

Über die Reduktion basischer Vitalfarbstoffe in pflanzlichen Vakuolen¹

Von Oswald Kiermayer

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 1 Farb- und 4 Schwarztafeln

(Vorgelegt in der Sitzung am 9. Dezember 1954)

I. Einleitung.

Die Vitalfärbung stellt heute neben Plasmolyse, Mikrochirurgie und Zentrifugierung wohl die wichtigste Methode der modernen Zellphysiologie dar. Mit ihrer Hilfe wurde es möglich, neue Erkenntnisse über die Stoffaufnahme und -speicherung lebender Zellen zu gewinnen.

Neben der Verwendungsmöglichkeit von Vitalfarbstoffen für Permeabilitätsstudien kommt ihnen aber noch auf anderen Gebieten, so vor allem in ihrer Verwendung als Redoxindikatoren, große Bedeutung zu. Die ersten grundlegenden Arbeiten in dieser Richtung stammen von Clark (1920, 1923) und seinen Mitarbeitern. Sie konnten in einer Serie von exakten chemischen Untersuchungen zeigen, daß die meisten unserer gebräuchlichen Vitalfarbstoffe durch geeignete chemische Reduktionsmittel in eine farblose, reduzierte Form (Leukobase) übergehen, die sich bei Zusatz eines Oxydationsmittels wieder in die ursprüngliche, gefärbte Form rückverwandelt. Clark hat nun von vielen solchen Farbstoffen das Redoxpotential bestimmt und sie in einer Tabelle geordnet, mit deren Hilfe es möglich ist, auf kolorimetrischem Wege die Redoxpotentiale verschiedener, auch lebender chemischer Systeme zu bestimmen.

Seit Gillespie (1920) gezeigt hat, daß lebende Bakterienkulturen eine stark reduzierende Kraft besitzen, ging man sowohl botanischer- wie auch zoologischerseits daran, mit Hilfe der Clark'schen Tabellen kolorimetrisch das Redoxpotential des

¹ Die Untersuchung wurde mit Hilfe einer Subvention der Österreichischen Akademie der Wissenschaften durchgeführt, für die der Verfasser seinen ergebensten Dank zum Ausdruck bringen möchte.

lebenden Protoplasmas zu messen. So injizierten Needham J. und Needham D. (1925, 1926) verschiedene Redoxindikatoren in lebende *Amoeba proteus*-Zellen und fanden, daß die Zellen die Farbstoffe bis zu einem bestimmten rH-Wert reduzieren, bei niedrigerem als der eigene aber oxydieren. Sie schließen daraus, daß die Zellen ein ganz bestimmtes, eigenes Redoxpotential (hier rH 17—19) aufrechterhalten. Rapkine und Wurmser (1926) untersuchten andere Zellen und kamen ebenfalls zu der Ansicht, daß jede Zelltype für sich ein charakteristisches „inneres“ Redoxpotential besitzt. Im Gegensatz dazu fanden Cannan, Cohen und Clark (1926) bei Bakterienkulturen ein beträchtliches Ansteigen der Reduktionsintensität bei Sauerstoffmangel. Auch Cohen, Chambers und Reznikoff (1928) berichteten über Injektionsversuche an *Amoeba dubia* und stellten fest, daß die Reduktion der injizierten Redoxindikatoren bei Sauerstoffmangel beträchtlich schneller vor sich ging als bei O₂-Gegenwart. Sie berechneten den rH-Wert der Amöben-Zelle bei O₂-Mangel mit 7,6, bei O₂-Gegenwart mit 13—18. Interessant ist ferner ihre Feststellung, daß die reduzierte Form der Farbstoffe bedeutend weniger giftig war als die oxydierte.

Botanischerseits sind vor allem die grundlegenden Arbeiten von Brooks (1941) und Rapkine und Wurmser (1926) an chlorophyllführenden Pflanzenzellen zu nennen. M. M. Brooks behandelte die marine Alge *Valonia* mit verschiedenen Farbstofflösungen. Sie konnte dabei u. a. feststellen, daß viele Farbstoffe von der lebenden Zelle reduziert wurden, und konnte ihre Leukoform im Zellsaft gespeichert vorfinden. Rapkine und Wurmser (1926) injizierten verschiedene Redox- und p_H-Indikatoren in Spirogyrazellen und versuchten auf diese Art deren rH-Wert zu ermitteln. Sie konnten dabei zeigen, daß der bei der CO₂-Assimilation entstehende Sauerstoff auf die Reduktion der Farbstoffe keinen Einfluß ausübt. Rapkine, Struyk und Wurmser (1929) bestimmten ferner ergänzend die genauen Redoxpotentiale von Kresylblau, Toluidinblau, Methylenblau, Janusgrün, Neutralrot und Neutralviolett.

Neben den genannten Arbeiten sind aus der älteren Redoxliteratur vor allem noch die Untersuchungen von Wankell (1921), über die Reduktion basischer Farbstoffe im lebenden Protoplasma, von Becker (1926) und von Nassanov (1930) zu nennen. Eine ausführliche Literaturzusammenstellung findet sich bei Brooks (1941).

In jüngster Zeit ist nun das Redoxproblem, zumal durch die Arbeiten von Fritz (1951), Drawert (1953) und Betz (1953),

wieder in den Vordergrund des zellphysiologischen Interesses gerückt. Fritz konnte nämlich an verschiedenen pflanzlichen Objekten zeigen, daß sich die mit Prune pure gefärbten Schnitte bei Sauerstoffmangel von Blau nach Blaußgelb verfärben und dabei das Plasma stark zu fluoreszieren beginnt. Bei O_2 -Zufuhr wird die Plasmafluoreszenz stark gemindert, und die ursprüngliche Blaufärbung tritt wieder ein. Auch B e t z berichtete über die Reduktion des Prune pure in lebenden Zellen. D r a w e r t konnte zeigen, daß Janusgrün B und Berberinsulfat bei Sauerstoffgegenwart die Chondriosomen deutlich anfärbt bzw. zur Fluoreszenz bringt, daß dagegen bei Deckglasabschluß diese Färbung erlischt und dafür nun die Mikrosomen stark zu fluoreszieren beginnen. D r a w e r t schließt aus den Versuchen, daß der Deckglasabschluß durch die Lebenstätigkeit der Zellen eine Veränderung der benutzten Farbstoffe (Reduktion) und damit eine Änderung ihrer Verteilung innerhalb der Zelle bedingt.

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Arbeiten, die sich zum Großteil nur mit der Reduktion von Vitalfarbstoffen im lebenden Protoplasma auseinandersetzen, soll in nachfolgender Abhandlung speziell über die Veränderungen der in pflanzlichen Vakuolen gespeicherten Farbstoffe nach Vitalfärbung berichtet werden. Auf Grund der Tatsache, daß es leider noch nicht möglich ist, eine genaue intrazelluläre p_{H} -Messung des Zellsaftes durchzuführen², muß allerdings im folgenden bei der Beschreibung von Redoxvorgängen auf eine genaue Angabe von rH-Werten verzichtet werden.

II. Material und Methodik.

Das für die nachfolgenden Versuche verwendete Desmidiaceen-Material stammte aus verschiedenen Hochmooren der österreichischen Alpen. Vor allem waren es Algenproben aus Hochmooren bei Tamsweg im Lungau³, aus der Ramsau am Südfuße des Dachsteins⁴ und aus Karlstift im Waldviertel⁵.

² Über eine neue Möglichkeit zur intrazellulären Messung des p_{H} -Wertes von Zellsäften auf Grund der verschieden hohen Umschlagspunkte der Vitalfarbstoffe vergl. die Arbeiten von Kinzel (1954) und Diskus und Kiermayer (1953).

³ legit W. Loub, A. Diskus, W. Url, K. Hilmbauer und O. Kiermayer. Vergl. die Kartenskizzen bei Loub (1953) und Loub, Url, Kiermayer, Diskus u. Hilmbauer (1954).

⁴ legit Prof. K. Höfler, Doz. H. Schindler und Dr. I. Krebs. Vergl. Höfler und Schindler (1951, 1953), Cholnoky und Schindler (1951), Krebs (1951), Kiermayer (1954).

⁵ legit Frl. cand. phil. T. Tollerian.

Da ich mich bei den folgenden Versuchen im wesentlichen der gleichen Färbemethode bediente, wie sie bereits bei Ch o l n o k y und H ö f l e r (1950) und K i e r m a y e r (1954) ausführlich dargelegt wurde, soll hier nur mehr kurz darauf eingegangen werden:

Aus den Algenfläschchen, die in den großen Nordfenstern oder im Fließwasserbecken des Pflanzenphysiologischen Institutes in Wien aufgestellt und in denen die verschiedensten Algenarten weiterkultiviert wurden, wurde mittels einer Pipette ein Tropfen einer möglichst detritusfreien Algenprobe auf den Objektträger gebracht und das für Vitalfärberversuche schädliche Moorwasser gründlich mittels eines Filtrierpapierstreifens abgesaugt. Die Probe wurde darauf mit einem großen Tropfen der jeweiligen Farblösung versetzt, einige Zeit stehengelassen, mit einem Deckglas bedeckt und die mikroskopische Beobachtung begonnen.

Da es vor allem galt, eine Zellsaftfärbung zu erzielen, kamen bei den Färberversuchen nur basische, leicht permeierfähige Vitalfarbstoffe, vor allem Neutralrot, Toluidinblau, Methylenblau, Brillantkresylblau und Toluylenblau, zur Verwendung. Außer Neutralrot, welches dank seinem niederen Umschlagpunkte schon in Wiener Leitungswasser gelöst geboten werden konnte, mußten alle übrigen Farbstoffe gepuffert (Phosphatpuffer hergestellt nach den neuen Angaben von K i n z e l 1954) zur Verwendung kommen. Die Farbstoffkonzentrationen betragen meist 1 : 3000 bis 1 : 10.000. Die Versuchsergebnisse wurden stets mit genauer Zeitangabe protokolliert, die Zeichnungen auf Grund mikrometrischer Abmessungen, zum Teil auch nach Farbmikrophotos, hergestellt.

Es sei gestattet, dem Vorstand des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Wien, meinem hochverehrten Lehrer Herrn Univ.-Prof. Dr. Karl H ö f l e r, für die Förderung und Unterstützung dieser Arbeit meinen ergebensten Dank zu sagen.

III. Die Versuche.

Beginnend mit Neutralrot, sollen im folgenden die Vitalfärberversuche mit diesem sowie mit Methylenblau, Toluidinblau, Brillantkresylblau und Toluylenblau in ihrer Funktion als R e d o x i n d i k a t o r e n dargelegt werden.

A. N e u t r a l r o t.

Färbt man eine Mischprobe von Desmidaceen mit Neutralrot 1 : 5000 bis 1 : 10.000, gelöst in Wiener Leitungswasser (p_H um 7,8), so tritt nach anfänglich Rosafärbung der Membranen eine deut-

liche, mit zunehmender Färbedauer immer stärker werdende Anfärbung der Vakuolen ein. Hand in Hand mit der Farbspeicherung geht meistens auch eine, für die Desmidiaceen charakteristische Vakuolenkontraktion. Diese Verhältnisse sind bereits ausführlich bei Cholnoky und Höfler (1950) und Kiermayer (1954) beschrieben worden, so daß auf eine genauere Schilderung derselben verzichtet werden kann. Auffallend waren indes die Färbilder bei sich gerade teilenden oder eben geteilten, noch zusammenhängenden Zellen. Hier waren anfänglich nur die Membranen der alten Zellhälften stark rot gefärbt, während die jungen Zellhälften ganz schwach rosa, meistens aber vollkommen farblos blieben. Nach einiger Zeit verschwand die rote Membranfärbung vollkommen, dafür war jetzt das Vakuom der alten Zellhälfte stark rot gefärbt, während das Vakuom der jungen Zellhälfte nur ganz schwach, vielfach aber auch farblos blieb. Dieser Unterschied in der Anfärbung von alten und jungen Halbzellen konnte bei verschiedenen Arten von Desmidiaceen, besonders deutlich aber bei *Cosmarium tetraophthalmum* festgestellt werden (Tafel 1, Fig. 1).

Da es vor allem galt, das Verhalten des in den Vakuolen gespeicherten Vitalfarbstoffes bei Sauerstoffmangel zu untersuchen, wurden Präparate, welche Algenzellen mit gefärbten Vakuolen enthielten, mittels Vaseline luftdicht abgeschlossen und kühl, bei normalem Lichtzutritt, aufgestellt.

Es zeigte sich, daß die schwach gefärbten Algenzellen in abgeschlossenen Präparaten oft viele Tage, in günstigen Fällen sogar mehr als 3 Wochen, lebensfähig blieben und selbst nach dieser Zeit noch normale Plasmaströmung hatten. Stärker gefärbte Zellen starben jedoch meist innerhalb von 3 bis 5 Tagen ab. An solchen Zellen sind schon lange vor ihrem Absterben charakteristische Veränderungen des Farbtones und der Farbintensität der Vakuolen festzustellen: Bei *Cosmarium tetraophthalmum* oder *Micrasterias truncata* färben sich die seitlichen, oberhalb des Chloroplasten gelegenen Vakuolen (vgl. Kiermayer 1954) von Rot auf Braunrot um, während die mittleren großen Vakuolen noch den ursprünglichen, also rein roten Farbton zeigen. Gleichzeitig mit der Umfärbung der Vakuolen auf Braunrot geht auch eine verhältnismäßig rasche Entfärbung der Vakuolen einher, die schließlich bis zum vollkommenen Farbverlust führt. Die roten Vakuolen behalten ihre Färbung noch längere Zeit bei, so daß auf diese Weise innerhalb einer Zelle gefärbte und ungefärbte Vakuolen liegen.

In einigen Fällen ließ sich beobachten, daß gleichzeitig mit der Entfärbung einer oder mehrerer Vakuolen eine beträchtliche Zunahme der Farbintensität der Nachbarvakuolen

erfolgt. In diesen Stadien sind die Zellen noch normal plasmolysierbar.

Der Umschlag von Rot auf Braunrot ist nicht immer deutlich festzustellen, sondern es entfärben sich häufig auch Vakuolen mit normal rotem Farbton (Tafel 4, Fig. 7). In solchen Fällen tritt die Entfärbung jedoch bedeutend langsamer ein, und es dauert oft mehrere Stunden, bis die Vakuolen vollkommen farblos geworden sind. Mit zunehmender Entfärbung der Vakuolen geht stets auch eine immer stärker werdende allgemeine Nekrose vor sich, die schließlich zum Tod der Zelle führt. Es ist deshalb anzunehmen, daß sowohl die Umfärbung von Rot nach Braunrot wie auch die Entfärbung der Vakuolen auf nekrotische Veränderungen innerhalb der Zelle zurückzuführen sind. Im letzten Kapitel der Arbeit wird auf diese Verhältnisse noch eingehend zurückzukommen sein. Dort werden auch die interessanten Färbepilder bei zentrifugierten und nachträglich vitalgefärbten *Pleurotaenium truncatum*-Zellen ausführlich diskutiert werden.

Wie oben berichtet wurde, können schwach gefärbte Algen bei vollkommenem Luftabschluß auch bis zu 3 Wochen normal lebensfähig erhalten werden. An solchen Zellen erfährt jedoch der innerhalb der Vakuolen gespeicherte Farbstoff eine charakteristische Veränderung: Die Vakuolen sind durchwegs dottergelb gefärbt und nur die großen Entmischungskugeln innerhalb der Vakuolen haben ihre ursprünglich rote Färbung behalten. Die Zellen mit dottergelber Vakuolenfärbung sind normal plasmolysierbar und zeigen starke Plasmaströmung. In solchen Präparaten ist meist auch der Detritus sowie der Zellinhalt toter Zellen stark gelb gefärbt. Sehr deutlich konnte ich diese beschriebenen gelben Vakuolen bei *Closterium lunula* beobachten. Hier waren die Vakuolen zwischen den Chloroplastenleisten schwach gelb gefärbt und jede Vakuole enthielt eine große rote Kugel. Die Endvakuolen waren stärker gelb mit ebenfalls einer großen dunkelroten Kugel. Das wandständige Plasma zeigte starke Strömung, und auch die Chloroplasten waren in keiner Weise nekrotisch verändert. Es war erstaunlich, daß selbst *Closterium lunula*, ein sonst äußerst empfindliches Objekt (L o u b 1951), trotz 3wöchigem Luftabschluß normal lebensfähig blieb.

Wie die obigen Versuche zeigten, wird also das in den Vakuolen von Desmidiaceen gespeicherte Neutralrot bei starkem Sauerstoffmangel in eine dottergelbe Form verwandelt. Nachdem Neutralrot außer als Vitalfarbstoff auch als Redoxindikator mit niedrigem rH-Wert Verwendung findet, ist die Umwandlung von Rot nach Gelb bei extremem O₂-Mangel wohl sicher auf eine

intrazelluläre Reduktion des Neutralrot zu einer gelben Stufe zurückzuführen.

Es ist auffällig, daß selbst der oft mächtig entwickelte und sicher stark assimilierende Chloroplast trotz seiner O_2 -Abgabe nicht fähig ist, dem Reduktionsprozeß entgegenzuwirken (R a p k i n e und W u r m s e r 1926 a). Auch den von S t r u g g e r (1949 b) bei Sauerstoffmangel in neutralrotgefärbten Allium-Schnitten beobachteten Asphyxie-Effekt sah ich bei Desmidiaceen unter gleichen Versuchsbedingungen nie auftreten.

Nachdem, wie gezeigt wurde, auch reduziertes Neutralrot in den Vakuolen gespeichert wird, schien es von besonderem Interesse, Vitalfärbeversuche mit solchem durchzuführen.

B. Vitalfärbeversuche mit reduziertem Neutralrot (Fluoreszent X).

Eine ganze Reihe von Autoren, sowohl von chemischer wie auch biologischer Seite, befaßte sich eingehend mit dem Problem der Reduktion von Vitalfarbstoffen. Die grundlegenden Untersuchungen über das Redoxverhalten von Neutralrot stammen von C l a r k und P e r k i n s (1932). Die genannten Autoren konnten auf Grund exakt durchgeführter chemischer Versuche zeigen, daß Neutralrot durch entsprechende Reduktionsmittel zu seiner farblosen Leukobase reduziert werden kann, daß sich jedoch innerhalb eines bestimmten p_H -Bereiches (p_H 4—6) an Stelle der farblosen Leukobase eine gelbe, stark fluoreszierende Modifikation derselben bildet. C l a r k und P e r k i n s bezeichneten diese gelbe, fluoreszierende Form als Fluoreszent X, das streng vom gelben Oxydant in alkalischer Lösung zu unterscheiden ist. Nach den beiden Autoren gelingt es, Fluoreszent X auch kristallin zu erhalten. Die orthorhombischen, anisotropen Kristalle bleiben dann mehrere Jahre hindurch beständig. In saurer Lösung wird Fluoreszent X bei Gegenwart von Sauerstoff rasch zu Neutralrot oxydiert, bleibt dagegen in alkalischer Lösung auch bei O_2 -Gegenwart in reduzierter Form erhalten.

Als eines der gebräuchlichsten Reduktionsmittel für Vitalfarbstoffe wird in der Literatur R o n g a l i t angegeben, und ich habe mich im folgenden auch dieses Mittels bedient, um Neutralrot von der oxydierten in die reduzierte Form überzuführen. Dieser Vorgang gelingt am leichtesten so, daß man 10 cm^3 einer Neutralrotlösung $1 : 10.000$ mit $0,2\text{ cm}^3$ einer 10%igen Rongalitlösung versetzt und etwas erwärmt. Dabei schlägt das rote Neutralrot in eine gelbe, schon bei Tageslicht stark grünlich fluoreszierende Lösung (Fluoreszent X) um. Versetzt man 1 cm^3 einer so

gewonnenen Farbe mit 4 cm³ aqua dest. und 1 cm³ einer Pufferlösung von bestimmten p_H-Wert und versucht, diese Farblösung nun mit Benzol auszuschütteln, so ergibt sich, daß der Farbstoff weder im sauren, neutralen noch basischen Bereich merklich in das Benzol hinaufgeht. Genauere chemische Untersuchungen über die Löslichkeitsverhältnisse des reduzierten Neutralrot stehen zur Zeit noch aus.

Versetzt man eine Algenprobe mit einem solchen, auf einen bestimmten p_H-Wert gepufferten Farbstoff, so tritt in den ersten Minuten weder im sauren noch basischen Bereich irgendeine Anfärbung ein. Nach 10 bis 20 Minuten jedoch beginnen sich bei niedrigem p_H die Zellwände der Algen gelb, bei höherem p_H (über p_H 7,5) die Vakuolen sehr deutlich d o t t e r g e l b zu färben. Dabei zeigen sich nicht die geringsten Spuren einer Schädigung der Zellen durch den Rongalitzusatz. Nach etwa halbstündiger Färbedauer sind bei stark alkalischer Reaktion des Farbbades die Vakuolen i n t e n s i v u n d l e u c h t e n d d o t t e r g e l b gefärbt.

Betrachtet man solcherart gefärbte Zellen im UV-Mikroskop, so zeigen die im Hellfeld gelben Vakuolen eine g l e i ß e n d w e i ß g e l b e F l u o r e s z e n z. Diese konnte bei allen den Desmidiaceen-Arten beobachtet werden, die einen „leeren“, d. h. speicherstofffreien Zellsaft besitzen. Bei *Cylindrocystis Brebissonii* und *Netrium digitus*, die nach Höfler-Schindler (1951) und Hirn (1953) einen „vollen“ Zellsaft haben, tritt mit Fluoreszent X (p_H über 10) eine intensive, gegenüber den Algen mit leeren Zellsäften bedeutend stärkere, im Hellfeld b r a u n g e l b e Vakuolenfärbung ein. Im UV-Licht zeigen jedoch diese Zellsäfte t r o t z d e r e n o r m e n S p e i c h e r u n g n i c h t d i e g e r i n g s t e F l u o r e s z e n z. Es ist deshalb anzunehmen, daß bei den „vollen“ Zellsäften von *Cylindrocystis* und *Netrium*, das reduzierte Neutralrot mit Speicherstoffen des Zellsaftes eine chemische Verbindung eingeht, die der Fluoreszenz vollkommen entbehrt.

Da bei den Desmidiaceen der mächtige Chloroplast durch seine starke Primärfluoreszenz die Verhältnisse bei mit Fluoreszent X gefärbten Zellen sehr undeutlich macht, wurden auch zentrifugierte Zellen, bei denen sich der Chloroplast stark zentrifugal verlagert hatte, einer Vitalfärbung mit diesem Farbstoff unterworfen. Hier zeigte sich im chloroplastenfreien Raum der nur vom Zellsaft erfüllt ist, die gelbe Fluoreszenz der Vakuolen ganz besonders deutlich.

Schließt man ein Präparat mit Zellen, die die Vakuolen durch die Färbung mit reduziertem Neutralrot stark gelb gefärbt hatten, mittels Vaseline luftdicht ab und sorgt für normalen Lichtzutritt,

so behalten die Vakuolen die gelbe Färbung noch einige Zeit bei, meistens tritt aber schon nach etwa 2 Stunden eine typische Veränderung in der Färbung der Vakuolen ein: Die gelben Vakuolen werden immer dunkler gelb, orange, rotorange und schließlich rein rot (Farbton wie bei normaler Neutralrot-Färbung). Mit zunehmender Verfärbung von Gelb nach Rot schwindet auch die weißgelbe Fluoreszenz immer mehr, bis die Vakuolen schließlich fluoreszenzlos sind. Die Umfärbung ist zweifellos auf einen Reoxydationsprozeß innerhalb der Vakuolen zurückzuführen.

Nach den Beobachtungen an mit Fluoreszent X gefärbten Algenzellen, schienen auch orientierende Färbeversuche an Zwiebelschuppen-Epidermen von Interesse:

Färbt man die Zellen der *Allium*-Innenepidermis mit Fl.-X-Lösungen von steigendem p_H , so tritt oberhalb p_H 7,5 eine sehr schwache, gelbliche Hellfeldfärbung der Vakuolen ein. Im UV-Licht leuchten solcherart gefärbte Zellsäfte schon überaus gleißend grün. Im starken Gegensatz dazu fluoreszieren die Vakuolen der Außenepidermis, die bekanntlich „volle“ Zellsäfte besitzen, in einem warmen gelbbraunen Farbton. Im Hellfeld erscheinen die Vakuolen der Außenepidermis meist schwach rötlich bis braunrot gefärbt. Bei *Allium* ergibt sich also bei Fluorochromierung mit Fl. X ein eindeutiger Unterschied in der Fluoreszenz der „vollen“ und der „leeren“ Zellsäfte. Die speicherstoffführenden Zellsäfte fluoreszieren gelbbraun, die speicherstoffleeren dagegen leuchtend grün. Es ist in diesem Zusammenhang also sehr interessant, daß die vollen Zellsäfte der *Allium*-Oberepidermis gelbbraun fluoreszieren, der ebenfalls volle Zellsaft von *Cylindrocystis* und *Netrium* im UV-Licht dagegen nicht im geringsten leuchtet. Es ist auf diese Weise vielleicht ein erster Ansatz zur weiteren Unterteilung der heute allgemein als „voll“ bezeichneten Zellsäfte gegeben.

Wie die obigen Versuche zeigten, stellt somit das gelbe, reduzierte Neutralrot (Fluoreszent X) ein für zellphysiologische Untersuchungen äußerst geeignetes Färbemittel dar. Dies vor allem durch seine gute vitale Tinktionsfähigkeit, seine Unschädlichkeit und seine Verwendung zur vitalen Fluorochromierung. Darüber hinaus ist dieser Farbstoff, vermöge seiner leichten Reoxydierbarkeit im sauren Milieu, ein idealer Indikator für intrazelluläre Oxydationsprozesse.

Nachdem, wie eben gezeigt, das in den Vakuolen von Desmidiaceen vital gespeicherte Neutralrot intrazellulär zu der gelben Reduktionsstufe reduziert wird, schien es von Interesse, auch andere Vitalfarbstoffe, die gleichzeitig auch bekannte Redoxindikatoren darstellen, auf ein ähnliches Verhalten hin zu prüfen. Ich

will in der folgenden Besprechung der Versuche von schwerer reduzierbaren Farbstoffen ausgehen und zu den Farbstoffen mit hohem rH-Wert aufsteigen. Nach den Untersuchungen von R a p k i n e, S t r u y k und W u r m s e r (1929) folgt nach dem schwer reduzierbaren Neutralrot (rH 4—7,5) das Methylenblau (rH 13,5—15,5), dann das Toluidinblau und Brillantkresylblau. Im Anschluß daran sollen auch Färbeversuche mit Toluylenblau, einem noch wenig verwendeten Vitalfarbstoff mit hohem rH, eingehender besprochen werden.

C. M e t h y l e n b l a u.

Da der Farbstoff nur im hoch alkalischen Bereich molekular vorliegt (D r a w e r t 1940, 1948, 1949), sonst aber ionisiert ist, mußte bei meinen Versuchen, bei denen es galt, eine Vakuolenfärbung zu erzielen, eine auf p_H 11 bis 12 gepufferte Farblösung verwendet werden. Die Farbkonzentration betrug meist 1 : 10.000, häufig aber auch 1 : 6000 und 1 : 7000. Wurde der Algenprobe die Farblösung zugesetzt, so trat rasch eine Anfärbung der Zellwände ein. Erst nach gründlichem Durchsaugen einer reinen, hoch alkalischen Pufferlösung entfärbten sich die Membranen, und der Farbstoff drang in die Vakuolen ein. Diese färbten sich meist in einem rein blauen, o r t h o c h r o m a t i s c h e n Farbton an. Auffallend war, daß eine Zunahme der Farbtintensität nur ganz kurze Zeit nach dem Durchsaugen der Pufferlösung erfolgte, dann aber aufhörte.

Wurde eine Probe, die stark gefärbte Algenzellen enthielt, mittels Vaseline luftdicht abgeschlossen, so zeigten sich schon 15 bis 20 Minuten nach der Einfärbung typische E n t f ä r b e r s c h e i n u n g e n. Und zwar wurden einige Vakuolen lichtblau oder farblos (Tafel 2, Fig. 2 und 3), während andere noch ihre dunkle Färbung beibehielten. Bei *Pleurotaenium truncatum* entfärbten sich einige Vakuolen des zentralen Wabenvakuolensystems (vgl. K i e r m a y e r 1954), während andere ihre Färbung noch weiterhin behielten. Bei *Cosmarium tetraophtalmum* sowie *Micrasterias truncata* begann die Entfärbung regelmäßig bei den seitlichen, über dem Chloroplasten gelegenen Vakuolen, so daß meist nur die mittlere große Vakuole stark gefärbt blieb. Bei solchen Zellen konnte die weitere Entfärbung unter dem Mikroskop beobachtet werden: Während die seitlichen Vakuolen vollkommen farblos wurden, verschwand auch bei den mittleren Vakuolen die blaue Farbe zusehends, bis schließlich keine Spur einer Anfärbung mehr festzustellen war. Wurde durch ein Präparat mit solchen entfärbten Zellen eine 1molare und auf p_H 11 bis 12 gepufferte Traubenzuckerlösung durchgesaugt, so trat in den Vakuolen

momentan eine blaue Wiederfärbung und normale Plasmolyse ein. Dadurch ist bewiesen, daß der Farbstoff nicht aus der Zelle exosmiert ist, sondern sicherlich in Form seiner farblosen Leukobase im Zellsaft gespeichert war. Beim Durchsaugen des sauerstoffreichen Plasmolytikums trat daher eine Reoxydation in Form eines momentanen Umschlags von Farblos nach Blau hin ein. Wie die normale Plasmolyse zeigte, sind die Zellen sowohl vor als auch nach der Wiederfärbung normal lebensfähig. Allerdings stirbt ein Teil der Zellen bald nach der Reoxydation ab.

Um den zeitlichen Verlauf von Anfärbung, Entfärbung und Wiederfärbung zu veranschaulichen, soll im folgenden eines der Versuchsprotokolle wiedergegeben werden.

10. Juni 1954.

M a t e r i a l: *Cosmarium tetraophthalmum* aus Karlstift.

F a r b s t o f f: Methylenblau 1 : 7000, pH um 11.

12^h 03' Färbung.

12^h 05' Bei den meisten Zellen ist die Membran stark blau gefärbt. Bei sich teilenden Zellen ist die Membran der älteren Zellhälfte bedeutend stärker gefärbt als die der jungen.

12^h 06' Reine Pufferlösung durch das Präparat gesaugt.

12^h 09' In den meisten Fällen die Membran entfärbt, dafür sehr schöne blaue (orthochromatische) Vakuolenfärbung. Eine bestimmte Zelle: Die mittlere Hauptvakuole ist stark blau gefärbt, die seitlichen Vakuolen schwächer blau.

12^h 20' Die bei 12^h 09 beobachtete Zelle hat die Hauptvakuole nur mehr schwach blau, die Seitenvakuolen vollkommen entfärbt.

12^h 24' Dieselbe Zelle hat die Hauptvakuole nur noch ganz schwach gefärbt. Eine andere Zelle hat die Hauptvakuole der einen Zellhälfte intensiv blau, die Hauptvakuole der anderen Halbzelle ist vollkommen farblos.

12^h 35' Die Zelle von 12^h 09' ist vollkommen entfärbt.

12^h 37' Durch das Präparat wird eine 1molare Traubenzuckerlösung durchgesaugt. Die Vakuolen färben sich momentan wieder dunkelblau an und geben normale Plasmolyse.

12^h 39' Kern färbt sich schwach blau an. Zelle stirbt.

12^h 43' Im Präparat liegen viele nach der Wiederfärbung abgestorbene Zellen. Ein großer Teil der Zellen hat jedoch die Wiederfärbung überlebt und zeigt blaue Vakuolenfärbung und normale Plasmolyse.

Als Farbstoff mit dem nächsthöheren rH-Wert folgt nach den Angaben von R a p k i n e, S t r u y k und W u r m s e r (1929) das Toluidinblau:

D. T o l u i d i n b l a u.

So wie Methylenblau gehört auch Toluidinblau zu den Farbstoffen, die nur im hoch alkalischen Bereich molekular vorliegen und daher nur dort zur Vakuolenfärbung geeignet sind (D r a w e r t 1940, H ö f l e r und S c h i n d l e r 1951, H i r n 1953).

In den beiden zuletzt genannten Arbeiten wird unter anderem gezeigt, daß sich die Vakuolen der Desmidiales im hoch alkalischen Bereich mit Toluidinblau violett, bei einigen Mesotaeniales dagegen grünblau anfärben. Auch bei meinen Versuchen färbten sich die Vakuolen der meisten Desmidiaceen in einem stark metachromatisch violetten Farbton an. Wird nun ein Präparat mit solcherart gefärbten Zellen wieder luftdicht abgeschlossen, so zeigen sich auch hier Entfärberscheinungen in der gleichen Weise wie bei den vorne beschriebenen Methylenblau-Versuchen (Tafel 2, Fig. 2 und 3). Gegenüber Methylenblau besteht jedoch ein großer Unterschied in der Entfärbdauer. Während sich bei Methylenblau, wie aus dem Protokoll ersichtlich, eine stark gefärbte Zelle binnen einer halben Stunde vollkommen entfärbt, dauert ein Farbloswerden der gefärbten Zellen (Vakuolen) hier vielfach bis zu drei Stunden und darüber. Dies ist deshalb sehr auffällig, da nach Rapkine, Struyk und Wurmser Toluidinblau in der rH-Reihe etwas höher steht und daher noch leichter zu reduzieren sein müßte als Methylenblau. Auf den möglichen Grund für die Verzögerung der Reduktion des Farbstoffes wird bei der Diskussion über die Färberversuche mit Brillantkresylblau noch zurückzukommen sein. Hier sei noch ein kurzes Versuchsprotokoll mit genauer Zeitangabe wiedergegeben:

10. Juni 1954.

Material: *Cosmarium tetraophthalmum* aus Karlstift.

Farbstoff: Toluidinblau 1 : 5000; pH 11.

10^h 56' Färbung.

10^h 58' Zellmembrane schwach blau.

11^h 01' Vakuolen hellviolett. Besonders stark ist meist die mittlere Hauptvakuole jeder Zellhälfte gefärbt.

11^h 07' Präparat wird luftdicht abgeschlossen.

13^h 32' Eine Zelle: Die Hauptvakuole einer Zellhälfte stark violett, die Vakuolen der anderen Hälfte vollkommen farblos. Die Zellen außerhalb vom Detritus haben noch stark violett gefärbte Vakuolen.

13^h 50' Die Zelle von 13^h 32' hat die Hauptvakuole der einen Zellhälfte nur mehr ganz schwach violett und ist sonst vollkommen farblos.

13^h 57' Zelle vollkommen farblos.

13^h 58' Durch das Präparat wird eine Imolare, auf pH 11 gepufferte Traubenzuckerlösung durchgesaugt. Die Vakuolen färben sich wieder stark violett an. Normale Plasmolyse.

Als nächster Farbstoff in der Reihe der Redoxindikatoren mit steigendem rH-Wert folgt Brillantkresylblau.

E. Brillantkresylblau.

Wegen seines verhältnismäßig niederen Umschlagpunktes und seiner starken Tinktionsfähigkeit gehört dieser basische

Oxazinfarbstoff wohl zu den beliebtesten Vitalfarbstoffen. So wurde Brillantkresylblau in jüngster Zeit auch häufig zur Vitalfärbung von Algenzellen verwendet (H ö f l e r und S c h i n d l e r 1951, 1952, 1953, H i r n 1953). Auch ich habe mich bei meinen Vitalfärbestudien an den Vakuolen der Desmidiaceen (K i e r m a y e r 1954) öfter dieses Farbstoffes bedient. Dabei stellte es sich heraus, daß Brillantkresylblau die Vakuolen von Zellen der gleichen Art, bei gleichen Versuchsbedingungen bald violett, bald blau anfärben kann. So färbten sich damals die Wabenvakuolen von *Pleurotaenium truncatum* eines frischen Materials orthochromatisch dunkelblau an, bei einem älteren Material derselben Art jedoch stets intensiv metachromatisch violett. Selbst innerhalb ein und derselben Zelle färbten sich bei einigen Closterien (*Cl. lumula*, *Cl. libellula*) die Endvakuolen intensiv violett, während die übrigen Vakuolen einen lichtblauen Farbton zeigten. (Auf die metachromatische Anfärbung der Endvakuolen von Closterien haben erstmalig C h o l n o k y und H ö f l e r 1950 hingewiesen.)

Wie damals festgestellt werden konnte, e n t f ä r b e n sich die orthochromatisch dunkelblau gefärbten Vakuolen von *Pleurotaenium truncatum* bei geringem Sauerstoffmangel (Deckglasabschluß) b i n n e n 5 b i s 10 M i n u t e n vollständig.

Um diese interessanten Entfärberscheinungen nochmals zu studieren, färbte ich auch im Zuge der jetzigen Untersuchungen Pleurotaenien mit Brillantkresylblau. Es stand ein älteres, schon 2 Jahre im Institut kultiviertes Algenmaterial zur Verfügung, bei dem sich die Vakuolen mit obigem Farbstoff r o t v i o l e t t anfärbten. Wurde ein Präparat mit solcherart gefärbten Zellen luftdicht abgeschlossen, so trat gegen alle Erwartung eine Entfärbung der Vakuolen nicht nach 5—10 Minuten, sondern erst nach etwa 1 S t u n d e ein. Aber auch nach dieser Zeit fanden sich noch eine große Menge gefärbter Zellen in dem abgeschlossenen Präparat. Es waren vor allem solche Zellen, die weit außerhalb vom Detritus lagen. Zellen in unmittelbarer Detritusnähe waren meist teilweise oder schon vollkommen entfärbt. Ragte die eine Hälfte einer *Pleurotaenium*-Zelle in den Detritus hinein, die andere dagegen nicht, so blieben die Vakuolen der detritusfreien Hälfte stark gefärbt, während die der anderen Halbzelle ihre Färbung vollkommen verloren. Daraus ist zu ersehen, daß der Detritus als eine Zone größerer Sauerstoffarmut auf die Entfärbedauer einen großen Einfluß hat.

Wird durch ein Präparat mit entfärbten Zellen eine 1molare, auf p_H 11 gepufferte Traubenzuckerlösung durchgesaugt, so tritt

augenblicklich mit dem leichten Beginn einer Plasmolyse auch eine violette Wiederfärbung der farblosen Vakuolen ein. Es wird also auch Brillantkresylblau innerhalb der Vakuolen bei Sauerstoffmangel zu der farblosen Leukobase reduziert, die bei Zufuhr einer sauerstoffreichen Lösung sofort wieder in die oxydierte, gefärbte Form übergeht.

Wie gezeigt, tritt bei den metachromatisch violett gefärbten Vakuolen eine Reduktion des Farbstoffes erst viel später als bei den orthochromatisch blauen ein. Dem hohen Redoxpotential des Brillantkresylblau entspricht also wohl die Entfärbedauer bei den orthochromatisch, nicht aber bei den metachromatisch gefärbten Vakuolen. Bei den letzteren erfährt die Reduktion des Farbstoffes eine beträchtliche Verzögerung. Auch bei den früher besprochenen, stark metachromatischen Färbepigmenten bei Toluidinblaufärbung trat eine starke Verzögerung in der Reduktion des Farbstoffes ein. Sowohl Toluidinblau als auch Brillantkresylblau müßte sich, vermöge ihrer höheren Redoxpotentiale, rascher entfärben als Methylenblau. Tatsächlich ist die Entfärbedauer bei metachromatisch gefärbten Vakuolen aber sowohl bei Toluidinblau als bei Brillantkresylblaufärbung bedeutend höher. Sie entspricht dagegen bei den mit Brillantkresylblau orthochromatisch blau gefärbten Vakuolen dem rH-Wert.

Es ist anzunehmen, daß bei metachromatischer Anfärbung der Vakuolen der Farbstoff den reduzierenden Stoffen innerhalb der Zelle weniger leicht anheimfallen kann, die Färbung daher längere Zeit erhalten bleibt.

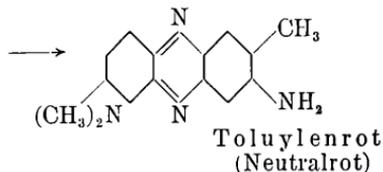
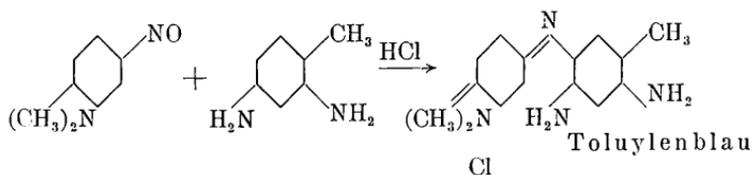
In diesem Zusammenhang müssen auch Färbversuche mit Closterien erwähnt werden. Wie oben gesagt, färben sich hier bei einigen Arten (besonders *Cl. libellula*) die Endvakuolen metachromatisch violett, die übrigen Vakuolen dagegen rein blau an. Ich konnte nun beobachten, daß in vielen Fällen die schwach blaue Färbung der Wabenvakuolen nach einiger Zeit des Deckglasabschlusses vollkommen verschwindet, die intensive Färbung der Endvakuolen jedoch erhalten bleibt, so daß auf diese Weise eine vollkommen ungefärbte Closterien-Zelle zwei intensiv violette Endvakuolen zeigt. Wahrscheinlich ist auch hier ein bestimmter Speicherstoff in den Endvakuolen, der die metachromatische Anfärbung hervorruft und den Wabenvakuolen fehlt, für das Erhaltenbleiben der Färbung maßgebend.

Zum Abschluß der Färbstudien folgen Versuche mit Toluylblau, einem zur Vitalfärbung noch wenig verwendeten basischen Farbstoff (Kiermayer 1954) mit hohem Redoxpotential.

F. Toluylenblau.

Nachdem ich in der mir zugänglichen Literatur noch keine genaueren Angaben über die Dissoziationsverhältnisse des Toluylenblau finden konnte, schien es mir vor den Vitalfärbeversuchen wichtig, vor allem den Umschlagspunkt des Farbstoffes orientierend zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde derselbe bei verschiedenen hohem p_H -Wert mit Benzol ausgeschüttelt. Die Versuche ergaben, daß der Umschlagspunkt etwas höher als der des Neutralrots, ungefähr bei p_H 8 bis 8,75, gelegen ist. Bei diesem p_H beginnt sich der Farbstoff mit roter Farbe im Benzol zu lösen. Quantitativ geht er jedoch erst bei p_H 10,1 bis 11,6 in das Benzol über. Somit liegt Toluylenblau unterhalb p_H 8 in Ionen dissoziiert vor, ist dagegen oberhalb p_H 8 in Form permeierfähiger Farbmoleküle vorhanden. Dementsprechend ist bei Vitalfärbeversuchen aus einer Farblösung unterhalb p_H 8 nur eine elektroadsorptive Anfärbung der Membranen, oberhalb p_H 8 aber auch eine Permeation der Farbmoleküle in die Vakuole zu erwarten.

Läßt man eine Stammlösung (1 : 1000 gelöst in Aqua dest.) bei Lichtzutritt und normaler Zimmertemperatur (etwa 19° C) einige Tage stehen, so wird die zuerst rein blaue Farblösung auffallend violett. Diese Verfärbung geht schließlich so weit, daß nach etwa 14 Tagen aus der blauen Lösung eine rein rote entstanden ist. Da nach Karrer (1950), aus dessen Lehrbuch auch nachfolgende chemische Formeln entnommen sind, Toluylenblau ein Zwischenprodukt bei der Herstellung von Neutralrot ist und sich beim Kochen durch einen Disproportionierungsvorgang leicht in Neutralrot verwandeln kann, scheint es sehr wahrscheinlich, daß sich Toluylenblau auch schon bei Zimmertemperatur, entsprechend langsamer, in Neutralrot umwandelt:



Eine mehrere Tage alte Stammlösung von Toluylenblau stellt somit eine Mischlösung von Toluylenblau und Neutralrot dar, in der bei verhältnismäßig „jungen“ Lösungen das Toluylenblau, bei älteren dagegen Neutralrot überwiegt.

Ich stellte zunächst orientierende Vitalfärbeversuche an Desmidiaceenzellen mit in Wiener Leitungswasser (p_H um 7,8) gelösten, frisch bereiteten Toluylenblau-Lösungen an. Es zeigte sich, daß bei diesem p_H tatsächlich nur die Zellmembranen, nicht aber die Vakuolen blau gefärbt wurden. Wurde der p_H -Wert mittels eines Phosphatpuffers auf 10,1 erhöht, so trat bei der Farbstoffkonzentration von 1:5000 bis 1:7000 bei vielen Zellen binnen weniger Minuten eine starke Färbung der Vakuolen ein. Der Farbton war stets orthochromatisch blau, Metachromasie war nie zu beobachten. So wie bei den früher besprochenen Farbstoffen trat auch hier bei geringem O_2 -Mangel (es genügte bereits Deckglasbedeckung), dem hohen rH-Wert des Toluylenblaus entsprechend, schon binnen 10—15 Minuten eine völlige Entfärbung der Vakuolen ein. Verzögerungen in der Reduktion des Farbstoffes wie bei den mit Toluidinblau oder Brillantkresylblau metachromatisch gefärbten Zellsäften traten hier erwartungsgemäß nicht auf.

Neben der Entfärbung der Vakuolen durch Reduktion des Farbstoffes kommt es bei Vitalfärbung mit Toluylenblau sehr häufig auch dadurch zu einem Farbverlust der Vakuolen, daß in ihnen der Farbstoff in Form großer, schollenförmiger, braunvioletter Kristalle ausfällt (Tafel 3, Fig. 4 und 5, und Tafel 4, Fig. 8). Bei Desmidiaceen mit in Waben gegliedertem Vakuom (Kiermayer 1954) liegt dann in jeder Wabenvakuole ein, der Größe der Vakuole entsprechender Kristall (Tafel 4, Fig. 8). Zellen mit starker Farbstoffällung zeigen jedoch stets auch schon die Symptome einer allgemeinen Nekrose und sterben sehr bald ab.

Besonders deutliche Färbebilder gaben vor allem wieder die verschiedenen *Micrasterias*-Arten, besonders *Micrasterias truncata*, während bei Closterien auffallenderweise mit Toluylenblau keine befriedigende Anfärbung erzielt werden konnte. Wahrscheinlich deshalb nicht, weil reines Toluylenblau, nach den Versuchen zu schließen, auch schon in geringer Konzentration geboten, stark schädigend wirkt und die *Closterium*-Zellen noch vor einer deutlichen Anfärbung absterben.

Wie entsprechende Versuche ergaben, ist jedoch eine mehrere Tage alte Lösung von Toluylenblau, d. h. also eine Mischlösung von Toluylenblau und Neutralrot, bedeutend weniger giftig als eine frisch bereitete Lösung, und es schienen deshalb Vitalfärbeversuche mit einer solchen Mischlösung erfolgversprechend.

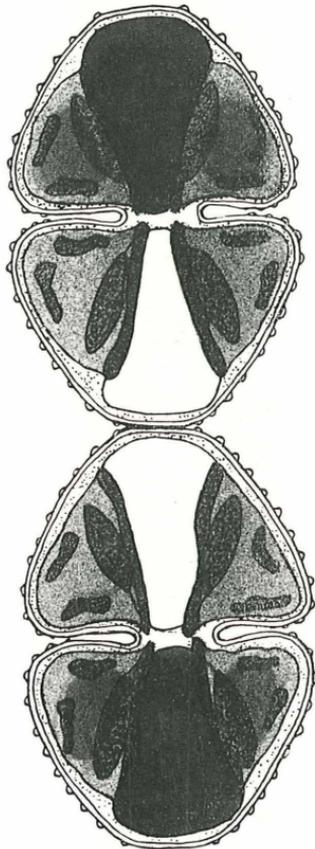


Fig. 1. *Cosmarium tetraophthalmum* nach der Teilung. Nach Vitalfärbung mit Neutralrot nur die alten Zellhälften gefärbt. Die Vakuolen der jungen Zellhälften vollkommen farblos.

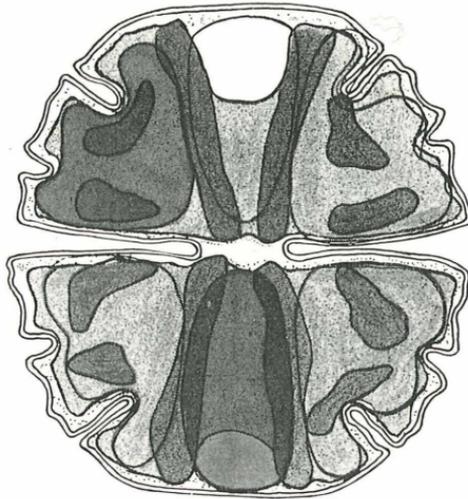


Fig. 2.

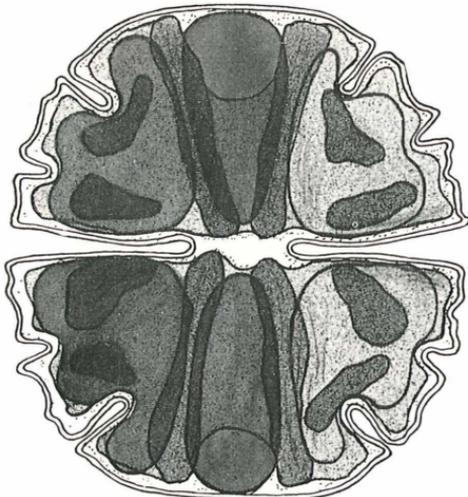


Fig. 3.

Fig. 2. und 3. *Microasterias truncata* mit Methylenblau vitalgefärbt. Einige Vakuolen durch Reduktion des Methylenblaus bereits farblos.

Tafel 3.

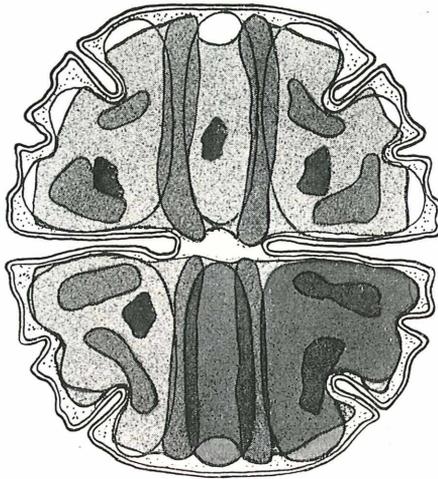


Fig. 4.

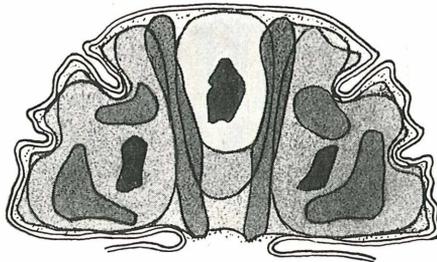


Fig. 5.

Fig. 4. *Micrasterias truncata* mit Toluylenblau gefärbt. Einige Vakuolen sind farblos, dafür liegen in diesen große schollenförmige Kristalle.

Fig. 5. *Micrasterias truncata*. Mit einem Gemisch von Neutralrot-Methylenblau vitalgefärbt. Toluylenblau ist in Form großer Kristalle ausgefallen, wodurch die Vakuolen nur mehr schwach rot gefärbt erscheinen.

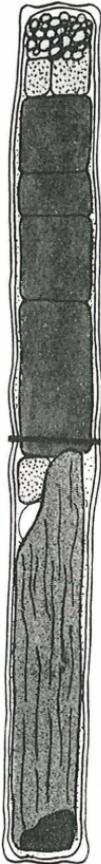


Fig. 6.



Fig. 7.

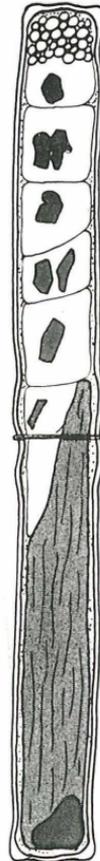


Fig. 8.

Fig. 6. *Pleurotaenium truncatum*. Zentrifugiert und nachträglich mit einem Neutralrot-Toluylenblau-Gemisch gefärbt. Der Großteil der Wabenvakuolen ist dunkelviolett gefärbt; einige Vakuolen am Ende sowie in unmittelbarer Chloroplastennähe sind auffallend bla u (punktiert).

Fig. 7. *Pleurotaenium truncatum*. Von den zentralen Wabenvakuolen, die zuerst einheitlich mit Neutralrot gefärbt waren, sind einige, darunter auch die Endvakuolen, durch Exosmose des Neutralrots farblos geworden.

Fig. 8. *Pleurotaenium truncatum*. Kristallausfall in den Wabenvakuolen nach Färbung mit Toluylenblau.

G. Vitalfärbeversuche mit Mischlösungen von Toluylenblau und Neutralrot.

Der Gedanke einer simultanen Doppelfärbung ist nicht neu, und man findet in der Literatur schon mehrere Angaben über derartige Versuche (R h u m b l e r 1893, R u z i c k a 1904). Botanischerseits waren es vor allem W e b e r (1933) und K ü s t e r (1942), die sich eingehender mit diesem Problem beschäftigten. Mit der Methode der Doppelfärbung in einer Mischlösung aus Neutralrot und Methylenblau konnte K ü s t e r vor allem zeigen, daß Gewebezellen je nach ihrem Lebenszustand entweder den roten oder den blauen Farbstoff speichern. Er macht für diese Selektion vor allem p_H -Änderungen des Zellsaftes bei Änderung des Lebenszustandes verantwortlich. Darauf wird jedoch später noch eingehender zurückzukommen sein. Im folgenden sollen vorerst meine Versuche mit Mischlösungen von Toluylenblau und Neutralrot dargestellt werden:

Stellt man mit einer 3 Tage alten Stammlösung von Toluylenblau (1 : 1000)^o, die nach dieser Zeit wie erwähnt schon einen höheren Prozentsatz an Neutralrot enthält, eine Verdünnung von 1 : 5000 oder 1 : 6000 (gelöst in Wiener Leitungswasser p_H 7,8) her und färbt damit das Algenmaterial, so zeigt sich schon nach wenigen Minuten Färbedauer ein buntes Bild: Da bei diesem p_H der Lösung das Toluylenblau, vermöge des höheren Umschlagspunktes, noch stark dissoziiert ist, tritt allgemein eine starke elektroadsorptive blaue Membranfärbung ein. Neutralrot bei diesem p_H schon größtenteils molekular, kann jedoch in die Vakuolen eindringen und färbt diese rot an. Somit sind an ein und derselben Zelle die Zellwand stark blau, die Vakuolen dagegen rot gefärbt.

Wird eine solche Mischlösung mittels Phosphatpuffer auf p_H 10 gebracht, so geht auch Toluylenblau in die molekulare permeierfähige Phase über und dringt in die Vakuolen ein. Aus der Mischung von Neutralrot und Toluylenblau ergibt sich eine leuchtend violette Zellsaftfärbung. Besonders schöne Färbebilder fanden sich wieder bei *Micrasterias truncata* (Tafel 5, Fig. 2) und *Cosmarium tetraophthalmum*. Hier waren stets die großen mittleren und auch die seitlichen, oberhalb des Chloroplasten gelegenen Vakuolen leuchtend violett.

^o Eine Mischung von 0,8 cm³ einer frischen Toluylenblau-Stammlösung (1 : 1000) + 0,2 cm³ einer Neutralrot-Stammlösung, entsprechend verdünnt und gepuffert, zeigte im wesentlichen gleiche Versuchsergebnisse wie eine mehrere Tage alte Toluylenblau-Stammlösung, erwies sich jedoch gegenüber der letzteren etwas giftiger.

Wird ein Präparat mit so gefärbten Zellen etwa 10 bis 15 Minuten nach der Einfärbung erneut untersucht, so zeigt sich ein überraschend buntes Bild. Neben den Zellen mit violetter Zellsaftfärbung haben viele die Vakuolen rein rot (Tafel 5, Fig. 3), andere wieder leuchtend blau gefärbt (Tafel 5, Fig. 4). Bei aufmerksamer Dauerbeobachtung unter dem Mikroskop läßt sich eindeutig feststellen, daß ursprünglich alle Zellen eine violette Zellsaftfärbung hatten, sich aber dann entweder nach Rot oder nach Blau hin umfärbten. Ein kurzes Versuchsprotokoll soll den zeitlichen Verlauf der Umfärbung zeigen:

3. Februar 1953.

Material: Karlstift.

Farbstoff: Toluylenblau (Stammlösung 3 Tage alt), 1 : 5000, pH 12.

Micrasterias truncata

11^h 21' Färbung.

11^h 29' Zellwände ungefärbt. Die Vakuolen leuchtend violett. Die mittleren Vakuomabschnitte sind meist etwas dunkler violett als die seitlichen. Im Präparat liegen einige Zellen mit auffallend hellblau gefärbtem Vakuom.

11^h 55' Beim Großteil der Zellen des Präparates hat sich das Vakuom von Violett auf Hellrot umgefärbt. Auffallend ist, daß der rote Farbton nur sehr schwach ist, im Gegensatz zu der vorerst intensiven Violett-färbung. Die Zellen, die um 11^h 29' das Vakuom hellblau gefärbt hatten, sind durchwegs abgestorben und zeigen dunkelblaue Kernfärbung. Während fast alle Zellen von *Micrasterias truncata* hellrot gefärbt sind, ist das Vakuom eines kleinen *Cosmarium* sp. noch intensiv violett.

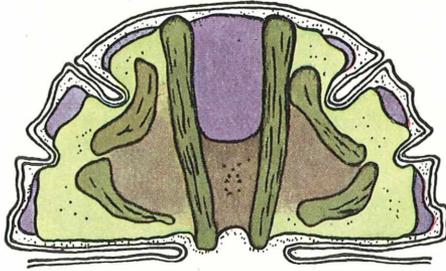
12^h 10' Ganz vereinzelt ist das Vakuom noch hellviolett gefärbt, bei der überwiegenden Mehrzahl jedoch hellrot. Das kleine *Cosmarium* sp. ist noch stark violett.

Erklärung zu nebenstehender Farbtafel.

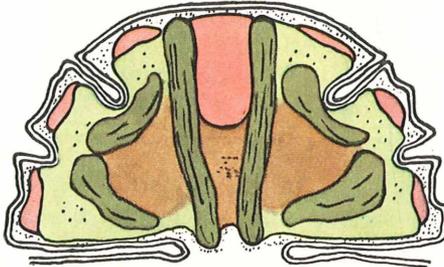
1. *Pleurotaenium truncatum*. Mit einem Neutralrot-Toluylenblau-Gemisch vitalgefärbt. Der Großteil der zentralen Wabenvakuolen dunkelviolett, einige Vakuolen am Ende der Zelle deutlich blau.
2. *Micrasterias truncata*. Vakuom mit einem Neutralrot-Toluylenblau-Gemisch violett gefärbt.
3. Das Vakuom hat sich durch Reduktion des Toluylenblaus nach Rot umgefärbt.
4. Das Vakuom hat sich durch Exosmose des Neutralrots nach Blau umgefärbt.
Pleurotaenium truncatum, zentrifugiert und mit einem Neutralrot-Toluylenblau-Gemisch gefärbt. Die zuerst einheitlich violett gefärbten Vakuolen haben sich im Zellende nach Blau, in Chloroplastennähe nach Rot umgefärbt. Dazwischen noch einige Vakuolen, welche die ursprüngliche violette Färbung beibehalten haben.
6. *Pleurotaenium truncatum* zentrifugiert, 1 Tag nach der Neutralrotfärbung. Mit zunehmender Entfernung der Vakuolen vom verlagerten Chloroplasten nimmt die Farbintensität immer mehr ab. Oberhalb des Chloroplasten einige stark abgerundete, intensiv rote kontrahierte Vakuolen.



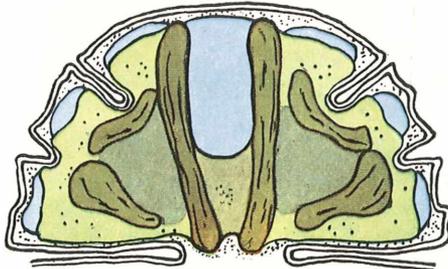
1



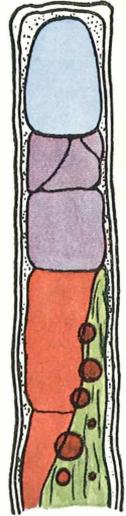
2



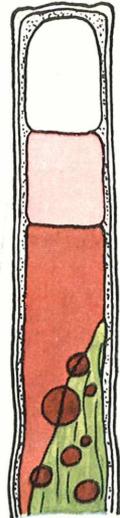
3



4



5



6

Bei zentrifugierten *Pleurotaenium truncatum*-Zellen, bei denen sich der Chloroplast stark zentrifugal verlagert und dadurch das System von Wabenvakuolen sehr deutlich sichtbar wird, färben sich sogar innerhalb ein und derselben Zelle manche Wabenvakuolen von Violett auf Rot, andere unmittelbar an solche angrenzende Vakuolen auf Blau um (Tafel 4, Fig. 6, und Tafel 5, Fig. 5).

Während die Zellen mit roter Vakuolenfärbung noch viele Stunden, ja oft Tage normal lebensfähig bleiben, sterben die blau gefärbten s t e t s schon kurze Zeit nach ihrer Umfärbung ab. Trotzdem sind Zellen mit blauer Vakuolenfärbung kurz nach der Umfärbung noch normal plasmolysierbar und zeigen in vielen Fällen noch Plasmaströmung.

Der Grund für die Umfärbung der violett gefärbten Vakuolen nach R o t liegt wohl sicher in der R e d u k t i o n des leicht reduzierbaren Toluylenblaus zur farblosen Leukobase. Dadurch verschwindet die blaue Komponente, und das rote, schwerer reduzierbare Neutralrot verbleibt innerhalb der Vakuolen. Auch bei Färberversuchen mit reinem Toluylenblau trat, wie vorne berichtet, bei Deckglasbedeckung die Reduktion des blauen Farbstoffes zur Leukobase ein.

Die Umfärbung der violetten Vakuolen nach Blau und das Verschwinden der roten Komponente kann jedoch nicht auf einem Reduktionsvorgang wie im ersten Fall beruhen, da ja Neutralrot mit dem tiefen rH-Wert (vgl. die nachfolgende Tabelle) nicht früher als das überaus leicht reduzierbare Toluylenblau reduziert werden kann.

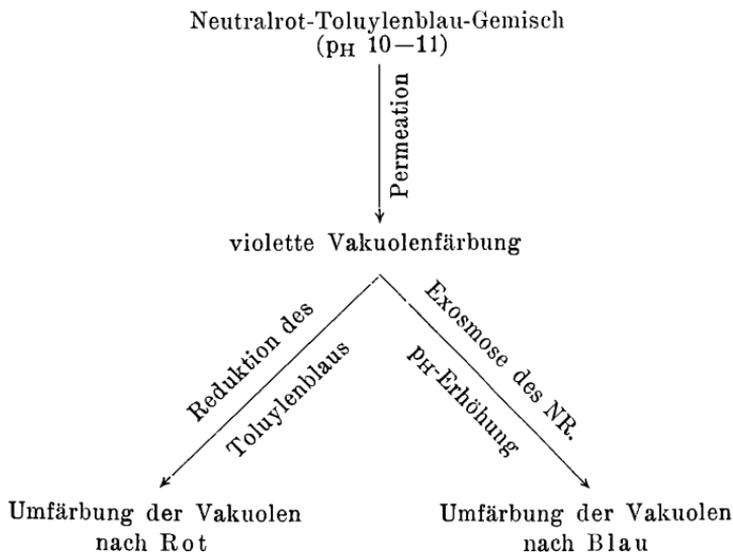
Farbstoff	rH-Wert	Umschlagsbereich	Reduktion
Neutralrot	4 — 7,5	etwa $p_{H} 7$	schwer
Toluylenblau	16—18	etwa $p_{H} 8—8,75$	leicht

Das Verschwinden von Neutralrot und das Erhaltenbleiben der blauen Färbung darf demnach nicht im Zusammenhang mit Redoxerscheinungen gebracht, sondern muß anders gedeutet werden:

Wie weiter oben gezeigt wurde, sterben die Zellen, die ihr Vakuom von Violett auf Blau ungefärbt haben, sämtlich nach einiger Zeit ab. Es stellt also wahrscheinlich die Umfärbung von Violett auf Blau das a l l e r e r s t e Anzeichen einer beginnenden Nekrose dar. K ü s t e r (1938) spricht bei Untersuchungen über die Farbänderung des roten Anthocyans von *Hyacinthus* und anderen

Objekten nach Blau die Vermutung aus, „daß es sich um einen, durch das nekrobiotisch veränderte Protoplasma bewirkten Reaktionswechsel des Zellsaftes handeln möchte“. Auch bei seinen Färbeversuchen mit einem Gemisch von Methyleneblau und Neutralrot, wobei sich die Zellen des Wundrandes blau, die übrigen dagegen rot oder violett färbten, glaubt Küster (1942), diese Unterschiede auf eine Reaktionsveränderung des Zellsaftes zurückführen zu können.

Zur Erklärung der Umfärbung violett gefärbter Vakuolen von Algenzellen bei Vitalfärbung mit einem Neutralrot-Toluylenblau-Gemisch nach Blau, glaube ich mich der Annahme Küsters voll anschließen zu dürfen. Auch bei den Algenzellen mit blauer Vakuolenfärbung scheint sich der Zellsaft mehr nach der alkalischen Seite hin verändert zu haben. Dadurch aber erfolgt eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen molekularer und dissoziierter Phase der Farbstoffe zugunsten der molekularen. Da nun Neutralrot gegenüber Toluylenblau den niedrigeren Umschlagspunkt besitzt, wird ersteres bei Erhöhung des p_{H} -Wertes des Zellsaftes von der dissoziierten in die molekulare Form übergehen und durch das Plasma exosmieren. Für Toluylenblau mit dem höheren Umschlagspunkt bleibt die Ionenfalle weiterhin bestehen. Durch die Exosmose von Neutralrot erscheint die Umfärbung von Violett nach Blau verständlich. Nachfolgendes Schema soll die beiden Umfärbungsmöglichkeiten veranschaulichen:



Gegen diese Deutung wäre einzuwenden, daß bei den nach Rot umgefärbten Zellen das Toluylenblau reduziert worden sein könnte, bei den blauen Zellen dagegen nicht. Man könnte annehmen, daß vielleicht die blauen Zellen, die ihrem Absterben nicht mehr ferne sind, die Reduktionskraft verloren haben oder aber daß durch die Erhöhung des p_{H} -Wertes im Zellsaft und dem damit verbundenen Abfall des rH-Wertes eine starke Verzögerung in der Reduktion des Toluylenblaus eintritt.

Im Zusammenhang mit der Reaktionsänderung des Zellsaftes durch das nekrobiotisch veränderte Protoplasma muß nun auf die ganz vorne besprochenen Vitalfärbeversuche mit reinem Neutralrot zurückgekommen werden. Dort wurde gezeigt, daß stärker gefärbte Zellen von *Cosmarium tetraophthalmum* oder *Micrasterias truncata* nach 3 bis 5 Tagen bei Luftabschluß absterben, daß aber schon lange vor dem Zelltod die roten Vakuolen braunrot werden und sich zu entfärben beginnen. Auch diese Erscheinung beruht aller Wahrscheinlichkeit nach darauf, daß der Zellsaft durch basische Stoffe, die von seiten des nekrobiotischen Plasmas in die Vakuole abgegeben werden, alkalischer wird, wobei das Neutralrot nach Braunrot umschlägt und schließlich exosmiert. Für diese Annahme sprechen vor allem auch die vorne beschriebenen Versuche, wobei bei der Entfärbung einer oder mehrerer Wabenvakuolen deren Nachbarvakuolen eine starke Zunahme in ihrer Farbintensität erfuhren. Wahrscheinlich permeiert das, aus einer Wabenvakuole austretende, jetzt molekulare Neutralrot gleich in die anschließende, vielfach noch „saure“ Nachbarvakuole und verursacht dort die starke Zunahme der Farbintensität.

Besonderer Klärung bedürfen auch die Entfärbeerscheinungen der zentrifugierten und nachträglich mit Neutralrot gefärbten *Pleurotaenium truncatum*-Zellen (vgl. Kiermayer 1954). Wie ich damals zeigen konnte, entfärben sich bei so präparierten Zellen bei vollkommenem Luftabschluß nur die vom verlagerten Chloroplasten weiter entfernten Wabenvakuolen, während die Vakuolen in unmittelbarer Nähe des Chloroplasten ihre normale Färbung beibehalten (Tafel 5, Fig. 6). Färbt man nun *Pleurotaenium*-Zellen, die vorerst zentrifugiert wurden und dadurch den Chloroplasten stark zentrifugal verlagert haben, mit einer Mischlösung von Toluylenblau und Neutralrot (0,8 cm³ einer Toluylenblau-Stammlösung 1 1000 + 0,2 cm³ einer Neutralrot-Stammlösung + 1 cm³ Pufferlösung von p_{H} 11 + 5 cm³ Aqua dest.), so zeigen sich sehr interessante Färbebilder: Kurz nach der Einfärbung sind alle Wabenvakuolen einheitlich violett gefärbt. Beobachtet man solcher-

art gefärbte Zellen jedoch etwa 10 bis 15 Minuten später, so sind bei einer großen Anzahl von Zellen die vordersten, d. h. die Vakuolen, die am weitesten von Chloroplasten entfernt sind, blaue, die danach anschließenden violett, schließlich die Vakuolen in unmittelbarer Chloroplastennähe rein rot gefärbt (Tafel 5, Fig. 5). Je weiter die Vakuolen einer *Pleurotaenium*-Zelle also vom verlagerten Chloroplasten entfernt sind, desto mehr neigen sie dazu, sich von Violett nach Blau hin umzufärben.

Macht man für diese Umfärbung wieder eine Reaktionsänderung des Zellsaftes verantwortlich, so werden damit die früher gemachten Beobachtungen über die Entfärbung von neutralrotgefärbten und zentrifugierten *Pleurotaenium truncatum*-Zellen verständlich. Aller Wahrscheinlichkeit nach tritt in den Vakuolen, die vom verlagerten Chloroplasten weiter entfernt sind, nach längerem Luftabschluß eine Erhöhung des p_H - Wertes ein, während in den Wabenvakuolen in unmittelbarer Chloroplastennähe die ursprünglich saure Reaktion des Zellsaftes erhalten bleibt. Auf diese Art wird es verständlich, daß in den vom Chloroplasten entfernten Vakuolen das Neutralrot exosmiert, in den Vakuolen beim Chloroplasten aber die Ionenfalle und damit die normale Neutralrotfärbung erhalten bleibt.

IV. Besprechung und Zusammenfassung.

In vorliegender Abhandlung wird über Entfärb- und Umfärberscheinungen an vitalgefärbten Desmidiaceen-Vakuolen berichtet. Orientierend wurden auch Untersuchungen an Epidermischnitten von *Allium cepa* durchgeführt. Zur Anfärbung der Vakuolen kamen nur basische, leicht permeierfähige Farbstoffe, die gleichzeitig auch Redoxindikatoren darstellen, so vor allem Neutralrot, Methylenblau, Toluidinblau, Brillantkresylblau und Toluylblau, zur Verwendung.

Wurde eine Algenprobe, welche Zellen mit stark tingierten Vakuolen enthielt, mittels eines Deckglases bedeckt und luftdicht mit Vaseline abgeschlossen, so zeigten sich nach einiger Zeit auffallende Veränderungen des in den Vakuolen gespeicherten Farbstoffes:

Bei Neutralrotfärbung trat nach 3wöchigem Luftabschluß eine Umfärbung der vorerst roten Vakuolen nach Dottedgelb ein, während sich die mit den oben genannten blauen Farbstoffen tingierten Vakuolen in bedeutend kürzerer Zeit vollkommene entfärbten (vgl. Kiermayer 1954). Da beim Durchsaugen

einer sauerstoffreichen Lösung (z. B. eines Plasmolytikums) durch das Präparat die farblosen Vakuolen sofort wieder ihre ursprüngliche Färbung annahmen, also keine Exosmose der Farbstoffe stattfand, ist sowohl die Um- als die Entfärbung der Vakuolen aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine intrazelluläre Reduktion des gespeicherten Vitalfarbstoffes zurückzuführen; die Wiederfärbung beim Durchsaugen eines sauerstoffreichen Plasmolytikums als Reoxydation aufzufassen. Auf der nachfolgenden, die Versuchsergebnisse zusammenfassenden Tabelle ist zu ersehen, daß die Entfärbedauer je nach dem rH-Wert des verwendeten Farbstoffes verschieden groß ist, d. h. daß Farbstoffe mit höherem rH-Wert in den Vakuolen bei O₂-Mangel erwartungsgemäß rascher reduziert werden als solche mit einem niederen Wert.

Diese Regel scheint jedoch nur dann Geltung zu haben, wenn die Anfärbung der Vakuolen in einem orthochromatischen Farbton erfolgt. Bei metachromatisch gefärbten Vakuolen tritt, wie die nachfolgende Tabelle zeigt, eine bedeutende Verzögerung in der Reduktion des Farbstoffes ein:

rH	Farbstoff, geordnet nach steigendem rH	Vakuolenfärbung	Reduktion des Farbstoffes nach
4 — 7,5 13,5—15,5	Neutralrot	orthochr.	mehreren Tagen
	Methylenblau	orthochr.	etwa 15— 20 Min.
16 —18	Toluidinblau	metachr.	etwa 120—180 Min.
	Brillantkresylblau	metachr.	etwa 60 Min.
		orthochr.	etwa 5— 10 Min.
	Toluylenblau	orthochr.	etwa 5— 10 Min.

Bei metachromatisch gefärbten Vakuolen bleibt daher die Anfärbung auch bei stärkerem Sauerstoffmangel noch viel länger erhalten, als es dem Redoxpotential des Farbstoffes entsprechen würde. Darauf ist vielleicht auch das Erhaltenbleiben der Färbung der metachromatisch tingierten Endvakuolen von Closterien (Cholnoky und Höfler 1950, Kiermayer 1954) zurückzuführen.

Da, wie die Versuche zeigten, Neutralrot nach längerer Zeit intrazellulär zu einer gelben Form reduziert und als solche in den Vakuolen gespeichert wird, schienen Vitalfärbversuche mit Neutralrot, das vorher durch ein chemisches Reduktions-

mittel reduziert wurde (nach Clark und Perkins 1932 als Fluoreszent X bezeichnet), von besonderem Interesse.

Es ergab sich, daß Neutralrot mit einem geringen Zusatz von Rongalit bei Erwärmung in eine gelbe, schon bei gewöhnlichem Tageslicht stark grünlich fluoreszierende Reduktionsstufe übergeht (Clark and Perkins 1932). Wurde eine Algenprobe mit einer solchen Lösung versetzt, so trat bei saurer Reaktion des Farbbades nach längerer Zeit eine starke gelbe Membranfärbung, bei alkalischer Reaktion dagegen eine intensive dottergelbe Vakuolenfärbung ein. Solcherart gefärbte Vakuolen leuchteten im UV-Licht überaus gleißend gelbgrün bis weißgelb. Die rote Primärfluoreszenz der Chloroplasten war entweder gelöscht, oder der Chloroplast leuchtete in einem warmen goldbraunen Farbton.

Eine Ausnahme in der Vakuolenfluoreszenz bildeten jedoch *Netrium digitus* und *Cylindrocystis Brebissonii*, die nach Höfler und Schindler (1951) und Hirn (1953) „volle“, d. h. speicherstoffführende Zellsäfte besitzen. Hier färbten sich die Vakuolen im Hellfeld intensiv braunrot, zeigten dagegen im UV-Licht nicht die geringste Fluoreszenz. Auch die Eigenfluoreszenz der Chloroplasten war hier stets vollkommen gelöscht.

Orientierend wurden auch die Vakuolen der Außen- und Innenepidermis der Zwiebelschuppen von *Allium cepa* bei Fluorochromierung mit Fluoreszent X untersucht. Es stellte sich heraus, daß die „leeren“ Zellsäfte der Innenepidermis überaus stark grün fluoreszierten, die „vollen“ der Außenepidermis dagegen in einem warmen braunen Farbton leuchteten. Somit ergibt sich bei Fluorochromierung mit obigem Farbstoff ein eindeutiger Unterschied in der Fluoreszenz des vollen Zellsaftes von *Netrium* und *Cylindrocystis* und des ebenso als „voll“ bezeichneten Zellsaftes von *Allium*. Diese fluoreszenzoptische Eigenschaft darf vielleicht als ein erster Ansatz zu einer weiteren Unterteilung der „vollen“ Zellsäfte gewertet werden.

Neutralrot in reduzierter Form (Fluoreszent X) stellt somit ein tinktionskräftiges, äußerst unschädliches Färbemittel dar. Da es schon bei geringer Speicherung stark fluoresziert, ist es zur vitalen Fluorochromierung ganz besonders geeignet und empfehlenswert. Darüber hinaus kann Fluoreszent X vermöge seiner leichten Oxydierbarkeit auch als Indikator für intrazelluläre Oxydationsprozesse Verwendung finden.

Einer besonderen Untersuchung wurde ferner das für Vitalfärberversuche noch wenig verwendete Toluylenblau unterworfen. Bei der einstweilen nur orientierenden Bestimmung des

Umschlagspunktes ergab sich, daß dieser, etwas höher als der des Neutralrots, ungefähr bei p_H 8—8,75 gelegen ist. Bei diesem p_H löst sich Toluylenblau bereits teilweise mit rotem Farbton im Benzol, quantitativ geht es jedoch erst im höher alkalischen Bereich, bei etwa p_H 10,1 bis 11,6, in dieses über. Läßt man eine Stammlösung 1 : 1000 von Toluylenblau etwa 3—4 Tage lang bei normalem Lichtzutritt und Zimmertemperatur stehen, so tritt eine fortschreitende Umfärbung der Lösung von Blau nach Violett schließlich nach Rot hin ein. Da nach K a r r e r (1950) beim Kochen einer Toluylenblau-Lösung durch einen Disproportionierungsvorgang Neutralrot entsteht, muß auch diese Umfärbung als eine Umwandlung des Toluylenblaus in Neutralrot gedeutet werden. In einer etwas älteren Toluylenblau-Stammlösung liegt somit stets ein Gemisch von Toluylenblau und Neutralrot vor, wobei bei „jungen“ Lösungen der erste, bei älteren jedoch der letztere Farbstoff überwiegt.

Vitalfärbeversuche mit einem solchen Gemisch bei alkalischer Reaktion des Farbbades ergaben aufschlußreiche Färbebilder: Schon nach kurzer Färbedauer zeigten die Vakuolen der meisten Desmidiaceen allgemein eine leuchtend violette Anfärbung (Mischfärbung aus Neutralrot und Toluylenblau). Dieser Farbton blieb jedoch nicht lange erhalten, sondern schon nach kurzem Deckglasabschluß erfolgte bei einem Teil der Zellen eine Umfärbung nach R o t, bei anderen Zellen der gleichen Art dagegen nach Blau. Während die nach Rot hin umgefärbten Zellen noch viele Stunden, ja oft Tage normal lebensfähig blieben, starben die nach Blau umgefärbten schon kurze Zeit nach ihrer Farbänderung ab. Unmittelbar nach der Umfärbung zeigten aber auch diese blauen Zellen noch Plasmaströmung und gaben normale Plasmolyse. Es muß deshalb angenommen werden, daß die Umfärbung nach Blau zwar noch keine Letalfärbung, jedoch das a l l e r e r s t e A n z e i c h e n einer beginnenden Nekrose darstellt. Dabei dürfte, wie auch schon K ü s t e r (1942) annimmt, eine Verschiebung der Zellsaftreaktion nach der basischen Seite hin erfolgen, die bewirkt, daß Neutralrot mit dem niedrigeren Umschlagspunkt molekular wird und exosmiert, während für Toluylenblau die Ionenfalle noch weiterhin erhalten bleibt. Auf diese Art wird die Umfärbung von Violett nach Blau unmittelbar verständlich. Die Verfärbung von Violett nach Rot, bei der die Zellen normal lebensfähig bleiben, ist dagegen sicher auf die Reduktion des Toluylenblaus zur farblosen Leukobase zurückzuführen.

Auch die Entfärbung von mit reinem Neutralrot gefärbten Vakuolen bei zentrifugierten *Pleurotaenium truncatum*-Zellen

(Kiermayer 1954) beruht aller Wahrscheinlichkeit auf einer Reaktionsänderung des Zellsaftes und der damit verbundenen Exosmose des Farbstoffes.

Die Methode der simultanen Doppelfärbung mit Toluylenblau und Neutralrot zeigt somit noch vor dem Aufhören der Plasmaströmung und bei normaler Plasmolyse den allerersten Beginn einer Nekrose an. Bei weiterem Ausbau der Methodik wird es damit vielleicht möglich werden, in Zweifelsfällen Nekrose- bzw. Tonoplastenzustände auch vitalfärberisch zu charakterisieren. Auf erste diesbezügliche Untersuchungen an Spirogyra-Tonoplasten kann aber erst in einer weiteren Arbeit eingegangen werden.

Literaturverzeichnis.

- Becker, E. R. (1926): Vital staining and reduction of vital stains by Protozoa. Biol. Bull. Vol. 50, 3.
- Betz, A. (1953): Untersuchungen über Verhalten und Wirkung der Vitalfarbstoffe Prune pure und Akridinorange sowie Beobachtungen über das Reduktions-Oxydationspotential in Zellen höherer Pflanzen. Planta 41/323—357.
- Brooks, S. C. and Brooks, M. M. (1941): The Permeability of living cells. Prot.-Monogr. 19.
- Cannan, R. K., Cohen, B., and Clark, W. M. (1926): Studies on oxidation-reduction. X, Pub. Health Rep. U.S.P.H.
- Cholnoky, B. v. und Höfler, K. (1950): Vergleichende Vitalfärversuche an Hochmooralgen. Sitz.-Ber. d. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 159. Bd., Heft 6—10, 142.
- Cholnoky, B. v. und Schindler, H. (1951): Winterlicher Diatomeen-Aspekt des Ramsauer Torfmoores. Verh. d. zool.-bot. Ges., Bd. 92, 228.
- Clark, W. M. (1920): Reduction potential of mixtures of indigo and indigo white, and of mixtures of methylene blue and methylene white. J. Washington Acad. Sc., X, 255.
- (1923): Studies on oxidation-reduction. Pub. Health Rep. 38, 443—455.
- Clark, W. M. and Perkins, M. E. (1932): Studies on Oxidation-Reduction. XVII. Neutral red. J. americ. chem. Soc. 54/I, 1228—1248.
- Cohen, B., Chambers, R. and Reznikoff, P. (1928): Inter-cellular oxidation-reduction studies I. J. gen. physiol. 11, 585.
- Diskus, A. und Kiermayer, O. (1954): Die Raphidenzellen von Haemaria discolor bei Vitalfärbung. Prot. 43, 450—454.
- Drawert, H. (1940): Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. II. Die Aufnahme basischer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 34, 159.
- (1948): Zur Theorie der Aufnahme basischer Stoffe. Zeitschr. f. Naturforschung, Bd. 3 b, 111.
- (1949): Zur Frage der Methylenblauspeicherung in Pflanzenzellen II. Zeitschr. f. Naturforschung, Bd. 4 b, 35.
- (1953): Vitale Fluorchromierung der Mikrosomen mit Janusgrün, Nilblausulfat und Berberinsulfat. Ber. d. d. bot. Ges. 66, 135—151.

- Fritz, A. (1951): Veränderungen von Plasmaeigenschaften durch Vitalfarbstoffe I. Prune pure. Sitz.-Ber. d. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 160, 789—828.
- Gillespie, L. J. (1920): Reduction potentials of bacterial cultures of waterlogged soils. Soil Sc., IX, 199.
- Hirn, I. (1953): Vitalfärbestudien an Desmidiaceen. Flora Bd. 140, 453.
- Höfler, K. und Schindler, H. (1951): Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentration. Prot. 40, 137.
- (1952): Algengallerten im Vitalfärbeversuch. Österr. Bot. Zeitschr. 99, 529.
- (1953): Vitalfärbbarkeit verschiedener Closterien. Protopl. 42, 296.
- Karrer, P. (1950): Lehrbuch der organischen Chemie. 11. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kiermayer, O. (1954): Die Vakuolen der Desmidiaceen, ihr Verhalten bei Vitalfärbe- und Zentrifugierungsversuchen. Sitz.-Ber. d. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 162. Bd., 175—222.
- (1955): Ringförmige Zellinhaltskörper bei Spirogyra maxima. Protoplasma 45, 150.
- Kinzel, H. (1954 a): pH-Werte alkalischer Phosphatpufferlösungen. Protopl. 43, 441—449.
- (1954 b): Theoretische Betrachtungen zur Ionenspeicherung basischer Vitalfarbstoffe in leeren Zellsäften. Protopl. 44, 52—72.
- Krebs, I. (1951): Beiträge zur Kenntnis des Desmidiaceen-Protoplasten. I. Osmotische Werte. II. Plastidenkonsistenz. Sitz.-Ber. d. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 160. Bd., 579.
- Küster, E. (1938): Über Vererbung, insbesondere über Vergoldungserscheinungen an Pflanzenzellen. Z. Mikr. 55, 166.
- (1942): Vitalfärbung und Vakuolenkontraktion. Zeitschr. f. wiss. Mikr. 58, 245.
- Loub, W. (1951): Über die Resistenz verschiedener Algen gegen Vitalfarbstoffe. Sitz.-Ber. d. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 160, 829.
- (1953): Zur Algenflora der Lungauer Moore. Sitz.-Ber. d. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 162, 545—569.
- Loub, W., Url, W., Kiermayer, O., Diskus, A. und Hilmbauer, K. (1954): Die Algenzonierung in Mooren des österreichischen Alpengebietes. Sitz.-Ber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl., Abt. I, 163, 447 bis 494.
- Nassanov, D. (1930): Über den Einfluß der Oxydationsprozesse auf die Verteilung von Vitalfarbstoffen in den Zellen. Z. f. Zellforschung 11.
- Needham, J. and Needham, D. (1925): The hydrogen-ion concentration and the oxidation-reduction potential of the cell-interior; a micro-injection study. Proc. Roy. Soc. London B 98, 259.
- (1926): Further micro-injection studies of the oxidation-reduction potential of the cell-interior. Proc. Roy. Soc. London B 99, 383.
- Rapkine, L. et Wurmser, R. (1926 a): Le potentiel de reduction des cellules vertes. Comp. Rend. Soc. Biol. 94, 1347.
- (1926 b): Sur le potentiel du reduction des cellules. Comp. Rend. Soc. Biol. Paris 95, 604.
- Rapkine, L., Struyk, A. et Wurmser, R. (1929 a): Le potentiel d'oxydo-reduction de quelques colorants vitaux. Comp. Rend. Soc. Biol. Paris 100.
- (1929 b): Le potentiel d'oxydo-reduction de quelques colorants vitaux. J. chim. phys. 26.

- R h u m b l e r, L. (1893): Eine Doppelfärbung zur Unterscheidung lebender Substanzen. Zool. Anz. 16, 47—57.
- R u z i c k a, V l. (1904): Über tinctorielle Differenzen zwischen lebendem und abgestorbenem Protoplasma. Arch. ges. Phys. 107, 497.
- S t r u g g e r, S. (1949 b): Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Auflage. Berlin—Göttingen—Heidelberg.
- W a n k e l l, F r. (1921): Über Reduktion basischer Farbstoffe im lebenden Protoplasma. Ber. d. naturforschenden Ges. Freiburg. Bd. 23, Heft 1.
- W e b e r, F. (1933): Zur Permeabilität der Schließzellen. Prot. 19, 452.
- W e s t, W. and G. S. (1904—1912): A Monograph of the British Desmidiaceae, Vol. I—IV. London.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse](#)

Jahr/Year: 1955

Band/Volume: [164](#)

Autor(en)/Author(s): Kiermayer Oswald

Artikel/Article: [Über die Reduktion basischer Vitalfarbstoffe in pflanzlichen Vakuolen. 275-302](#)