattfeldes vertragen also nach der kurzen Vorbehandlung

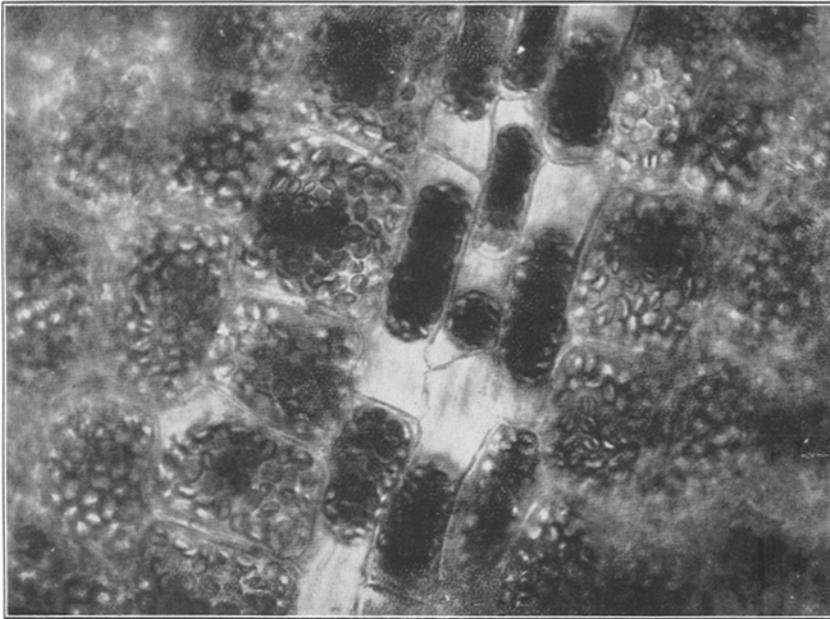


Fig. 1. *Helodea*-Blatt. Nach 1 Min. langer Vorbehandlung mit  $\frac{1}{10}$  % Kaliumpermanganat plasmolysiert mit 1,5 mol KCl-Lösung. Die Zellen des Blattfeldes nach kurzem Tonoplastenstadium abgestorben, die Zellen der Mittelrippe plasmolysiert.

mit Kaliumpermanganat die Plasmolyse mit 1,5 mol KCl nicht. Ganz anders verhalten sich die Zellen der Blattbasis, der Spitze, des Randes, der Mittelrippe, sowie auch die amphinekrotischen Zellen. Alle diese zeigen nach der Vorbehandlung mit  $\frac{1}{10}$  % Kaliumpermanganatlösung im KCl Plasmolytikum normale Plasmolyse. Es ergibt sich demnach schon aus dieser Versuchsreihe eine weitgehende Differenz in der Empfindlichkeit der Zellen der Oberseite des *Helodea*-Blattes gegenüber  $\text{KMnO}_4$ , und zwar erweisen sich die Zellen des Blattfeldes als besonders empfindlich. Um diesen Unterschied in der Resistenz genauer zu präzisieren, wurden bei weiteren Versuchen die Konzentration sowie die Dauer der Vorbehandlung des  $\text{KMnO}_4$  variiert.

## a) Versuche mit erwachsenen Blättern

## 1. Kaliumpermanganat in verschiedenen Konzentrationen

Nach Vorbehandlung mit  $\frac{1}{10}$  %  $\text{KMnO}_4$  von einer Minute und Plasmolyse mit 1,5 mol KCl konnte man beobachten, daß in den Zellen des Blattfeldes Tonoplastenplasmolyse eingetreten war; diese blieb 3—4 Stunden erhalten. Alle Zellen der Blattbasis, der Spitze, des Randes, der Mittelrippe und die amphinekrotischen Zellen des Blattfeldes zeigten keinerlei Schädigung und ließen sich normal plasmolysieren. Erst allmählich begannen die Zellen der Basis und Spitze abzusterben. Nach 5 Minuten zeigten auch diese Zellen Tonoplastenbildung. Auf der Blattunterseite war die Zonenbildung nicht so stark ausgeprägt. Die Blattzellen starben auch hier bis auf die Mittelrippe nach vorhergehender Tonoplastenbildung nach 5 Minuten völlig ab. Die noch am Leben gebliebenen Partien des Blattes (Mittelrippe, Rand und Blatzzähne) erwiesen sich als bedeutend resistenter und vertrugen nach einigen Stunden Vorbehandlung mit  $\frac{1}{10}$  %  $\text{KMnO}_4$  die Plasmolyse mit 1,5 mol KCl. Um den Resistenzgrad dieser Partien genau festzustellen, wurden Versuche mit einer höheren Konzentration von  $\text{KMnO}_4$  angestellt. Frische Blätter von demselben Alter wurden in  $\frac{5}{10}$  %  $\text{KMnO}_4$ -Lösung gebracht, wobei sich herausstellte, daß sich die Blatzzähne nach 2—3 Minuten, die Randzellen nach 4—6 Minuten langer Vorbehandlung nicht mehr plasmolysieren ließen. Die einzige überlebende Zone des Blattes blieb nun die Mittelrippe. Sie starb erst, und zwar von der Spitze und Basis gegen die Mitte des Blattes fortschreitend, bei 4—5 Minuten langer Vorbehandlung mit 1 %  $\text{KMnO}_4$  und darauffolgender Plasmolyse. Kurze Zeit vor den Mittelrippenzellen starben die Begleitzellen links und rechts der Mittelrippe ab. Nach 6 Minuten langem Aufenthalt in 1 %  $\text{KMnO}_4$  und Plasmolyse traten in den Zellen der Mittelrippe zum erstenmal Tonoplasten auf.

2. Gleichbleibende Konzentration,  
verschiedene Dauer der Kaliumpermanganat-Behandlung

*Helodea*-Blätter gleichen Alters wurden in  $\frac{1}{10}$  %  $\text{KMnO}_4$  gelegt. Dies ist jene Konzentration, die von den empfindlichsten Zellen (den Feldzellen) auf ganz kurze Dauer noch vertragen wurde.

Die Einwirkung der angeführten Konzentration durch 1 Minute genügte, um in den Zellen des Blattfeldes bei darauffolgender Plasmolyse mit  $1\frac{1}{2}$  mol KCl Tonoplastenbildung hervorzurufen. Die Blatzzähne und die Randzellen sind bedeutend resistenter; erst der Aufenthalt von 1— $1\frac{1}{2}$  Stunden für die Zähne und von  $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden für die Randzellen genügte, um bei nachheriger Plasmolyse eine letale Wirkung zu erzielen. Die Mittelrippe und die an sie beiderseits unmittelbar anschließende Zellreihe sind die resistentersten. Es bedarf einer Vorbehandlung von 6—8 Stunden um bei Plasmolyse diese Zellen zum Absterben zu bringen.

## b) Versuche mit Blättern der Knospenregion

Alle obigen Versuche wurden mit vollständig ausgewachsenen *Helodea*-Blättern gemacht. Dieselben Versuche mit ganz jungen Blättern aus der Spitze des Sprosses ausgeführt, ergaben, daß diese viel widerstandsfähiger sind gegen

Plasmolyse nach vorhergehender Einwirkung von  $\text{KMnO}_4$ . Sie vertrugen eine  $\frac{5}{10}$  %  $\text{KMnO}_4$ -Lösung 10 Minuten hindurch, ohne Schädigung zu erleiden und ließen sich normal mit einer  $1\frac{1}{2}$  mol KCl-Lösung plasmolysieren. Nach 15 Minuten begannen die Zellen der Spitze und der Basis braun zu werden. Die Einwirkung der 1 %  $\text{KMnO}_4$ -Lösung vermochte rasch eine Veränderung und schließlich das Absterben der verschiedenen Zellen herbeizuführen. Die Reihenfolge des Absterbens der verschiedenen Zonen blieb nicht ganz dieselbe wie bei den ausgewachsenen Blättern, doch zeigte sich auch hier die Mittelrippe als die resistenste Partie des Blattes. Die Zellen der Blattspitze und der Basis starben nach 1 Minute langer Vorbehandlung und Plasmolyse ab, die Zähne nach 5 Minuten. Von der Basis und Spitze aus breitete sich die Zone der abgestorbenen Zellen immer weiter gegen die Mitte des Blattes aus. Nach 5 Minuten war das ganze Blättchen bis auf den Mittelrippenteil abgestorben. Die Mittelrippenzellen starben erst nach 15–20 Minuten ab.

### c) Reversibilität der Kaliumpermanganat-Wirkung

Die Schädigung, die nach Einwirkung von  $\frac{1}{10}$  %  $\text{KMnO}_4$  auf ausgewachsene Blätter bei nachheriger Plasmolysezutage tritt, kann wieder behoben werden und zwar durch ein- oder mehrstündiges Auswaschen vor der Plasmolyse.

## 2. Kaliumpermanganat-Resistenz

Wie in dem vorhergehenden Abschnitte gezeigt wurde, vertragen die Zellen des Blattfeldes von *Helodea* nach kurzer Vorbehandlung mit  $\text{KMnO}_4$  die Plasmolyse nicht, sie müssen also durch die Vorbehandlung eine Veränderung des Protoplasmazustandes erfahren haben. Die Veränderung braucht aber, wenn nicht Plasmolyse eingeleitet wird, keine Schädigung der Zelle zu bedeuten. In der Tat erweisen sich die Zellen des Blattfeldes nach der kurzen Behandlung mit Kaliumpermanganat als in ihren Protoplasten (also abgesehen von einer eventuellen Manganspeicherung in der Membran) morphologisch unverändert. Die bisher geschilderten Versuche geben also über die Resistenz gegenüber Kaliumpermanganat (ohne darauffolgende Plasmolyse) keinen Aufschluß. Andererseits kann die Plasmolyse als Lebenskriterium nicht verwendet werden, wenn man entscheiden will, ob mit Kaliumpermanganat behandelte Zellen noch am Leben sind; denn selbst, wenn die Zellen am Leben sind, können sie bei einsetzender Plasmolyse absterben, was so schnell vor sich gehen kann, daß man den Eindruck gewinnt, die Zellen seien unplasmolysierbar, also von vornherein schon tot. Diese Bemerkung ist von allgemeiner prinzipieller Bedeutung für die Frage, ob die Plasmolyse als „Lebensreaktion“ Verwendung finden kann. Diese Frage ist für viele Fälle zu verneinen: Es kann eine Zelle am Leben, ja im wesentlichen normal vital sein und doch bei der Plasmolyse sofort absterben; Zellen, welche sich nicht plasmolysieren lassen, brauchen also keineswegs vor der Plasmolyse schon mehr oder minder schwer geschädigt oder gar schon tot zu sein (vgl. Weber 1932 über die Versuche von Fluri).

Zur Prüfung der Resistenz gegenüber Kaliumpermanganat an und für sich, das heißt, um zu prüfen, ob mit Kaliumpermanganat behandelte Zellen lebend sind, kann die Plasmolyse jedenfalls nicht verwendet werden; man muß da entweder Vitalfärbung (mit Neutralrot) vornehmen oder sich auf andere Kriterien verlassen (vgl. Nadson 1928).

Ohne auf die Einzelheiten der Versuche einzugehen, kann man zusammenfassend sagen, daß, wie gegenüber anderen Schädigungen, die Mittelrippenzellen und die der Blattbasis auch gegenüber der langandauernden Einwirkung stark verdünnter  $\text{KMnO}_4$ -Lösung sich am resistensten erwiesen.

### 3. Neutralrotfärbung

Vitalfärbungen bei unserem *Helodea*-Material ergaben im normalen Zustand eine diffuse Zellsaftfärbung in allen Zellen mit Ausnahme der Zellen an der Basis, Mittelrippe und des Randes, die sich am langsamsten, schwächsten und in der Mehrzahl der Fälle überhaupt nicht färbten. Übereinstimmung mit den Befunden von Gicklhorn (1927) und Moder (1932).

Folgende Versuche ergaben nun, daß Blätter, die mit schwachen Lösungen von  $\text{KMnO}_4$  vorbehandelt und mit Neutralrot gefärbt wurden, ein ganz anderes Bild zeigten. Junge *Helodea*-Blätter wurden in einer 0,05 %  $\text{KMnO}_4$ -Lösung  $2\frac{1}{2}$  Stunden gelassen, nachher 2 Stunden gewässert und mit 0,02 % Neutralrot gefärbt. Nach 5—6 Stunden waren die Kontrollblätter sowie die vorbehandelten Blätter gefärbt. Während jedoch bei den normalen Blättern die Basis, Mittelrippe und die amphinekrotischen Zellen ungefärbt blieben, zeigten gerade diese Zellen bei  $\text{KMnO}_4$ -Vorbehandlung bedeutend intensivere Färbung als die übrigen Zellen. Steigerte man die Konzentration von  $\text{KMnO}_4$  auf 0,1 %, so trat dieselbe Erscheinung schon bei 10 Minuten langer Vorbehandlung ein. Eine Erklärung für diese merkwürdige Erscheinung kann nicht gegeben werden; möglicherweise handelt es sich um eine Reaktionsänderung des Zellsaftes, die zu einer erhöhten Speicherung des basischen Vitalfarbstoffes in den Mittelrippenzellen führt.

### 4. Diskussion

Es fragt sich nun, welche Schlüsse in bezug auf die protoplasmatische Charakterisierung der verschiedenen Zonen des *Helodea*-Blattes aus den geschilderten Versuchen über die Wirkung des Kaliumpermanganats gezogen werden können.

Bei den folgenden Überlegungen muß von der Beobachtung ausgegangen werden, daß sich in den Zellen des Blattfeldes nach kurzer (1 Min.) Vorbehandlung mit  $\text{KMnO}_4$  in hypertonen Lösungen von KCl Vakuolenplasmolyse einstellt und daß die Zellen, nachdem dieses „Tonoplastenstadium“ erreicht ist, bald absterben. Ein derartiges plasmolytisches Verhalten wurde in letzter Zeit an *Helodea*-Blattzellen und anderen Objekten von Weber (1931—1933) und von Strugger (1931, 1932) beobachtet, und zwar nach ganz verschiedenartiger Vorbehandlung der betreffenden Zellen. So treten Tonoplastenstadien ein unter dem Einfluß der Kälte, bei Vitalfärbung mit Eosin, nach Vorbehandlung mit Kaliumoxalat, Kaliumrhodanid, Aluminiumsalzen, Gallensalzen. Wenn auch die Bedingungen, unter welchen sich beim Einlegen in hypertonen Lösungen Tonoplasten bilden, noch keineswegs vollkommen geklärt sind, so wurde es doch wahrscheinlich gemacht, daß die Vakuolenplasmolyse vornehmlich unter zwei verschiedenartigen Umständen erfolgt: entweder, wenn die Plasmolyse infolge Verfestigung der Protoplasmaoberfläche erschwert ist (weitgehende Zerstörung des Plasmalemma) oder aber, wenn die Bildung eines neuen Plasmalemma gestört ist (Behinderung der surface precipitation reaction). Der letztere Fall ist vor allem dann realisiert, wenn der Cytoplasmaoberfläche das zur Bildung eines neuen Plasmalemma nötige Kalzium entzogen wird (Vorbehandlung mit Kaliumoxalat); wird in diesem letzteren Falle nach der Vorbehandlung wieder Kalzium zugesetzt (Plasmolyse mit Ca-Salzen), so erfolgt keine Vakuolenplasmolyse, sondern normale Plasmolyse. Ob die Vorbehandlung mit Kaliumpermanganat etwa in dieser Weise wirkt, kann daher dadurch entschieden werden, daß nach der Kaliumpermanganat-Wirkung nicht mit KCl, sondern mit  $\text{CaCl}_2$  plasmolysiert wird. Es zeigt sich nun bei solchen Versuchen, daß in den der Kaliumpermanganatlösung entnommenen Blättern auch im  $\text{CaCl}_2$ -Plasmolytikum in den Blattfeldzellen Vakuolenplasmolyse

und nicht normale Plasmolyse eintritt. Daraus geht hervor, daß der Wirkungsmechanismus der Kaliumpermanganatlösung ein anderer sein muß als der der Kaliumoxalatlösung. Dasselbe ergibt sich im übrigen auch aus den Reversibilitätsversuchen. Während die Wirkung der Oxalatlösung schon durch ganz kurzes Auswaschen rückgängig gemacht werden kann, ist dies, wie oben beschrieben, bei der Wirkung der Permanganatlösung nicht der Fall. Diese ist zwar im allgemeinen auch reversibel, doch bedarf es eines auffallend langen Auswaschens, um den Effekt der Permanganatlösung wieder aufzuheben.

Mehr als die negative Feststellung, daß die Permanganatwirkung von der der Oxalatwirkung anscheinend verschieden ist, läßt sich allerdings ohne weiteres nicht machen. Die Tonoplastenbildung nach Kaliumpermanganat-Vorbehandlung dürfte demnach eher in einer Erschwerung der Plasmolyse (etwa durch Verfestigung der äußeren Grenzschihte) als in einer Behinderung der Plasmalemma-Neubildung die Ursache haben.

### III. Natriumoleat-Wirkung

Werden Blätter von *Helodea* in eine 1 % Natriumoleat-Lösung gelegt, dann beginnt schon nach wenigen Minuten an der Oberfläche des Blattes ein eigenartiger Belag aufzutreten. Zuerst zeigt sich dieser Belag an den Zellen, die zu beiden Seiten an die Mittelrippe grenzen, und zwar im basalen Teil des Blattes. Nach etwa einer Viertelstunde ist der Niederschlag über diesen Zellen schon recht dicht und geschlossen und breitet sich von hier aus allmählich über das ganze Blatt aus mit Ausnahme der Mittelrippenzellen, die auch späterhin vollkommen frei davon bleiben. Bei stärkerer Vergrößerung sieht man deutlich, wie der Niederschlag über den die Mittelrippe flankierenden Zellen zwar sehr dicht geworden ist, aber nicht die ganze Oberfläche dieser Zellen bedeckt, sondern nur ungefähr die Hälfte bis zwei Drittel. Niederschlagsfrei ist der an die Mittelrippe grenzende Zellteil, vom Niederschlag überzogen der von der Mittelrippe abgewendete Teil. Das Aussehen des Niederschlages kann recht verschieden sein. In der Regel sind es kleine Körnchen, die so dicht nebeneinander liegen, daß sie eine zusammenhängende Kruste bilden. Häufig ist der Niederschlag aber auch fadenförmig, die Fäden strahlen dann einzeln oder zu Büscheln vereinigt vom zentralen Teil der Zelloberfläche aus. Die Bildung der zarten Strahlenbüschel wird zum Teil durch das aufliegende Deckglas behindert. Die Bildung dieses Belages an der Oberseite der Epidermiszellen und ganz speziell die auffallende Tatsache, daß die Zellen der Mittelrippe frei von diesem Belage bleiben, erinnert an die eigenartige „Manganspeicherung“, die von Molisch (1909) entdeckt und zuletzt von Gieckhorn (1927) eingehend studiert wurde. Auch bei den Manganniederschlägen oder vielmehr Einlagerungen in der Membran handelt es sich um Bildungen in der Außenwand der Epidermiszellen und auch dort bleiben gerade die Zellen der Mittelrippe von der Manganeinlagerung frei. Das Mangandioxyd wird bei *Helodea* entweder in die Außenmembran eingelagert oder es bilden sich zusammenhängende Krusten, die locker der Epidermis aufliegen und leicht abgewaschen oder mit einem Pinsel entfernt werden können. Das letztere ist auch bei dem Belage der Fall, der sich wie eben beschrieben beim Einlegen der Blätter in die Na-Oleatlösung bildet.

Wenn demnach einerseits eine Reihe von Ähnlichkeiten besteht zwischen der Bildung des Niederschlages in Permanganatlösung und in Na-Oleatlösung, so

weist doch andererseits die Niederschlagsbildung in der Seifenlösung auch ganz andere Merkmale auf. Die Manganeinlagerung ist insofern eine Lebensreaktion, als sie nur erfolgt, solange die Zelle lebt. Sie tritt auch nur ein im Lichte und nur in der Epidermis der Blattoberseite. Alle diese Kriterien treffen bei der „Krusten“-Bildung in Na-Oleatlösung nicht zu. Sie tritt ein auch im Dunkeln, auch im abgetöteten Blatte und auch an der Epidermis der morphologischen Unterseite. Wichtig für die Frage nach der Entstehung der Niederschläge in Na-Oleat ist weiterhin das Ergebnis folgenden Versuches: Es war zu entscheiden, ob für die Entstehung der Kontakt des Protoplasmaschlauches mit der Zellmembran nötig ist. Die Blätter wurden zunächst in einer 1 mol Traubenzuckerlösung plasmolysiert. Nach Eintritt der perfekten Plasmolyse wurden die Blätter in eine 1 mol Traubenzuckerlösung übertragen, der  $\frac{1}{10}$  % Na-Oleat beigefügt war. Nach wenigen Minuten trat der „Niederschlag“ auf und zwar über den plasmolysierten Zellen in ganz gleicher Weise wie über nicht plasmolysierten Kontrollzellen. Wichtig ist dabei vor allem, daß die Ausdehnung des Niederschlages über den plasmolysierten Zellen nicht verschieden war von der Ausdehnung über nicht plasmolysierten Zellen. Während der Protoplast in der Zellmitte zu einer Kugel kontrahiert lag, überzog der Niederschlag die ganze Zelloberfläche, also auch dort, wo der Protoplast keinen Kontakt mehr mit der Membran hatte. Aus diesem Versuch geht hervor, daß die „Niederschlagsbildung“ aus der Zellmembran hervorgeht, daß weder das Plasmalemma (die äußere Plasmahaut) noch der ganze Protoplast überhaupt daran wesentlich beteiligt ist. Es muß also wohl eine in der Zellmembran selbst vorhandene Substanz mit dem Na-Oleat den Niederschlag geben.

Wenn bisher immer von einem „Niederschlag“ gesprochen wurde, der beim Einlegen in die Na-Oleatlösung entsteht, so ist diese Bezeichnung eigentlich nicht sehr treffend oder kann doch nur für die Zellen des Blattfeldes Geltung haben. An den Blatträndern und vor allem den Blättzähnen entsprechen die Bildungen keineswegs dem gewöhnlichen Bilde eines „Niederschlages“, sie sind in ihrer faden- oder stäbchenartigen Gestalt viel eher als „Effloreszenzen“ zu bezeichnen. Es besteht eine auffallende Ähnlichkeit mit dem „stäbchenförmigen Wachsüberzug“.

De Bary unterscheidet vier Hauptformen von Wachausscheidungen: den gehäuften Wachsüberzug, den körnigen Reifüberzug, den Stäbchenüberzug und die Krustenform. Alle vier Niederschlagsformen finden wir bei unseren Versuchen mit Na-Oleat.

Kocht man *Helodea*-Blätter  $2\frac{1}{2}$  Stunden in Alkohol oder legt sie 4 Stunden in Äther, so bekommt man, nach Na-Oleat-Behandlung, wenn auch in geringerem Maße, dieselben vorhin beschriebenen Niederschläge. Wenn es sich tatsächlich um eine Ausscheidung von Wachs, wie sie de Bary beschreibt, handeln würde, so müßte die vorhergehende Behandlung mit Wachslösungsmitteln, die ja in die feinen Ausfuhrkanälchen eindringen müßten, die Bildung eines neuen Niederschlages verhindern. Andererseits spricht die Gestalt der stäbchenförmigen Effloreszenzen, die sich bei Behandlung mit Na-Oleat bilden, und die eine so auffallende Ähnlichkeit mit stäbchenförmigem Wachsüberzug zeigen, für eine

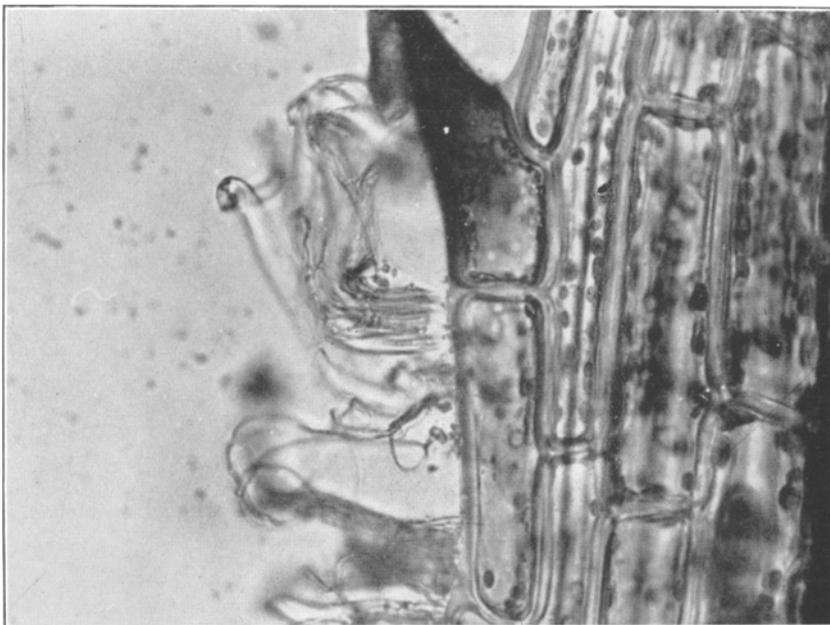


Fig. 3

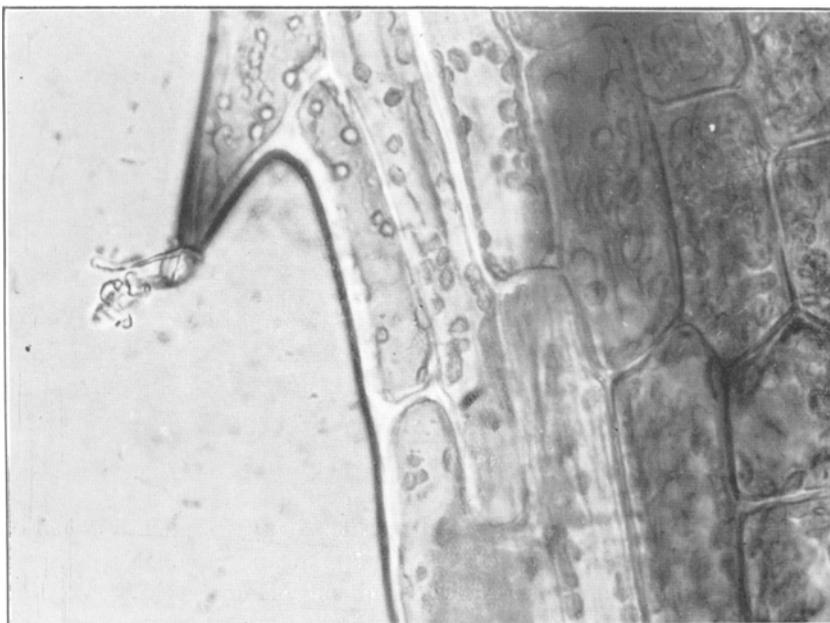


Fig. 2

analoge Entstehungsart. Die Art und Weise der Entstehung des Wachsüberzuges ist nun in neuerer Zeit durch die Arbeit von Dous (1927) weitgehend aufgeklärt worden. Dous konnte es wahrscheinlich machen, daß die Kutikula durch Poren durchbrochen wird, und daß durch diese Poren das im Protoplasma gebildete Wachs in Form von Effloreszenzen ausgeschieden wird. Es ist also daran zu

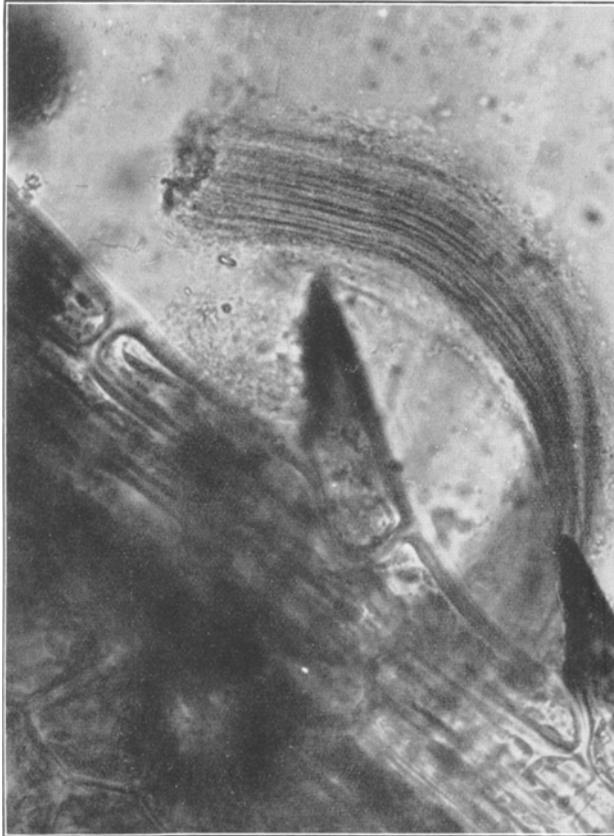


Fig. 4

Fig. 2—4. *Helodea*-Blatt in 1 % Na-Oleat-Lösung, Es entwickeln sich — zuerst an den Blatzzähnen und am Blattrand — Effloreszenzen.

denken, daß die Bildungen mit Na-Oleat in ähnlicher Weise entstehen. Als Bildungsort kommt allerdings hier der Protoplast nicht in Betracht, nachdem die Stäbchen auch nach Aufhebung des Kontaktes der Membran mit dem Protoplasten durch Plasmolyse entstehen. Es muß also angenommen werden, daß die Bildung bei dem Kontakt des Na-Oleat mit der Membran erfolgt und durch die Kutikula nach außen ausgeschieden wird.

Anschließend sei noch auf die Vermutung Gicklhorn's hingewiesen, in der er die *Helodea*-Epidermis als eine einzige Hydropote (mit Ausnahme der Mittelrippe) auffaßt.

Es wäre möglich, daß das Ausbleiben der Überzüge über der Mittelrippe auch bei unseren Versuchen dadurch erklärbar ist, daß diesen Zellen nicht die Eigenschaft von Hydropoten zukommt, den anderen Zellen aber wohl.

Zur Aufklärung der chemischen und physikalischen Natur der Überzüge und Effloreszenzen wurden folgende Reaktionen gemacht:

Löslichkeit der Überzüge:  
 in Äther: unlöslich  
 „ Alkohol „  
 „ Petroläther „  
 „ Aceton: „  
 „ verd. HCl: löslich, die Überzüge werden in ölartige Tropfen überführt  
 „ Essigsäure: löslich, die Überzüge werden in ölartige Tropfen überführt.

Färbbarkeit: in Sudan ist der „Niederschlag“ nicht färbbar.

Anisotropie: Die Figuren sind doppelbrechend.

Schmelzpunktbestimmung:

*Helodea*-Blätter, die mit 1 % Na-Oleat vorbehandelt wurden und Niederschlagsfiguren zeigten, wurden auf den Mikrothermostat (nach REICHERT) zur Bestimmung des Schmelzpunktes des „Niederschlages“ gebracht. Eine Beschreibung des Apparates hat Pekarek (1933) gegeben. Bei 90° C begannen die Figuren zu schmelzen.

Die Figuren zerflossen und ölähnliche Tropfen blieben zurück. Beim Abkühlen fielen keine Kristalle aus.

Die Vermutung, daß die Überzüge, die durch Behandlung mit Na-Oleat entstehen, stäbchen- und krustenförmige Wachsabscheidungen darstellen, ist demnach unbedingt abzulehnen. Es besteht nämlich außer ihrem Aussehen und ihrem gleichen Bildungsort keine Übereinstimmung. Während Wachs-niederschläge in Fettlösungsmittel, wie Äther und kochendem Alkohol, löslich sind, in Säuren hingegen nicht, verhielten sich die beschriebenen Natriumoleat-Niederschläge gerade umgekehrt.

Eine endgültige Erklärung für diese Erscheinung ist schwer zu geben. Sicher ist nur, daß das Na-Oleat ihre Bildung herbeiführt. Es sind nun zwei Möglichkeiten denkbar:

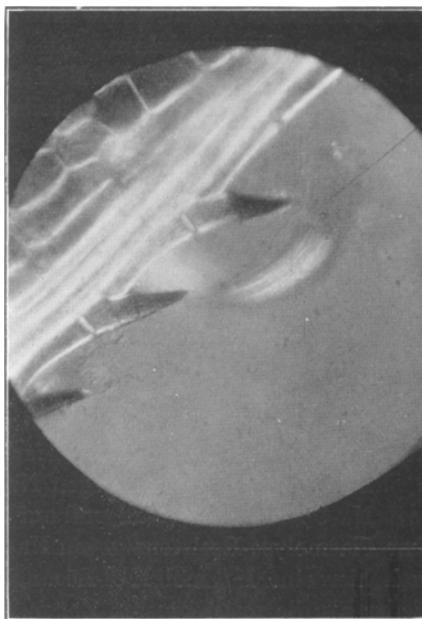


Fig. 5. *Helodea*-Blatt in 1 % Na-Oleat-Lösung. Dieselbe Partie des Blattes wie in Fig. 4 bei schwächerer Vergrößerung, im polarisierten Lichte. Das von einem Blattzahn ausstrahlende Effloreszenz-Büschel leuchtet auf (optische Anisotropie).

Erstens, das Na-Oleat führt nur eine Veränderung der Oberflächenspannung der Lipoidbestandteile der äußeren Grenzschichte herbei. Als Grenzschichte kommt in Betracht: die Zellmembran und die nach Hansteen-Cranner (1922) sie durchdringenden protoplasmatischen Bestandteile, welche Phosphatid-(Lipoid-) Charakter besitzen. Diese Veränderung kann zur Bildung adsorptiver Kräfte führen, durch die bestimmte Bestandteile (Adduktverbindungen) der Oberflächenschicht entrissen werden, die dann aus der Zelle austreten und diese eigenartigen Figuren bilden. Die zweite Möglichkeit besteht darin, daß das Na-Oleat an der Bildung der Niederschläge selbst beteiligt ist, und mit den in den protoplasmatischen Bestandteilen der Membran vorhandenen Eiweißstoffen eine Adduktverbindung eingeht.

Die Addukte können Additionsverbindungen von Eiweißstoffen mit Phosphatiden sein, die dadurch charakterisiert sind, daß ihre Fettkomponente getarnt ist, sie daher im gekoppelten Zustande keine Fettreaktionen geben (unlöslich in Äther, Alkohol usw., nicht färbbar mit Sudan). Sobald nun durch das Lösungsmittel (verdünnte Salzsäure, Essigsäure) oder durch hohe Temperatur (Schmelzen) die Adduktverbindung in seine Bestandteile zerlegt und die Eiweißkomponente entfernt wird, bleibt nur mehr der Fettanteil über, der jetzt auf Fettfarbstoffe positiv reagiert. Die Tropfen, die nach Lösung mit verdünnten Säuren entstanden, ließen sich auch tatsächlich mit Sudan färben, während sich die Effloreszenzen selbst dem Fettfarbstoff gegenüber nicht als färbbar erwiesen.

Plasmolyse-Resistenz gegen Natriumoleat:

Na-Oleat wirkt schädigend auf die Zellen ein. Im folgenden sei noch kurz über Plasmolyse-Resistenz gegen Na-Oleat berichtet. Als Plasmolytikum diente auch hier eine  $1\frac{1}{2}$  mol KCl-Lösung. Mittelrippe und Blattrand erwiesen sich wieder als die resistertesten Zonen. Auch hier kann die Erklärung dieses verschiedenen Verhaltens darin zu suchen sein, daß die Mittelrippenzellen, denen nach Gicklhorn zum Unterschied von den Feldzellen Hydropotencharakter nicht zukommt, für das Na-Oleat schwerer oder gar nicht durchlässig sind.

#### IV. Wirkung ultravioletter Strahlen

Unsere Kenntnis über die Wirkung der Ultraviolettstrahlen auf die lebende Zelle beruht zwar zum größeren Teil auf Beobachtungen an tierischem Material, doch liegen immerhin auch schon Arbeiten über den Einfluß auf Pflanzenzellen vor und außerdem darf man wohl annehmen, daß sich — in den Grundzügen wenigstens — tierisches und pflanzliches Protoplasma in dieser Hinsicht ähnlich verhalten wird; es können daher auch Befunde an tierischen Zellen bei den hier zu erörternden Fragen, wenn auch nur in beschränktem Maße, mitverwertet werden. Von der reichhaltigen Literatur (vgl. Heilbrunn 1928) seien nur diejenigen Arbeiten erwähnt, die in Beziehung zu der vorliegenden Untersuchung stehen.

Von den Lebenserscheinungen der Pflanzenzellen war es zunächst besonders die Protoplasmaströmung, deren Beeinflussung durch ultraviolette Strahlen studiert wurde. Hertel (1904) verwendete u. a. auch das Blatt von *Helodea* als Untersuchungsmaterial. Bei einer bestimmten Intensität und Dauer der Bestrahlung wurde in den Blattzellen die Protoplasmaströmung verlangsamt und dann (zunächst noch reversibel) sistiert. Uns interessiert hier besonders, daß sich dabei nach folgenden Angaben von Hertel die verschiedenen Partien des Blattes nicht gleich verhalten: „In den Randpartien des Blättchens hörte

schon nach einer Bestrahlung von 2—3 Minuten die Bewegung auf. Je näher die Zellen der Mittelrippe lagen, desto später trat die Wirkung auf . . . . In der Mittelrippe selbst sah man in manchen Blättern noch Strömung selbst bei 15 Minuten langer Bestrahlung . . .“ Eine Verlangsamung der Protoplasmaströmung kann auf einer Verminderung der treibenden Kraft, aber auch auf einer Erhöhung des Widerstandes (der Viskosität des Protoplasmas), schließlich natürlich auch auf beiden Ursachen beruhen. Eine Entscheidung ist nicht ohne weiteres zu treffen; immerhin hat aber die Möglichkeit, daß eine Erhöhung des Widerstandes für die Verlangsamung der Strömung zum Teil wenigstens verantwortlich ist, insofern manches für sich, als ja für verschiedene tierische und pflanzliche Objekte der Nachweis erbracht ist, daß die ultravioletten Strahlen die Viskosität des Cytoplasmas erhöhen; Schleip (1923) sowie Ruppert (1924) haben dies für tierische Eier, Gibbs (1926) für *Spirogyra*-Zellen gezeigt, auch die Veränderung im Dunkelfeldbilde bei Ultraviolettbestrahlung, wie sie u. a. von Addoms (1927) an den Wurzelhaaren von *Triticum* beobachtet und als beginnende Koagulation gedeutet wurde, fügt sich in das allgemeine Bild von der Zustandsänderung bei Bestrahlung gut ein; dasselbe gilt auch von der Erhöhung der Permeabilität, die bei Anwendung der Strahlenstichmethode von Tchahotine (1921) aufgezeigt wurde. Auf diese Literaturangaben wird zurückzugreifen sein, wenn die eigenen Befunde, die nun beschrieben werden, zu diskutieren sind. Diese eigenen Untersuchungen beziehen sich zunächst auf die Wirkung der Ultraviolettstrahlen, auf den Vorgang der Plasmolyse, und zwar auf Plasmolyseform, Plasmolysezeit und Deplasmolysezeit. Dabei wurde, wenn auch in zweiter Linie, so doch besonders darauf geachtet, ob die sich einstellenden Veränderungen in allen Regionen des Blattes in gleicher Weise zeigen, oder ob sich auch in dieser Hinsicht zonale Unterschiede zeigen. Im Laufe der Untersuchung ergaben sich weiterhin Beobachtungen über Strahlensensibilität, sowie auch über die Strahlendurchlässigkeit des Blattgewebes.

Die Bedingungen, unter denen die Bestrahlung vorgenommen wurde, waren folgende:

Lichtquelle: Quecksilberdampflampe Spannung: 120 Volt; Stromstärke: 2 Amp.

Wellenlänge: Nicht gemessen

Entfernung: 45,5 cm

Temperatur: 24° C

Die Dauer der Bestrahlung wurde variiert und betrug zwischen 1 und 12 Minuten. Die Versuchsblätter kamen nach Abtrennung vom Stamm in großen Wassertropfen auf eine Reihe von Objektträgern; auf jedem Objektträger befanden sich zwei Blätter. Ein Deckglas wurde nicht aufgelegt, um eine Abschwächung der UV-Strahlen zu vermeiden. Die Blätter wurden entweder mit der morphologischen Oberseite nach oben oder aber mit der morphologischen Unterseite nach oben den Strahlen ausgesetzt. Als Vergleichsobjekte dienten stets unbestrahlte Blätter derselben oder benachbarter Blattwirtel.

### Plasmolyseform

Um den Einfluß der Ultraviolettbestrahlung auf die Plasmolyseform zu verfolgen, wurden die Blätter sofort nach der Bestrahlung alle gleichzeitig plasmolysiert, dabei wurde zunächst Traubenzucker (also eine möglichst unschädliche Substanz) als Plasmolytikum gewählt, und zwar in 2 mol Lösung.

Das Ergebnis war folgendes:

Die Blätter, welche 1, 2 oder 3 Min. lang bestrahlt waren, vertrugen die nachherige Plasmolyse ebensogut wie die unbestrahlten Kontrollblätter; im Plasmolyseverlauf (Plasmolyseform, Plasmolysezeit) war keine Veränderung zu bemerken. Dagegen zeigten die länger (5—10 Min. lang) bestrahlten Blätter in ihrer Plasmolyseform und -zeit gegenüber den Kontrollblättern recht auf-

fallende Unterschiede. Schon nach 5 Min. Bestrahlung traten sofort beim Einlegen in das Plasmolytikum in manchen Zellen eigenartige blasenartige Bildungen auf, deren Natur nicht leicht aufzuklären war; diese Bildungen entstanden und vergrößerten sich ungemein rasch, so daß sich schon deswegen über die Art der Entstehung nichts Sicheres ermitteln ließ. Nach anfänglich rascher Volum-

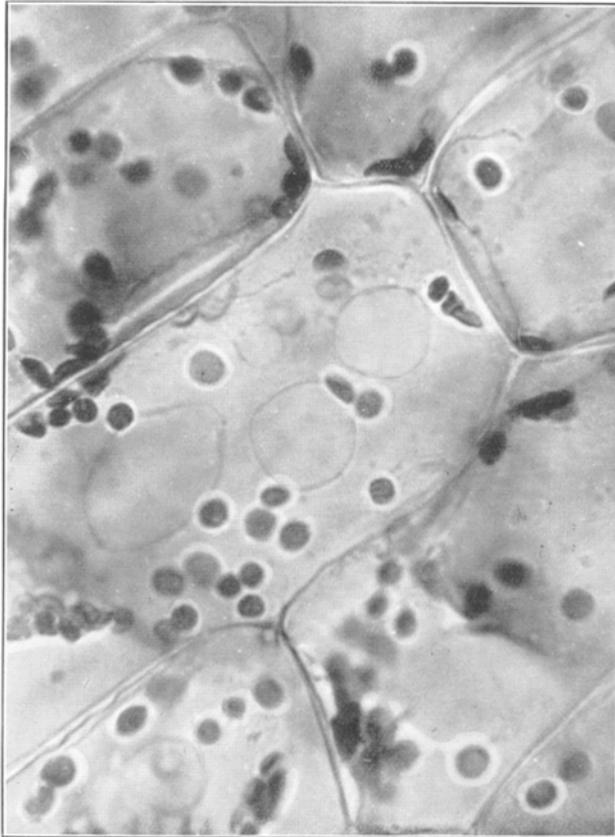


Fig. 6. *Helodea*-Blatt. Zellen des Blattfeldes neben der Mittelrippe nach 5 Min. Ultraviolett-Bestrahlung mit 2 mol Traubenzucker plasmolysiert.

zunahme nahmen die „Blasen“ später langsamer an Größe zu und erreichten nach etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde ihre maximale Ausdehnung (Fig. 6). Dann nahmen sie wieder an Umfang ab, ihre Konturen wurden immer undeutlicher und nach ca.  $\frac{1}{2}$  Stunde meist ganz unsichtbar, in diesem Zeitpunkt starb die Zelle völlig ab.

Bildungen, die als „Blasen“ bezeichnet wurden, hat bereits Schulze (1910) für Pflanzenzellen beschrieben, die mit Ultraviolettstrahlen behandelt wurden. Zum Teil waren dies postmortale lokale Auftreibungen der Kutikula (Staubfadenhaarzellen von *Tradescantia*), zum Teil prä- oder postmortal sich bildende Vakuolen. Die erstere Möglichkeit ist in unserem Falle schon dem morphologischen Bilde nach auszuschließen, dagegen wäre es dem Aussehen

nach wohl denkbar, daß die in den Zellen der bestrahlten *Helodea*-Blätter sich bildenden „Blasen“ Vakuolen sind. Auch dann würden sie sich übrigens von den von Schulze für *Chlamidomonas* beschriebenen Vakuolen-Blasen in ihrer Entstehungsweise unterscheiden, indem die letzteren sich in reinem Wasser bilden, die Blasen bei *Helodea* aber erst im Plasmolytikum. Wie gesagt, wäre es dem Aussehen nach möglich, daß die beschriebenen Blasen in den Zellen der bestrahlten *Helodea*-Blätter Vakuolen, und zwar „Tonoplaste“ sind. Wie bei anderen Pflanzenzellen, so kommt es auch bei *Helodea* häufig vor, daß beschädigte Zellen keine normale Plasmolyse, sondern Vakuolenplasmolyse oder Tonoplastenbildung zeigen. Um eine solche könnte es sich also hier handeln. Diese Möglichkeit kommt aber ebenfalls nicht in Betracht; dies beweisen Versuche an mit Neutralrot vitalgefärbten Blättern. Die Blasen ließen sich nicht mit Neutralrot färben und waren auch dann nicht gefärbt, wenn die Blätter vor der Bestrahlung mit Neutralrot gefärbt wurden. Die Blasen können also keine Tonoplaste gewesen sein. Es bleibt nur noch die Möglichkeit, daß diese „Blasen“ in ähnlicher Weise zustande kommen, wie die gerade in den letzten Jahren wiederholt beschriebene „Lochbildung“ plasmolysierter Protoplaste. Jost (1929) beschreibt, daß sich beim Einlegen von *Valonia* in 1 mol  $\text{CaCl}_2$  folgendes abspielt: „Es beginnen sofort . . . kleine kraterartige Eindellungen sich zu bilden, so daß die Protoplasmaoberfläche wie der Mond aussieht . . . Bald treten dann, zuerst kleine, dann größere Löcher im Plasmabelag auf“. Höfler (1932) hat eine ähnliche Erscheinung für *Cladophora* bei Harnstoffplasmolyse beschrieben und als „Fensterbildung“ bezeichnet, da er diese kreisrunden oder ovalen Bildungen nicht für Löcher im wandständigen Cytoplasma hält, sondern für „Fenster“, durch die man auf den Tonoplasten durchsieht. Schließlich hat Küster (1933) „Dellen-“ und „Löcher“-Bildung im Protoplasten von *Codium* bei plasmolytischer oder andersartiger Abhebung des Protoplasmaschlauches von der Membran beobachtet. Die in den Zellen der bestrahlten *Helodea*-Blätter auftretenden „Blasen“ haben nun zweifelsohne große Ähnlichkeit im Aussehen und in ihrer Entstehung mit bisher bekannt gewordenen Löchern oder Fenstern im Protoplasten. Daß diese „Blasen“ nicht leicht ohne weiteres als solche „Fenster“ zu erkennen sind, hängt wohl damit zusammen, daß der Cytoplasmaschlauch der *Helodea*-Zellen ja recht zart und ziemlich hyalin ist. Es scheint sich demnach bei dieser „Blasen“-Bildung um eine Art „Krampfplasmolyse“ zu handeln. Als unmittelbare Folge der Bestrahlung haftet das Cytoplasma besonders zähe und stark an der von den Strahlen direkt getroffenen Außenwand der Epidermiszelle. Von dieser Wand vermag es sich plasmolytisch sehr schwer loszulösen; die Loslösung erfolgt nur an kleinen kreisförmig umschriebenen Stellen, den positiven Plasmolyseorten; an der Grenze zwischen den positiven und negativen Plasmolyseorten reißt der Protoplast ein, es bilden sich Löcher (oder Fenster ?) im Cytoplasma, die von oben gesehen als mehr oder weniger kugelförmige Blasen erscheinen.

Ist diese Erklärung der „Blasenbildung“ richtig, dann wäre die zunächst eintretende, durch die Plasmolyse sichtbar gemachte Wirkung der Bestrahlung (bei einer Bestrahlungsdauer von 5—10 Min.) eine Erhöhung der Festigkeit (Viskosität) der äußeren, den Strahlen am stärksten ausgesetzten Cytoplasmaschichte.

Hier interessiert nun weiterhin, ob diese Blasenbildung bei Plasmolyse bei allen Zellen der bestrahlten Blätter in gleicher Weise auftritt. Dies ist keineswegs der Fall. Bei einer Ultraviolettbestrahlung des Blattes von nur 5 Minuten bilden sich die „Fenster“ bei nachheriger Plasmolyse ausschließlich in den unmittelbar an die Mittelrippe grenzenden Zellen. Bei 6 Minuten Bestrahlung stellt sich die Erscheinung auch noch in den Zellreihen auf, die 2 oder 3 Zellen von der Mittelrippe entfernt sind. Bei dieser Bestrahlungsdauer ist die Blasenbildung zu beiden Seiten der Mittelrippe auf das basale Drittel des Blattes be-

schränkt, wird die Bestrahlung länger ausgedehnt, so schreitet bei der darauffolgenden Plasmolyse die Blasenbildung gegen die Spitze des Blattes hin fort, ist aber dabei immer auf die der Mittelrippe benachbarten Zellreihen des Blattfeldes beschränkt, die Mittelrippenzellen selbst zeigen die Blasenbildung niemals. Nach obiger Interpretation läßt sich daher entnehmen, daß die Protoplaste der Zellreihen zu beiden Seiten der Mittelrippe und speziell im basalen Teil von den ultravioletten Strahlen am stärksten im Sinne einer Viskositätserhöhung des kortikalen Plasmas verändert werden. Ob dies in einer besonderen Strahlenempfindlichkeit der Protoplaste dieser Zellen begründet ist, oder ob etwa die Zellmembran dieser Zellen aus irgendeinem Grunde für die Strahlen leichter durchlässig ist, bleibt unentschieden.

#### Plasmolysezeit

Zur Untersuchung des Einflusses der ultravioletten Strahlen auf die Plasmolysezeit eignet sich Traubenzucker als Plasmolytikum nicht recht, da bei Traubenzuckerplasmolyse die Plasmolysezeit besonders lang ist, was die Durchführung der Versuche erschweren würde. Es wurde daher bei diesen Versuchen als Plasmolytikum 1 mol Harnstofflösung verwendet. Die Blätter wurden in verschiedenen Versuchsreihen je 1, 2 oder 3 Min. lang bestrahlt. Während bei den nicht bestrahlten Kontrollblättern die Plasmolysezeit 5—10 Min. betrug, niemals aber unter 5 Min., war die Plasmolysezeit der bestrahlten Blätter durchweg sehr kurz, sie betrug nur 1—2 Min., und zwar gleichgültig, ob die Bestrahlung 1, 2 oder 3 Min. vorgenommen wurde. Die selten rasche Annahme der „schönen“ Konvexplasmolyseform war auffallend und sehr einheitlich. Aus einer Abkürzung der Plasmolysezeit ist nach allen bisherigen Erfahrungen auf eine Herabsetzung der Viskosität der Cytoplasmagrenzschicht (des kortikalen Protoplasmas) zu schließen. Demnach hätte eine Bestrahlung von 1—3 Min. Dauer eine Viskositätserniedrigung des peripheren Cytoplasmas bewirkt. Dies scheint zunächst mit den Befunden über die „Blasenbildung“ (Krampfplasmolyse) in Widerspruch zu stehen. Es ist jedoch zu bedenken, daß sich die Krampfplasmolyse erst bei doppelt so langer Bestrahlungsdauer einstellt. Es ist sehr wohl möglich, daß kurze Bestrahlung die Viskosität des kortikalen Cytoplasmas herabsetzt, längere Bestrahlungsdauer aber die Viskosität erhöht. Diese Auffassung wird wesentlich gestützt durch eine Reihe von Literaturangaben. Gibbs (1926) fand, daß kurze Bestrahlung eine Verflüssigung des Protoplasmas von *Spirogyra* bewirkt, längere Bestrahlung dagegen eine Verfestigung. Heilbrunn und Daugherty (1933) konnten eine Verflüssigung des Ektoplasmas von *Amoeba* bei Ultraviolettbestrahlung, die nicht zu lange dauerte, feststellen.

#### Deplasmolysezeit

Die eben beschriebenen Versuche (Harnstoffplasmolyse kurz bestrahlter Blätter) gaben bei weiterer Beobachtung des Plasmolyseverlaufes auch Aufschluß über die Deplasmolysezeit und ihre Veränderung nach Ultraviolettbestrahlung. Folgende Tabelle verzeichnet neben den Plasmolysezeiten auch die Deplasmolysezeiten aus diesen Versuchen.

Dauer der Bestrahlung in Minuten	Plasmolysezeit	Deplasmolysezeit
1	1— 2	15—20
2	1— 2	4— 8
3	1— 2	3
0	5—10	20—30

Während die Deplasmolysezeiten der Kontrollen 20—30 Minuten betrug, werden die Zeiten durch die Bestrahlung abgekürzt, und zwar merklich schon bei 1 Minuten-Bestrahlung, beträchtlich bei 2 Minuten und bis zu  $\frac{1}{10}$  des Kontrollwertes bei 3 Minuten langer Bestrahlung.

Aus dieser Abkürzung der Deplasmolysezeit ist auf eine Erhöhung der Harnstoffpermeabilität zu schließen. Dabei fragt es sich, ob diese Permeabilitätserhöhung die Normal- oder die Plasmolysepermeabilität betrifft. In dieser Frage ist das Ergebnis folgender Versuche nicht ohne Bedeutung:

Es ist nicht gleichgültig für die Deplasmolyse, ob die Zellen (Blätter) vor oder nach der Bestrahlung plasmolysiert werden. Während bei den bisherigen Versuchen die Blätter nach der Bestrahlung plasmolysiert wurden, kamen sie nunmehr im Plasmolytikum selbst im bereits plasmolysierten Zustand zur Bestrahlung. Die dabei beobachteten Deplasmolysezeiten sind in der nachstehenden Tabelle verzeichnet.

Dauer der Bestrahlung in Minuten	Deplasmolysezeit
1	20—30
2	10—20
3	5—10
0	20—30

Vergleicht man diese Werte mit den Deplasmolysezeiten bei Plasmolyse nach der Bestrahlung, so ergibt sich, daß die Deplasmolysezeit der plasmolysiert bestrahlten Zellen (Plasmolyse vor der Bestrahlung) gegenüber den unbestrahlten Kontrollzellen viel weniger verändert ist.

Bestrahlt in Minuten	Deplasmolysezeiten in Minuten	
	unplasmolysiert bestrahlt	plasmolysiert bestrahlt
1	12—25	15—20
2	4— 6	6—12
3	3— 4	5—10

Für diese auffallende Tatsache sind zunächst zwei Erklärungen denkbar. Es muß in Erwägung gezogen werden, daß etwa die Harnstofflösung (1 mol) für die ultravioletten Strahlen weniger durchlässig ist als das Leitungswasser bzw., daß bei der Bestrahlung im plasmolysierten Zustande die Strahlen auch noch die, in den Zellraum eingedrungene Flüssig-

keit zu passieren haben, bevor sie auf das Plasmalemma treffen. Diese Annahme hat nicht viel für sich, weil ja die in Betracht kommende Schichtdicke äußerst gering ist. Es bleibt dann noch die andere Möglichkeit, daß die Permeabilitätserhöhung für Harnstoff bei Plasmolyse nach der Bestrahlung doch in erster Linie die Plasmolysepermeabilität betrifft. Demnach wäre die Permeabilität bei Bestrahlung bereits plasmolysierter Protoplasten deshalb nicht so hoch, weil hier das kritische Permeabilitätsstadium eben beginnender Plasmolyse, in dem die Plasmolysepermeabilität sich auswirkt, bereits vorüber ist; die Permeabilität bei Plasmolyse nach der Bestrahlung wäre aber stärker erhöht, weil hier der Protoplast, der bereits die Veränderung durch Ultraviolett-Bestrahlung erlitten hat, das kritische Plasmolysestadium, in dem die stärkste Steigerung erfolgt, erst passieren muß.

Gegen diese Deutung scheint allerdings zu sprechen, daß die Plasmolysezeiten bei kurzer Bestrahlung auffallend kurz sind, die Plasmolyse also „leicht“ vor sich zu gehen scheint, wobei im allgemeinen die für die Plasmolysepermeabilität charakteristische Steigerung der Durchlässigkeit gering ist. Es hat aber bereits Moder (1932) auseinandergesetzt, daß speziell bei Harnstoffplasmolyse die Plasmolysezeit in zwei ganz verschiedenen Fällen kurz sein kann. Erstens, wenn die Plasmolyse besonders leicht vor sich geht (bei geringem Haftvermögen des Protoplasmas), zweitens aber auch, wenn die Permeabilität besonders hoch ist, weil dann die rasch einsetzende Deplasmolyse die Abrundung beschleunigt. Ein zwingender Beweis dafür, daß diese letztere Möglichkeit hier realisiert ist, läßt sich aber nicht erbringen, so daß die Frage offen bleiben muß, warum bei Bestrahlung im plasmolysierten Zustande die Deplasmolysezeit fast doppelt so lang (die Permeabilität also geringer) ist als bei Bestrahlung im nicht plasmolysierten Zustande.

Nicht ohne Bedeutung für die hier offengelassene Frage sind die Ergebnisse folgender Versuche. Es wurde untersucht, ob durch Behandlung mit einem „abdichtenden“ Ca-Salz die Wirkung der ultravioletten Strahlen auf die Deplasmolysezeit (bzw. die Permeabilität) parallelisiert werden kann. Die Blätter wurden wie bei den früheren Versuchen 1, 2 oder 3 Minuten lang bestrahlt, dann aber nicht sogleich in das Harnstoffplasmolytikum gebracht, sondern zunächst für 1 Min. in eine 1 mol  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und dann erst in die 1 mol Harnstofflösung. Oder aber die Blätter kamen nach der Bestrahlung in ein Gemisch von gleichen Teilen 1 mol Urea und 1 mol  $\text{CaCl}_2$ -Lösung. Die Versuche hatten nur orientierenden Charakter. Die in der folgenden Tabelle verzeichneten Werte bedeuten eigentlich nicht die Deplasmolysezeiten, sondern Werte für die Plasmolyseresistenz, d. h. die Zeit, durch welche die Zellen nach Einlegen in das Plasmolytikum am Leben bleiben. Beide Werte (Deplasmolysezeit und Plasmolyse-Resistenzdauer) fallen aber im wesentlichen zusammen, weil die meisten Zellen im Moment der Beendigung der Deplasmolyse absterben.

Plasmolyseresistenz in Minuten und zugleich Resistenzdauer

Bestrahlungsdauer in Minuten	Plasmolytika		
	Harnstoff	Gemisch von 1 mol Urea + 1 mol $\text{CaCl}_2$	1 mol $\text{CaCl}_2$ + 1 mol Harnstoff, getrennt behandelt
1	20—30	90—120	90—120
2	6—12	60—90	45—60
3	3—5	40—60	30—60
0	20—30	70—120	70—120

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, erhöht sowohl die Ca-Zwischenbehandlung als auch der Ca-Zusatz zum Plasmolytikum die Deplasmolysezeit ganz auffallend stark, so daß nunmehr trotz Ultraviolettbestrahlung die Deplasmolysezeiten wesentlich länger sind als selbst bei den unbestrahlten Blättern. Die permeabilitätserhöhende Wirkung der Ultraviolettbestrahlung kann also durch die „abdichtende“ Wirkung des Kalziums vollkommen kompensiert, ja sogar überkompensiert werden. Ein weiterer Ausbau solcher Versuche könnte wohl Aufschlüsse über das Wesen der Ultraviolettstrahlenwirkung auf das Plasmalemma bringen.

In diesem Zusammenhange sei nur noch auf die Vorstellung von Heilbronn und Daugherty (1933) hingewiesen, nach welcher die Ultraviolettbestrahlung im kortikalen Cytoplasma das gebundene Kalzium frei macht. Zur Stütze dieser Auffassung wird speziell auch auf die Beobachtung von Nadson und Rochline-Gleichgewicht (1928) aufmerksam gemacht, daß bei ultraviolettbestrahlten *Helodea*-Blättern in den Vakuolen Ca-Oxalatkristalle auftreten. Vielleicht wird durch künstliche Zufuhr von Kalzium nach der Bestrahlung — wie dies in unseren zuletzt erwähnten Versuchen der Fall war — die Störung im Plasmalemma kompensiert, die durch die bei der Bestrahlung erfolgte Lösung der Ca-Proteinverbindung eingetreten ist.

#### Ultraviolettstrahlen-Resistenz

Die bisher mitgeteilten Versuche haben in erster Linie die Veränderung der Deplasmolysezeit als Kriterium der Empfindlichkeit bzw. Resistenz gegenüber der Bestrahlung mit Ultraviolettstrahlen verwendet.

In einigen Versuchsreihen, über die nunmehr noch anhangsweise berichtet werden soll, wurden noch einige andere Erfahrungen über die Strahlenschädigung gewonnen. Wie im ersten Teil dieses Abschnittes dargelegt wurde, geht in den 5 Minuten lang bestrahlten Blättern insofern eine Veränderung der Protoplaste vor sich, als sich bei nachheriger Plasmolyse „Blasen“-Bildung einstellt. Folgende Versuchsreihe zeigt, daß schon bei einer nur 4 Minuten langen Bestrahlung, bei der unmittelbar nachher die Plasmolyse mit 2 mol Traubenzucker normal verläuft und gut vertragen wird, eine Schädigung also noch nicht zu erkennen ist, die Blätter doch schon geschädigt sein müssen. Hält man nämlich die Blätter nach der Bestrahlung für 5 Stunden in Wasser und plasmolysiert erst dann, so zeigt sich, daß nur mehr das obere Drittel des Blattes am Leben ist, die beiden unteren Drittel aber bereits abgestorben sind. Wird zwischen Bestrahlung und Plasmolyse ein Zeitraum von 7 Stunden eingeschaltet, so ist dann der am Leben gebliebene Blatteil noch kleiner, er beschränkt sich nämlich nun auf die äußerste Blattspitze. Die Ultraviolettbestrahlung führt also bei einer Bestrahlungsdauer von 5 Minuten nicht sofort zum Zelltode. Der Tod tritt vielmehr erst im Verlaufe mehrerer Stunden gewissermaßen als Nachwirkung der Bestrahlung allmählich ein und zwar schreitet das Absterben von der Basis her gegen die Spitze zu fort. In dieser Richtung wäre demnach auch ein Empfindlichkeitsgradient anzunehmen, in der entgegengesetzten Richtung der Resistenzgradient.

Soll das Blatt unmittelbar nach der Bestrahlung bzw. noch während der Bestrahlung absterben, so muß die Dauer der Bestrahlung erhöht werden. Es hat sich gezeigt, daß meist nach 11—12 Minuten langer Bestrahlung das Blatt abstirbt, jedenfalls verträgt es dann keine Plasmolyse mehr und auch Plasmaströmung ist nirgends mehr zu beobachten. Zonale Unterschiede ließen sich in diesem Falle nicht feststellen, das ganze Blatt war abgestorben.

Schließlich wurden noch Versuchsreihen durchgeführt, welche zeigen sollten, in welchem Ausmaße die Strahlenwirkung durch den Durchgang durch eine Zellage (oberseitige oder unterseitige Epidermis) abgeschwächt wird.

Die *Helodea*-Blätter wurden so bestrahlt, daß bei den einen die morphologische Oberseite, bei den anderen die morphologische Unterseite den Strahlen direkt ausgesetzt war; die Blätter lagen also entweder mit der Oberseite oder mit der Unterseite nach oben am Objektträger. Die Bestrahlungsdauer betrug 15 Minuten, sie war demnach so lang, daß alle Zellen der direkt bestrahlten Blattseite schon während der Bestrahlung abstarben, in dem einen Falle war also die oberseitige Epidermis, im anderen Falle die unterseitige Epidermis nach der Bestrahlung abgestorben. Wurde die den Strahlen abgewendete Seite des Blattes gleich nach der Bestrahlung untersucht, so erwiesen sich die Zellen an dieser Seite als lebend. Die Strahlenwirkung ist demnach beim Durchgang der Strahlen durch die eine Epidermisschicht soweit abgeschwächt worden, daß die darunterliegende Zellschicht am Leben geblieben war. Untersucht man aber das Blatt nicht gleich nach der Bestrahlung, sondern erst in einem späteren Zeitpunkt, — etwa 9 Stunden nach der Bestrahlung — so zeigen sich auffallende Unterschiede, je nachdem die Unter- oder die Oberseite die bestrahlte Seite war. War die Oberseite die bestrahlte Seite, so zeigte sich nunmehr der größte Teil auch der Unterseite als abgestorben, nur ein zentraler Teil von ziemlich geringer Ausdehnung war noch am Leben. War aber die Unterseite die bestrahlte Seite, so zeigte sich nunmehr nach 9 Stunden auch die gesamte den Strahlen abgewandte Oberseite als abgestorben. Die Annahme, daß das nachträgliche Absterben der den Strahlen abgewendeten Seite durch die Nachbarschaft der durch die Bestrahlung sofort zum Absterben gebrachten Seite erfolgt wäre, hat kaum etwas für sich, da man bei *Helodea* immer wieder beobachten kann, daß lebende Blattpartien unmittelbar an tote grenzen, ohne daß eine Verbreiterung der abgestorbenen Partien erfolgen würde. Es muß daher angenommen werden, daß der nachträgliche Tod der Zellen der den Strahlen abgewendeten Seite eben auch ein Strahlentod ist. Der Tod erfolgt nur deswegen nicht schon unmittelbar bei der Bestrahlung, weil die Schädigung eine geringere, nicht so rasch zum Tode-führende war, und zwar deshalb, weil die abgewendete Seite bis zu einem gewissen Grade durch die darüberliegende Zellschicht vor den Strahlen geschützt war. Es bleibt also zu erklären, warum der Strahlenschutz, den die Epidermis der morphologischen Oberseite der Epidermis der morphologischen Unterseite gewährt, stärker ist (sich auf ein größeres Areal erstreckt) als der Schutz, den die Unterseite der Oberseite gewährt.

Es ist anzunehmen, daß es sich dabei um eine geringere Strahlendurchlässigkeit der oberseitigen Epidermis handelt.

Dabei erhebt sich allerdings die weitere Frage, worin diese geringere Strahlendurchlässigkeit begründet ist. Es können da wohl verschiedene Faktoren eine Rolle spielen. Die Zellen der oberseitigen Epidermis sind ganz wesentlich größer als die der unterseitigen. Die ultravioletten Strahlen haben also eine tiefere Schichte zu passieren, wenn sie die oberseitige Epidermis zu durchdringen haben, als wenn sie die unterseitige durchdringen. Vielleicht genügt schon dieser Umstand, um die geringere Durchlässigkeit der Epidermis der Oberseite zu erklären. Die Schichtdicke betrifft wohl im wesentlichen nur den Zellsafttraum. Es ist aber auch möglich, daß die Zellmembran, speziell der Außenwand an der Oberseite weniger strahlendurchlässig ist als an der Unterseite. Es braucht dies keineswegs etwa nur in einer stärkeren Mächtigkeit zu liegen, es kann ja die Beschaffenheit der Membran dabei wesentlich sein. Es sei in diesem Zusammenhange auf die Untersuchungen von Gola (1927) hingewiesen, der Unterschiede im Reflexionsvermögen pflanzlicher Epidermen gegen ultraviolette Strahlen festgestellt hat. Schließlich muß auch noch daran gedacht werden, daß eine verschiedene Lage der Chloroplasten einen Unterschied in der Strahlendurchlässigkeit bedingen könnte. Wenn die Chloroplasten der Epidermis der Oberseite sich während der Bestrahlung in der

Außenwandlage befunden hätten, die der Unterseite aber in Seitenwandlage, so würde auch auf diese Weise das Ergebnis verständlich. Leider wurde bei den Versuchen darauf nicht geachtet. Daß möglicherweise mehrere Faktoren zusammenwirken, dafür scheint die Beobachtung zu sprechen, daß Unterschiede in der Durchlässigkeit ja nicht nur zwischen der oberseitigen und unterseitigen Epidermis bestehen, sondern auch zwischen verschiedenen Regionen des Blattes. Es liegt wenigstens nahe, folgende Befunde in dieser Weise zu deuten. Wird die Bestrahlungsdauer von 15 auf 12 Minuten herabgesetzt, so erhält man, je nachdem die Oberseite oder die Unterseite der Strahlenquelle zugewendet ist, bei Untersuchung der den Strahlen abgewendeten Seite 2 Tage nach der Bestrahlung verschiedene Bilder. Während bei Bestrahlung der Unterseite die ganze abgewendete Oberseite abgestorben ist, bleibt nach Bestrahlung der Oberseite an der Unterseite der größte Teil der Zellen am Leben, nur an zwei symmetrisch gelegenen Flankenpartien der unteren Blatthälfte sind die Zellen abgestorben.

### V. Einfluß direkten Sonnenlichtes auf die Harnstoff-Permeabilität

Seit den grundlegenden Untersuchungen von Lepeschkin (1908, 1909) und Troendle (1910) wurde der Einfluß des Lichtes auf die Permeabilität der Pflanzenzellen von zahlreichen Autoren und mit verschiedenen Methoden studiert (Literatur bei Gellhorn, 1929). Wenn auch nach anfänglicher Kritik die von Lepeschkin zuerst geäußerte Ansicht, daß das Licht die Permeabilität erhöht, heute ganz allgemein angenommen wird, so bleiben doch noch eine Reihe von Fragen ungelöst. Bisher ist die lichtbedingte Permeabilitätserhöhung in erster Linie für anorganische Salze und für Farbstoffe nachgewiesen, dagegen wurde eine Permeabilitätserhöhung für organische Substanzen (Zucker) nicht gefunden. Es muß also die Frage für verschiedene Substanzgruppen speziell untersucht werden. Eine weitere Frage ist die, ob die Permeabilitätserhöhung, wenn sie nachweisbar ist, alle Zellen eines Organes oder Gewebes in gleicher Weise trifft.

Um zu unserer Kenntnis in dieser Hinsicht beizutragen, wurde der Einfluß des direkten Sonnenlichtes auf die Harnstoff-Permeabilität des *Helodea*-Blattes untersucht. Daß die Wahl gerade auf Harnstoff fiel, hatte seinen Grund darin, daß wir über die Harnstoff-Permeabilität des *Helodea*-Blattes in diffusem Licht schon Angaben von Moder (1932) vorfinden und daß eben in der Permeabilität für Harnstoff im *Helodea*-Blatt regionäre Unterschiede bestehen. Es sollte also vor allem geprüft werden, ob bei einer eventuell nachweisbaren Permeabilitätserhöhung die schon bestehenden Unterschiede etwa verstärkt bzw. abgeschwächt werden oder annähernd unverändert bleiben.

Nach Moder (1932) bestehen im *Helodea*-Blatt regionäre Unterschiede in der Harnstoff-Permeabilität: Die Zellen der Blattunterseite sind in weit höherem Grade permeabel als die der Oberseite. An der Blattoberseite wiederum (und ebenso an der Unterseite) sind die Zellen der Mittelrippe und Basis ungefähr 5mal so permeabel wie die Zellen des Blattfeldes.

Diese Permeabilitätsunterschiede konnten auch bei unserem Versuchsmaterial, das an einem Nordfenster bei ziemlich schwachem diffusen Licht in Kultur stand, nachgewiesen werden. Mit diesem Material wurden die Versuche über den Einfluß des direkten Sonnenlichtes auf die Harnstoff-Permeabilität ausgeführt.

Als Maß der Permeabilität wurde die Deplasmolysezeit genommen (vergl. Moder 1932). Die Versuchsblätter entstammten dem zweiten oder dritten Blattwirtel unter der Knospe. Die vom Sproß abgetrennten Blätter wurden abwechselnd mit der Ober- bzw. Unterseite nach oben in einen groß bemessenen Tropfen des Plasmolytikums (2 mol Harnstoff-Lösung) auf den Objektträger gelegt. Die einen Objektträger kamen mit den Blättern in einen Dunkelschrank, die anderen wurden dem direkten Sonnenlichte ausgesetzt. Um

eine übermäßige Erwärmung zu vermeiden, befanden sich die dem Sonnenlichte ausgesetzten Objektträger in einer Glasschale, die in einer größeren Schale mit Wasser stand. Das Wasser wurde nach Bedarf gewechselt. Die Blätter im Dunkelschranke wurden bei annähernd gleicher Temperatur gehalten; Temperaturen über 30° C wurden nicht erreicht.

Der Fortgang der Deplasmolyse wurde von Zeit zu Zeit bei schwacher Vergrößerung kontrolliert. Um eine Konzentrationserhöhung des Plasmolytikums während der Expositionszeit zu verhindern, wurde auf die *Helodea*-Blätter ein Deckglas gelegt und dieses mit Vaseline abgedichtet. Als Versuchszeit wurden meist die gleichen Stunden am Vormittage gewählt, als Versuchstage womöglich wolkenlose sonnige Tage mit dunstfreier Luft, um wenigstens annähernd mit vergleichbaren Intensitäten des Sonnenlichtes arbeiten zu können; im übrigen wurde von einer Messung der Lichtintensität Abstand genommen, da es sich ja nur um Ermittlung relativer Werte innerhalb der einzelnen Versuchsreihen handelte. Im ganzen wurden zehn Versuchsreihen durchgeführt. Die absoluten Werte der Deplasmolysezeiten der Zellen der „Sonnenblätter“ bzw. „Dunkelblätter“ waren an den verschiedenen Versuchstagen recht verschieden, ebenso auch die Differenz in der Deplasmolysezeit der „Sonnen“ und der Kontrollblätter. Dies liegt wohl zum Teil in der trotz der oben angeführten Vorsichtsmaßregel nicht zu umgehenden Ungleichheit in der Intensität des Sonnenlichtes, zum Teil aber auch in der „Launenhaftigkeit“ des Versuchsmaterials, von der ja auch schon Moder (1932) zu berichten weiß. Trotz aller individuellen Unterschiede fiel aber doch das Ergebnis der überwiegenden Mehrzahl der Versuche durchaus gleichsinnig aus.

Die Deplasmolysezeiten der dem Sonnenlicht ausgesetzten Blätter waren kürzer, meist sogar wesentlich kürzer als die Deplasmolysezeiten der dunkel gehaltenen Kontrollblätter.

Die Gleichsinnigkeit der Ergebnisse kommt im übrigen am besten bei Berechnung der Mittelwerte aus den 10 Einzelversuchsreihen zum Ausdruck; diese Mittelwerte sind in nachstehender Tabelle dargestellt. Es ergibt sich gerade aus den Mittelwertzahlen eine einheitliche und bedeutende Abkürzung der Deplasmolysezeiten im Licht gegenüber den Deplasmolysezeiten im Dunkeln.

Moder (1932) hat die Frage eingehend und kritisch erörtert, ob es überhaupt zulässig ist, aus Unterschieden in der Deplasmolysezeit auf Unterschiede in der Permeabilität zu schließen. Moder (1932) kommt zu einer bejahenden Antwort dieser Frage und es besteht auch für uns kein Grund an der Zulässigkeit dieses Schlusses zu zweifeln. Das Versuchsergebnis kann daher in folgender Weise interpretiert werden:

Unter dem Einfluß des direkten Sonnenlichtes wird die Permeabilität der Blatzellen von *Helodea* gegenüber Harnstoff beträchtlich erhöht.

Die Frage steht allerdings dabei noch offen, ob es sich bei dieser Permeabilitäts-erhöhung durch das Licht um eine Erhöhung der Normalpermeabilität oder der Plasmolysepermeabilität handelt. In bezug auf die von vornherein gegebenen Unterschiede in der Harnstoffpermeabilität der einzelnen physiologischen Zonen des *Helodea*-Blattes ist Moder zu der Vorstellung gekommen, daß diese Unterschiede „sich keineswegs etwa nur auf die Plasmolysepermeabilität beziehen, sondern es bestehen gleichsinnige Unterschiede auch in Hinsicht auf die Normalpermeabilität“. Es liegt nahe, dies auch für die lichtbedingte Permeabilitätsdifferenz anzunehmen, besonders deshalb, weil ja die sich sicherlich auf die Normalpermeabilität beziehenden Befunde von Lepeschkin (1930) ebenfalls eine Erhöhung der Permeabilität im Sonnenlichte erweisen. Andererseits muß aber doch in diesem Zusammen-

hange erwähnt werden, daß mit einer Erhöhung auch der Plasmolysepermeabilität im Lichte gerechnet werden muß und zwar auf Grund der Literaturangaben über Änderung der Cytoplasmaviskosität (Plasmolyseform) durch das Licht. Huber (1926) hat kurz darauf hingewiesen, daß bei *Hedera* beim Sonnenblatt größere Viskosität, beim Schattenblatt „offenbar geringere Viskosität“ durch die Plasmolyseform erschlossen werden könne. Weber (1929) hat gezeigt, daß im Licht die Viskosität des Protoplasmas der Mesophyllzellen von *Ranunculus ficaria* sehr beträchtlich erhöht ist, was in der Plasmolyseform und Plasmolysezeit zum Ausdruck kommt, erstere ist konkav oder eckig, letztere wird verlängert, ja wird sogar oft unendlich. Nach Lange (1933) tritt in der *Avena*-Koleoptile konkave Plasmolyseform nur nach Belichtung auf und diese Plasmolyseform wird auf eine Erhöhung der Festigkeit, mit der das Plasma den Zellwänden anhaftet, zurückgeführt. Nachdem im allgemeinen stärkeres Haften des Cytoplasmas an der Zellwand bei der Plasmolyse eine Erhöhung der Permeabilität zur Folge hat, so ist es sehr wohl möglich, daß die Belichtung auch die Plasmolysepermeabilität erhöht. Versuche zur Prüfung dieser Möglichkeit wurden nicht durchgeführt.

Zusammenfassend läßt sich demnach folgendes sagen: Unter dem Einfluß des direkten Sonnenlichtes wird die Permeabilität der *Helodea*-Blattzellen für Harnstoff erhöht; inwieweit es sich dabei um die Normalpermeabilität oder um die Plasmolysepermeabilität handelt, wurde nicht entschieden. Mit der Feststellung der Permeabilitätserhöhung für Harnstoff durch das Sonnenlicht ist die erste der zu Beginn dieses Abschnittes aufgeworfenen Fragen in positivem Sinne beantwortet. Es erübrigt sich nun noch zu erörtern, ob auch die zweite dort gestellte Frage durch die Versuchsergebnisse eine Klärung erfährt, ob alle Zellen bzw. alle physiologischen Blattzonen in gleicher Weise und in gleichem Ausmaße von der Permeabilitätserhöhung betroffen wurden.

Drückt man die Herabsetzung der Deplasmolysezeit durch das Licht gegenüber der Deplasmolysezeit der Dunkel- (Kontroll-) Blätter in Prozenten aus, so erhält man für die einzelnen physiologisch-protoplasmatischen Regionen der Ober- bzw. Unterseite folgende Werte.

Verkürzung der Deplasmolysezeit durch das Sonnenlicht  
in % der Kontrollwerte

	Oberseite	Unterseite
Mittelrippe . . . . .	25	40
Spitze . . . . .	38	49
Feldmitte . . . . .	39	50
Basis . . . . .	29	35

Diese Werte zeigen, daß erstens in allen Blattregionen die Verkürzung der Deplasmolysezeit durch das Sonnenlicht an der Blattunterseite wesentlich stärker war als an der Blattoberseite. Das Sonnenlicht setzt also in den Zellen der morphologischen Blattunterseite in höherem Grade herab als in den Zellen der Blattoberseite. Ob es sich dabei um eine spezifische höhere Lichtempfindlichkeit der Protoplaste der Zellen der Blattunterseite handelt oder um eine höhere Lichtdurchlässigkeit der Zellmembran der Außenwand der Blattunterseite dürfte nicht leicht zu entscheiden sein.

Im allgemeinen ist ja die Außenwand der Epidermiszellen der Unterseite der Blätter schwächer entwickelt und eventuell auch von einer weniger starken Kutikula überzogen; ob diese Regel aber auch für das Blatt von *Helodea canadensis* gilt, ist wohl sehr fraglich. Die mir bekannt gewordenen Abbildungen von Querschnitten durch das *Helodea*-Blatt bzw. das Blatt von *Hydrilla verticillata* (Caspary 1858, Kirchner, Loew, Schröter 1908, Gicklhorn 1926) lassen zum Teil deutlich erkennen, daß die Außenwand der oberseitigen Epidermis stärker entwickelt ist als die der unterseitigen. Selbst angefertigte Querschnitte (Freihandschnitte und Mikrotomschnitte) zeigen aber keineswegs stets gleichbleibende Verhältnisse. Bei manchen Blättern ist die Außenwand der oberseitigen Epidermis, bei manchen aber die Außenwand der unterseitigen Epidermis stärker verdickt, oder aber es läßt sich ein Unterschied überhaupt nicht feststellen. Ein durchgreifender Unterschied scheint demnach nicht zu bestehen. Ob in der chemischen Beschaffenheit der Außenwand der ober- bzw. unterseitigen Epidermis ein Unterschied besteht, bleibt zu untersuchen.

Schließlich noch einige Worte über die Unterschiede in der Herabsetzung der Deplasmolysezeit in den verschiedenen protoplasmatischen Regionen der Blattoberseite bzw. -unterseite für sich allein betrachtet.

Sowohl auf der Ober- als auch auf der Blattunterseite erwiesen sich die Zellen der Mittelrippe und der Basis am widerstandsfähigsten gegen schädigenden Einfluß des Sonnenlichtes. Am wenigsten resistent zeigten sich die Feldzellen. Nachdem eine stärkere Ausbildung der Epidermis in diesen resistenten Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, daß die Ursache des verschiedenen Verhaltens wohl im Protoplasma selbst zu suchen ist.

## VI. Kälte-Resistenz des *Helodea*-Blattes

Nach Weber (1932) verträgt ein Teil der Zellen des Blattes von *Helodea canadensis* bei Kälte (+ 2° C) die Harnstoffplasmolyse nicht. Moder (1932) hat gezeigt, daß es die Zellen des Blattfeldes der Oberseite sind, die sich so verhalten, daß dagegen die Zellen der Blattbasis, des Blattrandes sowie der Mittelrippe auch bei Kälte, Plasmolyse-resistent sind. Eine befriedigende Erklärung der Plasmolyse-Empfindlichkeit der Zellen des Blattfeldes bei „Kälte“ konnte nicht gegeben werden. Es liegen bisher vor allem überhaupt keine Angaben darüber vor, ob die protoplasmatisch verschiedenen Regionen des *Helodea*-Blattes verschiedene Kälte-Resistenz an und für sich zeigen. Erst, wenn dies geklärt ist, bestehen weitere Möglichkeiten, die Plasmolyse-Resistenz bei Kälte zu erklären. Im folgenden werden daher Beobachtungen über die Kälte-Resistenz des *Helodea*-Blattes mitgeteilt.

*Helodea*-Sprosse wurden in einem Glas mit Leitungswasser in eine Schnee-Kochsalz-Kältemischung gestellt. Das Wasser im Glase gefror vom Rande her, so daß die Sproßteile, die sich am Rande des Glases befanden, zuerst einfroren, zuletzt aber diejenigen Sproßteile, die im mittleren Teile waren.

Wurden Blätter, die noch nicht eingefroren waren, aus dem Eiswasser genommen, so erwiesen sich alle Zellen am Leben, sie ließen sich nachher bei Zimmertemperatur mit 1½ mol Harnstofflösung plasmolysieren. Von jenen Blättern dagegen, die sich im peripheren Eismantel befanden und eingefroren waren, lebte nur mehr ein Teil der Zellen. Es waren dies der basale Teil des Blattes und zwar annähernd bis zur Hälfte, der Blattrand samt den Zähnen, sowie die Mittelrippe.

Die Mittelrippenzellen zeigten ziemlich intensive Protoplasmaströmung. Das Überleben der Zellen dieser Blattpartien bzw. das Absterben der übrigen wurde — abgesehen von der Beobachtung der Plasmaströmung — durch Plasmolyse sowie durch Vitalfärbung

mit Neutralrot erwiesen. Die Zellen des Blattfeldes waren abgestorben und zwar sowohl auf der Ober- als auch auf der Unterseite. Diese Angaben beziehen sich auf Blätter, die 1—2 Stunden lang eingefroren waren.

Bleiben die Blätter 3—4 Stunden lang eingefroren, wobei wohl die Temperatur des Eises weiter sinkt — in der Kältemischung zeigte das Thermometer  $-5^{\circ}\text{C}$  —, so ergab die nach dem Auftauen vorgenommene Untersuchung des Blattes folgendes:

Alle Zellen des Blattes, und zwar sowohl der Ober- als auch der Unterseite, waren abgestorben mit Ausnahme einiger weniger Randzellen und vor allem der Mehrzahl der Blattzähne. Diese Blattzähne waren die letzten überlebenden Zellen des dem Kältetod verfallenen Blattes. Von besonderem Interesse ist es, daß nicht alle Blattzähne des ganzen Blattes am Leben geblieben waren; diejenigen des basalen Drittels des Blattes waren eingefroren, diejenigen der mittleren und oberen Blattpartie aber am Leben. Bei Vitalfärbung mit Neutralrot, die eine intensive homogene Durchfärbung des Zellsaftes der Blattzähne ergab, war es auffallend, daß in der Mehrzahl der überlebenden Blattzähne eine beträchtliche „spontane“ Kontraktion der Vakuole eingetreten war. Wurde Plasmolyse eingeleitet, so kontrahierte sich die vitalgefärbte Vakuole weiterhin plasmolytisch; das Cytoplasma verhielt sich verschieden: Entweder es zeigte keine oder keine normale plasmolytische Abhebung und Kontraktion, erwies sich dadurch also als bereits durch die Kälte geschädigt, oder aber es kam zu einer, der Zeit und Form nach normalen Plasmolyse, auch des Cytoplasmas, was dafür spricht, daß die Durchlässigkeit des Cytoplasmas sich nicht geändert hat. Diese Beobachtungen an den Blattzähnen der eingefrorenen Blätter lassen folgendes erkennen:

Unter dem Einfluß der Kälte tritt Vakuolenkontraktion ein; damit ist für diesen in letzter Zeit vielfach studierten Vorgang (Henner 1934) ein neues auslösendes Moment aufgezeigt. Die Permeabilität der Vakuolenhaut scheint dabei insofern unverändert zu bleiben, als diese spontan kontrahierte Vakuole sich weiterhin plasmolytisch verkleinern läßt. Dies trifft auch für diejenigen Zellen zu, bei denen die Permeabilität des Plasmalemmas (und Mesoplasmas) schon pathologisch verändert ist. Der Tonoplast (die Vakuolenhaut) erweist sich also auch im Falle der Frostschädigung als resistenter als Plasmalemma und Mesoplasma.

Die auffallende Tatsache, daß sich nicht alle Blattzähne eines Blattes in bezug auf ihre Kälte-Resistenz gleich verhalten, erinnert an die Beobachtung von Gieckhorn (1927, 421), wonach die Blattzähne hinsichtlich der Manganspeicherung in der Membran sich verschieden verhalten, je nach ihrer Lage am basalen, mittleren oder oberen Teil des Blatt-randes.

Über die Frage, worin die spezifische Kälte-Resistenz der Blattzähne gegenüber der Kälte-Empfindlichkeit aller übrigen Zellen des Blattes begründet ist, läßt sich derzeit nur folgendes sagen:

Erhöhte Kälte-Resistenz wird vielfach auf eine Erhöhung des osmotischen Wertes des Zellsaftes bzw. auf die damit in Beziehung stehende Erniedrigung des Wassergehaltes des Protoplasmas zurückgeführt (Literatur bei Maximov 1929). Es wäre daher naheliegend zu vermuten, daß der osmotische Wert des Zellsaftes der kälteresistenten Blattzähne gegen-

über dem der übrigen Blattzellen erhöht ist. Das ist aber, wie die Bestimmung des osmotischen Wertes bei Grenzplasmolyse ergeben hat, keineswegs der Fall. Bei den Versuchsblättern zeigen die Blattzähne in einer  $\frac{1}{2}$  mol Traubenzuckerlösung schon Grenzplasmolyse, ja gelegentlich auch schon etwas stärkere Plasmolysegrade, die übrigen Zellen aber entweder überhaupt noch keine Plasmolyse oder höchstens die ersten Anzeichen der Grenzplasmolyse. Der osmotische Wert der kälteresistenten Blattzähne ist also keineswegs höher, eher etwas niedriger als der des Zellsaftes der kälteempfindlichen Zellen. Auf einer Dehydratation des Cytoplasmas kann also die Widerstandsfähigkeit der Blattzähne gegen Gefrieren nicht beruhen. Viel mehr als diese negative Feststellung läßt sich allerdings nicht aussagen.

## VII. Hypotonie-Resistenz

Im allgemeinen vertragen die hautumkleideten Zellen von Blütenpflanzen die Übertragung in hypotonische Lösungen (destilliertes Wasser) ohne sichtliche Schädigung. Es sind allerdings Ausnahmen von dieser Regel bekannt geworden. Abgesehen von den Fällen, wo in hypotonischer Lösung Plasmoptyse eintritt, kann es auch ohne Plasmoptyse zu einem „Hypotonietod“ kommen (Scheitterer und Weber 1930, Höfler 1931). Moder (1932) hat beobachtet, daß auch im *Helodea*-Blatt bestimmte Zonen im destillierten Wasser absterben. Es ist aber nicht sehr wahrscheinlich, daß es sich dabei um einen Hypotonietod handelt, da das Absterben erst nach längerem Aufenthalt im destillierten Wasser eintritt. Vor kurzem hat Iljin (1934) gezeigt, daß Zellen, deren osmotischer Wert künstlich erhöht wurde, beim Übertragen in destilliertes Wasser absterben. Er führt diesen Tod auf den im Wasser sich einstellenden hohen Druck, auf eine mechanische Pressung zurück. Es war von Interesse zu prüfen, ob die Zellen der protoplasmatischen Regionen des *Helodea*-Blattes gegen derartige mechanische Pressung in gleicher Weise resistent bzw. empfindlich sind.

Zur künstlichen Erhöhung des osmotischen Wertes des Zellsaftes der Zellen wurden die Blätter stufenweise in Glycerinlösungen von steigender Konzentration übertragen. Ausgegangen wurde von isotonischen Lösungen ( $\frac{1}{2}$  mol Glycerin); in 1—24stündigen Intervallen wurden die Blätter von den Lösungen niederer in die höherer Konzentration übertragen, das Konzentrationsintervall betrug 0,25 mol Glycerin. Die zur Anwendung kommende maximale Konzentration betrug in einer Versuchsreihe  $1\frac{1}{2}$  mol, in der anderen 2 mol. Um die Hypotonie-Resistenz zu prüfen, kamen die Blätter aus den betreffenden Glycerinkonzentrationen unvermittelt in destilliertes Wasser. In dem Zeitpunkt der Rückübertragung waren die Zellen entweder schwach plasmolysiert oder die Plasmolyse war infolge Eindringens des Glycerins bereits zurückgegangen, die Deplasmolyse an sich hatte keine letale Wirkung. Um zu prüfen, ob die Zellen nach der Rückversetzung in destilliertes Wasser am Leben geblieben waren, wurde entweder Vitalfärbung mit Neutralrot oder Plasmolyse mit  $1\frac{1}{2}$  mol KCl angewendet.

*Helodea*-Blätter wurden in  $\frac{1}{2}$  mol Glycerinlösung gebracht und eine Stunde darin belassen. Nach Ablauf dieser Zeit kam ein Teil der Blätter in destilliertes Wasser, die übrigen wurden in  $\frac{3}{4}$  mol Glycerin übertragen. Alle Blattzellen vertragen die Übertragung von  $\frac{1}{2}$  mol Glycerin in destilliertes Wasser gut und auch nach einigen Stunden Aufenthalt im destillierten Wasser waren noch alle Zellen am Leben.

Um das Ansteigen der Konzentration möglichst langsam zu gestalten, ließ man die in  $\frac{3}{4}$  mol Glycerin übertragenen Blätter zwei Stunden in dieser Konzentration, beobachtete, daß sie nach diesem Zeitraum alle  $1\frac{1}{2}$  mol KCl plasmolysierbar waren und überführte einen Teil wieder in die nächst höhere Konzentration, den anderen zurück in destilliertes Wasser. Auch diese Übertragung wurde von allen Zellen vertragen, sie färbten sich mit Neutralrot vital und ließen sich nach 6stündigem Verweilen im destillierten Wasser mit KCl normal plasmolysieren.

Ebenso verhielten sich auch die Blätter, die in 1 mol Glycerin durch 2 Stunden lagen und in destilliertes Wasser gebracht wurden. Von 1 mol wurden die Blätter in  $1\frac{1}{4}$  mol übertragen und 2 Stunden dieser Konzentration ausgesetzt, hierauf wurden sie in destilliertes Wasser gelegt. Während die Zellen der Blätter in  $1\frac{1}{4}$  mol Glycerin sich noch völlig plasmolysieren ließen, erwiesen sich einige Zellen der Blattlamina nach Überführung in destilliertes Wasser und 2stündigem Aufenthalt in demselben als unplasmolysierbar. Blätter, die von  $1\frac{1}{2}$  mol Glycerin (es lebten noch alle Zellen bis auf vereinzelte) in destilliertes Wasser gebracht wurden und über Nacht dort lagen, zeigten schon, daß ein großer Teil von Zellen der plötzlichen Übertragung in die hypotonische Lösung nicht mehr standhielten. Es ließen sich nur mehr Zellen der Blattmittelrippe, des Randes, der Basis, der Blattunterseite und die Blattsäbne plasmolysieren, abgestorben dagegen waren vor allem die Zellen des Blattfeldes der Oberseite.

Blätter, die von  $1\frac{1}{2}$  mol in  $1\frac{3}{4}$  mol überführt und nach 6stündigem Einwirken dieser Konzentration in destilliertes Wasser gebracht wurden, ergaben, daß von den relativ wenigen Zonen, die nach der Glycerinbehandlung noch am Leben waren (Mittelrippe, Basis, Rand und einzelne verstreute Zellen an der Oberseite), nur mehr die Mittelrippe lebte und heftige Plasmaströmung zeigte. Von  $1\frac{3}{4}$  mol in 2 mol gebracht und darauf 20 Stunden in destilliertes Wasser, ergaben, daß der Aufenthalt von 3 Tagen in der hypotonischen Lösung nicht genügte, um die resistentesten Zellen, die Zellen der basalen Mittelrippe, zum Absterben zu bringen.

Weitere Versuchsreihen ergaben ähnliche Resistenz-Verhältnisse.

Aus den beiden Versuchsreihen geht zunächst hervor, daß die Zellen des *Helodea*-Blattes eine recht hohe Hypotonie-Resistenz aufweisen; sie vertragen ganz allgemein ein unvermitteltes Übertragen aus einer  $1\frac{1}{4}$  mol-Lösung in destilliertes Wasser. Beim Übertragen aus einer noch stärkeren Glycerinlösung in destilliertes Wasser ergeben sich Unterschiede in der Hypotonie-Resistenz. Am resistentesten erweisen sich die Zellen der Mittelrippe und bis zu einem gewissen Grade auch noch Zellen am Blattrand und an der Blattbasis. Nach der Vorstellung von Iljin (1934) saugt der Zellsaft, dessen osmotischer Wert in einer Glycerinlösung durch Glycerinaufnahme stark ansteigt, das Wasser bei Rückversetzung in die hypotonische Lösung mit großer Kraft an, preßt das Protoplasma fest an die Zellwand und zerdrückt es. Nachdem ja der Zellsaft aller Zellen des Blattes bei dem mehrstündigen Verweilen in der Glycerinlösung selbst beim Bestehen von Permeabilitätsunterschieden den gleichen osmotischen Wert angenommen hat, so muß auch der Druck, der beim Rückversetzen in das Wasser auf das der Zellwand angepreßte Protoplasma ausgeübt wird, in allen Zellen gleich sein. Wenn trotzdem das Protoplasma mancher Zellen den Druck aushält, das anderer Zellen aber nicht, so muß dies eben in einer verschiedenen Druckresistenz seinen Grund haben. Nach Iljin sind gewöhnlich Zellen, die unter natürlichen Verhältnissen einen niedrigen osmotischen Wert haben (Pflanzen feuchter Standorte), gegen Druck weniger resistent als Zellen mit hohem osmotischen Wert (Pflanzen trockener Standorte). In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß die Zellen der Mittelrippe (und Basis) des *Helodea*-Blattes nach Walter (1929) und Moder (1932) den niedersten osmotischen Wert im Blatt besitzen. Hierin besteht also ein Gegensatz zu der Vorstellung von Iljin über den Zusammenhang zwischen normalem osmotischen Wert einer Zelle

und der Druckresistenz derselben. Die Unterschiede in der Druckresistenz scheinen daher nicht nur in der normalen Hydratur, sondern auch in anderen (allerdings noch ganz unbekannt) Eigenschaften des Protoplasmas ihre Ursache haben zu können.

### VIII. Stärkeverteilung und Stärkebildung im Dunkeln

Das *Helodea*-Blatt besteht, abgesehen von der Mittelrippe, aus nur zwei Zelllagen. Die mit Chloroplasten ausgestatteten Epidermiszellen stellen daher das Assimilationsgewebe des Blattes dar. Die Chloroplasten der Epidermiszellen bilden im Licht autochthone Stärke, die in Form kleiner Körnchen im Stroma eingebettet sind.

In der Regel erreichen die Stärkekörner der Chloroplasten in bestimmten Partien des Blattes eine Größe, wie sie der typischen autochthonen Stärke sonst nicht zukommt; die Chloroplastenstärke verschwindet dann auch nachts nicht, sie kann somit nicht als Assimilationsstärke bezeichnet werden, ist vielmehr eher als Reservestoffstärke aufzufassen. Einen analogen Unterschied im Stärkegehalt der Plastiden hat Gratzky (1931) für Farnprothallien beschrieben. Auch bei diesen Objekten führen die Zellen Mittelrippe „Speicherplastiden“, die Flügel- und Randzellen dagegen „Assimilationsplastiden“.

Über die Verteilung der Stärke im *Helodea*-Blatt hat Moder (1932) orientierende Angaben gemacht. Es ergaben sich zonale Unterschiede im Stärkegehalt; die Basis- und Mittelrippenzellen sind wesentlich stärkereicher als die übrigen Blattzellen, es besteht ein Gefälle der Stärkeabnahme gegen die Spitze zu, wo sich das Minimum befindet.

Zunächst wurde geprüft, ob sich die Angaben von Moder über den Stärkegehalt auch für die *Helodea*-Blätter meines Materials bestätigen lassen. Den besten Überblick über Stärkegehalt und Stärkeverteilung gewinnt man durch Einlegen des Blattes in eine Jodchloralhydratlösung. Die Proben ergaben die gleichen Verhältnisse, wie sie Moder beschrieben hat. Die Blattbasis und die Mittelrippe sowie in der unteren Blatthälfte, auch die an die Mittelrippe angrenzenden Zellen sind äußerst stärkereich; diese Stärke schwindet auch an Tagen schwacher Beleuchtung nicht und ist am Morgen ebenso vorhanden wie am Abend. Gegen die Blattspitze und Blattbasis zu nimmt die Größe der Stärkekörner allmählich ab. Bei gut belichteten Pflanzen war auch die Blattspitze und der Blattrand nicht vollkommen stärkefrei.

Nachdem somit das Bild der normalen Stärkeverteilung und Menge ermittelt war, wurde nun weiterhin geprüft, erstens in welcher Weise sich das Stärkebild bei länger dauernder Verdunkelung ändert, und zweitens, ob es bei *Helodea* möglich ist bei Dunkelkultur durch künstliche Zufuhr von Kohlehydraten (Zucker) im Blatt Stärkebildung zu erzielen; wenn dies der Fall ist, mußte es sich zeigen, ob die dabei neu auftretende Stärke die gleiche Verteilung aufweist, wie die unter normalen Bedingungen gebildete Stärke.

*Helodea*-Sprosse, deren Blätter normalen Stärkegehalt aufwiesen, wurden in Leitungswasser in einen Dunkelschrank gestellt und darin bis zu vier Wochen belassen. Das Wasser wurde wiederholt gewechselt, um Schädigungen, die bei einem Aziditätswechsel im Dunkeln eintreten könnten, zu vermeiden (vergl. Weber 1932). Nach einem Aufenthalt von ca. 4 Tagen im Dunkeln zeigten sich die Zellen der gesamten Blattspitze sowie die Zellen des Blattfeldes gänzlich stärkefrei. Die Zellen der Blattbasis und der Mittelrippe bis hoch hinauf führten weiterhin Stärke und zwar in anscheinend unveränderter Menge. Dieser Unterschied im Stärkeabbau bei Dunkelkultur spricht dafür, daß die Stärke des oberen Blatteiles und der Blattfelder Assimilationsstärke ist, die des unteren Teiles und der Mittelrippe Reservestoffstärke.

Werden die Sprosse weiterhin im Dunkeln belassen, so schwindet allmählich auch die Reservestoffstärke aus den Blättern und diese erweisen sich nach etwa 4 Wochen als voll-

kommen stärkefrei. In der Zeit von der ersten bis zur vierten Woche kann man alle Übergangsstadien der Stärkeentleerung verfolgen. Auch in der Mittelrippe und den angrenzenden Zellen weicht die Stärke schrittweise von der Spitze her gegen die Basis zu zurück und schließlich findet sie sich nur mehr in einigen wenigen ganz an der Basis gelegenen Zellen.

Nachdem nun nach 4 Wochen Dunkelkultur in den Blättern das Stärkeminimum, das heißt der Zustand vollkommener Stärkefreiheit, erreicht war, konnte mit den Versuchen begonnen werden, die klarlegen sollten, ob die *Helodea*-Blätter bei künstlicher Kohlehydrat-ernährung im Dunkeln Stärke bilden und auf welche Weise sich die neu gebildete Stärke verteilt. Wie zuerst von Böhm (1883) und nach ihm von vielen Autoren bei solchen Versuchen, wurde Saccharose (und zwar eine 1 % Lösung) als Kohlehydratquelle dargeboten. Die Sprosse blieben dabei weiterhin in Dunkelkultur. Die Rohrzuckerlösung wurde jeden Tag oder jeden zweiten Tag gewechselt. Nach 3—4 Tagen konnte in den Blättern der Beginn der Stärkebildung konstatiert werden.

Die Verteilung der nunmehr im Dunkeln aus Zucker gebildeten Stärke war dieselbe wie in jenen Blättern, die zu Beginn des Versuches 2—3 Tage lang in Dunkelkultur gehalten waren. Das Maximum der Stärke befand sich im basalen Blatteil und in der Mittelrippe, gegen die Spitze und den Rand zu nahm der Stärkegehalt rasch ab (Spitze und Rand selbst waren noch ganz stärkefrei). Diese Verteilung blieb bei weiterer Dunkelkultur einige Tage erhalten. Der Stärkegehalt nahm aber nicht mehr weiter zu, sondern eher wieder ab. Selbst wenn die Konzentration des Zuckers in der Kulturlösung auf 2 % erhöht wurde, ließ sich keine Zunahme des Stärkegehaltes erzielen. Im Gegenteil, die im Dunkeln gebildete Stärke nahm in ihrer Menge nunmehr rasch ab und auch das Areal, in dem die Stärke gebildet worden war, wurde wieder kleiner, so daß die Blätter nach 10-tägigem Aufenthalt im Dunkeln — bis auf einige wenige Zellen der Blattbasis — wiederum vollkommen stärkefrei geworden waren, obwohl sie dauernd sich in der Zuckerlösung befanden.

Von diesen Ergebnissen ist zunächst beachtenswert, daß die Stärkebildung im Dunkeln aus Zucker in derselben Blattregion zuerst und am intensivsten eintritt, wo normalerweise sich das Stärkemaximum befindet und die Stärke auch bei Verdunkelung (ohne Zuckerzufuhr) am spätesten verschwindet. Es liegt nahe, aus diesem Ergebnis zu schließen, daß die Zuckerlösung von den Epidermiszellen nicht direkt von außen her aufgenommen werden kann, daß sie vielmehr vom Stämmchen her durch den Blattnerve zugeleitet wird, sonst wäre es ja nicht ohne weiteres einzusehen, daß die Stärke, wenn der Zucker im Kulturmedium der ganzen Blattfläche dargeboten wird, gerade in der Mittelrippe und an angrenzenden Blattpartien des basalen Blatteiles zuerst auftritt. Was den sekundären Stärkeabbau bei längerer Dunkelkultur betrifft, so dürfte dies wohl die Folge einer Schädigung sein; dabei ist es immerhin beachtenswert, daß auch in diesem pathologischen Falle der Gradient der Stärkeentleerung derselbe ist wie bei der primären Stärkeentleerung am 2. oder 3. Tage der Dunkelkultur.

Bei länger dauernder Dunkelkultur in Zuckerlösung ließen sich noch einige Beobachtungen über die „Resistenz“ gegen diese abnormalen Kulturbedingungen machen. „Alte“ Blätter (10 cm und weiter hinter der Spitze) erwiesen sich als wenig resistent; sie besaßen die Fähigkeit, aus der Zuckerlösung im Dunkeln Stärke zu bilden, überhaupt nicht, starben vielmehr schon nach etwa einer Woche ab, und zwar bis auf die Mittelrippe und Blattbasis. In diesen einzigen überlebenden Regionen hatten die Chloroplasten an Größe stark ab-

genommen, sie nahmen eine gelbe Farbe an und wurden durch das intensiv strömende Cytoplasma in lebhafter Rotation mitgeführt. Nach 3wöchigem Aufenthalt in der Zuckerlösung und insgesamt 7 Wochen Dunkelkultur waren dann alle vorher ausgebildeten Blätter (auch die jüngeren) abgestorben, dagegen hatten sich im Dunkeln neue etiolierte Triebe gebildet. Die Blätter der etiolierten Triebe waren klein, blaßgelb und überaus stärkereich, die Squamulae intravaginales dieser Blätter dagegen vollkommen stärkefrei.

### IX. Diskussion der Ergebnisse

Wie eingangs erwähnt, war dieser Untersuchung die Aufgabe gestellt, das Bild, welches Moder (1932) von der „protoplasmatischen Anatomie“ des *Helodea*-Blattes entworfen hat, zu ergänzen und zu vertiefen. Das Ergebnis der Arbeit von Moder war vor allem, daß das *Helodea*-Blatt, das in Hinblick auf seine rein morphologisch-anatomische Gestaltung wenig differenziert erscheint, in Hinblick auf die protoplasmatischen Eigenschaften seiner Zellen weitgehende zonenartige Unterschiede aufweist. Moder hat auf Grund der protoplasmatischen Prüfung im Blatt folgende Areale unterschieden: Mittelrippe, Feld, Rand, speziell die Blatzzähne, Zellen der Basis. Die vorliegende Untersuchung hat vor allem die Berechtigung der protoplasmatischen Unterscheidung dieser Areale neuerdings erwiesen, bekräftigt und zur protoplasmatischen Charakterisierung der genannten Zonen beigetragen. Bei allen Eingriffen, denen das Blatt unterworfen wurde, seien sie chemischer oder physikalischer Art, hat sich immer wieder gezeigt, daß sich diese Zonen den äußeren Einflüssen gegenüber verschieden verhalten, verschieden empfindlich bzw. resistent erweisen. Die protoplasmatische Eigenart dieser Regionen im *Helodea*-Blatt steht daher nunmehr ganz außer Zweifel.

Während also das nächste Ziel der Arbeit, Beiträge zur protoplasmatischen Anatomie des *Helodea*-Blattes zu liefern, in befriedigender Weise erreicht wurde, sind wir von dem ferneren Ziele noch weit entfernt, welches dahin geht, einen vertieften Einblick in das Wesen der protoplasmatischen Unterschiede der verschiedenen Blattregionen zu gewinnen.

Bevor, wenn auch nur kurz, auf die Erörterung dieser schwierigen Frage eingegangen wird, sei auf das Ergebnis einer vor kurzem erschienenen Arbeit von Rubinstein und Uspenskaja (1934) hingewiesen. In dieser Arbeit, die keineswegs auf der Linie der Untersuchungen über protoplasmatische Pflanzenanatomie liegt, wurde doch ein sehr wesentlicher Beitrag zu dieser Forschungsrichtung erbracht, was für die hier erörterte Frage um so wichtiger ist, als die Befunde ebenfalls die physikalisch-chemische Topographie des *Helodea*-Blattes betreffen.

In der zitierten Untersuchung wurde die relative Größe der elektrokinetischen Potentiale der Protoplaste verschiedener Zellgruppen bestimmt. Das größte negative Grenzpotential scheinen die Protoplasten der Randzellen zu besitzen, sie zeigen ausgesprochene anodische Kataphoreserichtung, während die Protoplaste der Seitenfelder und Mittelrippe glatt zur Kathode wandern. Beurteilt man die Größe der negativen Ladung nach der relativen Beständigkeit der anodischen Kataphorese, so kann man für die Protoplasten der Randzellen ein höheres Potential, für die der Mittelrippe dagegen ein niedrigeres als bei den Protoplasten der Seitenfelder annehmen. Das negative Grenzpotential scheint also vom Rand bis zur Blattmitte allmählich abzunehmen. In zwei Zonen, in der Nähe des Randes und der Mittelrippe erfolgt die Abnahme sprungweise.

Diese Feststellungen haben, wie bereits betont, für das hier in Frage stehende Problem sicherlich große Wichtigkeit. Es ergibt sich daraus zunächst einmal, daß tatsächlich an den Protoplasten selbst physikochemische Unterschiede feststellbar sind. Die Differenzen

im Verhalten der Protoplaste der verschiedenen Blattregionen sind also wohl nicht ausschließlich etwa in einer unterschiedlichen Ausbildung der Zellmembran begründet. Daß sich mit der elektrischen Ladung der Protoplaste und speziell des Plasmalemmas eine Reihe von anderen Eigenschaften, wie Permeabilität, Plasmolysezeit, Lichtempfindlichkeit, Resistenz gegen Hitze, gegen Frost, ändern können und müssen, ist vom kolloidchemischen Standpunkte aus ohne weiteres verständlich. Im einzelnen auf die sich etwa anbietenden Erklärungsmöglichkeiten einzugehen, erscheint allerdings bei der geringen Einsicht in solche Zusammenhänge verfrüht. Auch soll nicht gesagt sein, daß gerade das elektrokinetische Potential das alleinige oder auch nur primäre Merkmal ist, von dem sich alle anderen Eigenschaften ableiten. Auf jeden Fall aber muß das elektrokinetische ( $\zeta$ ) Potential von der Adsorbierbarkeit der in der Außenlösung befindlichen Ionen abhängig sein. Für die Größe des elektrokinetischen Potentials sind alle Ionen von Einfluß, die adsorbiert werden können. Das elektrokinetische Potential spielt nicht nur für die Kataphorese eine Rolle, was ja nur im Experiment zum Ausdruck kommt, sondern auch für die Elektroosmose. Es gilt die allgemeine Regel: Eine positive Membran ist bevorzugt durchlässig für Anionen, eine negative für Kationen. Das Vorzeichen der Membranladung wird aus dem elektrokinetischen Verhalten erschlossen. Daß die selektive Ionen-Permeabilität auf den Kolloidzustand auch des Mesoplasmas von Einfluß ist, versteht sich von selbst. Von Blattregionen mit unterschiedlichem elektrokinetischen Potential, wie es eben nach Rubinstein die immer wieder als durch Besonderheiten charakterisiert zutage tretenden protoplasmatischen Regionen des *Helodea*-Blattes sind, wird jedenfalls ein verschiedenes zellphysiologisches Verhalten von vornherein zu erwarten sein.

Schließlich sei auch noch auf die eben erschienene Arbeit von Strugger (1934) verwiesen, worin mit Hilfe der Plasmolyseform und -Zeitmethode in jungen *Helodea*-Blättern protoplasmatische Unterschiede zwischen der basalen oder meristematischen, der mittleren oder Streckungszone und der Spitze oder Dauerzone nachgewiesen wurden. Strugger sieht den primären Unterschied der Zonen darin, daß stark wachsende Zellen einen bedeutend höheren Viskositätsgrad der Plasmakolloide aufweisen im Vergleich zu ausgewachsenen Zellen.

### Zusammenfassung

Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war der weitere Ausbau der von Moder (1932) begründeten protoplasmatischen Anatomie des *Helodea*-Blattes. Für die protoplasmatischen Differenzen der von Moder unterschiedenen Blattzonen (Basis, Feld, Spitze, Rand, Mittelrippe) konnten neue Beweise erbracht werden. Gleichzeitig ergaben sich Beiträge zur Physiologie der Pflanzenzelle im allgemeinen.

Nach kurzer Vorbehandlung erwachsener Blätter mit verdünnter Kaliumpermanganatlösung vertragen die Zellen des Blattfeldes Plasmolyse mit KCl-Lösung nicht mehr, es tritt in diesen Zellen unter Absterben des Cytoplasmas Vakuolenplasmolyse ein. Es ist dies ein neues Verfahren, um mit Sicherheit „Tonoplasten“ zu erzielen. Die Zellen der übrigen Zonen des Blattes zeigen auch nach Kaliumpermanganat-Vorbehandlung normale Plasmolyse. Am resistentesten erweisen sich die Zellen der Mittelrippe. Die jungen Blätter der Knospenregion sind gegenüber der Plasmolyse nach Kaliumpermanganat-Behandlung widerstandsfähiger als die älteren erwachsenen Blätter.

In 1 % Na-Oleatlösung bildet sich auf der Epidermis des *Helodea*-Blattes ein effloreszenzartiger Niederschlag, der morphologisch mit dem Wachsüberzug große Ähnlichkeit hat. Dieser Niederschlag fehlt vollkommen über den Zellen der Mittelrippe.

Bei Ultraviolettbestrahlung der *Helodea*-Blätter in der Dauer von 5–10 Min. tritt bei nachheriger Plasmolyse eine „Loch“-bildung im Cytoplasma auf, die auf eine Erhöhung

der Viskosität der äußeren Cytoplasmaschicht zurückgeführt wird. Die Zellreihen zu beiden Seiten der Mittelrippe zeigen diese Veränderungen zuerst. Bei Bestrahlung von nur 1—3 Min. wird die Plasmolysezeit abgekürzt, was möglicherweise auf einer Herabsetzung der Viskosität der Plasmagrenzschicht bei kurzfristiger Bestrahlung beruht. Nach kurzer Ultraviolettbestrahlung und nachfolgender Harnstoffplasmolyse ist die Deplasmolysezeit wesentlich abgekürzt, woraus sich auf eine Erhöhung der Permeabilität schließen läßt. Eine viel geringere Änderung der Deplasmolysezeit ergibt sich, wenn die Blätter im bereits plasmolysierten Zustand bestrahlt werden. Durch „abdichtende“ Ca-Salze läßt sich die Abkürzung der Deplasmolysezeit (Erhöhung der Permeabilität) kompensieren.

Die Deplasmolysezeiten der direktem Sonnenlichte ausgesetzten Blätter sind kürzer als die Deplasmolysezeiten der Dunkelblätter. Unter dem Einflusse des direkten Sonnenlichtes wird demnach die Permeabilität der Blattzellen für Harnstoff erhöht. Die Permeabilitäts-erhöhung ist in den Zellen der Blattunterseite stärker als in denen der Oberseite. Am geringsten ist der Einfluß des Sonnenlichtes auf die Zellen der Mittelrippe und der Basis.

Die Blattzähne erweisen sich bei Einfrieren des *Helodea*-Blattes als die am meisten kälteresistenten Zellen. Werden schließlich auch diese geschädigt, so „überlebt“ der Tonoplast das Mesoplasma und Plasmalemma.

Nach künstlicher Erhöhung des osmotischen Wertes durch Einlegen in Glycerinlösungen und nachherigem unvermitteltem Rückversetzen in destilliertes Wasser zeigen die Zellen der Mittelrippe die höchste Hypotonie-Resistenz, die geringste dagegen die Zellen des Blattfeldes.

In bezug auf weitere Ergebnisse (über Stärkebildung, Vitalfärbung u. a.) sowie Einzelheiten sei auf den Text verwiesen.

### Literatur

- Bersa, E., 1932. Ein neuer Destillationsapparat für biologisch reines Wasser. Zeitschr. wissensch. Mikroskopie.
- Casparry, R., 1858. Die Hydrillen. Jahrb. f. wiss. Bot. 1.
- Dous, E., 1927. Wachsabscheidungen bei Pflanzen. Botan. Archiv 19.
- Freundlich, H., 1930. Kapillarchemie 1. Leipzig.
- Gellhorn, E., 1929. Das Permeabilitätsproblem. Berlin.
- Gicklhorn, J., 1926. Über die Entstehung und die Formen lokalisierter Manganspeicherung bei Wasserpflanzen. Protoplasma 1.
- Gibbs, R. D., 1926. The action of ultra-violet light on *Spirogyra*. Trans. Roy. Soc. Canada 20.
- Gola, G., 1927. Sulla rificazione di radiazioni ultraviolette per parte di alcuni organi vegetali. Nuovo Giorn. Botan. Ital. 34.
- Gratzy-Wardengg, E., 1932. Degeneration von Chloroplasten an Farnprothallien. Protoplasma 14.
- Hansteen-Cranner, B., 1922. Zur Biochemie und Physiologie der Grenzschichten lebender Pflanzenzellen. Meldinger fra Norges Landsbrukheiskole, Kristiania 2, 1.
- Heilbrunn, L. V. und Daugherty, K., 1933. The action of ultraviolet rays on *Amoeba* protoplasm. Protoplasma 18.
- Henner, J., 1934. Untersuchungen über Spontankontraktion der Vakuolen. Protoplasma 21.
- Hertel, E., 1904. Über Beeinflussung des Organismus durch Licht, speziell durch chemisch wirkende Strahlen. Zeitschr. f. allgem. Physiol. 4.
- Höfler, K., 1923. Plasmolyseformen bei *Chaetomorpha* und *Cladophora*. Protoplasma 16.

- Höfler, K., 1931. Hypotonietod und osmotische Resistenz einiger Rotalgen. Österr. botan. Zeitschrift 80.
- Huber, B., 1926. Ökologische Probleme der Baumkrone. *Planta* 2.
- Iljin, W. S., 1934. Das Zerdrücken des Protoplasmas durch den osmotischen Druck des Zellsaftes. *Protoplasma* 20.
- Jost, L., 1929. Einige physikalische Eigenschaften des Protoplasmas von *Valonia* und *Chara*. *Protoplasma* 7.
- Kirchner, Loew, Schröter, 1908. Lebensgeschichte der Blütenpflanzen Mitteleuropas I. 1.
- Küster, E., 1921. Über Manganniederschlag auf photosynthetisch tätige Pflanzenzellen. *Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie* 40.
- , 1933. Dellen und Löcher im Protoplasma der lebenden Pflanzenzellen. *Protoplasma* 19.
- Lange, S., 1933. Die Dorsiventralitätskrümmungen der Haferkeimlinge. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 78.
- Lepeschkin, W. W., 1930. Light and the Permeability of Protoplasma. *American Journ. of Botany* 17.
- Maximov, N. A., 1929. Internal factors of frost and drought resistance in plants. *Protoplasma* 7.
- Mayer, Fr., 1915. Hydropoten an Wasser- und Sumpfpflanzen. *Bot. Zentralbl., Beiheft* Abt. 1, 32.
- Moder, A., 1932. Beiträge zur protoplasmatischen Anatomie des *Helodea*-Blattes. *Protoplasma* 16.
- Molisch, H., 1913. Mikrochemie der Pflanzen. Jena.
- Nadson, G. et Rochline-Gleichgewicht, E., 1928. Apparation des cristaux d'oxalate de calcium dans les cellules végétales sous l'influence de la radiation ultraviolette. *C. R. Soc. Biol.* 98.
- Pekarek, J., 1933. Der Einfluß der Temperatur auf die Zellsaft-Viskosität. *Protoplasma* 20.
- Rubinstein und Uspenskaja, 1934. Über den isoelektrischen Punkt der pflanzlichen Plasmahaut. *Protoplasma* 21.
- Scheitterer, H. und Weber, F., 1930. Hypotonietod von Pflanzenzellen. *Protoplasma* 10.
- Strugger, S., 1934. Beiträge zur Physiologie des Wachstums. I. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 79.
- Tchahotine, S., 1921. Les changements de perméabilité de l'œuf d'Oursin localisés expérimentalement. *C. R. Soc. Biol.* 84.
- Weber, F., 1925. Physiologische Ungleichheit bei morphologischer Gleichheit. *Bot. Zeitschr.* 1925.
- , 1925. Über die Beurteilung der Plasmaviskosität nach der Plasmolyseform. *Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie* 42.
- , 1929. Plasmolysezeit und Lichtwirkung. *Protoplasma* 7.
- , 1932. Aluminiumsalz-Wirkung und Plasmolyse-Permeabilität. *Protoplasma* 17.
- , 1932. Unterschiede in der Säureresistenz der *Helodea*-Blattzellen. *Protoplasma* 16.