

DIFFERENTIALFÄRBUNG MIT RHODAMIN B

DARSTELLUNG DER GERBSTOFFZELLEN IM CAREX-BLATT

Mit 2 Abbildungen

Von DR. WALTHER WALDHEIM

(Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Wien)

Bei der Vitalfärbung mit Rhodamin B fielen im Blattlängsschnitt bei *Carex*-Arten einzelne stark tingierte Zellen auf, deren nähere Untersuchung Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Sie liegen im Mesophyll, besonders dort, wo die grünen Zellen des Assimilationsgewebes an die farblosen, das Gefäßbündel begleitenden Zellenzüge angrenzen. Diese stark färbbaren Zellen waren neben anderen *Carex*-Arten vor allem in den Blättern von *Carex silvatica* durch Größe ausgezeichnet und daher auffallend sichtbar. Daher wurde diese Art einer genaueren Prüfung unterzogen.

Im frischen, unbehandelten Schnitt sind die durch starke Färbbarkeit ausgezeichneten Zellen nicht ohne weiteres erkennbar. Der ungefärbte Blattquerschnitt zeigt den typischen Bau eines Faltblattes mit Fächerzellen (vgl. HABERLANDT 1924) an den Faltstellen unter der oberen und unteren Epidermis. Die Blattmitte ist von einem großen lufthältigen Gewebe erfüllt. Darüber gibt die ältere vergleichend-anatomische Literatur Aufschluß (SPINNER 1903, PLOWMANN 1906, KÜKENTHAL 1936). Die grünen Zellen des Assimilationsgewebes, die das Mesophyll bilden, stehen meist in regelmäßigen Längsreihen angeordnet. Erst die Vitalfärbung läßt uns auf die Zellen — typische Idioblasten — aufmerksam werden, die in der Nähe der Gefäßbündel liegen oder „aufsitzen“. Färbt man die Schnitte mit einer Lösung von Rhodamin B in destilliertem Wasser 1:1000 und legt sie nachher mehrere Stunden lang in reines Wasser, so wird die Farbe aus den gewöhnlichen Parenchymzellen restlos wieder ausgewaschen, von den Idioblasten aber festgehalten, so daß die letzteren nun im mikroskopischen Bild auffallend hervortreten.

Daß durch die Vitalfärbung spezifische Zellen im Gewebe gefunden werden können, ist in den letzten Jahrzehnten vielfach erwiesen worden. Das Rhodamin B hat in jüngerer Zeit als Farbstoff größere Bedeutung gewonnen. Seine Unschädlichkeit und Fluoreszenz gaben hierbei den Ausschlag. STRUGGER (1937, 1938) hat bewiesen, daß es durch besondere Unschädlichkeit ausgezeichnet und daher vorzüglich geeignet ist, „in t u r b a n t e“ Vitalfärbung hervorzurufen. Er hat auch gezeigt, daß es infolge seiner starken Lösungsaffinität zu Lipoiden vital gespeichert wird (1938, S. 97). Dabei fällt nur störend ins Gewicht, daß es sich in den Lipoiden vielfach farblos löst und daher unsichtbar bleibt, wenn man gewöhnlich beobachtet. Bei Fluoreszenz aber wird der Farbstoff sichtbar. Da das Rhodamin B nach DRAWERT im weiten p_H -Bereich (p_H 2 — 11,5) undissoziiert ist, d. h. nur in Form elektrisch neutraler, ungeladener Moleküle vorliegt, kommt eine elektro-adsorptive Membraufärbung nicht in Frage (DRAWERT 1939, STRUGGER 1938, HÖFLER 1948). Die lipoidlöslichen Moleküle des Farbstoffes permeieren leicht durch lebendes Plasma bis in die Zellsäfte und können hier

durch Bindung an zelleigene Stoffe gespeichert werden. Sind im Zellsaft Gerbstoffe vorhanden, so kann dabei „KrümelSpeicherung“ resultieren, wie seit langem bekannt ist (OVERTON 1900, RUHLAND 1908), oder es kommt zu einer diffusen Löslichkeitsspeicherung, wofür HÖFLER (1938) Beispiele bringt. Diese erweist sich bei Dauerwässerung der Präparate als auswaschbar. Daraus darf man freilich nicht schließen, daß der Farbstoff zuvor nicht eine chemische Bindung mit Zellstoffen eingegangen hätte (vgl. STRUGGER 1938, S. 95), denn ohne diese wäre ja die Speicherung, die wir sehen, nicht verständlich. Es kann vielmehr trotz solcher Speicherung, wenn die Zellen im Wasser liegen und Farbmoleküle in dieses exosmieren, nach dem Massenwirkungsgesetz bei Unterschreitung des Lösungsproduktes zu einer Wiederauflösung der vorher entstandenen Verbindung und damit zur Auswaschung und zum Verschwinden der Färbung kommen. Dafür gibt der Versuch der vitalen Koffeinfällung in gerbstoffhaltigen *Spirogyra*-Zellen und der Wiederlösung der Tröpfchenniederschläge nach Übertragen der Algenfäden in reines Wasser ein bekanntes Beispiel.

Im einzelnen ließ sich folgendes beobachten. Ich habe Flächenpräparate von jüngeren *Carex*-Blättern in der Weise hergestellt, daß der Schnitt mitten durch das großzellige Gewebe des Blattes läuft, wobei die Gefäßbündel mitgeschnitten werden. Die Präparate kommen nun für 10 Minuten in eine Rhodaminlösung 1 : 1000 und werden dann 10 Minuten oder länger in Wasser ausgewaschen. Dabei ergibt sich folgendes mikroskopisches Bild. Fast alle parenchymatischen Zellen erscheinen ungefärbt, während die verholzten Elemente der Gefäßbündelstränge auffallend weinrot gefärbt sind und außerdem einzelne Zellen im Mesophyll auffällig hervortreten. Die letzteren sind lilafarbig oder dunkelviolett gefärbt. Bei *Carex silvatica* sind sie zum Teil wesentlich (bis 2—10fach) größer als die übrigen grünen Mesophyllzellen. Sie haben oft im Assimilationsgewebe die Lage von Sammelzellen, wie sie etwa bei HABERLANDT (1895) in anschaulicher Weise beschrieben werden.

Bei anderen, von mir geprüften *Carex*-Arten, wie *C. vulpina*, *C. muricata*, *C. remota*, *C. caespitosa*, *C. stricta*, *C. pallescens*, *C. pendula*, *C. flava*, haben sie vielfach etwa die gleiche Größe wie die übrigen Mesophyllzellen. Manchmal ist auch die Gestalt der Idioblasten auffällig, viele zeigen einen schlauchförmigen Umriß (vgl. Abb. 1). Was die Verteilung im Gewebe betrifft, so „sitzen“ eine große Zahl an den Gefäßbündeln. Sie schließen oft direkt an die die Gefäßbündelscheide bildenden langgestreckten, kleinen und zarten parenchymatischen Zellen an, denen sie mit einem Pol anliegen.

Die Abb. 1 zeigt den charakteristischen Erfolg einer Rhodaminfärbung bei Flächenschnitt von der Unterseite des Blattes von *C. silvatica*, der von innen gesehen wird. In dem durch die Mitte der Abbildung streichenden Gefäßbündelstrang sind die verholzten Elemente weinrot gefärbt, die begleitenden parenchymatischen Zellen farblos. Schwarz dargestellt sind die vom Rhodamin B tingierten Idioblasten. Die chlorophyllführenden Assimilationszellen sind durchaus ungefärbt.

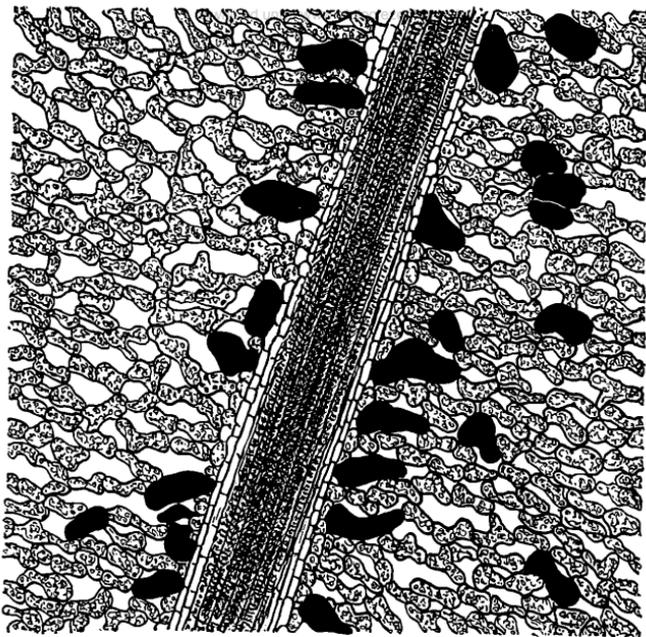


Abb. 1. Flächenschnitt der Blattunterseite von *Carex silvatica*, mit Rhodamin B gefärbt. Nach Auswaschung sind nur noch die Gerbstoffzellen und der Gefäßbündelstrang gefärbt.

Die weitere Analyse führte zu folgendem Ergebnis: Es finden sich in den Idioblasten mehrere Typen der Farbstoffspeicherung.

1. Diffuse Speicherung im Zellsaft. Bei Plasmolyse mit molarer Traubenzuckerlösung zieht sich der Protoplast von der farblosen Membran deutlich zurück.

2. Farbstoffspeicherung in der Vakuole unter Krümelbildung; sie findet sich in jedem Schnitt in einer gewissen Zahl der gefärbten Zellen.

3. Speicherung des Farbstoffes auch in der Zellmembran; sie wurde besonders nach langem, 12—24stündigem Auswaschen der Präparate nach der Färbung beobachtet.

Insbesondere jene Zellen, die durch dunkellila Färbung auffallen, weisen eine solche Färbung der Membran auf. Sie läßt sich nach Zuckerplasmolyse von der Zellinhalt-Färbung sofort unterscheiden. Der Farbton entspricht diesem Falle etwa dem Farbton 10 der OSTWALD'schen Farbenskala, während die verholzten, mit Rhodamin weinrot anfärbenden Elemente etwa dem Farbton 8 entsprechen.

Daß in den Idioblasten einmal der Zellinhalt, dann aber die Zellwandung sich anfärbt, war überraschend. Es war daher zu prüfen, wie ein längeres

Auswaschen auf die Idioblasten einwirkt. Eine Entfärbung erfolgte nicht. Auch ein vielstündiges Wasserbad blieb bei den genannten Elementen erfolglos, während die übrigen Parenchymzellen, die anfangs schwach angefärbt waren, völlig farblos wurden.

Wenn auch die Auswaschbarkeit nicht beweist, daß in den nachher entfärbten Zellen zuvor keine chemische Bindung stattgefunden hat, so ist doch anzunehmen, daß in den Zellen, die den Farbstoff halten, jedenfalls eine chemische Bindung derselben vorliegt. Mit welchen zelleigenen Stoffen tritt nun das Rhodamin B in Reaktion? Es liegt nahe, in erster Linie an Gerbstoffe zu denken. Ich habe daher die Präparate mikrochemisch in dieser Richtung geprüft. Flächenschnitte von *Carex silvatica*, die ich mit Kaliumbichromatlösung behandelte, zeigten den voluminösen, kastanienbraunen Niederschlag (vgl. MOLISCH 1923) in einzelnen Zellen des Mesophylls, die hinsichtlich der Lage, Form und Größe den durch Rhodamin dargestellten Zellen entsprechen. Eindeutig verlief die Gerbstofffällung mit Koffein (0,2% in destilliertem Wasser), welches, als Gerbstoffreagens angewendet, die geprüften Zellen am Leben läßt. Auch hier finden sich einige Typen der Fällung. Abb. 2 zeigt Gerbstoffidioblasten, die in der Vakuole einen großen, mathematisch kugeligen und völlig homogenen Fällungstropfen bergen. In

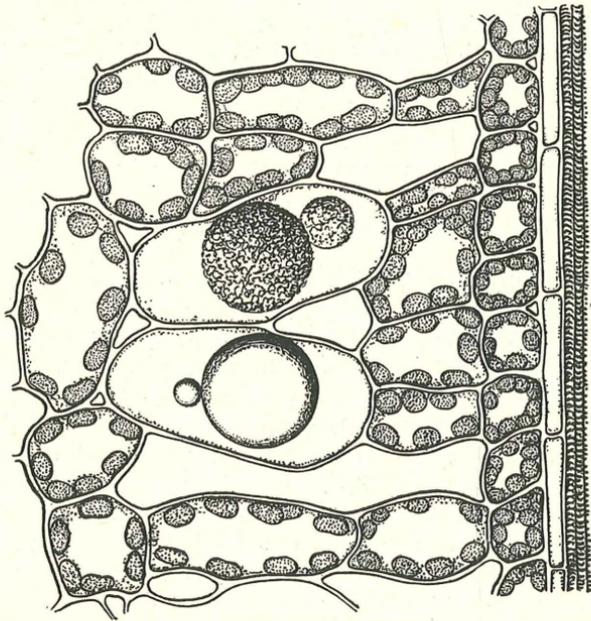


Abb. 2. Zelle oben: Gerbstoffidioblast, mit Koffein behandelt; Niederschlag kugelig geballt, Krümel nicht verschmolzen.
Zelle unten: Gerbstoffidioblast, mit Koffein behandelt; Niederschlag zu großen homogenen Tropfen zusammengeflossen.

anderen Zellen lagen im selben Schnitt mehrere Tropfen aneinander; wieder andere enthielten einen kugelig geballten Niederschlag, der aus sehr zahlreichen, aneinandergepreßten Tröpfchen oder fast krümelartigen Kügelchen bestand, wie Abb. 2 deutlich zeigt. Im frühen Stadium der Behandlung mit Koffein scheint sich überall eine ziemlich diffuse Fällung im ganzen Zellsaft einzustellen. Im ersteren Falle fließt der Niederschlag zu einem großen Tropfen zusammen, der schließlich eine einzige homogene Kugel bildet, wie sie in Abb. 2 (Zelle unten) dargestellt ist. Im zweiten Falle entstehen krümelige Kügelchen, die sich, ohne zu verschmelzen, zu einem kugeligen Gebilde zusammenballen. Das Bild einer solchen Fällung zeigt Abb. 2 (Zelle oben).

Die Koffeinreaktion erfolgt bei *Carex* streng vital, so wie dies VAN WISELINGH (1915) für *Spirogyra* in seinem klassischen Versuch nachgewiesen hat. Die mit Koffein behandelten Zellen lassen sich ohne weiteres plasmolysieren, wobei weder die homogenen Kugeln noch die Krümfällungen eine Veränderung erfahren. Setzt man jedoch einen Tropfen destillierten Wassers zu, so kann man die Auflösung der Gerbstofffällung direkt unter dem Mikroskop — ähnlich wie bei *Spirogyra* — verfolgen, bis endlich die Zelle wieder vollkommen leer ist. Es war nun naheliegend, dieselben Zellen bei fortgesetztem Beobachten unter dem Mikroskop zuerst mit Koffein zu behandeln, anschließend auszuwaschen und sodann durch Hindurchsaugen einer Rhodaminlösung anzufärben. Das Gelingen solcher Versuche gab den direkten Beweis, daß die stark Rhodamin speichernden Zellen, aus denen die Farbe nicht auswaschbar ist, als Gerbstoffidioblasten anzusprechen sind. Auf Grund dieser Versuche aber kann das nicht auswaschbare Festhalten von Rhodamin in bestimmten Zellen unseres Objektes als Gerbstoffnachweis angesehen werden. Daß die Färbung eine andauernde ist, haben Dauerpräparate bewiesen.

Als ich das Objekt gut genug kannte, gelang es auch in unbehandelten, entsprechend dünnen und frischen Präparaten in Blattflächen- und Querschnitten die Gerbstoffzellen zu erkennen. Es gelingt dies am unbehandelten Präparat freilich nur bei scharfer Beobachtung, denn die Idioblasten sind ungefärbt und sie fallen außer durch Größe und Form entscheidend eben durch den Mangel an Chlorophyllkörnern auf. Die Unscheinbarkeit der Idioblasten ist wohl die Ursache, daß sie der Aufmerksamkeit der verschiedenen Anatomen (DUVAL-JOUVE 1872, SPINNER 1903, PLOWMANN 1906) entgangen sind. Zu klären bliebe nun noch die Beobachtung, daß nach 1—2tägigem oder noch längerem Auswaschen in den nun dunkelvioioletten Gerbstoffzellen die Zellmembran und nicht, wie anfangs, die Zellsäfte gefärbt sind.

Nachdem KLEBS (1918) entdeckt hatte, daß am Farnprothallium „lebende“ und „tote“ Zellwandungen verschieden tinktionsfähig sind, hat BRAUNER (1932) die Erscheinung kausal geklärt.

An *Spirogyra*-Zellen werden die Gerbsäuren, die im Leben in der Vakuole

gelöst und durch das semipermeable-Plasma dort festgehalten sind, beim Zelltod frei, da das nekrotische Plasma für sie gangbar wird. Sie werden nun von der Zellulosemembran adsorbiert und sind durch Farbstoff oder Eisensalz in der Membran lokalisiert nachweisbar. Man spricht von „Beizung“ der Zellwände getöteter *Spirogyren* durch freiwerdende Vakuolengerbstoffe.

Mit großer Wahrscheinlichkeit darf das festgestellte Phänomen der tiefvioletten Färbung der Idioblastenzellwände in gleicher Weise als eine sekundäre Wirkung nach Rhodaminfärbung gedeutet werden. Die gute Haltbarkeit der Präparate nach Färbung in wässriger Lösung und einfacher Differenzierung durch nachfolgendes Wässern wird auf dieser Grundlage erklärlich.

Das Vorkommen der Gerbstoffidioblasten im *Carex*-Blatt hat auch vergleichend-anatomische Bedeutung. Bei orientierender Beobachtung konnte ich gleiche, vereinzelte Gerbstoffzellen in den Blättern einiger anderer, nicht zur Gattung *Carex* gehörender Scheingräser (*Cyperaceae*) auffinden, außerdem interessanterweise aber auch bei den bisher geprüften Simsengewächsen (*Juncaceae*), wie *Luzula albida*, *Juncus effusus* u. a.). Sie scheinen dagegen in den Blättern der echten Gräser (*Gramineae*) zu fehlen. Ein solcher, bis nun unbekannter, histologischer Unterschied zwischen Sauer- und Süßgräsern ist nicht nur von praktischer, diagnostischer Bedeutung, sondern weist auch auf tiefer gelegene physiologisch-anatomische Organisationsmerkmale der genannten Pflanzenfamilien hin.

Zusammenfassung.

Die Blätter von *Carex*-Arten besitzen im Mesophyll Gerbstoffidioblasten, die durch ihren Chemismus, zuweilen auch durch Größe und Form und stets durch den Mangel an Chloroplasten gegenüber den übrigen Mesophyllzellen gekennzeichnet sind. Sie lassen sich leicht sichtbar machen durch vitale Anfärbung frischer Präparate mit Rhodamin B. Es erfolgt in diesen Zellen eine irreversible chemische Bindung des Farbstoffes mit den Gerbstoffkomponenten der Zellsäfte. Nach dem Absterben erfolgt „Gerbstoffbeizung“ der Zellmembranen, welche dann auch den Farbstoff unter chemischer Niederschlagsbildung dauernd festhalten.

Die Gerbstoffzellen, die in der vergleichenden pflanzenanatomischen Literatur noch nicht beschrieben worden sind, scheinen kennzeichnend für die Familie der Scheingräser (*Cyperaceae*) und Simsengewächse (*Juncaceae*) zu sein, während sie sich bei echten Gräsern (*Gramineae*) bisher nicht fanden.

Literatur

- de Bary A.*, Vergleichende Anatomie der Vegetationsorgane der Phanerogamen und Farne. Leipzig, 1877. *Brauner L.*, Flora 127 (1933): 190. *Drawert H.*, Planta 29 (1939): 376. *Duval-Jouve*, Etudes générales sur les

- cypéacees. Bull. Soc. bot. de France, XVIII et XX; Comptes rendus (1872).
- Duval-Jouve*, Etude histotaxique des cyperus de France; Memoires de L'acad. des sc. et des let. de Montpellier T. VIII.
- Haberlandt G.*, Physiologische Pflanzen-anatomie. Leipzig, 1895.
- Höfler K.*, Mikroskopie **2** (1947): 13.
— Mikroskopie, Sonderheft — Fluoreszenzmikroskopie (1949).
— Wiss. Mitt. Pharmaz. Forsch. Inst. österr. Apoth. Ver. **4** (1948): 23.
- Klebs G.*, Sitzber. Heidelberger Ak. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. B (1919): Abh. 18.
- Kükenthal G.*, Cyperaceae, Scirpoideae-Cyperaceae. Das Pflanzenreich, regni vegetabilis conspectus. Herausg. von Engler und Diels IV, **20**. Leipzig, 1936.
- Molisch H.*, Mikrochemie der Pflanze. Jena, 1923.
- Ostwald W.*, Kleine Farbmeßtafel, Ausgabe A. Fa. Phywe, Göttingen.
- Overton E.*, Jb. wiss. Bot. **34** (1900): 669.
- Plowmann B.*, The comparative anatomy and phylogeny of the cyperaceae. Ann. of. Bot. **20** (1906): 1.
- Ruhland W.*, Jb. wiss. Bot. **46** (1908): 1.
- Spinner H.*, L'anatomie foliaire des „Carex suisses“. Dissertation inaugurale de l'université de Zürich. Neuchâtel, 1903.
- Strugger S.*, Flora **131** (1936): 113.
— Flora **131** (1937b): 324.
— Protoplasma **30** (1938): 85.
- van Wisselingh C.*, Über den Nachweis des Gerbstoffes in der Pflanze und über seine physiologische Bedeutung. Beih. Bot. Zentralbl. **32 I** (1915): 155.

BERICHTIGUNG UND ERGÄNZUNG

ZUM BEITRAG PROF. DR. HANS HOCHHOLZER

MIKROSKOPISCHE BODENUNTERSUCHUNG, Bd. III, S. 203 ff.:

Text zu Abb. 5, Seite 212: Richtig „Lagerungsverhältnisse“ statt „Lieferungsverhältnisse“.

Im Literaturverzeichnis ist zwischen KOLKWITZ und MEINCKE einzufügen:

Kubierna W Micropedology. Ames, USA., 1938.

— Inhalt und Aufgaben der Bodenkunde als Naturwissenschaft. Mitt. Geogr. Ges. Wien, 1943.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik](#)

Jahr/Year: 1949

Band/Volume: [4](#)

Autor(en)/Author(s): Waldheim Walther

Artikel/Article: [Differentialfärbung mit Rhodamin B. Darstellung der Gerbstoffzellen im Carexsbblatt. 46-52](#)